

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<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup>. 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Dra Kátia Perez e Prof<sup>a</sup> 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 docente, 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 à 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<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> produzem grandes quantidades de IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells produce large amounts of IFN- $\gamma$  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.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Classificação dos países segundo o estágio de eliminação da malária.	23
<b>Figura 2</b> - Incidência Parasitária Anual (IPA) na América Latina em 2011.	24
<b>Gráfico 1</b> - Casos de malária notificados no Brasil entre 2000 – 2012.	26
<b>Figura 3</b> - Incidência Parasitária Anual (IPA) por unidade federada (UF), na Região Amazônica, Brasil, 2010 e 2011.	26
<b>Gráfico 2</b> - Óbitos por malária notificados no Brasil entre 2000 – 2012.	27
<b>Figura 4</b> - Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i> , mostrando as fases dentro do hospedeiro vertebrado e no hospedeiro invertebrado.	30
<b>Figura 5</b> - Esquema mostrando um alvéolo sadio e um alvéolo durante o processo inflamatório com a produção citocinas, quimiocinas, proteases, migração e ativação celular, bem como o processo de reparo tecidual com apoptose, formação de fibrina e produção de fatores anti-inflamatórios durante a LPA/SDRA.	41
<b>Figura 6</b> - Modelo experimental de camundongos DBA/2 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.	51
<b>Figura 7</b> - Camundongos DBA/2 alocados dentro de câmaras plestimográficas (BUXCO Electronics, EUA).	53
<b>Figura 8</b> - Coleta de sangue em camundongo a partir da veia submandibular.	59
<b>Gráfico 3</b> - (A) Parasitemia e (B) curva de sobrevivência em que 60% dos animais infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA desenvolvem a LPA/SDRA entre o 7º e o 12º dias pós-infecção.	66
<b>Gráfico 4</b> – Perfil respiratório dos animais não infectados e infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.	67
<b>Figura 9</b> - Exemplos de curva ROC dos três diferentes parâmetros clínicos utilizados.	69
<b>Gráfico 5</b> - Os gráficos A, B e C representam os parâmetros respiratórios (Penh e FR) e a parasitemia no 7º dia após a infecção dos camundongos do grupo de sobrevivência que vieram a óbito por LPA/SDRA ou HP e (D, E, F) são os mesmos parâmetros medidos nos grupos sacrificados no 7º dia pós-	70

infecção em que foram repassados os valores de corte conforme o modelo preditivo.

**Gráfico 6** - Análise por citometria de fluxo do perfil leucocitário dos pulmões dos animais não infectados e infectados com *P.berghei* ANKA. 73

**Gráfico 7** - Análise por citometria de fluxo do perfil leucocitário dos pulmões no 7º dia após infecção dos animais LPA/SDRA e HP. 74

**Gráfico 8** - Análise por citometria do fluxo das populações de células do baço. 76

**Figura 10** - Pseudocolor Plots mostrando as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> estimuladas e basais produtoras de IFN- $\gamma$  nos animais não infectados (NI), LPA/SDRA e HP. 78

**Gráfico 9** – Análise intracelular da citocina IFN- $\gamma$  por citometria de fluxo. 79

**Gráfico 10** - Quantificação dos níveis séricos das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos animais sacrificados no 7º dia pós-infecção. 80

**Gráfico 11** - Medianas de fluorescência (MIF) dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> para as moléculas CD69, CD62L e CD44 nos animais não infectados, LPA/SDRA e HP. 82

**Figura 11** - Histogramas representativos das marcações de ativação utilizando os marcadores CD69, CD62L e CD44 para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. 83

**Gráfico 12** - Medianas de fluorescência (MIF) dos macrófagos intersticiais (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e macrófagos alveolares (F4/80+CD11c+) para as moléculas CD80 e CD86 nos animais não infectados, LPA/SDRA e HP. 84

**Figura 12** - Histogramas representativos das marcações de ativação utilizando os marcadores CD80 e CD86 para os macrófagos alveolares e intersticiais. 85

**Gráfico 13** - Quantificação da mieloperoxidase (MPO) produzida pela ativação dos neutrófilos. 86

**Gráfico 14** - Análise da ativação dos neutrófilos pulmonares pela Dihidrorodamina 123 (DHR 123) no 7º dia pós-infecção. 87

**Figura 13** - Análise por citometria de fluxo da ativação dos neutrófilos pulmonares (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) no 7º dia pós-infecção nos animais não infectados (NI), LPA/SDRA e HP. 88

**Gráfico 15** – (A) Curva de Sobrevivência e (B) Parasitemia dos animais infectados com *P.berghei* ANKA tratados com (0,2 mg/kg) de anticorpo anti- 90

Gr1 e (0,2 mg/kg) de anticorpo IgG no primeiro dia pós-infecção.

**Gráficos 16** - (A, B e C) Quantificação por citometria de fluxo do número de neutrófilos, monócitos e linfócitos por microlitros de sangue coletado dos animais controle (IgG) e depletados (anti-Gr1) nos dias 0, 2 e 7 pós-infecção. (D, E e F) contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) por esfregaço sanguíneo dos animais infectados nos dias 0, 2, 5, 7 e 9 pós-infecção. 90

**Gráfico 17** - (A) Curva de Sobrevivência e (B) Parasitemia dos animais infectados com *P.berghei* ANKA tratados com (0,9%) de solução salina e (12µg em 100µl) de lipossomas contendo clodronato no primeiro dia pós-infecção. 92

**Gráfico 18** - (A, B e C) Contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) por esfregaço sanguíneo nos dias 0,2,4,7,9 e 12 pós-infecção dos animais tratados com clodronato e com solução salina. (D, E, F e G) Quantificação por citometria de fluxo do número de neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos alveolares em três diferentes tempos (48h, 96h e 140h) após a dose de clodronato. 92

**Figura 14** - Método de TUNEL em tecido pulmonar de camundongos não infectados e infectados com *P. berghei* ANKA no 7º (fluorescência verde) e 8º (fluorescência vermelha) dias pós-infecção (aumento de 20x). 94

**Gráfico 19** - Quantificação de células em apoptose por µm<sup>2</sup> do tecido pulmonar de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA sacrificados no 7º e 8º dias pós-infecção analisados pelo método de fluorescência de TUNEL. A quantificação foi realizada em fotos retiradas no aumento de 20X, sendo fotografados 10 diferentes campos por tecido. 94

**Figura 15** - Pseudocolor Plots mostrando a marcação das células do lavado broncoalveolar (LBA) com Anexina-V e 7AAD nos animais NI, LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção. 95

**Gráfico 20** - (A e C) Frequência e número total de células do LBA que estão em apoptose (AnexinaV<sup>+</sup>) e (B e D) Frequência e número total de células do LBA que estão em necrose (AnexinaV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>). 96

**Gráfico 21** - Fenotipagem das células do LBA dos camundongos NI, 97

LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção (A) Frequência de populações e (B) Número total de células). (C e D) Fenotipagem das células vivas (AnexinaV<sup>-</sup>) e em apoptose (AnexinaV<sup>+</sup>) do LBA marcadas com os anticorpos CD3<sup>+</sup> (linfócitos); CD11c<sup>+</sup> (dendríticas); F480<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (macrófagos) e Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (neutrófilos).

**Gráfico 22** - (A) Expressão relativa de RNAm do gene Bak e (B) Expressão relativa de RNAm do gene Bcl2 nos animais LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção. 99

**Figura 16** - (A) Gráfico mostrando no eixo Y o valor estatístico p (*p Value*) e no eixo X o valor Logarítmico (*Log2 Fold Difference*) dos 82 genes regulados positiva ou negativamente para a morte celular programada. (B) Representação gráfica dos 32 genes significativos para o ensaio de PCR Array (Qiagen), mostrando os 29 genes regulados positivamente e os 3 genes regulados negativamente. 101

**Figura 17** - Diagrama da interação de moléculas na via de apoptose extrínseca e intrínseca utilizando os genes com valores de  $p \leq 0,1$  (marcados com estrela). 102

**Figura 18** - Diagramas das interações de moléculas nas vias da apoptose. 103

**Gráfico 23** - (A, B e D-H) Expressão relativa dos genes pró-apoptóticos (Casp3, Casp9, Bid, Bad, FADD, CAD e Ripk-1) e (C e I) anti-apoptóticos (Akt e Bcl-XL) nos animais LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção. 104

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Casos confirmados de malária no Brasil por ano e por sexo. Casos notificados no SINAN e no SIVEP-Malária. 27
- Tabela 2** – Lista de primers contendo genes pró e anti-apoptóticos mais gene constitutivo. 65
- Tabela 3** - Resultados do PCR-Array. Genes regulados positivamente (+) e negativamente (-) presentes ou não nos diagramas de vias (*pathway*). 100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALI/ARDS	<i>Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
LPA/SDRA	Lesão Pulmonar Aguda/ Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
OMS	Organização Mundial de Saúde
SISMAL	Sistema de Informação do Programa Nacional de Controle a Malária
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária
SINAN	Sistema de Informações de Agravos e Notificações
IPA	Incidência Parasitária Anual
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
AM	Acidose Metabólica
MC	Malária Cerebral
MP	Malária Placentária
IRA	Insuficiência Renal Aguda
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule 1</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
CSA	<i>Chondroitin Sulfate A</i>
IFN- $\gamma$	Interferon - gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-8	Interleucina 8
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
IgG	Imunoglobulina G
CCEA	Conferência de Consenso Europeia/Americana
PMN	Polimorfonucleares

NO	<i>Nitric Oxide</i>
TIMP	<i>Timp Metallopeptidase Inhibitor</i>
CTI	Centro de Terapia Intensiva
ECM	<i>Degranulation Extracellular Matrix</i>
FR	Frequência Respiratória
Penh	Pausa Respiratória
BID	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
BAX	<i>Bcl2 Associated X Protein</i>
BAK	<i>Bcl2 Antagonist Killer</i>
BCL-2	<i>B Cell Lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>B Cell Lymphoma Extra Large</i>
TNFR-1	<i>Tumour Necrosis Factor Receptor 1</i>
Casp-3	<i>Caspase 3</i>
Casp-9	<i>Caspase 9</i>
FAS	<i>Fas Cell Surface Death Receptor</i>
FASL	<i>Fas Ligand</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumoral Necrosis Factor Alfa</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
EP	Eritrócitos Parasitados
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
FADD	<i>Fas Associated via Death Domain</i>
RIPK-1	<i>Receptor TNFRSF Interacting Serine/Threonine Kinase 1</i>
P53	<i>Tumour protein P53</i>
XIAP	<i>X Linked Inhibitor of Apoptosis</i>
CAD/DFFB	<i>DNA Fragmentation Factor Beta</i>
TRAIL	<i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
AKT	<i>RAC-Alpha Serine/Threonine protein Kinase</i>
DHR 123	Dihidrorodamina 123
qRT-PCR	<i>quantitative Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
HP	Hiperparasitemia
NI	Não Infectado

IL1- $\beta$	Interleucina 1 beta
LBA	Lavado Broncoalveolar
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TRALI	<i>Transfusion Related Acute Lung Injury</i>
IgIV	<i>Intravenous Immunoglobuline</i>
MA	Macrófago Alveolar
MI	Macrófago Intersticial
H1N1	<i>Influenza A subtype H1N1</i>
VILI/IPIV	<i>Ventilator Induced Lung Injury</i>
mDC	<i>mieloide Dendritic Cell</i>
pDC	<i>plasmocitoide Dendritic Cell</i>
HA	Hiperrreatividade Aérea
MIP-2	<i>Chemokine ligand 2</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
DAD	<i>Difuse Alveolar Damage</i>
IPAH	Injuria Pulmonar Aguda por Hiperóxia
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
OVA	<i>Ovalbumin</i>



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>23</b>
2.1. A malária no Mundo e no Brasil	23
2.2. A história da malária e seu ciclo biológico	28
2.3. A malária e suas consequências	31
2.4. Aspectos imunológicos da malária	34
2.5. Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)	37
2.6. O papel da apoptose na LPA/SDRA	41
2.7. A LPA/SDRA associada a malária	43
2.8. Modelos animais para LPA/SDRA associada a malária	45
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
3.1. Objetivo central	49
3.2. Objetivos específicos	49
<b>4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>50</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>52</b>
5.1. Animais e parasitas.	52
5.2. Avaliação dos parâmetros respiratórios em câmaras plestimográficas.	52
5.3. Obtenção de células do tecido pulmonar.	53
5.4. Obtenção de células esplênicas.	53
5.5. Avaliação da resposta inflamatória por citometria de fluxo de células extraídas dos pulmões e do baço.	54
5.6. Ensaio de ativação de linfócitos, macrófagos e neutrófilos de células pulmonares pelo método de citometria de fluxo.	54
5.7. Quantificação de citocina IFN- $\gamma$ em linfócitos CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> por citometria de fluxo (ensaio intracelular).	55
5.8. Ensaio de ELISA para detecção de IFN- $\gamma$ e IL-10 no soro de animais sacrificados no 7 <sup>o</sup> dia pós-infecção.	55
5.9. Aquisição do lavado broncoalveolar de camundongos DBA/2	56
5.10. Ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos nos pulmões e no lavado broncoalveolar	56
5.11. Ensaio de citometria de fluxo utilizando o marcador de atividade de neutrófilos DHR 123	57
5.12. Cultivo de Hibridoma RB6-8C5	57
5.13. Purificação das células RB6-8C5 para obtenção de anticorpo monoclonal anti-GR1	58
5.14. Ensaio de depleção de células GR1 <sup>+</sup>	58
5.14.1. Coleta de sangue, parasitemia e contagem diferencial das células brancas do sangue	59
5.14.2. Fenotipagem das células brancas do sangue por citometria de fluxo	59
5.15. Preparação de lipossomas com clodronato	60

5.16. Ensaio de depleção de macrófagos utilizando-se clodronato em partículas lipossomais	61
5.16.1. Coleta de tecido, parasitemia e contagem diferencial das células brancas do sangue	61
5.17. Coleta, fixação e congelamento de tecidos para ensaios de detecção de apoptose	61
5.18. Reação de TUNEL para células apoptóticas	61
5.19. Reação de anexina-V por citometria de fluxo	62
5.20. Quantificação de genes de morte celular programada por meio da reação em cadeiacom transcriptase reversa quantitativa com o kit PAMM-012ZC apoptose array	63
5.21. Ontologia de genes e geração de vias de apoptose através da análise de bioinformática	63
5.22. Reação da polimerase em cadeiacom transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR)	64
5.23. Análises Estatísticas	65
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>66</b>
6.1. Estabelecimento de perfil de parasitemia e monitoramento da sobrevivência dos camundongos infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.	66
6.2. Perfil respiratório de camundongos DBA/2 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA mensurados em câmaras plestimográficas	67
6.3. Classificação dos animais nos grupos LPA/SDRA ou HP conforme modelo preditivo	68
6.4. Análise por citometria de fluxo da população leucocitária pulmonar e esplênica dos animais infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	71
6.4.1. Animais infectados por <i>P.berghei</i> ANKA apresentam maior população leucocitária pulmonar	71
6.4.2. Animais infectados por <i>P.berghei</i> ANKA que desenvolvem LPA/SDRA apresentam maior número de neutrófilos e macrófagos alveolares	71
6.4.3. Animais infectados por <i>P.berghei</i> ANKA apresentam maior população leucocitária esplênica	75
6.5. A produção de interferon- $\gamma$ pelas células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> é maior nos animais LPA/SDRA do que nos animais HP	77
6.6. Níveis séricos das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 estão aumentadas no 7 <sup>o</sup> dia pós-infecção em animais LPA/SDRA	79
6.7. Análise por citometria de fluxo da ativação de macrófagos e linfócitos dos pulmões no 7 <sup>o</sup> dia pós-infecção dos animais LPA/SDRA e HP	81
6.8. A mieloperoxidase (MPO) produzida pelos neutrófilos do lavado broncoalveolar e dos pulmões é maior nos animais LPA/SDRA	86
6.9. Os neutrófilos pulmonares dos animais LPA/SDRA produzem mais espécies reativas de oxigênio que os animais HP	87
6.10. A ausência de neutrófilos em DBA/2 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA aumenta a sobrevivência dos animais e protege do desenvolvimento da LPA/SDRA associada a malária	88
6.11. A ausência de macrófagos em DBA/2 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA aumenta a sobrevivência dos animais e protege do	91

desenvolvimento da LPA/SDRA associada a malária	
6.12. A morte celular programada (apoptose) nos pulmões de animais LPA/SDRA está mais presente que em animais HP	93
6.13. Há mais células em apoptose, mas não necróticas no lavado broncoalveolar dos animais LPA/SDRA em relação aos animais HP	95
6.14. Fenotipagem das células vivas (Anexina-V <sup>-</sup> ) e em apoptose (Anexina-V <sup>+</sup> ) do LBA dos camundongos infectados com <i>P.berghei</i> ANKA sacrificados no 7 <sup>o</sup> dia pós-infecção	96
6.15. Expressão de genes pró e anti-apoptóticos estão envolvidos no desenvolvimento da LPA/SDRA associada a malária	98
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>105</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>128</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>130</b>

## 1 INTRODUÇÃO & JUSTIFICATIVA

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 (Gomes et al., 2011; WHO, 2013).

As complicações observadas na malária são: acidose metabólica, malária cerebral, anemia severa e complicações pulmonares, conhecidas como lesão pulmonar aguda, também chamada (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), são cada vez mais observadas em pacientes infectados por *P. vivax* (Price et al. 2007; Tan et al. 2008). Recentemente, *P. vivax* tem sido referido como agente causador de LPA/SDRA associada à malária severa, quadro clínico observado anteriormente, apenas em infecções por *P. falciparum* (World Health Organization, 2000)

A LPA/SDRA é caracterizada pela inflamação aguda e 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 em pacientes críticos, podendo levá-los ao óbito (Anstey et al. 2002; Goodman et al. 2003).

A patogenia da LPA/SDRA associada à malária é multifatorial, pois não se conhece os mecanismos de desenvolvimento da doença e nem formas de diagnóstico precoce que permitam um tratamento efetivo e que evite a morte do paciente (Good et al., 2005; Mohan et al., 2008).

Recentemente, demonstrou-se que diferentes componentes da resposta imune estão envolvidos na patogênese da SDRA associada à malária, como o envolvimento de proteínas que induzem o aumento da permeabilidade do epitélio pulmonar e a elevação de algumas citocinas e quimiocinas (Epiphany et al., 2010; Van den Steen et al., 2010). Van den Steen e colaboradores mostraram o aumento da TNF- $\alpha$  e de IL-10 nos pulmões dos animais infectados com *P. berghei* NK65 que desenvolveram a síndrome em comparação com animais infectados com *P. chabaudi* AS. O autor ainda apontou o envolvimento das células T CD8<sup>+</sup> na patogênese da SDRA, uma vez que estas estão aumentadas durante o desenvolvimento da lesão pulmonar e, o quadro é revertido utilizando-se anticorpos anti-CD8<sup>+</sup> (Van den Steen et al., 2010).

Hee e colaboradores trabalhando com modelo murino cujo comprometimento pulmonar associado à malária é discreto, constataram aumento da população leucocitária de neutrófilos e monócitos, além de um aumento progressivo das células T CD4<sup>+</sup> associado a um grande número de células T CD8<sup>+</sup> nos pulmões durante a infecção (Hee et al., 2011).

Receptores e proteínas pró ou anti-apoptóticas possuem envolvimento nas doenças pulmonares e são fundamentais para o entendimento dos processos fisiopatológicos ligados a LPA/SDRA (Matute-Bello and Martin 2003). A apoptose pode ser promovida ou suprimida por vários receptores e proteínas celulares, tais como as proteínas da família das Caspases (-3, -6, -7, -8, -9 e -10) (Denault and Salvesen 2002), proteínas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bax e Bak) (Hengartner 2000), proteínas p53, receptores da família TNF (TNFR-1, Fas/CD95 e TRAIL) entre outros (Ashkenazi, 2002; Grivicich et al., 2007).

O papel das proteínas e dos receptores na inibição ou ativação da apoptose nas células do epitélio alveolar, vem sendo amplamente estudadas por diferentes grupos.

Croker e colaboradores pesquisaram as vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose na sobrevivência dos neutrófilos. Nesse estudo, os autores relacionam as perturbações (sobrevivência ou morte) na vida dos neutrófilos à decorrência de doenças pulmonares severas como LPA, SIRS, pneumonia e bronquiolites (Croker et al., 2011).

Apesar de nos últimos anos alguns estudos terem definido as manifestações clínicas da LPA/SDRA, os mecanismos celulares e moleculares que conduzem à síndrome ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma possível explicação para este fato é que os estudos em seres humanos, embora sejam essenciais, não são suficientes, devido às limitações óbvias intrínsecas aos sistemas experimentais humanos e à acessibilidade ao material biológico nos diferentes estágios da doença. Deste modo, os modelos murinos permitem estudar os mecanismos imunopatológicos envolvidos em condições experimentais definidas e controladas.

Em nossos trabalhos demonstramos características similares à LPA/SDRA humana, no que diz respeito aos achados histopatológicos como edema e hemorragias pulmonares severas, presença de células inflamatórias, associado à efusão pleural, aumento da permeabilidade vascular pulmonar, opacidade pulmonar unilateral ou bilateral observado pelo raios-X e hipoxemia (Epiphany et al., 2010; Ortolan et al., 2014).

Ainda, descrevemos um modelo preditivo para estudar a patogênese da LPA/SDRA associada à malária precocemente. Neste modelo conseguimos prever antes do momento da morte quais os animais que irão desenvolver a LPA/SDRA ou morrer tardiamente apresentando sinais de anemia e hiperparasitemia (Ortolan et al., 2014).

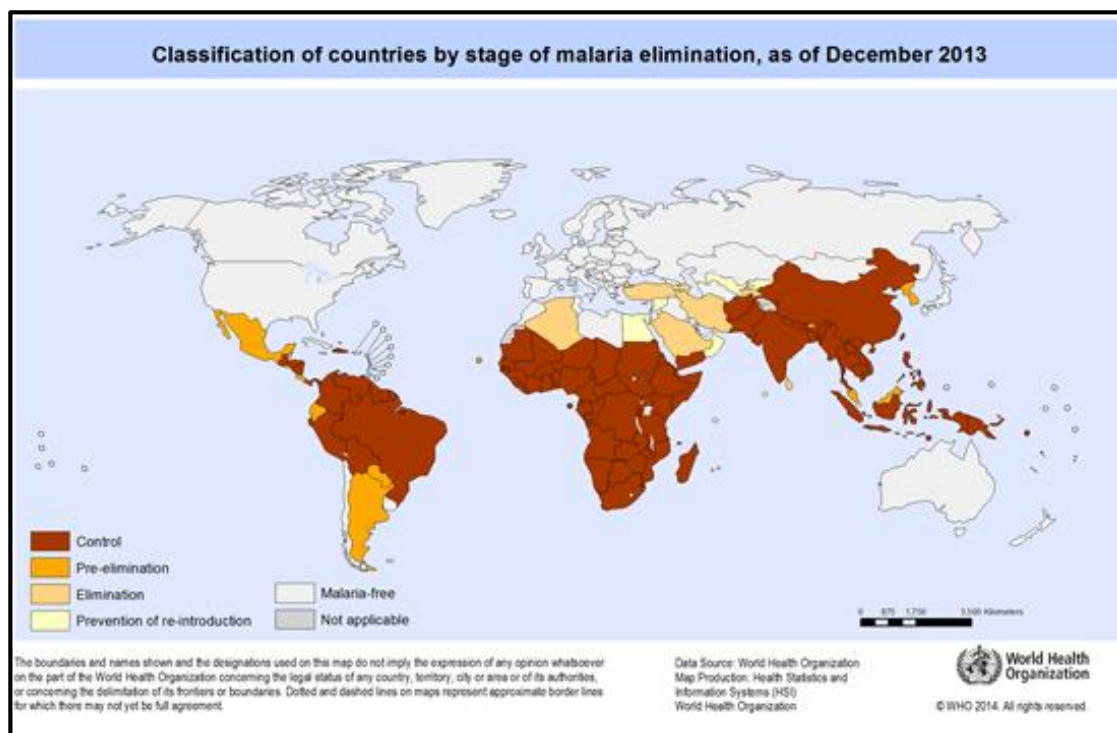
Assim, face ao quase completo desconhecimento dos elementos determinantes da patogenia da LPA/SDRA, o presente trabalho teve **como objetivo reconhecer e caracterizar o perfil leucocitário pulmonar, os fatores inflamatórios e a morte celular que contribuem para o desenvolvimento da LPA/SDRA** associada à malária murina.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A malária no Mundo e no Brasil

A malária é uma doença parasitária que mesmo tendo prevenção e tratamento ainda proporciona um grande impacto no desenvolvimento econômico mundial e na saúde pública, apresentando riscos às diversas populações, principalmente as localizadas nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 1) (Gomes et al., 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2013, a malária foi considerada endêmica em 104 países, sendo que destes 97 estão com transmissão em curso (fase controle) e sete estão em fase pré-eliminação, evitando a reintrodução da doença (Cotter et al., 2013; WHO, 2013).



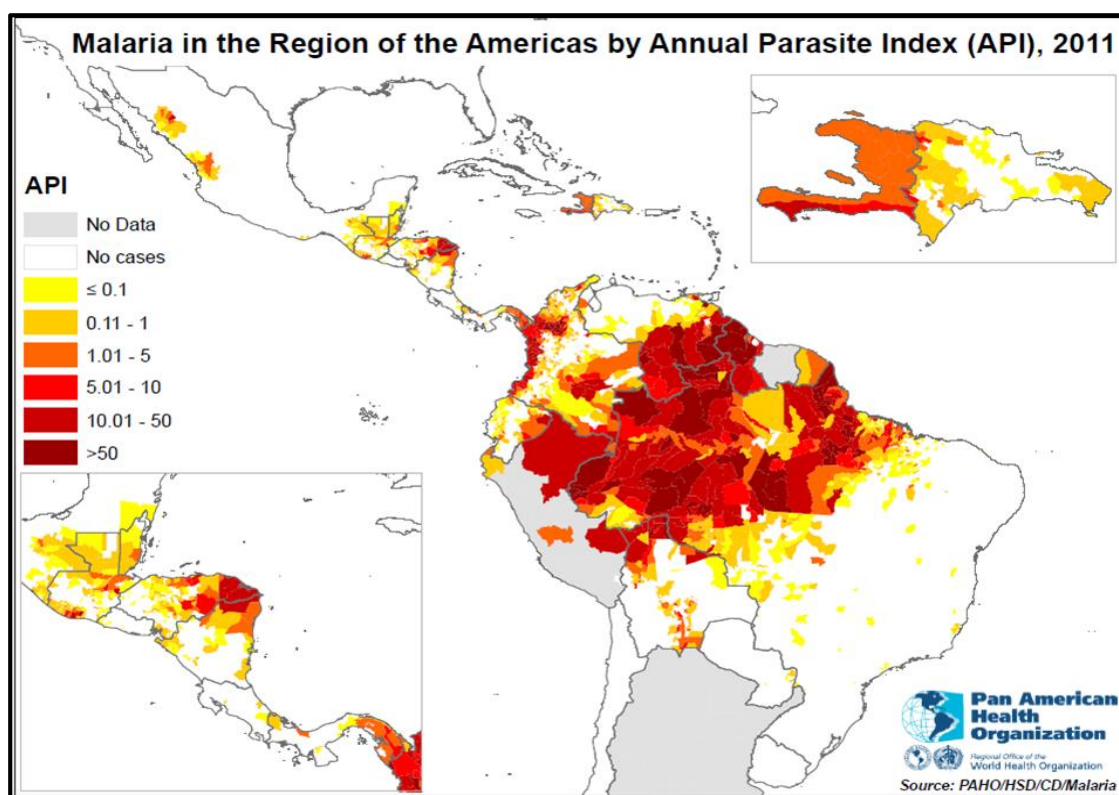
**Figura 1** - Classificação dos países segundo o estágio de eliminação da malária. Países em fase de eliminação ou controle encontram-se principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2014.

Em 2013, estimou-se que cerca de 3,4 bilhões de pessoas estavam em regiões de risco para malária. Cerca de 207 milhões de pessoas adquiriram a doença e 607.000 foram a óbito nesse ano. Destes óbitos, 90% aconteceram na África, sendo que 77% foram de crianças menores de 5 anos (WHO, 2013).

Na América Latina estima-se que 145 milhões de pessoas em 21 países encontram-se em risco de contrair malária. Em 2012, segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) 469.000 pessoas contraíram a doença e 108 foram a óbito (Arevalo-Herrera et al., 2012).

A contribuição da América Latina em número de casos de malária é baixa, onde ocorre cerca de 1% (3 milhões de casos) do total global. A região Amazônica, a qual abrange Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela apresenta 90% destes casos (Hay et al., 2010; Arevalo-Herrera et al., 2012).

O Brasil é o país que concentra o maior número de casos na América Latina, sendo estimados 300.000 casos anuais. Cerca de 99% deles ocorrem na Amazônia Legal que compreende os estados do Acre, Rondônia, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Roraima, Amazonas e Tocantins. No Brasil a malária é causada por três espécies de plasmódio: *Plasmodium vivax* (83,7% dos casos) seguido por *Plasmodium falciparum* (16,3% dos casos) e *Plasmodium malariae* <1% dos casos (Figura 2) (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).



**Figura 2** - Incidência Parasitária Anual (IPA) na América Latina em 2011. Nota-se que a região da Amazônia Legal no Brasil é responsável por um grande número de casos de malária. Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde, 2011.



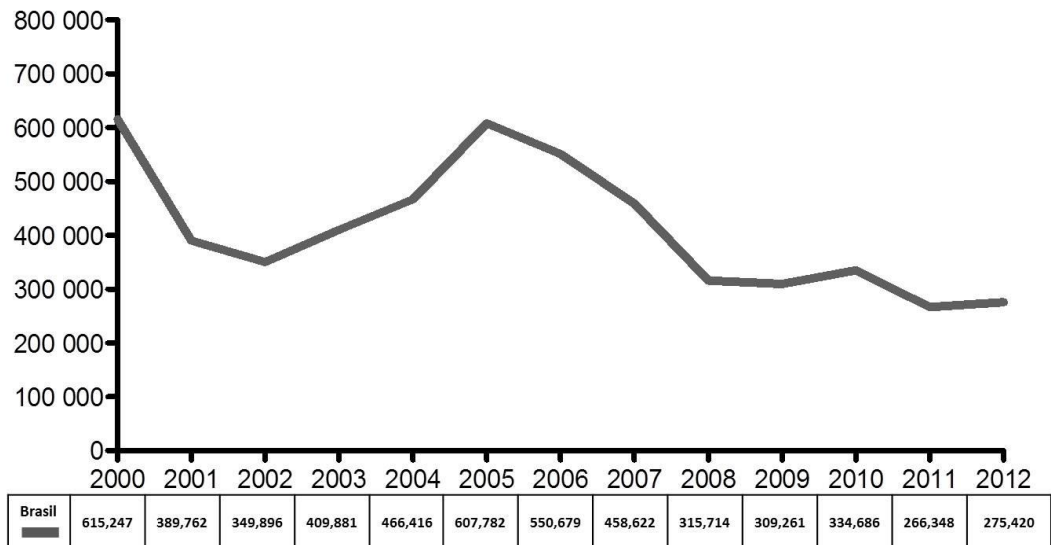
Até o início dos anos 90, *Plasmodium vivax* era visto como causador de uma malária benigna que promovia baixa letalidade. No entanto, conforme foram se estabelecendo programas como o Sistema de Informação do Programa Nacional de Controle da Malária (SISMAL), que funcionou de 1998 a 2002, do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (SIVEP) e do Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN) foi possível verificar que o *Plasmodium vivax* também promovia formas severas de malária, bem como mortalidade (Andrade et al., 2010; Medeiros et al., 2010).

O SIVEP-malária é um sistema de notificações de casos que abrange toda a região Amazônica e que está ativo desde o ano de 2003, enquanto o SINAN é responsável pela notificação do resto do país, sendo ambos os responsáveis por gerir os bancos de dados dos casos de malária que ocorrem anualmente (Brasil. Ministério da Saúde 2012b, 2012c).

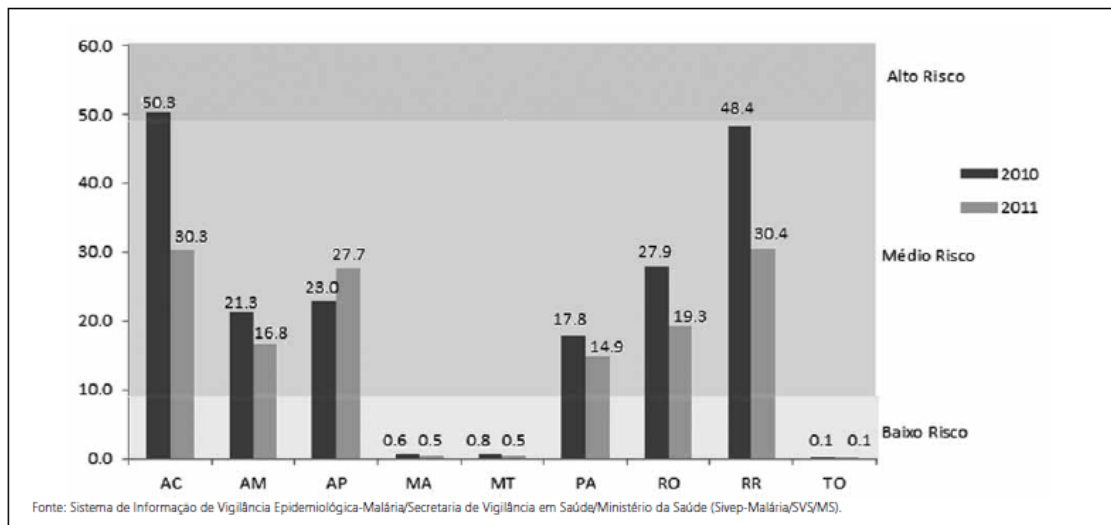
De acordo com esses dados, em 2012 foram notificados 275.420 casos confirmados de malária nos estados brasileiros, sendo que 99,75% foram notificados na Amazônia Legal (Brasil. Ministério da Saúde 2012b, 2012c).

Segundo o boletim epidemiológico de 2013, o número de casos de malária no Brasil vem diminuindo desde 2006 e, tal fato deve-se a contratação e a qualificação de profissionais envolvidos no controle (enfermeiros, microscopistas, médicos, entre outros), reforma e construção de postos diagnósticos, planejamento estratégico de borrifações intra-domiciliares, controle ambiental de criadouros, introdução do artesunato/mefloquina como primeira opção de tratamento para malária por *P. falciparum* e distribuição de mosquiteiros impregnados de longa duração (Gráfico 1) (Medeiros et al., 2010; Brasil. Ministério da Saúde 2013).

Quando se observa a região Amazônica o risco de se adoecer de malária aumenta quando comparado a outras regiões do país. Entre os anos de 2000 a 2011, a IPA (Incidência Parasitária Anual) apresentou-se de médio risco para a região, tendo os maiores valores no ano de 2011 os estados de Rondônia (19,3/1000 habitantes), Roraima (30,4/1000 habitantes), Acre (30,3/1000 habitantes) e Amapá (27,7/1000 habitantes) (Figura 3) (Brasil. Ministério da Saúde 2013).



**Gráfico 1** - Casos de malária notificados no Brasil entre 2000 – 2012. Fonte: Sistema de Informação do Programa Nacional de Controle da Malária/Ministério da Saúde (Sismal/MS) (2000 a 2002); Sistema de informação de Agravos de Notificação (SINAN) e Sistema de Informação e Vigilância Epidemiológica (SIVEP-malária). Adaptado a partir do (Brasil. Ministério da Saúde 2013).



**Figura 3** - Incidência Parasitária Anual (IPA) por unidade federada (UF), na Região Amazônica, Brasil, 2010 e 2011. Retirada do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, 2013.

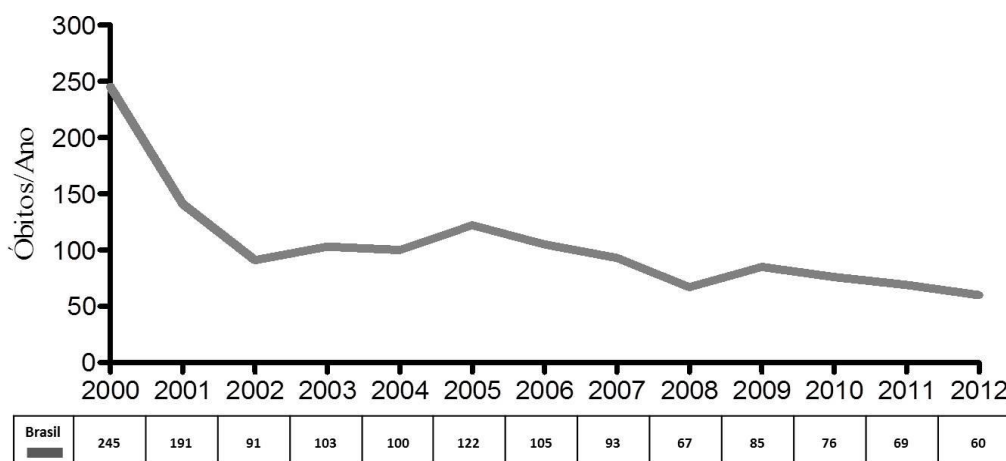
Os casos de malária notificados no Brasil mostram que essa enfermidade acomete mais homens (60,77%) do que mulheres (39,23%), e que a faixa etária mais atingida é entre 20-39 anos (Tabela 1) (Ortolan, 2013).

**Tabela 1** - Casos confirmados de malária no Brasil por ano e por sexo. Casos notificados no SINAN e no SIVEP-Malária

Ano 1º Sintoma(s)	Masculino	Feminino	Não informado	Total
2007	283.543	175046	69	<b>458.658</b>
2008	194.242	121.421	68	<b>315.731</b>
2009	191.003	118.196	65	<b>309.264</b>
2010	206.175	128.436	51	<b>334.662</b>
2011	182.170	112.512	421	<b>295.103</b>
2012	167.376	103.825	4.219	<b>275.420</b>

Casos notificados de malária no Brasil de 2007 a 2012 com resultado parasitológico positivo. Fonte: Adaptado do ministério da saúde/SVS – Sistema de informação de agravos de notificação (SINAN) e sistema de informação e vigilância epidemiológica (SIVEP - malária).

O Programa Nacional de Controle a Malária tem como o principal objetivo evitar óbitos por essa enfermidade. Nos últimos levantamentos realizados foi possível observar que o número de óbitos no Brasil reduziu significativamente. O Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), no ano de 2012 registrou 60 óbitos em todo território nacional, apresentando uma redução de 78,18% em relação ao ano 2000 (275 óbitos). Das mortes registradas em 2012 cerca de 81,6% (49 óbitos) foram registradas na região Amazônica (Gráfico 2) (Brasil. Ministério da Saúde 2012a)



**Gráfico 2** - Óbitos por malária notificados no Brasil entre 2000 – 2012. Fonte: Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM). Adaptado do gráfico do (Brasil. Ministério da Saúde 2013).

Os dados sobre os números de óbitos/espécie ainda são bem incompletos no Brasil. Em 2011 cerca de 43,5% dos óbitos não indicavam a espécie envolvida. Sabe-se apenas que dos óbitos que foram identificados, 37,7% foram por *Plasmodium vivax*, e 18,8% por *Plasmodium falciparum* (Brasil. Ministério da Saúde 2013).

As notificações da casuística no Brasil vêm melhorando anualmente. Em 2011, aproximadamente 87% dos casos eram causados por *P. vivax* e, cerca de 11% por *P. falciparum*. Episódios de *P. malariae* são baixos, sendo que no ano de 2012, apenas 90 casos foram notificados. Alguns autores sugerem que as baixas notificações dessa espécie estaria subestimada, pois os métodos diagnósticos de gota espessa e testes rápidos não seriam tão sensíveis para identificar e diferenciar essa espécie do *P. vivax* (Oliveira-Ferreira et al., 2010; Cotter et al., 2013).

Métodos moleculares têm mostrado ser uma ferramenta eficaz de identificação dessas espécies. Diagnósticos realizados com PCR mostraram que *P. malariae* estava sendo subnotificado nos estados do Mato Grosso e de Rondônia. A prevalência em Apicás (MT) de pacientes PCR positivos para *P. malariae* foi de 20% e em Rondônia de 10%, mostrando que esse parasita é facilmente confundido com os demais e que os métodos utilizados até o momento não proporcionam a eficaz identificação dessa espécie promovendo um número subestimado de casos (Cavasini et al., 2000; Scopel et al., 2004).

## 2.2 A história da malária e seu ciclo biológico

Indícios escritos sobre a malária datam de 4.000 anos antes de Cristo (A.C), tábuas de argila com escritas cuneiformes foram encontradas na biblioteca de Ashurbanipal, as quais mencionam febres mortais periódicas nos moradores dos rios Tigre e Eufrates (Sherman, 1998). Papiros com mais de 3.000 anos encontrados no Egito mencionam pessoas que contraíram febres periódicas e que tinham aumento e escurecimento do baço, além de mencionar as diferentes formas de tratamentos realizados na época. Nerlich e colaboradores, estudando múmias egípcias de várias dinastias (2.800-500 A.C) mostraram que os fragmentos de osso retirados para PCR apresentavam-se positivos para *P. falciparum* em 40% das amostras e, que dessas 92% apresentavam no tecido ósseo traços de anemia crônica que é condizente com a enfermidade (Nerlich et al., 2008). Estudos recentes mostraram que até o grande faraó egípcio Tutankhamun teria sucumbido à doença, pois diferentes análises por PCR foram realizadas a partir de fragmentos ósseos de sua múmia e o resultado foi positivo para *P. falciparum*. Hawass e colaboradores, através de seus estudos clínicos cogitaram a hipótese desse faraó ter morrido com malária agravada por uma doença genética pré-existente (Morbus Kohler-Freiber) (Hawass et al., 2010).

Em meados de 400 A.C, a malária também é descrita por Hipócrates em seu livro “Livro das Epidemias”, em que este relata a presença de febre terçã e quartã na Grécia (Sherman, 1998). Já por volta de 200 A.C, Roma e Grécia tem sua população acometida por febres cíclicas, que se achava que vinham de vapores venenosos dos pântanos, denominando a doença de (male aria = mal ar), que mais tarde tornou-se malária (Cox, 2010).

No século XIX, Louis Pasteur e Robert Koch começaram a procurar intensamente o agente da malária. Eles anunciaram terem encontrado evidências de bactérias na urina de pacientes com malária. Assim denominaram o agente como *Bacillus malariae* (Sherman 1998). Até que em 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran trabalhando na Argélia, ao examinar microscopicamente o sangue de um soldado com febres periódicas identificou nos corpúsculos vermelhos do sangue uma forma flagelada. Após verificar 192 pacientes com os mesmos sinais clínicos e que apresentavam as formas vistas por ele no primeiro paciente, ele teve certeza que se tratava de um parasita. Laveran batizou o seu protozoário de *Ocellaria malariae*. Contudo, quando ele mostrou seus dados a Academia Francesa de Ciências não houve nenhum cientista que acreditasse nos seus achados (Sherman, 1998; Cox, 2010).

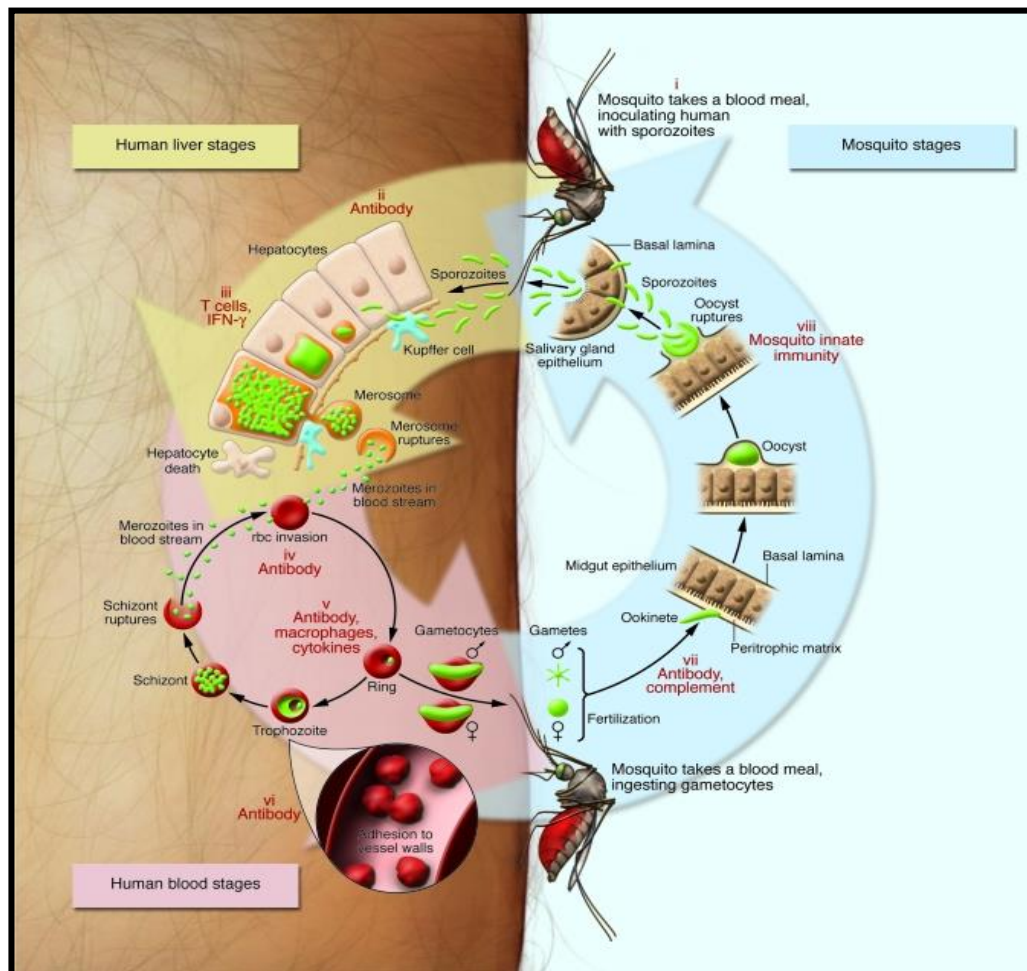
Em 1897, Ronald Ross estudando mosquitos na Índia descreveu pela primeira vez o ciclo sexuado do parasita da malária. Ele observou a multiplicação dos parasitas no intestino do mosquito e que esses se alojavam nas glândulas salivares até o momento do repasto sanguíneo (Ross, 1898).

Seis anos após a descoberta de Laveran, Camillo Golgi usando esfregaços sanguíneos descobriu o desenvolvimento assexuado do parasita da malária, e que o rompimento das hemácias parasitadas levava ao ciclo de febres (Sherman, 1998; Cox, 2010; Hempelmann e Krafts, 2013).

O ciclo de vida do *Plasmodium* é complexo e inicia-se quando uma fêmea de mosquito do gênero *Anopheles* está infectada com o parasita e realiza o repasto sanguíneo. No repasto a fêmea inocula juntamente com a saliva as formas infectantes do *Plasmodium*, os esporozoítos, no hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo, aproximadamente 15-200 esporozoítos são inoculados sob a pele do hospedeiro, permanecendo ali cerca de 15 minutos antes de alcançarem os capilares sanguíneos. Os esporozoítos são móveis, apesar de não apresentarem cílios ou flagelos. Essa motilidade

está intimamente associada à reorientação de proteínas na superfície do parasito (Amino et al. 2006; Neves et al. 2011).

Uma vez na corrente sanguínea os parasitas são levados para o fígado onde podem atravessar as células de Kupffer e invadirem vários hepatócitos até se estabelecerem em um deles (Mota et al., 2001). Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Estes multiplicam-se por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e, posteriormente, aos merozoítos os quais são liberados na corrente sanguínea por vesículas denominadas merossomas. Essas vesículas rompem-se e liberam estes merozoítos, que irão invadir os eritrócitos. Essa fase eritrocítica é a que promove os sinais clínicos da enfermidade (Figura 4) (Neves et al., 2006; Prudêncio et al., 2006; Sturm et al., 2006).



**Figura 4** - Ciclo Biológico do *Plasmodium*, mostrando as fases dentro do hospedeiro vertebrado e no hospedeiro invertebrado. Fonte: (Greenwood et al. 2008).

O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito dá-se por esquizogonia, com consequente formação de merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, que não mais se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos (Rey, 2008).

No mosquito os gametócitos são levados ao trato digestivo onde as hemácias que os envolvem são digeridas. Os gametócitos feminino e masculino fundem-se para formação do zigoto, que se diferencia em oocineto. Ocorre então uma meiose e várias mitoses que liberam os esporozoítos haploides na hemolinfa do inseto. Estes esporozoítos migram até a glândula salivar do mosquito e esperam um repasto sanguíneo para infectar um novo hospedeiro vertebrado (Ross 1898; Neves et al. 2011).

### **2.3 A malária e as suas consequências**

O período de incubação da malária é definido entre o momento da infecção até o aparecimento do parasita na corrente sanguínea e dos seus sintomas. Esse período é influenciado por vários aspectos como, a espécie do parasita infectante, o modo de transmissão, a imunidade do hospedeiro e a densidade de parasitas que foram inoculados (Bartoloni and Zammarchi 2012).

Para *P. falciparum* e *P. vivax* o período de incubação varia de 7 a 15 dias, sendo que para *P. malariae* pode chegar até 30 dias. As manifestações clínicas da malária ocorrem na fase sanguínea da doença e caracterizam-se por episódios de calafrios, febres altas (39°C a 41°C) com sudoreses que podem variar de 6 a 12 horas. Nessa fase é comum diarréias, cefaléias, alterações de consciência, náuseas e vômitos. Em crianças pequenas podem ocorrer episódios de convulsões (Bartoloni e Zammarchi, 2012).

Pacientes primo-infectados, grávidas e crianças menores de 5 anos geralmente são acometidos por sintomas clínicos mais severos, contudo os moradores de áreas não endêmicas, por não ter o seu sistema imune modulado como os moradores de regiões endêmicas, podem sofrer com a severidade da doença. Nas regiões com transmissão estável, a probabilidade de se morrer sem o tratamento é de 2%, enquanto que em regiões com endemicidade flutuante esse aumento é de 10 vezes, por isso o diagnóstico precoce e o tratamento correto e oportuno são os meios mais adequados para se reduzir a gravidade e a letalidade da doença (Kiszewski e Teklehaimanot, 2004).

As várias espécies de *Plasmodium* podem promover complicações severas nos hospedeiros, contudo o *P. falciparum* é a espécie responsável pela maior incidência de mortes por malária, principalmente no continente africano. As complicações mais frequentes encontradas nos pacientes com malária são anemias severas, trombocitopenia, acidose metabólica (AM), malária placentária (MP), malária cerebral (MC), insuficiência renal aguda (IRA), lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Miller et al., 2002; Gomes et al., 2011).

A patogênese da malária severa é complexa, mas se sabe até o momento que algumas formas estão estritamente relacionadas com o sequestro de hemácias parasitadas na microvasculatura e, a consequente obstrução do fluxo sanguíneo levando o tecido à hipóxia, à produção de citocinas pró-inflamatórias e ao acúmulo de leucócitos nos locais de sequestro (Gomes et al., 2011; Rénia et al., 2012).

A adesão de eritrócitos infectados está relacionada ao aparecimento de proteínas de superfície, sendo a mais conhecida a PfEMP1 (do inglês, *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*). Esta proteína permite a ligação do eritrócito infectado com os vários receptores de superfície das células endoteliais da microvasculatura (ICAM-1, VCAM, CD36, CSA e outras) permitindo o sequestro da célula parasitada e possivelmente o escape do parasita da morte eminente no baço (Miller et al. 2002; Rénia et al., 2012).

Os eritrócitos infectados são sequestrados nas células endoteliais da microvasculatura e do sinciciotrofoblasto da placenta, cérebro, rins, fígado e pulmões, respectivamente. A adesão não é homogênea e parasitas distintos podem promover maior ou menor aderência dependendo do tecido alvo (Miller et al., 2002).

As complicações encontradas na malária cerebral estão ligadas a quebra da barreira hemato-encefálica pelo sequestro das hemácias infectadas e obstrução dos vasos, a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a migração de leucócitos para o tecido cerebral principalmente linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Rénia et al. 2012).

O quadro clínico na malária cerebral acontece de forma progressiva, com manifestações como cefaléias, alteração no comportamento, desorientação, delírio e coma. A MC se não tratada leva ao óbito rapidamente e mesmo realizando-se o tratamento existe a mortalidade de 20% em adultos e 15% em crianças (Gomes et al., 2011; Bartoloni e Zammarchi, 2012).



Em relação a malária placentária, sabe-se que o sequestro de eritrócitos parasitados na microvasculatura da placenta acontece devido a ligação destes à condroitina sulfato A (CSA). Os parasitas sequestrados acumulam-se na placenta e ativam células mononucleares que produzem quimiocinas recrutando fagócitos para região intervilar. Observa-se também deposição de fibrina e hemozoina, que altera o espaço intervilar e perivilar causando a redução da oxigenação e o transporte de nutrientes para o feto, resultando assim o nascimento de bebês prematuros, com baixo peso ao nascer, mortalidade de recém-nascidos e anemia materna (Whitty et al., 2005; Autino et al., 2012).

A anemia grave é uma manifestação frequente e precoce da malária, a qual ocorre por múltiplos fatores, tais como a alteração da eritropoiese, a destruição de eritrócitos infectados e também sadios, perda sanguínea por coagulopatias. A designação de anemia severa é definida por um hematócrito menor de 15% ou uma concentração de hemoglobina menor que 5g/dl. Contudo essa taxa é para infecções por *P. falciparum*, já para outras espécies os valores mudam conforme idade e sexo do indivíduo (Gomes et al., 2011).

Já a acidose metabólica está relacionada ao aumento do metabolismo anaeróbico da glicose, o que, na malária grave, pode decorrer da hipóxia tecidual associada à anemia (diminuição da capacidade de carrear oxigênio), febre, aumento das citocinas, além da diminuição da depuração do lactado pelo fígado devido à redução do fluxo sanguíneo hepático. Com todos os fatores descritos acima o indivíduo antes sadio com um metabolismo predominantemente aeróbico, devido a infecção passa a um metabolismo anaeróbico produzindo grandes quantidades de lactato o que faz o pH sanguíneo cair (Gomes et al., 2011).

Outra complicação da malária severa é a Lesão Pulmonar Aguda e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, que é caracterizada por lesão endotelial difusa, aumento da permeabilidade alvéolo capilar, edema pulmonar e infiltração de células inflamatórias. A incidência dessa complicação é de cerca de 3% a 10% das infecções promovidas por *P. falciparum*, contudo sua letalidade é próxima de 70% (Gomes et al. 2011; Lacerda et al., 2012).

Apesar do *P. falciparum* possuir o maior número de casos da LPA/SDRA atualmente outros pesquisadores tem descrito essa complicação nas infecções por *P. vivax*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (Autino et al., 2012; Taylor et al., 2012). Estudos

conduzidos na Malásia demonstraram que pessoas infectadas por *P. ovale* e *P. knowlesi* adquiriram LPA/SDRA com sintomas similares aos encontrados com o *P. falciparum*, sendo que alguns pacientes sobreviveram após intensa medicação e ventilação, enquanto outros foram a óbito, mostrando que essas espécies também causam mortalidade (Gera e Dhanoa, 2010; Lau et al., 2013).

TJITRA e colaboradores realizaram um estudo na Indonésia em que 27 pacientes infectados por *P. vivax* apresentaram LPA/SDRA, sendo que 12 desses pacientes foram a óbito mesmo depois do tratamento (TJITRA et al., 2008). Em estudo *post-mortem* realizado em indivíduos que desenvolveram LPA/SDRA através da infecção por *P. falciparum*, foi detectado edema citoplasmático de células endoteliais, hemorragia e hemácias parasitadas aderidas no interior dos capilares pulmonares (DUARTE et al., 1995; Price et al., 2007).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de patogênese da LPA/SDRA associada a malária, sugere-se através dos achados histopatológicos e pelos sinais clínicos apresentados, que os mediadores inflamatórios, o infiltrado celular e a quebra da barreira alvéolo-capilar estejam diretamente envolvidas nessa síndrome.

#### **2.4 Aspectos imunológicos da malária**

O entendimento sobre a imunidade humana a malária vem sendo fornecido por duas fontes: o estudo da história natural em populações que habitam regiões endêmicas e a indução da malária em indivíduos não imunes (Langhorne et al., 2008). No final do século XIX e início do século XX, estudos realizados com pacientes de neurosífilis tratados com a co-infecção malárica forneceu pistas essenciais sobre a resposta imunológica humana frente a esse parasita (Schofield e Grau, 2005; Lacerda et al., 2012).

O sistema imune inato é o responsável por reconhecer os patógenos que se instalam em nosso organismo. Na malária, esse sistema é capaz de reconhecer o parasita em qualquer fase do seu ciclo biológico, contudo o parasita co-evoluiu ao longo de milhares de anos e desenvolveu mecanismos capazes de evadir o sistema de reconhecimento do hospedeiro (Hisaeda et al., 2005; Hafalla et al., 2011).

Uma forma de evasão não muito esclarecida acontece, quando o esporozoítio que ativou o sistema imune inato do hospedeiro consegue transmigration pelas células de Kupffer e se instalar em um hepatócito. Em alguns trabalhos, aparentemente, quando

ocorre a transmigração do parasita pelas células de Kupffer, essas não traduzem a informação para o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, apenas as células vizinhas traduzem esse sinal, o que pode estar diretamente relacionado ao deslocamento da proteína CS (do inglês *Circumsporozoite Protein*), produzida pelo esporozoíto, para a região nuclear da célula hospedeira inibindo essa via (Singh et al. 2007; Torgler et al., 2008). Sabe-se também que a ligação entre as proteínas CS e HSPGs (do inglês *Heparan sulfate proteoglycans*) inibe a produção de espécies reativas de oxigênio nos hepatócitos (Usynin et al., 2007).

O sistema de reconhecimento do hospedeiro ao plasmódio acontece através de células do sistema imune inato como os macrófagos ( $M\Phi$ ), neutrófilos, células dendríticas (DCs) e células *natural killers* (NK) (Stevenson and Riley 2004; Hafalla et al. 2011). Além disso, como resposta a entrada do parasita e/ou aos seus produtos liberados através da ruptura dos eritrócitos, há a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-8 e IL-4, que podem atrair novas células inflamatórias e contribuir no aumento da fagocitose pelos macrófagos (Langhorne et al., 2008; Hafalla et al., 2011).

A produção excessiva de citocinas e quimiocinas depende do tipo de interação entre o hospedeiro e o parasita. Os receptores de reconhecimento de padrão PRRs (do inglês *Pattern Recognition Receptors*) encontrados nas células do hospedeiro são capazes de identificar e responder ao plasmódio. Os parasitas e os produtos liberados pelos eritrócitos infectados ativam os PRRs, como os Toll-like receptors (TLRs) e CD36, que proporcionam o amadurecimento das células dendríticas (DCs) que migram para o baço, que é o primeiro local da resposta imune frente ao estágio sanguíneo do plasmódio (Langhorne et al., 2008; Hafalla et al., 2011).

A imunidade à malária desenvolve-se de forma relativamente lenta, não é estéril, e muitas vezes, diminui rapidamente quando os adultos imunes deixam as regiões endêmicas, o que sugere que a exposição contínua aos antígenos da malária é necessária não só para a geração de células de memória e células efetoras, mas também para sua persistência (Langhorne et al., 2008).

As células do sistema imune inato são uma peça importante na ativação dos linfócitos T. Um exemplo é a morte de esquizontes na fase hepática por células T CD8<sup>+</sup> que dependem das células NK e da produção de IL-12, mostrando a sinergia entre as imunidades inata e adaptativa (Doolan e Hoffman, 1999). Outro exemplo é a produção

de IL-12 pelas células dendríticas, que tem um papel central na indução da resposta das células T CD4<sup>+</sup>, as quais são essenciais na resposta adaptativa durante a fase sanguínea do parasita (Sher et al., 2003).

A resposta imune adaptativa ao plasmódio pode ser encontrada em qualquer fase do seu ciclo biológico, contudo vários trabalhos vêm demonstrando o importante papel das células T no ciclo hepático e sanguíneo da doença. Estudos recentes em modelos murinos estabeleceram que as células T são fundamentais para o estabelecimento da imunidade na fase pré-eritrocítica, mostrando que as células T CD8<sup>+</sup> são críticas e que sua resposta é primeiramente dirigida para as formas intra-hepáticas (Good e Doolan, 2010).

As células DCs têm um papel importante mediando à imunidade, pois alguns trabalhos têm mostrado que os esporozoítos podem ser internalizados pelas células DCs nos linfonodos drenantes da pele, onde a proteína CS é apresentada para as células DCs imaturas para ativar a resposta por células T CD8<sup>+</sup>. Nesses linfonodos as células T CD8<sup>+</sup> são primadas e ativadas, permitindo a migração delas para diversos órgãos, incluso o fígado (Amino et al., 2006; Chakravarty et al., 2007).

Estudos realizados com *P. berghei* e *P. yoelii*, mostraram que a transferência adotiva de clones de células T CD8<sup>+</sup> específicas para os epítomos localizados nas proteínas CS protegeu os camundongos contra os desafios com esses parasitas. Outro aspecto importante foi que a imunização dos camundongos com esse antígeno induziu a produção de células T CD8<sup>+</sup> específicas com capacidade de inibir o desenvolvimento dos parasitas na fase hepática (Carvalho et al., 2002).

Pesquisas recentes sobre o papel das células T CD8<sup>+</sup> de memória utilizando o modelo de vacinação com esporozoítos irradiados por raios- $\gamma$ , revelaram a importância da citocina IL-15 na manutenção da memória imunológica mediada por essas células. Nesse estudo utilizou-se animais selvagens e nocautes para IL-15 submetidos a dois desafios vacinais, os resultados obtidos revelaram que os animais selvagens não sucumbem a infecção malárica, mesmo recebendo dois desafios, mostrando que as células T CD8<sup>+</sup> mantêm a memória imunológica frente a enfermidade. Já os animais nocautes respondem bem ao primeiro desafio, mas sucumbem no segundo desafio, evidenciando a interdependência entre células T CD8<sup>+</sup> de memória e a citocina IL-15 na manutenção da proteção contra o plasmódio (Zarling et al., 2013).

Anticorpos contra antígenos do parasita expostos na superfície de merozoítos, eritrócitos infectados ou produtos liberados das organelas apicais no momento de invasão podem ser efetores críticos no estágio sanguíneo da malária (Langhorne et al. 2008). Anticorpos antígenos específicos podem diminuir a invasão, estimular a morte celular dependente de anticorpos e promover a opsonização, levando ao desaparecimento do parasita (Marsh e Kinyanjui, 2006). Diferentes subclasses de imunoglobulinas (Ig) foram correlacionadas com a imunidade na fase sanguínea, contudo sabe-se que as subclasses variam conforme o antígeno apresentado (Stanisic et al. 2009).

Para que haja um controle eficaz da parasitemia, a imunidade ao plasmódio é dependente de títulos elevados de anticorpos, bem como da presença células T CD4<sup>+</sup> específicas (Lundie, 2011). Estudos recentes reportam que a imunização por esporozoítos irradiados em camundongos deficientes para  $\beta$ 2-microglobulina e infectados por *P. berghei* ou *P. yoelli* geram completa imunização, e que as células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  estão envolvidas nesse processo (Oliveira et al., 2008).

Butler e colaboradores reportam em seu trabalho que o bloqueio de PDL-1 e de LAG3 restaura a função das células T CD4<sup>+</sup> aumentando o número de células T foliculares e de centros germinativos de células B, promovendo ao aumento dos níveis de anticorpos e o desaparecimento do parasita no estágio sanguíneo (Butler et al., 2012).

Mesmo que a reposta imune frente ao plasmódio gere incontáveis componentes pró-inflamatórios, que permitem controlar ou eliminar os parasitas, os mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- $\beta$  são importantes na supressão de uma resposta inflamatória amplificada que possa gerar danos ao hospedeiro (Stevenson e Riley, 2004; Riley et al., 2006).

Desta forma, a resposta imunológica frente a malária é complexa e específica para cada fase da infecção. Células do sistema imune inato e citocinas são importantes na resposta a infecção, contudo a presença exagerada dessas células e de citocinas pró-inflamatórias podem levar a danos teciduais e aumento da severidade da doença. Respostas anti-inflamatórias através de citocinas, fagocitose e a apoptose das células inflamatórias, fornecem o contra balanço na enfermidade e a ausência de manifestações severas (Galani et al., 2010; Boström et al. 2012).

## 2.5 Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)

A descrição da “Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo” foi primeiramente reportada por Ashbaugh e colaboradores em 1967, os quais relataram: dispnéia severa, taquipnéia, cianose causada por baixa oxigenação, perda da complacência pulmonar, e infiltração alveolar difusa nos seus pacientes com essa enfermidade. Dos 12 pacientes observados 7 deles foram a óbito e, os materiais histológicos coletados nas necropsias mostraram inflamações intersticiais difusas, edema intersticial e alveolar, hemorragia e presença de membranas hialinas nesses pulmões (Matthay e Zimmerman, 2005; Raghavendran e Napolitano, 2011).

Em 2013 estimou-se que a incidência de LPA/SDRA, nos Estados Unidos, foi de 150.000 casos, sendo que a mortalidade variou entre 30% a 40% (Rubin 2013).

A LPA/SDRA pode ser associada a vários tipos de desordens clínicas, que podem ser promovidas por infecções bacterianas, virais, fúngicas, traumas, queimaduras, aspiração de suco gástrico, inalação de produtos tóxicos, entre outros (Luh e Chiang, 2007; Matthay e Zemans, 2011).

A definição ouro para LPA/SDRA foi estabelecida na Conferência de Consenso Europeia/Americana (CCEA) de 1994 (Bernard et al., 1994; Matthay e Zemans, 2011; Raghavendran e Napolitano, 2011). Nesta reunião, ficou estabelecido que pacientes com infiltrados pulmonares bilaterais e com hipoxemia arterial e  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  entre 200 mmHg e  $\leq 300$  mmHg seriam designados com LPA e os pacientes com  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$  mmHg seriam designados com a forma mais severa da doença a SDRA (Luh e Chiang, 2007; Matthay e Zemans, 2011).

Contudo em 2012, estudiosos da Sociedade Torácica Europeia (ETS – *European Thoracic Society*) e da Sociedade de Medicina Crítica (SCCM – *Society of Critical Care Medicine*) estabeleceram um novo método de avaliação da LPA/SDRA denominado “Definição de Berlin”. Para isso a “Definição de Berlin” propõe três categorias de definição da SDRA baseada no grau de hipoxemia: leve ( $200\text{mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$  mmHg), moderado ( $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$  mmHg) e severo ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100\text{mmHg}$ ), além de quatro variáveis auxiliares como a gravidade radiológica (raios-X), complacência ( $\leq 40\text{ml/cm H}_2\text{O}$ ), pressão expiratória positiva ( $\geq 10\text{cm H}_2\text{O}$ ) e expiração correta de volume por minuto (10L/min) (Ranieri et al., 2012).

Porém, com esta nova definição não há mais LPA, sendo todos os pacientes são classificados com SDRA em vários níveis. Kangelares e colaboradores tentaram comparar os pacientes segundo a “Definição de Berlin” com o critério de LIS (*Lung Injury Score*), proposto em 1984. Nesse estudo eles verificaram que seus resultados eram consistentes com os achados apresentados no desenvolvimento da “Definição de Berlin” para SDRA. E que ambas definições apresentavam a pressão expiratória positiva e os níveis de hipoxemia como parâmetros relacionados a mortalidade (Kangelaris et al., 2014).

Até o momento muitos autores tentam comparar a CCEA com a “Definição de Berlin”, alguns acreditam não haver diferenças estatísticas entre as duas para que se sustente uma ou outra definição, mas há outros autores que consideram a Definição de Berlin mais sensível para alguns tipos de SDRA (Caser et al. 2012; S. Frohlich et al., 2013; Sine et al. 2013).

Os aspectos patológicos da doença foram inicialmente descritos por Bachofen e Weibel, onde amostras foram coletadas de pacientes em três fases distintas da SDRA e classificadas como fase aguda ou exudativa, fase fibroproliferativa e fase crônica (Bachofen e Weibel, 1977). Na fase aguda encontra-se a perda da função da barreira alvéolo-capilar responsável pelo acúmulo de fluido proteáceo (edema) no interstício pulmonar e no interior dos alvéolos, ocorre acúmulo de polimorfonucleares (PMN), hemorragia e, destruição dos pneumócitos tipo I e tipo II. Os pneumócitos tipo I constituem a vasta maioria da superfície alveolar e são particularmente susceptíveis a lesões. A fase fibroproliferativa tem por característica a hiperplasia de pneumócitos tipo II, que se proliferam com o objetivo de repor os pneumócitos tipo I que sofreram necrose ou apoptose e atelectasia devido à diminuição de surfactante. Já a fase crônica tem a resolução do infiltrado celular exacerbado, deposição de colágeno e fibrose (Figura 7) (Luh e Chiang, 2007; Matthay e Zemans, 2011).

A patogênese da LPA/SDRA é promovida por múltiplos fatores que podem começar logo depois de um trauma, ingestão de toxina ou por algum tipo de infecção. Inicia-se com o reconhecimento do agente infeccioso ou do estímulo pró-inflamatório pelos macrófagos alveolares e intersticiais, esses produzem citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-6 que ativam os macrófagos e promovem o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o tecido (Mosser e Edwards, 2008; Schneberger et al., 2011).

O recrutamento de monócitos/macrófagos tem papel fundamental na LPA/SDRA, porque monócitos inflamatórios chegam aos tecidos pela microvasculatura e se diferenciam em macrófagos inflamatórios que quando ativados, produzem citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, incluindo NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que são tóxicos ao organismo, causando danos teciduais (Nathan e Ding, 2010; Murray e Wynn, 2011). Em oposição aos macrófagos pró-inflamatórios (M1), os macrófagos anti-inflamatórios (M2), quando ativados são responsáveis pela homeostasia do tecido, fibrose e restauração (Wynn e Barron, 2010; Sindrilaru et al. 2011). Estudos recentes têm mostrado que macrófagos M1 podem se converter em macrófagos M2 com fenótipos de reparação (Arnold et al. 2007; Biswas e Mantovani, 2010).

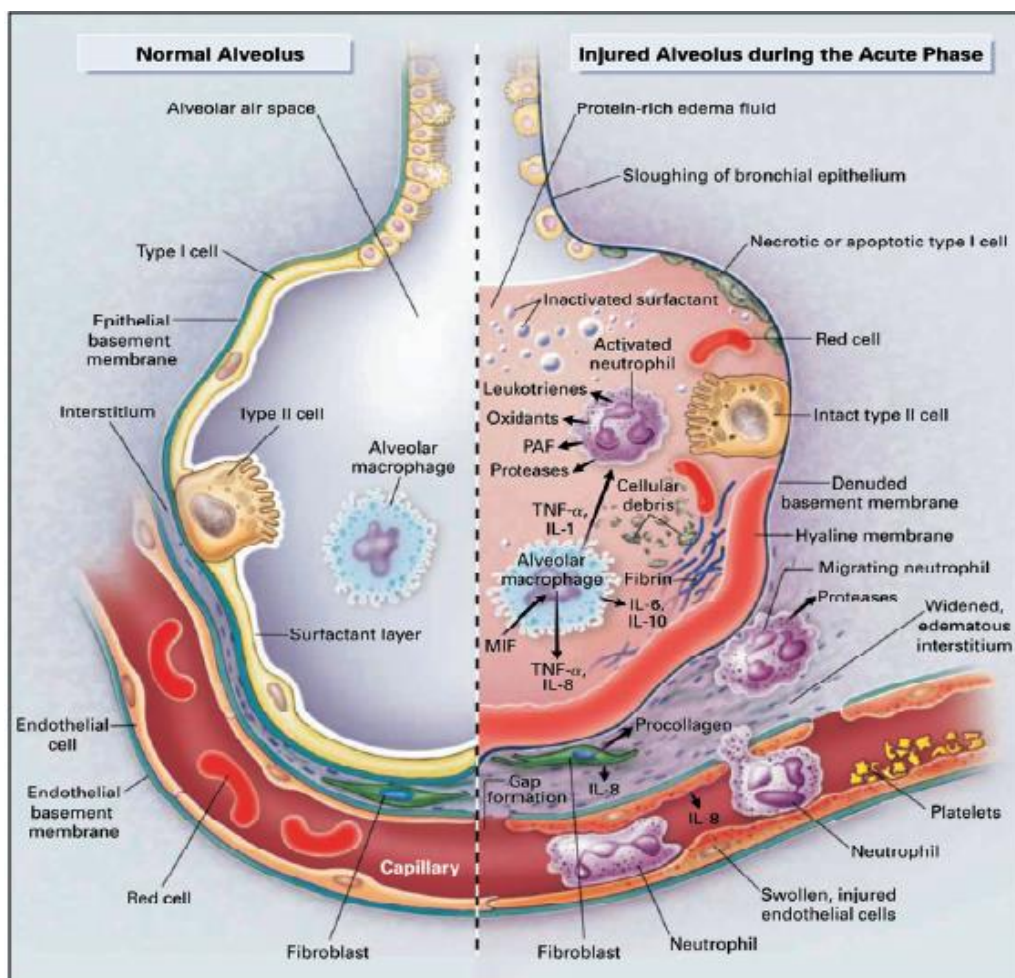
Macrófagos M2 produzem fatores de crescimento que estimulam as células epiteliais e fibroblastos, incluindo fator transformador de crescimento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). Macrófagos produtores TGF- $\beta$ 1 contribuem para regeneração e reparação de feridas, promovendo diferenciação de fibroblasto em miofibroblastos, por aumentar a expressão de inibidores de tecidos de metaloproteinases (TIMPs), que bloqueiam a degradação da matriz extracelular (ECM) e por estimular diretamente a síntese de colágeno (Shimokado et al., 1985; Roberts et al., 1986; Laskin et al., 2011).

Neutrófilos são uma das células centrais no mecanismo fisiopatogênico da LPA/SDRA, em que existem claramente ativação e acúmulo deste tipo celular (Reutershan e Ley, 2004).

Citocinas como a IL-8, bem como algumas quimiocinas (como CXCR2 e CXCL2) estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos nos pulmões e na regulação da permeabilidade vascular em diferentes modelos de injúria pulmonar aguda (Taylor e White, 2002; Zarbock et al., 2008). O influxo de neutrófilos para os pulmões faz com esses mudem sua conformação e se acumulem no endotélio da microvasculatura pulmonar. A continua liberação de citocinas e moléculas de adesão faz com que muitos desses neutrófilos migrem do endotélio da microvasculatura pulmonar para o interstício chegando a região alveolar, ou apenas fiquem aderidos a microvasculatura endotelial provocando o acúmulo dessas células (Reutershan e Ley, 2004; Zarbock et al., 2010). A migração dos neutrófilos para os pulmões durante a LPA/SDRA faz com que haja a liberação de substâncias proteicas, como elastase, fosfatase ácida, betaglicuronidases, mieloperoxidases, metaloproteinases, proteinase 3 e catepsinas, que são tóxicas aos



microrganismos invasores, além de provocar lesões ao tecido (Figura 5) (Rufino e Lapa, 2006).



**Figura 5** - Esquema mostrando um alvéolo sadio e um alvéolo durante o processo inflamatório com a produção citocinas, quimiocinas, proteases, migração e ativação celular, bem como o processo de reparo tecidual com apoptose, formação de fibrina e produção de fatores anti-inflamatórios durante a LPA/SDRA. Esquema retirado de (Matthay e Zemans, 2011).

## 2.6 O papel da Apoptose na LPA/SDRA

Na LPA/SDRA, a apoptose possui dois papéis fundamentais, que são o controle da inflamação e o reparo tecidual. A apoptose é definida como um conjunto de alterações celulares que promovem a morte das células. Ela pode ser iniciada por duas vias, a intrínseca mediada pela mitocôndria e a extrínseca que utiliza receptores de superfície de morte (Ashkenazi 1998; Galani et al. 2010). Há evidências que ambas as vias de apoptose são ativadas durante a LPA/SDRA, resultando na morte das células epiteliais (Matute-Bello e Martin, 2003; Galani et al., 2010).

A morte celular do epitélio alveolar promove a quebra da barreira alvéolo-capilar e a formação do edema. A alta regulação dos genes BAX, Casp3 e BID nas células epiteliais dos pulmões levam a apoptose e a manutenção dessa enfermidade (Matute-Bello e Martin, 2003; Galani et al., 2010). Trabalhos realizados em pacientes que desenvolveram a LPA/SDRA mostram o papel da via extrínseca da apoptose mediada pelos receptores de morte FAS/FASL (Matute-Bello e Martin, 2003). O acúmulo de FASL nos locais da inflamação inicia a apoptose das células epiteliais, parênquimais e inflamatórias. Estudos sobre a proteína anti-apoptótica de FAS (sFAS) durante a SDRA, mostraram que esta tem um papel protetor durante a enfermidade (Cheng et al., 1994; Lee et al., 2008).

Seitz e colaboradores estudando o modelo de LPA induzido por trauma, verificaram a morte dos pneumócitos tipo II, nas primeiras 48 horas após o trauma, bem como o aumento da atividade da caspase 3. Foi visto também, que a morte dessas células está relacionada ao aumento de FAS, FASL e caspase 8, que se mostram relevantes já nas primeiras 24 horas. Ainda nesse estudo, os autores verificaram *in vitro* que o sobrenadante dos macrófagos alveolares dos animais que sofreram o trauma eram capazes de induzir a morte dos pneumócitos tipo II, enquanto que o sobrenadante retirado dos neutrófilos não produziam efeitos significativos (Seitz et al. 2008).

Sabe-se que o stress oxidativo ocorre na LPA/SDRA. Em experimentos com células epiteliais pulmonares incubadas com ROS ou induzindo-se o stress oxidativo *in vivo*, mostrou-se que esse último pode ser um importante indutor de apoptose nesse tipo celular (Brown et al. 1997; Wang et al. 2003). Janssen e colaboradores demonstraram que a depleção endógena de NO causa perturbações no ciclo celular e a morte das células pulmonares (Janssen et al., 1998).

A remoção de células apoptóticas por fagócitos também tem um papel importante na sobrevivência e persistência da LPA/SDRA (Savill et al., 1989). As células em apoptose são reconhecidas pelos macrófagos através de proteínas de superfície, como o CD44. A falha na remoção das células mortas (neutrófilos e pneumócitos) propicia o aumento da inflamação e da mortalidade (Teder et al., 2002). A fagocitose dessas células pelos macrófagos inibe a produção de fatores pró-inflamatórios (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8) e aumenta a produção de mediadores anti-inflamatórios (TGF- $\beta$ , E2, PAF, IL-10), os quais permitem o reparo do tecidual (Matute-Bello e Martin, 2003; Tang et al. 2008; Galani et al., 2010). A inibição da apoptose resulta em um número aumentado de

neutrófilos viáveis, que prolongam a alveolite neutrofílica e a necrose contribuindo para manutenção da doença (Souza et al., 2003; Galani et al., 2010).

Martin e colaboradores evidenciam que no fluido do LBA de pacientes com LPA existem fatores que retardam a apoptose de polimorfonucleares, e que um desses fatores seria o GM-CSF – (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*). Quando GM-CSF está presente no tecido ou no LBA, os neutrófilos recebem a mensagem de que não devem entrar em apoptose prolongando a vida dessas células inflamatórias no tecido e promovendo mais danos teciduais. O autor também relata que em pacientes com injúria pulmonar cerca de 30% dos macrófagos alveolares fagocitam partículas de neutrófilos eliminando assim quaisquer fatores que poderiam causar danos maiores ao tecido (Martin et al., 2005).

## **2.7 A LPA/SDRA associada a malária**

A LPA/SDRA associada a malária ocorre em cerca de 10% dos adultos e 20% das crianças com malária grave, podendo acontecer uma única complicação ou vários distúrbios que podem levar à disfunção de múltiplos órgãos (Mohan et al., 2008; Taylor et al., 2012).

Alguns estudos sugerem que 5% dos pacientes com malária não complicada e 20% a 30% dos pacientes com malária severa são admitidos em CTIs e necessitam de ventilação mecânica por desenvolver LPA/SDRA (Sahu et al., 2010).

A LPA/SDRA associada à malária grave foi descrita primeiramente em pacientes com *P. falciparum*, contudo na atualidade essa complicação já foi vista em infecções por *P. knowlesi*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (Price et al., 2007; Tan et al., 2008; Mohan et al., 2008; Barber et al., 2011; Lau et al., 2013).

Taylor e colaboradores evidenciam em seu estudo, que muitos pacientes com malária severa acabam adquirindo a LPA/SDRA durante ou após o tratamento com antimaláricos. É interessante observar que os pacientes com *P. vivax* são os que mais adquirem a enfermidades depois de tratados (Taylor et al., 2012).

Bruneel e colaboradores realizaram estudo na França com 400 pacientes com *P. falciparum*, sendo que 101 pacientes foram admitidos com malária severa, e 76 deles (20%) utilizaram ventilação mecânica por desenvolver LPA/SDRA (Bruneel et al. 2010). Casos com *P. vivax* relatam pacientes tratados com antimaláricos apresentando sintomatologia de LPA/SDRA de 1 a 13 dias pós-tratamento. Esses pacientes são

mantidos com ventilação mecânica e tratados contra possíveis co-infecções que possam acompanhar a malária ou ser adquirida pela debilitação do paciente (Price et al., 2007; Tan et al., 2008; Nadkar et al., 2012).

Haydora e colaboradores em 2013, verificaram no Líbano um caso de malária pós-tranfusional em que o paciente evoluiu para LPA/SDRA. Nesse estudo os autores relatam que o paciente alguns dias após receber transfusão sanguínea apresentou febre, tosse, náuseas e dificuldade para respirar. Foi internado e após exames clínicos e laboratoriais foi diagnosticado com malária por *P. ovale*. O paciente evoluiu para o quadro de LPA/SDRA e foi mantido com ventilação na CTI por 16 dias (Haydoura et al., 2011).

Trabalhos realizados na Indonésia e Índia mostram que a incidência de LPA/SDRA nos pacientes com malária severa não é muito alta, contudo sua mortalidade é alta (50% a 80%) (Tjitra et al., 2008; Nadkar et al., 2012).

Em Kolkata, Índia, foram relatados três casos de LPA/SDRA associados à malária. Todos os três pacientes estavam infectados com *P. vivax* e foram descartadas coinfeções. Dois pacientes apresentaram sintomas após o tratamento com anti-maláricos, enquanto o terceiro apresentou o quadro de LPA/SDRA antes de receber qualquer tratamento. Todos os pacientes progrediram para entubação e ventilação, mas não houve óbitos (Sarkar et al., 2010).

Gera & Dhanoa observaram também na Índia que pacientes que deram entrada com malária por *P. vivax* e tinham sintomas de LPA/SDRA progrediam rapidamente para ventilação mecânica. Os autores verificaram que os pacientes na ventilação que recebiam tratamento com Artesunato combinado Sulfaxine/Pirimetamina tinham uma rápida regressão do quadro (Gera e Dhanoa, 2010).

Estudos recentes realizados no Brasil mostram o decréscimo no número de casos com *P. falciparum* e o aumento de infecções com *P. vivax* que levam a hospitalizações. Entre 1998 e 2008 verificou-se 234 mortes associadas a malária por *P. vivax* (Oliveira-Ferreira et al., 2010).

A imunopatogênese da malária por *P. vivax* é pouco conhecido, alguns estudos brasileiros mostram que pacientes com a forma severa da doença desenvolvem problemas pulmonares e anemia. Esses trabalhos mostram o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , aumento de antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD-1) e o aumento de IL-10 (Andrade et al., 2010).

Uma das principais complicações encontradas na malária por *P. vivax* é a LPA/SDRA. Lacerda e colaboradores verificaram que os pacientes que morriam por complicações pulmonares decorrentes da infecção com *P. vivax* tinham edema pulmonar, infiltrado inflamatório e acúmulo de neutrófilos no espaço alveolar. No entanto, outros tipos de severidade como a malária cerebral e a falência renal raramente foram encontradas (Costa et al. 2012; Lacerda et al. 2012).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da LPA/SDRA associada a malária estão pouco definidos, pois tanto os fatores relacionados ao hospedeiro, quanto os relacionados aos parasitas são importantes para a compreensão da doença. Embora a LPA/SDRA associada à malária já venha sido descrita há algum tempo, pouco se sabe sobre os mecanismos da patogênese, diagnóstico precoce e tratamento efetivo que evitem a internação destes pacientes em UTIs e os frequentes óbitos (Mohan et al., 2008; Taylor et al., 2012).

## **2.8. Modelos animais para LPA/SDRA associada a malária**

Modelos animais são importantes, pois são a ponte entre os pacientes e o laboratório de pesquisa. Hipóteses geradas em estudos humanos e *in vitro* podem ser testados em modelos animais, para mostrar sua relevância em um sistema vivo intacto (Matute-Bello et al., 2008). Estudos em seres humanos são complicados, pois o material disponível é restrito (biopsias e fluídos corporais) e, muitas vezes, só é possível à coleta *post mortem*. Os modelos animais são úteis pela facilidade de criação, facilidade de coleta de material e por mimetizar com excelência aspectos encontrados nos humanos (Zuzarte-Luis et al., 2014).

O estudo da interação parasita/hospedeiro na malária humana possui limitações, pois os pacientes precisam de tratamento para que não sucumbam a enfermidade e as coletas realizadas nos pacientes com malária severa geralmente ocorrem após a morte, sendo assim os modelos murinos permitem-nos compreender os mecanismos moleculares envolvidos nessas interações (Lovegrove et al., 2006; Pamplona et al., 2009)

Espécies de *Plasmodium* que infectam roedores são frequentemente utilizados como modelos experimentais para a doença humana. A associação de diferentes espécies de *Plasmodium* murinos e linhagens de camundongos permitem o estudo de uma série de manifestações patológicas que ocasionam síndromes fatais. Apesar dos

modelos murinos não reproduzirem todas as características histopatológicas observadas em humanos, eles compartilham muitos aspectos, incluindo respostas imunes similares (Lovegrove et al., 2006; Pamplona et al. 2009; Niikura et al., 2011).

Modelos murinos utilizando *P. berghei*, *P. yoelli* e *P. chabaudi* têm sido utilizados para elucidar interações imunológicas com os hospedeiros e demonstrar muitos fatores associados aos mecanismos de defesa a malária (Niikura et al. 2011). Estes modelos são importantes para compreensão de vários mecanismos imunopatológicos da malária severa, mimetizando a malária cerebral, a anemia severa, a falência renal, entre outros (Evans et al. 2006; Vigário et al. 2007; Elias et al. 2012). Contudo, esses modelos não eram adequados/limitados para o estudo da LPA/SDRA e só recentemente introduziu-se novos modelos para se estudar a doença (Matute-Bello et al., 2008).

Lovegrove e colaboradores, em 2008, estudando a linhagem C57BL/6 com *P. berghei* ANKA, verificaram que os camundongos submetidos a eutanásia no sexto e sétimo dias pós-infecção desenvolviam inflamação intersticial, ruptura da barreira alvéolo-capilar e produção de edema proteáceo, porém sem infiltrados inflamatórios no lavado bronco-alveolar. Neste mesmo estudo verificou-se que camundongos nocautes para CD36 não adquiriam a doença, mostrando que essa molécula estaria diretamente envolvida na patogênese da LPA/SDRA (Lovegrove et al., 2008).

Souza e colaboradores, em 2013, descreveram danos em vários órgãos, inclusive pulmões, durante a infecção de camundongos C57BL/6 e *P. berghei* ANKA. Esse modelo é bem descrito para malária cerebral, no entanto, estudando os seis primeiros dias de infecção desses camundongos, notou-se que o tecido pulmonar já sofre danos logo no primeiro dia, pois há infiltrado inflamatório, aumento do interstício, produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CXCL-1, contudo não foi possível verificar se esses camundongos desenvolviam LPA, pois estes sucumbiam antes com malária cerebral (Souza et al., 2013).

Camundongos C57BL/6 infectados *P. berghei* K173 foram utilizados por Hee e colaboradores, em 2010, neste modelo os camundongos são acometidos por uma LPA branda, porém se observou o aumento de neutrófilos e células TCD8<sup>+</sup> nos interstícios, danos na barreira alvéolo-capilar, diminuição da atividade do canal epitelial de sódio sensível a amilorida (CENa) que permite a formação do edema e aumento de fibrina (Hee et al., 2011).

No mesmo ano, Van den Steen e colaboradores, propuseram um modelo experimental utilizando-se camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* NK65. Os animais foram infectados com  $10^4$  parasitas e sem indícios de malária cerebral. Nesses animais foram observados aumento do peso pulmonar, aumento da permeabilidade alvéolo-capilar, formação de membrana hialina, hemorragias, aumento de leucócitos e edema (Van den Steen et al. 2010, 2013). Deroost e colaboradores, em 2012, observaram no modelo acima descrito que a produção de hemozoína pelo *Plasmodium* possui propriedades inflamatórias que participam do desenvolvimento da LPA/SDRA (Deroost et al., 2013).

Mais recentemente, foi observado que infecções com *P. yoelli* 17XL em camundongos Balb/C promoveram pneumonia intersticial com aumento de células mononucleares e polimorfonucleares nas paredes alveolares, bem como a formação de exsudato proteico no espaço alveolar (Fu et al., 2012).

Nosso grupo, em 2010, apresentou um modelo para LPA/SDRA a partir da infecção de camundongos da linhagem DBA/2 com *P. berghei* ANKA. Neste modelo os animais apresentavam quadro histopatológico similar ao encontrado em humanos com essa enfermidade. Cerca de 30% a 60% dos camundongos apresentavam dispneia, aumento da permeabilidade vascular, edema pulmonar, hemorragia e infiltrados inflamatórios no interstício e nos alvéolos (Epiphany et al., 2010).

Outro estudo realizado pelo nosso grupo mostrou através de microscopia de luz e eletrônica alguns achados histopatológicos encontrados no nosso modelo de LPA/SDRA. Os achados encontrados neste estudo são compatíveis aos vistos em LPA/SDRA associado à malária por *P. falciparum*, pois ambos mostram a presença de células inflamatórias, edema, oclusão dos capilares pelo inchaço do endotélio, espessamento dos septos pulmonares pelo infiltrado leucocitário e presença de hemácias infectadas. Contudo no nosso modelo não foi possível ver a formação de fibrose encontrada nos humanos na fase proliferativa (Newton et al., 1998; Aitken et al., 2014).

Recentemente, descrevemos um modelo preditivo para estudar a patogênese da LPA/SDRA associada à malária. O objetivo de desenvolvermos um modelo matemático baseado nos parâmetros respiratórios e na parasitemia dos animais infectados com *P. berghei* ANKA foi prever antes do momento de morte quais animais iriam desenvolver a síndrome. Foi possível observar que os animais que sucumbem a LPA/SDRA possuem baixa frequência respiratória e elevada pausa respiratória (Penh).

Os achados histopatológicos mostraram que esses animais possuem destruição do epitélio alveolar, presença de membrana hialina, infiltrados inflamatórios e presença de eritrócitos parasitados no interstício e nos alvéolos. Também foi visto nestes animais a presença de opacidade pulmonar unilateral ou bilateral através de raios-X, quebra da barreira alvéolo-capilar, aumento da produção de VEGF e hipotermia (Ortolan et al., 2014).

Perante esses achados e ao desconhecimento ainda predominante da patogênese da LPA/SDRA associada à malária, tivemos por objetivo avaliar o perfil leucocitário pulmonar e o papel das moléculas inibidoras/ativadoras da morte celular programada durante a LPA/SDRA no modelo murino.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Central**

O presente trabalho teve como objetivo central a identificação e a compreensão dos elementos envolvidos na patogênese da LPA/SDRA associada à malária severa, estudo que foi abordado no modelo murino de infecção.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

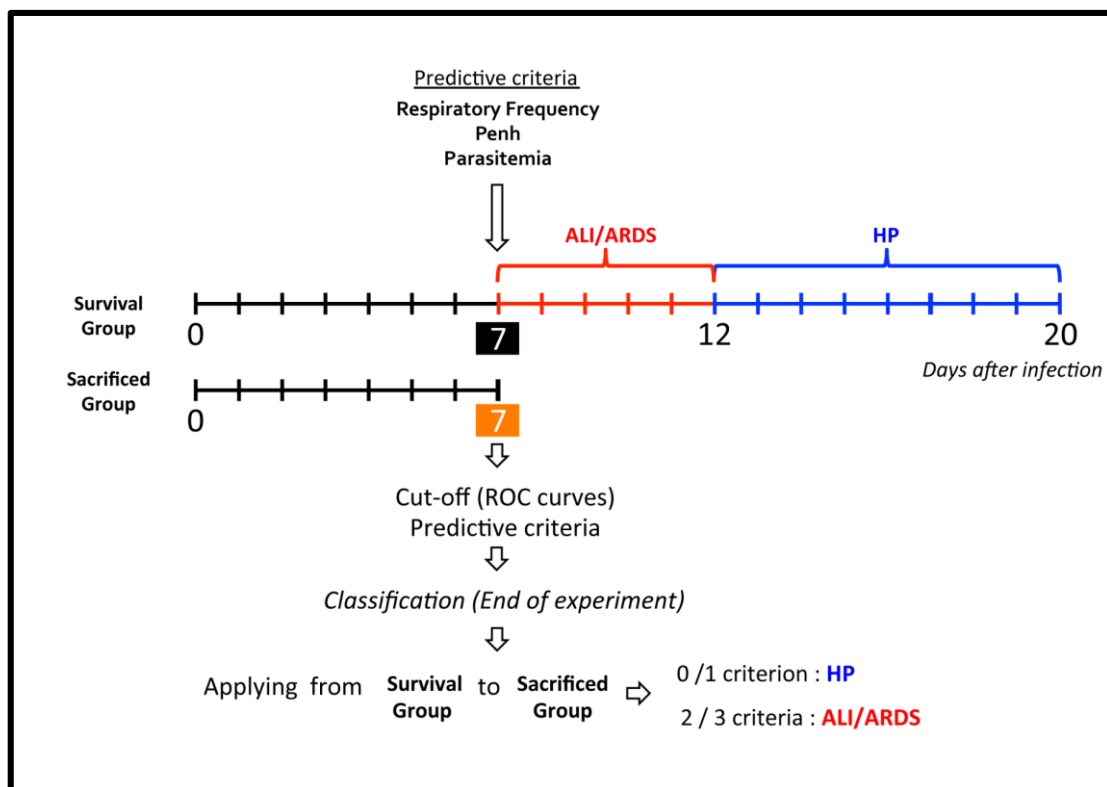
- a. Avaliar ao longo da infecção parâmetros fisiológicos da medida da capacidade respiratória, como o aumento da pausa respiratória (Penh) e a frequência respiratória (FR);
- b. Estudar de forma quantitativa e qualitativa a distribuição populacional dos leucócitos intrapulmonares nos animais LPA/SDRA e HP;
- c. Analisar a ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos no tecido pulmonar nos animais LPA/SDRA e HP;
- d. Avaliar a relação dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 e a LPA/SDRA;
- e. Avaliar a importância de neutrófilos e macrófagos no desenvolvimento da LPA/SDRA por meio de depleção dessas populações;
- f. Avaliar o papel da morte celular e de diferentes moléculas inibidoras/ativadoras de apoptose no tecido pulmonar e no lavado bronco-alveolar.

#### 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Epiphanio e colaboradores, em 2010, demonstraram que a associação entre camundongos da linhagem DBA/2 e *P. berghei* ANKA promove a LPA/SDRA. Cerca de 30 a 60% dos animais desenvolvem a LPA/SDRA e morrem entre os dias 7 e 12 pós-infecção, enquanto os demais morrem tardiamente de hiperparasitemia (HP) (Epiphanio et al., 2010).

Na maioria dos experimentos, foram utilizados 2 grupos de animais (animais da curva de sobrevivência e animais sacrificados), cada grupo continha de 10-12 animais entre 6 a 8 semanas de vida (Figura 6). Resumidamente, este modelo propôs o uso de variáveis como a frequência respiratória, parasitemia e o aumento da pausa respiratória (Penh) coletadas no 7º e 8º dias após a infecção para a elaboração do modelo preditivo. Os pontos de corte foram definidos por meio de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) de forma a minimizar a quantidade de resultados falsos positivos e falsos negativos para cada um dos parâmetros avaliados. Após definidos os pontos de corte para as três variáveis (do grupo de sobrevivência), os resultados das análises foram combinados e os animais que apresentavam pelo menos 2 parâmetros acima dos valores de corte foram considerados positivos para o teste e, portanto, classificados como LPA/SDRA. Caso contrário, os animais foram considerados negativos e agrupados como HP.

A sobrevivência dos animais foi acompanhada diariamente em ambos os grupos, assim como as parasitemias realizadas através de esfregaços sanguíneos, os quais foram coletados da cauda de cada animal (Ortolan et al., 2014). Os esfregaços foram fixados com metanol e, posteriormente, corados com Giemsa, conforme descrito por Kitamura e colaboradores (Kitamura et al., 1979).



**Figura 6** – Modelo experimental de camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA. Primeiro grupo representa os animais da curva de sobrevivência (em vermelho os dias em que os animais desenvolvem LPA/SDRA e em azul representando os dias do desenvolvimento de hiperparasitemia). O segundo grupo de animais é sacrificado no dia de interesse. Fonte:(Ortolan et al. 2014)

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

**5.1 Animais e parasitas:** foram utilizados camundongos da linhagem DBA/2 machos com 6-10 semanas de idade fornecidos pelo Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram criados e mantidos em mini-isoladores, em estantes ventiladas, sob condições controladas de umidade, iluminação e temperatura e com acesso livre a alimento e a água.

As infecções foram realizadas utilizando-se cepas de plasmódio murino *P. berghei* ANKA. Os camundongos foram infectados por via intraperitoneal (IP) com  $10^6$  eritrócitos parasitados, provenientes de animais previamente infectados (uma passagem).

Os procedimentos experimentais realizados com os animais foram de acordo com as diretrizes aprovadas pela Comissão Brasileira de Experimentação Animal (COBEA), pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (registrado sob nº 003 folhas 98 do livro 2), bem como pelo Comitê de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP), protocolo registrado através do número CPE-IMT 2011/123.

Para a eutanásia dos animais, administrou-se uma dose letal da solução composta por cetamina (Syntec, Brasil) 150 mg/kg e xilazina (Syntec, Brasil) 15 mg/kg via IP.

**5.2 Avaliação dos parâmetros respiratórios em câmaras plestimográficas:** os camundongos infectados e não infectados foram colocados em câmaras plestismográficas (BUXCO Eletronics, EUA) para avaliação da função pulmonar. O aparelho possui seis câmaras para medição nas quais seis animais são analisados individualmente e simultaneamente (Figura 7). Eles permanecem nas câmaras durante 10 minutos, nos quais os dados como frequência respiratória (respirações por minuto), volume corrente (ml), volume minuto (volume corrente multiplicado pela frequência respiratória, ml/min), tempo inspiratório ( $T_{r-1}$ ), tempo expiratório ( $T_e$ ) e o aumento da pausa respiratória (Penh) são registrados no software Biosystem XA. Segundo instruções do fabricante, o Penh é calculado pela fórmula:  $Penh = (T_e/T_{r-1}) \times PEF/PIF$ . Onde  $T_e$ : tempo expiratório;  $T_{r-1}$ : tempo de relaxamento; PIF: tempo de fluxo inspiratório; PEF: tempo de fluxo expiratório.



**Figura 7** - Camundongos DBA/2 alocados dentro de câmaras plestimográficas (BUXCO Eletronic, EUA) Foto: Luana dos Santos Ortolan

**5.3 Obtenção de células do tecido pulmonar:** o tecido pulmonar foi digerido com uso de colagenase tipo IV (2mg/ml e DNase 1mg/mL) por 40 minutos em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Para bloquear a reação enzimática foi utilizado meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os pulmões foram macerados e filtrados com ajuda de um êmbolo em *cell strainer* 70µm (BD Biosciences) e as células foram lavadas com meio RPMI 1640 (Gibco).

**5.4 Obtenção de células esplênicas:** para obtenção das células esplênicas, baços de animais sacrificados foram submetidos à maceração, colocados em 5 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco). O material extraído ficou em repouso no gelo por 5 minutos e logo após retirou-se 3 ml do sobrenadante. O sobrenadante foi centrifugado a 300x g por 5 minutos a 4°C. As hemácias foram lisadas com tampão ACK pH 7.4 (Life Technologies) por 3 minutos. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI 10% SFB.

**5.5 Avaliação da resposta inflamatória por citometria de fluxo de células extraídas dos pulmões e do baço:** após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 1 ml de tampão ACK pH 7.4 (Life Technologies) por 2 minutos para a lise das hemácias nos pulmões. Para inativar a lise colocou-se 10 ml de meio RPMI suplementado 10% SFB. As amostras foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 3 ml de meio RPMI suplementado com 10% SFB. Em seguida, para verificar a viabilidade e a contagem das células do baço e dos pulmões, estas foram diluídas e colocadas em Trypan blue (Invitrogen™). Após a contagem  $10^6$  células dos pulmões e do baço de animais infectados e não infectados foram distribuídas em placa com 96 poços e submetidas à centrifugação a 300 x g por 5 minutos. Em seguida, anticorpos monoclonais (BD PharMingen e Ebioscience) conjugados com fluorocromos e específicos para moléculas de superfície tais como CD4, CD8, CD19, TCR $\gamma\delta$ , Ly6G, F4/80, CD11c, CD11b, Ly6C, foram incubados por 30 min a 4°C ( $1\mu\text{g Ac}/1 \times 10^6$  células), em local de pouca luminosidade. As placas foram novamente centrifugadas e lavadas com *Staining Buffer*. As suspensões celulares marcadas com os anticorpos foram transferidas para tubos cônicos de propileno (BD Bioscience, EUA) e analisadas no aparelho FACScantoII (BD Bioscience, EUA), de acordo com a intensidade de fluorescência (3 lasers). O cálculo do número total de células de cada população é baseado: % da população viável vs número total de leucócitos isolados. A análise proveniente da aquisição no citômetro de fluxo foi realizada no software *Flowjo versão 10*.

**5.6 Ensaio de ativação de linfócitos, macrófagos e neutrófilos de células pulmonares pelo método de citometria de fluxo:** o protocolo para extração das células pulmonares, lise de eritrócitos e contagem das células viáveis foram realizados segundo os itens 5.3 e 5.5 deste material e métodos. As marcações de ativação de linfócitos e macrófagos foram realizadas com os anticorpos monoclonais (BD Pharmingen e Ebioscience) conjugados com fluorocromos para moléculas de superfície de linfócitos (CD44, CD69, CD62L, CD4, CD8 e CD19), de macrófagos (F4/80, CD11c, CD11b, LY6G, LY6C, CD80 e CD86) e de neutrófilos (Ly6G, CD11b). As células foram incubadas com os anticorpos por 30 min em 4°C ( $1\mu\text{g Ac}/1 \times 10^6$  células) em lugar com pouca luminosidade. Para a marcação de ativação de neutrófilo foi utilizado o composto dihidrorodamina 123 - DHR (SIGMA-ALDRICH). As células

foram lavadas com *Stannig Buffer* e centrifugadas a 300 x g por 5 min a 4°C e levadas para leitura no aparelho FACScantoII (BD Bioscience, EUA) de acordo com a intensidade de fluorescência (3 lasers). A análise proveniente da aquisição no citômetro de fluxo foi realizada no software *Flowjo versão 10*. Os ensaios de ativação foram mensurados a partir da mediana de fluorescência vista através de histogramas.

**5.6. Quantificação de citocina IFN- $\gamma$  em linfócitos CD4 e CD8 por citometria de fluxo (ensaio intracelular):** primeira etapa da marcação intracelular foi preparar a placa com os anticorpos que irão estimular as células na produção de citocinas, no nosso caso IFN- $\gamma$ . Preparou-se uma placa de 96 poços com 50 $\mu$ l/poço de anticorpo anti-CD3 10 $\mu$ g/ml + anticorpo anti-CD28 2 $\mu$ g/ml em 1 ml de Tampão TRIS 1M PH: 9. A placa com o estímulo foi deixada incubando (overnight) a 4°C. Após a incubação a placa foi lavada 2x com meio RPMI com 10%SFB e, em seguida, 10<sup>6</sup> células foram colocadas nos poços com o estímulo. Juntamente com as células foi colocado *Stop Golgi* (monensina) na diluição de (1,33  $\mu$ l de monensina + 1ml de RPMI 3%) e incubado por 6 horas. Após as 12 horas de incubação as células foram retiradas da placa de fundo chato e colocadas em placa de fundo U. As células sem estímulo (basais) também foram colocadas na placa de 96 poços e todas foram lavadas 2x com *Stanning Buffer* e centrifugadas por 8 minutos a 300 x g a 4°C. Posteriormente, as células receberam marcação extracelular com anticorpos CD4 e CD8 (1:200) e foram incubadas por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas novamente com *Stanning Buffer* e fixadas e permeabilizadas por 20 minutos com CitofixCitoperm (BD Pharmigen). Logo em seguida, as células foram lavadas com Permwash Solution na diluição 1:10 (BD Pharmigen) e realizada a marcação interna com IFN- $\gamma$ . O anticorpo anti-IFN- $\gamma$  foi diluído em Permwash e incubado por 30 minutos. As células foram lavadas 2x com Permwash e ressuspensas em tubos de propileno com 300 $\mu$ l de *Stannig Buffer* e em seguida levadas ao FACScantoII.

**5.7 Ensaio de ELISA para detecção de IFN- $\gamma$  e IL-10 no soro dos animais sacrificados no 7° dia pós-infecção:** utilizou-se para realização do ELISA das duas citocinas os kits (BD OptEIA IFN- $\gamma$  e IL-10). Preparou-se as placas de fundo chato com 100 $\mu$ l por poço de tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9,5 mais anticorpos de captura e incubou-se *overnight* a 4°C. Em seguida, lavou-se 3 vezes as placas com tampão de

lavagem (PBS 1X + 0,05% Tween). Foi feito o bloqueio das placas com PBS 1X + 10% SFB, sendo colocado 200µl por poço por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente 3 vezes com tampão de lavagem e a curva padrão foi preparada com IFN- $\gamma$  e IL-10, com diluições seriada conforme recomendação do fabricante. Colocou-se 100µl do padrão em cada poço e nos demais foi colocado 100µl de amostra e incubado 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida lavou-se 3 vezes com tampão de lavagem e adicionou-se aos poços 100µl solução de detecção (anticorpo de detecção + Sav-HRP) e incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se 3 vezes as placas com tampão de lavagem e colocou-se 100µl de Solução Substrato (TMB) e incubou-se no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 50µl de Solução de Parada (1M de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e as placas foram lidas em espectrofotômetro com absorbância de 450nm.

**5.8 Aquisição do lavado broncoalveolar de camundongos DBA/2:** o lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado em camundongos infectados e não infectados (NI) após administração de doses letais de ketamina/xilazina no 7º dia pós-infecção. A traquéia foi exposta e canulada (cateter 16G x 1,88 BD Angiocath) seguido da inserção de 1 ml de PBS 1X estéril e posterior aspiração do líquido com o auxílio de uma seringa de 3mL. A viabilidade celular foi analisada utilizando-se solução de Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich).

**5.9 Ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos nos pulmões e no lavado broncoalveolar (LBA):** os lavados broncoalveolares foram coletados conforme a descrição do item 5.9 e, foram congelados a -20°C até a realização do ensaio. Os pulmões foram perfundidos com 10ml de PBS (1X), para retirada de todo sangue e, em seguida, foram congelados com 1ml de PBS (1X) a -20 °C. Após o descongelamento do LBA e dos pulmões à temperatura ambiente, estes foram sonicados por 60 segundos a 40Hz com o *TissueRuptor* (Biospec Products Inc) e, posteriormente, centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados em tubos de polipropileno de 1,5 ml e colocados no gelo. Para a dosagem de mieloperoxidase utilizou-se 100 µl do sobrenadante e 100 µl de solução substrato colocados em placa de 96 poços. A solução substrato é composta de tampão citrato (ácido cítrico 10mM + citrato de sódio 10mM), 5mg de *o*-



Phenylenediamine dihydrochloride OPD (Sigma-Aldrich) e 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8,8mM). A curva padrão foi realizada com 100  $\mu$ l de peroxidase tipo II (Sigma-Aldrich) a 500 ng/ml + 100  $\mu$ l de substrato. Para finalizar a reação foi utilizada solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (Epoch-Bioteck) com o comprimento de onda de 492nm.

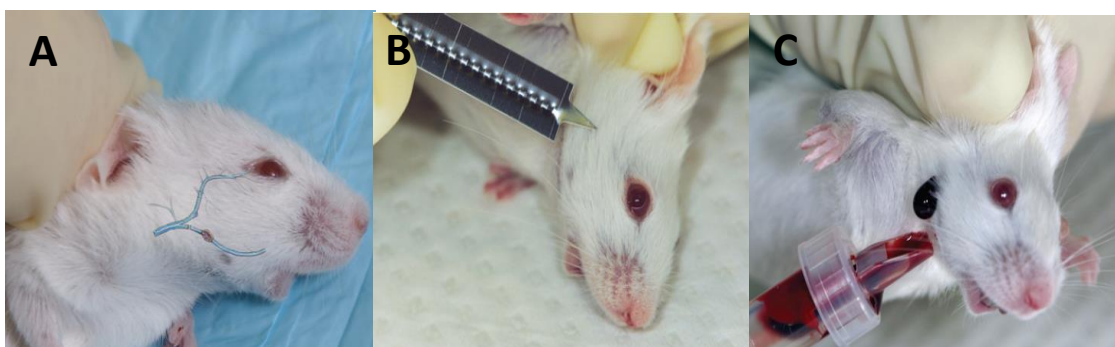
**5.10 Ensaio de citometria de fluxo utilizando o marcador de atividade de Neutrófilos DHR 123:** a coleta dos pulmões e a dissociação das células da matriz tecidual foram descritos nos itens 5.3 e 5.5 dos materiais e métodos. As células pulmonares ( $1 \times 10^6$ ) após a contagem foram colocadas em tubos cônicos (de polipropileno de 1,5 ml) e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a marcação com anticorpos monoclonais Ly6G e CD11b foi realizada por cerca de 30 minutos a 4°C. Após a incubação adicionou-se *Stanning Buffer* às amostras e essas foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e iniciou-se a incubação com Dihidrorodamina 123 (DHR 123) 1 $\mu$ g/ml por 30 minutos a 37°C. Após a incubação houve a adição de 200 $\mu$ l de *Stannig Buffer* e centrifugou-se a 300 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspendido em tubos de propileno com 300 $\mu$ l de *Stannig Buffer* e em seguida levados ao FACScantoII para a leitura. Os dados coletados foram analisados pelo programa *Flowjo versão 10*.

**5.11 Cultivo do Hibridoma RB6-8C5:** as amostras congeladas do Hibridoma RB6-8C5 foi gentilmente cedido pela professora doutora Vera Lucia Garcia Calich, do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, para a expansão e posterior purificação do anticorpo anti-GR1 produzido. As células foram retiradas do nitrogênio (-196°C) e foram descongeladas a 4°C e colocadas em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 20 $\mu$ g/ml de Gentamicina (para 100 ml – 250  $\mu$ l) e 5% SFB ultralow gelado. As células praticamente descongeladas receberam aos poucos o meio gelado e assim foi realizada a mistura. Garrafas de 25 cm<sup>2</sup> receberam 10 ml de meio DMEM-F12 com as células e estas foram levadas ao microscópio invertido para checagem da sua viabilidade. As células viáveis foram levadas para a estufa a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>. A cada três dias o meio era trocado e novas alíquotas eram congeladas.

**5.12 Purificação das células RB6-8C5 para a obtenção de anticorpo monoclonal anti-GR1:** as células do hibridoma RB6-8C5 após crescimento em um intervalo de (48-72 horas), foram suspensas em 5 mL de meio DMEM-F12 e repicadas na proporção de 1:5 para novos frascos. Quando atingiram número suficiente ( $35 \times 10^6$  células totais), estas foram coletadas e inoculadas na unidade biorreatora MiniPERM (Sarsted, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante, durante 12 dias, na presença de protetor celular a 0,5% e anti-espumante a 1% e velocidade inicial de 2 rpm com incremento de 1 rpm a cada 24 horas até o limite máximo de 8 rpm. Cerca de 70 ml de sobrenadante da cultura foi inicialmente precipitado em solução de sulfato de amônia a 90% de saturação em banho de gelo, e posteriormente as proteínas precipitadas foram sedimentadas por centrifugação a  $3000 \times g$  por 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado foi suspenso em solução salina 0,15 M e dialisado contra a mesma solução, com várias trocas, até a remoção completa do sulfato de amônia. Após diálise, as soluções contendo anticorpo foram purificadas por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína G, empregando-se solução tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 para a adsorção e tampão Tris-HCL 1M pH 2,5 para a eluição. As preparações de anticorpos eluídos foram dialisados e sua pureza foi avaliada por SDS-PAGE. Ao final do processo foram obtidos cerca de 15 mg de anticorpo purificado. Os anticorpos purificados foram divididos em alíquotas e congelados a  $-20^\circ\text{C}$  até o uso. A purificação do anticorpo foi realizada pela empresa VBP biotecnologia Ltda.

**5.13 Ensaio de Depleção de células GR1<sup>+</sup>:** foram utilizados camundongos DBA/2 com 6 a 8 semanas inoculados com  $10^6$  eritrócitos infectados de *P.berghei* ANKA. Utilizaram-se dois grupos de animais, no qual um deles recebia uma dose de anticorpo (controle IgG1) 0,2 mg/kg no primeiro dia pós infecção e o outro grupo recebia o anticorpo anti-RB6-8C5 IgG1 (anti-Gr1) na dose de 0,2 mg/kg, também no primeiro dia pós infecção. Ambos os grupos foram monitorados durante 20 dias. Nos dias 0, 2, 5, 7 e 9 foram realizadas coletas de sangue para quantificação de leucócitos do sangue, tanto por esfregaço sanguíneo, quanto por citometria de fluxo. Também foram realizadas necrópsias no dia de morte desses animais para confirmação se estes tinham lesões compatíveis com LPA/SDRA como efusão pleural e pulmões hemorrágicos ou não. A parasitemia desses animais foi acompanhada ao longo do período por lâminas de esfregaços sanguíneos.

**5.13.1 Coleta de sangue, parasitemia e contagem diferencial das células brancas do sangue:** nos dias 0, 5 e 7 pós-infecção foram realizadas as coletas de sangue de todos os camundongos pela veia submandibular (cerca de 100µl) utilizando-se lancetas descartáveis (Accu check) (Figura 8). O sangue foi coletado em microtubos de 2 ml nos quais foram adicionados 4µl de heparina (5000UI/ml) (Golde et al. 2005). O sangue coletado foi lavado 2 vezes com a solução (PBS 1X + 5mM EDTA) e centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos a 4°C. Após as lavagens foi adicionado ao sangue 2 ml de tampão de lise ACK pH 7.4 (Life Technologies) durante 3 minutos e em seguida lavado com meio RPMI 10% SFB a 300 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células brancas foram ressuspendidas em 1 ml de meio RPMI 10% SFB. Foram coletados esfregaços sanguíneos que foram fixados com metanol e corados com Giemsa para contagem e visualização das células parasitadas definindo assim o grau de infecção. Outras lâminas contendo esfregaços sanguíneos foram fixadas e coradas com panótico para uso hematológico (Laborclin). Após a coloração com panótico foram realizadas contagens dos leucócitos sanguíneos onde se diferenciou monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos para verificar a depleção dos neutrófilos circulantes e/ou o aumento ou diminuição das demais células.



**Figura 8** - Coleta de sangue em camundongo a partir da veia submandibular. (A) região onde se encontram os vasos. (B) Local exato em que se utilizando uma lanceta rompe-se o vaso para coleta. (C) Coleta em microtubo. Fotografias do artigo (Golde et al. 2005).

**5.13.2 Fenotipagem das células brancas do sangue por citometria de fluxo:** do sangue previamente processado e lisado, retirou-se  $10^6$  células que foram colocadas em placa de 96 poços e marcadas com anticorpos monoclonais (CD4, CD8, CD11b, Ly6G, Ly6C e F4/80). Após adicionar o mix de anticorpos nas células deixou-se marcar por 30

minutos, no escuro e a 4°C. Depois desse período as células foram 2 vezes lavadas com *Stannig Buffer* e as suspensões celulares marcadas com os anticorpos foram transferidas para tubos cônicos de propileno (BD Bioscience, EUA) e analisadas no aparelho FACScantoII (BD Bioscience, EUA) de acordo com a intensidade de fluorescência (3 lasers).

**5.14 Preparação de Lipossomas com Clodronato:** segundo o protocolo de Deamer e colaboradores, o clodronato foi encapsulado por lipossomos por uma injeção de éter (Deamer and Bangham 1976). A solução de 0,5 ml contendo éter foi preparada com 50 mg de fosfatidilcolina e 8 mg de colesterol foi injetada a (0,2 ml/min) dentro de 5 ml de 50 mmol/L de solução de clodronato mantida a uma temperatura de 42°C. A solução de éter é injetada com uma seringa adaptada, modelo KDS120 Push-Pull Pump, equipada com uma fina agulha n° 3D (KD Scientific Inc.). Durante a injeção gás argônio (Ar), foi adicionado a solução de clodronato com a formação de bolhas contínuas e desenvolvimento dos lipossomos e eliminação do solvente residual. A suspensão de lipossomos finalizados foi centrifugada a 10.000 g por 30 minutos (Thermo Scientific) a 25°C. O pellet foi lavado duas vezes com solução salina 0,9% (peso/volume). No final o pellet foi diluído em 2 ml de solução salina e filtrado a 0,8 µm de membrana de policarbonato. A concentração final de clodronato no lipossomo foi de 0,5 mmol/L. A porcentagem de clodronato encapsulada nos lipossomas é de 1% da quantidade inicial adicionada de 60 mg/ml de Bonefós (Bayer HealthCare Pharmaceuticals).

**5.15 Ensaio de Depleção de Macrófagos utilizando-se Clodronato:** para esse ensaio foram utilizados camundongos DBA/2 com 8 a 10 semanas. Esses camundongos foram inoculados com  $10^6$  eritrócitos infectados de *P. berghei* ANKA. Primeiramente, os animais infectados receberam uma dose intranasal de (12µg em 100µl) no primeiro dia pós-infecção e foram sacrificados em 48, 96 e 140 horas após o tratamento para se verificar a depleção e repopulação dos macrófagos pulmonares. Visto que os macrófagos eram depletados realizamos outros experimentos em que os animais foram divididos em dois grupos que receberam tratamentos diferentes no primeiro dia pós-infecção. Um grupo recebeu como tratamento apenas solução salina (0,9%) por via intranasal e o outro recebeu pela mesma via (12µg em 100µl) de lipossomas com clodronato. Esses animais foram acompanhados durante 20 dias para verificarmos se a

depleção dos macrófagos dos pulmões desses camundongos não proporcionava LPA/SDRA promovendo a sobrevivência deles.

**5.15.1 Coleta do tecido pulmonar, parasitemia e contagem diferencial das células brancas do sangue:** os animais infectados receberam clodronato em lipossomas no primeiro dia pós-infecção e foram eutanasiados para a coleta dos pulmões em 48, 96 e 140 horas após o tratamento para verificarmos a depleção e a repopulação dos macrófagos, além de analisarmos as populações de neutrófilos e linfócitos. Para este ensaio foi utilizado o método de extração das células pulmonares descrito no item 5.3 e as células foram marcadas com anticorpos monoclonais F4/80, Ly6G, CD4, CD8, CD11c e CD11b. Esfregaços sanguíneos foram coletados, fixados com metanol e corados com Giemsa para contagem e visualização das células parasitadas definindo assim o grau de infecção. Outras lâminas contendo esfregaços sanguíneos foram fixadas e coradas com panótico para uso hematológico (Laborclin). Após a coloração com panótico foram realizadas contagens dos leucócitos sanguíneos onde se diferenciou monócitos, linfócitos e neutrófilos para verificar a depleção dos neutrófilos circulantes e/ou o aumento ou diminuição das demais células.

**5.16 Coleta, fixação e congelamento de tecidos para ensaios de detecção de apoptose:** para a coleta dos pulmões, os animais sacrificados foram perfundidos com 10 ml de PBS 1X e, em seguida, os pulmões foram retirados e colocados em Isopentano. Posteriormente, os pulmões foram incluídos em meio OCT tissue tek® (Sakura Finetek, CA, EUA) e congelados em nitrogênio líquido para criocorte. Os espécimes foram cortados no criostato (Leica, modelo CM1850, Alemanha) com espessura de 7 µm e esses foram depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas ( $\gamma$ -Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane, Sigma, CA, EUA). Essas lâminas foram utilizadas para técnica de TUNEL.

**5.17 Reação de TUNEL para células apoptóticas:** a reação de TUNEL é um método morfológico específico para detecção do apoptose baseado nas características bioquímicas das células em morte celular programada, que sofrem clivagem internucleossômica do DNA. A reação de TUNEL foi realizada segundo instruções do fabricante (*In Situ Cell Death Detection Kit POD*, Roche Diagnostics, Mannheim,

Alemanha). Dessa forma, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos, e em seguida lavadas em PBS 1X pH 7,4 por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas sob gelo por 2 minutos com solução permeabilizante (0,1% Triton-X em 0,1% de Citrato de Sódio), seguida de lavagens por 2 minutos com PBS 1X. Posteriormente, foi adicionado 50µl da mistura da reação (Label solution + Enzyme solution) aos cortes e esses foram incubados em câmara úmida a 37°C por 60 minutos, protegidos contra luminosidade. Após a incubação as lâminas foram lavadas 3x em PBS 1X e montadas com resina Mowiol (Sigma-Aldrich). Logo após a montagem as lâminas foram levadas ao microscópio de imunofluorescência Zeiss (Axio Imager M2) onde as fotografias foram retiradas pela câmera Zeiss (Axio Cam HRc) e as lâminas foram previamente analisadas. Para a contagem das células em apoptose pela área de tecido utilizou-se o programa Image-Pro Plus versão 6.0 (Média Cybernetics).

**5.18 Reação da Anexina V por citometria de fluxo:** anexina-V é uma proteína fosfolipídica obrigatória, com uma alta afinidade por fosfatidilserina (PS). Durante a morte celular programada a PS transloca-se para a superfície externa das células apoptóticas. A detecção de PS com anexina-V, serve como um marcador para células apoptóticas. A metodologia empregada foi a do kit (*Annexin-V-FLUOS Staining Kit*, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Células do lavado broncoalveolar foram coletadas em 1 ml de PBS 1x e contadas em câmara de newbauer com azul de tripan. Cerca de  $10^5$  células foram colocadas em um tubo de fundo cônico de polipropileno de 1,5 ml, lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. Logo após, as células foram incubadas com os anticópos monoclonais F4/80, CD11c, CD11b, Ly6G, Ly6C, CD3 por 30 minutos. Em seguida as células foram lavadas com *Staining Buffer* e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. As células foram novamente incubadas com anexina-V diluída em tampão hepes por 10 min (1:100). A seguir as células foram lavadas com o tampão hepes e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. Após as lavagens as células foram filtradas e colocadas em tubos cônicos de propileno com 200 ml de tampão Hepses, para a análise de células em necrose foi adicionado o reagente 7AAD (Amino-Actinomicina D) 5 minutos antes do início da leitura. A leitura foi realizada no citometro FACScantoII (BD Biosciences, EUA).

**5.19 Quantificação de genes de morte celular programada por meio da reação da polimerase em cadeia com transcriptase reversa quantitativa com o kit PAMM-012ZC Apoptose Array:** dos animais sacrificados no 7º dia pós-infecção foram coletados os pulmões que posteriormente obtiveram seu RNA mensageiro extraído com o *RNeasy Mini Kit* - Qiagen e realizou-se a reação de síntese de cDNA com o *kit HT First Strand cDNA* (Qiagen). Neste kit o protocolo utilizado por amostra foi de 6µl de tampão GE2 + 8µl de RNA [1µg de RNA] e, em seguida colocado no termociclador a 37°C por 5 minutos, depois se adicionou no mesmo tubo 6µl da enzima BC4 na ciclagem de 42°C por 15 minutos + 95°C por 5 minutos. Após a retirada das amostras do termociclador colocou-se 91µl de água. Ao cDNA pronto (102µl por amostra) foi adicionado 1350µl de *Sybergreen Mastermix* (Qiagen) e 1248µl de água livre de RNase. A mistura de reagentes foi colocada nas placas de 96 poços do kit PAMM-012ZC (*Mouse Apoptose array*-Qiagen), onde os primers liofilizados já estavam presentes no fundo da placa. As placas prontas foram seladas e levadas ao equipamento Applied Biosystem (7500 fast). Os resultados foram analisados pela técnica de quantificação relativa ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) em software disponibilizado pela própria Qiagen para os kits de Array. As placas de PCR-Array possuíam 82 genes de morte celular programada e 4 genes constitutivos utilizados para normalização das análises.

**5.20 Ontologia de genes e geração de vias de apoptose através da análise de bioinformática:** após a realização do PCR-Array foi necessário realizar o estudo da ontologia dos genes (Gene Ontology). Os genes que apresentaram diferenças estatísticas significativas entre LPA/SDRA e HP, ou que demonstraram tendência para tal ( $p \leq 0,1$ ), foram analisados no programa de bioinformática DAVID (David Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>), disponível online. Os genes estudados também geraram 3 diagramas de interação molecular dentro do contexto celular da apoptose. Os diagramas de interação molecular utilizadas pelo DAVID foram o KEGG e o Biocarta. Esses modelos preditivos computacionais cruzaram referências com muitos bancos de dados e criaram um sistema autossuficientes para ligar o genoma a níveis moleculares. Eles construíram blocos através de genes e moléculas e escreveram diagramas com suas interações/vias para as funções celulares (Kanehisa et al. 2004; Chou et al. 2008).

**5.21 Reação da polimerase em cadeia com transcriptase reversa quantitativa (qRT PCR):** foram realizados estudos da expressão de genes relacionados a apoptose a partir de pulmões retirados de animais sacrificados no 7º dia pós-infecção. Os pulmões foram perfundidos com PBS 1X, colhidos a fresco e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, macerados e colocados em solução Trizol e armazenados a -80 °C, até o processamento para expressão de genes para apoptose (Bcl-2, BAX, p53, Bak, FasL e Fas em um primeiro momento e depois para os genes significativos no PCR-Array como Bcl-XL, Casp3, Casp9, FADD, CAD, BAD, BID, TNFR-1, XIAP/IAP, Trail, Ripk-1 e Akt) (Tabela 2). A extração de RNAm foi realizada de acordo com o protocolo “Animal Cell I” do kit de extração de RNA “RNEasy Mini” (Qiagen). A viabilidade do RNAm extraído foi verificada no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). A síntese de cDNA foi realizada com 1 µg de RNA da amostra, utilizando-se o kit “First Strand cDNA Synthesis” para RT-PCR (Roche) de acordo com as indicações do fabricante e para a execução qRT-PCR utilizamos SyBr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todos os resultados foram normalizados através da expressão do constitutivo HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) e foi utilizado o método quantitativo do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Abaixo a descrição dos primers utilizados para a expressão dos genes pró e antiapoptóticos por qRT-PCR.



**Tabela 2** – Lista de primers contendo genes pró e anti-apoptóticos mais gene constitutivo.

Gene	Produto Amplificado	Nº no Genbank	Fita: senso	Fita: antisenso
<b>Bax</b>	173	NM_007527	5'-tgcagaggatgattgctgac-3'	5'-gatcagctcggcacttttag-3'
<b>Bcl2</b>	212	NM_009741	5'-tgcctacaagaagcctggt-3'	5'-aaaatgcttctcggcacaat-3'
<b>Bak</b>	116	NM_007523.2	5'-tggaccaccaacagcatctt-3'	5'-tgtgggctgaagctgttcta-3'
<b>P53</b>	197	NM_011640.1	5'-ctagcattcagccctcatc-3'	5'-caacagatcgccatgcagt-3'
<b>FAS</b>	102	NM_007987.2	5'-tgaccagaataccaatgc-3'	5'-caaggttccatgttcacac-3'
<b>FASL</b>	174	NM_010177.4	5'-atagccaaccccagtacacc-3'	5'-agagatcagcggttccat-3'
<b>HPRT</b>	173	NM_013556	5'-tgctcgagatgtagaagg-3'	5'-tcccctgttactggtcatt-3'
<b>AKT</b>	180	NM_009652.3	5'-gggaaggtgattctggtgaa-3'	5'-gtcgtgggtctggaatgagt-3'
<b>RIPK1</b>	217	NM_009068.3	5'-ccctgtccaataaactgt-3'	5'-gttaggcggctcagctctt-3'
<b>FADD</b>	162	NM_010175.5	5'-gcctcaagcctaccatgttc-3'	5'-agtctggggagtcgaagagca-3'
<b>CAD</b>	153	NM_007859.4	5'-gcctcaagcctaccatgttc-3'	5'-agtctggggagtcgaagagca-3'
<b>Bad</b>	187	NM_007522.3	5'-aggacttatcagcccgaagca-3'	5'-gctcaactctgggactctgg-3'
<b>Bid</b>	206	NM_007544.3	5'-ctctgcgttcagcttgagt-3'	5'-cagaagcccacatcatgtt-3'
<b>Casp3</b>	205	NM_001284409.1	5'-cgtgggaaagtgaaccagat-3'	5'-tgcttccaagtcctgtgtc-3'
<b>Casp9</b>	172	NM_019600.1	5'-ggccctcctcctctcttcatct-3'	5'-tctctgctcttctgtgtga-3'
<b>Bcl-XL</b>	150	NM_35049.1	5'-gctgggacacttttggat-3'	5'tgtctggtcactccgactg-3'

Primers gerados a partir de sequências publicadas no Genbank. Identificamos na tabela o nome do gene, fragmento amplificado, número do Genbank e sequência dos primers senso e antisenso.

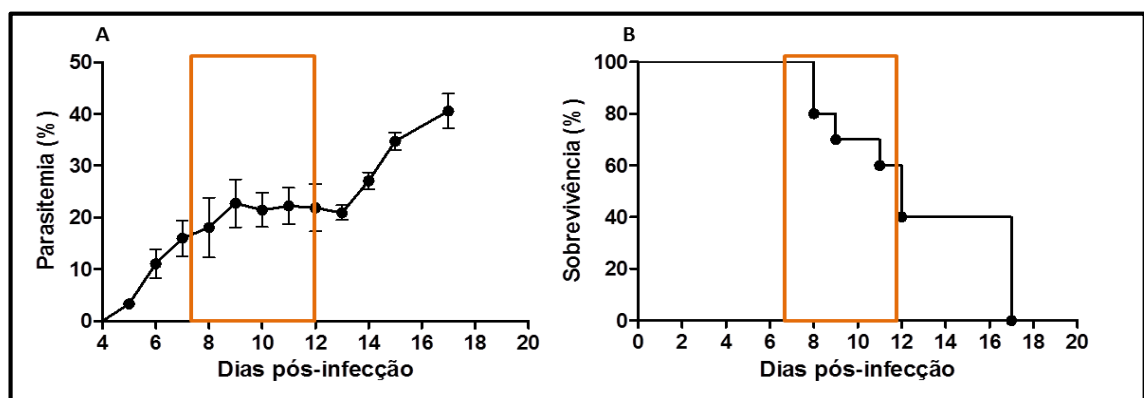
**Análises estatísticas:** As análises estatísticas foram realizadas com o apoio do software GraphPad Prism 5.0. Os dados foram analisados para normalidade pelos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk e para variância com o teste Bartlett's. As variáveis não paramétricas foram comparadas utilizando o teste de Mann Whitney entre os grupos LPA/SDRA e HP. Para as análises de três grupos, nós utilizamos o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's. Para as curvas de sobrevivência foram aplicados os testes de Log-rank e Gehan Breslow Wilcoxon. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando  $p \leq 0.05$  (5%). Os pontos de corte utilizados para separar os grupos foram gerados através de curvas ROC produzidas com o apoio do software MedCalc version 8.2.1.0.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Estabelecimento de perfil de parasitemia e monitoramento da sobrevivência dos camundongos infectados com *P.berghei* ANKA.

Em nosso modelo de infecção foram utilizados camundongos da linhagem DBA/2 infectados com  $10^6$  eritrócitos parasitados (EP) de *P. berghei* ANKA. Segundo nosso delineamento experimental os animais foram separados em dois grupos, sendo um grupo de sobrevivência e o outro grupo sacrificado para coleta de amostras. Os animais do grupo de sobrevivência eram monitorados até o 20º dia pós-infecção, onde os sobreviventes eram então submetidos à eutanásia. Todos os animais que morriam durante o período de infecção foram submetidos a necropsias para a verificação macro e microscópica do perfil histopatológico recentemente descrito em três de nossos artigos (Epiphanio et al., 2010; Aitken et al., 2014; Ortolan et al., 2014). Esfregaços sanguíneos foram coletados em todos os dias de infecção, a fim de se estabelecer um perfil parasitêmico para os nossos animais.

Nossos resultados mostram que cerca de 30 a 75% dos animais do grupo de sobrevivência desenvolvem a LPA/SDRA entre o 7º e o 12º dia pós-infecção. Esses animais apresentaram efusão pleural, edema e hemorragia pulmonares, ruptura da parede alveolar, infiltrados inflamatórios, presença da membrana hialina, corroborando com os dados publicados anteriormente pelo nosso grupo (Epiphanio et al. 2010; Ortolan et al., 2014). Os animais que não morreram durante esse período foram a óbito mais tardiamente em decorrência do aumento da parasitemia e da anemia severa, sendo denominados de HP (Gráfico 3A e 3B).



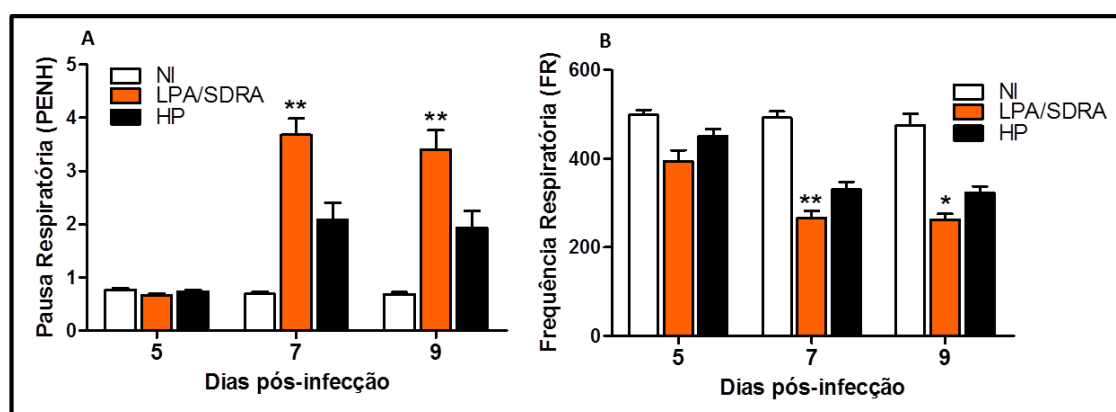
**Gráfico 3** - (A) Parasitemia e (B) curva de sobrevivência em que 60% dos animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA desenvolvem a LPA/SDRA entre o 7º e o 12º dias pós-infecção. Gráficos representativos de 15 experimentos independentes (n= 10-12 animais por experimento).

## 6.2 Perfil respiratório de camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA mensurados em câmaras plestimográficas.

Camundongos DBA/2 não infectados e infectados por *P. berghei* ANKA foram colocados em câmaras plestimográficas (Buxco Eletronics, EUA) para avaliação da função pulmonar. Para o estudo foram eleitos dois parâmetros a pausa respiratória (PENH) e a frequência respiratória (FR) como ferramentas na avaliação da capacidade pulmonar. Esses parâmetros foram coletados nos animais do grupo de sobrevivência e nos animais do grupo sacrificado em diferentes tempos de infecção (5, 7 e 9 dias pós-infecção).

Nota-se nos gráficos abaixo que o perfil respiratório dos animais infectados muda conforme o tempo de infecção. A pausa respiratória (PENH) e a frequência respiratória (FR) para o 5º dia pós-infecção não apresentam diferenças significativas entre os grupos LPA/SDRA e HP, sendo que os animais infectados possuem o perfil respiratório até esse momento muito similar com os animais não infectados. No 7º e 9º dias pós-infecção o perfil respiratório dos animais infectados é alterado, pois há um aumento significativo no PENH (\*\* $p < 0,01$ ) e uma diminuição significativa na FR (\*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ ) (Gráfico 4A e 4B).

Os parâmetros avaliados nesse perfil foram utilizados na elaboração do modelo preditivo apresentado a seguir, o qual nos permitiu a divisão dos animais nos grupos sacrificados em LPA/SDRA e HP.



**Gráfico 4** – Perfil respiratório dos animais não infectados e infectados com *P. berghei* ANKA. Os gráficos representam (A) aumento da pausa respiratória (Penh) e (B) frequência respiratória (FR) para 5º, 7º e 9º dias pós-infecção (dpi) entre os animais LPA/SDRA e HP. Nota-se que não houve diferenças significativas entre os grupos para o 5º(dpi), mas um aumento do Penh e diminuição da FR nos animais LPA/SDRA nos dias 7º e 9º dpi. Dados de 3 experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SEM (Kruskal-Wallis test onde \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ). NI= camundongos não infectados. (n= 8 NI; n=17 LPA/SDRA e n=14 HP).

### 6.3 Classificação dos animais nos grupos LPA/SDRA ou HP conforme modelo preditivo.

Em nossos experimentos obtivemos sempre dois fenótipos distintos de animais, os que desenvolviam a LPA/SDRA e os animais que morriam mais tardiamente com hiperparasitemia HP. Esses fenótipos eram bem definidos para o grupo de sobrevivência, pois os animais que desenvolviam a LPA/SDRA morriam entre o 7º e 12º dias pós-infecção com efusão pleural, hemorragia e edema, enquanto que os animais HP morriam mais tardiamente com pulmões acinzentados e anemia. Mas, como poderíamos saber se um animal iria desenvolver LPA/SDRA ou HP antes da sua morte? Como poderíamos estudar a patogênese da doença sem submetermos os animais a eutanásia em tempos precoces de infecção?

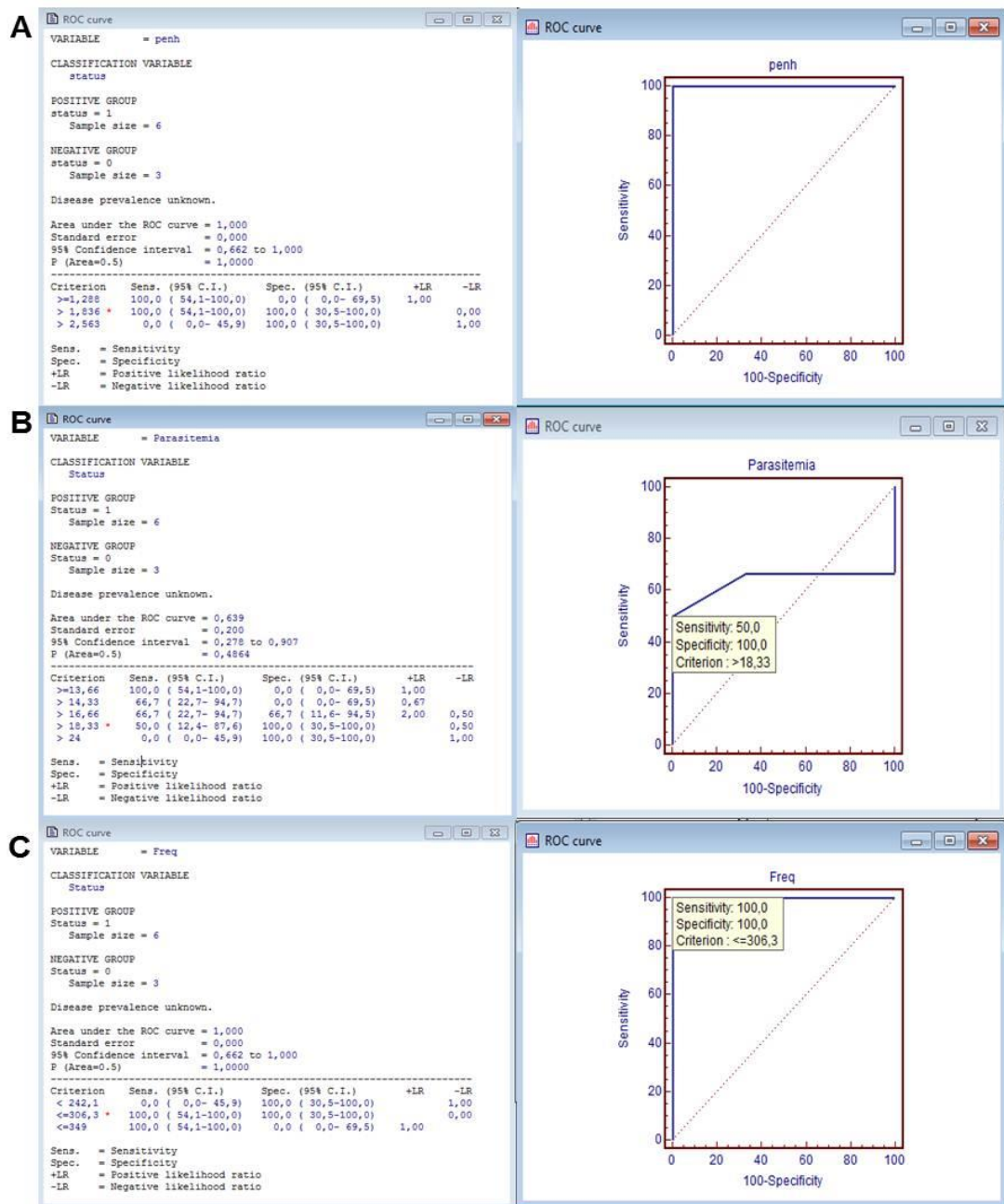
Com a finalidade de estudar o desenvolvimento da LPA/SDRA e mais especificamente, das células inflamatórias, da ativação celular, da produção de citocinas e da apoptose, houve a necessidade de diferenciá-los antes do momento da morte. Para isso, foi elaborado um modelo preditivo sob a orientação do Prof. Dr. Marcos Amaku do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo), em que utilizamos as variáveis Penh, FR e parasitemia e estabelecemos valores de corte estabelecidos por curvas.

Conforme descrito, o modelo publicado por nós, em 2014, os animais infectados eram divididos em dois grupos: o grupo de sobrevivência, no qual era possível identificar a causa da morte e o grupo sacrificado no qual eram feitas as coletas no dia de interesse (Ortolan et al., 2014).

As variáveis utilizadas no modelo preditivo foram o aumento da pausa respiratória (Penh), a frequência respiratória (FR) e a parasitemia dos animais de ambos os grupos (Figura 9). Através do software de análise estatística (MedCalc® v.8.2), cada um dos parâmetros do grupo de sobrevivência anteriormente mencionados, foram analisados individualmente por meio de curvas de características de operação do receptor, ou simplesmente curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve). Esta curva é representada por um gráfico de sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos) *versus* especificidade (taxa de falsos positivos) (Margotto, 2010).

Assim informamos ao programa, que cada variável estava associada aos *status* do animal do grupo de sobrevivência, ou seja, se ele desenvolveu ou não a LPA/SDRA. As

curvas resultantes forneceram valores de corte, para posteriormente diferenciarmos os grupos sacrificados em LPA/SDRA ou HP.

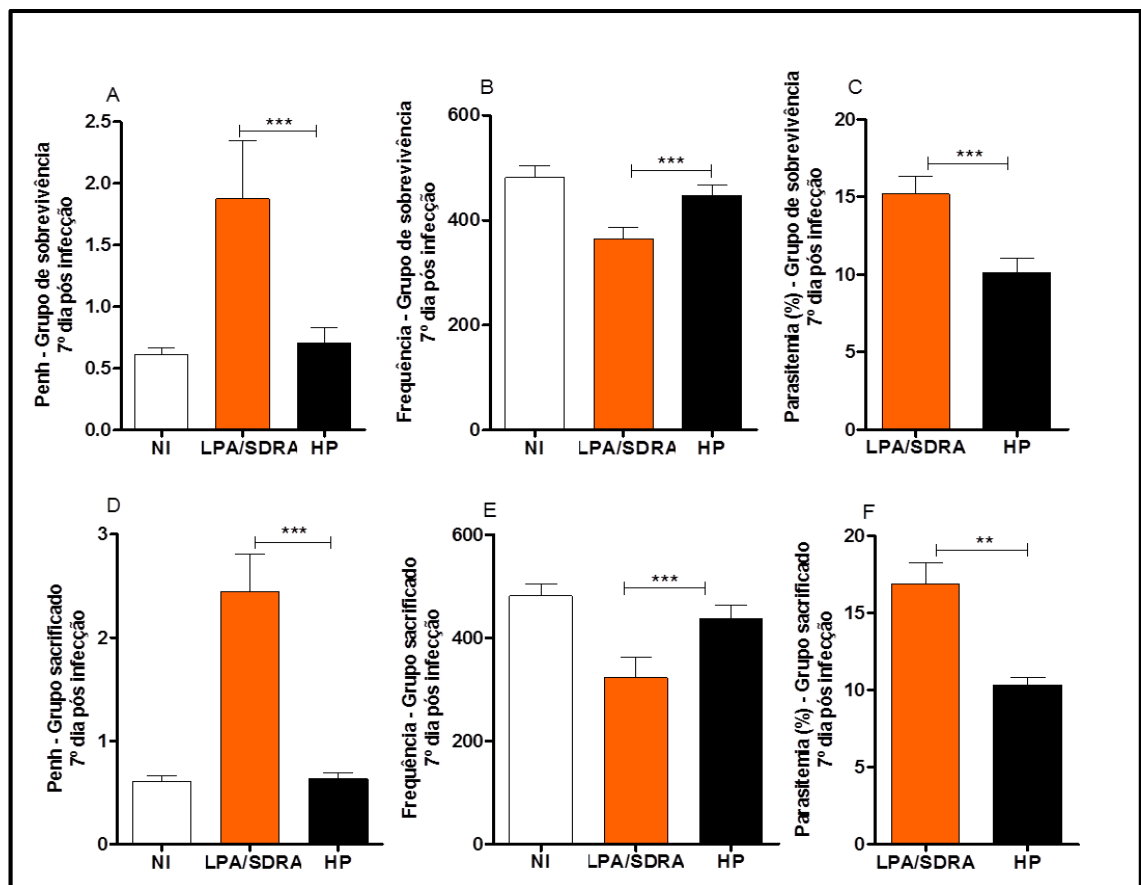


**Figura 9** - Exemplos de curva ROC dos três diferentes parâmetros clínicos utilizados. (A) curva escolhida para o parâmetro Penh (100% sensibilidade e 100% especificidade). (B) parasitemia (50% sensibilidade e 100% especificidade) e (C) frequência respiratória (100% sensibilidade e 100% especificidade).

Após definidos os pontos de corte para as três variáveis, os resultados das análises foram combinados e, foram considerados como positivos (animais que desenvolveram LPA/SDRA), os animais que apresentaram pelo menos dois valores iguais ou acima dos

pontos de corte para as variáveis analisadas. Caso contrário, os animais foram considerados negativos e agrupados como HP (Gráfico 5).

Esse modelo preditivo permitiu-nos inferir com alta sensibilidade ( $\leq 100\%$  and  $\geq 67\%$ ; média de 88.31%; SD  $\pm 11.95$ ) e especificidade ( $100\% \leq$  and  $\geq 71\%$ ; média de 90.85 %; SD  $\pm 10.81$ ), quais animais desenvolveriam a LPA/SDRA e quais animais seriam HP, a partir do grupo de sobrevivência. Vimos que os parâmetros respiratórios e a parasitemia dos animais do grupo de sobrevivência são similares aos encontrados no grupo de animais sacrificados, mostrando assim a eficiência do modelo na classificação desses animais (Ortolan et al., 2014).



**Gráfico 5** - Os gráficos (A, B e C) representam os parâmetros respiratórios (Penh e FR) e a parasitemia no 7º dia após a infecção dos camundongos do grupo de sobrevivência que vieram a óbito por LPA/SDRA ou HP e (D, E, F) são os mesmos parâmetros medidos nos grupos sacrificados no 7º dia pós-infecção em que foram repassados os valores de corte conforme o modelo preditivo. Dados representativos de 8 experimentos individuais expressos com média  $\pm$  SEM (Kruskal-Wallis test onde \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ). NI = camundongos não infectados. Grupo de sobrevivência (n= 3 NI; 5 LPA/SDRA e 5 HP) grupo sacrificado (n= 3 NI; 5 LPA/SDRA e 5 HP).

#### **6.4 Análise por citometria de fluxo da população leucocitária pulmonar e esplênica dos animais infectados por *P. berghei* ANKA.**

Pulmões e baço de animais sacrificados no 7º dia pós-infecção (dpi) foram coletados, submetidos à extração celular e marcados com anticorpos específicos para a citometria de fluxo. Os resultados obtidos no citometro de fluxo foram analisados pelo software Flowjo VX. A partir dessas análises foram realizados cálculos utilizando o número de células contadas na câmara de Neubauer, que permitiram assim a visualização das populações leucocitárias dos órgãos em frequência e em número total de células.

##### **6.4.1 Animais infectados por *P. berghei* ANKA apresentam maior população leucocitária pulmonar.**

Os resultados encontrados mostraram que tanto em frequência, quanto em número de células, os animais infectados possuíam um aumento significativo em relação aos não infectados para todas as populações leucocitárias estudadas (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  segundo o teste Mann-Whitney) (Gráfico 6A e 6B).

##### **6.4.2 Animais infectados por *P. berghei* ANKA que desenvolvem LPA/SDRA apresentam maior número de neutrófilos e macrófagos alveolares.**

Resultados significativos em frequência e número total de células foram encontrados entre os animais LPA/SDRA e HP para as marcações  $F480^+CD11b^+Ly6C^-$  (macrófagos intersticiais),  $F480^+CD11c^+Ly6C^-$  (macrófagos alveolares) e  $Ly6G^+CD11b^+$  (neutrófilos) (\*  $p < 0,05$ ) (Gráfico 7A e 7B). O aumento no número de neutrófilos já foi visto em várias doenças pulmonares com ou sem origem infecciosa, tais como tuberculose, asbestose, doença granulomatosa e LPA/SDRA associada a outros fatores (Leitch et al. 2008). Através da fenotipagem dos leucócitos pulmonares foi possível visualizar que a população de neutrófilos ( $Ly6G^+CD11b^+$ ) está aumentada nos animais que desenvolvem a LPA/SDRA associada a malária em relação aos animais HP no 7º dia pós-infecção, o que nos permite inferir que essas células estão sendo recrutadas e ativadas participando da patogênese desta enfermidade.

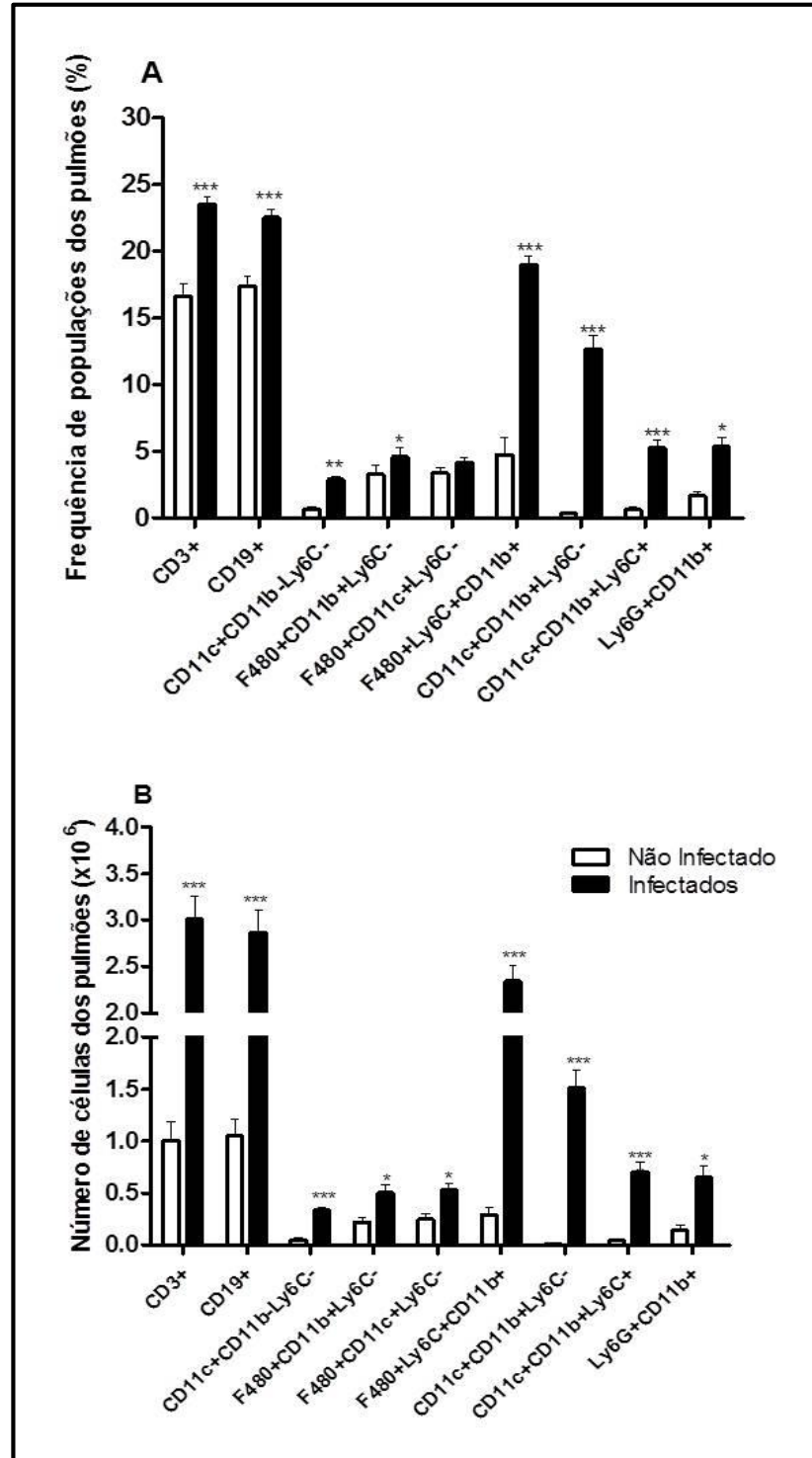
Marcações específicas para populações de macrófagos dos pulmões foram realizadas, sendo possível separar dois tipos de macrófagos apenas por marcação extracelular. As células  $F480^+CD11c^+$  são macrófagos alveolares que possuem um

caráter mais pró-inflamatório, enquanto F480<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> são de macrófagos intersticiais que possuem um caráter mais anti-inflamatório (Bedoret et al., 2009; Moreira e Hogaboam, 2011; Chamoto et al., 2012). Ambas as marcações mostraram resultados significativos (\* p<0,05), sendo que células F4/80<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> diminuíram na população HP em relação a LPA/SDRA, enquanto que a população F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> aumentou nos animais HP em relação a LPA/SDRA (Gráfico 7A e 7B).

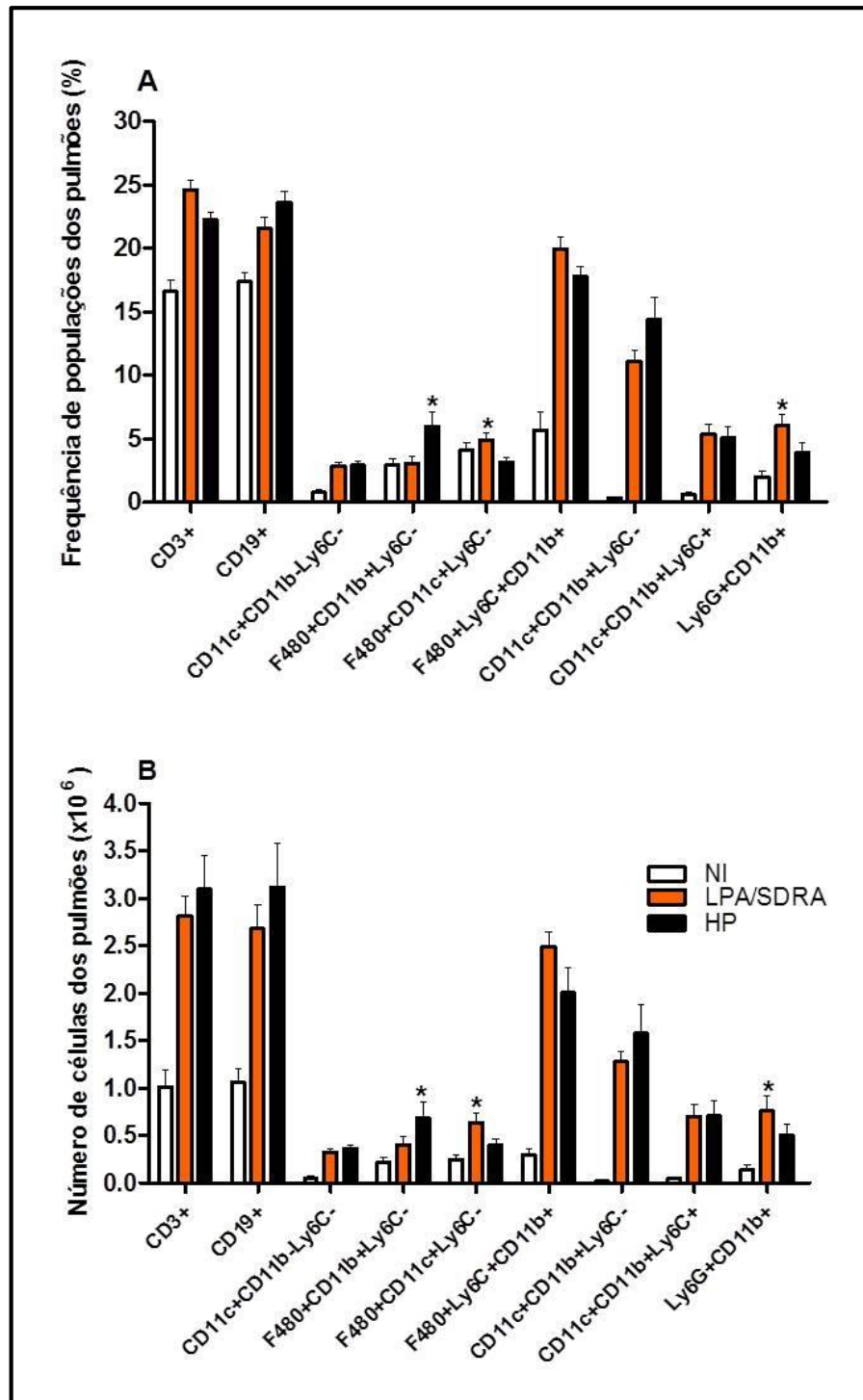
Com a associação das marcações CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> e Ly6C<sup>+</sup> foi possível visualizar outras populações de leucócitos pulmonares, tais como as células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>, que segundo alguns autores são denominadas de monócitos inflamatórios/macrófagos inflamatórios (Sunderkötter et al., 2004; Schneberger et al., 2011; D'Alessio et al., 2012), a população CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> que são descritas como células dendríticas mielóides e a população CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> chamadas de células dendríticas inflamatórias (Li et al., 2008; Schreiber et al., 2011; Shi e Pamer, 2011; Liu et al., 2012). Através dos resultados foi possível observar que as populações acima citadas tiveram aumento significativo em frequência e número de células nos pulmões dos animais infectados (\*\*p<0,001) em relação aos não infectados, mas não houve diferenças significativas entre os animais LPA/SDRA e HP (Gráfico 6 e 7).

Monócitos inflamatórios têm um importante papel na LPA/SDRA induzida por ventilação, porque a alta pressão lesiona o tecido e promove a migração dos monócitos sanguíneos para o interstício pulmonar e a produção de citocinas que auxiliam na resposta inflamatória e na formação do edema (Wilson et al., 2009). Neste modelo os monócitos inflamatórios (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) apresentam uma tendência (p=0,08) a estarem aumentados nos animais LPA/SDRA, o que nos permite inferir que essas células também estejam envolvidas no processo inflamatório e na formação do edema por nós descrito (Ortolan et al., 2014).





**Gráfico 6** - Análise por citometria de fluxo do perfil leucocitário dos pulmões dos animais não infectados e infectados com *P.berghei* ANKA. **(A)** frequência de populações leucocitárias de animais não infectados e infectados extraídas e marcadas com diferentes anticorpos. **(B)** número de células de animais não infectados e infectados. Dados de 3 experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SEM (Mann-Whitney test onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ). Animais não infectados ( $n=5$ ) e animais infectados ( $n=26$ ).



**Gráfico 7** - Análise por citometria de fluxo do perfil leucocitário dos pulmões no 7º dia após infecção dos animais LPA/SDRA e HP. (A) frequência leucocitária de animais não infectados (NI), animais LPA/SDRA e animais HP. (B) número de células dos pulmões de animais não infectados (NI), animais LPA/SDRA e animais HP com marcados com diferentes anticorpos. Dados de três experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SEM (Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's onde  $*p < 0,05$ ). Animais não infectados (n=5), LPA/SDRA (n=14) e HP (n=12).

As populações de células dendríticas vistas neste trabalho não mostraram diferenças significativas entre LPA/SDRA e HP, contudo as células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>) mostraram a tendência de estarem aumentadas nos animais HP em relação aos animais LPA/SDRA (p=0,1). Alguns autores relatam que essas células dendríticas possuem um perfil Th2, induzindo a proliferação de células T reguladoras e a produção de citocinas anti-inflamatórias (de Heer et al. 2005; Li et al. 2008). Assim é possível inferir que mesmo não aumentadas de modo significativo essas células podem estar contribuindo para uma resposta protetora nos animais HP.

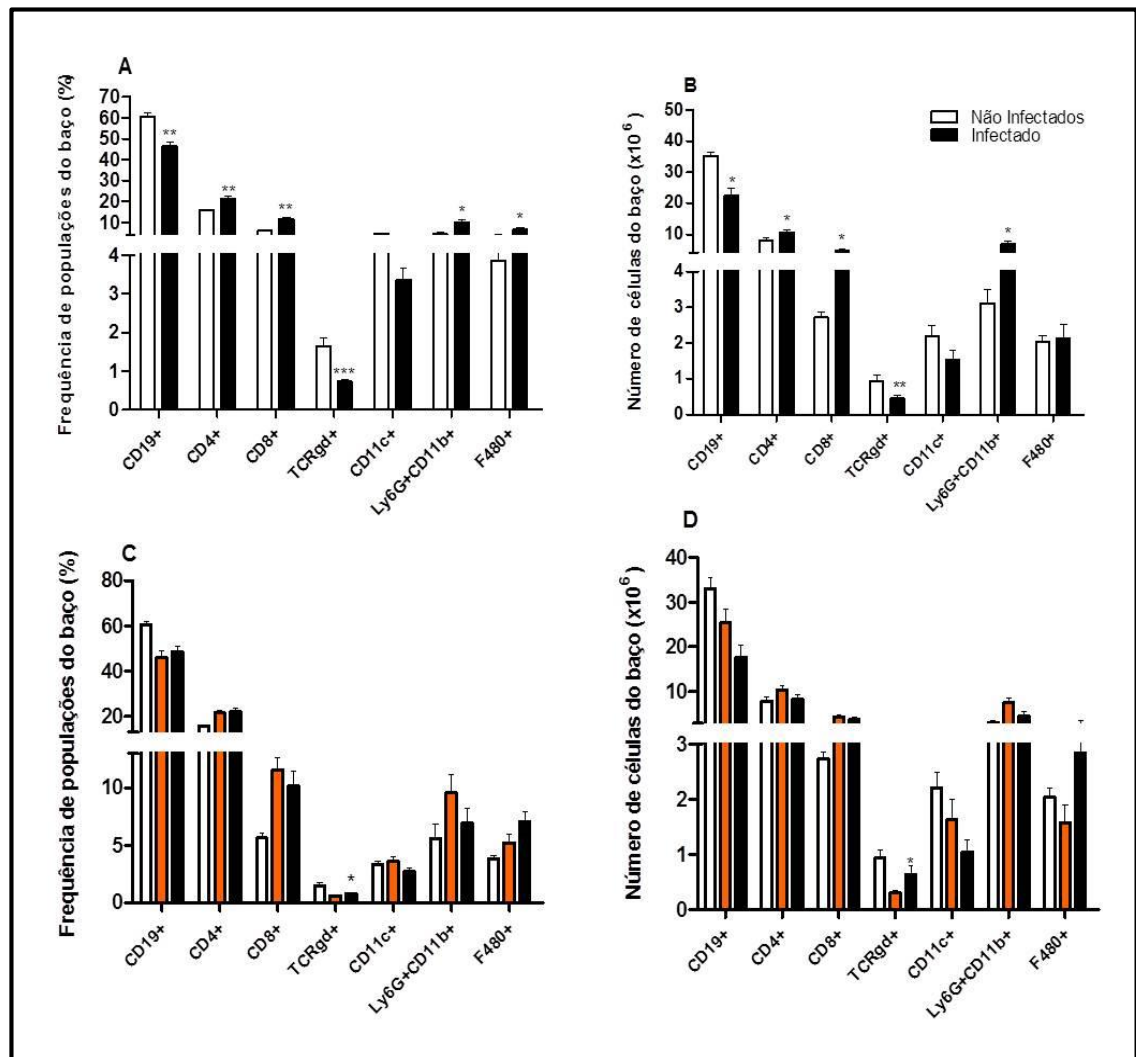
Em relação às populações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>) e B (CD19<sup>+</sup>) não houve diferenças significativas entre os grupos, mas foi possível observar que a maioria das células do sistema imune pulmonar são células B e células T. Tal fato deve-se a presença do tecido linfóide associado ao brônquio (TLAB ou BALT, do inglês *Bronchus-associated lymphoid tissue*) que é parte integrante do sistema imune da mucosa dos pulmões e é caracterizado pela agregação de células linfóides na bifurcação superior aos bronquíolos. Os BALTs são compostos por células B circundadas por células T e quando há inflamação no tecido pulmonar, as células deste tecido são estimuladas e as células B e T proliferam (Halle et al., 2009). Os nossos resultados indicaram um aumento significativo das populações de células B e T nos pulmões dos animais infectados quando comparados com não infectados, mas, no entanto, não houve diferenças significativas nessas células entre os animais LPA/SDRAe HP.

#### **6.4.3 Animais infectados por *P. berghei* ANKA apresentam maior população leucocitária esplênica.**

Em contrapartida, realizamos a marcação de células esplênicas para caracterizar o perfil celular do baço durante o desenvolvimento da síndrome. Analisamos os marcadores para células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, TCRγδ, CD11c<sup>+</sup>, F480<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>. Nessas marcações encontramos diferenças significativas na frequência de populações das células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup> que estavam aumentadas nos animais infectados em relação aos não infectados e diferenças significativas relacionadas ao decréscimo das populações CD19<sup>+</sup>, TCRγδ<sup>+</sup> nos animais infectados em relação aos não infectados (\*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001). Apenas a população CD11c<sup>+</sup> não mostrou diferenças significativas (Gráfico 8A). Em relação ao número de células esplênicas as populações que mostraram diferenças significativas entre não

infectados e infectados foram as populações CD19<sup>+</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (\* p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001) (Gráfico 8B).

Quando os animais foram separados conforme o modelo preditivo, foi observado que para a frequência de populações apenas as células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> tinha um aumento significativo nos animais HP em relação a LPA/SDRA (\*p=0,04), contudo viu-se que para esse dia de infecção a população F4/80<sup>+</sup> apresentava a tendência de estar aumentada nos animais HP em relação a LPA/SDRA (p=0,1) (Gráfico 8C).



**Gráfico 8** - Análise por citometria de fluxo das populações de células do baço. (A) frequência leucocitária e (B) número de células do baço de animais não infectados (NI) e infectados com *P.berghei* ANKA. (C) frequência leucocitária e (D) número total de células do baço de animais NI, LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção. Dados de três experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SEM (Mann-Whitney test entre NI x INF e Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's para NI x LPA/SDRA x HP onde \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001). Animais não infectados (n=5), LPA/SDRA (n=17) e HP (n=12).

Em relação ao número total de células, vimos que os animais HP apresentaram aumento significativo da população  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  em relação aos animais LPA/SDRA (\* $p=0,04$ ), enquanto que para a população de macrófagos  $\text{F4}/80^+$  foi visto apenas a tendência desse aumento ( $p=0,07$ ) nos animais com hiperparasitemia (Gráfico 8D).

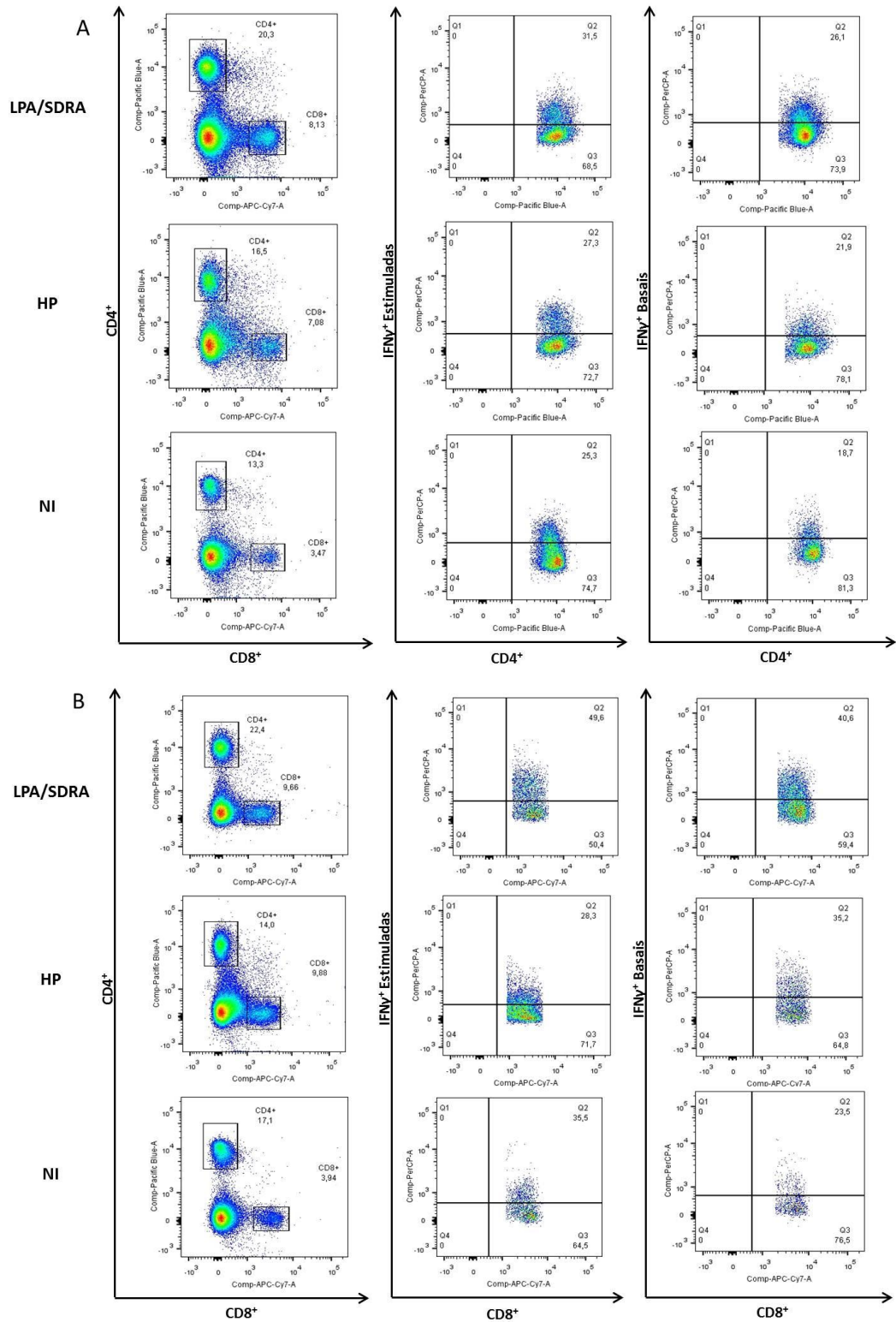
### **6.5 A produção de Interferon- $\gamma$ pelas células T $\text{CD4}^+$ e $\text{CD8}^+$ é maior nos animais LPA/SDRA do que nos animais HP.**

Nosso grupo verificou que entre as expressões relativas de mRNA de várias citocinas inflamatórias estudadas, o IFN- $\gamma$  estava aumentado nos animais infectados por *P. berghei* ANKA que desenvolviam a LPA/SDRA (dados não mostrados). Com essa informação resolvemos examinar se a produção de IFN- $\gamma$  estava sendo realizada pelas células T  $\text{CD4}^+$  e T  $\text{CD8}^+$ , pois durante as infecções por plasmódio observou-se que várias populações celulares, tais como células T  $\text{CD4}^+$ , T  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{TCR}\gamma\delta^+$ ,  $\text{NK}^+$  e  $\text{NKT}^+$ , estavam envolvidas na produção desta citocina (Villegas-Mendez et al., 2012). Estudos com malária cerebral também evidenciaram o importante papel das células  $\text{TCD4}^+$  e  $\text{TCD8}^+$  produtoras de IFN- $\gamma$  na promoção dessa patologia (Mitchell et al., 2005; Villegas-Mendez et al., 2012). A partir desses resultados investigamos através da técnica de citometria de fluxo a produção de IFN- $\gamma$  por essas células nos animais LPA/SDRA e HP.

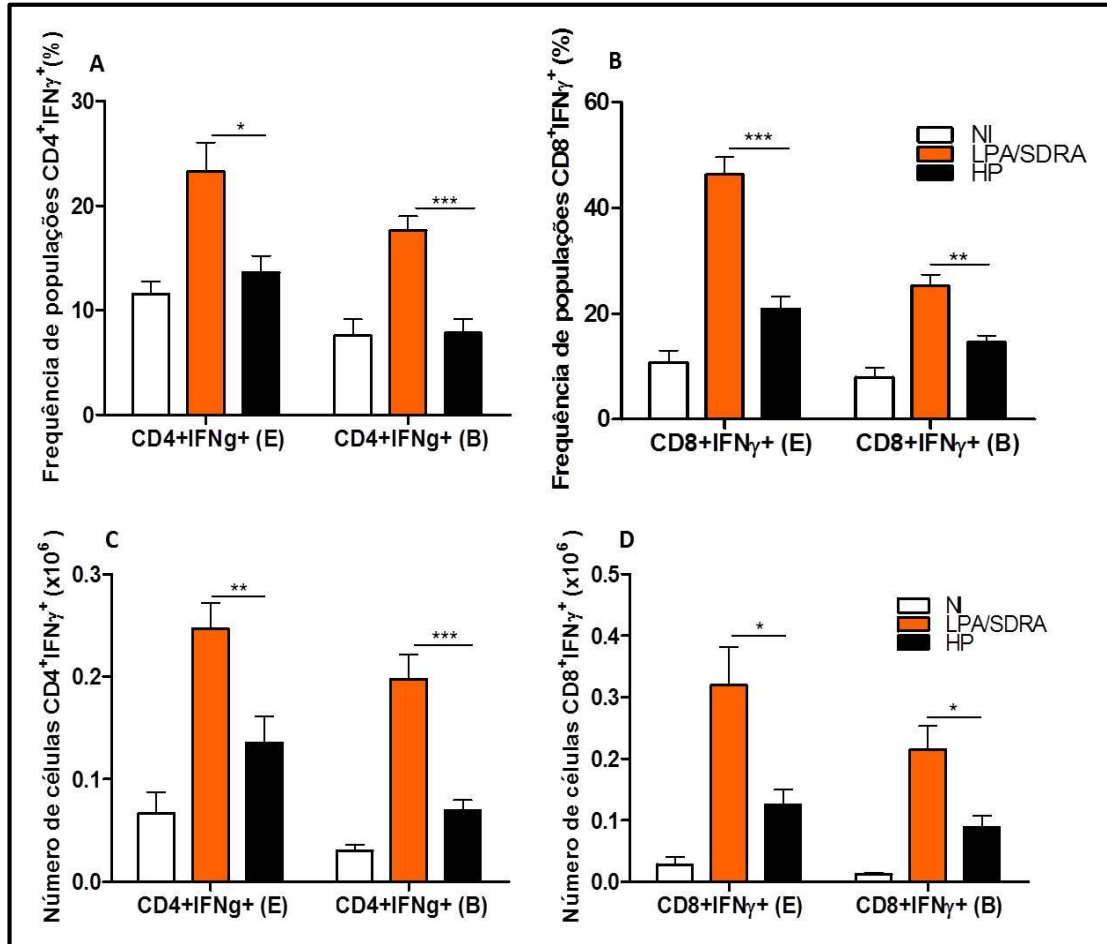
Pulmões de animais infectados e não infectados foram coletados no 7º dia pós-infecção. Para o ensaio intracelular parte das células extraídas foram estimuladas com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 para verificarmos a produção de IFN- $\gamma$  (controle positivo), enquanto que as demais células foram mensuradas de maneira basal (como extraídas dos animais) (Figura 10).

Os resultados mostraram o aumento significativo das células  $\text{CD4}^+\text{IFN}\gamma^+$  estimuladas e basais, nos animais LPA/SDRA em relação a HP, tanto para frequência (\* $p=0,01$  e \*\*\* $p=0,0001$ ), quanto no número total de células (\*\* $p=0,009$  e \*\*\* $p=0,0005$ ) (Gráfico 9A e 9C).

As células  $\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+$  estimuladas e basais também mostraram um aumento significativo em frequência (\* $p=0,04$  e \*\* $p=0,004$ ) e número total de células (\* $p=0,003$  e \*  $p=0,01$ ) nos animais LPA/SDRA em relação a HP (Gráfico 9B e 9D).



**Figura 10** - Pseudocolor Plots mostrando as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> estimuladas e basais produtoras de IFN- $\gamma$  nos animais não infectados (NI), LPA/SDRA e HP. **(A)** Plots mostrando células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> estimuladas e basais e **(B)** plots mostrando células CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> estimuladas e basais.



**Gráfico 9** – Análise intracelular da citocina IFN- $\gamma$  por citometria de fluxo. (A e C) frequência e número total de células CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> e (B e D) CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> nos pulmões de animais não infectados, animais LPA/SDRA e HP sacrificados no 7<sup>o</sup> dia pós-infecção, sendo (E) células estimuladas e (B) células basais. Dados de três experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SE (Kruskal-Wallis test onde \*p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001). Animais não infectados (n=7), LPA/SDRA (n=15) e HP (n=10).

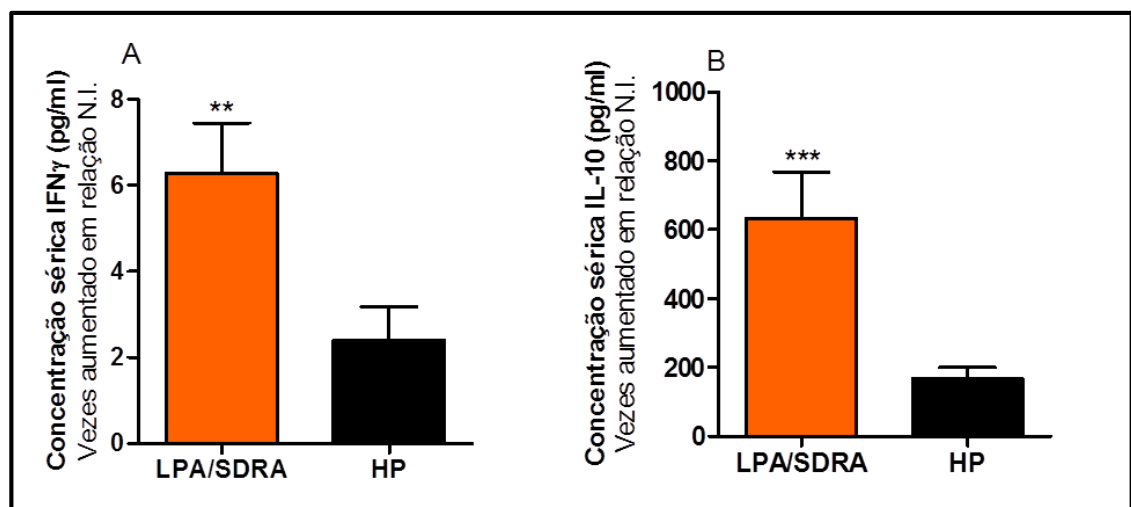
## 6.6 Níveis séricos das citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 estão aumentados no 7<sup>o</sup> dia pós-infecção em animais LPA/SDRA.

Com os resultados prévios observados a partir da expressão de mRNA de várias citocinas, principalmente o aumento significativo de IFN- $\gamma$  e IL-10, por nosso grupo (dados não mostrados) e pelos resultados significativos mostrando que as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> são grandes produtoras de IFN- $\gamma$ , resolvemos comparar os níveis séricos de IL-10 e IFN- $\gamma$  dos animais LPA/SDRA e HP.

Foram realizadas coletas de sangue nos animais sacrificados no 7<sup>o</sup> dia pós-infecção por meio de punção cardíaca e alíquotas de soro foram utilizadas para a quantificação sérica das citocinas acima descritas através da técnica de ELISA.

Os resultados obtidos mostraram que a concentração sérica da citocina IFN- $\gamma$  é seis vezes maior nos animais LPA/SDRA em relação aos animais não infectados. Aumento significativo também foi observado nos animais LPA/SDRA em relação a HP (\*\*p=0,005) (Gráfico 10A).

Para citocina anti-inflamatória IL-10 a concentração sérica nos animais que desenvolvem a síndrome é 632 vezes maior do que nos animais não infectados. Entre os animais infectados houve aumento significativo para LPA/SDRA em relação a HP (\*\*p=0,0008) (Gráfico 10B).



**Gráfico 10** - Quantificação dos níveis séricos das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos animais sacrificados no 7º dia pós-infecção. (A) Concentração sérica de IFN- $\gamma$  e (B) IL-10 comparando o número de vezes aumentado em relação aos camundongos não infectados (NI). Dados de três experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SE (Mann-Whitney test onde \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001). Animais LPA/SDRA (n=15) e HP (n=16).

Como os resultados encontrados mostraram altos níveis séricos das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos animais que desenvolvem a LPA/SDRA no 7º dia pós-infecção, isto nos permitiu inferir que a produção concomitante dessas duas citocinas seria uma tentativa do sistema imunológico em minimizar os danos teciduais nesses animais durante a infecção. Alguns trabalhos relatam o importante papel da IL-10 no contrabalanço da resposta inflamatória, já que em modelos de LPA/SDRA a produção de IL-10 pelas células TCD4<sup>+</sup> bloquearia a indução de citocinas quimioatrativas de neutrófilos e promoveria a sobrevivência dos pacientes, enquanto que a baixa produção de IL-10 levaria ao aumento da patologia e/ou óbito (Venet et al., 2009). Freitas do Rosário e



colaboradores, 2012 observaram em modelo de malária usando *P. chabaudi* que as células TCD4<sup>+</sup> que produziam de forma concomitante IFN- $\gamma$  e IL-10 estavam extremamente ativadas e que essas células produziam mais IFN- $\gamma$  no início da infecção do que IL-10, enquanto que mais tarde apresentavam o fenótipo contrário, mostrando a regulação do sistema imune contribuindo para resolução da enfermidade (Freitas do Rosário et al., 2012).

### **6.7 Análise por citometria de fluxo da ativação de macrófagos e linfócitos dos pulmões no 7º dia pós-infecção dos animais LPA/SDRA e HP.**

Células dos pulmões de animais não infectados e infectados por *P. berghei* ANKA foram coletados no 7º dia pós-infecção. Essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais de fenotipagem como CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup> e anticorpos de ativação de linfócitos T como CD44<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> e CD62L<sup>+</sup> e de macrófagos como CD80 e CD86.

O objetivo deste ensaio foi verificar se os animais infectados que desenvolvem LPA/SDRA apresentam seus linfócitos T e seus macrófagos alveolares e intersticiais mais ativados do que os animais HP.

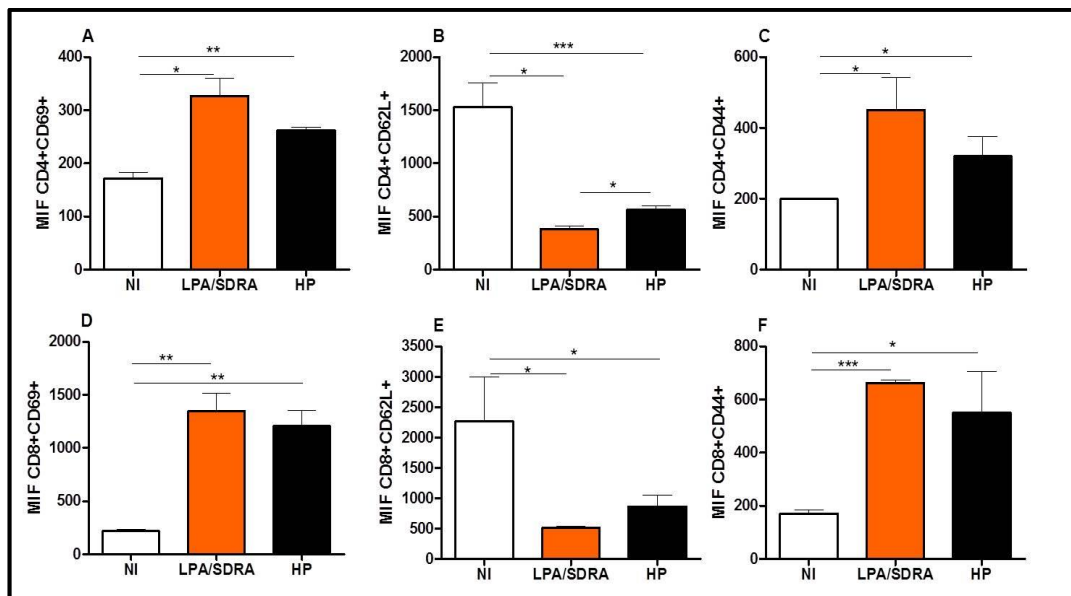
Primeiro observamos a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> com os marcadores CD69, CD62L e CD44. Sabemos que os três marcadores mostram a ativação das células T, quando essas entram em contato com algum antígeno. CD62L (L selectina) atua como um "homing receptor" para que os linfócitos entrem no tecido linfóide secundário pelas células endoteliais das vênulas. Esse receptor é encontrado na superfície de células T, sendo que as células jovens possuem uma alta expressão desse receptor para chegarem aos órgãos linfóides e entrarem em contato com o antígeno, enquanto que as células efetoras possuem baixa ou nenhuma expressão da L selectina (Kawashima e Fukuda, 2012).

A molécula CD69 parece ser induzida por glicoproteínas da superfície celular durante a ativação no órgão linfóide, essa molécula está envolvida na proliferação e transmissão de alguns sinais nos linfócitos (Rutella et al., 1999). Já a molécula CD44 mostra a ativação dos linfócitos T pelo contato com um antígeno o que promove a migração e o extravasamento dos linfócitos T efetores para os locais de inflamação (DeGrendele, 1997).

Os resultados obtidos mostraram que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> estão significativamente ativados nos animais infectados com LPA/SDRA e HP (CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>+</sup>) em relação aos animais não infectados (CD4<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>) no 7<sup>o</sup> dia pós-infecção (\*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001) (Gráficos 11A, 11B e 11C).

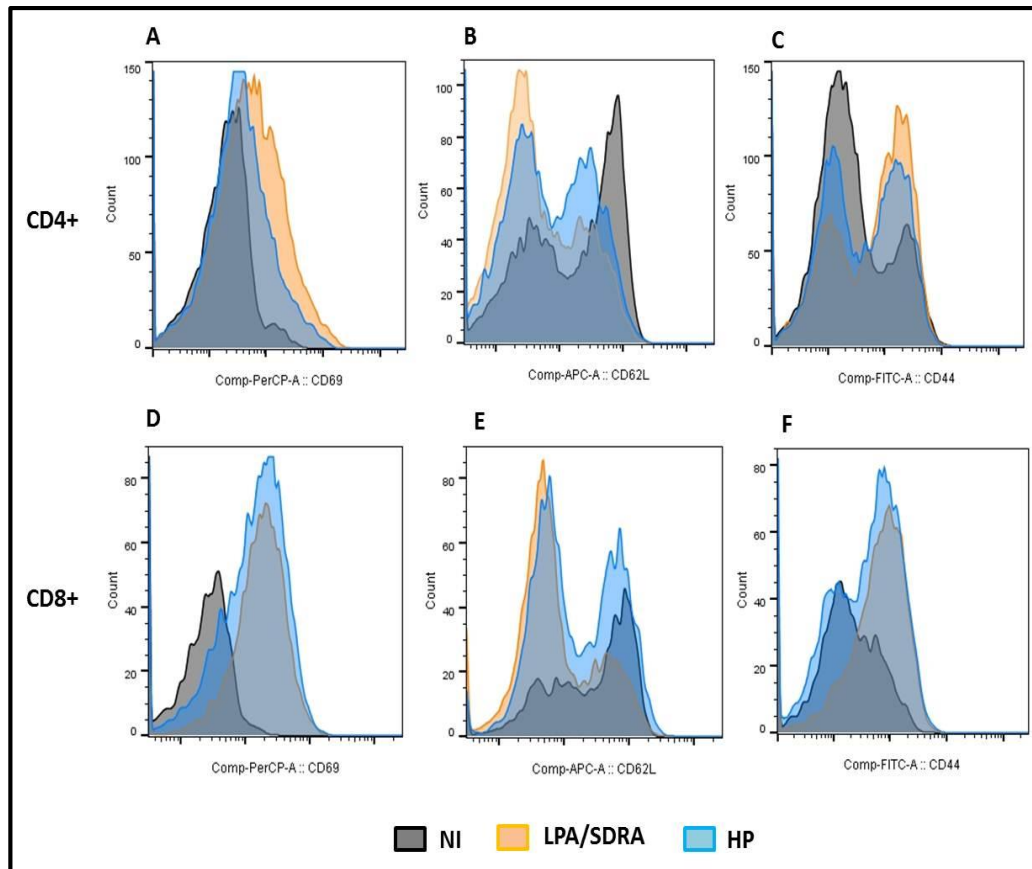
Resultados semelhantes foram obtidos para os linfócitos TCD8<sup>+</sup>, que estão significativamente ativados nos animais LPA/SDRA e HP (CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>+</sup>) em relação aos animais não infectados (CD8<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>) no 7<sup>o</sup> dia pós-infecção (\*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001) (Gráficos 11D, 11E e 11F).

Diminuição significativa da mediana de fluorescências (MIF) da L selectina foi encontrada nos animais LPA/SDRA em relação a HP para os linfócitos CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (290±480 vs 515±640; \*p=0,013), para os linfócitos CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> foi encontrada apenas a tendência da diminuição da MIF (469±568 vs 512±1200; p=0,07) entre LPA/SDRA e HP (Gráfico 11B e 11E).



**Gráfico 11** - Medianas de fluorescência (MIF) dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> para as moléculas CD69, CD62L e CD44 nos animais não infectados, LPA/SDRA e HP. (A, B e C) aumento significativo na ativação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> (CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>+</sup>) nos animais infectados em relação aos não infectados (CD69<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>) e diminuição significativa de CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> entre os animais LPA/SDRA e HP. (D, E e F) aumento significativo na ativação dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> (CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>+</sup>) nos animais infectados em relação aos não infectados (CD69<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>). Dados de dois experimentos independentes expressos com média ± SE (Kruskal-Wallis test com pós teste de Dunn's onde \*p<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001). Animais NI (4), LPA/SDRA (n=5) e HP (n=4).

É possível observar nos histogramas uma expressão basal de CD44 nos animais não infectados (Figura 11C e 11F). A nossa hipótese é que esse fato ocorra devido as células pulmonares estarem em constante contato com o ambiente externo através da respiração, o que permite que antígenos inespecíficos mantenham uma constante ativação dessas células.

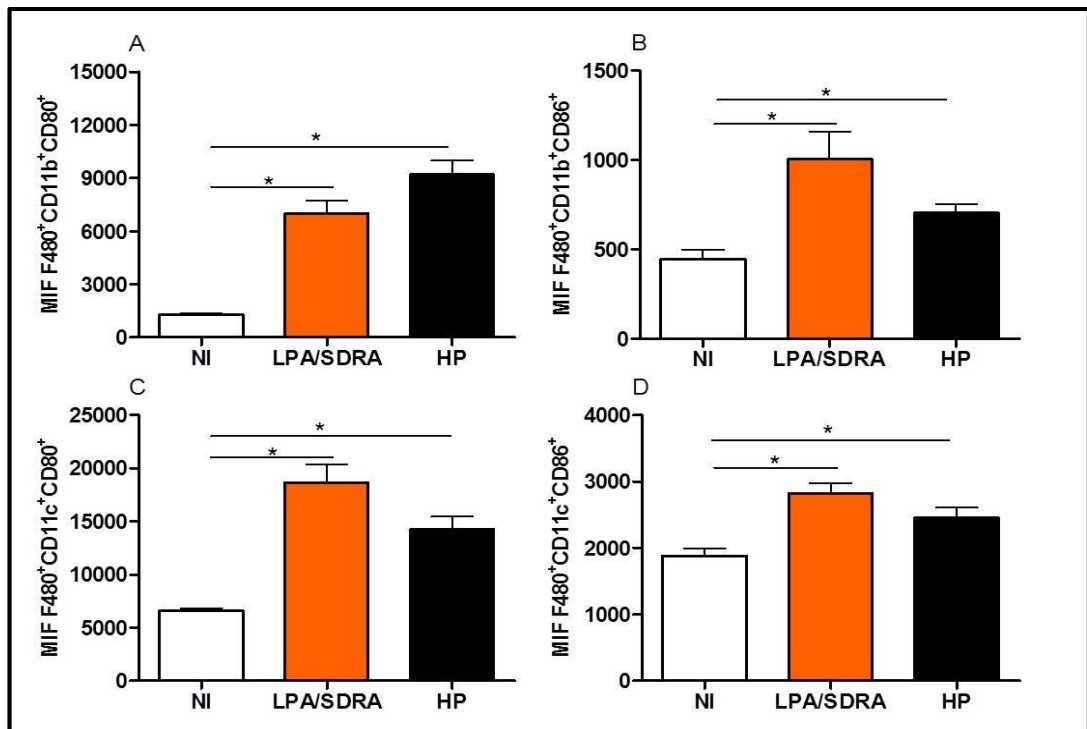


**Figura 11** - Histogramas representativos das marcações de ativação utilizando CD69, CD62L e CD44 para os linfócitos T CD4+ e T CD8+. (A, B, C) histogramas da ativação das células T CD4+ e (D, E e F) histogramas da ativação das células TCD8+. Em cinza são os animais não infectados (NI), em laranja os animais LPA/SDRA e em azul os animais HP. Aumento na ativação é significativo apenas entre infectados e não infectados.

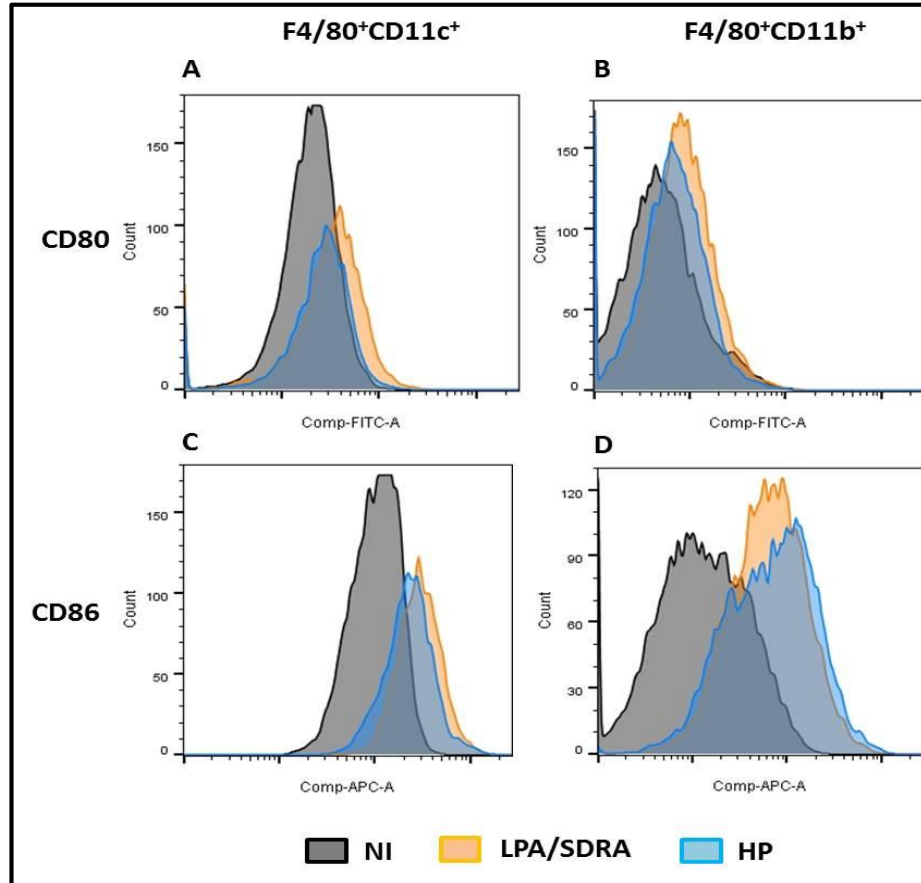
Foram realizados também ensaios de ativação para macrófagos intersticiais e alveolares utilizando-se os marcadores F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup> e CD86<sup>+</sup>. As moléculas coestimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) estão presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC) como as células dendríticas, macrófagos e inclusas células B ativadas. Essas duas moléculas possuem receptores nas células T, tais como CD28 e CTLA-4 que promovem à ativação dos linfócitos T e/ou a regulação

dessa ativação. Macrófagos pulmonres em condições normais apresentam uma baixa expressão das moléculas B7, contudo quando recebem um estímulo antigênico há um aumento importante dessas células em apresentarem antígenos para as células T (Israël-Assayag et al., 1999; van Rijt et al., 2004).

Os resultados encontrados mostram um aumento significativo da expressão de CD80 e CD86 na população de macrófagos intersticiais  $F4/80^+CD11b^+$  nos animais infectados em relação aos não infectados (\* $p < 0,05$ ). Contudo não houve diferenças significativas nas medianas de fluorescência entre os animais LPA/SDRA e HP para as marcações CD80 ( $5000 \pm 9000$  vs  $7000 \pm 10000$ ) e CD86 ( $680 \pm 1500$  vs  $600 \pm 800$ ) respectivamente (Gráfico 12A e 12B).



**Gráfico 12** - Medianas de fluorescência (MIF) dos macrófagos intersticiais ( $F4/80^+CD11b^+$ ) e macrófagos alveolares ( $F4/80^+CD11c^+$ ) para as moléculas CD80 e CD86 nos animais não infectados, LPA/SDRA e HP. (A e B) aumento significativo na ativação dos macrófagos intersticiais ( $F4/80^+CD11b^+CD80^{low}CD86^{high}$ ) nos animais infectados em relação aos não infectados ( $F4/80^+CD11b^+CD80^-CD86^+$ ) e (C e D) aumento significativo na ativação dos macrófagos alveolares ( $F4/80^+CD11c^+CD80^{low}CD86^{high}$ ) nos animais infectados em relação aos não infectados ( $F4/80^+CD11c^+CD80^-CD86^{int}$ ). Dados de dois experimentos independentes expressos com média  $\pm$  SE (Kruskal-Wallis test com pós teste de Dunn's onde \* $p < 0,05$ ). Animais NI (4), LPA/SDRA (n=5) e HP (n=4).



**Figura 12** - Histogramas representativos das marcações de ativação utilizando os marcadores CD80 e CD86 para os macrófagos alveolares e intersticiais. **(A e C)** histogramas da ativação dos macrófagos alveolares ( $F4/80^+CD11c^+$ ) e **(B e D)** histogramas da ativação dos macrófagos intersticiais ( $F4/80^+CD11b^+$ ). Em cinza são os animais não infectados (NI), em laranja os animais LPA/SDRA e em azul os animais HP. Aumento na ativação é apenas significativo entre infectados e não infectados.

Em relação aos macrófagos alveolares  $F480^+CD11c^+$  observamos que as marcações CD80 e CD86 apresentaram diferenças significativas entre os animais infectados e não infectados ( $*p < 0,05$ ), mas não foi encontrada diferenças significativas entre os grupos LPA/SDRA e HP em relação as medianas de fluorescência de CD80 ( $18700 \pm 22400$  vs  $118470 \pm 15500$ ) e de CD86 ( $2500 \pm 3350$  vs  $2170 \pm 2660$ ) (Gráfico 12C e 12D).

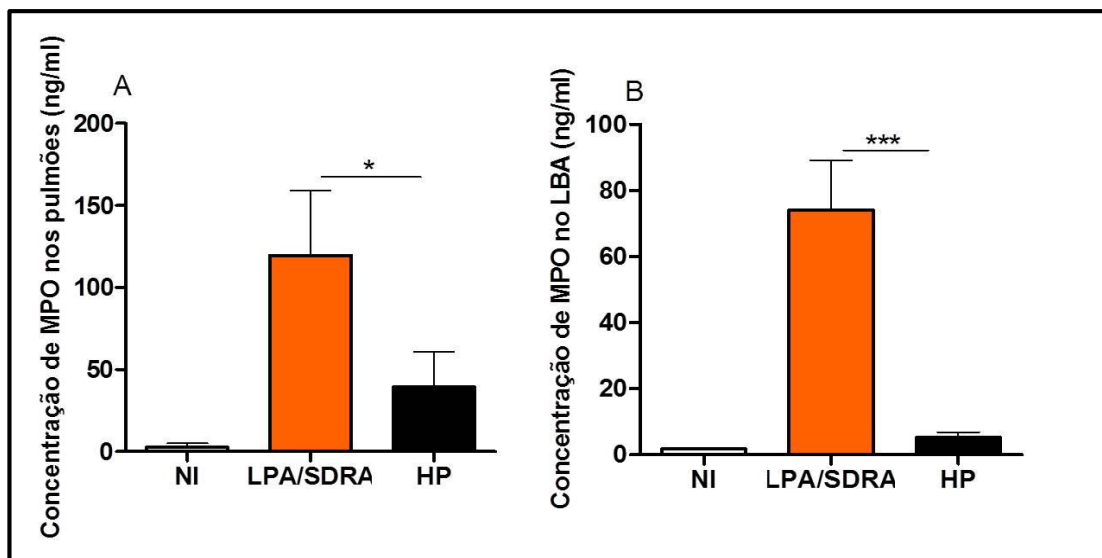
Nota-se que a molécula co-estimulatória CD86 já se encontra com uma MIF alto de forma basal tanto em macrófagos alveolares quanto nos intersticiais, sendo que a infecção por plasmodio promove um aumento ainda maior dessa expressão (Figura 12C e 12D).

### 6.8 A Mieloperoxidase (MPO) produzida pelos neutrófilos do lavado broncoalveolar e dos pulmões é maior nos animais LPA/SDRA.

Uma vez visto a ativação dos linfócitos T e dos macrófagos alveolares e intersticiais, decidimos verificar se os neutrófilos dos pulmões e do lavado broncoalveolar estavam mais ativados nos animais LPA/SDRA em relação a HP.

Neutrófilos ativados têm uma importante contribuição nas injúrias pulmonares, pois promovem a liberação de enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio e mediadores pró-inflamatórios. A mieloperoxidase é uma enzima, especificamente uma peroxidase que tem como papel a defesa contra patógenos pela conversão do peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso. O aumento da atividade dos neutrófilos produz maiores quantidades de mieloperoxidase que contribuem para a patogênese das lesões pulmonares e também provoca a ativação da caspase 3, levando as células a apoptose (Vliet et al., 2000; Saffarzadeh et al., 2012).

Foi observado através da quantificação da mieloperoxidase dos pulmões dos animais não infectados e infectados sacrificados no 7º dia pós-infecção, que houve o aumento significativo da concentração de MPO, além de aumento desta enzima em animais LPA/SDRA em relação a HP (\* $p=0,03$ ). Observamos também o aumento significativo da MPO no LBA de animais não infectados e infectados e de animais LPA/SDRA em relação aos animais HP (\*\*\* $p=0,0001$ ) (Gráfico 13A e 13B)



**Gráfico 13** - Quantificação da mieloperoxidase (MPO) produzida pela ativação dos neutrófilos. (A) Concentração de MPO nos pulmões e (B) no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais infectados com *P.berghei* ANKA no 7º dia pós-infecção. Dados de dois e três

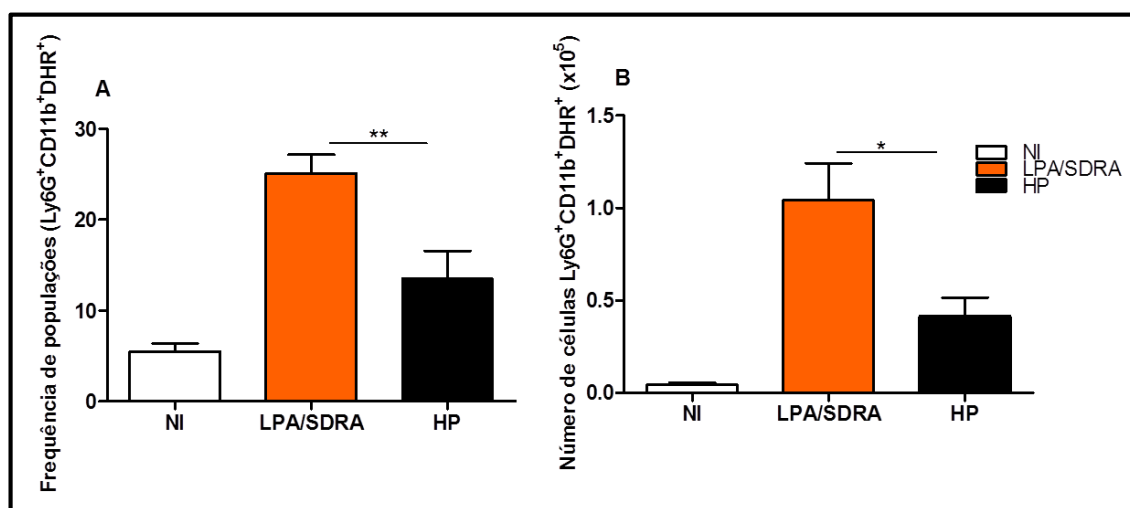
experimentos agrupados respectivamente, expressos com média  $\pm$  SE (Kruskal-Wallis test onde \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ). Animais NI (n=10) LPA/SDRA (n=13) e HP (n=15).

## 6.9 Os neutrófilos pulmonares dos animais LPA/SDRA produzem mais espécies reativas de oxigênio que os animais HP.

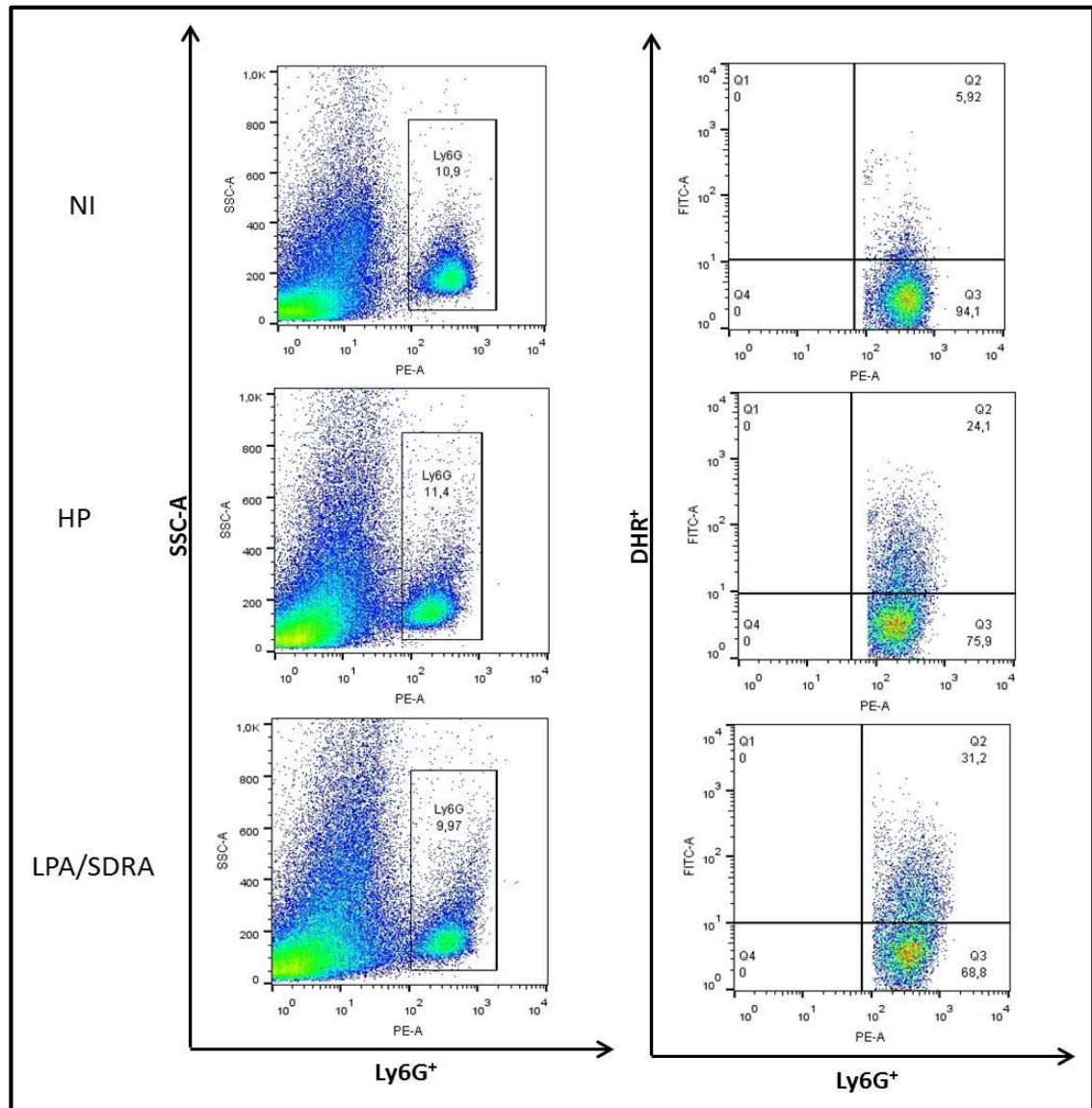
Através dos ensaios com a Dihidrorodamina 123 (DHR) foi possível confirmar os resultados já vistos pela quantificação da MPO e verificarmos pela técnica de citometria de fluxo que os neutrófilos ( $\text{Ly6G}^+\text{CD11b}^+$ ) estavam produzindo peroxidonitrito, espécie reativa de oxigênio (reactive oxygen species [ROS]), que em contato com a dihidrorodamina promove a oxidação dessa e o produto é a rodamina que fluoresce (Richardson, 1998).

Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo na população de células ( $\text{Ly6G}^+\text{CD11b}^+\text{DHR}^+$ ) nos animais LPA/SDRA em relação a HP, tanto em frequência (\*\* $p=0,006$ ), quanto em número de células (\* $p=0,03$ ) (Gráfico 14A e 14B).

A figura 13 mostra os plots das células  $\text{Ly6G}^+$  nos quais podemos verificar que os animais controle (NI), possuem uma baixa frequência de células  $\text{DHR}^+$ , em torno de 5%, já os animais infectados apresentam uma frequência de 10 a 15% maior nos animais HP em relação à NI e de 20 a 25% maior nos animais LPA/SDRA em relação à NI.



**Gráfico 14** – Análise da ativação dos neutrófilos pulmonares pela Dihidrorodamina 123 (DHR 123) no 7º dia pós-infecção. (A) frequência e (B) número total de neutrófilos pulmonares ( $\text{Ly6G}^+\text{CD11b}^+$ ) ativados positivos para DHR. Dados de três experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SE (Kruskal-Wallis test com pós teste de Dunn's onde \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ). Animais NI (n=8) LPA/SDRA (n=20) e HP (n=7).



**Figura 13** - Análise por citometria de fluxo da ativação dos neutrófilos pulmonares ( $\text{Ly6G}^+\text{CD11b}^+$ ) no 7º dia pós-infecção nos animais não infectados (NI), LPA/SDRA e HP. Pseudocolor plots mostrando a frequência de neutrófilos ativados positivos para DHR.

**6.10A redução precoce de neutrófilos em DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA aumenta a sobrevivência dos animais e protege do desenvolvimento da LPA/SDRA associado à malária.**

Através dos resultados obtidos acima e do aumento significativo de neutrófilos no LBA e da expressão do gene *Ncf2* nos pulmões observados pelo nosso grupo, revelou-se de total importância averiguar a contribuição dos neutrófilos para a LPA/SDRA associada à malária.



Para isso, infectamos camundongos DBA/2 com *P. berghei* ANKA que receberam dose única de anticorpos anti-Gr1 (RB6-8C5) ou anticorpos IgG (grupo controle) no primeiro dia após a infecção. Foi coletado sangue desses animais para contagem diferencial de leucócitos e parasitemia, bem como para citometria de fluxo.

Os animais que foram tratados com anticorpos anti-Gr1 obtiveram a depleção dos seus neutrófilos e não foram a óbito entre o 7º ao 12º dias pós-infecção, período no qual alguns animais em média de 40 a 60% dos animais do grupo controle morreram com LPA/SDRA. Os animais que receberam anti-Gr1 morreram após esse período, sem quaisquer sinais da síndrome ou foram sacrificados após o 20º dia pós-infecção (Gráfico 15A).

Não foram encontradas diferenças significativas nas parasitemias dos animais controle (IgG) e dos animais depletados (anti-Gr1), ambas as parasitemias subiram de forma similar (Gráfico 15B).

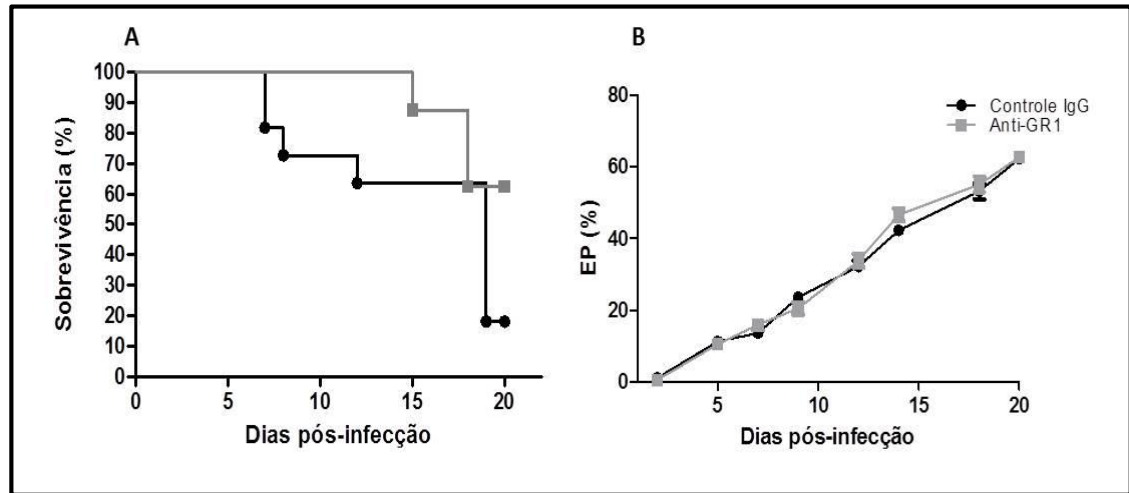
As coletas de sangue iniciaram-se no 2º dia pós-infecção onde foi possível verificar através dos esfregaços sanguíneos que a porcentagem das populações de neutrófilos e monócitos haviam diminuído significativamente ( $***p < 0,001$ ), enquanto que os linfócitos haviam aumentado de forma significativa ( $***p < 0,001$ ) (Gráfico 16D, 16E e 16F).

Na citometria de fluxo dados condizentes foram encontrados, pois as populações de neutrófilos  $Ly6G^+CD11b^+$ , monócitos  $Ly6C^+ Ly6G^+ CD11b^+$  e linfócitos  $CD3^+$  que estavam significativamente diminuídas e aumentada, respectivamente (Gráfico 16A, 16B e 16C). No 5º dia pós-infecção, a porcentagem da população monocítica nos animais depletados já havia se recuperado e mostrava-se significativamente maior ( $* p < 0,05$ ) que nos animais do grupo controle (Gráfico 16E).

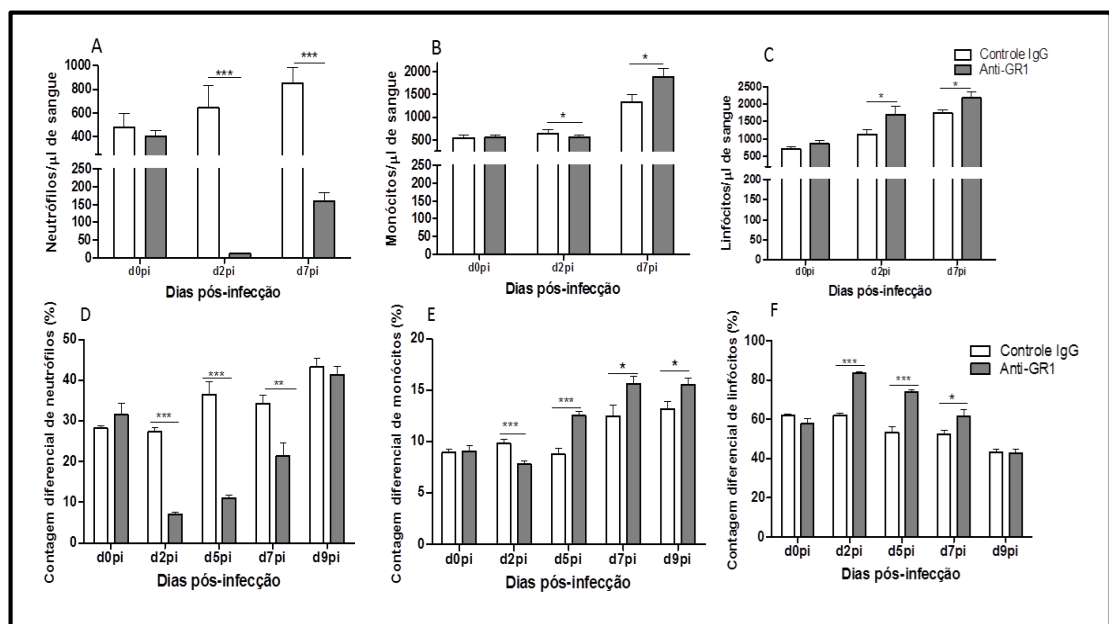
No 7º dia pós-infecção notamos que a porcentagem de neutrófilos nos animais depletados com anti-GR1 ainda era significativamente baixa em relação aos controles ( $** p < 0,001$  e  $*** p < 0,0001$ ), mas em recuperação (Gráfico 16A e 16 D).

Já no 9º dia pós-infecção foi possível notar pela contagem diferencial de leucócitos que os animais dos grupos controle e depletado possuíam um aumento similar na população de neutrófilos. Os monócitos também aumentaram nos dois grupos, mas mantiveram-se significativamente maior nos depletados em relação aos controles ( $* p < 0,05$ ). Já os linfócitos mostraram uma diminuição similar para os dois grupos (Gráfico 16D, 16E e 16F).

Com esses experimentos foi possível inferir que os neutrófilos são importantes na patogênese da LPA/SDRA associada à malária murina.



**Gráfico 15** – (A) Curva de Sobrevivência e (B) parasitemia dos animais infectados com *P.berghei* ANKA tratados com (0,2 mg/kg) de anticorpo anti-Gr1 e (0,2 mg/kg) de anticorpo IgG no primeiro dia pós-infecção. Dados representativos de três experimentos independentes expressos com média  $\pm$  SE (teste Log-rank onde  $p < 0,05$ ) ( $n = 15-20$  animais por experimento).



**Gráficos 16** - (A, B e C) Quantificação por citometria de fluxo do número de neutrófilos, monócitos e linfócitos por microlitros de sangue coletado dos animais controle (IgG) e depletados (anti-Gr1) nos dias 0, 2 e 7 pós-infecção. (D, E e F) contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) por esfregaço sanguíneo dos animais infectados nos dias 0, 2, 5, 7 e 9 pós-infecção. Dados de três experimentos independentes expressos com média  $\pm$  SE (Mann-Whitney test onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ). Controle IgG (10-12 animais) e depletados anti-Gr1 (10-12 animais).

### **6.11 A depleção de macrófagos em DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA aumenta a sobrevivência dos animais e protege do desenvolvimento da LPA/SDRA associado a malária.**

Uma vez visto que os neutrófilos possuem um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da LPA/SDRA, resolvemos verificar se os macrófagos também possuíam um papel importante durante a síndrome.

Para isso, infectamos camundongos DBA/2 com *P. berghei* ANKA que receberam uma única dose intranasal de clodronato em lipossomas (grupo experimental) ou solução salina (grupo controle) no primeiro dia após a infecção. Esfregaços sanguíneos foram coletados dos animais de ambos os grupos para contagem diferencial de leucócitos e para parasitemia.

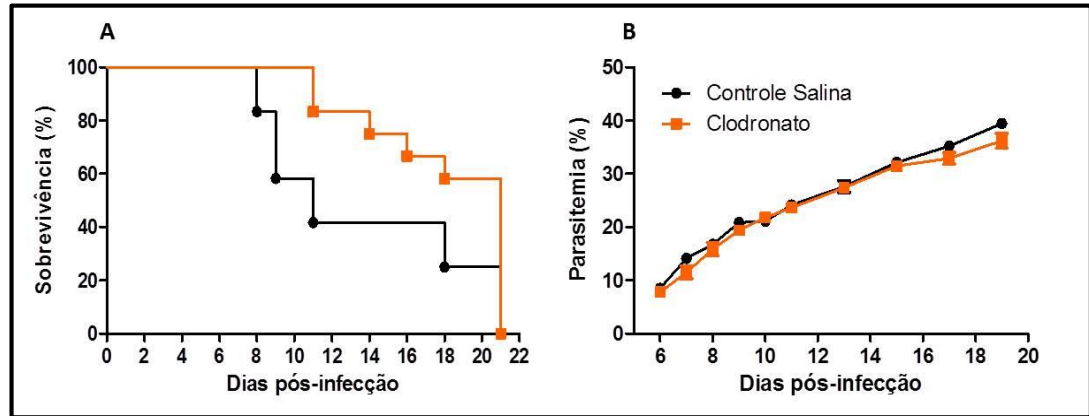
Os animais tratados com clodronato tiveram seus macrófagos depletados e sobreviveram sem quaisquer sintomas de LPA/SDRA, enquanto que os animais tratados com salina tiveram uma taxa de óbito de 60% a 70% entre o 7º e o 12º dias pós-infecção. Os animais que receberam o clodronato morreram após esse período, sem quaisquer sinais da síndrome ou foram sacrificados após o 20º dia pós-infecção (Gráfico 17A).

Não foram encontradas diferenças significativas entre as parasitemias dos animais que receberam salina e dos animais tratados clodronato, ambas as parasitemias subiram de forma similar (Gráfico 17B).

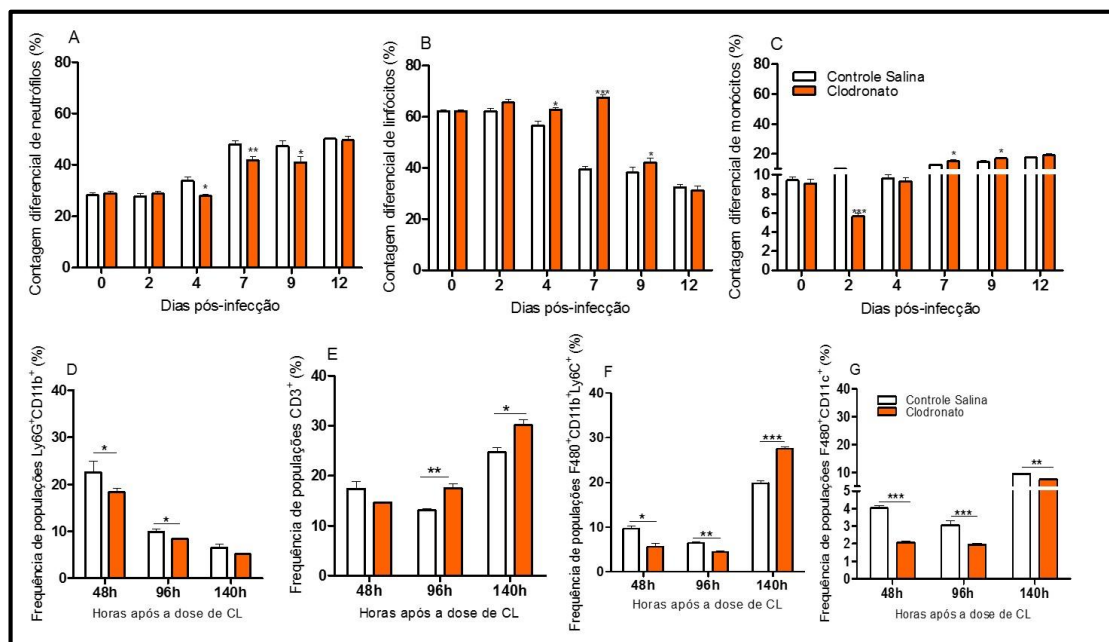
Os esfregaços sanguíneos foram utilizados para contagem diferencial de leucócitos, nos quais foram possíveis observar que a população de neutrófilos está diminuída de forma significativa nos dias 4, 7 e 9 pós-infecção (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ). Os linfócitos apresentaram um aumento significativo nos animais depletados nos dias 4, 7 e 9 pós-infecção (\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ ), enquanto que os monócitos apresentaram uma diminuição significativa nos animais depletados no dia 2 pós-infecção (\*\*\* $p < 0,001$ ) e um aumento significativo nos dias 7 e 9 pós-infecção (\* $p < 0,05$ ) (Gráfico 18A, 18B e 18C).

Ensaio com citometria de fluxo mostraram que 48 horas após a dose de clodronato há a diminuição significativa de neutrófilos e monócitos no tecido pulmonar (\* $p < 0,05$ ). Com 96 horas é possível observar que os neutrófilos e os monócitos ainda permanecem diminuídos nos animais que receberam o clodronato (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ), enquanto que os linfócitos estão aumentados de forma significativa

(\*\* $p < 0,01$ ). Com 140 horas após a dose de clodronato vimos que não há diferenças significativas na população de neutrófilos e há um aumento significativo nas populações de monócitos e linfócitos (\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) (Gráfico 18D, 18E e 18F).



**Gráfico 17** – (A) Curva de Sobrevivência e (B) Parasitemia dos animais infectados com *P.berghei* ANKA tratados com (0,9%) de solução salina e (12 $\mu$ g em 100 $\mu$ l) de lipossomas contendo clodronato no primeiro dia pós-infecção. Dados representativos de dois experimentos independentes expressos com média  $\pm$  SE (teste Log-rank onde  $p < 0,05$ ) (n = 15-20 animais por experimento).



**Gráfico 18** – (A, B e C) Contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) por esfregaço sanguíneo nos dias 0,2,4,7,9 e 12 pós-infecção dos animais tratados com clodronato e com solução salina. (D, E, F e G) Quantificação por citometria de fluxo do número de neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos alveolares em três diferentes tempos (48h, 96h e 140h) após a dose de clodronato. Dados de dois experimentos independentes expressos com média  $\pm$  SE (Mann-Whitney test onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ). Controle Salina (10-12 animais) e CL= Clodronato (10-12 animais).

Vimos também através da citometria de fluxo que 60 a 70% dos macrófagos alveolares são depletados com uma única dose de clodronato e, que a retirada desses macrófagos se mantém significativa até 140 horas após a dose (Gráfico 18G).

Através desses experimentos verificamos que os macrófagos alveolares são de fundamental importância para o desenvolvimento e manutenção da LPA/SDRA associada a malária, pois a sua retirada promove a sobrevida dos animais e o não estabelecimento da síndrome.

### **6.12 A morte celular programada (apoptose) nos pulmões de animais LPA/SDRA está mais presente que em animais HP.**

Animais infectados com *P. berghei* ANKA foram sacrificados no 7º e 8º dias pós-infecção e seus pulmões coletados e criopreservados para a realização da técnica de TUNEL por fluorescência.

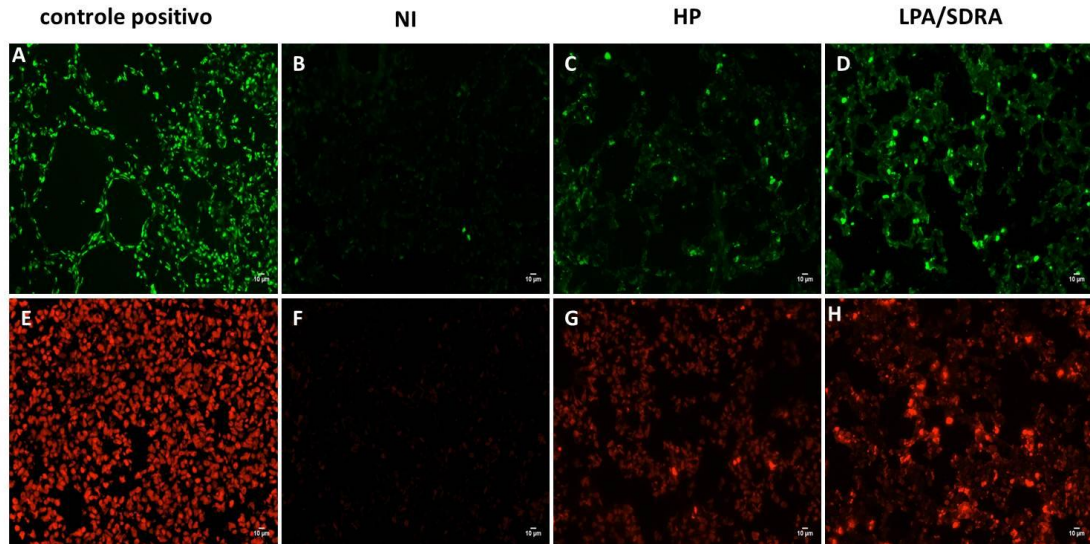
A análise dos resultados foi realizada contabilizando-se a quantidade global de pontos fluorescentes por unidade de área de tecido pulmonar ( $\mu\text{m}^2$ ), e pelo seu percentual em relação ao total.

Para o controle da reação de TUNEL um corte de tecido foi estimulado a apoptose com DNase I (controle positivo) e para o controle negativo um corte recebeu apenas a solução dUTP conjugada a fluoresceína e que não tinha TdT. No controle positivo as células em sua maioria são fluorescentes ao microscópio e no controle negativo o tecido não apresenta fluorescência, ficando escuro (Figura 14A e 14E).

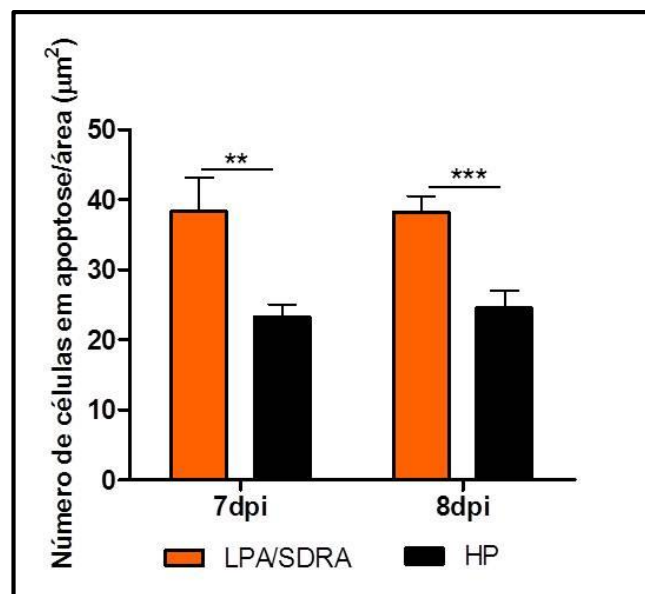
Os cortes dos pulmões de animais não infectados, LPA/SDRA e HP foram submetidos a reação de TUNEL, e ao se levar a microscópio de fluorescência, foi possível notar que os animais não infectados não possuíam fluorescência formando apenas uma imagem escura com nuances do tecido (Figura 14B e 14F). Tanto no 7º (fluorescência em verde) quanto no 8º dias pós-infecção (fluorescência vermelha), foi possível notar que os animais HP possuíam alguns poucos pontos de fluorescência no tecido, mostrando que a apoptose está ocorrendo, porém em poucas células do tecido (Figura 14C e 14G). Já os animais LPA/SDRA possuíam vários pontos de fluorescência espalhados pelo tecido, o que nos mostra claramente que a apoptose está ocorrendo de maneira mais intensa nesse grupo (Figura 14D e 14H).

A quantificação dos pontos fluorescentes foi realizado por números destes pontos por micrômetro quadrado de tecido, o que nos permitiu concluir que os animais

LPA/SDRA no 7° e 8° dias pós-infecção possuem mais células em apoptose do que os animais HP (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ), e que não há aumento significativo da morte celular entre 7° e 8° dias pós-infecção nos animais LPA/SDRA (Gráfico 19).



**Figura 14** - Método de TUNEL em tecido pulmonar de camundongos não infectados e infectados com *P. berghei* ANKA no 7° (fluorescência verde) e 8° (fluorescência vermelha) dias pós-infecção (aumento de 20x). (A e E) Controle positivo, (B e F) camundongos não infectados (NI), (C e G) camundongos HP e (D e H) camundongos LPA/SDRA.



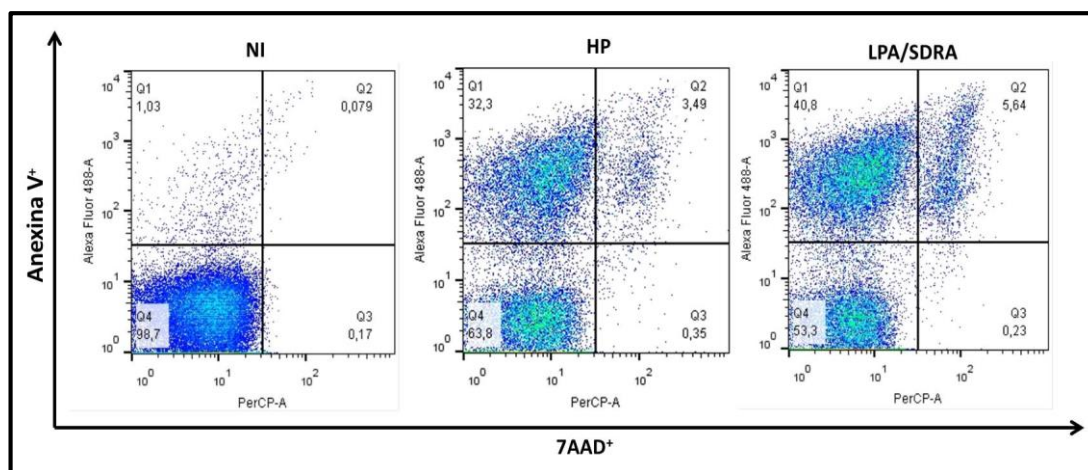
**Gráfico 19** - Quantificação de células em apoptose por  $\mu\text{m}^2$  do tecido pulmonar de camundongos infectados com *P. berghei* ANKA sacrificados no 7° e 8° dias pós-infecção analisados pelo método de fluorescência de TUNEL. A quantificação foi realizada em fotos retiradas no aumento de 20X, sendo fotografados 10 diferentes campos por tecido. Dados de dois experimentos agrupados para cada dia de infecção expressos com média  $\pm$  SE (Mann-

Whitney test onde \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ). Para o 7º dia (LPA/SDRA = 7 animais e HP = 9 animais) e para o 8º dia (LPA/SDRA = 6 animais e HP = 8 animais).

### 6.13 Há mais células em apoptose, mas não necróticas no LBA dos animais LPA/SDRA em relação aos animais HP.

Animais não infectados e infectados com *P. berghei* ANKA foram sacrificados no 7º dia pós-infecção e os seus lavados broncoalveolares foram coletados e incubados com os marcadores Anexina-V e 7-AAD.

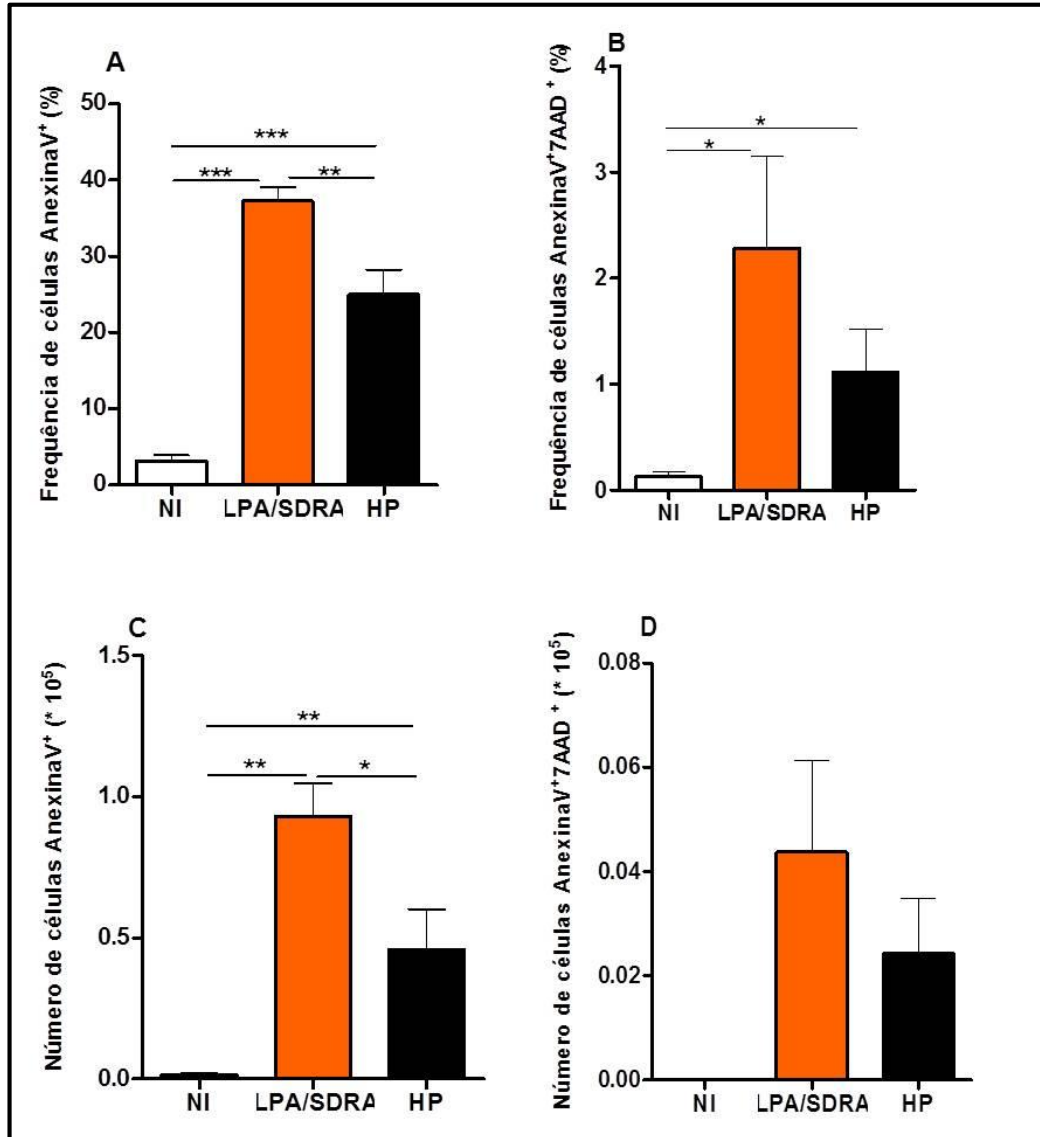
Os ensaios realizados com o LBA mostraram que os animais sacrificados no 7º dia pós-infecção tem uma porcentagem alta de células em apoptose, enquanto que os animais não infectados quase não as possuem, contudo a marcação 7AAD mostra que apenas uma pequena quantidade de células nos animais infectados está passando pelo processo de necrose (Figura 15).



**Figura 15** - Pseudocolor Plots mostrando a marcação das células do lavado broncoalveolar (LBA) com Anexina-V e 7AAD nos animais NI, LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção. Nota-se que nos animais NI as células positivas para Anexina-V ou Anexina-V e 7AAD são praticamente inexistentes.

Os resultados obtidos nesse ensaio mostraram que os animais que desenvolvem a LPA/SDRA têm um aumento significativo da apoptose (AnexinaV<sup>+</sup>) em relação aos animais HP em frequência (\*\* $p < 0,01$ ) e em número total de células (\* $p < 0,05$ ) (Gráfico 20A e 20C).

Em relação à quantidade de células em necrose (AnexinaV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) houve diferenças significativas somente entre os animais não infectados e infectados LPA/SDRA ou HP (Gráfico 20B e 20D)



**Gráfico 20** - (A e C) Frequência e número total de células do LBA que estão em apoptose (AnexinaV<sup>+</sup>) e (B e D) frequência e número total de células do LBA que estão em necrose (AnexinaV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>). Dados de dois experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SE (Kruskal-Wallis test com pós teste de Dunn's onde \*\* p<0,01 e \*\*\*p<0,001). Animais NI (n=7), LPA/SDRA (n= 9) e HP (n= 8).

#### 6.14 Fenotipagem das células vivas (AnexinaV<sup>-</sup>) e em apoptose (AnexinaV<sup>+</sup>) do LBA dos camundongos infectados com *P. berghei* ANKA sacrificados no 7<sup>o</sup> dia pós-infecção.

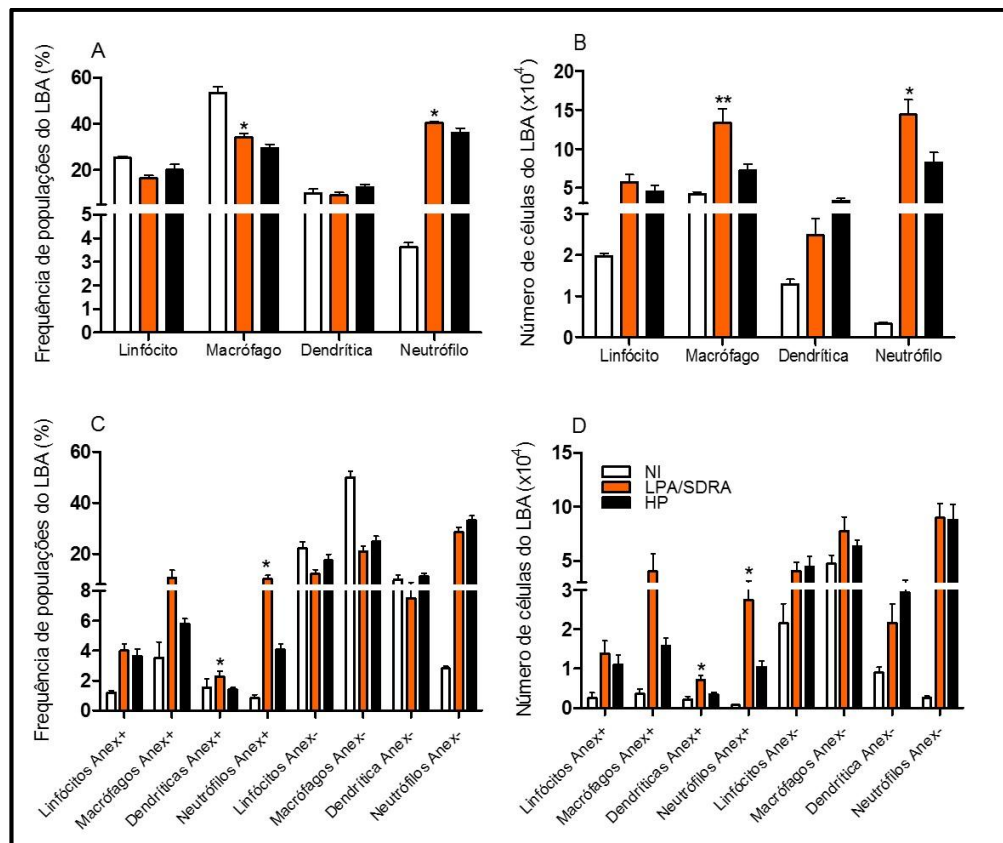
O ensaio anterior revelou que os animais LPA/SDRA e HP possuíam muitas células em apoptose positivas para Anexina-V, sendo que os animais que desenvolviam a síndrome possuíam uma quantidade significativa dessas células morrendo. Assim, a



partir desse resultado o objetivo foi verificar quais eram as células presentes no LBA e quais células estavam em apoptose.

Para isso, marcamos as células do LBA com o marcador Anexina-V e com os anticorpos monoclonais CD3, F4/80, Ly6G, CD11c e CD11b.

No primeiro momento visualizamos linfócitos (CD3), macrófagos (F480+CD11c+), células dendríticas (CD11c+) e neutrófilos (Ly6G+CD11b+) nos animais não infectados, LPA/SDRA e HP. Vimos que tanto para frequência, quanto para o número de células os MA e os neutrófilos apresentavam um aumento significativo (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ) nos animais LPA/SDRA em relação aos HP, mostrando que esses dados corroboram com os resultados encontrados por nós com células do tecido pulmonar. Em relação aos linfócitos e as células dendríticas não foram encontradas diferenças significativas para essas duas populações entre os animais LPA/SDRA e HP (Gráfico 21A e 21B).



**Gráfico 21** – Fenotipagem das células do LBA dos camundongos NI, LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção (A) Frequência de populações e (B) Número total de células. (C e D) Fenotipagem das células vivas (AnexinaV<sup>-</sup>) e em apoptose (AnexinaV<sup>+</sup>) do LBA marcadas com os anticorpos CD3<sup>+</sup> (linfócitos); CD11c<sup>+</sup> (dendríticas); F480<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (macrófagos) e

Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (neutrófilos). Dados de dois experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SE (Kruskal-Wallis test onde \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$ ). Animais NI (n=4), LPA/SDRA (n=10) e HP (n=9).

Depois de verificarmos quais eram as populações celulares encontradas no LBA dos nossos grupos, nós analisamos através do marcador anexina-V, quais eram as populações que estavam sofrendo apoptose.

Encontramos em nossas análises que os neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e as células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) têm um aumento significativo da frequência e número de células em apoptose nos animais LPA/SDRA em relação a HP (\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p = 0,001$ ) (Gráfico 21C e 21D).

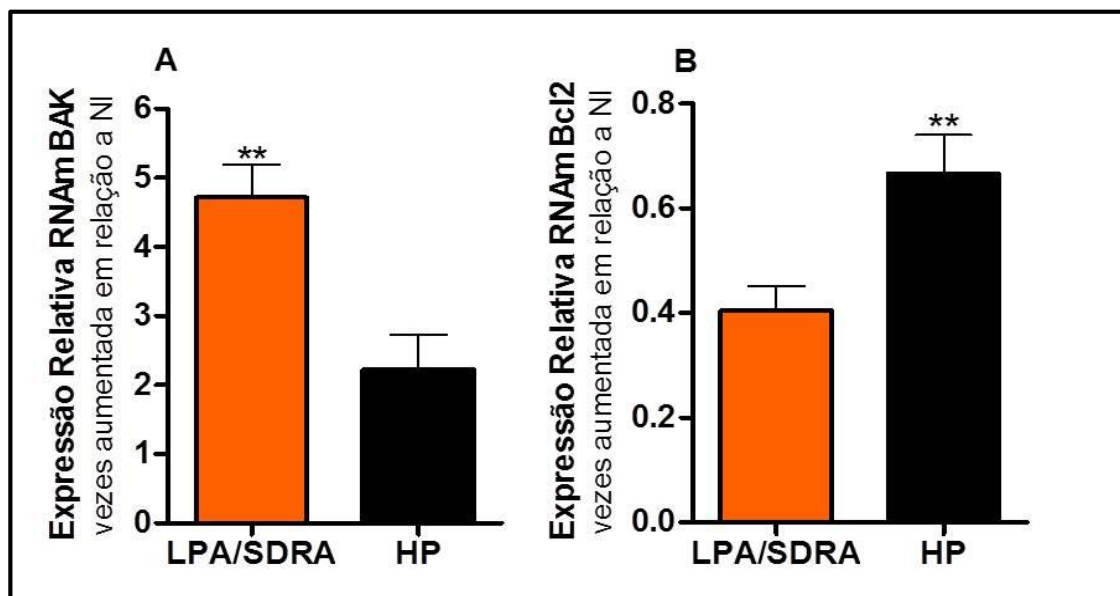
Já em relação as células vivas (Anex-V<sup>-</sup>) vimos que não há diferenças significativas entre os grupos LPA/SDRA para nenhuma população. No entanto, há a tendência na frequência e no número de células da população de células dendríticas estarem aumentadas nos animais HP em relação a LPA/SDRA ( $p = 0,06$  e  $p = 0,01$  respectivamente) (Gráfico 21C e 21D).

Em relação aos linfócitos e aos macrófagos não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

### **6.15 Expressão de genes pró e anti-apoptóticos estão envolvidos no desenvolvimento da LPA/SDRA associado a malária.**

O estudo com a expressão gênica de moléculas pró ou anti-apoptóticas teve início com a escolha de alguns genes mais descritos pela literatura, que tratam da síndrome respiratória aguda provocada por diversos fatores e morte celular programada.

Foram escolhidos seis genes (Bax, Bak, FAS, FASL e P53 pró-apoptóticos e Bcl2 anti-apoptótico) que foram mensurados nos pulmões dos camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA. Os genes FAS, FASL, P53 e Bax não mostraram diferenças significativas entre os animais com LPA/SDRA e HP para o 7º dia pós-infecção. Mas, o gene Bak (*Bcl2-antagonist/killer*) apresentou aumento significativo nos animais LPA/SDRA em relação a HP (\*\* $p = 0,006$ ), enquanto Bcl2 (*B cell lymphoma 2*) teve sua expressão diminuída nos animais LPA/SDRA em relação a HP (\*\* $p = 0,003$ ) (Gráfico 22A e 22B).



**Gráfico 22** - (A) Expressão relativa de RNAm do gene Bak e (B) Expressão relativa de RNAm do gene Bcl2 nos animais LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção. Dados analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e expressos em número de vezes aumentada em relação a camundongos não infectados de 2 experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SE (Mann-Whitney test onde  $**p < 0,01$ ). Animais LPA/SDRA (n=11) e HP (n=10).

Com os resultados prévios adquiridos foi possível verificar que nem todos os genes descritos na literatura estavam de fato aumentados ou diminuídos nos animais LPA/SDRA associados à malária no 7º dia pós-infecção. Isso não significa que em dias anteriores e/ou posteriores ao dia 7 após a infecção não haja expressão significantes desses genes. Contudo, o nosso objetivo foi verificar quais eram os genes ligados à morte celular programada tanto de via intrínseca, quanto de via extrínseca que poderiam estar mais ou menos expressos no 7º dia pós-infecção, em que os animais começam a apresentar sintomas relacionados à LPA/SDRA.

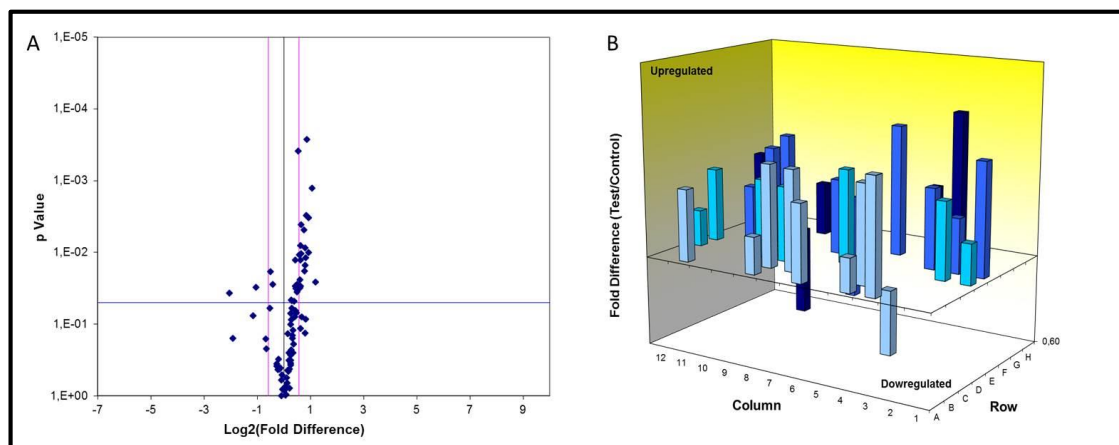
Para isso utilizamos um PCR-Array com 82 genes ligados a apoptose e, averiguamos a expressão gênica nos pulmões dos animais não infectados e infectados sacrificados no 7º dia pós-infecção. Destes genes, 32 mostraram valores estatísticos significativos ( $*p \leq 0,05$ ), sendo que 29 desses genes estão regulados positivamente e apenas 3 genes estão regulados negativamente (Figura 16A e 16B e Tabela 3). Para a execução e prévias análises dos resultados solicitamos a ajuda da Dra. Ligia Antunes Gonçalves do Instituto Gulbenkian de Ciências de Portugal.

**Tabela 3** - Resultados do PCR-Array. Genes regulados positivamente (+) e negativamente (-) presentes ou não nos diagramas de vias (*pathway*).

Genes da via de apoptose			Vias	
Genes	Valor de p	Regulado + ou -	KEGG	Biocarta
<b>Akt</b>	0,010	+	sim	sim
<b>Anxa5</b>	0,045	+	*	*
<b>API5</b>	0,007	+	*	*
<b>Bad</b>	0,047	+	sim	sim
<b>Bak</b>	0,010	+	sim	sim
<b>Bcl2a1a</b>	0,018	-	*	*
<b>Bcl-XL</b>	0,014	+	sim	sim
<b>Bcl2l2</b>	0,011	+	*	*
<b>Bid</b>	0,003	+	sim	sim
<b>Casp2</b>	0,023	+	*	*
<b>Casp3</b>	0,010	+	sim	sim
<b>Casp9</b>	0,012	+	sim	sim
<b>Flip</b>	0,004	+	sim	sim
<b>ICAD</b>	0,031	+	sim	sim
<b>CAD</b>	0,003	+	sim	sim
<b>Diablo</b>	0,031	+	não	sim
<b>FADD</b>	0,004	+	sim	sim
<b>Gadd45a</b>	0,035	+	*	*
<b>Igf1r</b>	0,029	+	*	*
<b>Ltbr</b>	0,008	+	*	*
<b>Mapk1</b>	0,012	+	*	*
<b>Nod1</b>	0,001	+	*	*
<b>Polb</b>	0,027	-	*	*
<b>Ripk-1</b>	0,0002	+	sim	não
<b>TNFR1</b>	0,018	+	sim	não
<b>TRAIL</b>	0,025	+	sim	não
<b>APO3</b>	0,0003	+	não	sim
<b>TRAF3</b>	0,047	+	*	*
<b>Trp63</b>	0,030	-	*	*
<b>XIAP/IAP</b>	0,029	+	sim	sim

\* não aparece nos diagramas

Genes regulados positivamente (+) e negativamente (-) pelo ensaio de PCR-Array e que estão ou não presentes nos diagramas de vias (*pathway*) concebidos pelo software DAVID pelos métodos estatísticos KEGG e Biocarta.



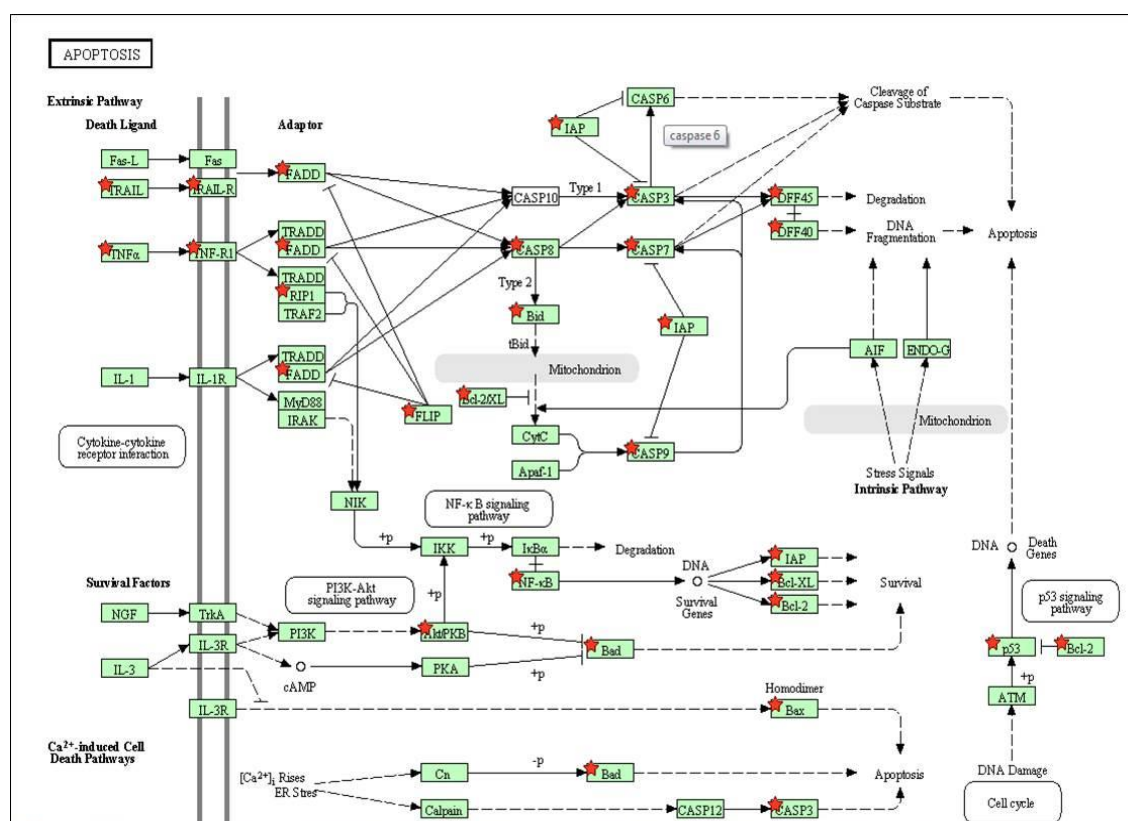
**Figura 16 - (A)** Gráfico mostrando no eixo Y o valor estatístico p ( $p Value < 0,05$ ) e no eixo X o valor Logarítmico ( $Log_2 Fold Difference$ ) dos 82 genes regulados positiva ou negativamente para a morte celular programada. **(B)** Representação gráfica dos 32 genes significativos para o ensaio de PCR Array (Qiagen), mostrando os 29 genes regulados positivamente e os 3 genes regulados negativamente.

Após as análises prévias fez-se necessário a análise por Ontologia Gênica (Gene Ontology). A ontologia gênica é uma ferramenta que nos permite descrever a distribuição dos genes e dos produtos gênicos em três domínios biológicos: função molecular, processos biológicos e componentes celulares (Gene and Consortium, 2008). Devido aos genes estudados estarem relacionados à morte celular programada foi realizada a ontologia de modo que pudéssemos classificar esses genes conforme os domínios biológicos acima citados. Para tal, obtivemos a orientação da Dra. Marcella Sorelli Carneiro Ramos e do Dr. Marcelo Augusto Christoffolete da Universidade Federal do ABC. O programa utilizado foi DAVID Bioinformatic Database e, inicialmente, os genes selecionados foram aqueles que tinham diferenças estatísticas entre os grupos e/ou mostravam tendência de serem diferentes entre os grupos ( $p \leq 0,1$ ). O programa revelou com 100% de confiança que os genes encontravam-se na categoria morte celular programada e, separou-os como: regulação positiva da morte celular, regulação da atividade da caspase e genes mitocondriais da apoptose. Esta análise permitiu ainda a correlação dos genes por 2 métodos preditivos computacionais, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e Biocarta.

Ambos os programas computacionais reúnem um banco de dados de genes, genomas, proteínas e interações moleculares que permitem a formação de vias e complexos de interesse (Kanehisa et al., 2004). O primeiro diagrama obtido foi a junção da via intrínseca e extrínseca da apoptose, iniciando com ligantes de morte (Figura 17).

O outro diagrama encontrado foi de via intrínseca (mitocondrial) e o último diagrama foi referente aos receptores de morte DR3/APO3 (Figura 18A e 18B).

Com essas análises realizadas nós selecionamos 12 genes (Bad, Bid, Bcl-XL, Ripk-1, CAD, FADD, Casp3, Casp9, TRAIL, TNFR1, XIAP e Akt) que eram significativos nos ensaios ( $p \leq 0,05$ ) e que apareciam em um ou ambos os métodos preditivos computacionais (Tabela 3). Esses resultados indicaram-nos quais os possíveis genes que poderiam ser relevantes para o estudo da apoptose no modelo de LPA/SDRA associado a malária e a partir disso foram realizados os ensaios para validação dos resultados acima citados utilizando qRT-PCR.

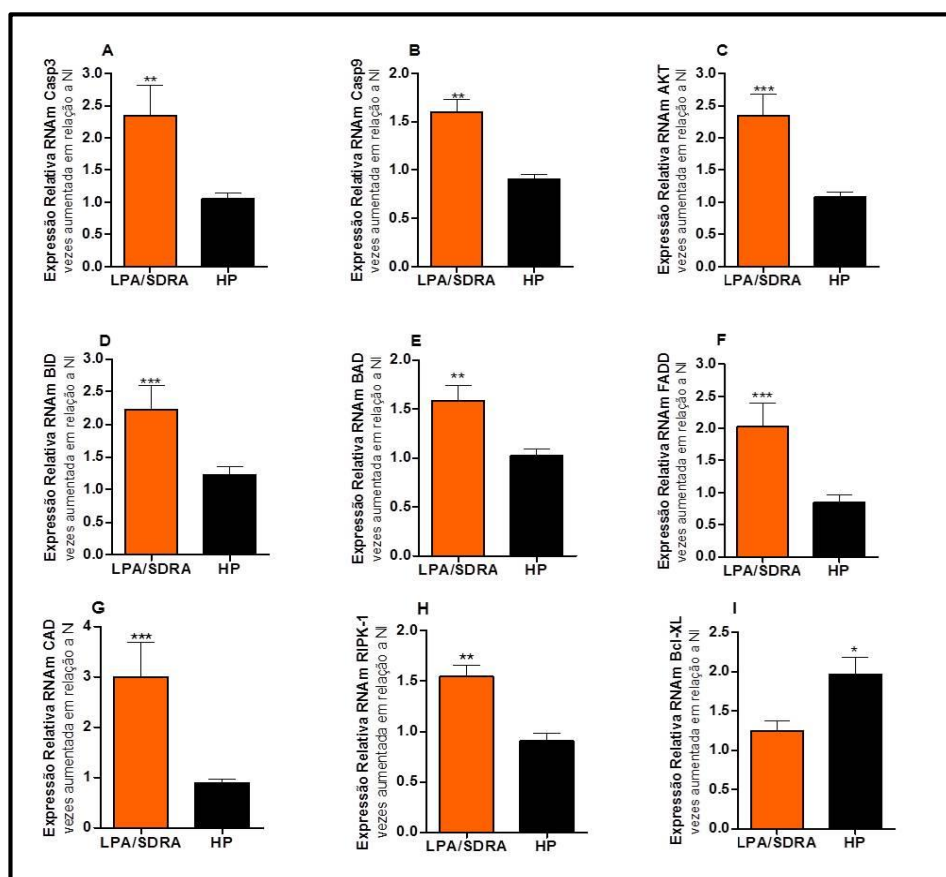


**Figura 17** - Diagrama da interação de moléculas na via de apoptose extrínseca e intrínseca utilizando os genes com valores de  $p \leq 0,1$  (marcados com estrela). É possível verificar que várias moléculas da via das caspases e da via mitocondrial estão sinalizadas no diagrama.



Os resultados obtidos por qRT-PCR validaram os dados encontrados no ensaio de PCR-Array mostrando o aumento significativo dos genes pró-apoptóticos Casp3, Casp9, Bid, Bad, FADD, CAD e Ripk-1 nos animais LPA/SDRA em relação a HP (\*\*p <0,01 e \*\*\*p <0,001) (Gráfico 23A, 23B e 23D-H). Em relação aos genes anti-apoptóticos foi visto que Akt está significativamente aumentado nos animais LPA/SDRA em relação a HP (\*\*\*p <0,001) e que Bcl-XL está aumentado de forma significativa nos animais HP em relação a LPA/SDRA (\*p <0,05) (Gráfico 23C e 23I).

Em relação aos genes TRAIL, TNFR1 e XIAP/IAP os primers utilizados não amplificavam as sequências ou ocorreu a formação de dímeros. Até este momento, não foi possível validar os resultados para esses genes, contudo novos primers serão adquiridos para finalização dos resultados para o artigo.



**Gráfico 23 - (A, B e D-H)** Expressão relativa dos genes pró-apoptóticos (Casp3, Casp9, Bid, Bad, FADD, CAD e Ripk-1) e **(C e I)** anti-apoptóticos (Akt e Bcl-XL) nos animais LPA/SDRA e HP no 7º dia pós-infecção. Dados analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e expressos em número de vezes aumentada em relação a camundongos não infectados de 2 experimentos agrupados expressos com média  $\pm$  SE (Mann-Whitney test onde \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001). Animais LPA/SDRA (n=12) e HP (n=9).



## 7 DISCUSSÃO

Neste trabalho utilizamos o modelo experimental para lesão pulmonar aguda e/ou síndrome do desconforto respiratório agudo, descrito anteriormente com camundongos da linhagem DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA (Epiphany et al., 2010). Este modelo permitiu-nos reproduzir algumas das características observadas na LPA/SDRA associada à malária humana e, é importante salientar que poucos são os modelos animais descritos até o momento que mimetizam essa enfermidade.

Reproduzimos este modelo nas condições atuais de laboratório de pesquisa e de biotério e constatamos que as características por nós encontradas para o modelo de LPA/SDRA corroboram com aqueles descritos anteriormente por Epiphany e colaboradores (Epiphany et al., 2010). Em recente publicação do nosso grupo, constatou que os animais que desenvolviam LPA/SDRA apresentaram taxa de mortalidade que variou entre 25 a 75% dos animais (média de 49,2%), além de verificar que esses animais possuíam presença da membrana hialina pulmonar, opacidade pulmonar observada ao raio X, além dos achados anteriormente descritos (Ortolan et al., 2014).

Com base em um dos principais critérios estabelecidos pelo Consenso Americano-Europeu de 1994, que é a hipoxemia, mensurada pelo  $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ , Epiphany e colaboradores demonstraram que os animais desenvolviam a LPA. Entretanto agora nosso grupo demonstrou que, apesar da maioria dos animais desenvolverem a LPA ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 300$  mmHg), existe uma parcela deles que desenvolvem a forma severa da doença a SDRA ( $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 \leq 200$  mmHg). Com esses resultados denominamos os nossos animais como LPA/SDRA (Epiphany et al., 2010; Ortolan et al., 2014).

O perfil respiratório dos animais não infectados e infectados foi obtido através das medições realizadas nas câmaras plestimográficas. Os parâmetros avaliados foram a frequência respiratória (FR) e o aumento pausa respiratória (Penh) nos dias 5, 7 e 9 após a infecção.

Para o 5º dia pós-infecção não houve diferenças significativas para a FR e o Penh, mostrando que neste dia os animais LPA/SDRA e HP ainda possuem um padrão respiratório bem próximo aos animais não infectados. Contudo no 7º e 9º dias pós-infecção, os animais LPA/SDRA apresentaram um aumento significativo do Penh e uma diminuição significativa da FR em relação aos animais HP (Gráfico 4A e 4B).

Bonville e colaboradores estudando o modelo de pneumonia viral observou que esses animais possuíam um aumento do Penh e do tempo expiratório (TE) entre os dias 6-11 pós-infecção, o que corroborava com o aumento da replicação viral. Nesse período verificou-se que o aumento desses parâmetros eram correlacionados com o aumento da produção de algumas citocinas inflamatórias como MIP-2 e MCP-1, bem como ao aumento dos infiltrados inflamatórios vistos em histologia (Bonville et al., 2006). Trabalhos realizados com LPS induzindo a LPA mostraram o aumento do Pehn, a diminuição da FR e o aumento do volume tidal nos animais desafiados e relacionaram esses resultados com o aumento dos danos epiteliais e endoteliais encontrados nos pulmões (Sun et al., 2011; Liu et al., 2013). Os trabalhos acima descritos corroboram com nossos resultados publicados, mostrando que o perfil respiratório dos animais é induzido pelo processo inflamatório que acontece nos pulmões durante a LPA/SDRA associada à malária (Ortolan et al., 2014).

A literatura médica descreve que os pacientes com LPA/SDRA associados à malária têm como histórico clínico: dispneia, aumento da frequência respiratória, infiltrados inflamatórios, edema e hipóxia (Asiedu e Sherman, 2000; Saleri et al., 2006; Mohan et al., 2008; Tan et al., 2008). Em alguns casos esses pacientes chegam a complicações pulmonares severas e necessitam de ventilação mecânica (Asiedu e Sherman, 2000; Saleri et al., 2006).

Epiphonio e colaboradores estudando a LPA/SDRA associada à malária verificaram que alguns dos sintomas descritos nos humanos eram mimetizados neste modelo murino. Esses animais apresentavam quebra da barreira alvéolo-capilar, hipóxia, edema, aumento dos infiltrados inflamatórios no interstício e nos alvéolos e hemorragia (Epiphonio et al., 2010). Outros trabalhos utilizando diferentes associações de linhagens de camundongo e plasmodio murino, também encontraram muitos dos achados acima descritos (Hee et al., 2011; Fu et al., 2012; Deroost et al., 2013; Van den Steen et al., 2013; Ortolan et al., 2014).

Foi com o intuito de estudar os infiltrados inflamatórios em um tempo precoce de infecção nos pulmões e lavado broncoalveolar de camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA que desenvolveram LPA/SDRA, propusemos um novo método, o modelo preditivo descrito por Ortolan e colaboradores. No modelo proposto são utilizados os animais são separados em dois grupos: grupo de animais da curva de sobrevivência e grupo de animais sacrificados no dia de interesse. Em ambos os grupos

foram mensurados alguns parâmetros como: frequência respiratória (FR), aumento da pausa respiratória (Penh) e parasitemia. Os parâmetros medidos nos animais controle (grupo de sobrevivência) foram utilizados na realização de curvas ROC que produziram pontos de corte que foram aplicados para o grupo de animais sacrificados no 7º dia pós-infecção e, permitindo assim, classificar estes animais com alta sensibilidade e especificidade (média 88,3% e 90,85%, respectivamente) (Ortolan et al., 2014).

Os resultados das medições realizadas nos dois grupos mostram que os perfis respiratórios desses animais eram muito semelhantes, (Gráfico 5A, 5B, 5D e 5E).

Este modelo preditivo é um modelo original e inovador, o qual permitiu o desenvolvimento de todo este trabalho.

Com o modelo preditivo pré-estabelecido, e com alguns resultados já publicados pelo nosso grupo o próximo passo foi verificar a resposta imune tecidual envolvida na LPA/SDRA. Para isso, fizemos estudos do perfil leucocitário e da ativação celular do tecido pulmonar. Na análise dos leucócitos pulmonares notamos que os animais infectados possuem frequência e número de células significativamente maior que os animais não infectados para todas as populações estudadas (Gráfico 6A e 6B). No entanto, quando separamos esses animais infectados conforme o modelo preditivo observamos, que os animais LPA/SDRA tem aumento significativo em frequência e número de células para as populações de neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e macrófagos alveolares (F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), enquanto que os animais HP têm um aumento significativo de macrófagos intersticiais (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) (Gráfico 7A e 7B).

Os neutrófilos são uma das células centrais no mecanismo fisiopatogênico da LPA/SDRA, em que existem claramente ativação e acúmulo deste tipo celular (Reutershan and Ley 2004). Os neutrófilos são abundantes no sangue, mas praticamente ausentes nos tecidos pulmonares em pessoas saudáveis. Possuem meia vida curta, sobrevivendo poucas horas (seis horas, em média) depois de liberados pela medula óssea (Rufino e Lapa, 2006).

Citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estão relacionadas à infecção malárica e a vários tipos de infecções pulmonares. Sabe-se que o aumento dessas citocinas também estimula a produção de IL-8, produzida por macrófagos alveolares, células endoteliais e epiteliais (Taylor e White, 2002; Souza et al., 2003). IL-8, bem como outras quimiocinas (como CXCR2 e CXCL2) estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos

para os pulmões e na regulação da permeabilidade vascular em diferentes modelos de injúria pulmonar aguda (Taylor e White, 2002; Zarbock et al. 2008).

O influxo de neutrófilos para os pulmões faz com que esses mudem sua conformação e se acumulem no endotélio da microvasculatura pulmonar. A contínua liberação de citocinas e moléculas de adesão faz com que muitos desses neutrófilos migrem do endotélio da microvasculatura pulmonar para o interstício chegando a região alveolar, ou apenas fiquem aderidos a microvasculatura endotelial provocando o acúmulo dessas células (Reutershan e Ley, 2004; Zarbock et al., 2010). A migração dos neutrófilos para os pulmões durante a LPA/SDRA faz com que haja a liberação de substâncias protéicas, como elastase, fosfatase ácida, betaglucuronidases, mieloperoxidases, metaloproteinases, proteinase 3 e catepsinas, que são tóxicas aos microorganismos invasores, mas em excesso causam danos ao tecido (Rufino e Lapa, 2006).

Modelos de LPA/SDRA promovidos por LPS, sepsis, fibrose cística e malária mostram o aumento da população neutrofílica nos pulmões e no LBA, além de evidenciar a atividade desse fagócito pelo aumento da produção de mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio (Vliet et al., 2000; Saffarzadeh et al., 2012; Xie et al., 2012; Van den Steen et al., 2013).

Neutrófilos ativados produzem mediadores inflamatórios como as enzimas produzidas nos grânulos azurófilos: mieloperoxidase e elastase. A mieloperoxidase (MPO) é liberada pelo processo de desgranulação do neutrófilo, esta reage com o  $H_2O_2$  produzido no *burst* respiratório formando um complexo que pode oxidar uma grande variedade de substâncias. Os produtos gerados nessa reação são altamente oxidantes e causam profundos efeitos biológicos possibilitando a morte no interior dos fagócitos de microorganismos, bem como danos teciduais promovidos pelo extravasamento desses compostos que contribuem para inflamação e para injúria pulmonar (Klebanoff, 2005; Saffarzadeh et al., 2012).

Experimentos quantificando a mieloperoxidase nos pulmões e no LBA dos animais no 7º dia pós-infecção evidenciaram o aumento significativo da produção dessa enzima nos animais LPA/SDRA em relação a HP (Gráfico 13A e 13B). Verificou-se também a atividade dos neutrófilos pulmonares pela produção de ROS utilizando-se DHR 123. Nesse ensaio observou-se que os animais LPA/SDRA possuíam um aumento significativo dessa marcação em relação aos animais HP (Gráfico 14).

Trabalhos realizados em modelos de LPA/SDRA promovidos por sepsis ou por LPS mostraram aumento significativo de MPO nos animais induzidos a essas patologias. No entanto, quando esses animais foram tratados com luflonome um fármaco imunoregulatório ou com monoamonium glicihizinate (MAG) houve a redução da produção da MPO e ROS (Ozturk et al., 2008; Shi et al., 2010). Semple e colaboradores mostraram que os animais que recebiam o anticorpo 34-1-2 (MHC I) eram induzidos a TRALI (*transfusion related acute lung injury*) e tinham uma produção de ROS aumentada em relação ao controle, mas quando eram tratados previamente com IgIV (*imunoglobulina intravenosa*) e depois induzidos a TRALI pelo anticorpo 34-1-2, esses animais mantinham os níveis basais de ROS similares aos dos animais controle (Semple et al., 2012).

Espécies reativas de oxigênio (ROS: *reactive oxygen species*) são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), são produzidas principalmente por células inflamatórias como: macrófagos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos (Barnes, 1990). Os neutrófilos ativados liberam ROS no interstício e nos alvéolos pulmonares promovendo reações químicas com outras proteínas ou o estresse oxidativo. O aumento desenfreado na produção de ROS pelos neutrófilos pode gerar danos celulares e teciduais que promovem a LPA/SDRA (Chabot et al., 1998; Chow et al., 2003).

A partir dos resultados acima descritos podemos concluir que há um acúmulo de neutrófilos ativados nos pulmões que estes estão produzindo uma grande quantidade de ROS e MPO nos animais LPA/SDRA, contribuindo assim para os danos teciduais encontrados nessa enfermidade.

Em nossos resultados encontramos também o aumento significativo da população de macrófagos alveolares (F480<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) nos pulmões de animais LPA/SDRA, enquanto que para os macrófagos intersticiais (F480<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) esse aumento significativo foi verificado nos animais HP (Gráfico 7A e 7B). Sabemos que macrófagos alveolares (MA) e macrófagos intersticiais (MI) são as duas maiores populações de macrófagos que ocupam os pulmões e são sentinelas no reconhecimento de patógenos e em morte celular (Moreira and Hogaboam 2011). Macrófagos intersticiais vêm de monócitos do sangue e se alojam em tecidos pulmonares saudáveis ou em processo inflamatório, enquanto MA podem ter sua origem de monócitos sanguíneos ou de macrófagos residentes do interstício (Landsman e Jung, 2007).

Landsman e colaboradores propõem que a origem do MA envolve a diferenciação dos monócitos sanguíneos dentro do parênquima pulmonar formando monócitos/macrófagos intermediários, em seguida há a expansão proliferativa dessas células e a migração para dentro do espaço alveolar. Nesse cenário, os MI sevem como uma reserva local para a repopulação de MA, quando necessário (Bowden e Adamson, 1972; Landsman e Jung, 2007).

Resultados baseados em vias de expressão gênica, secreção de proteínas e do processo de imunidade no hospedeiro permitiram a classificação dos macrófagos ativados de duas maneiras: macrófagos M<sub>1</sub> com perfil inflamatório e macrófagos M<sub>2</sub> com perfil regulador. Ambos os tipos de macrófagos ativados produzem citocinas e quimiocinas que recrutam, ativam e mantêm a sobrevivência de outras células inflamatórias (Moreira e Hogaboam, 2011).

Macrófagos com perfil M<sub>1</sub> são induzidos por citocinas Th1 pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e são caracterizados pela produção de altas concentrações de IL-12, IL-1, TNF $\alpha$  e iNOS. Esses macrófagos promovem de maneira exacerbada danos no tecido pulmonar, aceleram o processo de remodelamento e liberam grande quantidade de óxido nítrico que é responsável a danos ao DNA, inflamação e ao aumento de muco em modelos animais para asma (Farley et al., 2006; Moreira e Hogaboam, 2011; Johnston et al., 2012).

Já os macrófagos com perfil M<sub>2</sub> exercem a função de regular a inflamação e iniciar o reparo do tecido. Esses macrófagos produzem citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e IL-13), bem como fatores que contribuem no reparo do tecido e estimulam a angiogênese (TGF- $\beta$ , VEGF e EGF), mas não significa que não tenham um papel efetor no processo fagocítico na defesa do hospedeiro contra patógenos, apenas que sua função é mais imunoreguladora quando necessária (Laskin et al., 2011).

Mosser e Edwards relataram que os macrófagos possuem uma propriedade denominada plasticidade que os permitem alterar seu fenótipo dependendo do contexto do microambiente em que se encontram (Mosser e Edwards, 2008). Por exemplo, células M<sub>1</sub> podem ser repolarizadas em M<sub>2</sub> após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos. Sugere-se que essa reprogramação para um perfil regulador possa estar envolvida na resolução de doenças pulmonares como a LPA (Johnston et al., 2012).

Dessa maneira, macrófagos intersticiais mantêm seu perfil brando ou rapidamente passam para um fenótipo regulador, enquanto que os macrófagos alveolares, uma vez

ativados, mantêm um papel pró-inflamatório (Knapp et al., 2003; Moreira e Hogaboam, 2011). Em modelos de lesão pulmonar aguda (LPA), sabe-se que os macrófagos alveolares são fagócitos ávidos e que orquestram boa parte do processo inflamatório nos pulmões, pois quando entram em contato com patógenos produzem citocinas quimioatrativas de outros leucócitos (Delclaux e Azoulay, 2003).

Verificamos neste trabalho também a ativação dos MA e MI através da expressão das moléculas CD80 e CD86. As moléculas coestimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) estão presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC) como as células dendríticas, macrófagos e inclusas células B ativadas. Essas duas moléculas possuem receptores nas células T, tais como CD28 e CTLA-4 que promovem à ativação dos linfócitos T e/ou a regulação dessa ativação (Mark et al., 2000).

Trabalhos com pneumonia hipersensitiva e sarcoidose mostraram uma alta expressão da molécula CD86 nos macrófagos alveolares dos pacientes com essas enfermidades em relação aos seus controles. Em relação a molécula CD80 também foram encontrados aumentos significativos em ambas as doenças, no entanto a intensidade de expressão dessa molécula é menor do que a de CD86. Uma explicação para isso é que a ativação através de CD86 ocorre logo após o contato com o antígeno, enquanto que a ativação pela molécula CD80 acontece posteriormente (Agostini et al., 1999; Israel-Assayag et al., 1999).

Em nossos resultados vimos que a expressão de CD86 e CD80 nos MA (F480<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) estava significativamente aumentada nos animais infectados (LPA/SDRA ou HP) em relação aos não infectados (Gráfico 12C e 12D). Nos MI (F480<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) observamos o aumento de significativo de CD80 nos animais infectados em relação aos não infectados, e um aumento ainda maior da expressão de CD86 nesses animais (Figura 12) (Gráfico 12A e 12B). Já entre os grupos LPA/SDRA e HP não foram encontradas diferenças significativas na expressão dessas moléculas.

Lin e colaboradores estudando infecções com H1N1 observaram que os macrófagos alveolares dos animais com influenza tinham baixa expressão de CD80 e CD86 similares aos encontrados nos animais controle sugerindo que a ativação dessas células não contribuem para resposta inflamatória frente ao vírus (Lin et al., 2008).

Com esses dados podemos apenas inferir que os MA e MI estão sendo ativados frente à infecção pelo plasmódio contribuindo para a resposta inflamatória. Contudo, como não foram encontrados resultados significativos entre os grupos sugere-se que

para o estabelecimento dos fenótipos seja necessário o envolvimento de outras células e fatores inflamatórios.

Em nossa fenotipagem pulmonar observamos também o aumento significativo da população de monócitos inflamatórios (F480<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) e células dendríticas mielóides (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>) nos animais infectados em relação aos não infectados (Gráfico 6A e 6B). Entretanto, não foram identificadas diferenças significativas entre os animais LPA/SDRA e HP (Gráfico 7A e 7B).

Monócitos derivam da hematopoiese na medula óssea e eles respondem a muitos tipos de patógenos, inclusive ao *Plasmodium* (Sponaas et al. 2009). Depois de produzidos, os monócitos caem na corrente sanguínea e vão para os tecidos em que ocorre o processo inflamatório e diferenciam-se em macrófagos ou células dendríticas, dependendo do estímulo recebido (Gordon e Taylor, 2005; Schneberger et al., 2011). As células que expressam os marcadores CD11b<sup>+</sup>, CCR2<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup> são denominadas monócitos inflamatórios e representam de 2 a 5% das células brancas circulantes em um camundongo selvagem, porém quando há uma infecção ou inflamação essa população celular é rapidamente recrutada para as regiões necessárias (Shi e Pamer, 2011).

Sponaas e colaboradores usando como modelo o *Plasmodium chabaudi* verificaram o recrutamento de monócitos inflamatórios (CD11b<sup>high</sup> Ly6C<sup>+</sup>) para o tecido esplênico e observaram que essas células eram importantes produtoras de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias que contribuía para a retirada total dos parasitas do sangue (Sponaas et al., 2009).

Wilson e colaboradores estudando o modelo de injúria pulmonar induzida por ventilação (IPIV ou do inglês *VILI ventilation induced lung injury*) mostraram que os animais submetidos à ventilação com alto estiramento pulmonar tinham um número aumentado de monócitos inflamatórios (GR-1<sup>high</sup>) cerca de 3 horas após a ventilação. O número de monócitos nos sítios inflamatórios foi maior que o número de neutrófilos recrutados e os animais submetidos à ventilação mostraram injúrias no tecido pulmonar. Para estabelecer se esses monócitos eram importantes para o desenvolvimento da IPIV utilizou-se o modelo de depleção por clodronato lipossomal. Os animais que receberam o clodronato e foram submetidos à ventilação tiveram nas primeiras 24 horas parte dos seus monócitos depletados e diminuição dos sintomas da IPIV, mostrando que os



monócitos inflamatórios contribuem para o agravamento da injúria pulmonar (Wilson et al., 2009).

Em relação as células dendríticas mielóides (mDCs) encontradas nesse estudo (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>) vimos que estas não possuem diferenças significativas entre os grupos, mas possuem a tendência (p=0,1) de estarem aumentadas nos animais que não desenvolvem a síndrome (Gráfico 7A e 7B). Trabalhos realizados com tecido pulmonar, esplênico e nervoso mostram o importante papel das células dendríticas no controle da imunidade e na tolerância. Em condições basais, antígenos próprios ou inofensivos são apresentados por mDCs levando ao aborto da proliferação de células T específicas, ao mesmo tempo em que células dendríticas plasmocitóides (pDCs) suprimem a função efetora de células T. Concomitantemente, mDCs imaturas e pDCs induzem a geração de células T reguladoras capazes de suprimir a inflamação das vias aéreas (de Heer et al., 2004, 2005; Li et al., 2008).

Em relação aos linfócitos os nossos resultados mostraram o aumento significativo das células B (CD19<sup>+</sup>) e das células T (CD3<sup>+</sup> = CD4<sup>+</sup> mais CD8<sup>+</sup>) nos pulmões dos animais infectados em relação aos não infectados (Gráfico 6A e 6B). Já entre os animais LPA/SDRA e HP não foram encontradas diferenças significativas para ambas as marcações (Gráfico 7A e 7B). Quando analisamos nossos resultados chamou-nos a atenção o fato de haver uma grande quantidade de células B no tecido pulmonar e de essas células estarem aumentadas nos animais infectados por *Plasmodium*, independente de eles desenvolverem ou não a síndrome.

Uma explicação para quantidade de células B no tecido pulmonar é o BALT ou TLAB (tecido linfoide associado aos brônquios), o qual é parte do sistema imune pulmonar caracterizado pela agregação de linfócitos na bifurcação superior dos bronquíolos, sendo composta por células B circundada por células T (Maglione et al., 2007; Halle et al., 2009). Pesquisas realizadas em modelos murinos para asma e tuberculose mostraram o papel das células B na imunoregulação, pois há produção de anticorpos IgG e IgA nos pulmões, a regulação de algumas citocinas e o aumento dessas células na otimização da resposta imune contra patógenos (Maglione et al., 2007; Drolet et al., 2010).

Maglione e colaboradores observaram o aumento dos linfócitos B e de sua ativação nos camundongos infectados com *Micobacterium tuberculosis*. Nesse modelo os animais tinham um período de infecção prolongado com o visível aumento das

agregações linfocitárias. Quando os autores utilizaram camundongos nocautes para linfócitos B, os resultados encontrados foram o aumento de neutrófilos nos pulmões e a produção exacerbada de IL-10 em um período precoce, o que levou os camundongos a óbito antecipadamente devido a um agravamento da doença (Maglione et al., 2007).

Nossos resultados com os linfócitos T não mostraram aumento significativo dessas células ( $CD3^+$ ) nos animais LPA/SDRA e HP. Ensaio utilizando os marcadores  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  e  $CD8^+$  foram realizados, porém não encontramos aumento ou diminuição significativa para essas populações (dados não mostrados), por isso utilizamos apenas o marcador  $CD3^+$  para representá-las.

Experimentos para verificar a ativação dos linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  foram realizados nos pulmões dos camundongos sacrificados no 7º dia pós-infecção. Nossos resultados mostraram que os linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  estavam significativamente ativados nos animais infectados ( $CD4^+CD69^+CD62L^{low}CD44^+$  e  $CD8^+CD69^+CD62L^{low}CD44^+$ ) em relação aos animais não infectados ( $CD4^+CD69^-CD62L^+CD44^{low}$  e  $CD8^+CD69^{low}CD62L^+CD44^{low}$ ) (Gráfico 11). Em relação aos grupos LPA/SDRA e HP foi encontrada a diminuição significativa da L selectina nos linfócitos  $CD4^+CD62L^{low}$ , o que nos permite supor que essas células tenham chegado ao linfonodo, proliferado e entrando em contato com o antígeno tornando-as efetoras (Gráfico 11B e 11E).

Hengel e colaboradores descreveram que os linfócitos que expressam a L selectina ainda são células que não entraram em contato com antígenos, assim para se tornarem ativas “efetoras” elas necessitam perder a expressão de CD62L e ganhar expressão de outras moléculas. Uma vez efetoras ou não essas células tem a função de transladar entre o sangue e os linfonodos promovendo o patrulhamento imunológico (Hengel et al., 2003).

Nitcheu e colaboradores mostraram que linfócitos T  $CD8^+$  ativados ( $CD44^+CD62L^-CD69^+$ ) retirados do baço de camundongos C57BL/6 no 6º dia pós-infecção e transferidos para animais resistentes RAG-2 migravam para a região cerebral e promoviam a MC (Nitcheu et al., 2003). Alguns pesquisadores demonstraram que os linfócitos T  $CD8^+$  e T  $CD4^+$  que expressam o receptor  $V\beta 8.1,2$  e estão ativados ( $CD44^+CD62L^-CD69^+$ ) são os responsáveis pela promoção da MC, pois os animais que receberam linfócitos pouco ativados ( $CD44^{low}CD62L^+CD69^{low}$ ) não desenvolveram essa patologia, bem como os animais nocautes para essas células (Boubou et al., 1999; Bagot et al., 2004).

Apesar de pouco se saber sobre o papel dos linfócitos T na LPA/SDRA associado a malária, pesquisas com *Mycobacterium tuberculosis* e *Cryptococcus neoformans* mostram o importante papel dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ativados (CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) no controle da infecção na fase aguda, bem como na formação de memória caso haja uma segunda infecção (Serbina e Flynn, 2001; Lindell et al., 2013).

Hogan e colaboradores estudando modelos de infecções virais demonstraram que os animais infectados com a cepa de influenza SENDAI tinham as células T CD4<sup>+</sup> do LBA ativadas (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD69<sup>+</sup>), enquanto que as células T CD4<sup>+</sup> do tecido pulmonar respondiam parcialmente a essa ativação (CD44<sup>int</sup>CD62L<sup>int</sup>CD69<sup>low</sup>). Quando essas células foram retiradas dos camundongos e submetidas a estímulo *ex vivo* por peptídeos das cepas SENDAI e FLU, verificou-se que as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> respondiam ao estímulo específico dos peptídeos da cepa SENDAI produzindo IFN- $\gamma$ , com isso foi demonstrado que o fenótipo ativado e a função efetora dessas células persistem nos pulmões após a resolução da infecção e que essas células são capazes de mediar uma ação protetora (Hogan et al., 2001).

Resultados similares foram observados para o modelo de infecção com *Micobacterium tuberculosis*, em que os animais infectados mostraram ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> a partir da 4<sup>o</sup> semana pós-infecção. O fenótipo de ativação dessas células para esse período foi CD44<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD45Rb<sup>low</sup>CD62L<sup>int</sup>. Com 12 semanas pós-infecção foi verificada a diminuição da expressão de CD62L mostrando o acúmulo desses linfócitos ativados/de memória no tecido pulmonar. Nesse estudo também foi observado que esses linfócitos têm uma alta produção de IFN- $\gamma$  comparado com o dos animais não infectados (Feng et al., 1999).

Pesquisas realizadas pelo nosso grupo mostraram que a quantificação gênica de IFN- $\gamma$  e IL-10 nos pulmões dos animais LPA/SDRA estavam aumentadas em relação aos animais HP (Ortolan 2013). A partir desses resultados, iniciamos ensaios para mensurar os níveis séricos de IFN- $\gamma$  e IL-10, além de estudar a produção de IFN- $\gamma$  nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos pulmões destes animais.

Os resultados obtidos mostraram que existe um aumento significativo das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 nos soros dos animais LPA/SDRA em relação a HP (Gráfico 10A e 10B). Em relação à produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T observamos que as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produzem significativamente mais IFN- $\gamma$  nos animais LPA/SDRA em relação aos HP (Gráfico 9).

Kobayashi e colaboradores em estudo sobre o papel do IFN- $\gamma$  e da IL-10 em cepas de *Plasmodium yoelii* letal e não letal, demonstraram que os animais tratados com anticorpos anti-IFN- $\gamma$  no modelo letal desenvolviam uma infecção exacerbada e morriam antes dos animais controle que eram tratados simplesmente com IgG. Entretanto, os animais que foram tratados com anticorpos anti-IL10 tiveram uma sobrevivência maior. Estes resultados permitem-nos inferir que a homeostasia dessas citocinas nos primeiros momentos da infecção está associada à progressão e a proteção no modelo de *P.yoelii* letal (Kobayashi et al. 2000). Oh e colaboradores relataram que a citocina IL-10 tem a função de regular as respostas T<sub>H</sub>1 no modelo de hiperreatividade aérea (HA), pois a resposta T<sub>H</sub>1 iniciada por IL-12 e IFN- $\gamma$  é modulada por essa citocina diminuindo potencialmente a inflamação das vias aéreas e a HA (Oh et al., 2002).

Alguns autores sugerem que a suscetibilidade de alguns camundongos a malária cerebral é diretamente ligada à cepa de *Plasmodium*, bem como a produção de IFN- $\gamma$  pelas células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (Belnoue et al., 2002; Nitchou et al., 2003). Mitchell e colaboradores revelaram que as células T estão intimamente ligadas a produção de IFN- $\gamma$ . Os autores citam que as populações minoritárias de células T CD8 teriam papel fundamental no aumento da produção de IFN- $\gamma$ , no primeiro momento da infecção (primeiras 24 horas) promovendo assim um papel protetor para malária cerebral. No entanto, quando esta citocina é produzida nos estágios tardios (dias 4 e 5 pós-infecção) os indivíduos suscetíveis desenvolvem malária cerebral (Mitchell et al., 2005).

Em trabalho recente Villegas-Mendez e colaboradores, demonstraram que os linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  têm papel direto no desenvolvimento da MC, pois camundongos nocautes para essa citocina apresentaram MC quando receberam transferência de células T CD4<sup>+</sup> esplênicas de um animal selvagem. Os autores sugerem que a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4<sup>+</sup> atua em certas localidades do cérebro e modificam seu ambiente, e que o recrutamento e acúmulo das células T CD8<sup>+</sup>, que produzem ou não IFN- $\gamma$ , estariam colaborando para o desenvolvimento da malária cerebral (Villegas-Mendez et al., 2012).

Caruso e colaboradores pesquisando a contribuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> durante a infecção por *Micobacterium tuberculosis* demonstraram que as células T CD4<sup>+</sup> são necessárias para a resistência a tuberculose, e que a ausência dessas células resulta no atraso da produção de IFN- $\gamma$  e na formação do granuloma. Verificou-se que a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4 nos primeiros dias de infecção promove a

proteção contra a tuberculose, e que as células T CD8 contribuem para a produção de IFN- $\gamma$ , contudo são insuficientes para compensar a perda das células T CD4 nos animais nocautes levando-os ao agravamento da doença e a morte (Caruso et al., 1999).

Em nosso trabalho verificamos também o perfil das células esplênicas levando em conta que esse é um importante órgão linfoide, centro de destruição de eritrócitos (Engwerda et al., 2005) e produtor de VEGF, envolvido na gênese da LPA/SDRA (Epiphany et al., 2010).

Diferenças significativas na frequência de populações e no número total de células foram encontrados para as marcações (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> e TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>) entre os animais não infectados e infectados (Gráfico 8A e 8B), mas entre os animais LPA/SDRA e HP apenas a população TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> apresentou aumento significativo nos animais que não desenvolvem a síndrome (Gráfico 8C e 8D). Sabe-se que as células TCR $\gamma\delta$  são uma população distinta de linfócitos com um repertório expansivo e único. Essas células são os primeiros linfócitos da imunidade inata a chegar na ontogenia e ter um papel importante na proteção dos tecidos contra danos causados por patógenos (Ziegler, 2004; Li et al., 2012).

No entanto, estudos realizados por Yanez e colaboradores revelaram o papel destas células na produção de IFN- $\gamma$  e na resposta inflamatória no modelo de malária cerebral. Neste estudo foram utilizados camundongos 129/C57BL/6 (nocautes) para TCR $\gamma\delta$  e camundongos que tiveram suas células TCR $\gamma\delta$  depletadas via anticorpo. Os resultados demonstram que os camundongos que foram tratados com o anticorpo não apresentaram a doença, enquanto que os animais nocautes ficaram parcialmente protegidos, indicando assim, o papel inflamatório das células TCR $\gamma\delta$  na malária cerebral (Yañez et al., 1999). Por outro lado, estudo desenvolvido por Li e colaboradores mostrou o papel das células TCR $\gamma\delta$  na eliminação do *Plasmodium* em camundongos nocautes para AIM (Inibidor de apoptose expresso por macrófagos) e na recuperação dos tecidos afetados. O trabalho mostra que os camundongos nocautes AIM possuem uma subpopulação de V $\gamma$ 7+TCR $\gamma\delta$  que está envolvida na reconstituição do sistema imune causado pela deficiência do inibidor de apoptose e que essa subpopulação encontra-se aumentada no fígado e baço dos animais, justificando a eliminação do parasita por esse modelo (Li et al., 2012).

Nossos resultados mostraram que apesar de não haver diferenças significativas na frequência e número de células na população de macrófagos esplênicos no 7º dia pós-

infecção, existe a tendência desse aumento (0,1 e 0,07 respectivamente) nos animais HP em relação a LPA/SDRA.

Estudo realizado por Sam & Stevenson utilizaram a infecção com *P. chabaudi* AS para verificar o papel dos macrófagos produtores de IL-12 na eliminação dos parasitas do sangue. Utilizando camundongos C57BL/6 resistentes e A/J suscetíveis mensurou-se a síntese de IL-12p40 e IL-12p70 pelos macrófagos esplênicos. Os resultados mostraram que os macrófagos esplênicos dos camundongos C57BL/6 sintetizam mais IL-12 p70 *in vivo* e *in vitro* que os animais A/J suscetíveis e, que a produção de p70 pode ser correlacionada com o desenvolvimento antecipado de uma resposta Th1 e com a resistência do hospedeiro frente à infecção (Sam e Stevenson, 1999). Su e Stevenson mostraram em seu trabalho que o aumento de macrófagos esplênicos nos camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi* AS é proporcional ao dos animais GKO, no entanto a produção antecipada de IFN- $\gamma$  nos camundongos C57BL/6 é essencial para síntese de IL-12 pelos macrófagos, o que não acontece com os camundongos GKO que são deficientes para essa citocina, tornando-os suscetíveis em relação aos animais C57BL/6 (Su e Stevenson, 2000).

Trabalhos realizados com *P. falciparum* mostraram que o aumento do baço está associado a expansão da popa vermelha e da polpa branca, pois há o acúmulo de eritrócitos infectados ou não, bem como o aumento de macrófagos, o que gera uma desorganização da arquitetura esplênica com a dissolução da zona marginal e a relativa perda das células B (Urban et al., 2005; Buffet et al., 2011).

Outro alvo importante de nosso estudo foi verificar se os neutrófilos estão envolvidos na imunopatogênese da LPA/SDRA associada à malária severa. Visto que os neutrófilos estavam aumentados e ativados de maneira significativa nos animais LPA/SDRA em relação a HP, realizamos ensaios com o anticorpo anti-Gr1 (RB6-8C5) para verificarmos se a depleção dessa população influenciava diretamente o desenvolvimento da síndrome.

Os resultados obtidos mostraram que os animais que receberam uma dose do anticorpo anti-Gr1 não morriam no intervalo de 7-12 dias pós-infecção com LPA/SDRA e iriam morrer mais tardiamente de hiperparasitemia (Gráfico 15A e 15B).

Estudos em diversos modelos experimentais para LPA/SDRA mostraram que quando os neutrófilos são depletados ou mesmo bloqueados os danos ao tecido pulmonar são atenuados e clinicamente insignificantes (Goodman et al., 2003; Matthey

e Zemans, 2011). Chen e colaboradores ao estudarem o papel dos neutrófilos na malária cerebral (CM) demonstraram que a depleção precoce dessas células é importante para o não desenvolvimento da patologia, para o não recrutamento de monócitos para os vasos cerebrais e para a limitação da produção de algumas citocinas no tecido cerebral (Chen et al., 2000). Porcherie e colaboradores mostraram que além da depleção de neutrófilos em camundongos C57BL/6 não promover a MC, existe um tipo de neutrófilo com fenótipo  $Ly6G^{+7/4^{+}Fc\epsilon RI^{+}}$  que induz em camundongos nocaute para  $Fc\epsilon RI$  sintomas de malária cerebral, enquanto que o fenótipo negativo para  $Fc\epsilon RI^{-}$  não promove a doença.(Porcherie et al., 2011).

Pesquisas com lesões pulmonares induzidas por LPS mostraram que os animais controles que recebiam apenas LPS apresentavam hemorragias, infiltrados inflamatórios, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, produção exacerbada de ROS e sucumbiam a doença, enquanto que os animais que tiveram seus neutrófilos retirados não apresentavam o quadro acima descrito e sobreviviam a enfermidade (Abraham et al., 2000; Savov et al., 2002).

Visto que os neutrófilos são essenciais para a inflamação e a promoção da LPA/SDRA, verificamos se os macrófagos pulmonares também contribuem para esse quadro. Com os resultados anteriores e com o conhecimento que os macrófagos são importantes produtores de quimiocinas e citocinas atrativas de neutrófilos, resolvemos retirar esses macrófagos dos animais infectados com *P. berghei* ANKA, através de clodronato em lipossomas.

Nossos resultados mostraram que os animais infectados que receberam o tratamento com o clodronato eram resistentes e morreram após o 14º dia pós-infecção com sintomas de hiperparasitemia, enquanto que os animais tratados com solução salina morriam entre o 7º e 12º dias pós-infecção com LPA/SDRA.

A partir desses resultados vimos que os macrófagos possuem um papel fundamental na promoção da LPA/SDRA associada a malária, pois a retirada desses macrófagos reduz a quantidade de neutrófilos do sangue atraídos para os pulmões diminuindo a inflamação. Vimos também que a retirada dos neutrófilos permite a sobrevivência dos animais e previne o quadro da LPA/SDRA. Com esses resultados podemos inferir que ambas as populações estudadas contribuem para o processo de inflamação e injúria tecidual, pois os macrófagos fagocitam os patógenos e as células em morte celular, além de produzir citocinas e quimiocinas atrativas de PMN, enquanto

que os neutrófilos uma vez recrutados aglomeram nos vasos diminuindo a circulação, migram para o interstício e para os alvéolos liberando espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e proteases que auxiliam a retirada dos patógenos, mas também promovem injúrias ao endotélio.

Frank e colaboradores em sua pesquisa com IPIV (injúria pulmonar induzida por ventilação) viram que a depleção de macrófagos alveolares gera um decréscimo da permeabilidade endotelial, resultando em baixos níveis da citocina CXCL1 e um baixo recrutamento de neutrófilos para região alveolar promovendo a sobrevivência desses animais. Os dados obtidos por eles também suportam a hipótese que fatores solúveis no espaço aéreo durante a IPIV são resultados da interação entre o epitélio alveolar e os macrófagos ativados, que de alguma forma ainda não elucidada promovem os danos teciduais vistos nesse modelo (Frank et al., 2006).

Em modelos de reperfusão isquêmica alguns pesquisadores mostraram que a depleção de macrófagos alveolares promove a proteção dos animais com essa enfermidade. Nesse modelo eles também verificam que os animais com MA depletados tem uma baixa regulação da expressão de citocinas e quimiocinas atrativas de leucócitos (TNF- $\alpha$ , MIP-2 e MCP-1) em relação a alta regulação encontrada nos animais controle (Naidu et al. 2003; Zhao et al. 2006).

Leemans e colaboradores estudando a infecção por *M. tuberculosis* perceberam que os animais que tinham seus MA depletados resistiam mais do que 5 meses a infecção, enquanto que os animais controles morriam antes desse período. Esses resultados sugerem que os MA facilitam o crescimento de *M. tuberculosis* no compartimento pulmonar e que sua depleção evita o crescimento da bactéria. No hospedeiro infectado a apoptose pode suprir esse papel regulando o crescimento da bactéria pela morte dos MA (Leemans et al., 2001).

Outro objetivo do nosso trabalho foi avaliar o papel da apoptose nos pulmões dos animais LPA/SDRA e HP, verificando a presença de morte celular, o fenótipo das células em apoptose, bem como a expressão gênica de moléculas pró e anti-apoptóticas para o 7º dia pós-infecção.

Nosso primeiro passo foi verificar se havia mais células em apoptose nos animais LPA/SDRA em relação a HP. Para isso coletamos os pulmões dos animais no 7º e 8º dias pós-infecção e realizamos o ensaio de fluorescência por TUNEL. Nossos resultados



mostraram que os animais com LPA/SDRA apresentaram um número maior de células em apoptose (por  $\mu\text{m}^2$  de tecido) do que os animais HP (Gráfico 19, Figura 14D e 14H).

As células em apoptose vistas em grande quantidade nos animais LPA/SDRA podem ser endoteliais ou epiteliais que acabam morrendo devido aos produtos gerados durante o processo inflamatório, citoadesão de eritrócitos infectados ou serem células inflamatórias que migram para região e depois de realizada suas funções, como por exemplo fagocitar agentes infecciosos ou debris celulares morrem por este processo de maneira programada.

Petrache e colaboradores, ao estudarem as células endoteliais pulmonares verificaram que a citocina TNF- $\alpha$  produzida durante o processo inflamatório era indutora de apoptose nesse tipo celular. Isso foi comprovado mostrando que a proteína MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) presente na interação actina-miosina é fundamental para o sinal de apoptose, pois a desestabilização do citoesqueleto através da indução por TNF- $\alpha$  promove espaços celulares que aumentam a permeabilidade e geram sinais apoptóticos. Nesse estudo verificou-se também que a utilização de um inibidor de actina (ML-7) promove a resistência das células endoteliais ao processo de morte celular induzida pela citocina TNF- $\alpha$  (Petrache et al., 2001).

Soares e colaboradores em sua revisão sobre células endoteliais relatam o efeito da hemoxigenase-1 (HO-1) na prevenção da apoptose. Eles relatam que as células endoteliais induzidas por TNF- $\alpha$  geram um aumento da expressão de HO-1 que protegem essas células da morte. Ainda nesse trabalho os autores citam o uso do CO (monóxido de carbono) como agente antioxidante, pois ao tratarem células endoteliais induzidas com TNF- $\alpha$  eles verificaram que o CO produz uma alta expressão de HO-1 promovendo a ação anti-apoptótica (Soares et al., 2002).

No lavado broncoalveolar vimos através do ensaio utilizando Anexina V e 7-AAD que os animais LPA/SDRA possuem um aumento significativo de células em apoptose em relação aos animais HP, enquanto que para marcação de necrose não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Gráfico 20).

As células do LBA foram submetidas a fenotipagem e a marcação com Anexina V para visualizarmos quais eram os tipos celulares que estavam em apoptose. Vimos que nas células do LBA dos animais LPA/SDRA havia um aumento significativo da apoptose dos neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e das células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) em relação aos animais HP (Gráfico 21A e 21B).

Cox e colaboradores em seu estudo sobre lesão pulmonar mostraram que o influxo de neutrófilos para os pulmões dos animais tratados com LPS promove o acúmulo dessas células nas primeiras 24 horas, onde também foi observado o aumento da apoptose dessas células e a fagocitose delas por parte dos macrófagos pulmonares. A indução dos neutrófilos acumulados no tecido a apoptose funciona como um mecanismo regulador da inflamação impedindo que a atividade deles e seus produtos promovam danos ao tecido, enquanto que o papel dos macrófagos é reconhecer os sinais de morte e fagocitar os neutrófilos em lise impedindo que seus metabólitos provoquem injúrias (Cox et al., 1995).

Pesquisa realizada por Parsey e colaboradores mostraram que os animais que eram induzidos a endotoxemia tinham um grande aumento de neutrófilos em apoptose nos pulmões na primeira hora, contudo ao longo das primeiras 24 horas, o número de neutrófilos em processo de morte foi diminuindo. Após 48 horas a população de neutrófilos em apoptose voltou a aumentar nos animais induzidos a endotoxemia (Parsey et al. 1999). A diminuição da apoptose de neutrófilos durante algumas horas ou dias durante uma enfermidade também foi verificada por Matute-bello e colaboradores. Sua pesquisa verificou a diminuição de neutrófilos em apoptose no LBA de pacientes com LPA/SDRA nos três primeiros dias de manifestação da enfermidade e mostrou que essa resposta estava relacionada a altas concentrações do fator GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*) no LBA. O aumento desse fator e a inibição da apoptose dos neutrófilos estariam diretamente envolvidos na severidade da doença e nos danos teciduais encontrados nesses pacientes (Matute-Bello et al., 2000).

No nosso modelo de LPA/SDRA associado a malária, vimos o aumento da apoptose de neutrófilos no LBA no 7º dia pós-infecção, contudo não podemos descartar se há a presença de GM-CSF no período inicial da infecção promovendo a sobrevivência dos neutrófilos e diferenciando nossos animais naqueles que desenvolvem a síndrome dos que não desenvolvem (HP). Porém podemos sugerir que a morte celular dos neutrófilos no 7º pós-infecção estaria envolvida no processo de reparo e regulação do organismo durante a síndrome corroborando com os dados de Martin e colaboradores (Martin et al., 2003).

Aumento na apoptose também foi encontrado para a população de células dendríticas no LBA dos animais LPA/SDRA em relação a HP. Smedt e colaboradores estudaram a interação das células dendríticas com as células T em animais que recebiam

LPS. Essa pesquisa mostrou que a ativação dos linfócitos T (moléculas CD25, CD69 e CD40) interagindo com as células dendríticas maduras (CD86) promove um sinal de sobrevivência para as últimas e, que a não existência desse sinal por parte dos linfócitos T induz um perfil regulador do sistema imune promovendo a apoptose das células dendríticas (de Smedt et al., 1998).

Chen e colaboradores estudando autoimunidade verificou que o processo de apoptose das células dendríticas tem como objetivo a manutenção da tolerância imunológica e que a autoimunidade é promovida por uma falha no sinal de morte celular. Isso ficou evidente quando os pesquisadores utilizaram camundongos selvagens e camundongos nocautes para a região p35 das células dendríticas que não permite a ativação da caspase 8. Os animais nocautes apresentavam acúmulo de células dendríticas e ativação dos linfócitos T gerando graves sintomas de autoimunidade, já os animais selvagens não apresentavam qualquer sintomas (Chen et al., 2006). A partir desses estudos e dos nossos resultados podemos inferir que as células dendríticas estejam mantendo um papel regulador nos pulmões dos animais com LPA/SDRA.

Uma vez feita a fenotipagem das células em apoptose e visto que nos animais LPA/SDRA existe mais morte celular, nosso próximo passo foi verificar quais os marcadores pró e anti-apoptóticos estavam mais ou menos expressos nos animais LPA/SDRA no 7º dia pós-infecção.

Primeiramente foram realizados ensaios em PCR em tempo real para os genes Bax, Bak, FAS, FASL, P53 e Bcl2, que eram os mais citados na literatura da LPA/SDRA. Vimos que o gene Bak tinha sua expressão aumentada nos animais LPA/SDRA em relação a HP (Gráfico 22A), enquanto que o gene Bcl2 tinha sua expressão diminuída nesses animais (Gráfico 22B). Para os P53, FAS, FASL e Bax não foram encontradas diferenças significativas para esse dia de infecção, contudo estudos preliminares do nosso grupo mostraram o aumento de Bax para o 5º pós-infecção nos animais LPA/SDRA (dados não mostrados).

Após esses resultados realizamos um ensaio de PCR-array para vários marcadores de apoptose com a finalidade de procurarmos outros genes que pudessem estar regulados de maneira positiva ou negativa em nosso modelo no 7º dia pós-infecção. Nossos resultados apresentaram 32 genes significativos, dos quais apenas 12 (Bad, Bid, Bcl-XL, Ripk-1, CAD, FADD, Casp-3, Casp-9, TRAIL, TNFR1, Xiap e Akt) foram selecionados para validação por qRT-PCR.

Os resultados obtidos por qRT-PCR confirmaram o aumento significativo da expressão de Casp-3, Casp-9, Bid, Bad, FADD, CAD, Ripk-1 e Akt nos animais LPA/SDRA em relação a HP e a diminuição de Bcl-XL nos animais com síndrome.

Guinee e colaboradores, mostraram o papel dos marcadores Bax e Bcl2 no desenvolvimento da DAD (*Difuse Alveolar Damage*). Os resultados por eles encontrados mostraram o aumento da expressão de Bax em pacientes com DAD e que esse aumento está relacionado a indução da morte de pneumócitos tipo II. Em contrapartida Bcl2 possui uma baixa expressão nesses pacientes, mas uma alta expressão nas células intersticiais pulmonares, sendo um possível marcador de progressão ou não da DAD (Guinee et al., 1997). O' Reilly e colaboradores revelaram que pacientes com hiperoxia tem o aumento da expressão do marcador Bax, mas não de Bak e Bid e que as células envolvidas na morte celular por Bax são as células endoteliais alveolares e células epiteliais do tipo I, enquanto que a expressão de Bcl2 nesses pacientes é diminuída, promovendo a apoptose no tecido pulmonar hiperventilado (O'Reilly et al., 2000).

Croker e colaboradores pesquisaram as vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose na sobrevivência dos neutrófilos. Nesse estudo o autor relaciona as perturbações na vida dos neutrófilos na decorrência de doenças pulmonares severas como LPA/SDRA, SIRS, pneumonia e bronquiolites. Dados a respeito da morte celular programada dos neutrófilos sugerem que a expressão de Bid, Bak e Bax em comunhão com FAS acelera a apoptose, mas que não a torna restrita a interação entre essas duas vias. Os autores mostram também que o aumento da expressão de Mcl-1 e Bcl2 inibem a ação de FAS na apoptose dos neutrófilos (Croker et al., 2011).

Pesquisas sobre o efeito de surfactantes no tecido pulmonar de camundongos com SDRA induzido por LPS, demonstraram que a ação do surfactante diminui a translocação de Bax e Bak do interior da mitocôndria e promovem o aumento de Bcl2 fornecendo proteção ao tecido pulmonar durante o processo patológico (Mittal e Sanyal, 2012).

Trabalhos realizados em pacientes com LPA/SDRA mostraram que os marcadores de apoptose por quebra de DNA (TUNEL), casp-3, Bax, p53, Fas e FasL possuem sua expressão aumentada nas células do epitélio alveolar de pacientes que morrem da síndrome em relação aos sadios (Albertine et al. 2002). Sabe-se que o marcador Fas está presente na superfície alveolar, no epitélio brônquico e nos macrófagos alveolares,

enquanto que FasL é expresso em células T citotóxicas, neutrófilos ativados e plaquetas (Galani et al. 2010). Foi demonstrado ainda, que a combinação de Fas/FasL induz as células epiteliais do tipo II tanto a apoptose *in vivo* quanto *in vitro* (Matute-Bello et al., 2001).

No trabalho de Bhandari e colaboradores verificou-se que os animais submetidos a hiperóxia com 100% de O<sub>2</sub> por 72 horas e com presença da angiopoitina 2 possuíam a expressão de mRNA de caspase 3, 8 e 9 significativamente aumentada em relação aos animais não submetidos ao procedimento com O<sub>2</sub>. Nesse mesmo trabalho, a expressão dos genes Bax, Bid, Bak e Bim foram mensurados nos animais nocautes e não nocautes para angiopoitina 2 submetidos ao O<sub>2</sub> e, eles puderam observar o aumento na expressão desses genes nos animais não nocautes expostos ao O<sub>2</sub> e ver que esses animais eram os que progrediam para a IPAH (Injúria Pulmonar Aguda por Hiperoxia) (Bhandari et al., 2006).

Chopra e colaboradores estudando o modelo de LPA promovido por sepsis observou que camundongos em diferentes dias de infecção possuem o aumento da atividade de caspase 3 e 8 em relação ao animal sadio. Os autores também verificaram que a via TNF- $\alpha$  e TNFR-1, expressas e ativadas, eram as que promoviam as vias intrínsecas e extrínsecas ao aumento da atividade das caspases nos animais infectados (Chopra et al., 2009).

Smedt e colaboradores viram que as células dendríticas dos animais desafiados por LPS e OVA produziam uma maior expressão de Bcl-XL, mostrando que as células dendríticas que interagiam com linfócitos T ativados produziam uma expressão maior dessa molécula anti-apoptótica e promoviam a autoimunidade dos camundongos (de Smedt et al. 1998).

Imunocomplexos de IL-8 e anticorpo anti-IL-8 (IC) foram encontrados no plasma e no fluído pulmonar de pacientes com LPA. Neutrófilos foram retirados do sangue destes pacientes, isolados e colocados em cultura para se verificar a presença de apoptose e as possíveis vias responsáveis. Os neutrófilos incubados com meio ou plasma de pacientes controle apresentaram apoptose, alta atividade enzimática de caspase-3 e caspase-9 e altos níveis das proteínas pró-apoptóticas Bak e Bax, enquanto que os neutrófilos incubados com IC tiveram uma supressão da apoptose, com baixos níveis de atividade enzimática de caspases 3 e 9, altos níveis de proteína Bcl-XL, decréscimo das proteínas Bak e Bax e aumento do sinal de sobrevivência pela atividade

da via PI3-K/Akt, gerando a hipótese de que esses imunocomplexos de IL-8 estão contribuindo para a diminuição da morte celular de neutrófilos e progressão da LPA (Fudala et al., 2007).

Kolliputi e Waxman analisaram o papel da IL-6 na citoproteção de células endoteliais. Neste trabalho células endoteliais (HUVEC) e camundongos IL-6 e foram expostos ao O<sub>2</sub> por 72 horas, onde foi verificado que os animais selvagens apresentam o aumento da apoptose e da expressão e da fosforilação de Bax e inatividade da via PI3-K/Akt, enquanto que os animais com super expressão de IL-6 e as HUVEC submetidas a IL-6 apresentaram ativação da via PI3-K/Akt, que promove a dimerização e a não translocação de Bax para superfície mitocondrial permitindo que o processo de apoptose não aconteça (Kolliputi e Waxman, 2009).

A partir dos nossos resultados é possível inferir que os animais com LPA/SDRA possuem mais células em morte celular do que os animais HP. No entanto, ainda não sabemos se o aumento da morte celular está relacionado com a apoptose de células endoteliais e epiteliais pulmonares, ou se nossos resultados indicam um papel regulador, pois as células inflamatórias entram morte celular programada reduzindo maiores danos teciduais. Apesar dos nossos animais sucumbirem a LPA/SDRA, a apoptose pode ser vista nestes animais como uma tentativa de promover o equilíbrio imunológico, pois várias vias promovem a morte celular para proteger o local da infecção e outras vias tentam impedir a morte para manutenção desta.

Em síntese esse trabalho permitiu-nos conhecer o perfil celular dos animais com LPA/SDRA associado a malária, verificar quais são as populações aumentadas nesses animais tanto no órgão alvo da inflamação, quanto no tecido esplênico. Observar a ativação de linfócitos, macrófagos e neutrófilos nos animais infectados com perfil LPA/SDRA ou HP. Constatar o importante papel de macrófagos e neutrófilos durante infecção e avaliar sua contribuição durante a síndrome, pois sua retirada permite o não estabelecimento da LPA/SDRA. Mostrar o mecanismo de compensação promovido durante a infecção, pois há o aumento da citocina IFN- $\gamma$  e da citocina IL-10 proporcionando efeitos pró e anti-inflamatórios, bem como compreender o processo de morte celular que se estabelece nos animais LPA/SDRA, através do estudo do perfil das células em apoptose e da expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas mais ou menos reguladas.

Esse trabalho representa uma contribuição para a compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na LPA/SDRA associada a malária murina, fazendo-se necessários outros estudos para estabelecimento dos principais fatores que levam a síndrome.

## 8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, os quais trazem contribuições para o entendimento da patogênese da LPA/SDRA associada à malária, podemos concluir:

- a. Os animais que desenvolvem LPA/SDRA possuem o aumento da pausa respiratória (Penh) elevado e diminuição da frequência respiratória (FR) em relação aos animais HP.
- b. Por meio do modelo preditivo desenvolvido pelo nosso grupo, é possível classificar os animais sacrificados no 7º dia pós-infecção em LPA/SDRA e HP.
- c. Os animais classificados como LPA/SDRA possuem um aumento na população de neutrófilos nos pulmões e da atividade dessas células, que contribui diretamente no estabelecimento da doença, uma vez que quando os neutrófilos são retirados precocemente, os animais não morrem com a síndrome.
- d. O aumento dos macrófagos alveolares nos animais LPA/SDRA contribui com um papel pró-inflamatório, enquanto que o aumento de macrófagos intersticiais nos animais HP parece promover um papel regulador. E a retirada da população de macrófagos pulmonares nos animais infectados contribui para o não aparecimento da síndrome.
- e. Linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> são os responsáveis pela alta produção da citocina IFN- $\gamma$  nos animais com LPA/SDRA.
- f. Os animais LPA/SDRA apresentam altos níveis no soro das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$ , mostrando uma possível tentativa do organismo de anular os efeitos pró-inflamatórios.
- g. Animais com LPA/SDRA têm um maior número de células em apoptose no tecido pulmonar que os animais HP.
- h. Animais com LPA/SDRA possuem grande número de células no LBA em apoptose, principalmente neutrófilos e células dendríticas, e a morte dessas células podem estar associadas ao mecanismo regulador do hospedeiro frente a injúria pulmonar.



i. O estudo da morte celular nos animais LPA/SDRA demonstrou o aumento da expressão de alguns genes pró-apoptóticos como Casp-3, Casp-9, Bad, Bid, Bak, FADD, CAD e Ripk-1 e o aumento do gene anti-apoptótico Akt, enquanto que os animais HP mostraram estar mais protegidos pelo aumento dos genes anti-apoptóticos Bcl-XL e Bcl2.

## REFERÊNCIAS

- Abraham E, Carmody a, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Dec;279(6):L1137–45.
- Agostini C, Trentin L, Perin a, Facco M, Siviero M, Piazza F, et al. Regulation of alveolar macrophage-T cell interactions during Th1-type sarcoid inflammatory process. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 1):L240–50.
- Aitken EH, Negri EM, Barboza R, Lima MR, Alvarez JM, Marinho CR, et al. Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Malar J*. 2014 Jan;13(1):230.
- Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman G a, et al. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2002 Nov;161(5):1783–96.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):220–4.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM a, Barral A, et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. 2010 Jan;9:13.
- Anstey NM, Jacups SP, Cain T, Pearson T, Ziesing PJ, Fisher D a, et al. Pulmonary manifestations of uncomplicated falciparum and vivax malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. *J Infect Dis*. 2002 May 1;185(9):1326–34.
- Arevalo-Herrera M, Quiñones ML, Guerra C, Céspedes N, Giron S, Ahumada M, et al. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. *Acta Trop*. 2012 Mar;121(3):303–14.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):1057–69.
- Ashkenazi a. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science (80- )*. 1998 Aug 28;281(5381):1305–8.
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):420–30.
- Asiedu DK, Sherman CB. Adult respiratory distress syndrome complicating Plasmodium falciparum malaria. *Heart Lung*. 2000;29(4):294–7.
- Autino B, Corbett Y, Castelli F, Taramelli D. Pathogenesis of malaria in tissues and blood. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012 Jan;4(1):e2012061.
- Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis*. 1977 Oct;116(4):589–615.

- Bagot S, Nogueira F, Collette A, do Rosario V, Lemonier F, Cazenave P-A, et al. Comparative Study of Brain CD8+ T Cells Induced by Sporozoites and Those Induced by Blood-Stage *Plasmodium berghei* ANKA Involved in the Development of Cerebral Malaria. *Infect Immun*. 2004 Apr 21;72(5):2817–26.
- Barber BE, William T, Jikal M, Jilip J, Dhararaj P, Menon J, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in children. *Emerg Infect Dis*. 2011 May;17(5):814–20.
- Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med*. 1990 Jan;9(3):235–43.
- Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012 Jan;4(1):e2012026.
- Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, et al. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest*. 2009 Dec;119(12):3723–38.
- Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin J-C, van Rooijen N, Viguier M, et al. On the pathogenic role of brain-sequestered alpha beta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6369–75.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive Care Med*. 1994 Jan;20(3):225–32.
- Bhandari V, Choo-Wing R, Lee CG, Zhu Z, Nedreelow JH, Chupp GL, et al. Hyperoxia causes angiopoietin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. *Nat Med*. 2006 Nov;12(11):1286–93.
- Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2010 Oct;11(10):889–96.
- Bonville C a, Bennett NJ, Koehnlein M, Haines DM, Ellis J a, DelVecchio AM, et al. Respiratory dysfunction and proinflammatory chemokines in the pneumonia virus of mice (PVM) model of viral bronchiolitis. *Virology*. 2006 May 25;349(1):87–95.
- Boström S, Giusti P, Arama C, Persson J-O, Dara V, Traore B, et al. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J*. BioMed Central Ltd; 2012 Jan;11(1):109.
- Boubou MI, Collette a, Voegtlié D, Mazier D, Cazenave P a, Pied S. T cell response in malaria pathogenesis: selective increase in T cells carrying the TCR V(beta)8 during experimental cerebral malaria. *Int Immunol*. 1999 Sep;11(9):1553–62.
- Bowden DH, Adamson IY. The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage. *Am J Pathol*. 1972 Sep;68(3):521–37.
- Brasil. Ministério da Saúde SVS. Sistema de Informação de Mortalidade [Internet]. SIM. 2012a [cited 2014 May 7]. Available from: <http://svs.aids.gov.br/cgiae/sim/>

- Brasil. Ministério da Saúde SVS. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (SIVEP) [Internet]. SIVEP. 2012b [cited 2014 May 7]. Available from: [http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria)
- Brasil. Ministério da Saúde SVS. Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) [Internet]. Sinan. 2012c [cited 2014 May 7]. Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/malaria/bases/malabr.def>
- Brasil. Ministério da Saúde SVS. Boletim Epidemiológico de 2013 [Internet]. Bol. Epidemiológico 2013. 2013 [cited 2014 May 15]. p. 1–16. Available from: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim\\_epidemiologico\\_numero\\_1\\_2013.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_epidemiologico_numero_1_2013.pdf)
- Brown LA, Harris FL, Jones DP. Ascorbate deficiency and oxidative stress in the alveolar type II cell. *Am J Physiol.* 1997 Oct;273(4 Pt 1):L782–8.
- Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira J-P, Peytel E, et al. Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PLoS One.* 2010 Jan;5(10):e13236.
- Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood.* 2011 Jan 13;117(2):381–92.
- Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol.* 2012 Feb;13(2):188–95.
- Caruso a M, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol.* 1999 May 1;162(9):5407–16.
- Carvalho LH, Sano G-I, Hafalla JCR, Morrot A, Curotto de Lafaille M a, Zavala F. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat Med.* 2002 Feb;8(2):166–70.
- Caser E, Casati A, Matos GFJ, Carvalho CRR, Barbas CS V. Comparing Berlin To Aecc Definition To Predict Mortality In Acute Lung Injury Patients : What Are The Changes ? *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;5625.
- Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000 Oct;33(5):489–92.
- Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J.* 1998 Mar;11(3):745–57.
- Chakravarty S, Cockburn I a, Kuk S, Overstreet MG, Sacci JB, Zavala F. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med.* 2007 Sep;13(9):1035–41.
- Chamoto K, Gibney BC, Ackermann M, Lee GS, Lin M, Konerding M a, et al. Alveolar macrophage dynamics in murine lung regeneration. *J Cell Physiol.* 2012 Sep;227(9):3208–15.

- Chen L, Zhang Z, Sendo F. Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin Exp Immunol*. 2000 Apr;120(1):125–33.
- Chen M, Wang Y-H, Wang Y, Huang L, Sandoval H, Liu Y-J, et al. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science*. 2006 Feb 24;311(5764):1160–4.
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro J, Brauer M, Kiefer M, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* (80- ). 1994 Mar 25;263(5154):1759–62.
- Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute lung injury:apoptosis and signaling mechanisms. *Exp Biol Med* (Maywood). 2009 Apr;234(4):361–71.
- Chou C-C, Hsiao H-Y, Hong Q-S, Chen C-H, Peng Y-W, Chen H-W, et al. Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. *Nano Lett*. 2008 Feb;8(2):437–45.
- Chow C-W, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Oct;29(4):427–31.
- Costa FTM, Lopes SCP, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol*. Australian Society for Parasitology Inc.; 2012 Nov;42(12):1099–105.
- Costa K, Almeida W, Magalhaes I, Montoya R, Moura M, Lacerda M. Malária em Cruzeiro do Sul ( Amazônia Ocidental brasileira ): análise da série histórica de 1998 a 2008. 2010.
- Cotter C, Sturrock HJW, Hsiang MS, Liu J, Phillips A a, Hwang J, et al. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2013 Sep 7;382(9895):900–11.
- Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*. 2010 Jan;3(1):5.
- Cox G, Crossley J, Xing Z. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Feb;12(2):232–7.
- Croker B a, O'Donnell J a, Nowell CJ, Metcalf D, Dewson G, Campbell KJ, et al. Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 9;108(32):13135–40.
- D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, Mock JR, Eto Y, Garibaldi BT, et al. Resolution of experimental lung injury by monocyte-derived inducible nitric oxide synthase. *J Immunol*. 2012 Sep 1;189(5):2234–45.
- Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1976 Sep;443(3):629–34.
- DeGrendele HC. Requirement for CD44 in Activated T Cell Extravasation into an Inflammatory Site. *Science* (80- ). 1997 Oct 24;278(5338):672–5.

- Delclaux C, Azoulay E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur Respir J*. 2003 Aug 1;22(Supplement 42):10s – 14s.
- Denault J-B, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev*. 2002 Dec;102(12):4489–500.
- Deroost K, Tyberghein A, Lays N, Noppen S, Schwarzer E, Vanstreels E, et al. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 May;48(5):589–600.
- Descheemaeker P-N, Mira J-P, Bruneel F, Houzé S, Tanguy M, Gangneux J-P, et al. Near-fatal multiple organ dysfunction syndrome induced by *Plasmodium malariae*. *Emerg Infect Dis*. 2009 May;15(5):832–4.
- Doolan DL, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol*. 1999 Jul 15;163(2):884–92.
- Drolet J-P, Frangie H, Guay J, Hajoui O, Hamid Q, Mazer BD. B lymphocytes in inflammatory airway diseases. *Clin Exp Allergy*. 2010 Jun;40(6):841–9.
- DUARTE MIS, CORBETT CEP, BOULOS M, AMATO NETO V. Ultrastructure of the lung in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1995;34(1):31–5.
- Elias RM, Correa-Costa M, Barreto CR, Silva RC, Hayashida CY, Castoldi A, et al. Oxidative stress and modification of renal vascular permeability are associated with acute kidney injury during *P. berghei* ANKA infection. *PLoS One*. 2012 Jan;7(8):e44004.
- Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol*. 2005 Feb;21(2):75–80.
- Epiphanio S, Campos MG, Pamplona A, Carapau D, Pena AC, Ataíde R, et al. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog*. 2010 May;6(5):e1000916.
- Evans KJ, Hansen DS, van Rooijen N, Buckingham L a, Schofield L. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1192–9.
- Farley KS, Wang LF, Razavi HM, Law C, Rohan M, McCormack DG, et al. Effects of macrophage inducible nitric oxide synthase in murine septic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Jun;290(6):L1164–72.
- Feng CG, Bean AG, Hooi H, Briscoe H, Britton WJ. Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1999 Jul 15;67(7):3242–7.
- Frank JA, Wray CM, McAuley DF, Schwendener R, Matthay MA. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Dec;291(6):L1191–8.

- Freitas do Rosário AP, Lamb T, Spence P, Stephens R, Lang A, Roers A, et al. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *J Immunol.* 2012 Feb 1;188(3):1178–90.
- Fu Y, Ding Y, Zhou T, Ou Q, Xu W. Comparative histopathology of mice infected with the 17XL and 17XNL strains of *Plasmodium yoelii*. *J Parasitol.* 2012 Apr;98(2):310–5.
- Fudala R, Krupa A, Matthay MA, Allen TC, Kurdowska AK. Anti-IL-8 autoantibody:IL-8 immune complexes suppress spontaneous apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Aug;293(2):L364–74.
- Galani V, Tatsaki E, Bai M, Kitsoulis P, Lekka M, Nakos G, et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. *Pathol Res Pract.* Elsevier; 2010 Mar 15;206(3):145–50.
- Gene T, Consortium O. The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D440–4.
- Gera C, Dhanoa J. Vivax-induced ARDS: report of two cases. *J Assoc Physicians India.* 2010 Jan;58(January):48–50.
- Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY).* 2005 Oct;34(9):39–43.
- Gomes AP, Vitorino RR, Costa A de P, Mendonça EG de, Oliveira MG de A, Siqueira-Batista R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011 Sep;23(3):358–69.
- Good MF, Doolan DL. Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity.* Elsevier Inc.; 2010 Oct 29;33(4):555–66.
- Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol.* 2005 Jan;23:69–99.
- Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay M a. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Dec;14(6):523–35.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953–64.
- Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest.* 2008 Apr;118(4):1266–76.
- Grivicich I, Regner A, Rocha AB da. Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53(3):335–43.
- Guinee D, Brambilla E, Fleming M, Hayashi T, Rahn M, Koss M, et al. The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage. *Am J Pathol.* 1997 Oct;151(4):999–1007.
- Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):297–316.

- Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, et al. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J Exp Med*. 2009 Nov 23;206(12):2593–601.
- Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, et al. Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *JAMA*. 2010 Feb 17;303(7):638–47.
- Hay SI, Okiro E a, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra C a, et al. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Med*. 2010 Jun;7(6):e1000290.
- Haydoura S, Mazboudi O, Charafeddine K, Bouakl I, Baban T a, Taher AT, et al. Transfusion-related *Plasmodium ovale* malaria complicated by acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a non-endemic country. *Parasitol Int*. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Jan;60(1):114–6.
- Hee L, Dinudom A, Mitchell AJ, Grau GE, Cook DI, Hunt NH, et al. Reduced activity of the epithelial sodium channel in malaria-induced pulmonary oedema in mice. *Int J Parasitol*. Australian Society for Parasitology Inc.; 2011 Jan;41(1):81–8.
- De Heer HJ, Hammad H, Kool M, Lambrecht BN. Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Semin Immunol*. 2005 Aug;17(4):295–303.
- De Heer HJ, Hammad H, Soullié T, Hijdra D, Vos N, Willart M a M, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med*. 2004 Jul 5;200(1):89–98.
- Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malar J*. *Malaria Journal*; 2013 Jan;12(1):232.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770–6.
- Hengel RL, Thaker V, Pavlick M V., Metcalf J a., Dennis G, Yang J, et al. Cutting Edge: L-Selectin (CD62L) Expression Distinguishes Small Resting Memory CD4+ T Cells That Preferentially Respond to Recall Antigen. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):28–32.
- Hisaeda H, Yasutomo K, Himeno K. Malaria: immune evasion by parasites. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Apr;37(4):700–6.
- Hogan RJ, Zhong W, Usherwood EJ, Cookenham T, Roberts a D, Woodland DL. Protection from respiratory virus infections can be mediated by antigen-specific CD4(+) T cells that persist in the lungs. *J Exp Med*. 2001 Apr 16;193(8):981–6.
- Israël-Assayag E, Dakhama a, Lavigne S, Laviolette M, Cormier Y. Expression of costimulatory molecules on alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Jun;159(6):1830–4.
- Janssen YM, Soultanakis R, Steece K, Heerdt E, Singh RJ, Joseph J, et al. Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations, apoptosis, and oxidative stress in pulmonary cells. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):L1100–9.



- Johnston LK, Rims CR, Gill SE, McGuire JK, Manicone AM. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Oct;47(4):417–26.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D277–80.
- Kangelaris KN, Calfee CS, May AK, Zhuo H, Matthay M a, Ware LB. Is there still a role for the lung injury score in the era of the Berlin definition ARDS? *Ann Intensive Care*. *Annals of Intensive Care*; 2014 Jan;4(1):4.
- Kawashima H, Fukuda M. Sulfated glycans control lymphocyte homing. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Apr;1253:112–21.
- Kiszewski AE, Teklehaimanot A. A review of the clinical and epidemiologic burdens of epidemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Aug;71(2 Suppl):128–35.
- Kitamura Y, Hatanaka K, Murakami M, Shibata H. Presence of mast cell precursors in peripheral blood of mice demonstrated by parabiosis. *Blood*. 1979 Jun;53(6):1085–8.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005 May;77(5):598–625.
- Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris N a, Pater J, et al. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 15;167(2):171–9.
- Kobayashi F, Ishida H, Matsui T, Tsuji M. Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN-gamma monoclonal antibody on the host defense mechanism against *Plasmodium yoelii* yoelii infection. *J Vet Med Sci*. 2000 Jun;62(6):583–7.
- Kolliputi N, Waxman AB. IL-6 cytoprotection in hyperoxic acute lung injury occurs via PI3K/Akt-mediated Bax phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Jul;297(1):L6–16.
- Lacerda MVG, Mourão MPG, Alexandre M a a, Siqueira AM, Magalhães BML, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J*. 2012 Jan;11:12.
- Landsman L, Jung S. Lung Macrophages Serve as Obligatory Intermediate between Blood Monocytes and Alveolar Macrophages. *J Immunol*. 2007a Sep 4;179(6):3488–94.
- Landsman L, Jung S. Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol*. 2007b Sep 15;179(6):3488–94.
- Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas A-M, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*. 2008 Jul;9(7):725–32.
- Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR, Laskin JD. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011 Jan;51:267–88.

- Lau Y-L, Lee W-C, Tan L-H, Kamarulzaman A, Syed Omar SF, Fong M-Y, et al. Acute respiratory distress syndrome and acute renal failure from *Plasmodium ovale* infection with fatal outcome. *Malar J. Malaria Journal*; 2013 Jan;12(1):389.
- Lee EY, Maguire JH. Acute pulmonary edema complicating ovale malaria. *Clin Infect Dis*. 1999 Sep;29(3):697–8.
- Lee KS, Choi YH, Kim YS, Baik SH, Oh YJ, Sheen SS, et al. Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from ARDS patients with regard to apoptosis. *Respir Med*. 2008 Mar;102(3):464–9.
- Leemans JC, Juffermans NP, Florquin S, van Rooijen N, Vervoordeldonk MJ, Verbon a, et al. Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4604–11.
- Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa. *Mucosal Immunol*. 2008 Sep;1(5):350–63.
- Li C, Mannoor K, Inafuku M, Taniguchi T, Inamine Y, Miyazaki T, et al. Protective function of an unconventional  $\gamma\delta$  T cell subset against malaria infection in apoptosis inhibitor deficient mice. *Cell Immunol*. Elsevier Inc.; 2012 Oct;
- Li H, Zhang G-X, Chen Y, Xu H, Fitzgerald DC, Zhao Z, et al. CD11c+CD11b+ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2008 Aug 15;181(4):2483–93.
- Lin KL, Suzuki Y, Nakano H, Ramsburg E, Gunn MD. CCR2+ Monocyte-Derived Dendritic Cells and Exudate Macrophages Produce Influenza-Induced Pulmonary Immune Pathology and Mortality. *J Immunol*. 2008 Feb 4;180(4):2562–72.
- Lindell DM, Ballinger MN, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. Immunologic homeostasis during infection: coexistence of strong pulmonary cell-mediated immunity to secondary *Cryptococcus neoformans* infection while the primary infection still persists at low levels in the lungs. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4652–61.
- Liu F, Li W, Pauluhn J, Trübel H, Wang C. Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats: comparative assessment of intratracheal instillation and aerosol inhalation. *Toxicology*. Elsevier Ireland Ltd; 2013 Feb;304:158–66.
- Liu J, Zhang P-S, Yu Q, Liu L, Yang Y, Qiu H-B. Kinetic and distinct distribution of conventional dendritic cells in the early phase of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Mol Biol Rep*. 2012 Dec 8;39(12):10421–31.
- Lovegrove FE, Gharib S a, Peña-Castillo L, Patel SN, Ruzinski JT, Hughes TR, et al. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathog*. 2008 May;4(5):e1000068.
- Lovegrove FE, Peña-Castillo L, Mohammad N, Liles WC, Hughes TR, Kain KC. Simultaneous host and parasite expression profiling identifies tissue-specific transcriptional programs associated with susceptibility or resistance to experimental cerebral malaria. *BMC Genomics*. 2006 Jan;7:295.

- Luh S, Chiang C. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007 Jan;8(1):60–9.
- Lundie RJ. Antigen presentation in immunity to murine malaria. *Curr Opin Immunol*. Elsevier Ltd; 2011 Feb;23(1):119–23.
- Maglione PJ, Xu J, Chan J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):7222–34.
- Margotto PR. Como fazer e interpretar no SPSS. *Esc Super Ciências da Saúde*. 2010;6.
- Mark D a, Donovan CE, De Sanctis GT, He HZ, Cernadas M, Kobzik L, et al. B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) have complementary roles in mediating allergic pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Mar;22(3):265–71.
- Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28(1-2):51–60.
- Martin TR, Hagimoto N, Nakamura M, Matute-Bello G. Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proc Am Thorac Soc*. 2005 Jan;2(3):214–20.
- Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4 Suppl):S184–8.
- Matthay M a, Zimmerman G a. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Oct;33(4):319–27.
- Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2011 Jan;6:147–63.
- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Sep;295(3):L379–99.
- Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, Nakamura M, Ballman K, Vathanaprida C, et al. Recombinant human Fas ligand induces alveolar epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Aug;281(2):L328–35.
- Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, et al. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2000 Jan;28(1):1–7.
- Matute-Bello G, Martin TR. Science review: apoptosis in acute lung injury. *Crit care*. 2003 Oct;7(5):355–8.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):673–9.

- Mitchell AJ, Hansen AM, Hee L, Helen J, Potter SM, Walker JC, et al. Early Cytokine Production Is Associated with Protection from Murine Cerebral Malaria Early Cytokine Production Is Associated with Protection from Murine Cerebral Malaria. 2005;
- Mittal N, Sanyal SN. Therapeutic Role of Surfactant during Mitochondrial Membrane Mediated Apoptosis in Endotoxin Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Biomed Sci.* 2012 Jan;4(1):60–9.
- Mohan A, Sharma SK, Bollineni S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis.* 2008 Sep;45(3):179–93.
- Moreira AP, Hogaboam CM. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. *J Interf cytokine Res.* 2011 Jun;31(6):485–91.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* Nature Publishing Group; 2008 Dec;8(12):958–69.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science.* 2001 Jan 5;291(5501):141–4.
- Murray PJ, Wynn T a. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* Nature Publishing Group; 2011 Nov;11(11):723–37.
- Nadkar MY, Huchche AM, Singh R, Pazare AR. Clinical profile of severe Plasmodium vivax malaria in a tertiary care centre in Mumbai from June 2010-January 2011. *J Assoc Physicians India.* 2012 Oct;60(June 2010):11–3.
- Naidu B V, Krishnadasan B, Farivar AS, Woolley SM, Thomas R, Van Rooijen N, et al. Early activation of the alveolar macrophage is critical to the development of lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Jul;126(1):200–7.
- Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell.* Elsevier Inc.; 2010 Mar 19;140(6):871–82.
- Nerlich AG, Schraut B, Dittrich S, Jelinek T, Zink AR. Plasmodium falciparum in ancient Egypt. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1317–9.
- Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Vitor RA. *Parasitologia Humana.* 12th ed. São Paulo: Atheneu Rio; 2011. p. 498.
- Newton CR, Taylor TE, Whitten RO. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 May;58(5):673–83.
- Niikura M, Inoue S-I, Kobayashi F. Role of Interleukin-10 in Malaria: Focusing on Coinfection with Lethal and Nonlethal Murine Malaria Parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–8.
- Nitcheu J, Bonduelle O, Combadiere C, Tefit M, Seilhean D, Mazier D, et al. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):2221–8.

- O'Reilly M a, Staversky RJ, Huyck HL, Watkins RH, LoMonaco MB, D'Angio CT, et al. Bcl-2 family gene expression during severe hyperoxia induced lung injury. *Lab Invest.* 2000 Dec;80(12):1845–54.
- Oh J-W, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman CG, et al. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Sep;110(3):460–8.
- Oliveira G a, Kumar KA, Calvo-Calle JM, Othoro C, Altszuler D, Nussenzweig V, et al. Class II-restricted protective immunity induced by malaria sporozoites. *Infect Immun.* 2008 Mar;76(3):1200–6.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010 Jan;9:115.
- Ortolan L. Caracterização da resposta inflamatória frente à lesão pulmonar aguda murina/ síndrome do desconforto agudo associado a malária grave. Universidade Federal de São Paulo; 2013. p. 108.
- Ortolan LS, Sercundes MK, Barboza R, Debone D, Murillo O, Hagen SCF, et al. Predictive Criteria to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated ALI/ARDS in Mice. *Mediators Inflamm.* 2014 Jan;2014:872464.
- Ozturk E, Demirbilek S, Begec Z, Surucu M, Fadillioglu E, Kirimlioglu H, et al. Does leflunomide attenuate the sepsis-induced acute lung injury? *Pediatr Surg Int.* 2008 Aug;24(8):899–905.
- Pamplona A, Hanscheid T, Epiphanyo S, Mota MM, Vigário AM. Cerebral malaria and the hemolysis/methemoglobin/heme hypothesis: shedding new light on an old disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Apr;41(4):711–6.
- Parsey M V, Kaneko D, Shenkar R, Abraham E. Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of IL-1beta. *Clin Immunol.* 1999 May;91(2):219–25.
- Petrache I, Verin AD, Crow MT, Birukova A, Liu F, Garcia JG. Differential effect of MLC kinase in TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis and barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Jun;280(6):L1168–78.
- Porcherie A, Mathieu C, Peronet R, Schneider E, Claver J, Commere P-H, et al. Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *J Exp Med.* 2011 Oct 24;208(11):2225–36.
- Price L, Planche T, Rayner C, Krishna S. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Jul;101(7):655–9.
- Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Nov;4(11):849–56.
- Raghavendran K, Napolitano LM. Definition of ALI/ARDS. *Crit Care Clin.* 2011 Jul;27(3):429–37.

- Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526–33.
- Rénia L, Howland SW, Claser C, Gruner AC, Suwanarusk R, Teo T, et al. Mysteries at the blood-brain barrier. 2012;(April):193–201.
- Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit care*. 2004 Dec;8(6):453–61.
- Rey L. *Parasitologia*. 4th ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2008. p. 888.
- Richardson MP. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood : comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. 1998;187–93.
- Rijt LS, Vos N, Willart M, Kleinjan A, Coyle AJ, Hoogsteden HC, et al. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jul;114(1):166–73.
- Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28(1-2):35–49.
- Roberts a B, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(12):4167–71.
- Ross R. THE RÔLE OF THE MOSQUITO IN THE EVOLUTION OF THE MALARIAL PARASITE. *Lancet*. 1898. p. 488–90.
- Rubin E. Battling For Breath [Internet]. ARDS Fund. 2013 [cited 2014 Jun 15]. Available from: <http://ardsusa.org/category/medical-websites-articles>
- Rufino RIO, Lapa R. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol*. 2006;32(3):241–8.
- Rutella S, Rumi C, Lucia MB, Barberi T, Puggioni PL, Lai M, et al. Induction of CD69 antigen on normal CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets and its relationship with the phenotype of responding T-cells. *Cytometry*. 1999 Jun 15;38(3):95–101.
- S. Frohlich , A. Doolan , N. Murphy , T. Crotty JB. Comparison Of The Accuracy Of The Aecc And Berlin Definitions In Diagnosing Ards. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;2211.
- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser M a, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012 Jan;7(2):e32366.
- Sahu S, Mohanty NK, Rath J, Patnaik SB. Spectrum of malaria complications in an intensive care unit. *Singapore Med J*. 2010 Mar;51(3):226–9.
- Saleri N, Gulletta M, Matteelli A, Caligaris S, Tomasoni LR, Antonini B, et al. Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria in traveler returning from Venezuela. *J Travel Med*. 2006;13(2):112–3.

- Sam H, Stevenson MM. Early IL-12 p70, but not p40, production by splenic macrophages correlates with host resistance to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria. *Clin Exp Immunol*. 1999 Aug;117(2):343–9.
- Sarkar S, Saha K, Das CS. Three cases of ARDS: An emerging complication of *Plasmodium vivax* malaria. *Lung India*. 2010 Jul;27(3):154–7.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*. 1989 Mar;83(3):865–75.
- Savov JD, Gavett SH, Brass DM, Costa DL, Schwartz D a. Neutrophils play a critical role in development of LPS-induced airway disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Nov;283(5):L952–62.
- Schneberger D, Aharonson-Raz K, Singh B. Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):97–106.
- Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep;5(9):722–35.
- Schreiber HA, Harding JS, Hunt O, Altamirano CJ, Hulseberg PD, Stewart D, et al. Inflammatory dendritic cells migrate in and out of transplanted chronic mycobacterial granulomas in mice. *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):3902–13.
- Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás—Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop*. 2004 Mar;90(1):61–4.
- Seitz DH, Perl M, Mangold S, Neddermann A, Braumüller ST, Zhou S, et al. Pulmonary contusion induces alveolar type 2 epithelial cell apoptosis: role of alveolar macrophages and neutrophils. *Shock*. 2008 Nov;30(5):537–44.
- Semple JW, Kim M, Hou J, McVey M, Lee YJ, Tabuchi A, et al. Intravenous immunoglobulin prevents murine antibody-mediated acute lung injury at the level of neutrophil reactive oxygen species (ROS) production. *PLoS One*. 2012 Jan;7(2):e31357.
- Serbina N V, Flynn JL. CD8(+) T cells participate in the memory immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2001 Jul;69(7):4320–8.
- Sher A, Pearce E, Kaye P. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2003 Aug;15(4):421–9.
- Sherman IW. *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington DC: ASM Press; 1998.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2011 Nov;11(11):762–74.
- Shi J-R, Mao L-G, Jiang R-A, Qian Y, Tang H-F, Chen J-Q. Monoammonium glycyrrhizinate inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol*. Elsevier B.V.; 2010 Oct;10(10):1235–41.

- Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell*. 1985 Nov;43(1):277–86.
- Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011 Mar;121(3):985–97.
- Sine C, Belenkiy S, Waters J, Batchinsky A, Cannon J, Aden J, et al. ARDS in burns: application of the Berlin Definition. *Crit Care Med*. 2013 Dec;41(5):A53.
- Singh AP, Buscaglia C a, Wang Q, Levay A, Nussenzweig DR, Walker JR, et al. Plasmodium circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. *Cell*. 2007 Nov 2;131(3):492–504.
- Smedt T, Pajak B, Klaus GG, Noelle RJ, Urbain J, Leo O, et al. Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4476–9.
- Soares MP, Usheva A, Brouard S, Berberat PO, Gunther L, Tobiasch E, et al. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Apr;4(2):321–9.
- Souza AB de, Santos FB dos, Negri EM, Zin WA, Rocco PRM. Lung tissue remodeling in the acute respiratory distress syndrome. *Journal Pneumol*. 2003;29(4):235–45.
- Souza MC, Silva JD, Pádua T a, Capelozzi VL, Rocco PRM, Henriques MDG. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013 Mar 1;186(1):65–72.
- Sponaas A-M, Freitas do Rosario AP, Voisine C, Mastelic B, Thompson J, Koernig S, et al. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood*. 2009 Dec 24;114(27):5522–31.
- Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infect Immun*. 2009 Mar;77(3):1165–74.
- Van den Steen PE, Deroost K, Deckers J, Van Herck E, Struyf S, Opdenakker G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends Parasitol*. Elsevier Ltd; 2013 Jul;29(7):346–58.
- Van den Steen PE, Geurts N, Deroost K, Van Aelst I, Verhenne S, Heremans H, et al. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 May 1;181(9):957–68.
- Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):169–80.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287–90.



- Su Z, Stevenson MM. Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun*. 2000 Aug;68(8):4399–406.
- Sun G-Y, Guan C-X, Zhou Y, Liu Y-P, Li S-F, Zhou H-F, et al. Vasoactive intestinal peptide re-balances TREM-1/TREM-2 ratio in acute lung injury. *Regul Pept*. Elsevier B.V.; 2011 Feb 25;167(1):56–64.
- Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets D a, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4410–7.
- Tan LKK, Yacoub S, Scott S, Bhagani S, Jacobs M. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infect Dis*. 2008 Jul;8(7):449–54.
- Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Apr;294(4):L632–41.
- Taylor WRJ, Hanson J, Turner GDH, White NJ, Dondorp AM. Respiratory manifestations of malaria. *Chest*. 2012 Aug;142(2):492–505.
- Taylor WRJ, White NJ. Malaria and the lung. *Clin Chest Med*. 2002 Jun;23(2):457–68.
- Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Puré E, et al. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science*. 2002 Apr 5;296(5565):155–8.
- Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*. 2008 Jun 17;5(6):e128.
- Torgler R, Bongfen SE, Romero JC, Tardivel a., Thome M, Corradin G. Sporozoite-Mediated Hepatocyte Wounding Limits *Plasmodium* Parasite Development via MyD88-Mediated NF- $\kappa$ B Activation and Inducible NO Synthase Expression. *J Immunol*. 2008 Mar 5;180(6):3990–9.
- Urban BC, Hien TT, Day NP, Phu NH, Roberts R, Pongponratn E, et al. Fatal *Plasmodium falciparum* malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization. *Infect Immun*. 2005 Apr;73(4):1986–94.
- Usynin I, Klotz C, Frevert U. Malaria circumsporozoite protein inhibits the respiratory burst in Kupffer cells. *Cell Microbiol*. 2007 Nov;9(11):2610–28.
- Venet F, Chung C-S, Huang X, Lomas-Neira J, Chen Y, Ayala A. Lymphocytes in the development of lung inflammation: a role for regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in indirect pulmonary lung injury. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3472–80.
- Vigário AM, Belnoue E, Grüner AC, Mauduit M, Kayibanda M, Deschemin J-C, et al. Recombinant human IFN- $\alpha$  inhibits cerebral malaria and reduces parasite burden in mice. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6416–25.
- Villegas-Mendez A, Greig R, Shaw TN, de Souza JB, Gwyer Findlay E, Stumhofer JS, et al. IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8<sup>+</sup> T cell accumulation within the brain. *J Immunol*. 2012 Jul 15;189(2):968–79.

- Vliet AVANDER, Nguyen MAIN, Shigenaga MK, Eiserich JP, Marelich GP, Cross CE, et al. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(3):L537–46.
- Wang L, Medan D, Mercer R, Overmiller D, Leonard S, Castranova V, et al. Vanadium-induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: Role of reactive oxygen species. *J Cell Physiol*. 2003 Apr;195(1):99–107.
- Whitty CJM, Edmonds S, Mutabingwa TK. Malaria in pregnancy. *BJOG*. 2005 Sep;112(9):1189–95.
- WHO. malaria report. World Heal Organ. 2013 Aug 8;296.
- Wilson MR, O'Dea KP, Zhang D, Shearman AD, van Rooijen N, Takata M. Role of lung-marginated monocytes in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 May 15;179(10):914–22.
- World Health Organization. Severe Falciparum Malaria. *R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94.
- Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010 Aug;30(3):245–57.
- Xie K, Yu Y, Huang Y, Zheng L, Li J, Chen H, et al. Molecular hydrogen ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through reducing inflammation and apoptosis. *Shock*. 2012 May;37(5):548–55.
- Yañez DM, Batchelder J, Heyde HC Van Der, Weidanz WP.  $\gamma$   $\delta$  T-Cell Function in Pathogenesis of Cerebral Malaria in Mice Infected with Plasmodium berghei ANKA. 1999;
- Zarbock a, Allegretti M, Ley K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br J Pharmacol*. 2008 Oct;155(3):357–64.
- Zarbock A, Bishop J, Müller H, Schmolke M, Buschmann K, Aken H Van, et al. Chemokine homeostasis vs . chemokine presentation during severe acute lung injury : the other side of the Duffy antigen receptor for chemokines. 2010;(28):462–71.
- Zarling S, Berenzon D, Dalai S, Liepinsh D, Steers N, Krzych U. The survival of memory CD8 T cells that is mediated by IL-15 correlates with sustained protection against malaria. *J Immunol*. 2013 May 15;190(10):5128–41.
- Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, Sharma AK, Zarbock A, Tribble CG, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Nov;291(5):L1018–26.
- Ziegler HK. The role of gamma/delta T cells in immunity to infection and regulation of inflammation. *Immunol Res*. 2004 Jan;29(1-3):293–302.
- Zuzarte-Luis V, Mota MM, Vigário AM. Malaria infections: What and how can mice teach us. *J Immunol Methods*. Elsevier B.V.; 2014 May 14;1–10.

