

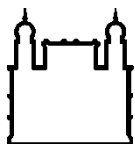
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular

**PAPEL DO EIXO FPR2/ALXR-LIPOXINA A<sub>4</sub> DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA GRAVE EXPERIMENTAL**

**TATIANA ALMEIDA PÁDUA**

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***TATIANA ALMEIDA PÁDUA***

**PAPEL DO EIXO FPR2/ALXR-LIPOXINA A<sub>4</sub> DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA GRAVE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Biologia Celular e  
Molecular

**Orientador (es):** Dra. Maria das Graças M. O. Henriques

Dra. Mariana Conceição de Souza

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2016



Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P125 Pádua, Tatiana Almeida

Papel do eixo FPR2/ALXR-Lipoxina A<sub>4</sub> durante o desenvolvimento da  
Malária grave experimental / Tatiana Almeida Pádua. – Rio de Janeiro,  
2016.

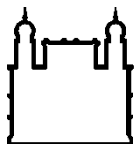
xxiii, 170 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 97-112

1. Malária. 2. Lipoxina A<sub>4</sub>. 3. FPR2/ALXR. 4. *Plasmodium berghei*. I.  
Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: Tatiana Almeida Pádua***

### **PAPEL DO EIXO FPR2/ALXR-LIPOXINA A<sub>4</sub> DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA GRAVE EXPERIMENTAL**

**ORIENTADOR (ES): Dra. Maria das Graças M. O. Henriques**

**Dra. Mariana Conceição de Souza**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

#### **EXAMINADORES:**

Prof. Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins - Presidente (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa (UNICAMP)

Prof. Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo (UERJ)

Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gosmes Silva (UFRJ)

Prof. Dr. Vinícius de Frias Carvalho (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 01 de dezembro de 2016

**Dedico este trabalho aos meus pais Humberto Monteiro Pádua e Maria do Carmo Almeida Pádua que nunca mediram esforços para que eu alcançasse os meus objetivos.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha orientadora e chefe Dra. Maria das Graças M. O. Henriques pela a oportunidade de fazer o doutorado mesmo durante o meu contrato como terceirizada e pela confiança de que eu seria capaz de manter as duas funções durante esses três anos e meio. Além disso, pela atenção, dedicação, orientação e apoio para a conclusão desse trabalho.

Em especial à minha orientadora Dra. Mariana Conceição de Souza pelo incentivo e confiança depositada em mim em relação ao doutorado. E principalmente por demonstrar que o nosso aprendizado é contínuo e que sempre devemos ir além. Obrigada por me tornar uma profissional mais capaz principalmente na área da fisiopatologia da malária.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Humberto pela educação, oportunidades que me deram e um ambiente familiar favorável, que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã, Fabiana por sua compreensão e apoio nas horas em que precisei e pelas palavras animadoras.

Ao meu Noivo Victor pela parceria, amizade, muuuuuita paciência e por sempre me incentivar a continuar buscando os meus objetivos mesmo que os eventuais obstáculos dificultem isso.

A todos meus familiares, em especial: avó Maria (*in memorian*), os tios Geraldo, Lurdes e Rosa e primos Augusto, Dianna e Ana Paula por estarem mais próximos, sempre presentes em minha vida compartilhando momentos bons e ruins.

Ao parceiro de trabalho e amigo Msc. Thadeu Costa e à amiga de uma vida inteira Patrícia Souto por me indicarem ao Laboratório da Farmacologia Aplicada possibilitando o eu inicio na farmacologia.

À Dra. Elaine Cruz Rosas que não participou diretamente na minha orientação durante a tese, porém foi o meu primeiro contato com o grupo da Farmacologia Aplicada. Além disso, pelos conselhos durante esses seis anos de Fiocruz e compressão pelo o tempo escasso para eu dar continuidade aos nossos projetos durante o período do doutorado.

À Dra. Carmen Penido pela boa vontade em nos ajudar com as dúvidas em relação aos mais variados assuntos e pelas opiniões e correções dos meus textos, artigos e apresentações.

A todos os meus amigos da vida que tornaram essa etapa do doutorado muito mais leve através dos momentos de distração, em especial: Janaina, Sylvio, Renata, Juliana Rangel, Juliana Lignani, Vêronica, Liliana, Mariana, Amanda, Vanessa, Valquire, Carol, Rodrigo, Gustavo e Andreza.

Aos meus amigos Dr. Fausto K. Ferraris e Dr. Magaiver A. Silva pelos ensinamentos, discussões científicas, auxílio na bancada e incentivo nos momentos mais desanimadores.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia Aplicada (inclusive aqueles que já não estão trabalhando mais conosco), Dr. André Luís Candéa, Msc. Alexandre Figueiredo, Bianca de Abreu, Msc. Catarina Negreiros, Daniela Pacheco, Daiane dos Santos, Dr. Edward Helal, Érika Cunha, Dr. Fausto Ferraris, Dra. Fátima Vergara, Dr. Fernando Conte, Ingrid Del Castilo, Dra. Juliana Gandelman, Larissa Capeletti, Laysa Barbosa, Dr. Leonardo Seito, Msc. Luana Correa, Dr. Magaiver Andrade, Márcia Rami, Msc. Marcia Vidal, Dra. Maria Fernanda Costa, Maria do Socorro Chagas, Mônica Carvalho, Msc. Natalia Torres, Dr. Otávio Menezes L. Junior, Msc. Perla Villani, Dr. Raghavendra Nulgulmnalli Manjunathiah, Msc. Raquel Ferraz, Dra. Simone Carvalher, Taís Magne, Taíze Duarte, Msc. Thadeu Costa pelos ensinamentos, pelo auxílio na bancada e por diversos bons momentos juntos. Em especial:

À Msc. Marcia Vidal e Maria do Socorro Chagas pelos ensinamentos sobre os procedimentos de rotina do laboratório de Farmacologia Aplicada assim que eu entrei para a equipe.

À Daniela Pacheco por me ensinar os procedimentos cirúrgicos necessários para a coleta dos órgãos para a histologia.

À Erika Cunha pelo auxílio na coleta do material, além dos processamentos e cortes dos tecidos para as análises histológicas.

Ao Dr. Leonardo Seito pela consultoria e auxílio nos ensaios de *Western Blotting*, principalmente no da heme-oxigenase 1.

À Dra. Maria Fernanda de Souza Costa pelas contribuições na minha formação e pelo auxílio nos experimentos que continham citometria de fluxo e imunofluorescência.

Ao Dr. André Luís Peixoto Candéa pela parceria na bancada e pelos ensaios de isolamento de neutrófilos e ensaios com as linhagens de células endoteliais.

Ao Dr. Otávio Menezes de Lima Junior pelas discussões e ideias que possibilitaram o projeto com a Lipoxina A<sub>4</sub> e pelo auxílio nos experimentos iniciais.

A todas as alunas de iniciação científica que fizeram parte do meu crescimento como pesquisadora e ainda contribuem para o meu aprendizado diário na arte de ensinar e orientar: Msc. Luana Correa, Msc. Natália Torres, Daiane dos Santos, Bianca Cruz de Abreu, Mônica Carvalho, Ingrid del Castilo, Suelen de Oliveira, Larissa Capeletti e Laysa Barbosa.

Aos veterinários, Ubirajara de Albertim Ribeiro e André Nunes, além dos técnicos Suelen de Oliveira, Allan, Beatriz Elise e André Sales que fizeram e ainda fazem parte do núcleo de biotério do laboratório de Farmacologia Aplicada por cuidarem e proporcionarem conforto para os animais.

Ao Msc. Marcos Jun do PN4 pelo auxílio no processamento das amostras para a dosagem de Lipoxina A<sub>4</sub> e por sempre estar disponível para nos ajudar.

Às amigas Msc. Janaina Georgii e Dra. Manuella Lanzetti por me possibilitarem a captura das imagens histológicas contidas neste trabalho.

À amiga Dra. Renata Nesi pelo auxílio na interpretação dos dados de função pulmonar contidas neste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica renal sob a coordenação da Dra. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves e do Dr. Celso Caruso Neves do IBCCF na UFRJ, em especial aos Drs. Leandro Silva e João Luiz Silva-Filho pelos experimentos com *P. falciparum*.

Ao Laboratório de Investigação cardiovascular sob a coordenação do Dr. Eduardo Tibiriçá do IOC na Fiocruz, em especial à Dra. Vanessa Estato pelos experimentos com microscopia intravital, com o *Laser Speckle* e pelas explicações e ajuda na interpretação desses resultados.

Ao Laboratório de Investigação Pulmonar sob a coordenação da Dra. Patricia R. M. Rocco do IBCCF na UFRJ, em especial ao Dr. Johnatas Silva pelos experimentos de mecânica ventilatória e pelo auxílio na avaliação da morfometria pulmonar.

Ao Laboratório de Inflamação sob a coordenação da Dra. Patricia M. R. S. Martins e do Dr. Marco Aurélio Martins do IOC na Fiocruz pelos experimentos com os animais AnxA1<sup>-/-</sup>.

Ao Dr. João Alfredo de Moraes Gosmes Silva que foi o revisor deste trabalho. Obrigada por disponibilizar o seu tempo para corrigir o meu texto com atenção e rapidez.

À secretaria da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial à Daniele Lobato e a Julimar Loures da Silva Ferreira pelas informações e auxílio com a documentação necessária tanto para a minha inscrição no doutorado quanto para a defesa.

Ao auxílio financeiro fornecido pelo CNPq, FAPERJ, CAPES e FIOCRUZ.

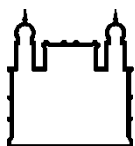
E finalmente, a Deus, por me conceder a saúde necessária para correr atrás dos meus objetivos e desfrutar das oportunidades a mim oferecidas.

Enfim, Muito Obrigada a todos!

*"É preciso que não tenham medo de dizer alguma coisa que possa ser considerada como erro. Porque tudo que é novo, aparece aos olhos antigos como coisa errada. É sempre nesta violação do que é considerado certo, que nasce o novo e há a criação... "*

Mário Schenberg





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

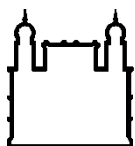
### PAPEL DO EIXO FPR2/ALXR-LIPOXINA A<sub>4</sub> DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA GRAVE EXPERIMENTAL

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Tatiana Almeida Pádua

A malária continua sendo a principal doença parasitária presente em 106 países, com um número estimado de 214 milhões de casos em todo o mundo, levando a 438.000 mortes em 2015. A forma mais grave da doença frequentemente causada pelo *Plasmodium falciparum* é caracterizada por malária cerebral, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e injúria renal aguda. Essas decorrências ocorrem devido ao intenso processo inflamatório sistêmico e local presentes durante a infecção. De fato, alguns autores sugerem que a modulação da resposta inflamatória induzida durante a infecção proporcionaria a melhora dos pacientes. Nesse contexto os mediadores anti-inflamatórios pró-resolutivos como a Lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>), via sinalização do receptor FPR2/ALXR, pode ser uma ferramenta útil para a descoberta de novos tratamentos adjuvantes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da modulação do receptor FPR2/ALXR e da administração de LXA<sub>4</sub> durante a fisiopatologia da malária grave pela infecção por *P. berghei* ANKA. Nossos resultados mostram que o bloqueio dos receptores FPR2/ALXR pelo seu antagonista, o BOC-2, em camundongos Balb/C (resistentes à malária cerebral), levou a formação de edema cerebral e acúmulo de linfócitos e hemácias parasitadas na microvasculatura cerebral. Já o tratamento com LXA<sub>4</sub> protegeu camundongos C57BL/6 da malária cerebral induzida pela infecção com *P. berghei* ANKA de forma independente da ativação de linfócitos. No entanto, a LXA<sub>4</sub> atua no endotélio cerebral aumentando a densidade de capilares funcionais, diminuindo a expressão de ICAM-1 e aumentando a expressão de HO-1 tanto no tecido cerebral quanto em células endoteliais in vitro. Além disso, o tratamento com LXA<sub>4</sub> nesses animais também diminuiu o edema pulmonar e o influxo de neutrófilos para o pulmão, melhorando assim a função desse órgão. Vimos, ainda, que a LXA<sub>4</sub> atua diretamente sobre neutrófilos da medula impedindo sua motilidade através da inibição do remodelamento do citoesqueleto. Esses resultados apontam para a importância da participação dos agonistas anti-inflamatórios do receptor FPR2/ALXR durante o desenvolvimento da malária grave experimental.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### THE ROLE OF FPR2 / ALXR-LIPOXIN A4 AXIS DURING THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL SEVERE MALARIA

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

**Tatiana Almeida Pádua**

Malaria remains a major parasitic disease, present in 106 countries with an estimated 214 million cases worldwide leading to 438.000 deaths in 2015. The most severe form of malaria often caused by *Plasmodium falciparum* is characterized by cerebral malaria, acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute kidney injury. These diseases are due to an intense systemic or local inflammatory process that occurs during infection. In fact, some authors suggest that the modulation of inflammatory response during infection would provide the outcome of patients. In this context anti-inflammatory and pro-resolutive mediators like Lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) that acts through FPR2/ALXR receptor, may be an useful tool for discovering new adjuvant therapies. Thus the aim of this study was to evaluate the FPR2/ALXR receptor modulation and LXA<sub>4</sub> administration effect during the pathophysiology of severe malaria by *P. berghei* ANKA infection. Our results showed that blocking FPR2 / ALXR receptor by its antagonist, BOC-2 in Balb/C mice (resistant to cerebral malaria), led to formation of cerebral edema and accumulation of lymphocytes and parasitized red blood cells in the cerebral microvasculature. As well, the treatment with LXA<sub>4</sub> protected C57BL/6 mice from *P. berghei* ANKA-induced cerebral malaria in an independent way of lymphocytes activation. Instead, LXA<sub>4</sub> increased functional capillary density of brain endothelium, reduced ICAM-1 expression and increased HO-1 expression in both brain tissue and in endothelial cells *in vitro*. Furthermore, the treatment with LXA<sub>4</sub> in these animals also decreases the pulmonary edema and the neutrophils influx into lungs, thereby improving this organ function. We further observed that LXA<sub>4</sub> directly impairs neutrophil motility by inhibiting neutrophils cytoskeletal remodeling. These results point to the importance of the participation of anti-inflammatory agonists of FPR2/ALXR receptor during the development of experimental severe malaria.

## ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Malária</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 <i>Histórico e desenvolvimento de políticas antimaláricas</i>	1
1.1.2 <i>Dados Epidemiológicos</i>	3
1.1.3 <i><u>Plasmodium spp</u> e o desenvolvimento da patogênese da malária</i>	3
1.1.4 <i>Malária grave</i>	7
1.1.5 <i>Malária cerebr</i>	10
1.1.6 <i>Síndrome do desconforto respiratório agudo induzida pela malária (M-SDRA)</i>	12
1.1.7 <i>Resposta inflamatória induzida pela malária como alvo terapêutico</i>	14
<b>1.2 Mediadores lipídicos anti-inflamatórios</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 <i>Receptores FPRs</i>	15
1.2.2 <i>Lipoxinas</i>	17
1.2.3 <i>Lipoxinas como tratamento adjuvante de doenças infecciosas</i>	19
<b>1.3 Justificativa</b> .....	<b>20</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Aspectos éticos</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Animais</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3 Materiais</b> .....	<b>22</b>
<b>3.4 Infecção por <i>P. berghei</i> ANKA</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5 Tratamentos</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6 Sobrevida</b> .....	<b>25</b>

3.7	Avaliação da quebra das barreiras hemato-encefálicas e hemato-alveolar .....	25
3.8	Testes Comportamentais (SHIRPA) .....	26
3.9	Quantificação de citocinas e mediadores lipídicos .....	27
3.10	Microscopia intravital cerebral com epi-iluminação e fluorescência .....	29
3.11	Análise morfológicas do cérebro .....	30
3.12	<i>Laser Speckle Contrast Imaging</i> .....	30
3.13	Isolamento de mononucleares cerebrais e esplênicos .....	31
3.14	Preparação de suspensão celular para aplicação em citometria de fluxo .....	31
3.15	Estimulação in vitro de células endoteliais .....	32
3.16	<i>Western Blotting</i> .....	33
3.17	Imunocitoquímica .....	34
3.18	Ensaio de citoaderência .....	34
3.19	Mecânica ventilatória .....	34
3.20	Análises morfométricas do tecido pulmonar .....	36
3.21	Contagem de leucócitos periféricos .....	36
3.22	Isolamento de neutrófilos .....	36
3.23	Ensaio de quimiotaxia e quimiotaxia .....	37
3.24	Ensaio de polimerização do citoesqueleto de actina .....	38
3.25	Análise estatística .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	Comparação entre a suscetibilidade e tolerância à infecção por <i>P. berghei</i> ANKA.....	39
4.2	Papel dos mediadores anti-inflamatórios endógenos na resistência ao desenvolvimento da malária cerebral.....	42
4.2.1	<i>Avaliação do tratamento com o BOC-2 durante o desenvolvimento da malária cerebral induzida por P.berghei ANKA.</i> .....	42
4.2.2	<i>Efeito do tratamento com BOC-2 na disfunção da microvasculatura do córtex cerebral</i> .....	45

4.2.3	Efeito do tratamento com BOC-2 no fluxo microvascular do córtex cerebral de camundongos resistentes à malária cerebral	48
<b>4.3</b>	<b>Avaliação do efeito do pré-tratamento com a LXA4 na malária cerebral induzida por <i>P. berghei</i> ANKA.....</b>	<b>49</b>
4.3.1	<i>Avaliação do tratamento com LXA4 durante o desenvolvimento da malária cerebral induzida por P.berghei ANKA</i>	49
4.3.2	<i>Avaliação do tratamento com LXA4 no acúmulo e ativação de linfócitos durante a malária cerebral</i>	52
4.3.3	<i>Efeito do tratamento com LXA4 na disfunção da microvasculatura do córtex cerebral</i>	56
4.3.4	<i>Avaliação do tratamento com LXA4 na modulação de marcadores de ativação de endotélio cerebral</i>	61
<b>4.4</b>	<b>Efeito da LXA4 exógena na M-SDRA induzida por <i>P. berghei</i> ANKA.....</b>	<b>67</b>
4.4.1	<i>Avaliação do tratamento com LXA4 na disfunção pulmonar durante a malária grave induzida por P. berghei ANKA</i>	67
4.4.2	<i>Efeito anti-inflamatório sistêmico da LXA4 durante a malária grave</i>	71
4.4.3	<i>Avaliação do tratamento com LXA4 em neutrófilos de medula óssea durante a malária grave</i>	73
4.4.4	<i>Efeito da LXA4 no egresso dos neutrófilos medulares durante a malária grave</i>	77
4.4.5	<i>Mecanismo de ação da LXA4 sobre a inibição da migração dos neutrófilos medulares durante a malária grave</i>	82
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>96</b>
6.1	<b>Conclusões Parciais .....</b>	<b>96</b>
6.2	<b>Conclusão Geral.....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>113</b>

<b>8.1 ANEXO 1 - Publicações relacionadas ao assunto da tese (2013-2016)</b> .....	<b>113</b>
<b>8.2 ANEXO 2 - Publicações durante o período do Doutorado (2013-2016)</b> .....	<b>169</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b>	Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i> ....	5
<b>Figura 1.2.</b>	Barreira hemato-encefálica antes e durante a malária cerebral....	11
<b>Figura 1.3.</b>	Barreira hemato-alveolar antes e durante a M-SDRA.....	13
<b>Figura 1.4.</b>	Ações das terapias adjuvantes durante a malária grave.....	14
<b>Figura 1.5.</b>	Vias de geração das lipoxinas e das ATLS.....	18
<b>Figura 4.1.</b>	Comparação entre a linhagem suscetível C57BL/6 e a resistente Balb/C quanto ao desenvolvimento da malária grave.....	41
<b>Figura 4.2.</b>	Avaliação do tratamento com BOC-2 durante a infecção por <i>P. berghei</i> ANKA em camundongos Balb/C.....	43
<b>Figura 4.3.</b>	Avaliação do tratamento com BOC-2 na produção de citocinas no tecido cerebral de camundongos Balb/C durante a infecção por <i>PbA</i> .....	44
<b>Figura 4.4.</b>	Avaliação do tratamento com BOC-2 na aderência de leucócitos e hemácias na microvasculatura do córtex cerebral.....	46
<b>Figura 4.5.</b>	Avaliação do tratamento com BOC-2 na oclusão da microvasculatura do córtex cerebral .....	47
<b>Figura 4.6.</b>	Avaliação do tratamento com BOC-2 fluxo microvascular do córtex cerebral.....	48
<b>Figura 4.7.</b>	Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> durante a infecção por <i>P. berghei</i> ANKA em camundongos C57BL/6.....	50
<b>Figura 4.8.</b>	Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> na produção de citocinas no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 durante a infecção por <i>PbA</i> .....	51
<b>Figura 4.9.</b>	Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> no acúmulo de linfócitos T CD8+ no cérebro de animais infectados com <i>PbA</i> .....	53
<b>Figura 4.10.</b>	Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> no acúmulo de linfócitos T CD3+ no baço de animais infectados com <i>PbA</i> .....	54
<b>Figura 4.11.</b>	Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> no acúmulo de linfócitos T CD8+ no baço de animais infectados com <i>PbA</i> .....	55
<b>Figura 4.12.</b>	Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> na aderência de leucócitos e hemácias na microvasculatura do córtex cerebral.....	58
<b>Figura 4.13.</b>	Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> oclusão da microvasculatura	

do córtex cerebral.....	59
<b>Figura 4.14.</b> Efeito do tratamento com LXA <sub>4</sub> na resposta vascular à acetilcolina (Ach) durante a malária cerebral.....	60
<b>Figura 4.15.</b> Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> na modulação da expressão de marcadores de ativação endotelial durante a malária cerebral.....	63
<b>Figura 4.16.</b> Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> na modulação da expressão de marcadores de ativação endotelial murina <i>in vitro</i> .....	64
<b>Figura 4.17.</b> Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> na modulação da expressão de marcadores de ativação endotelial humana <i>in vitro</i> .....	65
<b>Figura 4.18.</b> Efeito do tratamento com LXA <sub>4</sub> na citoaderência <i>in vitro</i> .....	66
<b>Figura 4.19.</b> Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> durante o desenvolvimento da disfunção pulmonar induzido pela infecção por <i>P. berghei</i> ANKA em camundongos C57BL/6.....	68
<b>Figura 4.20.</b> Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> na morfologia pulmonar durante a malária grave induzida pela infecção por <i>P. berghei</i> ANKA em camundongos C57BL/6.....	69
<b>Figura 4.21.</b> Efeito do tratamento com LXA <sub>4</sub> na produção de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 durante a infecção por <i>PbA</i> .....	70
<b>Figura 4.22.</b> Efeito anti-inflamatório sistêmico da LXA <sub>4</sub> durante a malária grave de camundongos C57BL/6 durante a infecção por <i>PbA</i> .....	72
<b>Figura 4.23.</b> Efeito do tratamento com a LXA <sub>4</sub> na produção sistêmica de quimiotáticos durante a malária grave em camundongos C57BL/6.....	73
<b>Figura 4.24.</b> Efeito da LXA <sub>4</sub> na modulação de fatores relacionados com a quimioatração nos neutrófilos de camundongos C57BL/6 durante a malária grave.....	75
<b>Figura 4.25.</b> Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> na maturação de neutrófilos da medula óssea de animais infectados por <i>P. berghei</i> ANKA.....	76
<b>Figura 4.26.</b> Avaliação do tratamento com LXA <sub>4</sub> na apoptose de neutrófilos da medula óssea de animais infectados por <i>P. berghei</i> ANKA.....	77



<b>Figura 4.27.</b> Efeito do tratamento com a LXA <sub>4</sub> no egresso dos neutrófilos medulares durante a malária grave em camundongos C57BL/6....	79
<b>Figura 4.28.</b> Efeito do análogo 15-epi-LXA <sub>4</sub> no egresso dos neutrófilos medulares de camundongos infectados por <i>P. berghei</i> ANKA.....	80
<b>Figura 4.29.</b> Efeito direto da LXA <sub>4</sub> na capacidade migratória dos neutrófilos da medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados por <i>P. berghei</i> .....	81
<b>Figura 4.30.</b> Mecanismo de ação da LXA <sub>4</sub> na inibição da capacidade migratória dos neutrófilos medulares de camundongos C57BL/6 durante a malária grave.....	83
<b>Figura 5.1.</b> Avaliação da ausência de anexina A1 durante o desenvolvimento da malária grave em camundongos Balb/C.....	87
<b>Figura 5.2.</b> Avaliação do tratamento com BOC-2 no acúmulo de linfócitos TCD3+ e TCD8+ no baço de animais infectados com <i>PbA</i> .....	88
<b>Figura 5.3.</b> Avaliação do tratamento com RvD1 durante a infecção por <i>P. berghei</i> ANKA em camundongos C57BL/6.....	90

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AnxA1	Anexina A1
Ang	Angiopietina
AP-1	Proteína ativadora-1 (do inglês, <i>Activator protein-1</i> )
APS	Persulfato de amônio (do inglês, <i>Ammonium persulfate</i> )
ATLs	Lipoxinas desencadeadas pela aspirina (do inglês, <i>aspirin-triggered lipoxins</i> )
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês, <i>Bovine serum albumin</i> )
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIDR	Regiões interdomínios ricas em cisteína (do inglês, <i>cysteine-rich interdomain region</i> )
CO2	Ciclooxigenase-2
CR1	Receptor de complemento do tipo 1 (do inglês, <i>Complement Receptor</i> )
CSA	Condroitina sulfato A
CXCL-1	Ligante de quimiocinas CXC
DBL	Domínios semelhantes aos ligantes de Duffy (do inglês, <i>Duffy Binding-Like domains</i> )
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DHA	Ácido docosahexaenóico
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etileno diamino-tetra acético (do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGF	Fator de crescimento epidermal (do inglês, <i>Epidermal growth factor</i> )
EGTA	Ácido etilendiaminotetracético de etilenoglicol (do inglês, <i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> )
EIA	Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme Immunoassay</i> )
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (Ensaio de imunoabsorção)

	enzimática)
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês, <i>Extracellular signal regulated kinases</i> )
F-actina	Filamentos de actina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
fMLF	formil-metionina-leucina-fenilalanina
FPRs	Receptores formil peptídeo
GPCR	Receptor acoplado à proteína G (do inglês, <i>G-protein coupled receptor</i> )
HBSS	Solução salina balanceada de Hank's (do inglês, <i>Hanks' balanced salt solution</i> )
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-etanosulfônico
IA	Índice de adesão
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1 (do inglês, <i>Intercellular adhesion molecule-1</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
LXA <sub>4</sub>	Lipoxina A <sub>4</sub>
LXB <sub>4</sub>	Lipoxina B <sub>4</sub>
LO	Lipoxigenases
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, <i>Mitogen activated protein kinase</i> )
MCP-1	Proteína quimioatrante de monócitos (do inglês, <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MMP-9	Metaloproteinase 9
M-SDRA	SDRA induzida pela malária
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear-kappa B (do inglês, <i>Nuclear Factor kappa B</i> )
NLR	Receptor do tipo NOD (do inglês, <i>NOD-like receptor</i> )
NLRP3	NLR contendo o domínio de pirina 3 (do inglês, <i>NLR Pyrin Domain</i> )

Containing 3)

NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>Nitric oxide</i> )
NOD	Domínio de ligação de nucleotídeos por oligomerização (do inglês, <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i> )
NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
OPD	Ortofenilenediamina (do inglês, <i>Orthophenylenediamine</i> )
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno (do inglês, <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> )
PBS 1x	Solução salina tamponada com fosfato 1x (do inglês, <i>Phosphate buffer saline</i> )
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária (do inglês, <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> )
PfEMP1	Proteínas de membrana do eritrócito 1 de <i>P. falciparum</i> (do inglês, <i>P. falciparum erythrocyte membrane proteins</i> )
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PI3K/Akt	via fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PPAR-γ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma-γ (do inglês, <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i> )
RANTES	Regulada por Ativação, célula T Normal, Expressa e Secretada (do inglês, <i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i> )
REPC	Receptor de proteína C endotelial (do inglês, <i>activation of endothelial cell protein C receptor-EPCR</i> )
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (do inglês, <i>Reactive nitrogen intermediates</i> )
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive oxygen species</i> )
RvD1	Resolvina D1
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo (do inglês, <i>acute respiratory distress syndrome - ARDS</i> )
SFB	Soro fetal bovino
SPMs	Mediadores pró-resolutivos especializados (do inglês, <i>specialized pro-</i>

	<i>resolving mediators)</i>
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante- $\beta$ (do inglês, <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i> (do inglês, <i>Toll-like receptor</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (do inglês, <i>Tumor necrosis fator <math>\alpha</math></i> )
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular 1 (do inglês, <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> )
WP	Corpúsculos de Weibel-Palade

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Malária

### 1.1.1 Histórico e desenvolvimento de políticas antimaláricas

Malária (*do italiano medieval; mal' aria: maus ares*), também denominada como paludismo (*do latim; palus: pântano*), é uma doença descrita desde 2700 a.C. pelos chineses [revisto por (1)]. Por mais de 2500 anos acreditou-se na ideia que a malária fazia parte de um grupo de doenças causadas por *miasma*, palavra grega que significa “vapor venenoso” ou “névoa contendo partículas de matéria decomposta” [revisto por (2)]. Seguindo essa teoria, Hipócrates discutiu as características das “febres dos pântanos” e baços aumentados dos pacientes que viviam em regiões de terrenos alagados em seu tratado *On Airs, Waters, and Places*, 400 a.C. [revisto por (2)]. A identificação dos microrganismos como causa das doenças infecciosas e o desenvolvimento da teoria dos germes por Louis Pasteur e Robert Koch só ocorreu entre 1878 e 1879, derrubando a teoria do miasma e levando à descoberta do agente etiológico da malária (3). Em 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran observou protozoários de diferentes formas dentro dos eritrócitos dos soldados com malária em missão na Argélia. Estes parasitas foram denominados por ele como *Oscillaria malariae* e assim ficou demonstrado que a malária é causada por um protozoário e não por uma bactéria (3). Durante os anos posteriores (1882-1900), os avanços das técnicas de coloração histológica e dos microscópios permitiram a descoberta de outros protozoários intracelulares. Por volta de 1885, o fisiologista russo chamado Vassily Danilewsky identificou os três parasitas intra-eritrocíticos mais comuns de aves atualmente conhecidos como *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* (3). Em seguida, iniciou-se uma intensa busca por outros parasitas causadores da malária em répteis, aves e mamíferos e então por volta de 1890, após muita controvérsia, era senso comum que a malária era causada por um protozoário que invadia e se multiplicava nos eritrócitos. Viram também que existiam três espécies com periodicidades características, responsáveis pelo quadro terçã benigno (*Haemamoeba vivax*), terçã maligno (*Laverania malariae*)

e quartã maligna (*Haemamoeba malariae*) hoje em dia denominadas respectivamente, *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Essa situação foi elegantemente resumida na monografia “*Studi di uno Zoologo Sulla Malaria*” de Giovanni Battista Grassi (2). Em 1918, John Stephens na costa oeste da África descobriu a quarta espécie que se assemelhava com o *P. vivax* descrita como *P. ovale* em 1922 [revisto em (2, 3)]. No mesmo período, Ronald Ross observou que mosquitos alimentados com sangue de aves com malária apresentavam o parasita nas suas glândulas salivares (2). Simultaneamente, cientistas italianos como, por exemplo, Giovanni Battista Grassi identificaram o mosquito anófeles (*do Grego; anofelís: bom para nada*) como o vetor para a malária humana (2). Atualmente, sabe-se que existem cerca de 400 espécies diferentes de mosquitos anófeles, porém apenas 30 destes são vetores de grande importância para a transmissão da malária (3).

No Brasil, a malária foi introduzida por volta de 1560 durante a colonização portuguesa com o tráfico de escravos africanos e foi primeiramente descrita em 1587 como febres terçã e quartã que acometiam os índios Tupinambás [revisto por (4)]. Por volta de 1900, com o desenvolvimento das ferrovias e da indústria da borracha, a malária chegou a acometer cerca de 6 milhões pessoas, o que representava naquela época, 50% da população do Brasil (5). Nesse período apareceram as primeiras iniciativas para o controle da malária (6). Expedições comandadas por Oswaldo Cruz, Carlos Chagas e Arthur Neiva iam até áreas endêmicas com o objetivo de implementar métodos preventivos e terapêuticos inspirados em Ronald Ross. Os métodos ofensivos incluíam o uso de larvicidas para a eliminação do mosquito e os métodos defensivos o uso de quinina pelos trabalhadores como medida profilática (4). Desta forma, em 1920 foi criado pelo governo o Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP) e mais tarde, em 1957, a campanha de erradicação da malária (CEM) que promoveram ações visando o controle contínuo da malária (4, 7). Algumas ações foram promissoras nesse período, como a conscientização da população sobre o seu importante papel no controle desta doença. Outras diretrizes não foram tão eficazes, como o uso indiscriminado do diclorodifeniltricloroetano (DDT) e a adição de cloroquina no sal de cozinha (Método de Pinotti), que aceleraram os casos de resistência do parasita (8). Entretanto, apesar da contínua preocupação com o controle e a eliminação da malária, mudanças no cenário histórico/econômico prolongam a existência dessa

doença em território brasileiro (6). Ao longo da história do Brasil, diversas alterações políticas e os períodos críticos para a economia prejudicam o desenvolvimento das medidas de saúde pública que visam o controle das doenças negligenciadas como a malária (6). Atualmente o Brasil está inserido dentro do plano de metas de desenvolvimento sustentável das nações unidas que tem como objetivo reduzir 90% dos casos mundiais de malária até 2030 e, eventualmente, a sua eliminação em 35 países (9).

### **1.1.2 Dados Epidemiológicos**

Segundo a Organização Mundial de saúde (OMS), a malária ainda está presente em 106 países e, em apenas no ano de 2015, foram registrados 214 milhões de casos, sendo 88% na África, seguido de 10% no sudeste asiático e de 2% na região do Mediterrâneo Oriental (10). Dentre esses casos, 438.000 foram fatais sendo 306.000 crianças com idade menor do que 5 anos (10). No continente americano, de acordo com a Organização de Saúde Pan-americana (PAHO), a malária ainda é endêmica em 21 países com 389.390 casos confirmados (9). Atualmente no Brasil, apesar do número de casos serem os menores em 35 anos, ainda representa 42% dos casos reportados nas Américas (9). Em 2013, foram reportados 166.689 casos de malária em terras brasileiras (4, 9). A grande maioria desses casos está restrita na área amazônica (99,5%), e os poucos casos que ocorrem fora da região amazônica são em áreas que já foram endêmicas, tais como Piauí e Ceará (4, 6). Apesar da redução dos casos reportados a malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública em países de região tropical como o Brasil e estudos para melhor compreender a fisiopatologia desta infecção assim como propor novos tratamentos se fazem necessários.

### **1.1.3 *Plasmodium spp* e o desenvolvimento da patogênese da malária**

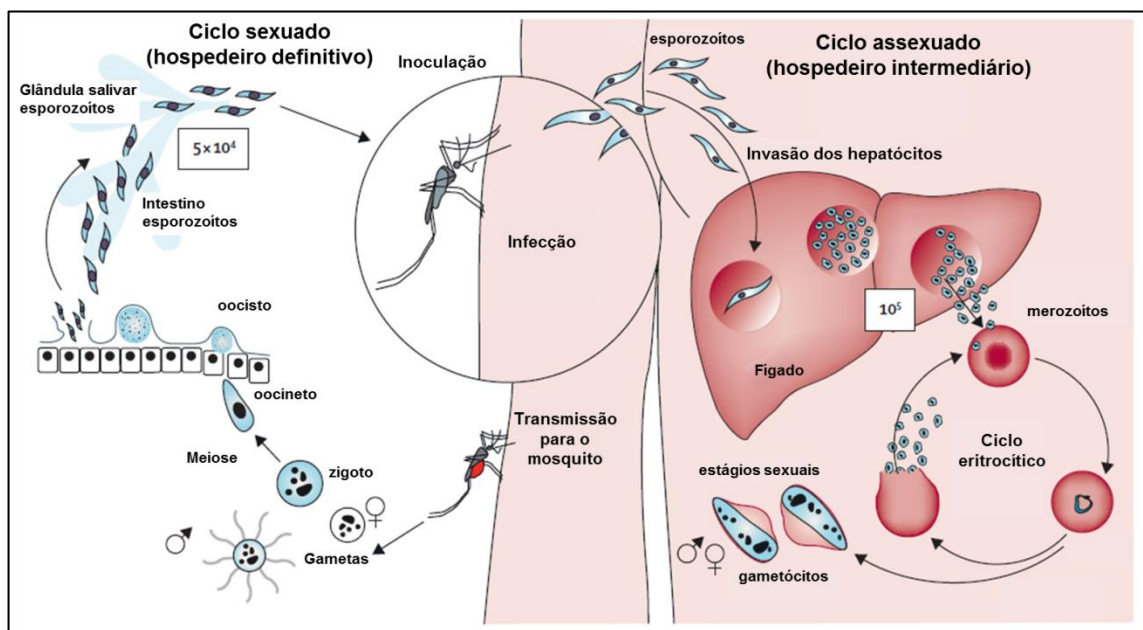
Atualmente são descritas cinco espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium* que causam malária em humanos (11). Em quatro destas, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, a infecção ocorre de homem para homem através do repasto sanguíneo do mosquito fêmea do gênero anófeles. Mais recentemente, uma quinta espécie do gênero *Plasmodium* foi classificada como causadora da doença em humanos. O *P. knowlesi* foi primeiramente identificado a partir de transmissão zoonótica, no entanto atualmente a espécie é transmitida de



humano para humano (12). Além de humanos e primatas não humanos, espécies de *Plasmodium* infectam répteis e aves. Atualmente são descritas 24 espécies de *Plasmodium* que infectam as aves como, por exemplo, *P. relictum* e *P. gallinaceum* (3). A infecção de aves serviu como principal modelo experimental para estudos quimioterápicos para a malária até a descoberta da malária em roedores (3). Já para roedores são descritas quatro espécies de *Plasmodium*, o *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei*, e o *P. yoelii* (13). O *P. berghei* foi descoberto em 1948 em uma espécie de roedor silvestre, *Grammomys surdaster*, e a partir de 1965 passou a ser utilizada em pesquisas científicas assim como o *P. yoelii* após a demonstração de que estas espécies eram capazes de gerar esquizontes no fígado de roedores de laboratório por seus esporozoítos de forma semelhante ao observado durante a infecção por *P. falciparum*. (14, 15). Atualmente, o *P. berghei* ANKA é o mais utilizado em modelos experimentais de malária uma vez que reproduz os sintomas de malária grave (13).

O *Plasmodium spp.* apresenta um ciclo heteroxênico (Figura 1.1), incluindo o ciclo sexuado e assexuado. O primeiro ocorre no mosquito anófeles, o hospedeiro definitivo, e o segundo em um mamífero, o hospedeiro intermediário (11). O ciclo sexuado se inicia quando a fêmea do anofelino durante a sua alimentação hematófaga em um hospedeiro infectado ingere eritrócitos contendo gametócitos do *Plasmodium spp.* Estes gametócitos saem das hemácias, se diferenciam em gametas e se fusionam formando o zigoto no trato gastrointestinal do mosquito (15). O zigoto, por sua vez, se diferencia em oocineto, uma forma móvel que atravessa a parede do estômago e se aloja na membrana basal do tecido estomacal diferenciando-se em oocisto no qual milhares de esporozoítos se desenvolvem (15). Quando maduros esses esporozoítos são então liberados e migram para as glândulas salivares do inseto (15). O ciclo assexuado se inicia durante a próxima alimentação hematófaga em um mamífero saudável em que o mosquito inocula os esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro intermediário (11). Devido ao tropismo do *Plasmodium* pelo tecido hepático, este migra da corrente sanguínea para o fígado. No tecido hepático os esporozoítos passam através de alguns hepatócitos até se alojarem em uma dessas células e se desenvolverem em merozoítos (16). Esta fase denominada de pré-eritrocítica dura aproximadamente 14 dias, e corresponde ao período de incubação da doença (15). Algumas espécies como o *P. vivax* e *P. ovale* evoluem para a forma de hipnozoítos. Estas formas podem ficar em latência durante anos e evoluir para uma recidiva da infecção (15).

Os merozoítos contidos dentro de uma vesícula sólida constituída pela membrana dos hepatócitos denominada merossoma caem na circulação sanguínea dando início ao ciclo eritrocítico (16). Uma vez na circulação sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos e iniciam a sua replicação (que dura 24 horas para a infecção em roedores e 48-72 horas em humanos) resultando na sintomatologia da malária (15). Durante esse processo ocorre a maturação do parasita que passa da forma de trofozoíto jovem (do inglês; *ring form*: forma de anel) para trofozoíto maduro (17). Estes trofozoítos, por sua vez, evoluem para a forma esquizonte, que causa a lise da hemácia infectada, liberando na corrente sanguínea cerca de 16 a 32 merozoítos filhos que irão invadir novas hemácias e recomeçar o ciclo eritrocítico (17). Alguns parasitas dentro das hemácias ainda se diferenciam em gametócitos que serão as formas responsáveis pela sua transmissão a novos mosquitos, iniciando novamente o ciclo sexuado do *Plasmodium spp.* (17).



**Figura 1.1:** Ciclo de vida do *Plasmodium spp.* (adaptado de White, N.J. e colaboradores, 2014).

Os primeiros sintomas da malária são descritos como mal-estar associados a dores de cabeça, fadiga, dores musculares e desconforto abdominal, seguidos por febres irregulares (18). A maioria dos pacientes com malária não complicada apresentam febre, anemia leve e, depois de vários dias, um baço palpável. O fígado também pode tornar-se aumentado, especialmente em crianças pequenas, enquanto

a icterícia leve é mais provável em adultos (11). Também ocorrem frequentemente náuseas, vômitos e hipotensão ortostática. Entretanto, estes sintomas estão associados especificamente à malária por *P. falciparum* que pode evoluir para a forma mais grave da doença (18).

O ciclo eritrocítico do *P. falciparum* apresenta uma particularidade em relação às outras espécies de *Plasmodium* que infectam o homem (16). Os estágios de trofozoíto maduro ou esquizonte do *P. falciparum* na sua maioria expressam na superfície das hemácias infectadas uma família de proteínas altamente variáveis como as proteínas de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum* (PfEMP1). Estas proteínas criam protuberâncias na superfície dos eritrócitos infectados denominadas "knobs" que permitem a sua adesão ao endotélio e a outros eritrócitos (19). A PfEMP1 é o principal ligante relacionado a adesão das hemácias infectadas. Esta família de proteínas é codificada por aproximadamente 60 *var* (*variant antigen*) genes que são transcritos mutuamente através de um mecanismo que permite somente uma ou algumas poucas cópias de genes *var* transcricionalmente ativos de cada genoma (19, 20). Desta forma, o parasita expressa de cada vez uma única versão de PfEMP1 na superfície da hemácia modificando o seu fenótipo adesivo e sua propriedade antigênica constantemente (21, 22). Sua função de ligação ocorre através de estruturas extracelulares semi-conservadas (2-9 domínios) compostos de domínios semelhantes aos ligantes de Duffy (DBL) seguidos de regiões interdomínios ricas em cisteína (CIDR) (21, 22). Estes domínios possuem especificidade a determinados ligantes: o CIDR se liga ao receptor CD36 (presente tanto nas células endoteliais como em plaquetas e em leucócitos) e os DLB $\beta$  (um tipo de domínio DBL) que estão relacionados com a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (22). Entretanto, são descritos outros ligantes para PfEMP1, como a molécula de adesão célula endotelial/plaquetas (PECAM), receptor de proteína C endotelial (REPC), receptor de complemento do tipo 1 (CR1), heparan sulfato e condroitina sulfato A (CSA) (18, 21, 23). De forma geral, esses ligantes permitem a hemácia infectada aderir ao endotélio ou a outras hemácias (parasitada ou não) formando aglomerados de hemácias denominados rosetas. Assim, os eritrócitos infectados ficam retidos na microvasculatura do hospedeiro para maximizar a replicação do parasita e evitar a sua destruição por macrófagos no baço (18, 21, 23).

#### **1.1.4 Malária grave**

Alguns pacientes desenvolvem a malária para a sua forma mais grave. Esta é uma condição sistêmica caracterizada por uma ou mais manifestações clínicas como malária cerebral, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), convulsões, prostração, hemorragias, icterícia e injúria renal aguda que pode levar ao coma e, conseqüentemente, a morte (24, 25). De acordo com a OMS, a malária grave pode evoluir a partir da doença sem complicações devido a diversos fatores, tais como a resposta do hospedeiro, a virulência do parasita, co-morbidades e serviços de saúde deficientes para os pacientes infectados (23, 26). A malária grave costumava ser exclusivamente atribuída à infecção por *P. falciparum*, uma vez que esta sintomatologia está associada à malária cerebral. Entretanto, nos últimos 15 a 20 anos, diversos estudos têm demonstrado sintomas de malária grave sendo atribuídos ao *P. vivax* e ao *P. knowlesi*, o que levou a OMS a adicionar estas espécies como causadoras da malária grave (27). Alguns estudos já descreveram o potencial de citoaderência de hemácias infectadas por *P. vivax* às células endoteliais, sugerindo um mecanismo pelo qual essa espécie causa malária grave (28, 29). Além destas espécies, o *P. malariae* e o *P. ovale* também afetam múltiplos órgãos em crianças e em adultos, entretanto com intensidades diferentes (30-32). A disfunção de múltiplos órgãos observada durante a forma grave da malária é associada a uma resposta inflamatória sistêmica desencadeada por, entre outros fatores, adesão de leucócitos à microvasculatura dos órgãos, hemácias parasitadas obstruindo o fluxo sanguíneo, e a produção exacerbada de mediadores inflamatórios (33, 34). Apesar das diferenças morfológicas e bioquímicas entre as espécies de *Plasmodium*, os mecanismos patogênicos pelo qual a malária grave se desenvolve parecem ser similares.

Além das hemácias parasitadas, outras células estão envolvidas no desenvolvimento da patogênese da malária. Em ambas as fases pré-eritrocíticas e eritrocíticas, os macrófagos e os monócitos são os responsáveis pela produção de citocinas durante a infecção por malária (19). A ativação desses fagócitos pode ser mediada pela ligação do complexo hemozoína/DNA do parasita ao receptor *Toll-like* 9 (TLR-9) e a subsequente ativação da sinalização do inflamossoma (35). A hemozoína, um biocristal resultante da digestão de hemoglobina pelo parasita (19), uma vez liberada durante a lise de eritrócitos infectados na circulação, é fagocitada por monócitos circulantes e macrófagos teciduais. Desta forma, a hemozoína ativa

complexos proteicos intracelulares de inflamossoma desses fagócitos como: NOD-, LRR- e o domínio pirina contendo (NLRP)3 e NLRP12, o que resulta na ativação de caspase 1 e a subsequente liberação de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), eventos que estão associados às febres periódicas da malária (19, 35, 36). Além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , alguns estudos demonstraram que a hemozoína também pode induzir a produção de citocinas imunomodulatórias como a IL-10 que, por sua vez, regula intimamente a produção de IL-12 e RANTES (Regulada por Ativação, célula T Normal, Expressa e Secretada) (37). A presença dessas citocinas e quimiocinas, respectivamente, está diretamente envolvida no desenvolvimento da resposta imunológica durante a malária (38). A ativação das células mononucleares também leva a produção do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-12 pelos neutrófilos. Estas citocinas estimulam células imunes inatas como as células “natural killers” (NK) e linfócitos T  $\gamma\delta$  (incluindo linfócitos T  $\gamma\delta$  NK) a produzir rapidamente interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Como consequência, a IL-12 e o IFN- $\gamma$  ativam os monócitos e os macrófagos levando-os a aumentar a fagocitose de hemácias infectadas (19, 39) e a produzirem espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), com o objetivo de matar o parasita (40). A ativação dos componentes celulares do sistema imune inato, como as células dendríticas, também é importante para o estabelecimento da imunidade adquirida (19). No baço, as células dendríticas apresentam os antígenos do parasita processados às células T “naive” (Th0) e induzem uma resposta pró-inflamatória (Th1), principalmente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$ . Este subtipo de linfócito está envolvido no início da infecção por malária estimulando a diferenciação da resposta para Th1 e subsequentemente, estimulando células B a produzirem anticorpos específicos para eliminarem o parasita (39). Além disso, já foi demonstrado em modelo experimental de malária que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> atuam na fase efetora, contribuindo para as alterações de permeabilidade na barreira hemato-encefálica através de mecanismos dependentes de perforina (41).

As células endoteliais também desempenham um papel crucial na resposta inflamatória durante a malária grave. Na fase eritrocítica, como já foi anteriormente descrito, os leucócitos e linfócitos produzem mediadores inflamatórios solúveis, como o TNF- $\alpha$ , que ativam as células endoteliais (42). Além disso, os eritrócitos infectados também ativam o endotélio por expressar proteínas específicas do parasita como PfEMP1. A ativação endotelial resulta no aumento da expressão de

moléculas de adesão como ICAM-1 (43) e a consequente ativação e adesão de leucócitos à microvasculatura periférica dos órgãos (44). Diversas proteínas têm sido descritas como marcadores inflamatórios da ativação endotelial durante a malária grave. O REPC, por exemplo, amplamente expresso nas células endoteliais e nos leucócitos, funciona como ligante para a família das PfEMP1 (22, 45). O REPC é referenciado como um receptor de membrana associado à sinalização de fatores de coagulação, já que este aumenta a conversão da proteína C para o seu estado ativado, proteína C ativada (PCA). O complexo REPC/PCA possui atividades citoprotetoras endoteliais e anti-inflamatórias que auxiliam na manutenção da integridade vascular (46, 47). Desta forma, a ligação das hemácias infectadas ao REPC impede a formação do complexo REPC/PCA, que pode levar ao sequestro de outras células, à ativação do sistema complemento e à disfunção endotelial (46). Outro importante marcador é a angiopoietina (Ang) que faz parte do eixo Ang-Tie2, descrito como um importante regulador da quiescência, ativação e disfunção endotelial em doenças infecciosas, oncológicas, na aterosclerose e na hipertensão pulmonar (48, 49). Tanto a sinalização da Ang-1 como da Ang-2 em células endoteliais ocorre através do seu receptor Tie-2, uma tirosina quinase com domínios homólogos ao fator de crescimento endotelial (EGF) e às imunoglobulinas (48). A Ang-2 (agonista parcial do receptor Tie2) é liberada pelas células endoteliais e atua de maneira antagônica a resposta de Ang-1 (18). Durante a malária cerebral, a Ang-1 exerce efeitos anti-inflamatórios por diminuir a expressão de moléculas de adesão e manter a integridade da barreira hemato-encefálica reforçando as junções de oclusão VE-caderinas. Por outro lado, a Ang-2 é estocada nos corpúsculos de Weibel-Palade (WP) das células endoteliais que são liberados em resposta a um estímulo inflamatório (48, 49). Em indivíduos saudáveis, o nível basal de Ang-1 é maior do que de Ang-2, enquanto a razão oposta é observada em casos fatais de malária (50). Além disso, altos níveis de Ang-2 também são observados em crianças com malária grave (51).

Entretanto, vale ressaltar que os eventos descritos acima ocorrem em diferentes órgãos com diferentes intensidades. Embora existam poucos exemplos de adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral no desenvolvimento da malária cerebral em humanos (52), a necropsia em casos fatais de malária revela um intenso infiltrado inflamatório no tecido pulmonar (33). As interações entre o endotélio e células inflamatórias no pulmão diferem das interações observadas no cérebro,

provavelmente pelas diferenças morfológicas entre a barreira hemato-encefálica e a barreira hemato-alveolar, como por exemplo, as diferentes composições de junções oclusivas dessas barreiras. As células endoteliais cerebrais expressam menos CD36, apresentam menos cavéolas e são mais ricas em junções de oclusão que as células endoteliais pulmonares (53, 54). Além disso, o endotélio pulmonar é rico em junções aderentes e P-selectinas o que permite a transmigração de leucócitos por vias paracelulares e transcelulares (53, 54).

### **1.1.5 Malária cerebral**

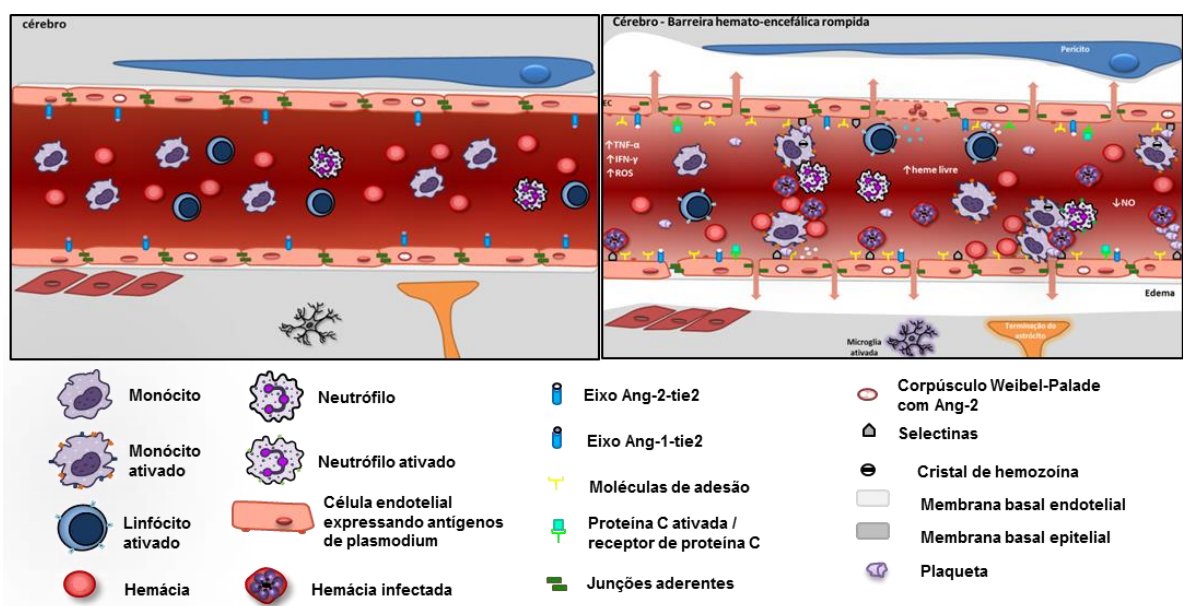
A malária cerebral (MC) é definida ao se identificar a presença do *P. falciparum* no cérebro, convulsões e coma excluindo qualquer outra causa para o coma, como as meningites (55, 56).

A severidade da doença está correlacionada diretamente com o nível de sequestro de eritrócitos parasitados e a porcentagem de vasos obstruídos tanto para adultos como crianças (52, 57-60). No entanto, existem algumas diferenças entre a MC de crianças e de adultos que incluem: anéis hemorrágicos e acúmulo de células inflamatórias mais frequentes na microvasculatura cerebral de crianças (61, 62). Mais recentemente, Taylor e colaboradores (2015) descreveram três diferentes subtipos de malária cerebral: a MC1 que é caracterizada pela presença de hemácias infectadas na microvasculatura cerebral; a MC2 com a presença de hemácias infectadas sequestradas na microvasculatura cerebral e a patologia vascular; e a MC3 que apresenta dano cerebral não relacionado com a patogênese da malária (63). Os mediadores inflamatórios estão presentes na MC1 e na MC2. Como descrito anteriormente, moléculas de adesão e o REPC expresso nas células endoteliais cerebrais induzem a adesão de hemácias infectadas (45). Da mesma forma, durante a MC2, os leucócitos são observados no espaço intravascular e as proteínas plasmáticas são encontradas no tecido cerebral o que denota quebra da barreira hemato-encefálica e, conseqüentemente, edema cerebral (52). Esses estudos demonstram assim a importância do processo inflamatório durante a patogênese da MC.

Apesar desses trabalhos, os mecanismos celulares associados à malária cerebral humana (MCH) não podem ser observados diretamente nos cérebros dos pacientes. A técnica oftalmológica de exame da retina não permite a observação dinâmica dos eventos característicos desta patologia. Além do local exato das

hemácias infectadas, dos leucócitos e das plaquetas individualmente nas vênulas pós-capilares, a oclusão da microvasculatura cerebral e o extravasamento proteico vascular (63). Portanto, para se investigar a patogênese da MC é frequentemente utilizado o modelo de malária cerebral experimental (MCE). Neste modelo a infecção por *P. berghei* ANKA (*PbA*) em camundongos suscetíveis, como os C57BL6 causa sintomatologia semelhante a observada durante a MCH por *P. falciparum* (13, 55). Ambas, MCH e MCE são caracterizadas por vasculopatia severa, com ativação e disfunção endotelial, além de micro hemorragias levando ao comprometimento neurológico (13, 52). Além dessas características, alguns autores sugerem que, assim como as hemácias infectadas pelo *P. falciparum*, as hemácias infectadas com *PbA* também fazem citoaderência, mesmo que passiva, causando lesão cerebral (13, 64, 65). Uma particularidade da MCE é a participação de leucócitos. Monócitos, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e plaquetas aderem nas vênulas pós-capilares cerebrais, no entanto não transmigram para o tecido cerebral do camundongo infectado com *PbA* (66). Isso corrobora com a ideia de que o comprometimento cerebral seja devido à disfunção endotelial induzida por esses leucócitos

De fato, a ativação e disfunção endotelial no cérebro (Figura 1.2) é o ponto crucial para a patogênese da MC e ocorre principalmente nas vênulas pós-capilares cerebrais que são funcionalmente distintas das outras áreas de barreiras hemato-encefálicas e estão em contato direto com o espaço perivascular (56, 62, 67).



**Figura 1.2:** Barreira hemato-encefálica antes e durante a malária cerebral. (adaptado de Souza, M.C. e colaboradores, 2015).



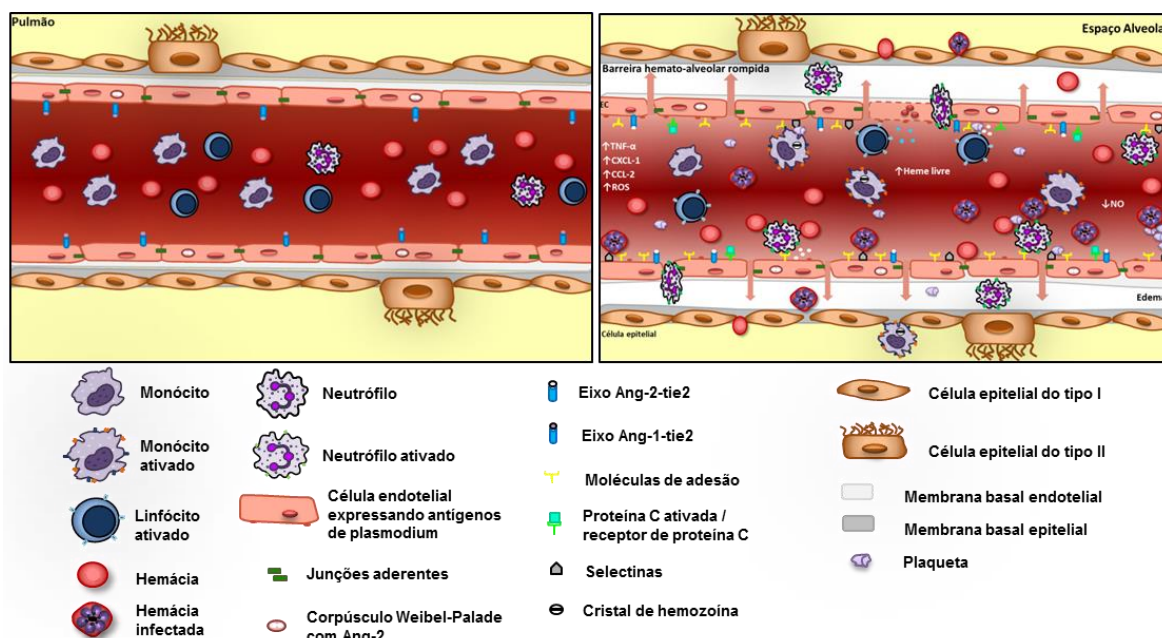
### **1.1.6 Síndrome do desconforto respiratório agudo induzida pela malária (M-SDRA)**

O pulmão é o segundo órgão mais afetado durante a malária grave. A disfunção pulmonar (Figura 1.3) ocorre em 20% de todos os casos de malária grave de adultos causada por *P. falciparum* (68) ou por *P. vivax* (69). Durante a malária grave induzida por *P. knowlesi*, mais de 50% dos pacientes desenvolvem SDRA (68). Porém estes dados epidemiológicos podem estar subestimados uma vez que os métodos para o diagnóstico e a classificação da SDRA foram redefinidos durante a Convenção de Berlim em 2012 (70). Atualmente a SDRA é classificada como leve, moderada ou severa de acordo com a imagem do tórax, a origem do edema, a oxigenação e o tempo da disfunção respiratória (70). Essa síndrome pode ser causada por uma lesão pulmonar direta como infecção pulmonar, aspiração ou contusão pulmonar (71) ou por lesões indiretas como sepse, transfusão sanguínea massiva ou por lesões não pulmonares (72). Histopatologicamente a SDRA é caracterizada por uma inflamação pulmonar desregulada, rica em proteína intersticial e edema alveolar, com consequente aumento da permeabilidade e/ou rompimento da barreira alvéolo-capilar (72). Desta forma, durante a malária grave, a disfunção pulmonar pode ser causada diretamente pela adesão das hemácias infectadas na microvasculatura pulmonar ou indiretamente como consequência da atividade de fatores inflamatórios endoteliais. A análise de casos fatais de malária grave revelou que os pacientes apresentaram sintomas clássicos de SDRA como: edema pulmonar, congestão dos capilares pulmonares, espessamento de alvéolos pulmonares e intenso infiltrado inflamatório no tecido pulmonar (33).

Apesar da MC ser comum em crianças, a SDRA induzida pela malária (M-SDRA) é mais frequentemente observada nos adultos (11). De fato, a patologia observada no tecido pulmonar difere entre adultos e crianças. Poucos casos de pneumonia são observados em crianças (33), enquanto em adultos é frequentemente observado um intenso infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar (30, 33). Milner e colaboradores (2014) sugeriram que a SDRA em crianças é um efeito indireto da malária cerebral que acarreta intensa resposta inflamatória induzindo uma disfunção pulmonar não específica (34). Já foi demonstrado que a resposta inflamatória oriunda de lesão cerebral afeta diretamente o sistema respiratório alterando a permeabilidade vascular e, consequentemente, permitindo o influxo de leucócitos para o parênquima pulmonar

(73). Entretanto, em adultos com malária, a presença de hemácias infectadas provavelmente induz a uma resposta inflamatória local.

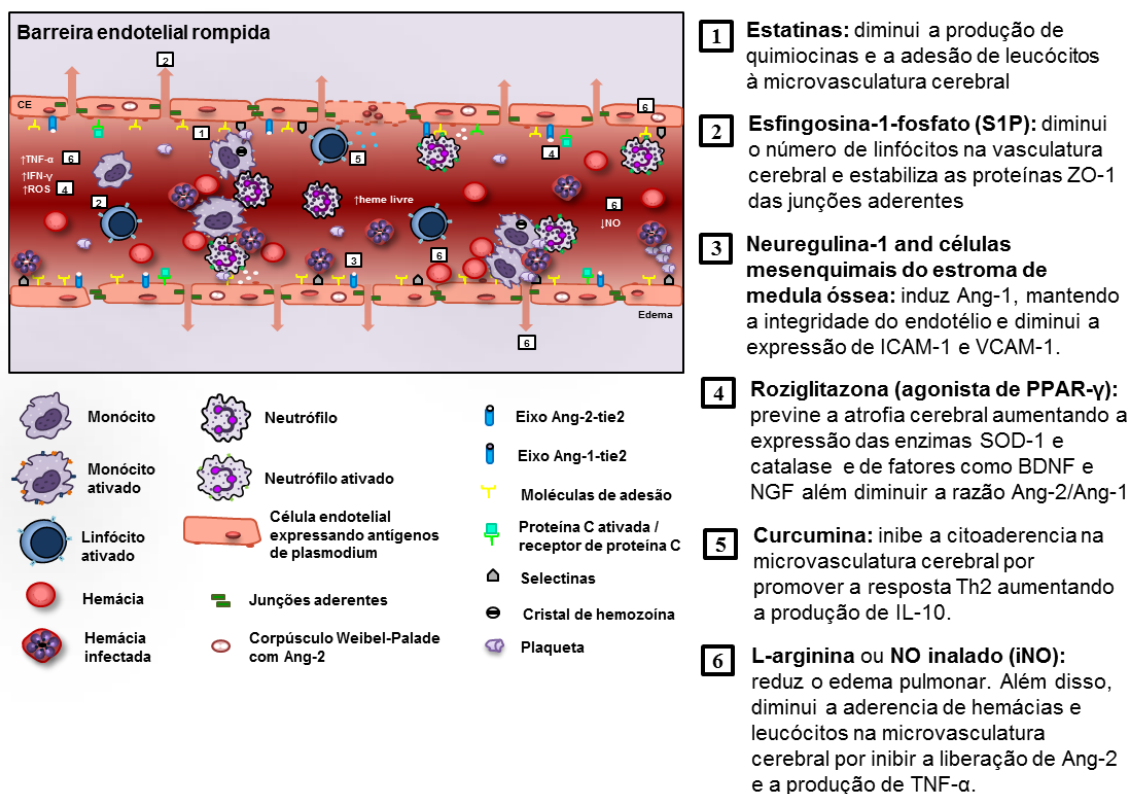
Modelos experimentais de malária grave também apresentam edema pulmonar, infiltrado celular, dano tecidual e disfunção da mecânica pulmonar, características semelhantes às observadas nos pacientes com M-SDRA (74-77). A hemozoína e o contato íntimo entre os eritrócitos parasitados e o endotélio pulmonar desencadeia uma resposta inflamatória apenas 24 horas após a infecção (74). Isto é caracterizado por intenso infiltrado leucocitário, assim como pela produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar, que persiste por pelo menos cinco dias após a infecção (74-76, 78). Além disso, a quantidade dos parasitas nos pulmões define a extensão da produção de quimiocinas como CCL2, CXCL1 e CCL5 as quais estão correlacionadas com o acúmulo de leucócitos no tecido pulmonar (74, 78-80). Diferente do que é observado na patologia cerebral, no infiltrado inflamatório pulmonar ocorre a presença de neutrófilos, além das células mononucleares (75). Nesse contexto, a depleção de neutrófilos impede o desenvolvimento da M-SDRA e prolonga a sobrevivência de camundongos mostrando a importância dos neutrófilos nesse modelo (81).



**Figura 1.3:** Barreira hemato-alveolar antes e durante a M-SDRA. (adaptado de Souza, M.C. e colaboradores, 2015).

### 1.1.7 Resposta inflamatória induzida pela malária como alvo terapêutico

Os dados revisados acima mostram a importância da resposta inflamatória do hospedeiro durante o desenvolvimento e a perpetuação da malária grave. Tem sido mostrado que os padrões moleculares associados ao *Plasmodium*, tanto nas infecções em humanos como em camundongos, desencadeiam respostas inflamatórias sistêmicas e órgão específica. Devido a diferenças anatômicas e fisiológicas, cada órgão desenvolve uma resposta inflamatória particular que culmina na disfunção do órgão em questão. Nos últimos anos diversas terapias direcionadas à resposta do hospedeiro têm sido investigadas para o tratamento da malária e para outras doenças infecciosas (82). Esses trabalhos demonstram que o tratamento com moduladores inflamatórios como terapia adjuvante aos antimaláricos pode melhorar a condição dos pacientes concomitante a resolução da infecção (Figura 1.4).



**Figura 1.4:** Ações das terapias adjuvantes durante a malária grave. (adaptado de Souza, M.C. e colaboradores, 2015).

Pacientes diagnosticados com malária grave têm sido tratados com moduladores da produção de TNF- $\alpha$  (83), de precursores de óxido nítrico (NO) (84, 85) ou da adesão das hemácias infectadas à vasculatura (86) e apresentaram escores inflamatórios diminuídos em comparação com o grupo tratado com placebo.

Na linha da modulação da resposta do hospedeiro concomitante ao antimalárico, diversas abordagens terapêuticas têm sido avaliadas para a melhora durante a malária em modelos experimentais. O tratamento com atorvastatina, constituinte da classe de fármacos que inibem a etapa limitante da síntese de colesterol e apresenta efeitos pleiotrópicos, demonstrou inibir a produção de quimiotáticos tais como eotaxina/CCL11, IL-13, LIX/CXCL5, MIP1 $\beta$ /CCL4 e MIP2 (87), além de diminuir a adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral em animais infectados com PbA (88) provavelmente por inibir a ligação de CD11a em leucócitos (89). Esses fármacos ainda não foram utilizados em testes clínicos como tratamento adjuvante da malária, entretanto diminuíram o risco de morte relacionado à sepse em pacientes (90). O uso do estabilizador de barreira endotelial esfingosina-1-fosfato (S1P) também levou a proteção ao desenvolvimento da malária grave por diminuir a quantidade de linfócitos T CD8+, CD4+ e CD45+ aderidos na vasculatura cerebral, sugerindo diminuição da expressão de ICAM-1 e estabilização das proteínas juncionais ZO-1 nos cérebros de camundongos (91, 92). Além disso, outros tratamentos como a transfecção de células mesenquimais do estroma de medula óssea, a administração de S1P e a administração de neuregulina-1 (outro estabilizador de barreira endotelial) induzem a via anti-inflamatória de Ang-1, a qual mantém a integridade endotelial e reduz a permeabilidade da barreira hematoencefálica (23, 48, 93-96).

## **1.2 Mediadores lipídicos anti-inflamatórios**

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que a resolução da inflamação seria um processo passivo. Atualmente, estudos têm fornecido fortes evidências que a resolução da inflamação é um mecanismo ativo orquestrado por mediadores pró-resolutivos especializados (SPMs) via sinalização de receptores específicos (97). Nesse contexto os mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos como as lipoxinas, anexinas e resolvinas, protectinas e maresinas podem ser um foco de estudo para tratamentos adjuvantes à administração de antimaláricos.

### **1.2.1 Receptores FPRs**

Os SPMs são ligantes da classe de receptores formil peptídeo (FPRs) e seu variante FPRL-1 (*FPR-like 1*) descritos como receptores de quimioatraentes

derivados de patógenos como o formil-metionina-leucina-felnilalanina (fMLF) (98). Esses receptores são amplamente expressos em diversas linhagens celulares como mielóide, epitelial e mesenquimal (99). Dessa forma possuem papel importante na defesa do hospedeiro e no processo inflamatório (100). Os receptores FPR humanos foram definidos bioquimicamente em 1976 como receptores contendo sete domínios transmembranares acoplados à proteína G (GPCRs) apresentando efeitos pleiotrópicos (101) [revisado em (102)]. Isso acontece porque, após a ligação do agonista, as proteínas G inibitórias (Gi) triméricas acopladas ao receptor FPR rapidamente se dissociam em subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$  e levam a fluxos transientes de cálcio, fosforilação da ERK e polarização de membrana favorecendo a quimiotaxia (101).

Em humanos são descritos três tipos de FPRs: FPR1, FPRL1 (ou FPR2/ALXR) e FPR3. Já em camundongos foram descritos até agora oito subtipos (103), sendo mFPR1 ortólogo do receptor FPR1 (com homologia de 77%) e mFPR2-RS1/RS2 ortólogo para o FPR2/ALXR (com homologia de 76%) (97, 104). Esse padrão espelhado pelos genes ortólogos murinos sugerem que essas espécies compartilham os papéis fisiológicos desses receptores (97). De fato, de acordo com Giebeler A. e colaboradores (2014) a deleção de mFPR1 ou de mFPR2-RS1/RS2 está associada à desregulação da resposta inflamatória, com aumento do processo inflamatório e injúria hepática mais severa (105).

O FPR2/ALXR possui 351 aminoácidos e compartilha 69% dos seus aminoácidos com o FPR1 humano (98). É considerado um receptor promíscuo, pois se liga ao fMLF, a ligantes peptídicos não formilados e a ligantes lipídicos. Dada a variedade de ligantes e sua composição bioquímica, a sinalização por FPR2/ALXR pode resultar em efeitos pró-inflamatórios a anti-inflamatório e pró-resolutivos (97, 98). As vias de sinalização ativadas por esse receptor incluem ativação de fosfolipase C (PLC), de isoformas da proteína quinase C (PKC), via fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt), da via das MAPKs, assim como, a fosforilação de tirosinas quinases citosólicas e de fatores de transcrição, liberação de cálcio e produção de oxidantes [revisado em (106)]. Estas vias levam à fagocitose de neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos, estimulam a produção de citocinas imunomodulatórias como IL-10 e do fator de crescimento transformante (TGF) (104). O sétimo domínio transmembranar e as regiões adjacentes do receptor FPR2/ALXR são essenciais para o reconhecimento de ligantes lipídicos, enquanto

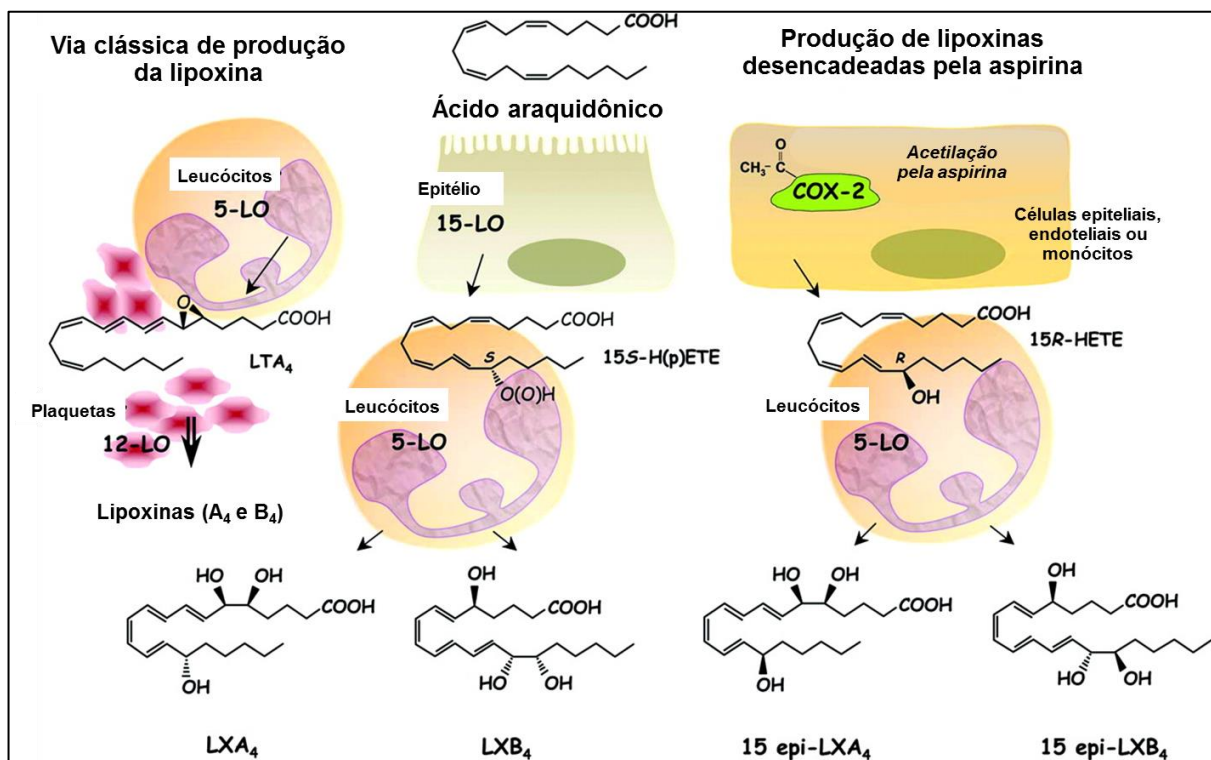
as outras regiões são necessárias para o reconhecimento de ligantes peptídicos de alta afinidade (106). Um dos mecanismos de troca de função do receptor é a N-glicosilação do FPR2/ALXR, que não altera dramaticamente a interação dele com os lipídios, porém diminui significativamente a afinidade por ligantes peptídicos (107). Os agonistas lipídicos de FPR2/ALXR são, em sua maioria, mediadores lipídicos derivados da ação de enzimas sobre o ácido docosahexaenóico (DHA), ácido araquidônico (AA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) (108). Tais mediadores são descritos como anti-inflamatórios por modular negativamente a resposta inflamatória. Por outro lado, também são descritos como pró-resolutivos por estimular uma resposta antagônica à resposta inflamatória, como estimular a apoptose de células inflamatórias e a fagocitose das mesmas (108). Sendo assim a modulação do receptor FPR2/ALXR é um importante alvo terapêutico, pois está envolvido em uma gama de processos biológicos assim como nas doenças patológicas (106).

### **1.2.2 Lipoxinas**

A lipoxina é um eicosanoide natural que foi primeiramente isolado em 1984 por Serhan e colaboradores a partir de leucócitos humanos como um produto oriundo do ácido araquidônico via ação de lipoxigenases (LO) (109). Nesta família estão a lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>, 5S,6R,15S-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E-ácido tetranóico), a lipoxina B<sub>4</sub> (LXB<sub>4</sub>, 5S,14R,15S-trihidroxi-eicosa-6E,8Z,10E,12E-ácido tetranóico) além dos epímeros 15-epi-lipoxinas, também conhecidos como lipoxinas desencadeadas pela aspirina (ATLs) (110, 111). Dentre os agonistas lipídicos do receptor FPR2/ALXR, a LXA<sub>4</sub> é o ligante endógeno de maior afinidade e primeiramente identificado (104). O termo lipoxina foi proposto uma vez que esses trihidroxitetranos surgem rapidamente de interações das vias de sinalização das lipoxigenases de forma autócrina ou parácrina [revisado em (112)].

As lipoxinas são geradas nos locais de inflamação por ações sequenciais das 5 e 12-lipoxigenases ou das 15- e 5-lipoxigenase dependendo do contexto celular (Figura 1.5). A via clássica envolve dois estágios do metabolismo do ácido araquidônico a partir da interação dos leucócitos com plaquetas ou com células epiteliais. Os leucócitos expressam 5-LO, o que é capaz de converter o ácido araquidônico em leucotrieno A<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub> ou em seu isômero LXB<sub>4</sub>. A segunda via envolve a 15-LO das células epiteliais que oxigenam o AA em 15S-ácido hidroxileicosatetranóico. Este metabólito é prontamente captado pelos leucócitos e

convertido pela 5-LO em lipoxinas ativas (113). A terceira forma de sintetizar endogenamente a lipoxina é via acetilação da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) pela aspirina. Estas espécies, as ATLs, mantêm várias características das lipoxinas endógenas induzindo a vasodilatação, síntese de prostaciclina e síntese de óxido nítrico (114, 115).



**Figura 1.5:** Vias de geração das lipoxinas e das ATLs. (adaptado de Nan Chiang e colaboradores, 2006).

Classicamente, a  $LXA_4$  estimula a fagocitose de células apoptóticas pelos macrófagos, processo denominado eferocitose, tanto *in vitro* como *in vivo* através de um mecanismo mediado por PKC e PI3K (100). Entretanto a  $LXA_4$  não ativa os macrófagos de uma maneira clássica (formando o perfil inflamatório M1), mas sim por mecanismos alternativos que resultam em um fenótipo “reparador” não fisiológico com secreções reduzidas citocinas pró-inflamatórias como IL-8, MCP-1 e TGF- $\beta$  [revisado em (99)]. Além disso, a  $LXA_4$  inibe a quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN) enquanto ativa a quimiotaxia de monócitos (100), além de suprimir mecanismos de interação dos leucócitos com as células endoteliais (116). Entretanto vem sendo descrito outros inúmeros efeitos do tratamento com  $LXA_4$  sintética. A  $LXA_4$  tem sido envolvida nos mecanismos citoprotetores das células

endoteliais, por estimular a geração de prostaciclina, NO e heme-oxigenase (HO-1) (99). Trabalhos também demonstram que a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL1 $\beta$ , por inibir fatores de transcrição NF $\kappa$ B e AP1, além da estimulação da produção de IL-10 via ativação de FPR2/ALXR pela LXA<sub>4</sub> em diferentes tecidos (117-119).

### **1.2.3 Lipoxinas como tratamento adjuvante de doenças infecciosas**

Alguns trabalhos têm demonstrado a ação da lipoxina durante o desenvolvimento de doenças infecciosas. Durante infecções virais, como a do vírus Influenza A, ocorre uma regulação negativa de genes envolvidos com ações pró-resolutivas do hospedeiro, dentre elas ações mediadas pelas lipoxinas como tráfego de células inflamatórias e indução de citocinas (120). Além disso, o tratamento de camundongos deficientes em 5-LO com lipoxina e resolvina E1 restaura o fenótipo ativado de macrófagos e melhoram a condição do trato respiratório durante a infecção por vírus respiratório sincicial (RSV) (121).

Em modelos de infecção por microrganismos intracelulares o papel da LXA<sub>4</sub> ainda é controverso (122). Já foi mostrado que a LXA<sub>4</sub> regula negativamente a resposta inflamatória durante a infecção por *Toxoplasma gondii* por controlar a produção de citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$ , contribuindo para o aumento da sobrevivência dos animais infectados (120, 123). Sabe-se que a produção excessiva de citocinas pró-inflamatória é desfavorável para o hospedeiro levando ao quadro de caquexia, dano tecidual e morte prematura (120). Por outro lado, durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* o aumento de citocinas pró-inflamatórias em animais deficientes na enzima 5-LO auxiliou na manutenção da taxa de sobrevivência desses animais (124). Sugere-se que as diferenças nesses dois modelos sejam por diferença de taxas de replicação desses agentes infecciosos e pelo local de biossíntese e das ações da lipoxina, como por exemplo, no cérebro e nos pulmões durante essas infecções (122).

Recentemente, Shryock e colaboradores investigaram o papel da LXA<sub>4</sub> durante a malária. Foi observado que o tratamento com LXA<sub>4</sub> ou com a 15-epi-LXA<sub>4</sub> diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e o acúmulo de linfócitos T CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no tecido cerebral (125). No entanto, não está claro o potencial que estes mediadores anti-inflamatórios possuem no comprometimento dos vários órgãos afetados durante a malária grave.



### 1.3 Justificativa

A Malária é uma das principais doenças parasitárias do mundo e está incluída em planos mundiais de erradicação como: *World Health Assembly Resolution WHA58.2* de 2005 e *The Global Malaria Action Plan for a malaria-free world (GMAP)* de 2008. Segundo a OMS, entre o período de 2000-2015, houve uma redução de 50-75% dos casos reportados e de 60% da sua taxa de mortalidade. Ainda assim, a forma mais grave da malária apresenta alta taxa de mortalidade principalmente entre as crianças acometidas menores de cinco anos. Além disso, são crescentes os casos de resistência aos antimaláricos disponíveis no mercado justificando a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos e terapias complementares. Para isso, estudos sobre a imunopatologia da malária e a identificação de novos alvos terapêuticos são de suma importância para a continuidade desse processo de erradicação da malária.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do eixo FPR2/ALXR-LXA<sub>4</sub> no desenvolvimento da malária grave induzida por *P. berghei* ANKA (*PbA*) em camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Comparar o desenvolvimento da malária grave experimental induzida por *P. berghei* ANKA e o papel da LXA<sub>4</sub> em cepas de camundongos resistentes (Balb/C) e suscetíveis (C57BL/6) à malária cerebral;
- Estudar a participação do receptor FPR2/ALXR no desenvolvimento da malária grave experimental;
- Estudar o efeito da administração de LXA<sub>4</sub> exógena no dano cerebral causado durante a infecção por *P. berghei* ANKA;
- Avaliar o efeito da administração de LXA<sub>4</sub> exógena sobre componentes pulmonares e extrapulmonares que dão origem a síndrome do desconforto respiratório agudo desenvolvida durante a malária grave experimental.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos previstos neste projeto estão licenciados no Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB 342/12) para o uso de OGM (*P. berghei* ANKA-GFP) e na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), licença: L-052/12 sob a responsabilidade da Dra. Mariana Conceição de Souza; na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), licença: L-038/2015 sob a responsabilidade do Dr. Eduardo Vera Tibiriçá; e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ, licença: CEUA-CCS-019, sob a responsabilidade da Dra. Patrícia Rieken Macedo Rocco.

### 3.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 e Balb/C, machos, com idades entre 5 e 6 semanas, fornecidos pelo centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia Aplicada de Farmanguinhos até o momento de uso, com temperatura controlada de 23°C ± 2°C, livre acesso à água e ração e sendo submetidos a ciclos de claro/escuro de 12h.

### 3.3 Materiais

O *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)-GFPcon 259cl2 (*Malaria Research and Reference Reagent Resource center-MR4*, Manassas, VA; depositado por CJ Janse e AP Waters, MR4 number: MRA-865) foi doado pelo Dr. Leonardo Carvalho. Ácido etileno diamino-tetra acético (EDTA), ácido etilenodiaminotetracético de etilenoglicol (EGTA), acrilamida, azul de bromofenol, bisacrilamida, coquetel de inibidores de protease, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), cloreto de potássio (KCl), ditioeritrol (DTT), formamida, corante Azul de Evans, RPMI-1640 (*Roosevelt Park Memorial Institute*), dodecil sulfato de sódio (SDS), fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF), glicerol, ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-etanosulfônico (HEPES), 2-mercaptoetanol, nitrito de sódio, persulfato de amônio (APS), salina

tamponada com fosfato (PBS), HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) trisaminometano (Tris, Trizma<sup>®</sup>), Tween 20, cacodilato de sódio, tiocarbhidrazida (THC), Triton X-100, faloidina Rodamina, albumina sérica bovina (BSA), inibidor de protease e fosfatase foram adquiridos da *Sigma Aldrich* (EUA). DAPI e meio de montagem foram obtidas da *Vector Laboratories* (EUA). Soro fetal bovino (SFB), colagenase, succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) e *Nonidet* (N)P-40 foram adquiridos da *Gibco/Life Technologies* (EUA). Os pares de anticorpos e o mediador recombinante para o ELISA foram adquiridos da *R&D Systems* (EUA). O Kit de EIA para dosagem de LTB<sub>4</sub>, Lipoxin A<sub>4</sub> (5S,6R,15S-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E-ácido tetranóico), 15-epi-LXA<sub>4</sub> foram adquiridos da *Cayman Chemical Company* (EUA). O Kit de EIA para dosagem de LXA<sub>4</sub> foi adquirido através da *Neogen* (EUA). O N-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (BOC-2) foi comprado na *GenScript*, (EUA). *Hyperfilm*, membrana de PVDF *Hybound* e reagente ECL<sup>®</sup> *Plus* (*Enhanced chemiluminescence, Pierce*) foram adquiridos da *Amersham Biosciences* (Reino Unido). Anticorpos policlonais de coelho anti-HO-1 murino e anticorpo conjugado a HRP anti- IgG de coelho foram obtidos da Enzo Life Sciences, Inc. (EUA). Anticorpos monoclonal produzido em camundongo anti-ICAM-1 e conjugado a HRP anti-IgG de camundongo foram obtidos da Santa Cruz *Biotechnologies* (EUA). Os anticorpos monoclonais murinos conjugados a fluorocromos: anti-CD11b/CD18 (FITC); anti-Ly6G (1A8) (PE); anti-CD3 (FITC), anti-CD8 (PerCP), anti-CXCR2 (PerCP/Cy 5.5), anexina V (APC) e anti-ICAM-1 (PE) foram adquiridos de *BD Pharmigen* (EUA). *Isoton* foi obtido da *Coulter* (EUA). O iodeto de propídeo (PI) foi adquirido na *Biolegend* (EUA). Solução de *Giemsa*, *May Grünwald* e Entellan<sup>®</sup> foram adquiridas da Merck (Alemanha). Pentobarbital sódico 3 % (Hypnol<sup>®</sup> - *Synthec*, Brasil), cloridrato de xilazina 2 % (Xilazin<sup>®</sup> - *Synthec*, Brasil) e cloridrato de quetamina 10 % (Cetamin<sup>®</sup> - *Synthec*, Brasil) foram obtidos comercialmente.

### **3.4 Infecção por *P.berghei* ANKA**

Para o estudo da malária cerebral, a infecção de camundongos C57BL/6 e Balb/C foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de  $5 \times 10^6$  hemácias parasitadas com *P.berghei* ANKA-GFP diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x, volume final 200µl) retiradas de um camundongo previamente infectado da mesma linhagem. Os animais não infectados receberam o mesmo volume do veículo

(PBS 1x, 200 µl, i.p.). Para o estudo sobre da M-SDRA a infecção de camundongos C57BL/6 foi induzida pela injeção i.p. de  $1 \times 10^6$  hemácias parasitadas com *P. berghei* ANKA-GFP diluídas em PBS 1x (volume final 200 µl) retiradas de um camundongo previamente infectado da mesma linhagem. Os animais não infectados receberam o mesmo volume do veículo (PBS 1x, 200 µl, i.p.).

Nos tempos indicados, a porcentagem de hemácias infectadas foi examinada por citometria de fluxo (FACSCalibur, Beckton Dickinson - EUA) e esfregaços sanguíneos corados por panótico rápido (Laborclin) foram realizados para a contagem dos leucócitos periféricos.

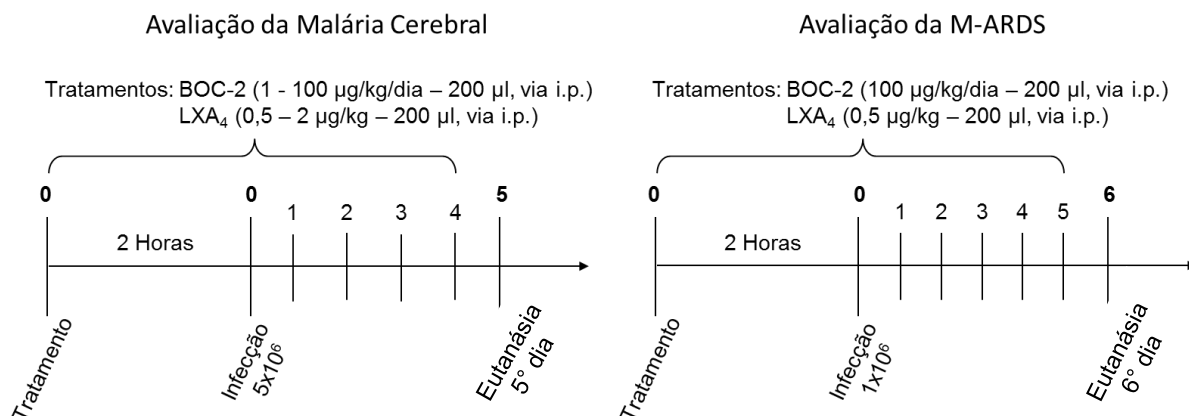
### 3.5 Tratamentos

Camundongos C57BL/6 e Balb/C foram distribuídos randomicamente em quatro grupos experimentais: animais não infectados, animais infectados por *P. berghei* ANKA (*PbA*) sem tratamento (receberam apenas o veículo dos tratamentos, PBS 1x, 200 µl, i.p.), animais infectados por *PbA* tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, 200 µl, i.p.) e animais infectados por *PbA* tratados com BOC-2 (100 µg/kg/dia, 100µl, i.p.) e depois com LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, 100 µl, i.p.).

Primeiramente, para avaliação da malária cerebral camundongos Balb/C foram tratados com BOC-2 (1-100 µg/kg/dia, 200 µl, i.p.) duas horas antes da infecção e por mais quatro dias consecutivos, totalizando cinco dias de tratamentos. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5-2 µg/kg/dia, 200 µl, i.p.) duas horas antes da infecção e por mais quatro dias consecutivos, totalizando também cinco dias de tratamentos. Os camundongos C57BL/6 que receberam os dois tratamentos, foram tratados primeiramente com o BOC-2 (1-100 µg/kg/dia, 100µl, i.p.) e meia hora depois tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, 100 µl, i.p.). O esquema de tratamento foi repetido por quatro dias consecutivos e as análise de parâmetros de malária cerebral foi avaliado no quinto dia após a infecção conforme o esquema a seguir.

Para avaliação da M-SDRA camundongos C57BL/6 foram tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, 200 µl, i.p.) duas horas antes da infecção e por mais cinco dias consecutivos, totalizando também seis dias de tratamentos. Os camundongos C57BL/6 que receberam os dois tratamentos, foram tratados primeiramente com o BOC-2 (100 µg/kg/dia, 100µl, i.p.) e meia hora depois tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5

$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , 100  $\mu\text{l}$ , i.p.). O esquema de tratamento foi repetido por cinco dias consecutivos e as análises de parâmetros da M-SDRA foram avaliadas no sexto dia após a infecção conforme o esquema a seguir.



Nos tempos indicados os animais foram submetidos a eutanásia ou perfusão seguida de eutanásia, dependendo da técnica que seria aplicada em seguida. Para a realização da eutanásia os animais receberam excesso de anestésico (200  $\mu\text{l}$  de pentobarbital sódico 3 %, i.p. - Hypnol®). Para perfusão seguida de eutanásia, os animais foram sedados com quetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e anestesiados via i.p. com 70  $\mu\text{l}$  pentobarbital sódico 3% (Hypnol®). Depois de detectada a ausência de resposta a estímulos nociceptivos, os animais foram perfundidos com uma solução salina heparinizada (100 UI/ml) em média por 5 minutos.

### 3.6 Sobrevida

Os camundongos foram tratados e infectados como descrito acima e mantidos em biotério, com o mesmo ambiente acima citado, para avaliação diária da sobrevida. Os resultados foram expressos como porcentagem de animais vivos.

### 3.7 Avaliação da quebra das barreiras hemato-encefálicas e hemato-alveolar

Para a avaliação do edema cerebral e pulmonar, foi administrado via intravenosa (i.v.) 150  $\mu\text{L}$  do corante Azul de Evans (2%) em cada animal (126). Após duas horas os camundongos foram eutanasiados para retirada de seus cérebros e pulmões, que foram pesados e reservados em 2 mL ou 4 mL de formamida PA, respectivamente, por 48 horas a 37°C. Após este período o sobrenadante foi recolhido e a

absorbância foi mensurada por espectrofotometria ( $\lambda=620$  nm) (Spectramax 190, Molecular Devices, CA, USA) de acordo com as concentrações da curva padrão de Azul de Evans. Os resultados foram expressos por miligrama (mg) de Azul de Evans por grama (g) de peso dos tecidos cerebral ou pulmonar.

### 3.8 Testes Comportamentais (SHIRPA)

A malária cerebral experimental foi definida pela presença de pelo menos dois dos seguintes sinais clínicos de envolvimento neurológico: ataxia, paralisia dos membros, mau reflexo de correção, convulsões e coma. Além disso, uma série de testes SHIRPA (*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment*) foi utilizada nesse estudo para avaliar alterações comportamentais, motoras e neurológicas durante o desenvolvimento da infecção por *PbA* (127). Foram selecionados alguns testes voltados para avaliação dos parâmetros cognitivos e comportamentais com o objetivo de avaliar o comprometimento cerebral dos camundongos. Os testes descritos a seguir inicialmente foram realizados nos animais ainda não infectados. Em seguida estes mesmos camundongos foram tratados e infectados conforme descrito acima. Cinco dias após a infecção, os testes foram repetidos e os resultados expressos como diferença entre a soma dos scores após a infecção e antes da inoculação do *PbA*.

*Comportamento registrado na arena:* Inicialmente, o animal foi colocado dentro de uma estrutura cônica de vidro, localizada sobre uma plataforma branca, e foram observados: posição corporal, atividade espontânea, taxa de respiração, tremor, número de *headings* (apoio apenas sobre as patas traseiras) e *groomings* (movimentos de “limpar” dirigidos a cabeça ou corpo, efetuados com as patas dianteiras) dos animais.

*Excitação de transferência:* Transcorrido cinco minutos do teste descrito acima, o animal foi transferido para a arena sem ser tocado. Iniciou-se então a observação durante trinta segundos das reações imediatas ao novo ambiente que foram registradas através de um *score* no qual “0” significa coma (sem qualquer movimento) e “6” significa extremamente excitado (comportamento maníaco).

*Atividade locomotora:* Ainda na arena é quantificado durante trinta segundos o número de quadrados de  $11\text{ cm}^2$  da arena que o animal pisou com as quatro patas ao mesmo tempo.

*Elevação de cauda:* Durante a avaliação da atividade locomotora observou-se também o nível de elevação da cauda do animal e foi registrado através de um score no qual “0” arrastando a cauda no chão e “3” cauda elevada (acima de 45°).

*Comportamento registrado acima da arena:* O animal foi retirado da arena pela cauda e observaram-se seus movimentos e a sua intenção de se soltar até ser posto em cima da grade.

*Manobra de grade:* O animal foi segurado acima da grade por suspensão da cauda de forma que ele conseguiu pegar a grade com as patas dianteiras. Em seguida o animal é mantido estendido e girado horizontalmente até que seu corpo ficasse por cima da grade e então foi liberado. A reação do animal foi registrada através de um score no qual “0” significou que o animal caiu imediatamente ao ser solto e “4” significou que ele agarrou ativamente a grade também com as patas posteriores.

*Comportamento registrado durante a restrição supina:* O animal foi contido em posição supina e observou-se a capacidade de posicionamento visual, força ao agarrar, tônus abdominal e reflexo a beliscadas nos dedos da pata traseira. Além disso, nesse momento foi medido o comprimento do animal da ponta de seu nariz até a base da cauda.

*Reflexo de correção postural por contato:* O animal foi colocado dentro de um tubo com quatro centímetros de diâmetro e virado de cabeça para baixo. Foi registrada a capacidade do animal se virar e ficar de cabeça para cima ou não. Sendo “0” para capacidade ausente e “1” para a capacidade presente.

### **3.9 Quantificação de citocinas e mediadores lipídicos**

A quantificação de citocinas e mediadores lipídicos foi feita em cérebros, pulmões e plasma conforme descrito a seguir.

Os animais foram perfundidos e tiveram seus cérebros e pulmões retirados e congelados em N<sub>2</sub> líquido. Os órgãos foram então macerados durante dois minutos em 1 mL de tampão de lise celular (20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, Triton X-100 1% e 1:1000 de coquetel inibidor de protease). Os extratos foram centrifugados a 10.000 G por vinte minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido.

Para dosagem de mediadores no plasma, após a anestesia, o sangue foi retirado por punção cardíaca utilizando-se citrato de sódio 1,8 % como



anticoagulante e centrifugado a 200 G por dez minutos a 4°C. O plasma então foi recolhido e congelado a -20°C para as análises posteriores.

Em todas as amostras foi dosada a quantidade de proteínas totais pelo método de Lowry (BioRad) para a normalização dos resultados.

As concentrações de citocinas e quimiocinas foram avaliadas pelo método de ELISA sanduíche (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) usando pares de anticorpos correspondentes de acordo com as instruções do fabricante (*R&D System*, EUA). Placas de 96 poços (Nunc-Maxsorp™, Thermo Scientific, EUA) foram incubadas a 4°C com a concentração ótima de anticorpos monoclonais purificados contra cada citocina analisada. Após dezoito horas, os poços foram lavados com 200 µL de uma solução de tween 20 a 0,05% diluído em PBS-tween. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com 200 µL de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA). Decorridos vinte e quatro horas a placa foi lavada e incubada com anticorpo de detecção. Após lavagens a placa foi incubada com estreptoavidina peroxidase e a revelação foi realizada após a adição de tampão citrato/perborato de sódio contendo OPD (500 µg/mL). A reação foi bloqueada pela adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2 M, a leitura realizada por espectrofotometria (Spectra Max 190/Molecular Device, EUA) a 490 nm. As concentrações de citocinas e quimiocinas foram determinadas a partir de valores obtidos com a curva padrão realizada com diferentes diluições da proteína recombinante fornecida pelo fabricante. O resultado foi expresso em nanograma (ng) de citocina por miligrama (mg) de proteína total das amostras.

As concentrações de LXA<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub> foram mensuradas por EIA de acordo com as instruções do fabricante (*Cayman Chemical Co.* EUA). O ensaio foi realizado utilizando kits distintos, porém realizados de maneira similar como descrito a seguir: foram adicionados 50 µL/poço das amostras ou 50 µL/poço das soluções padrão diluídas em série de LXA<sub>4</sub> ou LTB<sub>4</sub> em placas de 96 poços pré-revestidas com anticorpo IgG murino. Em seguida, foram adicionados o anticorpo contra LXA<sub>4</sub> ou LTB<sub>4</sub> (50 µL/poço) e LXA<sub>4</sub> ou LTB<sub>4</sub> conjugados com colinesterase (50 µL/poço) e incubados durante cerca de dezoito horas em temperatura ambiente. Os poços correspondentes ao controle receberam somente o tampão de EIA e a LXA<sub>4</sub> ou LTB<sub>4</sub> conjugada com colinesterase (50 µL/poço). Após esta etapa, a placa foi lavada (5x) com tampão fosfato de potássio 0,01 M contendo tween 20 a 0,05%. Em seguida, foram adicionados 200 µL/poço do reagente de Elmmans (contém o substrato para a

enzima colinesterase diluído em água deionizada, segundo instruções do fabricante) para revelação. A placa foi incubada sob agitação ao abrigo da luz até ocorrer a reação e lida em leitora de placa a 405 nm. Os dados foram analisados com auxílio de uma planilha disponibilizada pelo fabricante em <https://www.caymanchem.com/analysis/EIA>. O resultado foi expresso em ng/ml ou pg/ml.

### **3.10 Microscopia intravital cerebral com epi-iluminação e fluorescência**

A técnica microscopia intravital foi realizada no laboratório de Investigação cardiovascular (IOC-Fiocruz) sob a coordenação do Dr. Eduardo Tibiriçá. Para isso os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e a anestesia foi mantida por doses adicionais da mistura dos anestésicos (5 mg/kg) via i.v. na veia caudal. A temperatura foi monitorada com uma sonda retal e mantida a 37°C com um cobertor homeotérmico (Harvard Apparatus, Boston, MA, USA). A microvasculatura da pia máter foi visualizada em um sistema de microscopia (Olympus BX150WI, EUA) através de uma craniotomia do osso parietal direito realizada por uma broca (128). Esta janela também permite a visualização do recrutamento dos leucócitos *in vivo* (129). A área avaliada foi continuamente perfundida com um fluido cefalorraquidiano artificial a 37°C, pH 7,35. A solução de perfusão foi continuamente arejada com 10% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> e 84% N<sub>2</sub> para a manutenção da tensão e dos níveis de gases comparáveis ao pH fisiológico para se evitar a inflamação local.

Após a administração i.v. de fluoresceína (FITC)-dextrana (FITC-dextran 150), imagens da microcirculação foram adquiridas pelo Archimed 3.7.0 software (Microvision, Evry, França). Imagens seriadas foram adquiridas com as objetivas de 100X (Olympus BX150WI; Center Valley, PA, EUA) por 1 min/campo de quatro campos. Apenas os capilares continuamente perfundidos foram contados para se determinar a média da densidade capilar funcional, expressa em número de capilares por mm<sup>2</sup>.

Para a marcação dos leucócitos circulantes, os animais receberam uma injeção i.v. de rodamina 6G (0,3 mg/kg). Os leucócitos fluorescentes foram visualizados por microscopia como descrito acima. A interação dos leucócitos com o endotélio foi

avaliada pela contagem dos leucócitos aderindo à parede vascular (ao longo de 100µm) durante trinta segundos e expressa como o número de células/min/100 µm. Os parâmetros acima foram determinados nas vênulas da pia mater com diâmetro entre 50 a 70 µm.

### **3.11 Análise morfológicas do cérebro**

Os animais foram perfundidos e tiveram seus cérebros retirados, fixados em formalina 4%, processados e incluídos em parafina. Os cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para as análises morfológicas dos cérebros e pulmões.

A obstrução da microvasculatura cerebral e a citoaderência foi analisada na região cortical-medular. Vasos ocluídos foram avaliados durante 30 campos consecutivos em aumento de 400X. Já as hemácias parasitadas aderidas foram observadas em 30 campos consecutivos em aumento de 1000X de acordo com o seguinte *score* semi-quantitativo: “0” = nenhuma hemácia parasitada aderida; “1” = únicas hemácias parasitadas aderidas; “2” = rosetas aderidas; “3” = células aderidas de forma difusa.

### **3.12 Laser Speckle Contrast Imaging**

O fluxo sanguíneo cerebral foi mensurado através do aparelho de *Laser Speckle Contrast Imaging*. (PeriCam PSI System, Perimed, Suécia). Esta técnica foi realizada no laboratório de Investigação cardiovascular (IOC-Fiocruz) sob a coordenação do Dr. Eduardo Tibiriçá e proporciona o índice de perfusão microvascular que é proporcional à concentração e velocidade dos eritrócitos.

Para esta análise os animais anestesiados foram mantidos em uma superfície estável, em uma sala com temperatura estável a 25°C, a pele sobre a calota craniana foi retirada. Em seguida os animais foram colocados sob um sistema de *laser Speckle* (10 cm de distancia) com contraste de imagem de 785 nm para medida contínua da perfusão sanguínea tecidual em tempo real. Para a determinação das alterações no fluxo sanguíneo da microcirculação foram feitas 16 imagens/s em um total de 20 min. por animal. As imagens foram analisadas utilizando o Perisoft software (Perimed, Stockholm, Suécia). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

### **3.13 Isolamento de mononucleares cerebrais e esplênicos**

Os animais foram perfundidos e tiveram seus cérebros e baços retirados para a análise fenotípica dos mononucleares. Para isso o tecido cerebral foi macerado em RPMI puro com auxílio de uma peneira, centrifugado a 400 x G por cinco minutos e cada pellet ressuspensionado em dois mL de tampão HEPES contendo 0,05% de colagenase. Essa suspensão ficou em movimentação no *Shaker* a 37°C durante trinta minutos. Em seguida, a suspensão foi filtrada em tecido *voal* e centrifugada a 80 x G por trinta segundos. Os mononucleares foram obtidos por meio de separação em gradiente constituídos por soluções a 80 e 40 % de Percoll. Para isso, as células foram centrifugadas a 1620 x G durante trinta minutos sem aceleração e desaceleração, em temperatura ambiente. A camada de células mononucleares foi recolhida na interface entre a solução de 80 e 40 % de Percoll e lavadas duas vezes com Hank's sem  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ . Já os baços foram macerados em Hank's sem  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  e o leucócitos de cada baço foram obtidos por meio de separação em 2 mL de gradiente de histopaque 1083. Para isso, as células foram centrifugadas a 400 x G durante trinta minutos sem aceleração e desaceleração, em temperatura ambiente. A camada de leucócitos foi recolhida, sobre a solução de histopaque e lavada duas vezes com Hank's sem  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ . Em ambos os tecidos a contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer e todas as populações de células isoladas foram avaliadas por citometria de fluxo, conforme descrito no item 3.14.

### **3.14 Preparação de suspensão celular para aplicação em citometria de fluxo**

As células submetidas à citometria de fluxo foram semeadas em uma placa de 96 poços com fundo em "U" e centrifugadas (400 x G por dois minutos). Os *pellets* foram ressuspensionados em 100 µl de PBS contendo 0,1 % de azida sódica (PBS-Azida), 10 % de SFB e Fc Block (anticorpo anti-CD16/CD32, 1:100) e incubados por trinta minutos a 4° C para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação. Após centrifugação as células foram incubadas (trinta minutos, 4°C) com os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromo: anti-CD3 mAb conjugado a FITC, anti-CD8 conjugado a PerCP, anti-CD11b/CD18 conjugado a PE (1:100), anti-GR1/Ly6G conjugado a FITC (1:100), anti-CXCR2 conjugado a PerCP/Cy 5.5. No caso da avaliação da apoptose, a marcação foi realizada com anexina V (APC) e iodeto de

propídeo (PI). Além disso, para a marcação intracelular de citocinas, as células foram fixadas em paraformaldeído 2% (20 minutos, 4°C), centrifugadas a 400 x G por dois minutos e lavadas com PBS-azida contendo 10% de SFB (PBS-azida-SFB). Em seguida, as células foram incubadas com PBS-azida-SFB contendo 0,1% de saponina (trinta minutos) para abertura de poros na membrana celular. Após a permeabilização, as células foram ressuspensas e incubadas em uma solução de 30 µl contendo os anticorpos anti-TNF-α conjugado a PE (1:100) e anti-IFN-γ biotinilado (1:100) (trinta minutos, 4°C). As células foram então lavadas com 100 µl PBS-azida-saponina 0,1% por duas vezes e uma vez com PBS-azida. Os isotipos IgG foram utilizados como controle negativo de marcação. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS-azida, centrifugadas e então ressuspensas em PBS-azida e transferidas para tubos tubo em FACScalibur (Becton Dickinson, EUA). As análises dos marcadores de superfície e intracelular foram realizadas utilizando os softwares Cell Quest<sup>®</sup> (Becton Dickinson, EUA) ou FlowJo<sup>®</sup>. Os dados foram coletados e expressos em uma escala log de intensidade de fluorescência e apresentados como dot plots ou histogramas. A população de células de interesse foi primeiramente identificada em uma região física de acordo com tamanho e granulosidade das células e em seguida pela intensidade de fluorescência. As células de interesse foram representadas como porcentagem do número total de células.

### **3.15 Estimulação *in vitro* de células endoteliais**

Células de linhagens endoteliais murina (tEnd.1) ou humana (ECV 304) foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado (10 % de SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 IU/ml de penicilina e 100 mg/ml streptomomicina), acondicionadas em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> à 37° C e plaqueadas numa concentração de 10<sup>4</sup> células por poço em placas de vinte e quatro poços. Após vinte e quatro horas, as células foram pré-tratadas com LXA<sub>4</sub> (10 nM), BOC-2 (40 nM) ou com o inibidor da atividade da HO-1, ZnPIX (50 µM) por uma hora e estimuladas (50:1) com hemácias não infectadas ou infectadas com *P. berghei*-GFP ou com *P. falciparum* previamente corados com CFSE (25 µM) por trinta minutos, respectivamente. Em seguida, as células foram submetidas a protocolos de *Western blotting* ou imunocitoquímica para identificação e quantificação de proteínas, ou citoaderência de hemácias.

### 3.16 Western Blotting

A técnica de *western blotting* foi aplicada em cérebros de camundongos após perfusão e congelamento em N<sub>2</sub> líquido e em células endoteliais estimuladas *in vitro* conforme descrito anteriormente.

Os cérebros e as células de cultura *in vitro* foram homogeneizadas em 1 mL ou 70 µl respectivamente, de tampão de extração gelado (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40) suplementado com inibidores de fosfatases e proteases (10 mM NaF, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e coquetel inibidor de protease 1x), mantidas no gelo por quinze minutos com agitação periódica e sonicadas a 4 °C por um minuto seguido de centrifugação a 18620 G, 4° C por dez minutos. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry.

As amostras foram desnaturadas em tampão de amostra Laemmli (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 1 %; 2-mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 % e azul de bromofenol 0,001 %) e aquecidos a 90 °C por cinco minutos. Em seguida 20 µg dos lisados totais ou nucleares foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE (em gel de poliacrilamida-SDS 11 %) e transferidos para membranas de PVDF em sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry), utilizando tampão de transferência (Tris 48 mM e Glicina 39 mM). Após a transferência, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora de BSA 5 % em TBST (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4; NaCl a 150 mM; Tween 20 a 0,1 %) por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas (*overnight*, a 4 °C) com o anticorpo policlonal primário produzido em coelho para HO-1 (1:5000) e posteriormente com o anticorpo conjugado a HRP anti- IgG de coelho (1:2500) ou com anticorpo monoclonal primário produzido em camundongo para ICAM-1 (1:1000) e posteriormente com o anticorpo conjugado a HRP anti-IgG de camundongo (1:500). Após a incubação as membranas foram lavadas três vezes com TBST e duas vezes com TBS. A detecção foi feita usando o Sistema ECL e as membranas expostas a filme de autorradiografia. As membranas então foram estripadas com NaOH (1N) e então incubadas com o anticorpo policlonal produzido em coelho para β-actina (1:5000) para a detecção das proteínas totais. As bandas foram quantificadas por densitometria usando o *software* Image J<sup>®</sup> (domínio público).

### 3.17 Imunocitoquímica

Para avaliação da expressão de ICAM-1, as células de linhagens endoteliais murina (tEnd.1) ou humana (ECV 304) tratadas e estimuladas como descrito acima foram fixadas em paraformaldeído a 4% e sacarose a 4% e bloqueadas com BSA 2%. As células foram incubadas com os anticorpos anti-murino ou anti-humano ICAM-1 (1:100 e 1:50, respectivamente) e subsequente incubadas com os anticorpos secundários apropriados conjugado ao fluorocromo PE. A aquisição microscópica da fluorescência das imagens foi realizada através do microscópio de fluorescência (Nikon, Japan), e a intensidade de fluorescência foi mensurada no software Volocity® (Perkin Elmer, EUA).

### 3.18 Ensaio de citoadesão

As células de linhagens endoteliais murina (tEnd.1) ou humana (ECV 304) tratadas e estimuladas como descrito acima foram incubadas sob agitação à 37° C por uma hora para a adesão das hemácias. Após esse período, as hemácias não aderidas foram gentilmente retiradas com lavagens de PBS 1X (x 3) e as células remanescentes foram fixadas em etanol e coradas com Giemsa. O número dos eritrócitos aderidos por ECV-304 ou por tEnd-1 foi determinado pela contagem direta das células no microscópio em aumento de 400X (Olympus BX41, Japão). Os resultados foram expressos como índice de adesão calculado como previamente descrito (130):

$$IA = \left( \frac{\text{Célula endotelial com hemácia aderida}}{\text{Total de células endoteliais}} \right) \times \left( \frac{\text{Hemácia aderidas}}{\text{Total de células endoteliais}} \right) \times 100$$

### 3.19 Mecânica ventilatória

A metodologia da mecânica ventilatória foi realizada no Laboratório de Investigação Pulmonar (IBCCF- UFRJ) sob a coordenação da Dra. Patricia R. M. Rocco. Para isso seis dias após o início do tratamento, camundongos C57BL/6 foram sedados (diazepam, 1 mg via i.p.), anestesiados (pentobarbital sódico, 20 mg/kg via i.p.) e submetidos a traqueostomia. Os dados foram registrados baseados no fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Em seguida os animais foram paralisados com brometo de vecurônio (0,005 mg/kg-1 via i.v.) e mecanicamente ventilados com um ventilador de fluxo constante (Samay

VR15; Universidade da Republica, Montevideu, Uruguai) utilizando os seguintes parâmetros: taxa respiratória = 100 respirações/min, volume corrente ( $V_T$ ) = 0,2 ml e a fração de oxigênio inspirado ( $F_{iO_2}$ ) = 0,21. A parte anterior da caixa torácica foi removida cirurgicamente e a pressão positiva ao final da expiração (*positive end-expiratory pressure* - PEEP) de 2 cm H<sub>2</sub>O foi aplicada. A utilização da PEEP evita o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica. Após dez minutos do período de ventilação, a mecânica pulmonar foi computada. Os parâmetros da mecânica respiratória foram obtidos através do método da oclusão ao final da inspiração (131). Este método permite analisar os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão. Após a oclusão das vias aéreas durante cinco segundos ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da pressão transpulmonar (PL) até um ponto de inflexão ( $P_{i,L}$ ), a partir do qual, o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ( $P_{el,L}$ ). O valor da elastância estática do pulmão ( $Est,L$ ) foi calculado dividindo-se o  $P_{el,L}$  pelo volume inspirado ( $V_T$ ). Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o fluxo nunca cai à zero imediatamente após a oclusão, proporcionando a existência de um pequeno volume. Esse fluxo é responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, da  $P_{i,L}$  e da  $P_{el,L}$ . Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ( $\Delta P_1$ ) que corresponde a pressão máxima menos a  $P_i$  (pressão dissipada para vencer viscosidade do pulmão) seguida por uma queda lenta ( $\Delta P_2$ ), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar ( $P_{el}$ ). A pressão resistiva do equipamento foi subtraída da pressão resistiva dos pulmões de tal forma que os resultados representem as propriedades mecânicas intrínsecas. As medições foram feitas pelo menos 10 vezes em cada animal e analisados usando o software ANADAT<sup>®</sup> (RHT-InfoData, Inc., Montreal, Quebec, Canadá).



### **3.20 Análises morfométricas do tecido pulmonar**

Foram realizadas análises morfométricas dos pulmões de camundongos perfundidos, em trinta campos consecutivos em aumento de 200X e 400X. O dano alveolar difuso (DAD) foi quantificado por uma pontuação ponderada por um investigador cego para o protocolo experimental. Os scores de “0” a “4” foram utilizados para representar a severidade do espessamento de septo alveolar, colapso alveolar, infiltrado inflamatório e edema intersticial, sendo “0” histoarquitetura normal e “4” as máximas alterações. A pontuação cumulativa do DAD foi calculada como a soma de cada pontuação característica, e variou 0-64 (132). Para a quantificação dos leucócitos no parênquima pulmonar em aumento de 1000X, foram avaliados 10 campos aleatórios e não coincidentes por lâmina, que foram determinados pela técnica de contagem de pontos (133). Computou-se o número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido, células mononucleares e polimorfonucleares, obtendo-se desta forma o número de células por área de tecido em porcentagem.

### **3.21 Contagem de leucócitos periféricos**

As contagens de leucócitos totais periféricos e da medula óssea foram realizadas em um contador automático de partículas (Counter Z1, Beckman-Coulter Inc., EUA). Para isso 50 µl do sangue coletado dos animais por punção cardíaca ou da suspensão com os leucócitos medulares foram diluídos (1:200) em uma solução isotônica tamponada (ISOTON<sup>®</sup>, Beckman Coulter). A diferenciação dos leucócitos periféricos foi realizada esfregaços sanguíneos corados com Panótico rápido (Laborclin). A contagem diferencial de pelo menos 100 células por animal foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX41, Japão) com aumento de 1000X.

### **3.22 Isolamento de neutrófilos**

Os camundongos foram eutanasiados e seus fêmures e tíbias de ambas as patas traseiras foram dissecados e removidos. As extremidades distais dos ossos foram removidas e cada fêmur e tíbia foi lavado com 2 mL de Hank's sem Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup> com 1,8 % de citrato de sódio. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada a 400 G durante quinze minutos a 22° C e ressuspendida em 2 mL de Hank's sem Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>. Os polimorfonucleares foram obtidos por meio de

separação em gradiente constituídos por soluções a 72 e 65 % de Percoll. Para isso, as células foram centrifugadas a 1200 x G durante trinta e cinco minutos sem aceleração e desaceleração, em temperatura ambiente. A camada de células mononucleares, sobre a solução de Percoll a 65 % foi descartada e os polimorfonucleares foram recolhidos na interface entre a solução de 72 e 65 % de Percoll e lavados duas vezes com Hank's sem  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ . A contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer e a pureza dos neutrófilos foi feita a partir de citoesfregaço em lâminas de vidro corados por panótico rápido (> 90 % de pureza).

### 3.23 Ensaios de quimiocinesia e quimiotaxia

Inicialmente os neutrófilos obtidos de animais não infectados, infectados com *PbA* tratados ou não com LXA<sub>4</sub> ou/e BOC-2 tiveram os seus neutrófilos medulares isolados como descrito acima. Os ensaios de quimiocinesia e quimiotaxia de neutrófilos foram realizados através do sistema de câmara de *Boyden* modificada de 48 poços (Neuroprobe Inc., EUA). Esta câmara é composta por dois compartimentos separados por uma membrana de policarbonato (filtro de policarbonato de 5 µm, Neuroprobe Inc., EUA): o compartimento superior (onde é depositada a suspensão de células) e o compartimento inferior (onde é colocado o estímulo quimiotático). Para os ensaios de quimiocinesia, os poços inferiores foram preenchidos com 29 µl de RPMI-1640. Já para os ensaios de quimiotaxia, os poços inferiores foram preenchidos com 29 µl de plasma de animais não infectados (Nip), plasma de animais infectados com *PbA* (*Pbp*) ou CXCL1 (250 nM), e os poços superiores foram preenchidos com neutrófilos em meio RPMI (10<sup>5</sup> células/poço; 50 µl). O mesmo experimento foi realizado com animais tratados com o análogo 15-epi-LXA<sub>4</sub> e BOC-2 e 15-epi-LXA<sub>4</sub>.

Em outro grupo de experimentos para avaliar o efeito direto da LXA<sub>4</sub> sobre os neutrófilos, os neutrófilos isolados de animais saudáveis foram pré-tratados *in vitro* com LXA<sub>4</sub> (10nM) ou BOC-2 (40 nM) e quinze minutos depois LXA<sub>4</sub> (10 nM), por uma hora e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> antes do estímulo. Em seguida foram colocados na câmara de Boyden sobre RPMI-1640, plasma de animais não infectados (Nip), plasma de animais infectados com *PbA* (*Pbp*) ou CXCL1 (250nM).

Em todos os experimentos, as membranas foram coradas com Panótico rápido (Laborclin – Brasil) para fixação e coloração das células. Em seguida, os neutrófilos foram quantificados diretamente em microscópio ótico (1000x) por 15 campos consecutivos na linha média de cada poço. O experimento foi realizado em quadruplicata e os resultados expressos em número de neutrófilos/campo.

### **3.24 Ensaio de polimerização do citoesqueleto de actina**

Neutrófilos da medula óssea isolados de animais saudáveis como descrito acima foram plaqueados numa concentração de  $(5 \times 10^4)$  neutrófilos/poço) em placas de 24 poços (Nunc, Rochester, NY, EUA) contendo lamínulas e deixados para aderir a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por três horas. Após esse período, as células foram pré-tratadas *in vitro* com LXA<sub>4</sub> (10 nM) ou BOC -2 (40 nM) e quinze minutos depois LXA<sub>4</sub> (10 nM), por uma hora e estimuladas por mais uma hora com plasma de animais não infectados (Nip) ou plasma de animais infectados com PbA (*Pbp*) também a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram então lavadas com PBS 1x e fixadas durante vinte minutos com *paraformaldeído* a 4 %. A seguir, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,25%) e coradas com faloidina conjugada à rodamina (1:100). Os núcleos foram corados com DAPI (1:10000) por cinco minutos. As lâminulas foram montadas com *Vecta Shield* e seladas com esmalte incolor. As imagens de fluorescência foram capturadas por microscopia de fluorescência (*Nikon Inc.*, EUA) em 10 campos distintos de cada lâmina. A análise foi realizada em pelo menos 300 células por lâmina (3 lâminas por grupo) em aumento de 400X sendo classificadas com marcação de faloidina difusa ou polarizada.

### **3.25 Análise estatística**

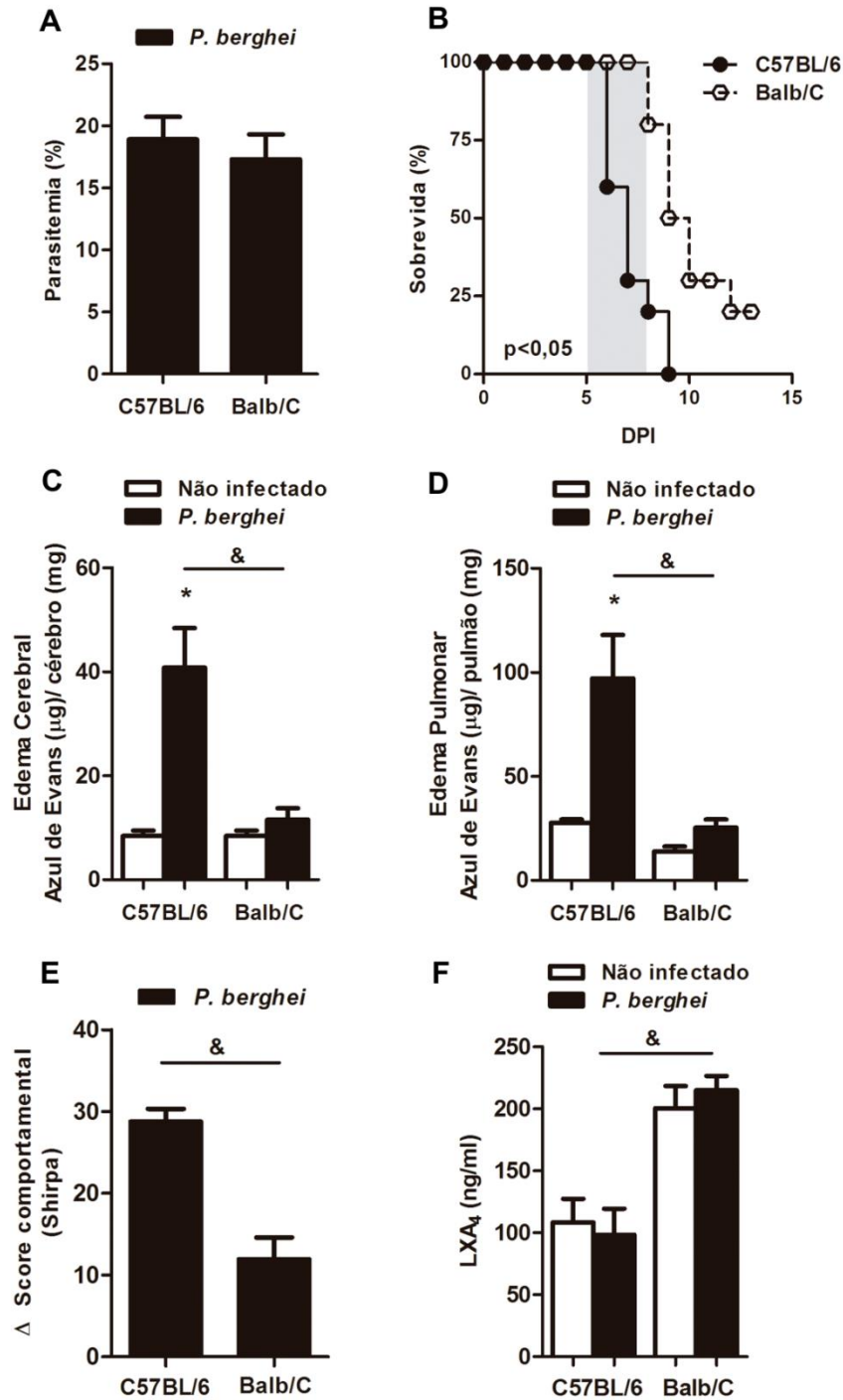
Os dados obtidos foram processados no software GraphPad Prism 6.00<sup>®</sup> (GraphPad software, La Jolla, CA, EUA) e apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados e das curvas de sobrevivência foi realizada através dos testes de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni e do teste de Log-rank (Mantel-Cox), respectivamente. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. Comparação entre a suscetibilidade e tolerância à infecção por *P.berghei* ANKA

Estudos anteriores já demonstraram que as linhagens de camundongos C57BL/6 e Balb/C diferem na resposta à infecção por *P. berghei* ANKA (*PbA*). Os camundongos C57BL/6 são susceptíveis ao desenvolvimento da malária grave com acometimento sistêmico dos órgãos, levando ao quadro de comprometimento da função cerebral e conseqüentemente a morte (134). Por outro lado, camundongos da linhagem Balb/C são tolerantes ao desenvolvimento da malária grave e morrem mais tardiamente devido à intensa anemia e à hiperparasitemia, sem que haja a disfunção de múltiplos órgãos (134, 135). Entretanto, ainda não está completamente compreendido os motivos pelos quais essas duas linhagens apresentam diferentes comportamentos durante a infecção por *PbA*. Considerando isso, primeiramente, foi realizado o estudo comparativo entre as linhagens de camundongos C57BL/6 e Balb/C no modelo experimental de malária grave utilizado ao longo deste trabalho. Pode-se observar que não houve diferença na parasitemia entre as duas linhagens 5 dias após a infecção (Figura 4.1 A). Entretanto, os camundongos C57BL/6 apresentaram menor sobrevida quando comparados com os camundongos Balb/C (Figura 4.1 B). O maior número de mortes dos camundongos C57BL/6 ocorreu entre o 5° e o 9° dia de infecção. Já os camundongos Balb/C permaneceram vivos durante esse período, morrendo em dias posteriores: entre o 9° e o 12° dia após a infecção. Além disso, cerca de 20% dos animais continuaram vivos até o fim do experimento (Figura 4.1 B). Corroborando com a curva de sobrevivência, os camundongos C57BL/6 desenvolveram maior edema cerebral (Figura 4.1 C) e pulmonar (Figura 4.1 D) em comparação com camundongos C57BL/6 não infectados e com os Balb/C infectados. Não foi observado edema cerebral (Figura 4.1 C) nem edema pulmonar (Figura 4.1 D) nos camundongos Balb/C infectados com *PbA* quando comparados ao grupo de camundongos Balb/C não infectados. As análises dos testes de SHIRPA demonstraram maior diferença no score comportamental de camundongos C57BL/6 do que o score dos camundongos Balb/C (Figura 4.1 E). Essa diferença

nos escores sugere que 5 dias após a infecção por *PbA* os camundongos C57BL/6 foram menos responsivos aos estímulos e apresentaram comportamentos diferentes dos observados antes da infecção o que denota danos neurológicos nesses animais. Vale ressaltar que os camundongos Balb/C não apresentaram alterações de comportamento tão diferentes quanto os camundongos C57BL/6 durante o mesmo período de análise (Figura 4.1 E). A fim de se investigar se as diferenças observadas durante a infecção por *PbA* entre camundongos C57BL/6 e Balb/C teria relação com níveis de produção dos mediadores lipídicos anti-inflamatórios, foi investigada a produção endógena de LXA<sub>4</sub>. Foi observado maior quantidade de LXA<sub>4</sub> no plasma de camundongos Balb/C do que no plasma de camundongos C57BL/6 (Figura 4.1 F). Entretanto não foi observada nenhuma modulação da produção da LXA<sub>4</sub> após cinco dias da infecção por *PbA* em ambas as linhagens (Figura 4.1 F). Sugerindo que os níveis basais de LXA<sub>4</sub> presentes no plasma de camundongos Balb/C seriam suficientes para proteger o animal do processo inflamatório desencadeado pelo *PbA*.



**Figura 4.1** Comparação entre a linhagem suscetível C57BL/6 e a resistente Balb/C quanto ao desenvolvimento da malária grave. Camundongos C57BL/6 e Balb/C saudáveis e infectados com *P. berghei* ANKA foram avaliados 5 dias após a infecção (DPI) por *PbA* (in\u00f3culo de  $5 \times 10^6$  hem\u00e1cias infectadas/por animal) em rela\u00e7\u00e3o aos seguintes par\u00e2metros: **(A)** Parasitemia; **(B)** Sobrevida; Edemas **(C)** cerebral e **(D)** pulmonar por inje\u00e7\u00e3o de Azul de Evans (2%); **(E)** An\u00e1lises comportamentais pelo SHIRPA e **(F)** Dosagem de LXA<sub>4</sub> end\u00f3gena por EIA. Os resultados foram expressos como m\u00e9dia  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo de tr\u00eas experimentos independentes. As an\u00e1lises estat\u00edsticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo p\u00f3s-teste de Bonferroni. A an\u00e1lise das curvas de sobrevidas foi realizada pelo o teste de Log-rank (Mantel-Cox). As diferen\u00e7as significativas ( $p \leq 0,05$ ) em rela\u00e7\u00e3o aos grupos n\u00e3o infectados foram indicadas por (\*) e entre as linhagens C57BL/6 e Balb/C foram indicadas por (&).

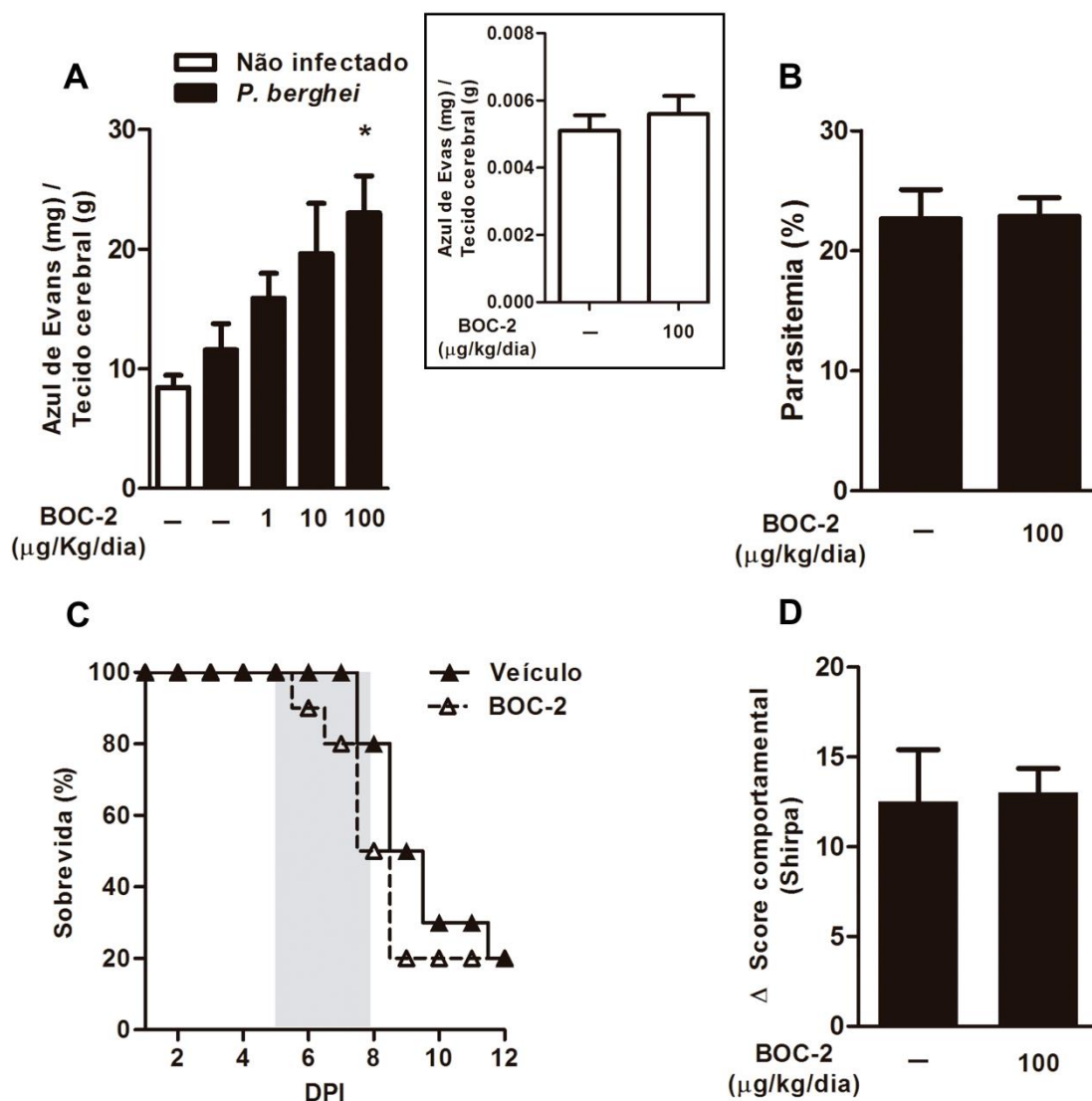
## **4.2. Papel dos mediadores anti-inflamatórios endógenos na resistência ao desenvolvimento da malária cerebral**

Uma vez demonstrado que camundongos Balb/C apresentam maior produção endógena de LXA<sub>4</sub>, hipotetizamos que a resistência desses animais ao desenvolvimento da malária cerebral poderia estar relacionada a maior atividade de agonistas endógenos do receptor FPR2/ALXR. Para investigar essa hipótese, foi utilizado o tratamento com o BOC-2, antagonista não seletivo dos receptores FPRs em camundongos Balb/C e avaliado parâmetros relacionados com o dano cerebral.

### **4.2.1 Avaliação do tratamento com o BOC-2 durante o desenvolvimento da malária cerebral induzida por *P. berghei* ANKA**

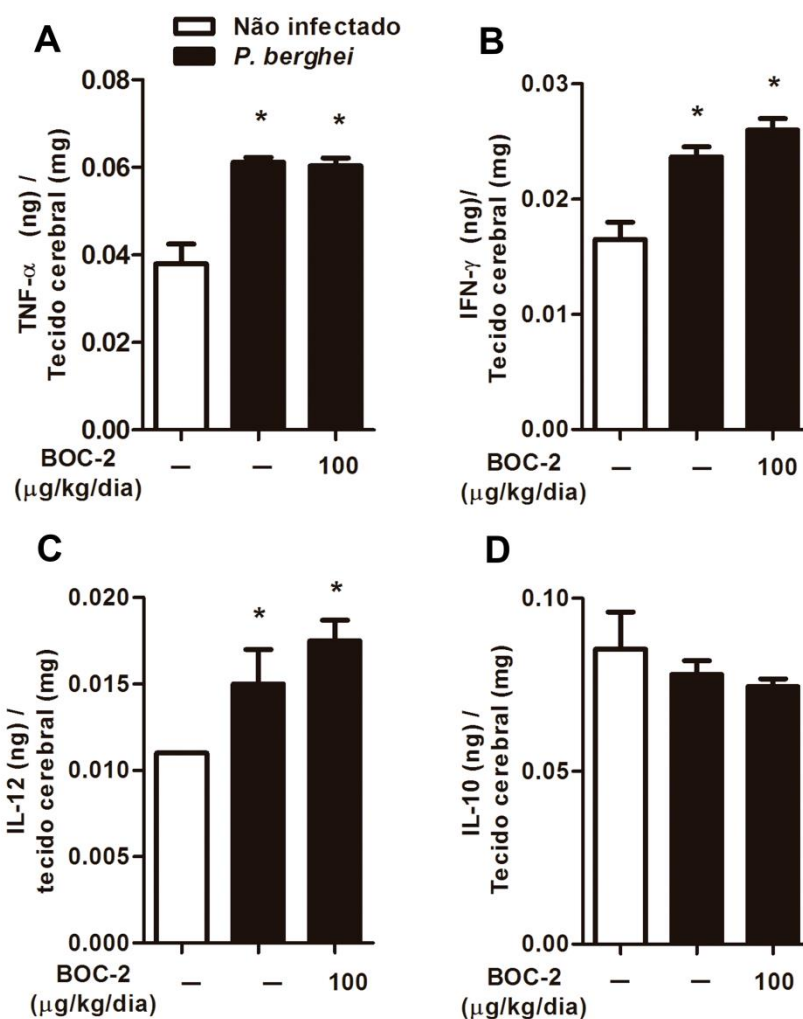
O pré-tratamento com o BOC-2 (antagonista do receptor FPR2/ALX) em camundongos Balb/C infectados por *PbA* induziu o edema cerebral de maneira dose dependente, sendo esse aumento significativo na dose de 100 µg/kg/dia (Figura 4.2 A). Essa mesma dose não alterou a permeabilidade da barreira hematoencefálica em animais não infectados (Figura 4.2 A, *insert*), a parasitemia (Figura 4.2 B), a sobrevivência (Figura 4.2 C) e os danos cognitivos dos animais infectados (Figura 4.2 D). No entanto, durante o período de tempo em que se observa morte por malária cerebral (entre o 5° e o 9° dia de infecção) foi observado que 50% dos animais infectados e tratados com BOC-2 morriam enquanto apenas 20% dos camundongos infectados não tratados sucumbiam à infecção (Figura 4.2 C).

Apesar do comprometimento neurológico característico da malária cerebral não ser induzido em camundongos Balb/C, a infecção por *PbA* aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α (Figura 4.3 A), de IFN-γ (Figura 4.3 B) e de IL-12 (Figura 4.3 C), porém não alterou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 4.3 D) no tecido cerebral desses animais em comparação com os animais não infectados. Além disso, o tratamento com a BOC-2 não alterou a produção de nenhuma dessas citocinas no tecido cerebral em comparação com os animais infectados que não receberam o tratamento (Figura 4.3 A-D).



**Figura 4.2 Avaliação do tratamento com BOC-2 durante a infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos Balb/C.** Camundongos Balb/C infectados com *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal) tratados ou não com BOC-2 (100 µg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção (DPI). **(A)** Efeito do pré-tratamento com diferentes doses de BOC-2 (1 -100 µg/kg/dia, i.p.) no extravasamento proteico no tecido cerebral; **(B)** parasitemia; **(C)** curva de sobrevivência e **(D)** análises comportamentais. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. A análise das curvas de sobrevivências foi realizada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).





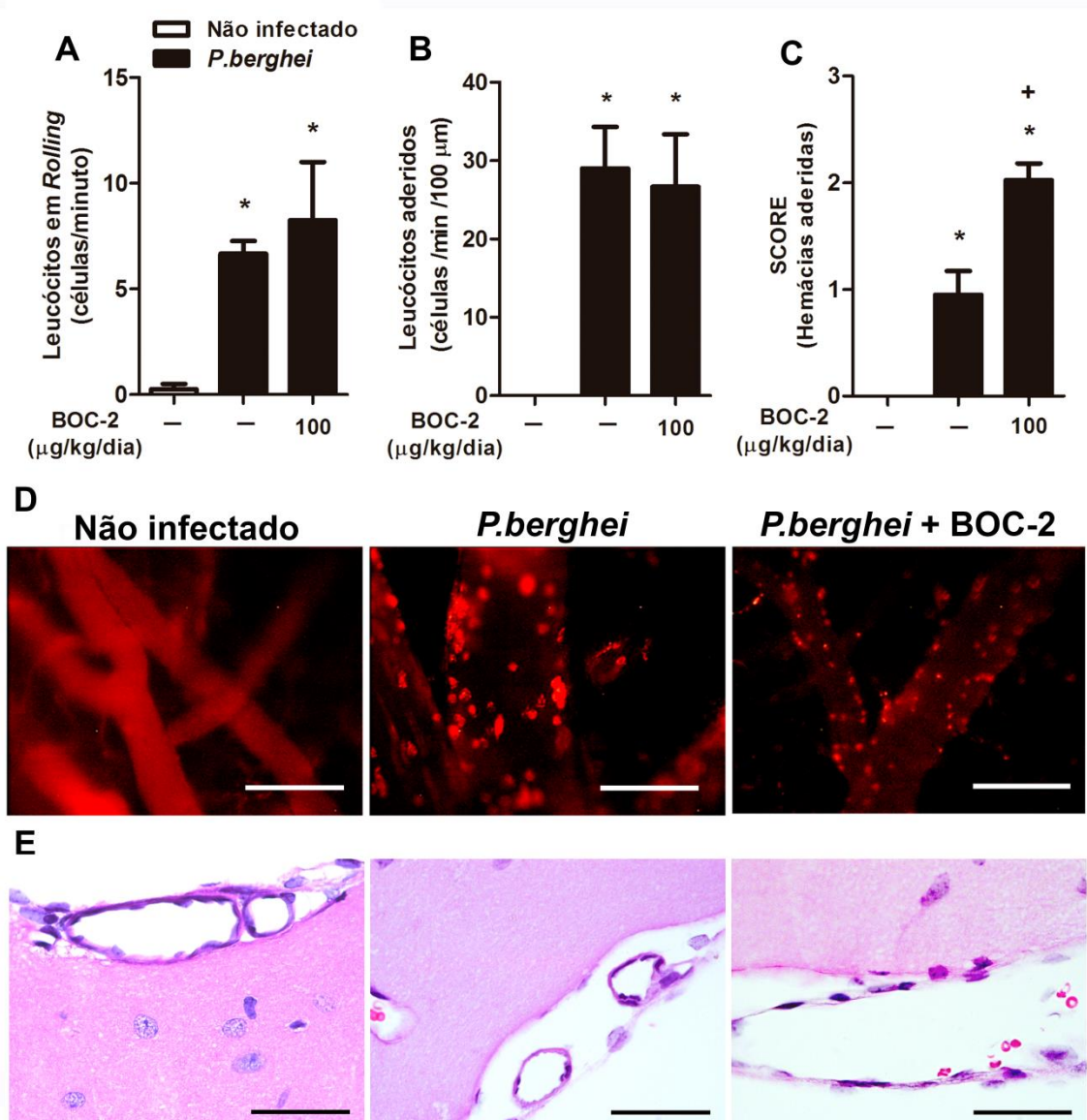
**Figura 4.3 Avaliação do tratamento com BOC-2 na produção de citocinas no tecido cerebral de camundongos Balb/C durante a infecção por *PbA*.** Animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com BOC-2 (100 μg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). As produções das citocinas **(A)** TNF-α, **(B)** IFN-γ, **(C)** IL-12 e **(D)** IL-10 foram mensuradas no tecido cerebral por ELISA. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 3 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*).

#### **4.2.2 Efeito do tratamento com BOC-2 na disfunção da microvasculatura do córtex cerebral**

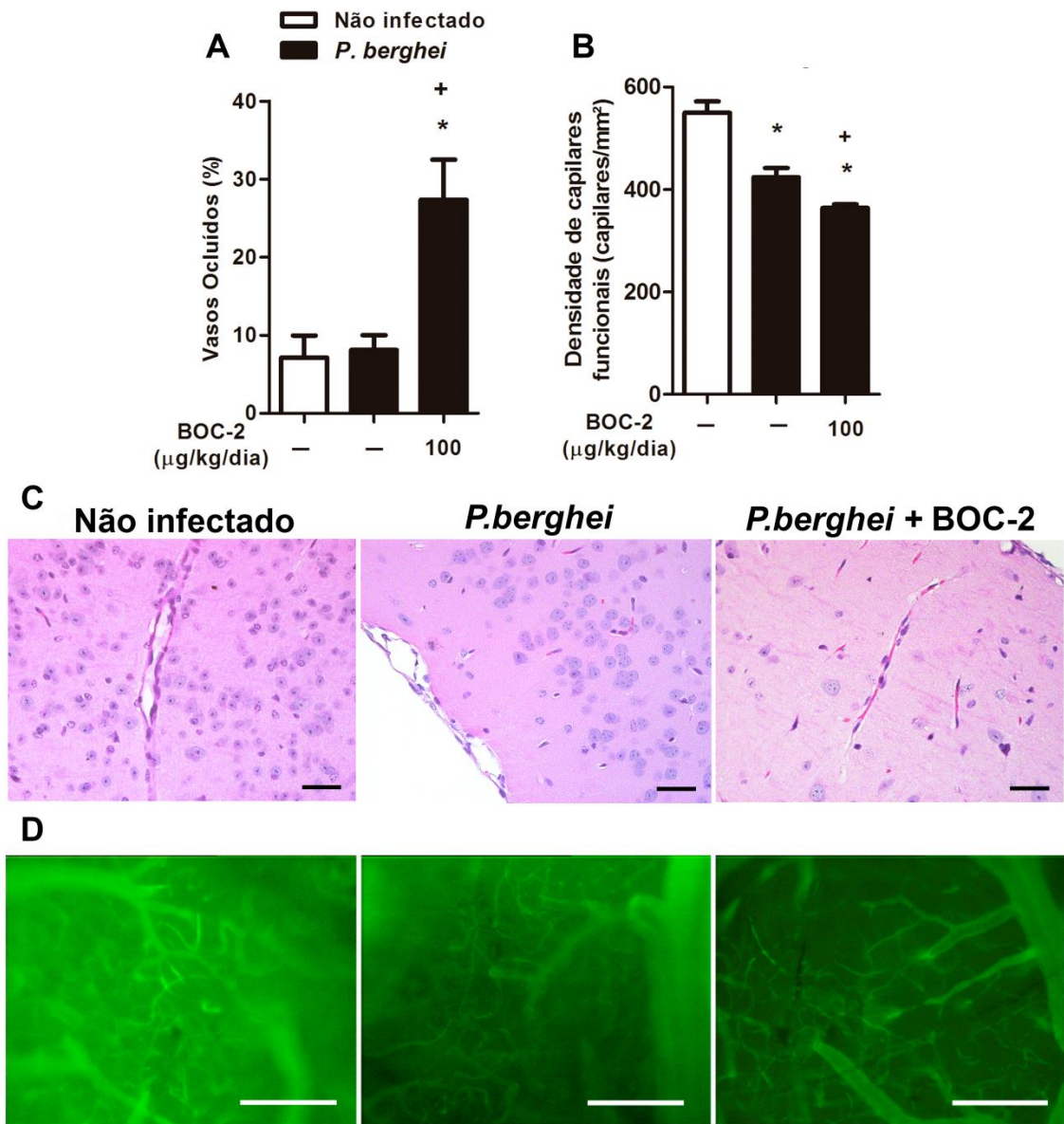
Considerando que o pré-tratamento com o BOC-2 causou extravasamento proteico nos cérebros dos camundongos Balb/C, foi investigado o efeito desta substância na função das células endoteliais da microcirculação do córtex cerebral desses animais.

Através da técnica de microscopia intravital foi observado que a infecção por *PbA* aumentou tanto o número de leucócitos em *rolling* (Figura 4.4 A) e aqueles aderidos à parede endotelial das vênulas pós-capilares do córtex cerebral (Figura 4.4 B e D) em comparação aos animais não infectados (Figura 4.4 A, B, D). O tratamento com o BOC-2 não alterou o aumento desses parâmetros durante a infecção (Figura 4.4 A, B, D). Já a análise do *score* do acúmulo de hemácias na microvasculatura cerebral em cortes histológicos por microscopia de luz, demonstrou que a infecção por *PbA* também foi capaz de aumentar a adesão de hemácias ao endotélio em comparação aos animais não infectados (Figura 4.4 C e E). Nesta avaliação, o tratamento com BOC-2 aumentou ainda mais o acúmulo de hemácias no leito vascular desses animais em comparação ao grupo infectado sem tratamento (Figura 4.4 C e E).

Corroborando com o aumento da acúmulo de hemácias, o tratamento com o BOC-2 aumentou também a porcentagem de vasos ocluídos nos cérebros de camundongos Balb/C quando comparado com os animais infectados sem tratamento (Figura 4.5 A e C). Vale ressaltar que a infecção por *PbA* não induziu alteração na oclusão de vasos nos camundongos Balb/C (Figura 4.5 A e C). Pela microscopia intravital ainda se observou a diminuição na densidade de capilares funcionais (capilares espontaneamente perfundidos) durante a infecção com o *PbA* (Figura 4.5 B e D) que foi ainda mais diminuído após o tratamento com BOC-2 (Figura 4.5 B e D).



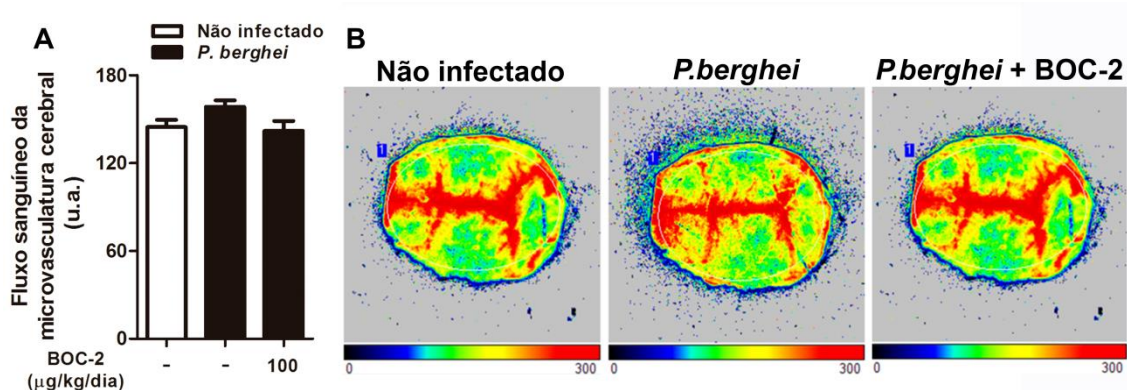
**Figura 4.4 Avaliação do tratamento com BOC-2 na aderência de leucócitos e hemácias na microvasculatura do córtex cerebral.** Camundongos Balb/C não infectados, infectados com *PbA* sem tratamento e infectados com *PbA* e tratados com BOC-2 (100 µg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). Análises realizadas por microscopia intravital observando-se **(A)** o número de leucócitos em *rolling* e **(B)** de leucócitos aderidos no leito vascular. **(C)** Análise semiquantitativa por microscopia de luz da microvasculatura da pia mater do córtex cerebral com hemácias infectadas (40 campos consecutivos em aumento de 1000x). **(D)** Imagens representativas dos leucócitos e **(E)** hemácias aderidas a microvasculatura da pia mater (Barras = 100 µm). Os resultados foram expressos como média ± EPM de 4 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).



**Figura 4.5 Avaliação do tratamento com BOC-2 na oclusão da microvasculatura do córtex cerebral.** Camundongos Balb/C não infectados, infectados com *PbA* sem tratamento e infectados com *PbA* e tratados com BOC-2 (100 µg/kg/dia, i.p.), foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). **(A)** Análise histológica da microvasculatura cerebral. Quantificação da porcentagem (40 campos consecutivos em aumento de 400x, Barras = 20 µm) de vasos ocluídos da microvasculatura da pia mater. **(B)** Análise realizada por microscopia intravital observando-se a densidade de capilares funcionais. **(C)** Imagens representativas dos vasos ocluídos e **(D)** da densidade de capilares funcionais da microvasculatura da pia mater (Barras = 100 µm). Os resultados foram expressos como média ± EPM de 4 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).

#### 4.2.3 Efeito do tratamento com BOC-2 no fluxo microvascular do córtex cerebral de camundongos resistentes à malária cerebral

Uma vez observado que o tratamento com o BOC-2 diminuiu diretamente a densidade capilar funcional no córtex cerebral, foi investigada se essa diminuição estava relacionada à alteração do fluxo sanguíneo de toda a superfície microvascular no córtex cerebral pela técnica de *laser speckle*. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os animais infectados por *PbA* em comparação com os animais saudáveis (Figura 4.6 A,B), nem quando os animais infectados foram tratados com o BOC-2 (Figura 4.6 A,B). Sugerindo assim que a modulação do receptor FPR2/ALXR tem um efeito direto apenas no fluxo capilar do córtex cerebral de camundongos Balb/C.



**Figura 4.6 Avaliação do tratamento com BOC-2 no fluxo microvascular do córtex cerebral.** Camundongos Balb/C foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). Análise realizada por *Laser speckle* observando (A) o fluxo sanguíneo na microvasculatura do córtex cerebral. (B) Imagens representativas de animais não infectados, infectados com *PbA* sem tratamento e infectados com *PbA* e tratados com BOC-2 (100 µg/kg/dia, i.p.). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 4 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### **4.3. Avaliação do efeito do pré-tratamento com a LXA<sub>4</sub> na malária cerebral induzida por *P.berghei* ANKA**

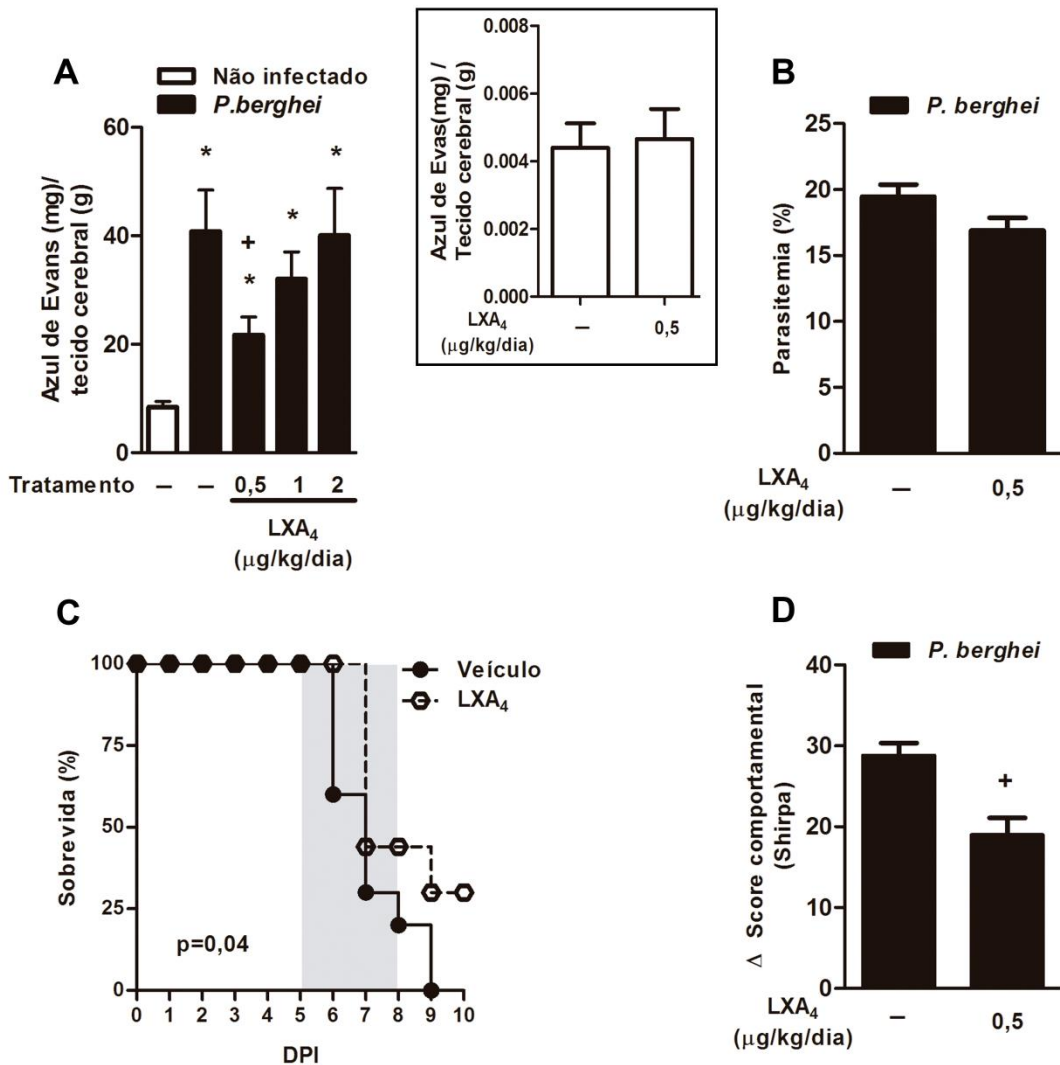
Até o momento foi demonstrado que o bloqueio da sinalização dos receptores FPRs reverte a resistência de camundongos Balb/C ao desenvolvimento da malária cerebral. Principalmente com o aumento da disfunção endotelial e da conseqüentemente quebra da barreira hemato-encefálica. Ademais, camundongos C57BL/6 apresentaram níveis mais baixos de LXA<sub>4</sub> endógena. Considerando esses resultados, foi investigado se o pré-tratamento com LXA<sub>4</sub> sintética, um agonista exógeno do FPR2/ALXR, poderia alterar a suscetibilidade de camundongos C57BL/6 à MCE.

#### **4.3.1 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> durante o desenvolvimento da malária cerebral induzida por *P. berghei* ANKA**

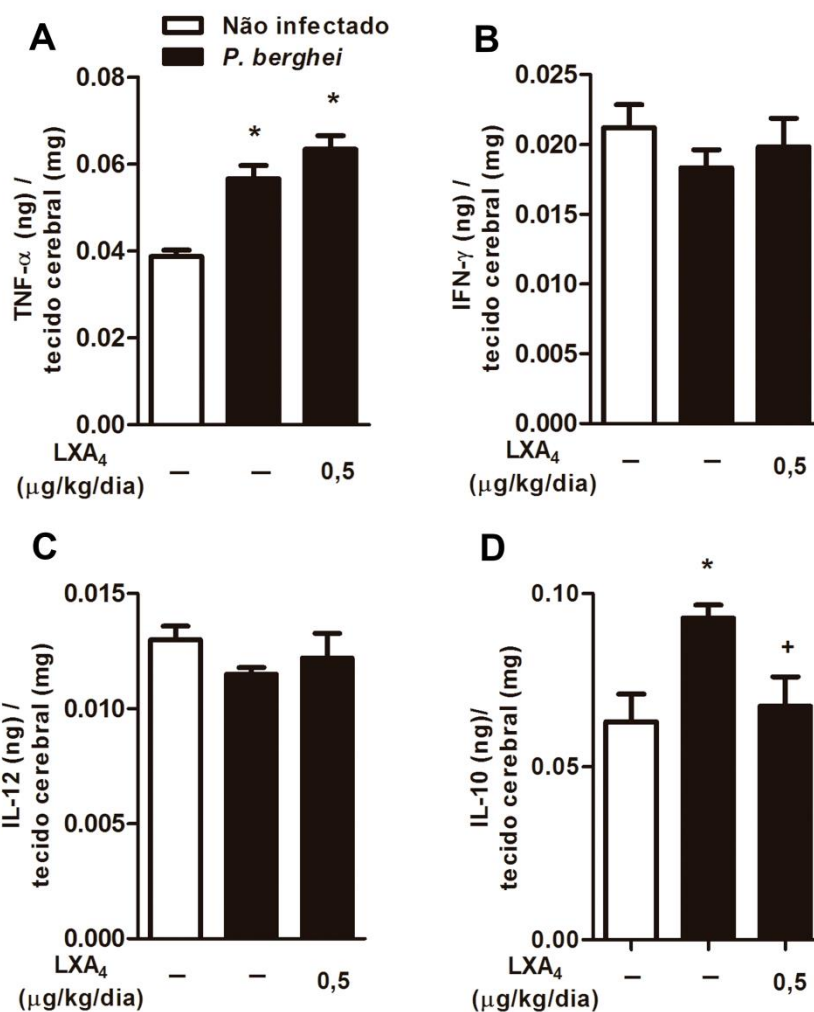
O tratamento com a LXA<sub>4</sub> preveniu a formação do edema cerebral causado pela infecção com *PbA* em camundongos C57BL/6 de maneira dose dependente, onde foi observada inibição apenas na dose de 0,5 µg/kg/dia (Figura 4.7 A). Essa mesma dose não alterou a permeabilidade da barreira hematoencefálica em animais não infectados (Figura 4.7 A, *insert*). A inibição do edema cerebral não foi causada pela diminuição da parasitemia uma vez que a LXA<sub>4</sub> não alterou a contagem de parasitas no sangue periférico (Figura 4.7 B). Além de atenuar o edema, o tratamento com a LXA<sub>4</sub> foi capaz de diminuir os danos cognitivos observados durante a malária cerebral (Figura 4.7 D) o que refletiu no aumento da sobrevivência dos animais infectados no período de tempo em que se observa morte por malária cerebral (5-9 dias após a infecção, área em cinza na Figura 4.7 C).

Além disso, a infecção com *PbA* aumentou a produção de TNF-α (Figura 4.8 A) e de IL-10 (Figura 4.8 D), porém não alterou os níveis de IFN-γ (Figura 4.8 B) e IL-12 (Figura 4.8 C) no tecido cerebral desses animais em comparação com animais não infectados. O tratamento com a LXA<sub>4</sub> apenas inibiu a produção de IL-10 (Figura 4.8 D) no cérebro em comparação com os animais infectados que não receberam nenhum tratamento.





**Figura 4.7 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> durante a infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6.** Camundongos C57BL/6 infectados com *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal) tratados ou não com LXA<sub>4</sub> (0,5 μg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção (DPI). **(A)** Efeito do pré-tratamento com diferentes doses de LXA<sub>4</sub> (0,5-2 μg/kg/dia, i.p.) no extravasamento proteico no tecido cerebral; **(B)** parasitemia; **(C)** curva de sobrevivência e **(D)** análises comportamentais. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. A análise das curvas de sobrevivências foi realizada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicadas por (+).



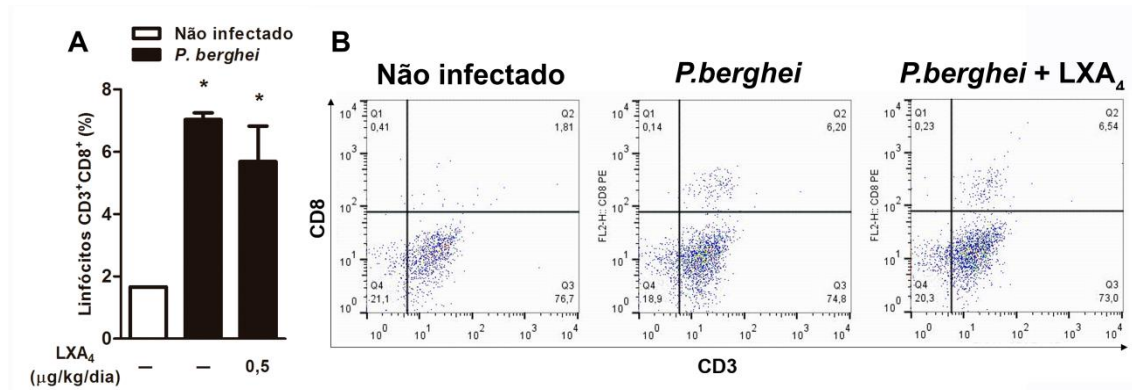
**Figura 4.8 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na produção de citocinas no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 durante a infecção por *PbA*.** Animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 μg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de 5x10<sup>6</sup> hemácias infectadas/por animal). As produções das citocinas **(A)** TNF-α, **(B)** IFN-γ, **(C)** IL-12 e **(D)** IL-10 foram mensuradas em tecido cerebral por ELISA. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 3 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).



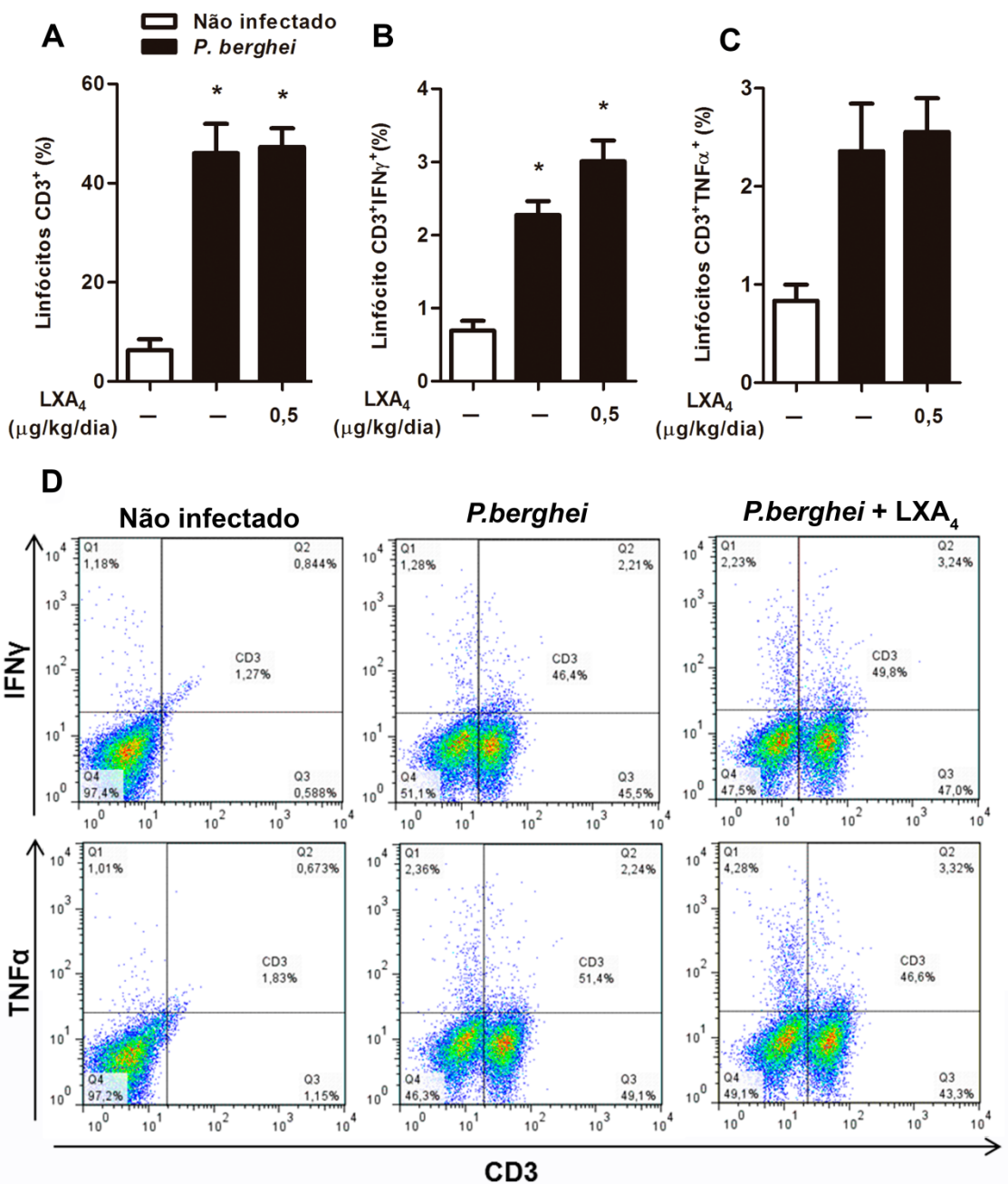
#### **4.3.2 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> no acúmulo e ativação de linfócitos durante a malária cerebral**

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são os principais mononucleares observados na microvasculatura cerebral durante a infecção por *PbA* (66). Corroborando com a literatura, em nosso modelo foi observado o acúmulo de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tecido cerebral dos animais durante a infecção com *PbA* (Figura 4.9 A e B). Entretanto o tratamento com LXA<sub>4</sub> não foi capaz de diminuir o acúmulo desse subtipo de linfócitos (Figura 4.9 A e B).

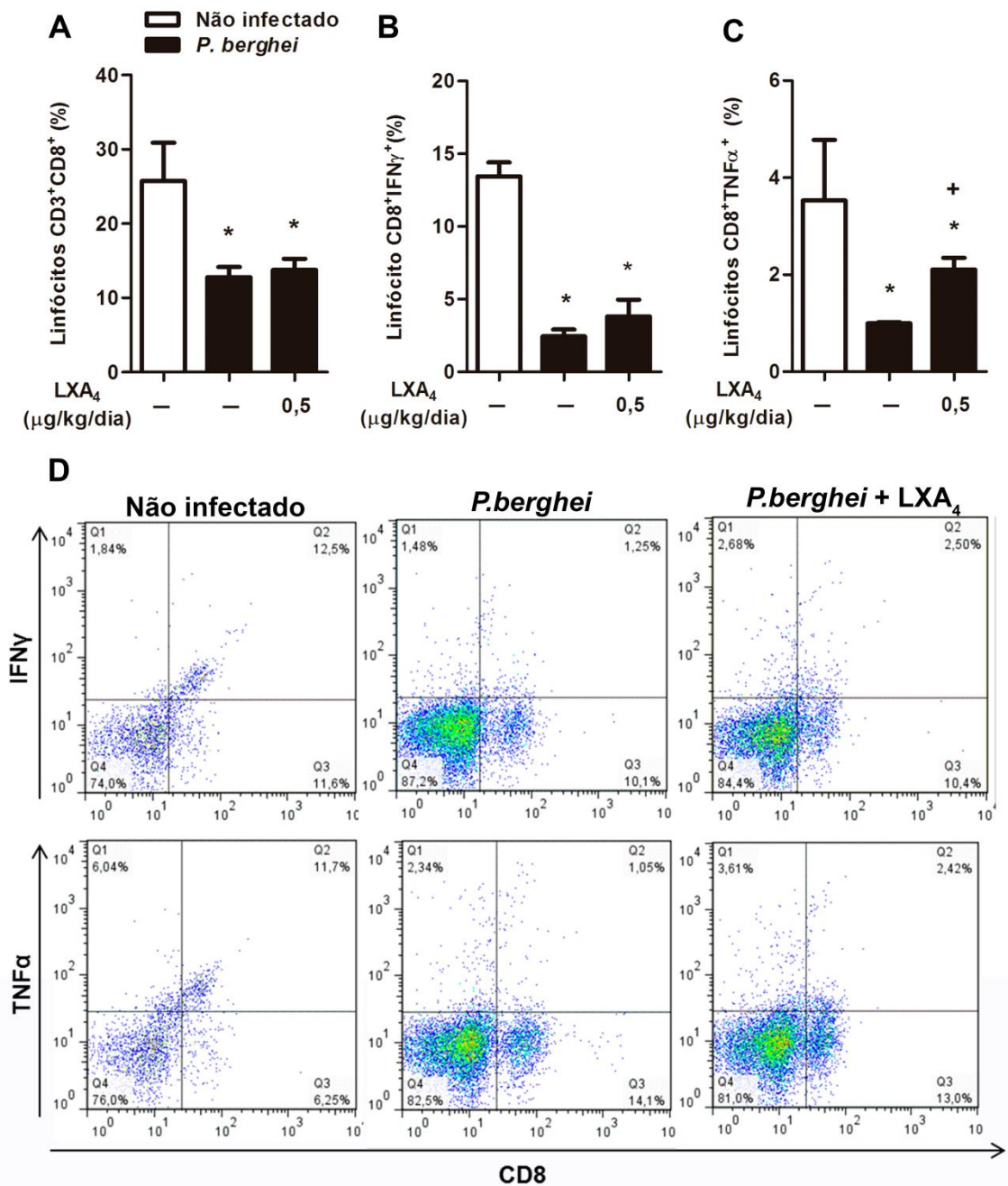
Para se investigar o efeito do pré-tratamento com a LXA<sub>4</sub> na ativação sistêmica dos linfócitos, avaliamos o acúmulo e a produção de citocinas por linfócitos T nos baços de camundongos C57BL/6 infectados com *PbA*. Foi observada durante a infecção por *PbA* aumento do número de linfócitos TCD3<sup>+</sup> no baço de camundongos C57BL/6, porém o tratamento com a LXA<sub>4</sub> não alterou esse aumento. (Figura 10 A). Nos animais infectados também foi observado o acúmulo de células TCD3<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> (Figura 4.10 B e D) mas não de células TCD3<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup> (Figura 4.10 C e D) em comparação aos animais saudáveis. O tratamento com LXA<sub>4</sub> não teve efeito sobre o acúmulo de nenhuma dessas duas populações de linfócitos (Figura 4.10 B, C e D). Também durante a infecção ocorreu tanto a diminuição do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 4.11 A), como o acúmulo de células TCD8<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> (Figura 4.11 B e D) e TCD8<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup> (Figura 4.11 C e D) em comparação aos animais saudáveis. O tratamento com LXA<sub>4</sub> não alterou a diminuição do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 4.11 A), nem a produção de IFN-γ por células TCD8<sup>+</sup> (Figura 4.11 B e D). A LXA<sub>4</sub> apenas preveniu em parte a diminuição de células TCD8<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup> quando comparada com o grupo infectado sem tratamento (Figura 4.11 C e D).



**Figura 4.9 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> no acúmulo de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no cérebro de animais infectados com *PbA*.** Animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 μg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de 5x10<sup>6</sup> hemácias infectadas/por animal). Os linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram avaliados por citometria de fluxo. Os dot plots são representativos de cada grupo experimental. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas (p ≤ 0,05) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*).



**Figura 4.10** Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> no acúmulo de linfócitos T CD3<sup>+</sup> no baço de animais infectados com *PbA*. Animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 μg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de 5x10<sup>6</sup> hemácias infectadas/por animal). **(A)** População de linfócitos TCD3<sup>+</sup> total e produtora de **(B)** IFN-γ ou **(C)** TNF-α. Os dot plots são representativos de cada grupo experimental. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas (p ≤ 0,05) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).



**Figura 4.11** Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> no acúmulo de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no baço de animais infectados com *PbA*. Animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 μg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de 5x10<sup>6</sup> hemácias infectadas/por animal). **(A)** População de linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> total e produtora de **(B)** IFN-γ ou **(C)** TNF-α. Os dot plots são representativos de cada grupo experimental. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas (p ≤ 0,05) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).

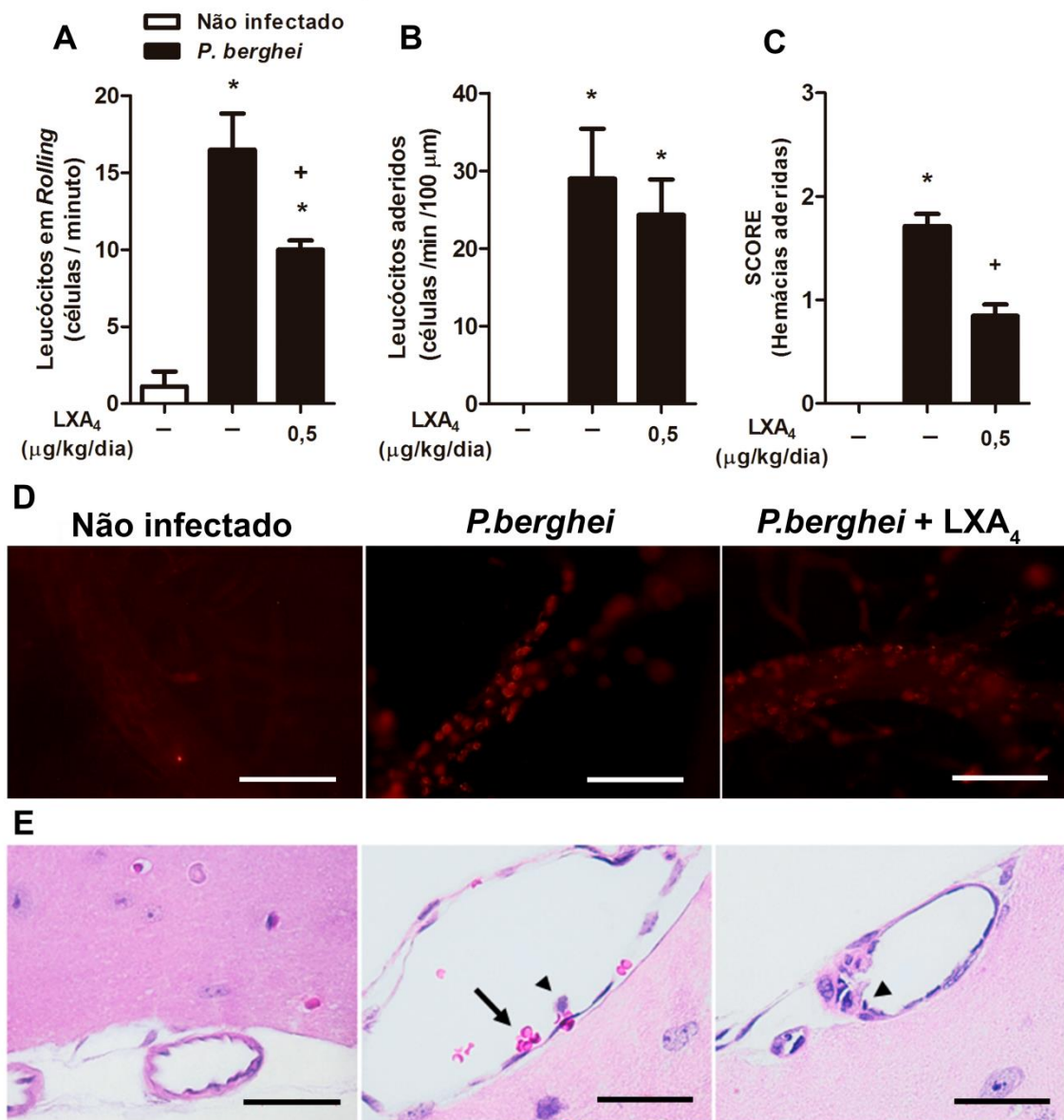
### **4.3.3 Efeito do tratamento com LXA<sub>4</sub> na disfunção da microvasculatura do córtex cerebral**

Uma vez observado que a LXA<sub>4</sub> não é capaz de alterar o acúmulo de linfócitos no cérebro, avaliamos se a melhora no quadro inflamatório cerebral seria devido à modulação da interação leucócito-endotélio induzida pela malária cerebral. Através da técnica de microscopia intravital podemos observar que a infecção pelo *PbA* induziu o aumento do número de leucócitos em *rolling* (Figura 4.12 A) e aderidos (Figura 4.12 B e D) à parede endotelial de vênulas pós-capilares do endotélio cerebral. O tratamento com a LXA<sub>4</sub> diminuiu o número dos leucócitos em *rolling* (Figura 4.12 A), porém não impediu a adesão dos leucócitos na parede endotelial (Figura 4.12 B e D). Já na análise histológica dos cérebros, foi observado que a infecção com *PbA* também aumentou a associação de hemácias ao endotélio vascular (Figura 4.12 C e E) e o tratamento com LXA<sub>4</sub> preveniu esse evento (Figura 4.12 C e E).

Os resultados anteriores sugerem que a LXA<sub>4</sub> pode atuar sobre o endotélio principalmente nos capilares cerebrais. De fato, a infecção com o *PbA* aumentou o número de vasos sanguíneos ocluídos no cérebro dos animais infectados (Figura 4.13 A e C) e o tratamento com a LXA<sub>4</sub> foi capaz de prevenir a oclusão desses vasos sanguíneos (Figura 4.13 A e C). Com o intuito de confirmar o efeito da LXA<sub>4</sub> sobre o endotélio, foi realizado um ensaio de funcionalidade capilar. Durante a infecção com o *PbA* foi observado diminuição da densidade de capilares funcionais (capilares espontaneamente perfundidos) (Figura 4.13 B e D). O tratamento com LXA<sub>4</sub> preveniu a disfunção endotelial, aumentando a densidade de capilares funcionais (Figura 4.13 B e D) em comparação com os animais infectados que não receberam o tratamento.

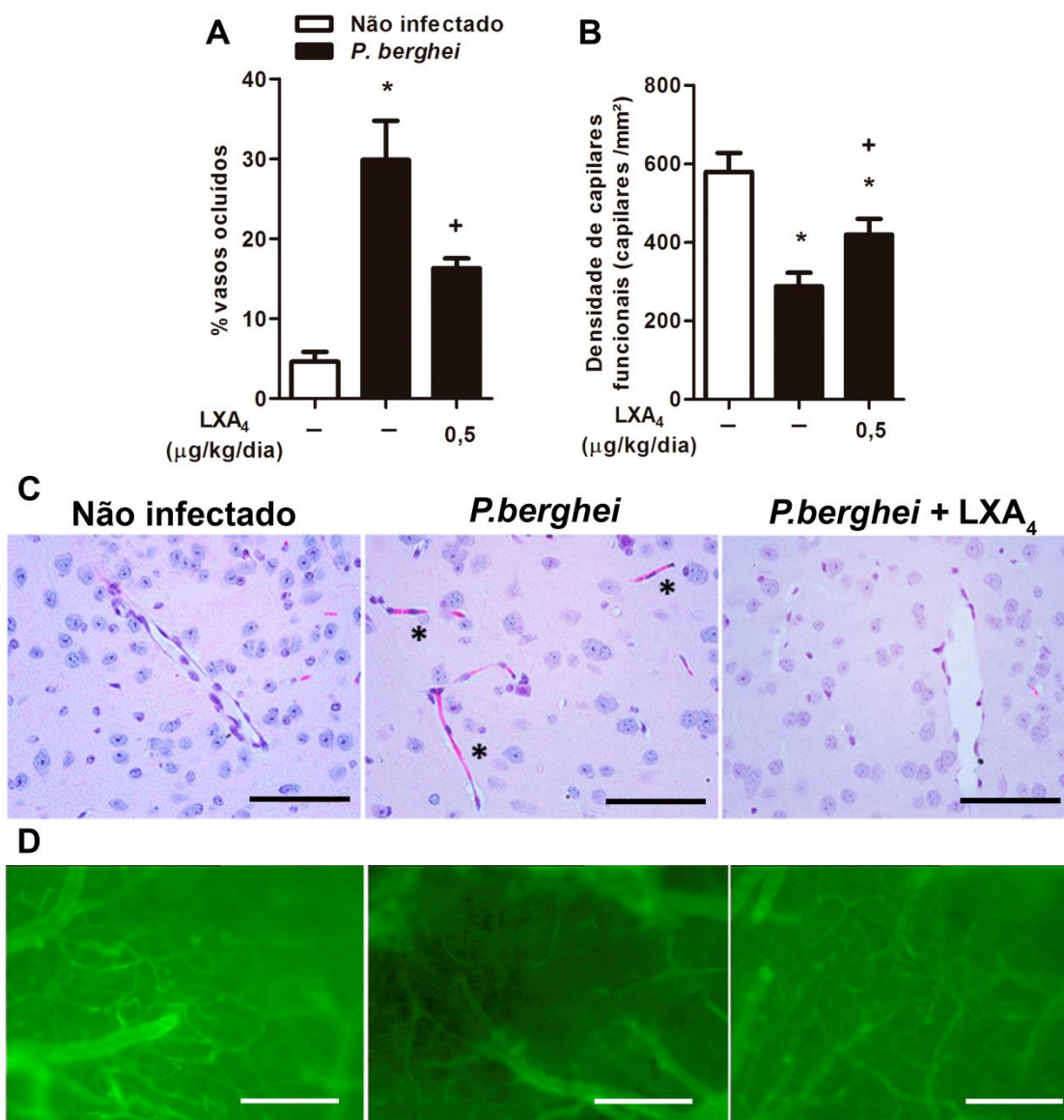
A disfunção dos vasos sanguíneos também é caracterizada pela perda da sua capacidade de distensão e contração na presença de substâncias vasoativas. A acetilcolina provoca a distensão do vaso, ou seja, uma variação positiva dos vasos sanguíneos como o observado nos animais não infectados (Figura 4.14 A, B e E). Entretanto, durante a infecção com *PbA* a administração de acetilcolina não teve ação de distensão vascular como nos animais não infectados. Os vasos sanguíneos dos animais infectados não foram capazes de se dilatar na presença dessa substância o que demonstra disfunção das células endoteliais. Ao contrário, foi observada contração (variação negativa) desses vasos sanguíneos (Figura 4.14 A,

C e F). Já o tratamento com LXA<sub>4</sub> não preveniu significativamente a contração desses vasos frente ao estímulo da acetilcolina (Figura 4.14 A, D e G).



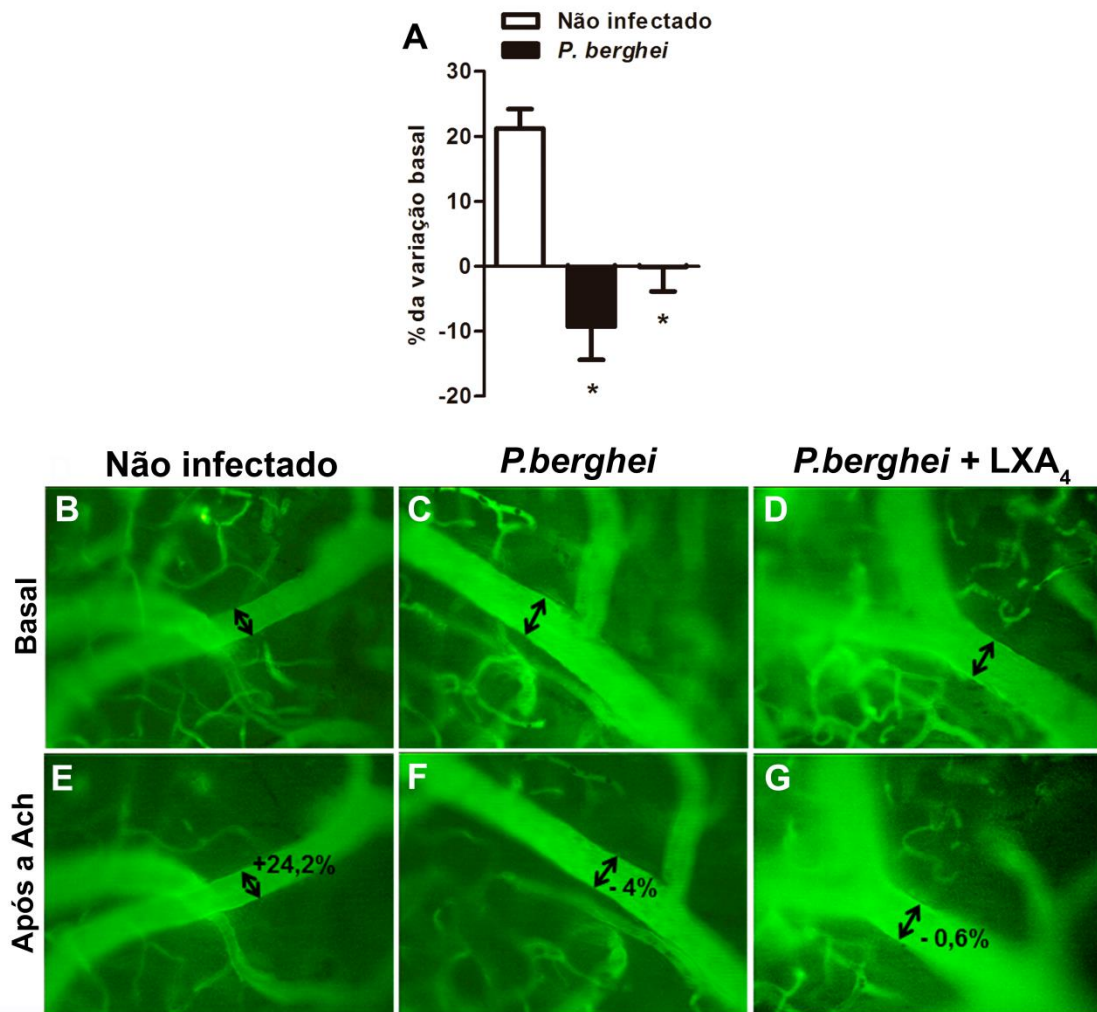
**Figura 4.12 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na aderência de leucócitos e hemácias na microvasculatura do córtex cerebral.** Camundongos C57BL/6 não infectados, infectados com *PbA* sem tratamento e infectados com *PbA* e tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 μg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de 5x10<sup>6</sup> hemácias infectadas/por animal). Análises realizadas por microscopia intravital observando-se **(A)** o número de leucócitos em *rolling* e **(B)** de leucócitos aderidos no leito vascular. **(C)** Análise semi-quantitativa por microscopia de luz da microvasculatura da pia mater do córtex cerebral com hemácias infectadas (40 campos consecutivos em aumento de 1000x). **(D)** Imagens representativas dos leucócitos e **(E)** hemácias aderidas a microvasculatura da pia mater (Barras = 100 μm). Os resultados foram expressos como média ± EPM de 4 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).





**Figura 4.13 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> oclusão da microvasculatura do córtex cerebral.** Camundongos C57BL/6 não infectados, infectados com *PbA* sem tratamento e infectados com *PbA* e tratados com (0,5 μg/kg/dia, i.p.), foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). **(A)** Análise histológica da microvasculatura cerebral. Quantificação da porcentagem (40 campos consecutivos em aumento de 400x, Barras = 20 μm) de vasos ocluídos da microvasculatura da pia mater. **(B)** Análise realizada por microscopia intravital observando-se a densidade de capilares funcionais. **(C)** Imagens representativas dos vasos ocluídos e **(D)** da densidade de capilares funcionais da microvasculatura da pia mater (Barras = 100 μm). Os resultados foram expressos como média ± EPM de 4 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).





**Figura 4.14 Efeito do tratamento com LXA<sub>4</sub> na resposta vascular à acetilcolina (Ach) durante a malária cerebral.** Camundongos C57BL/6 foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). **(A)** Análise realizada por microscopia intravital observando-se porcentagem de variação basal após administração de acetilcolina. Imagens representativas de animais não infectados **(B, E)**, infectados com *PbA* sem tratamento **(C, F)** e infectados com *PbA* e tratados com (0,5 µg/kg/dia, i.p.) **(D, G)**. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).

#### **4.3.4 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na modulação de marcadores de ativação de endotélio cerebral**

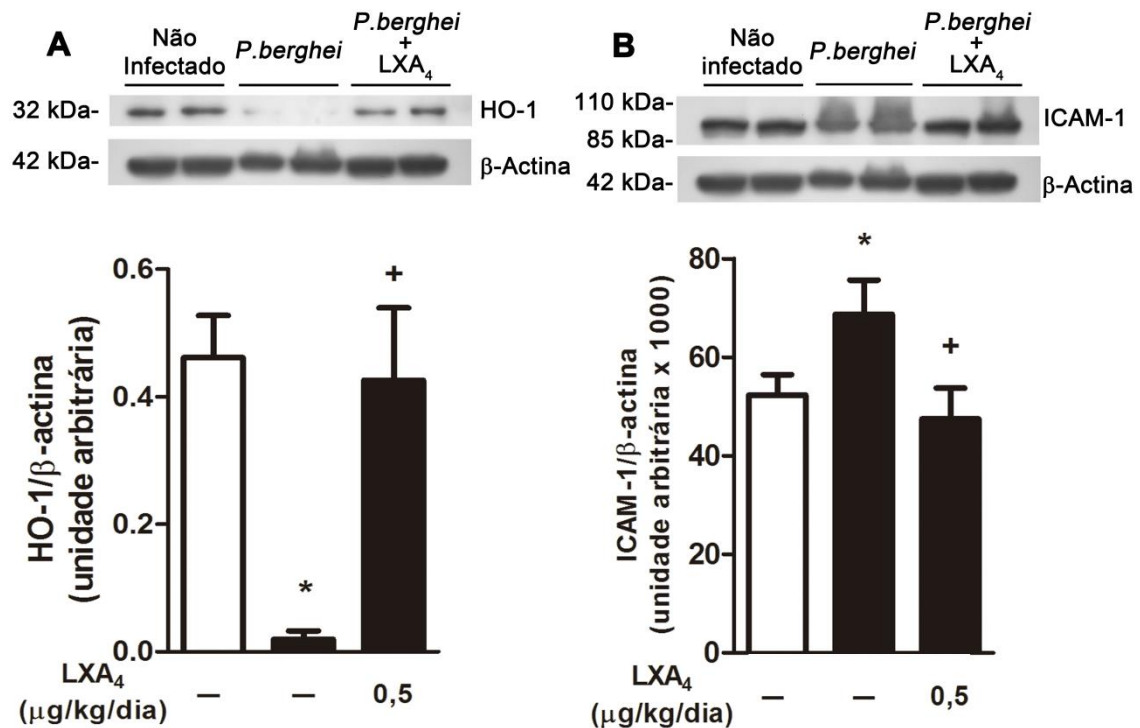
Para avaliar o efeito da LXA<sub>4</sub> no endotélio cerebral de camundongos infectados com *PbA*, foram utilizados dois marcadores de ativação: a ICAM-1 e a HO-1. A infecção com *PbA* diminuiu a expressão de HO-1 no tecido cerebral em comparação com os animais não infectados (Figura 4.15 A). Já o tratamento com LXA<sub>4</sub> preveniu essa diminuição mantendo os níveis basais durante a infecção, sugerindo um efeito protetor desse eicosanoide no tecido cerebral (Figura 4.15 A). Corroborando com esse resultado, animais infectados com *PbA* apresentaram aumento de ICAM-1 e o tratamento com LXA<sub>4</sub> impediu o aumento dessa molécula de adesão no tecido cerebral (Figura 4.15 B).

Para investigar se o efeito da LXA<sub>4</sub> sobre endotélio cerebral de camundongos infectados com *PbA* é por um mecanismo direto de modulação da HO-1 e ICAM-1. A linhagem de células endoteliais murina (tEND-1) foi estimulada com hemácias de camundongos parasitadas por *PbA* (Figura 4.16). Essa estimulação aumentou a expressão de HO-1 em comparação com as células endoteliais murinas estimuladas com hemácias não parasitadas, e o pré-tratamento com LXA<sub>4</sub> aumentou ainda mais a expressão de HO-1 (Figura 4.16 A). Corroborando com os resultados *in vivo* observou-se também o aumento da expressão de ICAM-1 nas células tEND-1 estimuladas hemácias murinas parasitadas por *PbA* e o pré-tratamento com LXA<sub>4</sub> inibiu parcialmente esse aumento (Figura 4.16 B). Vale ressaltar que essa inibição da LXA<sub>4</sub> foi revertida com o pré-tratamento com o BOC-2 o que demonstra a participação do receptor FPR2/ALXR nesse processo (Figura 4.16 B).

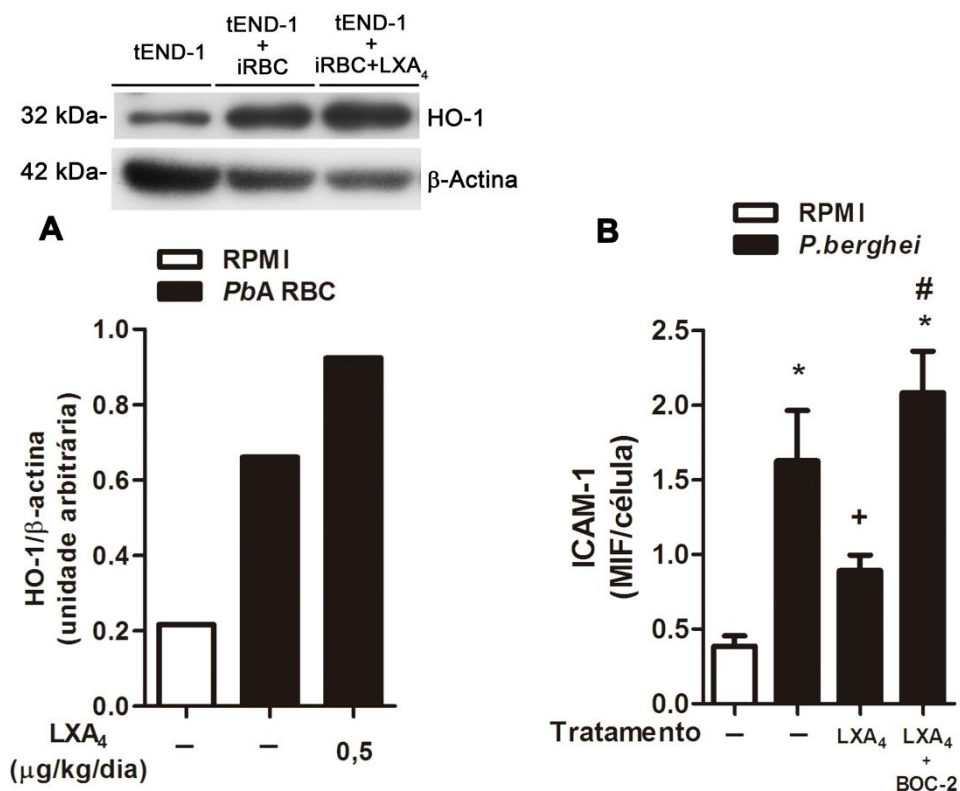
Para confirmar se a LXA<sub>4</sub> também seria capaz de alterar a expressão de HO-1 e ICAM-1 em células endoteliais humanas durante o modelo experimental de infecção por *P. falciparum* (*Pf*) *in vitro*, a linhagem de células endoteliais humana (ECV-304) foi estimulada com hemácias humanas parasitadas por *Pf* (Figura 4.17). A estimulação de células ECV-304 por hemácias humanas parasitadas por *Pf* não alterou a expressão de HO-1 em comparação com as células endoteliais estimuladas com hemácias não parasitadas, porém o tratamento com LXA<sub>4</sub> aumentou mais uma vez a expressão de HO-1 (Figura 4.17 A). De forma semelhante ao observado nas células endoteliais murinas, o estímulo com hemácias humanas parasitadas por *Pf* aumentou a expressão de ICAM-1 nas células ECV-304 e o pré-

tratamento com LXA<sub>4</sub> inibiu esse aumento. Mais uma vez a inibição da LXA<sub>4</sub> foi revertida com o pré-tratamento com o BOC-2 (Figura 4.17 B).

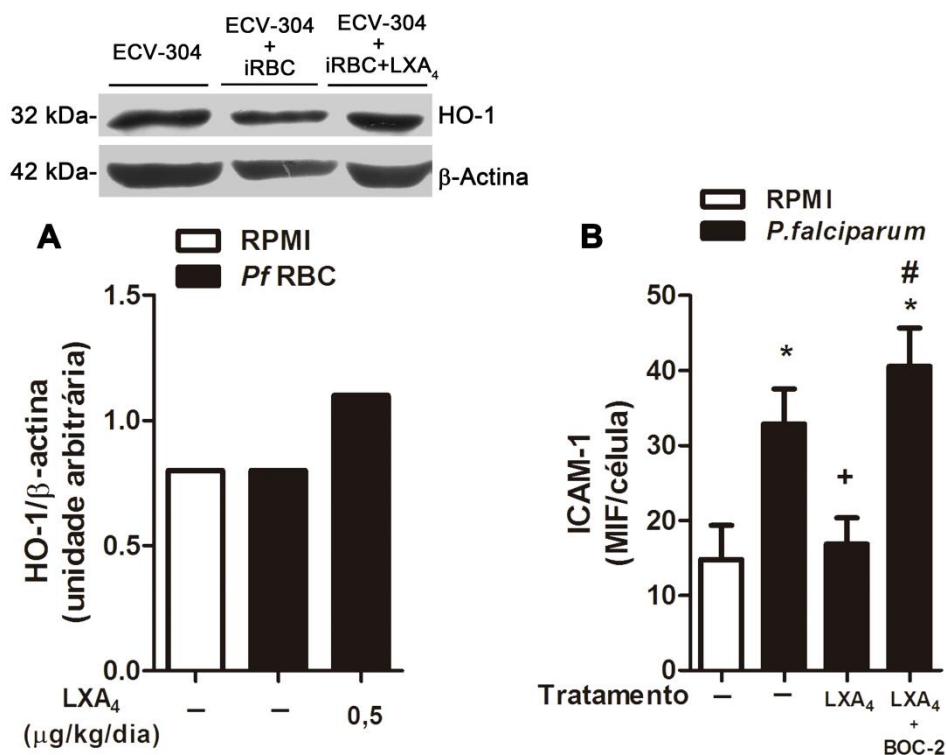
Uma vez demonstrado o mecanismo pelo qual a LXA<sub>4</sub> atua nas células endoteliais, foi investigado como as alterações de HO-1 e ICAM-1 durante a malária afetariam a função endotelial. As células endoteliais murinas e humanas foram incubadas com *PbA* (Figura 4.18 A) ou com *Pf* (Figura 4.18 A) respectivamente, o que resultou na indução de adesão das hemácias ao endotélio em ambos os tipos celulares. O tratamento com LXA<sub>4</sub> tanto em células endoteliais murinas quanto nas células humanas diminuiu essa citoaderência (Figura 4.18 A, B, D e H) em comparação com as células estimuladas sem pré-tratamentos (Figura 4.18 A, B, C e G). Além disso, a diminuição no índice de adesão foi revertida pelo pré-tratamento com BOC-2 (Figura 4.18 A, B, E e I) e pelo tratamento concomitante com o inibidor da atividade da HO-1, ZnPPiX (Figura 4.18 A, B, F e J). Esses dados assim sugerem que a ação da LXA<sub>4</sub> na modulação de ICAM-1 em células endoteliais acontece via HO-1.



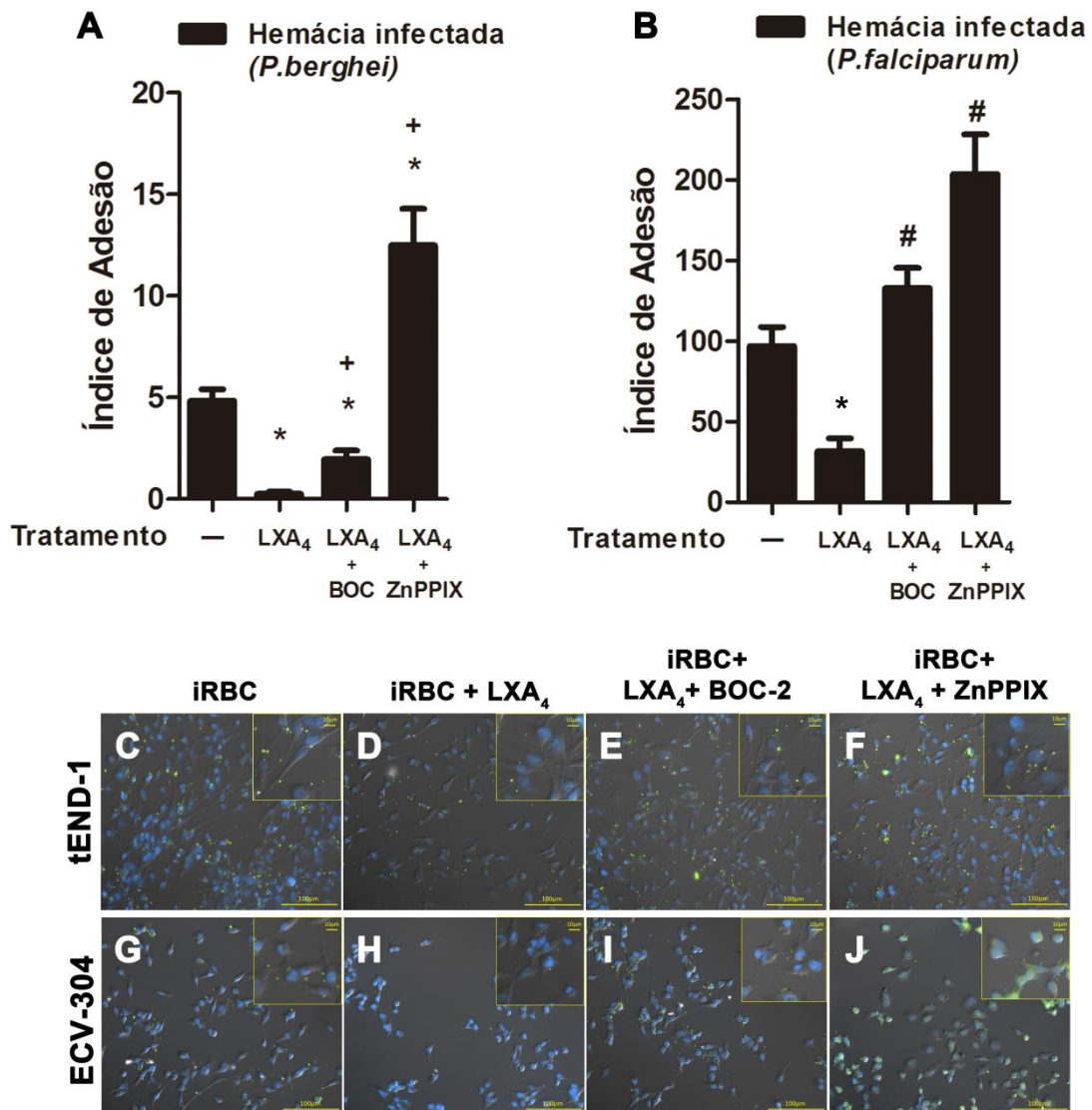
**Figura 4.15 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na modulação da expressão de marcadores de ativação endotelial durante a malária cerebral.** Camundongos C57BL/6 foram avaliados após 5 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). Análises da expressão de **(A)** HO-1 e de **(B)** ICAM-1 foram realizadas por *Western blotting*. Blotting representativo de dois animais de três experimentos diferentes. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).



**Figura 4.16 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na modulação da expressão de marcadores de ativação endotelial murina *in vitro*.** Linhagem de células endoteliais murina TEND-1 estimuladas com hemácias parasitadas por *P.berghei* ANKA (50:1) foram avaliados após 1h do estímulo. Análise da expressão de **(A)** HO-1 por *Western blotting* e de **(B)** ICAM-1 demonstrada por análise da imunofluorescência. *Blotting* representativo de um experimento. Os resultados da fluorescência foram expressos como média de intensidade de fluorescência ± EPM (n=3 por grupo) de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).



**Figura 4.17 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na modulação da expressão de marcadores de ativação endotelial humana *in vitro*.** Linhagem de células endoteliais humana ECV-304 estimuladas com hemácias parasitadas por *P.falciparum* (50:1) foram avaliados após 1h do estímulo. Análise da expressão de **(A)** HO-1 por *Western blotting* e de **(B)** ICAM-1 demonstrada por análise da imunofluorescência. Blotting representativo de um experimento. Os resultados da fluorescência foram expressos como média de intensidade de fluorescência ± EPM (n=3 por grupo) de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).



**Figura 4.18** Efeito do tratamento com LXA<sub>4</sub> na citoaderência *in vitro*. Análise do índice de adesão de **(A)** hemácias infectadas com *PbA* incubadas com células murinas (TEND-1) e de **(B)** hemácias infectadas com *Pf* incubadas com células humanas (ECV-304). **(C-J)** Imagens representativas das células endoteliais marcadas em azul com DAPI e as hemácias infectadas em verde contendo o *P. berghei* ANKA-GFP ou *P. falciparum* marcado com CFSE. Ambas as linhagens foram pré-tratadas com **(C e G)** RPMI; **(D e H)** LXA<sub>4</sub> (10nM); **(E e I)** LXA<sub>4</sub> (10 nM) e BOC-2 (40 nM) e **(F e J)** LXA<sub>4</sub> (10 nM) e ZnPPIX (50 μM). Os resultados da fluorescência foram expressos como média ± EPM (n=3 por grupo) de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas (p ≤ 0,05) em relação ao grupo infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (+ ou #).

#### **4.4. Efeito da LXA<sub>4</sub> exógena na M-SDRA induzida por *P.berghei* ANKA**

Durante a malária grave outros órgãos são acometidos além do cérebro, entre eles o pulmão. Desta forma a próxima etapa deste trabalho foi investigar se o pré-tratamento com LXA<sub>4</sub> sintética também teria efeito na lesão pulmonar causada pela infecção com *P. berghei* ANKA.

##### **4.4.1 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na disfunção pulmonar durante a malária grave induzida por *P. berghei* ANKA**

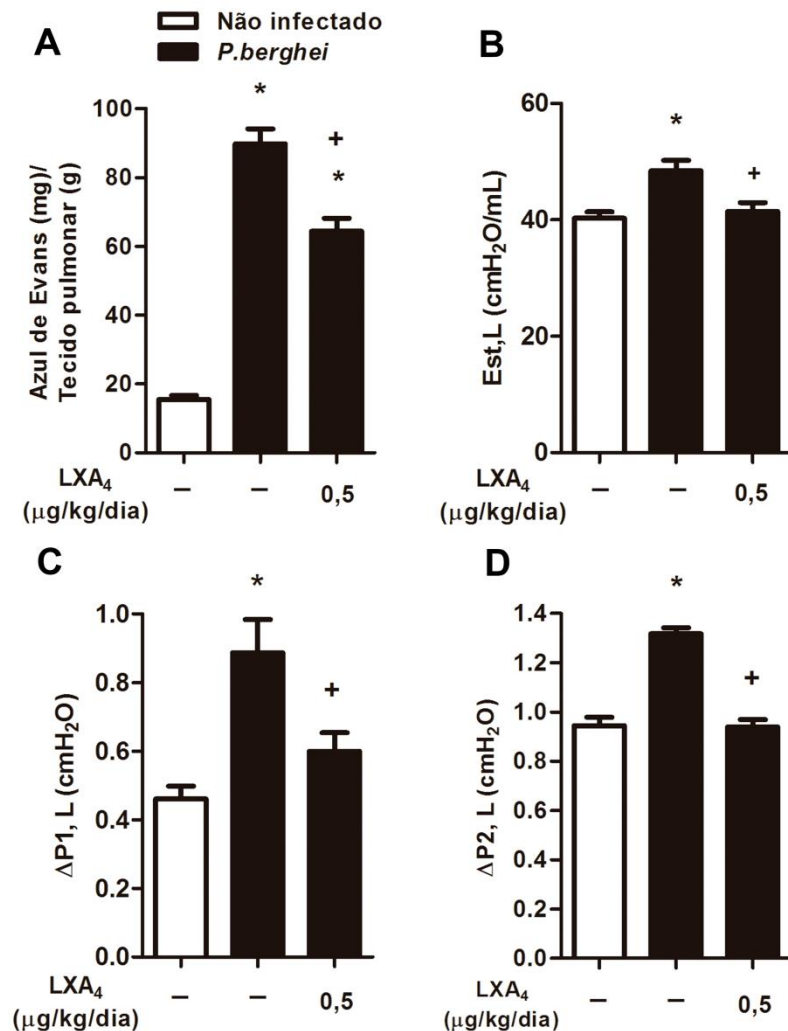
A infecção com *PbA* em camundongos C57BL/6 causou, após 6 dias, edema pulmonar (Figura 4.19 A) além da disfunção pulmonar caracterizada pelo aumento da elastância estática (Est) (Figura 4.19 B), da pressão de resistência ( $\Delta P_1$ ) (Figura 4.19 C) e da pressão viscoelástica ( $\Delta P_2$ ) (Figura 4.19 D). O pré-tratamento com a LXA<sub>4</sub> (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , i.p.) preveniu o aumento do edema pulmonar (Figura 4.19 A), assim como a elastância estática (Est) (Figura 4.19 B), e as pressões de vias aéreas centrais ( $\Delta P_1$ ) (Figura 4.19 C) e de vias aéreas distais ( $\Delta P_2$ ) (Figura 4.19 D).

Corroborando os resultados da função pulmonar, os animais saudáveis apresentaram a histoarquitetura pulmonar preservada (Figura 4.20 A-G) enquanto os camundongos infectados com *PbA* demonstraram aumento do colapso alveolar (Figura 4.20 B), espessura do septo alveolar (Figura 4.20 C), edema intersticial (Figura 4.20 D), infiltrado inflamatório (Figura 4.20 E) e aumento do dano alveolar difuso (DAD) (Figura 4.20 G). Todas essas alterações morfológicas foram atenuadas pelo tratamento com LXA<sub>4</sub> (Figura 4.20 A-G). Pela contagem dos neutrófilos presentes nos pulmões verificamos que a infecção pelo *PbA* aumentou o número desses polimorfonucleares no parênquima pulmonar quando comparado com os animais saudáveis (Figura 4.20 F), porém o tratamento com LXA<sub>4</sub> diminuiu a quantidade desses neutrófilos no tecido pulmonar dos animais infectados (Figura 4.20 F).

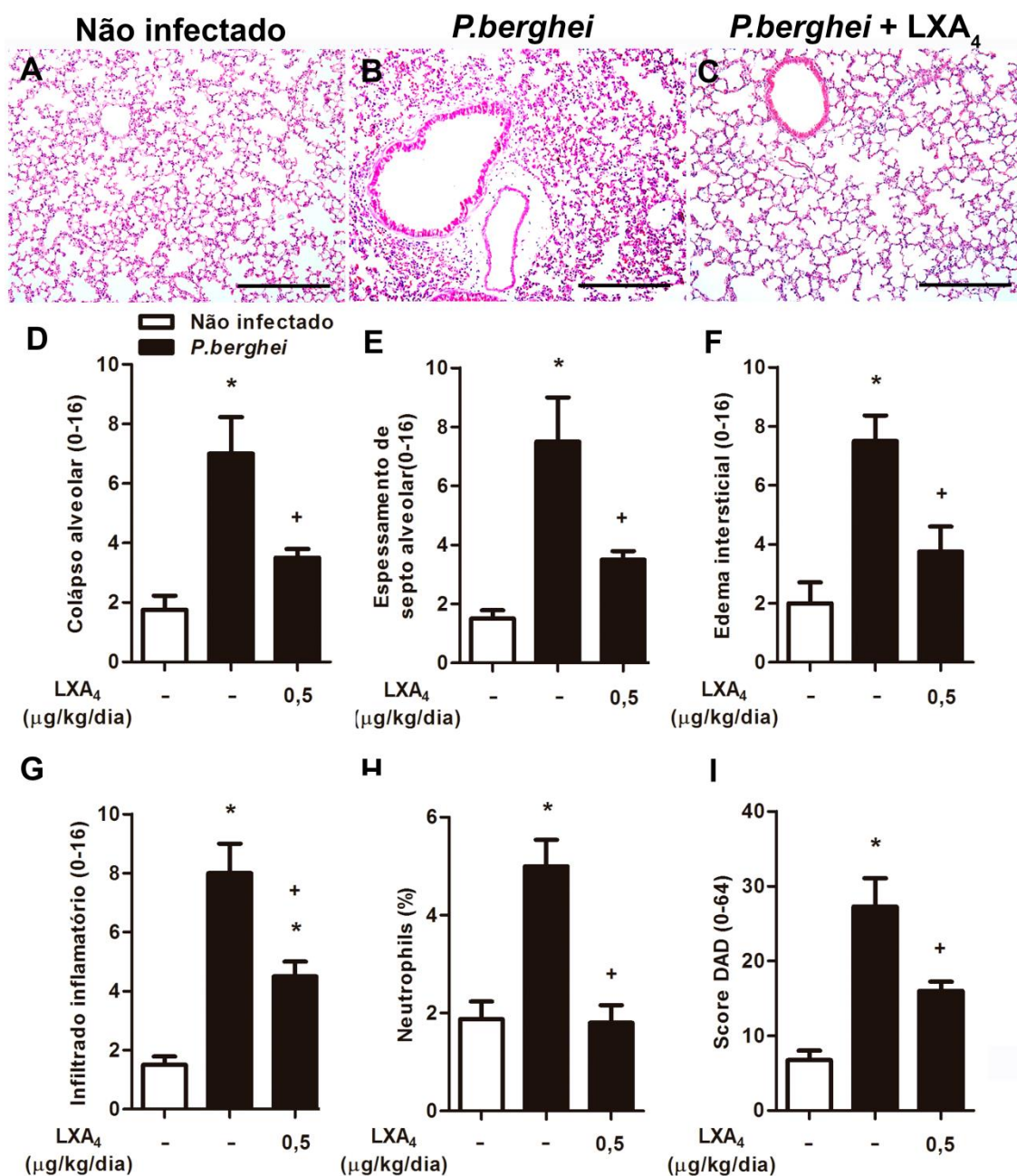
A infecção com *PbA* também aumentou a produção das citocinas IL-6 (Figura 4.21 A) e TNF- $\alpha$  (Figura 4.21 B), porém não alterou os níveis de IL-10 (Figura 4.21 C) no tecido pulmonar desses camundongos. Em relação as quimiocinas, observou-se um aumento de CXCL1 (Figura 4.21 D) e de CCL2 (Figura 4.21 F) nos pulmões dos animais infectados em comparação com animais não infectados. O tratamento



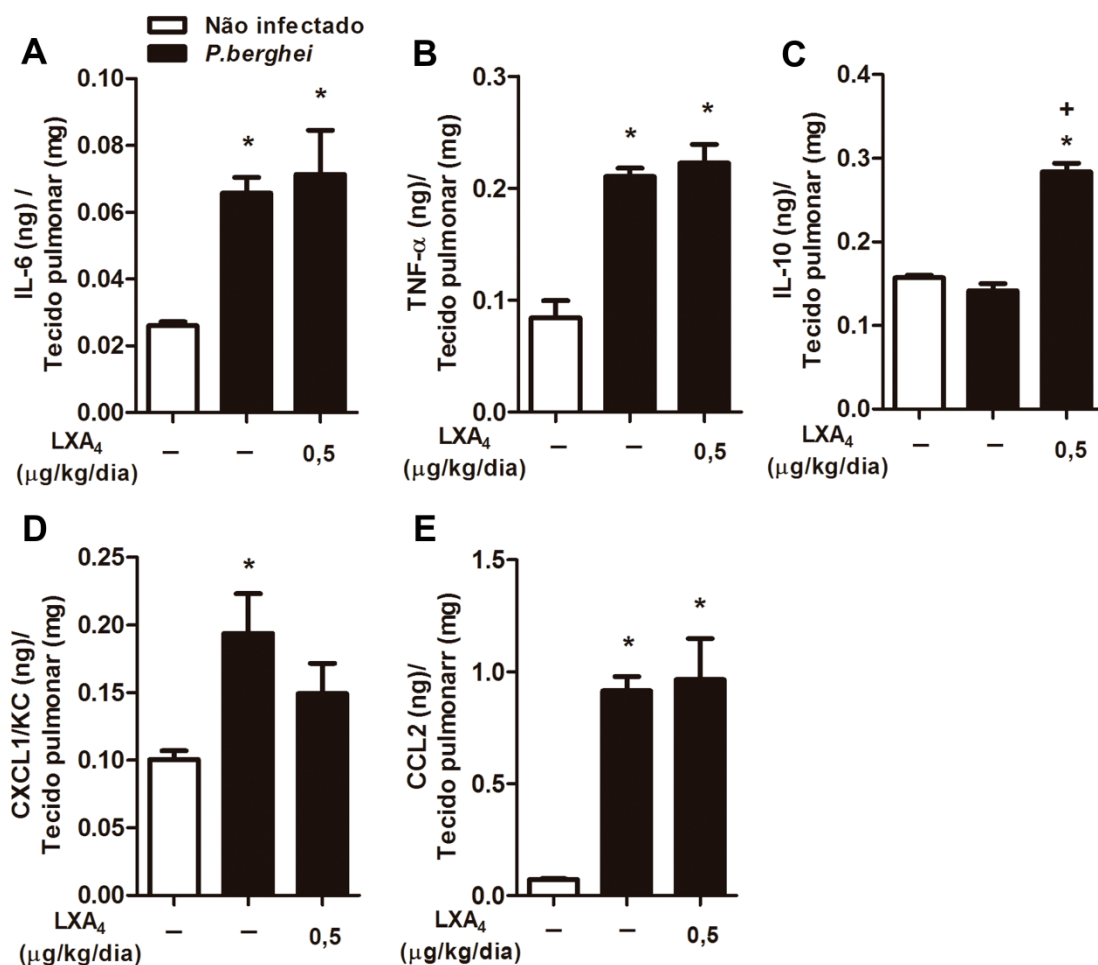
com a LXA<sub>4</sub> aumentou apenas a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 4.21 D) no tecido pulmonar em comparação com os outros grupos experimentais, sem alterar a produção dos outros mediadores avaliados.



**Figura 4.19 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> durante o desenvolvimento da disfunção pulmonar induzido pela infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6.** Camundongos C57BL/6 infectados com *PbA* (inóculo de  $1 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal) tratados ou não com LXA<sub>4</sub> (0,5 μg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 6 dias de infecção. **(A)** Efeito do pré-tratamento com LXA<sub>4</sub> no extravasamento proteico no tecido pulmonar; análises de **(B)** elastância estática (Est), **(C)** pressão de resistência (ΔP1) e de **(D)** viscoelasticidade (ΔP2). Os resultados foram expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).



**Figura 4.20** Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na morfologia pulmonar durante a malária grave induzida pela infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6. (A-C) Fotos representativas de pulmões de animais saudáveis, infectados por *PbA* (inóculo de  $1 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal) e tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , i.p). Análises morfométricas de (D) colápo alveolar, (E) espessamento de septo alveolar, (F) edema intersticial, (G) infiltrado inflamatório, (H) Acúmulo de neutrófilos e (I) dano alveolar difuso (DAD) nos cortes de tecido pulmonar. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).

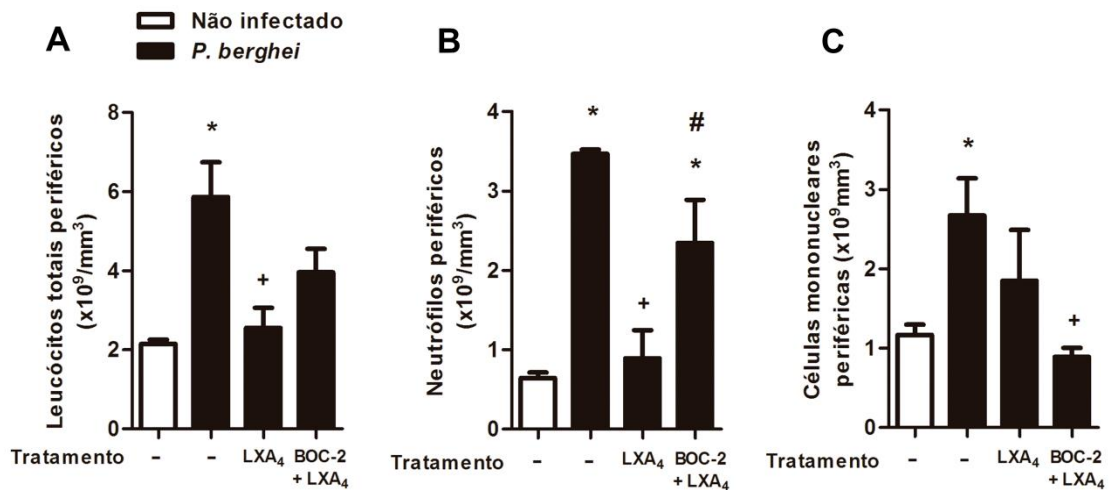


**Figura 4.21** Efeito do tratamento com LXA<sub>4</sub> na produção de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 durante a infecção por *PbA*. Animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 6 dias de infecção por *PbA* (inóculo de 1x10<sup>6</sup> hemácias infectadas/por animal). As produções de (A) IL-6, (B) TNF-α, (C) IL-10, (D) CXCL1 e (E) CCL2 foram mensuradas no tecido pulmonar por ELISA. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 3 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas (p ≤ 0,05) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).

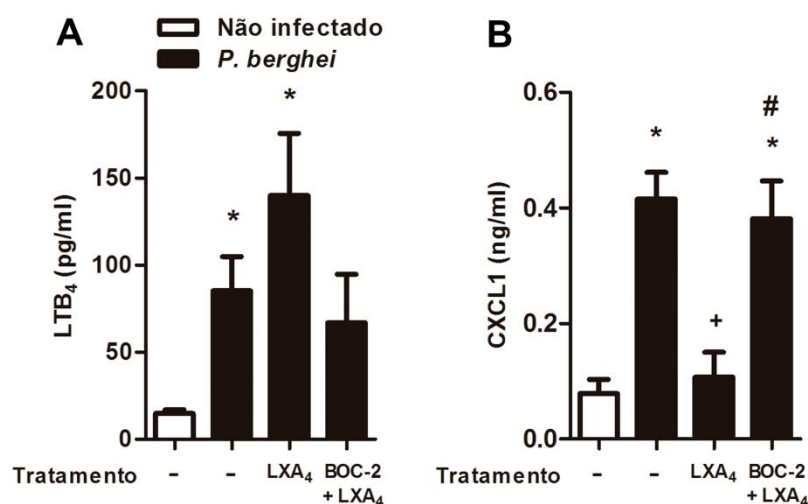
#### **4.4.2 Efeito anti-inflamatório sistêmico da LXA<sub>4</sub> durante a malária grave**

Uma vez observado que o tratamento com LXA<sub>4</sub> diminuiu o número de neutrófilos, mas não modulou o aumento das quimiocinas no tecido pulmonar dos animais infectados por *PbA*, avaliamos se esses resultados seriam uma consequência do efeito sistêmico do tratamento com LXA<sub>4</sub>. Desta forma, também foi avaliada a contagem desses leucócitos e o efeito do tratamento com LXA<sub>4</sub> no sangue periférico dos animais. A infecção com *PbA* aumentou a quantidade de leucócitos totais circulantes (Figura 4.22 A), incluindo a de neutrófilos (Figura 4.22 B) e de células mononucleares (Figura 4.22 C) em comparação aos animais não infectados, enquanto o tratamento com LXA<sub>4</sub> preveniu o aumento da quantidade de leucócitos totais, inclusive de neutrófilos no sangue periférico dos animais infectados (Figura 4.22 A e B). Entretanto, a LXA<sub>4</sub> não modulou o aumento de células mononucleares periféricas (Figura 4.22 C). Vale ressaltar que o tratamento concomitante com o antagonista do receptor FPR2/ALXR reverteu o efeito inibitório da LXA<sub>4</sub> no influxo dos neutrófilos para a circulação sanguínea (Figura 4.22 B) o que demonstra a participação do receptor FPR2/ALXR nesse processo.

Foi também observado se o tratamento com LXA<sub>4</sub> estaria modulando a produção sistêmica de quimiotáticos para os neutrófilos durante o desenvolvimento da malária grave. Durante a infecção por *PbA* foi observado aumento da produção de LTB<sub>4</sub> (Figura 4.23 A) e de CXCL-1 (Figura 4.23 B) no plasma dos animais infectados em comparação aos animais saudáveis. Já o tratamento com LXA<sub>4</sub> não modulou o aumento da produção de LTB<sub>4</sub> durante a infecção com *PbA*. (Figura 4.23 A), mas por outro lado preveniu o aumento da produção de CXCL-1 nesses animais (Figura 4.23 B). Além disso, a inibição da produção de CXCL-1 pela LXA<sub>4</sub> foi revertida com o pré-tratamento com o BOC-2 (Figura 4.23 B) demonstrando a participação do receptor FPR2/ALXR no processo de modulação desse quimiotático.



**Figura 4.22 Efeito anti-inflamatório sistêmico da LXA<sub>4</sub> durante a malária grave de camundongos C57BL/6 durante a infecção por *PbA*.** Animais não infectados, infectados sem tratamento, infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , i.p.) e infectados tratados com BOC-2 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , i.p.) e LXA<sub>4</sub> (0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , i.p.) foram avaliados após 6 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $1 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). A contagem dos leucócitos totais periféricos **(A)** foi realizada em sangue através do contador de partículas (Counter) e as contagens diferenciais em esfregaço sanguíneo desses animais para quantificação dos **(B)** neutrófilos e das **(C)** células mononucleares. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).



**Figura 4.23 Efeito do tratamento com a LXA<sub>4</sub> na produção sistêmica de quimiotáticos durante a malária grave em camundongos C57BL/6** Animais não infectados, infectados sem tratamento, infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, i.p.) e infectados tratados com BOC-2 (100 µg/kg/dia, i.p.) e LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 6 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $1 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). A medição dos níveis plasmáticos de **(A)** LTB<sub>4</sub> foi realizada por EIA e a de **(B)** CXCL-1 foi realizada por ELISA. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).

#### 4.4.3 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> em neutrófilos de medula óssea durante a malária grave

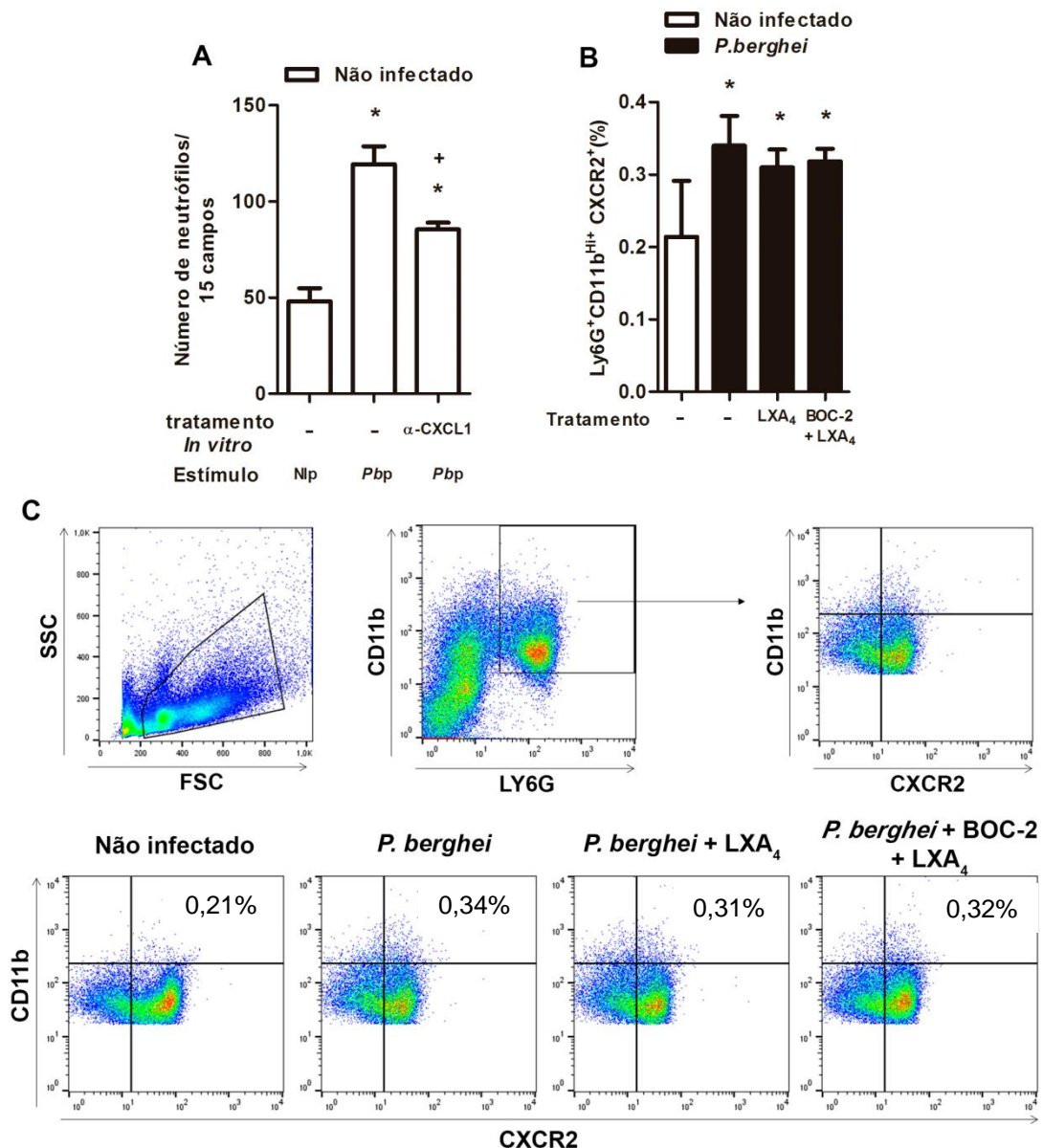
Considerando que a inibição de CXCL-1 pelo pré-tratamento com a LXA<sub>4</sub> poderia ser responsável pela redução dos números de neutrófilos periféricos, avaliamos o papel desse quimiotático presente no plasma de camundongos infectados na migração de neutrófilos provenientes de medula óssea. Para isso foi realizado um ensaio de quimiotaxia no qual neutrófilos de camundongos C57BL/6 foram estimulados com o plasma de animais não infectados (Nip) e infectados com *PbA* (*Pbp*). Os neutrófilos em contato com o *Pbp* migraram mais em comparação com os estimulados com Nip (Figura 4.24 A). Entretanto, quando o CXCL-1 presente no *Pbp* foi neutralizado pela adição do anticorpo anti-CXCL-1 nesse plasma, a migração dos neutrófilos foi parcialmente inibida (Figura 4.23 B). Os resultados até o momento sugerem que a LXA<sub>4</sub> possivelmente estaria agindo em outros mecanismos, além da produção de CXCL-1, relacionados a migração dos neutrófilos durante a M-SDRA. Desta forma, foi investigado se o tratamento com a LXA<sub>4</sub> teria um efeito direto nos neutrófilos modulando a expressão de CXCR2. A infecção por *PbA*

aumentou a expressão de CXCR2 em neutrófilos de medula óssea em comparação com neutrófilos de animais não infectados, porém o tratamento com LXA<sub>4</sub> ou o tratamento com o BOC-2 e LXA<sub>4</sub> não alterou esse aumento (Figura 4.24 B,C).

Em seguida, foi avaliado se a redução dos neutrófilos circulantes nos animais infectados e tratados com LXA<sub>4</sub> seria devido à diminuição da disponibilidade destas células na medula óssea. Durante a infecção por *PbA* houve diminuição do número total de neutrófilos (aqui representados como CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) na medula óssea dos camundongos C57BL/6 quando comparados com os animais não infectados (Figura 4.25 A, C). O tratamento com LXA<sub>4</sub> aumentou o número desses neutrófilos dentro da medula óssea, mas não ao nível basal dos animais saudáveis (Figura 4.25 A, C). Além disso, o tratamento concomitante com o BOC-2 não foi capaz de modular essa ação da LXA<sub>4</sub>. Por outro lado, o número de neutrófilos maduros (demonstrado como a população celular CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>Hi+</sup>) (136) na medula óssea é maior nos animais infectados por *PbA* quando comparado com os animais não infectados (Figura 4.25 B, C). Entretanto, o tratamento com a LXA<sub>4</sub> não alterou a porcentagem de neutrófilos maduros durante a infecção por *PbA* (Figura 4.25 B, C).

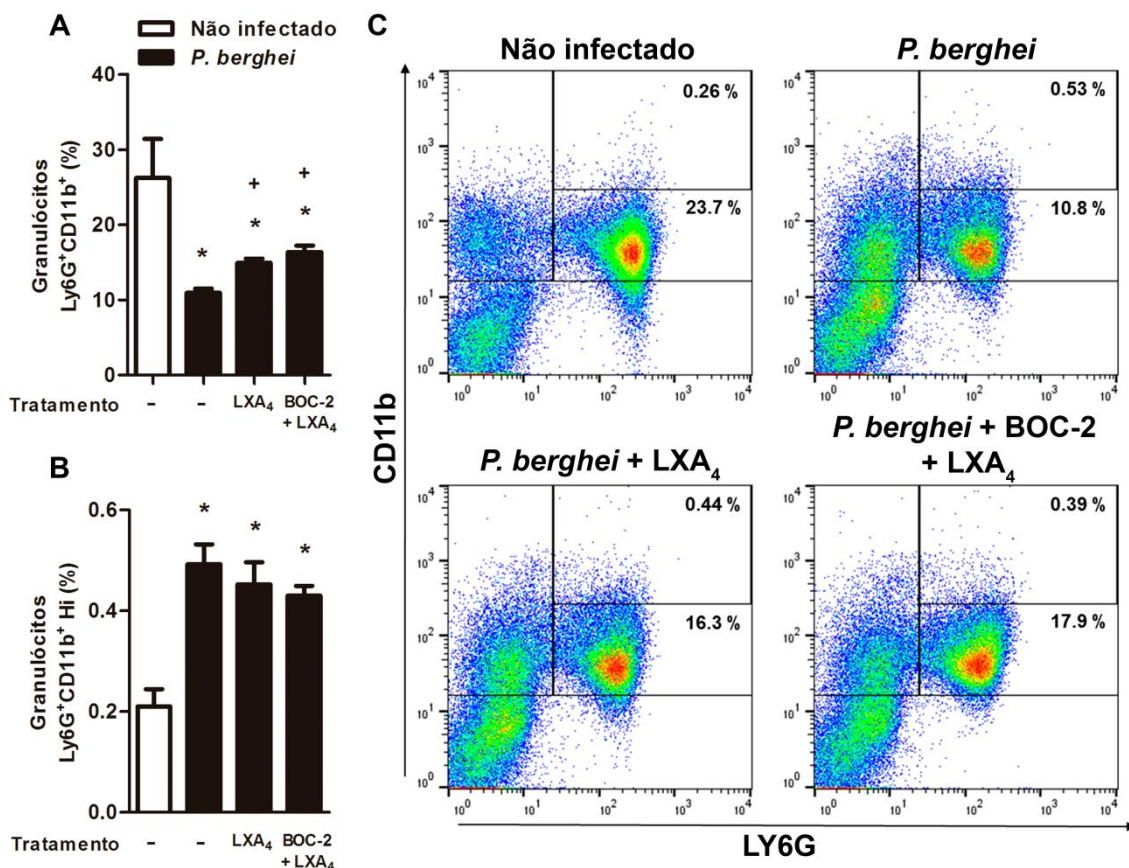
Uma vez que o tratamento com LXA<sub>4</sub> não atua na maturação de neutrófilos, foi investigada a capacidade desse mediador anti-inflamatório de estimular a apoptose de neutrófilos ainda dentro da medula óssea. Durante a infecção por *PbA* houve aumento da apoptose de células CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> na medula óssea de camundongos C57BL/6 quando comparados com os animais não infectados (Figura 4.26 A,B), entretanto não houve modulação desse aumento pelo tratamento com LXA<sub>4</sub> nem pelo tratamento concomitante com o BOC-2 e LXA<sub>4</sub> (Figura 4.26 A,B).



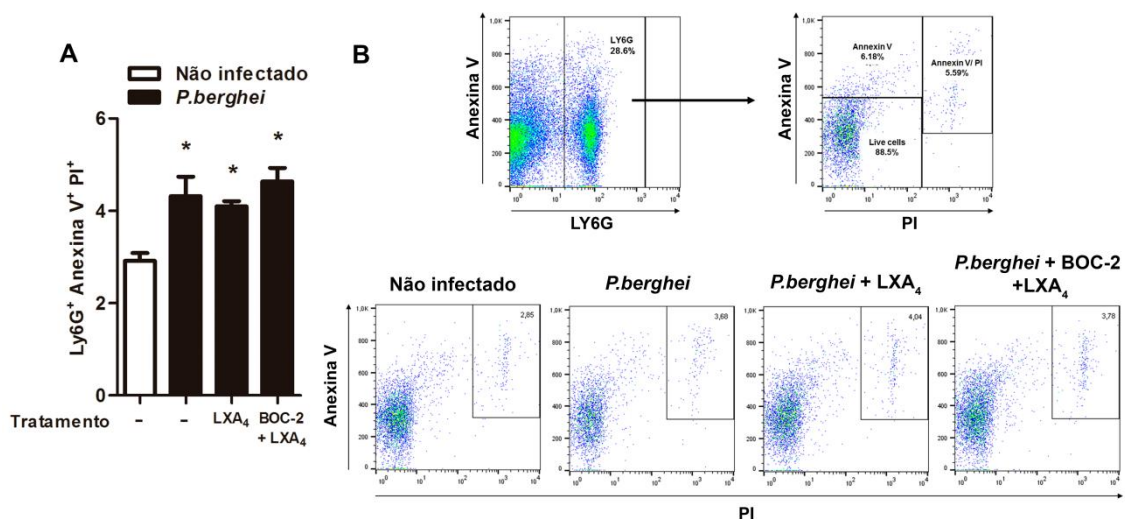


**Figura 4.24** Efeito da LXA<sub>4</sub> na modulação de fatores relacionados com a quimioatração nos neutrófilos de camundongos C57BL/6 durante a malária grave. **(A)** Quimiotaxia de neutrófilos retirados da medula óssea de animais saudáveis estimulados *in vitro* com o plasma de animais não infectados (Nip), plasma de animais infectados por *PbA* (Pbp) ou *Pbp* pré-tratado com o anticorpo anti-CXCL-1. Os resultados foram expressos como média do número de neutrófilos por 15 campos consecutivos (n=4) por grupo. **(B)** Porcentagem de neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>Hi+</sup>CXCR2<sup>+</sup>) na medula óssea de animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5  $\mu$ g/kg/dia, i.p.) ou com BOC-2 e LXA<sub>4</sub> foram avaliados após 6 dias de infecção por *PbA* (inóculo de  $1 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal). **(C)** Dot plots representativos mostrando a porcentagem de células CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>Hi+</sup>CXCR2<sup>+</sup> na medula óssea de camundongos C57BL/6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM, n=6 por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).





**Figura 4.25 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na maturação de neutrófilos da medula óssea de animais infectados por *P.berghei* ANKA (A) Porcentagem dos neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) e (B) de neutrófilos maduros (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>Hi</sup>) na medula óssea de animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, i.p.) ou com BOC-2 e LXA<sub>4</sub> foram avaliados após 6 dias de infecção por *PbA* (inóculo de 1x10<sup>6</sup> hemácias infectadas/por animal). (C) Dot plots representativos mostrando a porcentagem de células CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>Hi</sup> na medula óssea de camundongos C57BL/6. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=6 por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas (p ≤ 0,05) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).**



**Figura 4.26 Avaliação do tratamento com LXA<sub>4</sub> na apoptose de neutrófilos da medula óssea de animais infectados por *P.berghei* ANKA. (A)** Porcentagem de neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) na medula óssea de animais não infectados, infectados sem tratamento e infectados tratados com LXA<sub>4</sub> (0,5 µg/kg/dia, i.p.) ou com BOC-2 e LXA<sub>4</sub> foram avaliados após 6 dias de infecção por *PbA* (inóculo de 1x10<sup>6</sup> hemácias infectadas/por animal). **(B)** Dot plots representativos mostrando a porcentagem de células Ly6G<sup>+</sup>Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> na medula óssea de camundongos C57BL/6. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=6 por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas (p ≤ 0,05) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*).

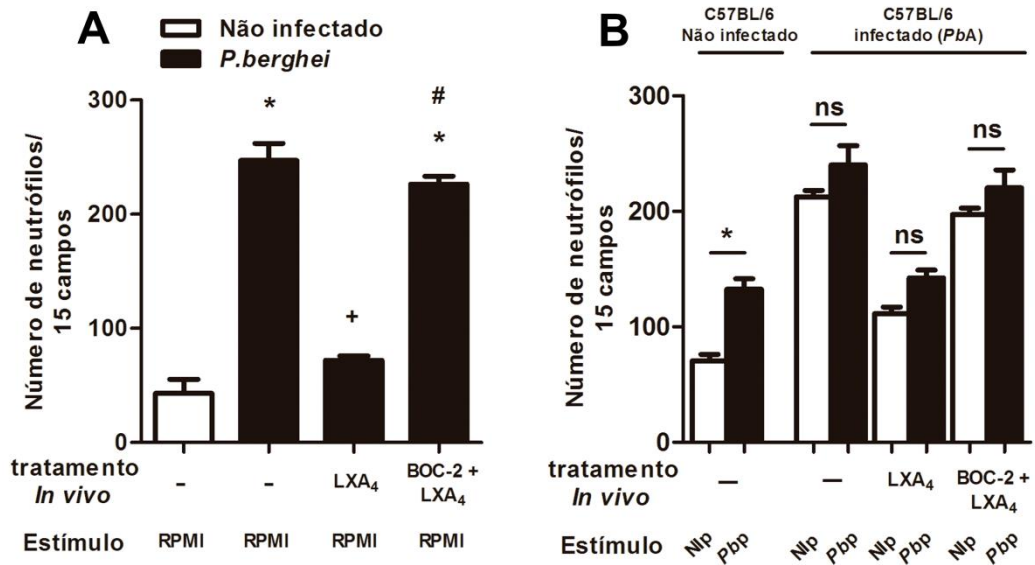
#### 4.4.4 Efeito da LXA<sub>4</sub> no egresso dos neutrófilos medulares durante a malária grave

Considerando que o tratamento com LXA<sub>4</sub> altera a produção sistêmica de CXCL-1 sem afetar o amadurecimento, a apoptose, nem a expressão de CXCR2 de neutrófilos medulares, foi investigada a capacidade da LXA<sub>4</sub> em modular o processo migratório de neutrófilos da medula óssea. Neutrófilos recolhidos de animais infectados por *PbA* migraram espontaneamente em ensaio *ex vivo* quando comparados com neutrófilos recolhidos de animais não infectados (Figura 4.27 A). Entretanto o tratamento *in vivo* com a LXA<sub>4</sub> impediu a migração espontânea dos neutrófilos de animais infectados, fenômeno que foi revertido pelo tratamento concomitante com o BOC-2 (Figura 4.27 A). Para avaliar se a ausência de migração dos neutrófilos oriundos de animais tratados com LXA<sub>4</sub> seria devido à falta de estímulo quimioatraente foi realizado um ensaio de re-estimulação *in vitro* de neutrófilos recolhidos dos animais não infectados, infectados por *PbA* e infectados por *PbA* tratados com LXA<sub>4</sub> ou com BOC-2 e LXA<sub>4</sub>. Neutrófilos provenientes da medula óssea dos grupos citados foram estimulados em ensaio de quimiotaxia *in*

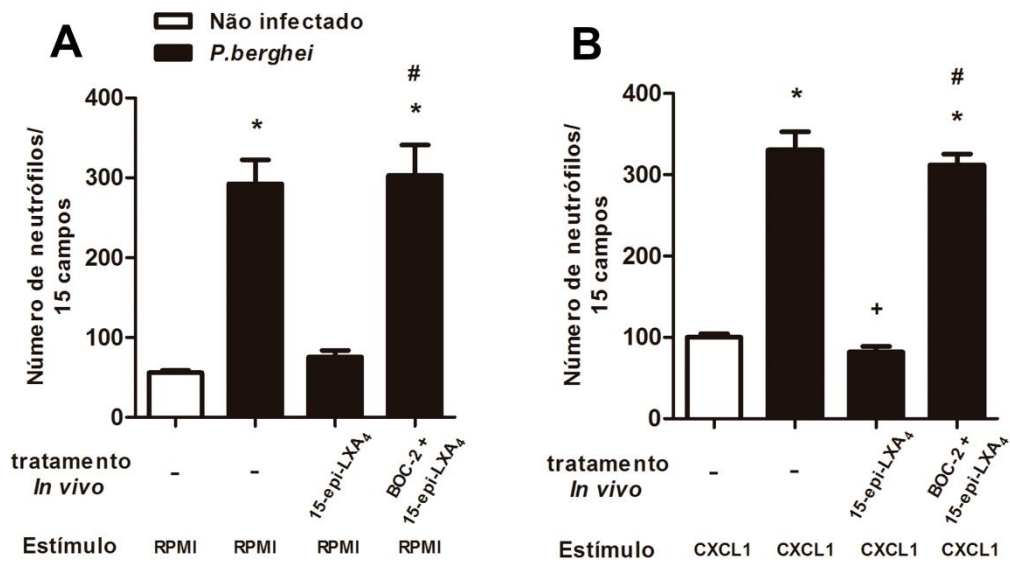
*vitro* com o plasma de animais não infectados (Nip) ou plasma de animais infectados (*Pbp*). Os neutrófilos recolhidos de animais não infectados estimulados com o *Pbp* migraram em maior número do que os neutrófilos estimulados com o Nip (Figura 4.27 B). Desta forma confirmamos a capacidade migratória dessas células frente a um estímulo. Além disso, foram recolhidos neutrófilos de animais infectados por *PbA* tratados ou não *in vivo* com LXA<sub>4</sub> com ambos BOC-2 e LXA<sub>4</sub>. (Figura 4.27 B). A re-estimulação desses neutrófilos com o *Pbp* não os fizeram migrar mais dos que os estimulados com Nip demonstrando assim que a inibição da LXA<sub>4</sub> sobre o egresso dos neutrófilos da medula óssea nos animais infectados é um efeito que não pode ser revertido pela re-estimulação *in vitro* (Figura 4.27 B).

Considerando que existem outros análogos da LXA<sub>4</sub> agonistas do FPR2/ALXR, como seu epímero 15-epi-LXA<sub>4</sub>, foram realizados os mesmos ensaios de quimioatração com neutrófilos de animais tratados *in vivo* com este análogo sintético. De maneira semelhante ao tratamento com a LXA<sub>4</sub>, o tratamento *in vivo* com a 15-epi-LXA<sub>4</sub> inibiu a capacidade migratória espontânea de neutrófilos medulares recolhidos de animais infectados por *PbA* (Figura 4.28 A). Além disso, o tratamento dos animais com a 15-epi-LXA<sub>4</sub> inibiu a capacidade de migração de seus neutrófilos frente ao quimiotático CXCL-1 (Figura 4.28 B). Vale ressaltar que esses efeitos inibitórios do análogo 15-epi-LXA<sub>4</sub> também foram revertidos com o pré-tratamento do BOC-2 (Figura 4.28 A, B).

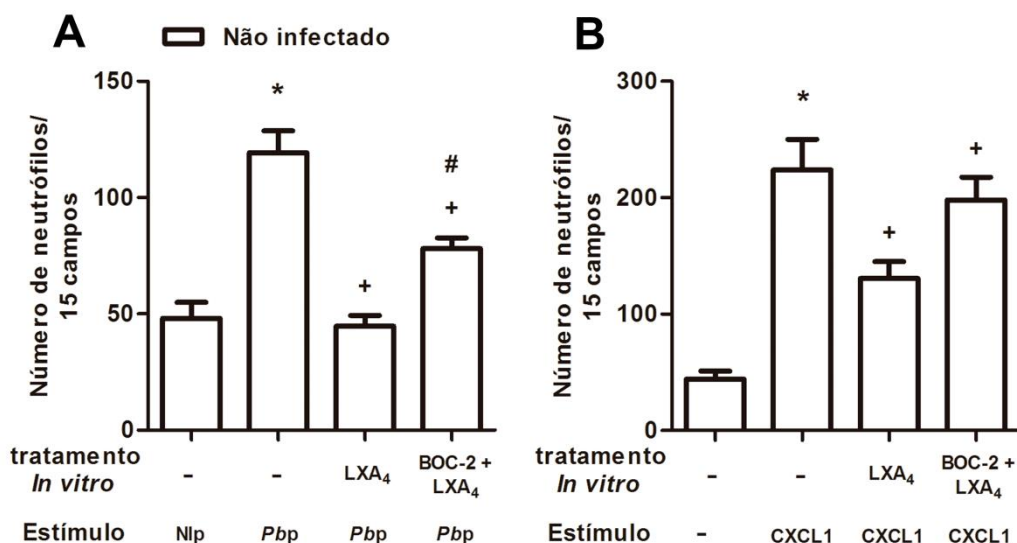
Para avaliar o efeito direto do tratamento da LXA<sub>4</sub> nos neutrófilos oriundos da medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados por *PbA*., foram realizados ensaios de quimiotaxia com tratamentos e estimulações *in vitro*. Neutrófilos isolados de medula óssea de animais saudáveis foram recolhidos e pré-tratados com meio (RPMI), LXA<sub>4</sub> (10 nM), ou com BOC-2 (40 nM) e LXA<sub>4</sub> (10 nM). Em seguida, essas células foram colocadas frente aos estímulos Nip, *Pbp* ou CXCL-1 (250 nM). Os neutrófilos estimulados com *Pbp* (Figura 4.29 A) ou com CXCL-1 (Figura 4.29 B) apresentaram capacidade migratória aumentada quando comparados aos neutrófilos estimulados com Nip ou RPMI (Figura 4.29 A, B, respectivamente). Além disso, o tratamento com LXA<sub>4</sub> inibiu diretamente a migração dos neutrófilos estimulados com *Pbp* (Figura 4.29 A) e inibiu parcialmente a migração de neutrófilos estimulados com CXCL-1 (Figura 4.29 B). O co-tratamento com o BOC-2 reverteu a ação da LXA<sub>4</sub> em relação ao estímulo *Pbp* (Figura 4.29 A). Desta maneira se confirma o efeito direto da LXA<sub>4</sub> na capacidade migratória de neutrófilos de medula óssea.



**Figura 4.27 Efeito do tratamento com a LXA<sub>4</sub> no egresso dos neutrófilos medulares durante a malária grave em camundongos C57BL/6. (A)** Quimiotaxise pela câmara de Boyden de neutrófilos recolhidos de animais saudáveis, infectados por *PbA* sem tratamento, infectados por *PbA* tratados com LXA<sub>4</sub> e infectados por *PbA* tratados com BOC-2 e LXA<sub>4</sub>. **(B)** Quimiotaxia pela câmara de Boyden de neutrófilos recolhidos de animais saudáveis, infectados por *PbA* sem tratamento, infectados por *PbA* tratados com LXA<sub>4</sub> e infectados por *PbA* tratados com BOC-2 e LXA<sub>4</sub>. Os neutrófilos foram reestimulados *in vitro* com o plasma de animais não infectados (Nip) ou, plasma de animais infectados por *PbA* (*Pbp*). Os resultados foram expressos como média do número de neutrófilos por 15 campos consecutivos (n=4) por grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).



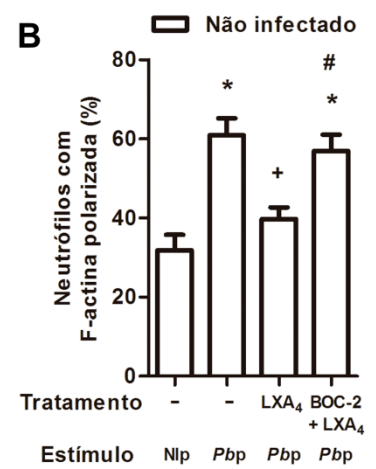
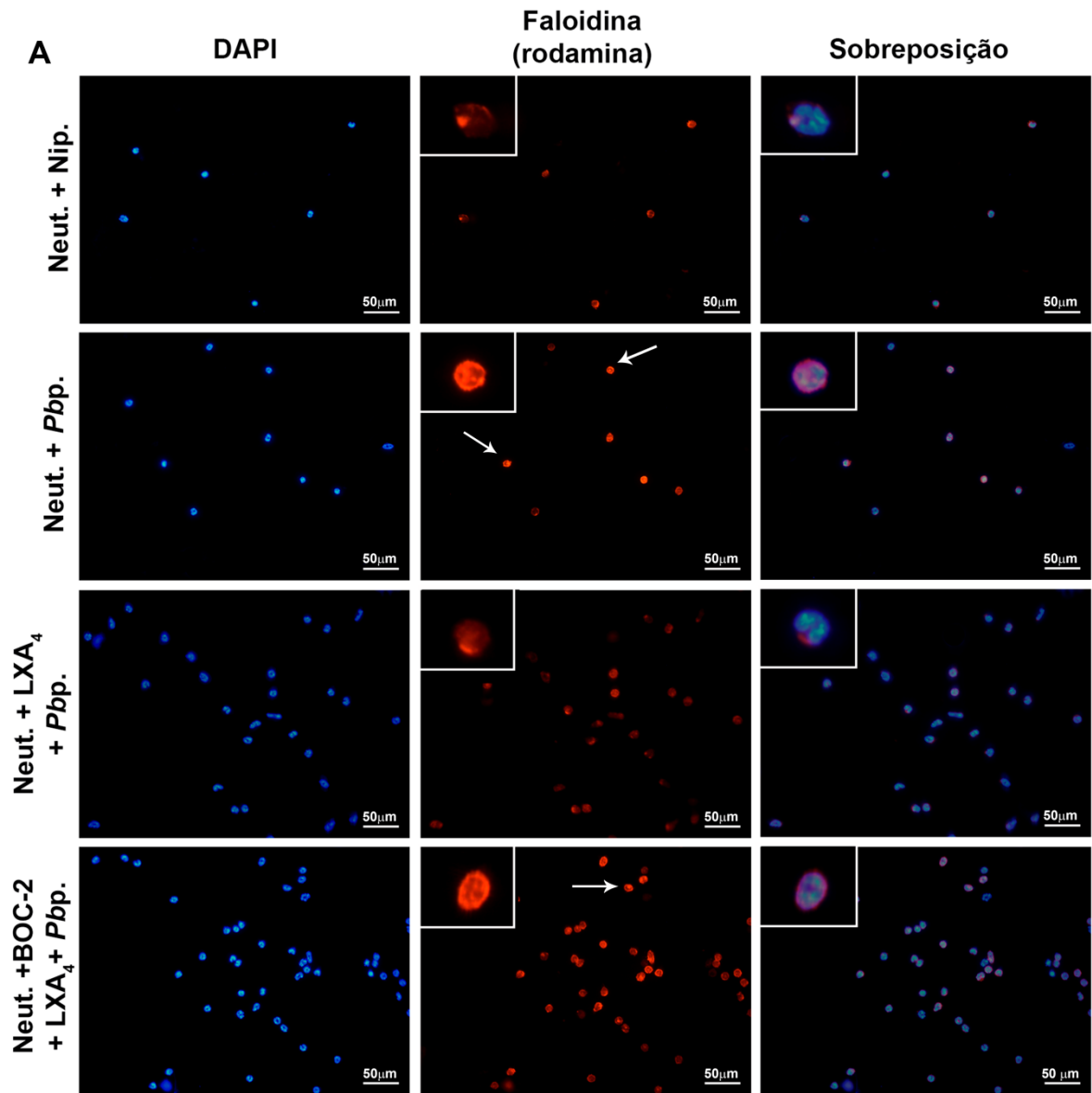
**Figura 4.28** Efeito do análogo 15-epi-LXA<sub>4</sub> no egresso dos neutrófilos medulares de camundongos infectados por *P.berghei* ANKA **(A)** Quimiocinese pela câmara de Boyden de neutrófilos recolhidos de animais saudáveis, infectados por *PbA* sem tratamento, infectados por *PbA* tratados com 15-epi-LXA<sub>4</sub> e infectados por *PbA* tratados com BOC-2 e 15-epi-LXA<sub>4</sub>. **(B)** Quimiotaxia pela câmara de Boyden de neutrófilos recolhidos de animais saudáveis, infectados por *PbA* sem tratamento, infectados por *PbA* tratados com 15-epi-LXA<sub>4</sub> e infectados por *PbA* tratados com BOC-2 e 15-epi-LXA<sub>4</sub>. Os neutrófilos foram reestimulados *in vitro* com CXCL-1. Os resultados foram expressos como média do número de neutrófilos por 15 campos consecutivos (n=4) por grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).



**Figura 4.29** Efeito direto da LXA<sub>4</sub> na capacidade migratória dos neutrófilos da medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados por *P.berghei* (A) Quimioquinesa de neutrófilos recolhidos de animais saudáveis, infectados por *PbA* sem tratamento, infectados por *PbA* tratados com 15-epi-LXA<sub>4</sub> e infectados por *PbA* tratados com BOC-2 e 15-epi-LXA<sub>4</sub>. (B) Quimiotaxia de neutrófilos recolhidos de animais saudáveis, infectados por *PbA* sem tratamento, infectados por *PbA* tratados com 15-epi-LXA<sub>4</sub> e infectados por *PbA* tratados com BOC-2 e 15-epi-LXA<sub>4</sub>. Os neutrófilos foram reestimulados *in vitro* com CXCL-1. Os resultados foram expressos como média do número de neutrófilos por 15 campos consecutivos (n=4) por grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).

#### **4.4.5 Mecanismo de ação da LXA<sub>4</sub> sobre a inibição da migração dos neutrófilos medulares durante a malária grave**

A fim de se investigar por qual mecanismo a LXA<sub>4</sub> seria capaz de impedir a migração de neutrófilos medulares de camundongos C57BL/6, foi avaliado o remodelamento de citoesqueleto nessas células através da marcação de faloidina conjugada a rodamina. Os neutrófilos estimulados com Nip apresentaram distribuição homogênea e difusa dos filamentos de actina em seus citoplasmas (Figura 4.30 A e B). Entretanto, os neutrófilos estimulados com *Pbp* demonstraram filamentos de actina com distribuição heterogênea, concentrada na face interna da membrana citoplasmática denotando polarização dessas estruturas (Figura 4.30 A e B). Este padrão polarizado foi inibido quando os neutrófilos foram tratados *in vitro* com LXA<sub>4</sub> (10 nM) e restaurado quando tratados com BOC-2 (40 nM) e LXA<sub>4</sub> (10 nM) (Figura 4.30 A e B), sugerindo que a LXA<sub>4</sub> impede a reorganização do citoesqueleto de actina em neutrófilos impedindo-o de migrar em direção ao estímulo quimiotático.





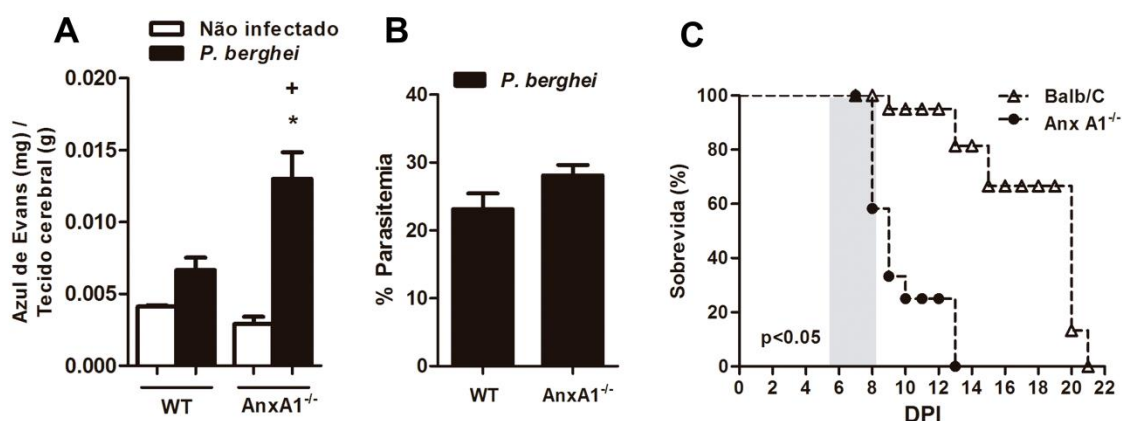
**Figura 4.30 Mecanismo de ação da LXA<sub>4</sub> na inibição da capacidade migratória dos neutrófilos medulares de camundongos C57BL/6 durante a malária grave.** Neutrófilos recolhidos de animais saudáveis pré-tratados com meio (RPMI), LXA<sub>4</sub> (10 nM), ou com BOC-2 (40 nM) e LXA<sub>4</sub> (10 nM) e estimulados com Nip ou *Pbp* foram submetidos à coloração dos filamentos de actina por faloidina conjugada à rodamina. As células foram analisadas através da microscopia de fluorescência. **(A)** Fotomicrografias representativas da polimerização dos filamentos de actina mostrando as colorações de DAPI, faloidina conjugada à rodamina e a sobreposição das duas colorações (400X. Barras = 50 µm). As setas indicam a F-actina polarizada. **(B)** Análise morfológica da porcentagem de neutrófilos polarizados. Os resultados foram expressos como média de quatro lâminas de neutrófilos por grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo infectado e tratado com LXA<sub>4</sub> são indicados por (#).

## 5 DISCUSSÃO

A malária é uma doença característica de áreas tropicais que apresenta alta morbidade e mortalidade (26). Apesar da disponibilidade de antimaláricos eficazes, os casos de resistência aos medicamentos de referência têm contribuído para a manutenção dos altos números de casos de malária mundialmente (18). No caso de sua manifestação mais letal, a malária grave, o grau de comprometimento da doença está diretamente relacionado ao intenso processo inflamatório sistêmico que acomete múltiplos órgãos, dentre eles, o cérebro e os pulmões (55). Considerando essas observações, alguns autores propõem terapias adjuvantes ao tratamento com antimaláricos visando o controle do intenso quadro inflamatório (137). Neste contexto, o estudo da modulação dos receptores FPRs é de extrema importância para o desenvolvimento de terapias adjuvantes alternativas.

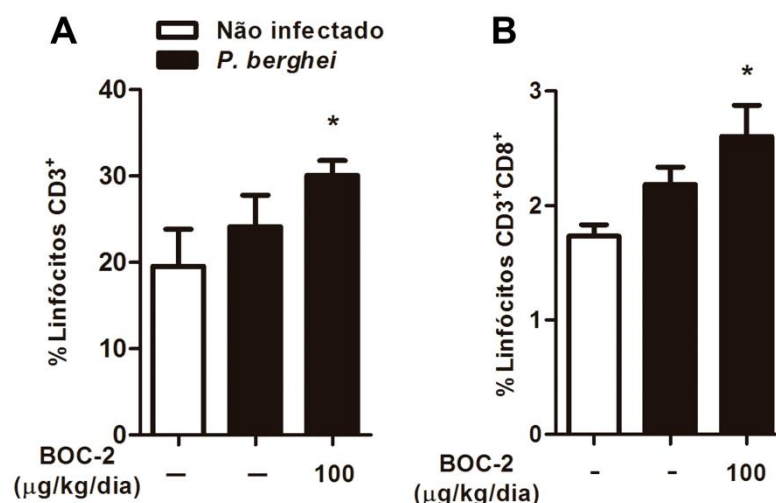
Uma ferramenta útil para o entendimento da fisiopatologia da malária grave é a utilização do modelo de malária cerebral experimental (MCE). Neste modelo a infecção por *P. berghei* ANKA (*PbA*) apresenta características semelhantes a observadas em pacientes infectados por *P. falciparum*, como dano cognitivo, lesão pulmonar aguda e insuficiência renal (55, 74, 138). No que diz respeito ao desenvolvimento da MCE, os camundongos C57BL/6 e Balb/C exibem respostas diferentes durante a infecção por *PbA*. Enquanto os camundongos C57BL/6 são suscetíveis ao desenvolvimento da malária grave, os camundongos Balb/C são tolerantes (134). A tolerância ao desenvolvimento dos quadros mais graves relacionados à infecção é caracterizada por poucas consequências negativas da infecção ao hospedeiro sem a redução da carga parasitária (135). Estudos anteriores mostram que diferentes linhagens de camundongos possuem diferentes respostas à infecção por *P. berghei* ANKA. De acordo com o descrito por Epiphany e colaboradores (2010), camundongos C57BL/6 apresentam, entre outros sintomas, comprometimento cerebral e pulmonar; já os camundongos DBA apresentam SDRA sem comprometimento cerebral. Os camundongos Balb/C, por sua vez, não desenvolvem nem a disfunção cerebral nem a pulmonar característica morrendo por anemia grave e hiperparasitemia (76, 139). Especula-se que a tolerância do camundongo Balb/C seja devido a um perfil molecular citoprotetor quando

comparado com camundongos C57BL/6. Os camundongos Balb/C expressam constitutivamente mediadores anti-inflamatórios como a hemeoxigenase-1 (HO-1) no tecido cerebral (139). Corroborando com estas evidências, foi observado no presente estudo que os camundongos Balb/C apresentaram sobrevida prolongada, sem alterações neurológicas além de produzirem constitutivamente mais LXA<sub>4</sub> que os camundongos C57BL/6. Estes resultados sugerem que a produção endógena de LXA<sub>4</sub> aumentada pode também ser um fator que prediz a tolerância ao desenvolvimento da malária grave (MG). Entretanto, outros mediadores anti-inflamatórios além da HO-1 e da LXA<sub>4</sub> podem estar contribuindo para a tolerância dos camundongos Balb/C. Animais deficientes na expressão de anexina A1 (AnxA1<sup>-/-</sup>) que possuem o *background* genético de Balb/C infectados com *PbA* apresentaram aumento do edema cerebral que foi revertido pelo pré-tratamento com o estabilizador de junções intercelulares FTY-720, sugerindo um papel importante da anexina A1 na estabilização da barreira hemato-encefálica (Figura 5.1 A). Além disso, esses animais deficientes na expressão de anexina A1 apresentaram redução da sobrevida apesar da contagem de hemácias parasitadas não estar alterada quando comparados com animais selvagens (WT) (Figura 5.1 B e C). A anexina A1 é um peptídeo ligante do receptor FPR1 e seu papel no processo inflamatório está relacionado com a modulação da aderência de polimorfonucleares ao endotélio e a sua consequente transmigração para o sítio lesionado (140). Além disso, o receptor FPR1, através de seu ligante anexina A1, se destaca pelo seu papel na manutenção da integridade vascular cerebral (141). Assim esses resultados sugerem que um conjunto de ligantes dos receptores FPR podem regular barreira hemato-encefálica durante a infecção por *PbA* e contribuir para a resistência à MCE.



**Figura 5.1 Avaliação da ausência de anexina A1 durante o desenvolvimento da malária grave em camundongos Balb/C.** Camundongos Balb/C *wild type* (WT) e Balb/C *knockout* para anexina A1 (AnxA1<sup>-/-</sup>) saudáveis e infectados com *P. berghei* ANKA, pré-tratados ou não com FTY-720 (0,3 mg/kg/dia, p.o., durante 6 dias) foram avaliados 5 dias após a infecção por *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal) em relação aos seguintes parâmetros: **(A)** edema cerebral; **(B)** parasitemia; **(C)** sobrevivência. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. A análise das curvas de sobrevivência foi realizada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos grupos não infectados foram indicadas por (\*) e entre as linhagens Balb/C *wild type* (WT) e Balb/C AnxA1<sup>-/-</sup> foram indicadas por (+).

De forma consistente com os resultados anteriores, o tratamento com o antagonista dos receptores de FPR1 e FPR2/ALXR, o BOC-2, reverteu de maneira dose dependente a resistência à MCE de animais Balb/C. Além disso, causou aumento do edema cerebral, oclusão vascular e diminuiu a densidade de capilares funcionais durante a infecção por *PbA* apesar dessas alterações não influenciarem o fluxo microvascular cerebral como um todo. Este resultado sugere uma possível compensação pelo fluxo venular da rarefação capilar. Durante a avaliação por microscopia ótica e intravital a porção da microcirculação analisada é bastante restrita e específica, onde qualquer pequena alteração e perda de capilares é evidente (128). Diferente da análise do fluxo sanguíneo pelo *laser speckle* que abrange uma região maior do cérebro e inclui todos os vasos da microcirculação como vênulas, arteríolas, metarteríolas (142). Além disso, foi observado aumento do número de linfócitos TCD3<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> nos baços de animais infectados e tratados com BOC-2 em comparação com os animais não infectados (Figura 5.2). A diferença observada apenas entre esses dois grupos experimentais, junto com os resultados comentados acima sugerem que o bloqueio da sinalização dos receptores FPRs muda o perfil anti-inflamatório e protetor característico dos camundongos Balb/C durante a infecção por *PbA*.



**Figura 5.2 Avaliação do tratamento com BOC-2 no acúmulo de linfócitos TCD3<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no baço de animais infectados com *PbA*.** Camundongos Balb/C infectados com *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal) tratados ou não com BOC-2 (100 µg/kg/dia, i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção. Os baços dos animais foram coletados, macerados e submetidos a gradiente de histopaque para a separação dos mononucleares e então as células marcadas com anticorpo **(A)** anti-CD3 murino e com **(B)** anti-CD8 conjugados a fluorocromos. A subpopulação de CD3<sup>+</sup> foi analisada em um gate físico de mononucleares, os linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> em um gate de células CD3<sup>+</sup>. Os dot plots são representativos de cada grupo experimental. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*) e em relação ao grupo infectado são indicados por (+).

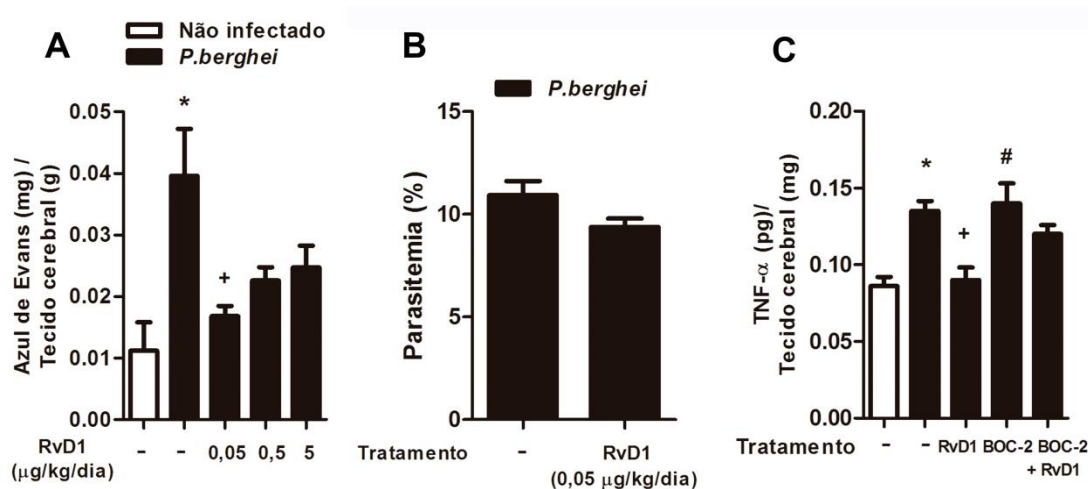
Dentre os ligantes dos receptores FPR com atividades anti-inflamatórias, a LXA<sub>4</sub> é o agonista endógeno do receptor FPR2/ALXR de maior afinidade (104). Desta forma, corroborando com os resultados observados nos camundongos Balb/C tratados com o BOC-2, foi verificado que houve uma melhora nos principais sinais da MCE como sobrevida e análises comportamentais (SHIRPA) nos animais C57BL/6, suscetíveis à MCE, quando tratados com LXA<sub>4</sub> exógena. Apesar da LXA<sub>4</sub> ser reconhecida como um mediador anti-inflamatório (99), seu papel durante os danos neurológicos induzidos pela infecção com *PbA* ainda é pouco compreendido. Recentemente, Shryock e colaboradores (2013) demonstraram que o tratamento com o epímero da LXA<sub>4</sub> aumentou a sobrevida de camundongos por inibir a produção de IL-12 e o acúmulo de células TCD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no tecido cerebral de camundongos deficientes na expressão da enzima 5-lipoxigenase (125).

De forma interessante, quando foi realizada a análise da dose-resposta da LXA<sub>4</sub>, foi observado que as menores doses foram mais eficazes. Esse padrão de resposta

farmacológica já é descrito para ligantes dos receptores FPRs uma vez que estes são receptores acoplados à proteína Gi (GPCR) cuja ação é regulada por dessensibilização e internalização induzida por seus agonistas (102, 143). Quando a LXA<sub>4</sub> é administrada em nosso modelo por cinco dias consecutivos em altas concentrações, provavelmente satura o receptor que se mantém dessensibilizado por mais tempo, promovendo assim um efeito inverso. Além disso, a LXA<sub>4</sub> não interfere na porcentagem de parasitemia, o que sustenta a evidência que esse mediador modula exclusivamente a resposta do hospedeiro durante a infecção por *PbA*.

O dano ao tecido cerebral induzido durante a infecção por *PbA* é principalmente causado pelo acúmulo e ativação de células inflamatórias, pela produção de mediadores inflamatórios na vasculatura cerebral e pelo rompimento da barreira hematoencefálica. Estudos demonstraram que a maioria dos leucócitos presentes durante a MCE são monócitos e estas células aumentam o recrutamento de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> para a microvasculatura cerebral (66). Entretanto, na ausência dos monócitos, os linfócitos T continuam sendo recrutados para o cérebro e iniciam a MCE (66). Já o rompimento da barreira hematoencefálica é induzido pela expressão diminuída e desorganização das proteínas juncionais das células endoteliais cerebrais ativadas (64, 91, 144). Já foi descrito o papel das lipoxinas como mediadores capazes de atenuar a ruptura da barreira hematoencefálica em modelos experimentais não infecciosos pela modulação da expressão da metaloproteinase 9 (MMP 9) e ativação de MAPK (145, 146). Outros trabalhos sugerem que o papel protetor da LXA<sub>4</sub> em doenças como a toxoplasmose depende da inibição da produção de citocinas. Além disso, a produção aumentada de IFN- $\gamma$  e IL-12 foi demonstrada durante a MCE na ausência da LXA<sub>4</sub> endógena (125). Vale ressaltar que o IFN- $\gamma$  e IL-12 são mais relevantes para a ativação de linfócitos do que para a ativação endotelial (147), o que explica a falta de atividade da LXA<sub>4</sub> no acúmulo de linfócitos tanto no baço como na microvasculatura cerebral nesse trabalho. O TNF- $\alpha$  também tem sido demonstrado como uma citocina crucial na disfunção endotelial durante a MCE (148). Entretanto, em nosso modelo, a LXA<sub>4</sub> também não foi capaz de modular a produção de TNF- $\alpha$  durante a infecção. Como já foi descrito que a LXA<sub>4</sub> inibe a ativação das células endoteliais estimuladas por TNF- $\alpha$  (118), podemos inferir que a prevenção da formação do edema cerebral em animais tratados com LXA<sub>4</sub> não depende da produção de TNF- $\alpha$ , muito embora não

possamos excluir a possibilidade da atividade da LXA<sub>4</sub> sobre a produção de citocinas durante a malária cerebral. Vale ressaltar ainda que diferentes ligantes dos receptores FPRs podem ativar diferentes vias de sinalização. Como mostrado na Figura 5.3 o pré-tratamento com a resolvina D1 (RvD1) inibiu o edema cerebral de camundongos C57BL/6 sem alterar a parasitemia desses animais. Além disso, diferentemente da LXA<sub>4</sub>, a RvD1 inibiu a produção de TNF- $\alpha$  no tecido cerebral desses animais que foi revertido parcialmente com o tratamento conjunto com BOC-2. Já está descrito que além de se ligar ao FPR2/ALXR a RvD1 atua também via GP32 (149), o que explica a reversão parcial do efeito da RvD1 pelo BOC-2.



**Figura 5.3 Avaliação do tratamento com RvD1 durante a infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos C57BL/6.** Camundongos C57BL/6 infectados com *PbA* (inóculo de  $5 \times 10^6$  hemácias infectadas/por animal) tratados ou não com RvD1 (0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , i.p.) foram avaliados após 5 dias de infecção. **(A)** Efeito dose resposta do pré-tratamento com RvD1 (0,05-5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ , i.p.) no extravasamento proteico no tecido cerebral realizado pela injeção de Azul de Evans (2%); **(B)** Parasitemia; **(C)** Produção da citocina TNF- $\alpha$  mensurada por ELISA em extrato de tecido cerebral. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo não infectado foram indicadas por (\*), em relação ao grupo infectado são indicados por (+) e em relação ao grupo RvD1 são indicados por (#).

Embora não haja diferença no acúmulo de linfócitos no tecido cerebral nos animais infectados tratados com LXA<sub>4</sub>, foi observada a melhora na densidade de capilares funcionais e a redução na oclusão vascular cerebral, além da diminuição de leucócitos em *rolling* e de hemácias parasitadas aderidas à microvasculatura cerebral. Diferentemente do que é observado em humanos, a adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral durante a MCE está bem descrita (55, 150). Foi demonstrado por microscopia intravital que durante a infecção por *PbA* são

encontrados mais linfócitos T CD8<sup>+</sup>, monócitos, neutrófilos e plaquetas acumulados nas vênulas pós-capilares cerebrais em comparação a infecção por *P. yoelli* XL, plasmódio que induz quadro de hiperparasitemia sem os sinais de comprometimento neurológico (91), sugerindo a importância do acúmulo dos leucócitos no cérebro para o desenvolvimento da MCE. Além disso, a MCE também está associada com a vasoconstrição, obstrução vascular e respostas prejudicadas à acetilcolina devido a disfunção da enzima óxido nítrico sintase (151, 152). De fato, já foi descrito que a obstrução do fluxo sanguíneo, como a observada durante a MCE, aumenta o *rolling* de leucócitos, principalmente de monócitos (66). Considerando que as alterações mais evidentes foram observadas em relação ao endotélio cerebral, esses dados sugerem que, em nosso modelo, a LXA<sub>4</sub> não está atuando sobre a atividade dos leucócitos na microcirculação cerebral, mas sim sobre a ativação de células endoteliais.

Para confirmar a hipótese de que a LXA<sub>4</sub> estaria agindo na disfunção endotelial induzida durante a MCE, a expressão de um dos marcadores de ativação da célula endotelial, a ICAM-1, foi investigada. Neste estudo, a LXA<sub>4</sub> inibe a expressão de ICAM-1 no tecido cerebral de camundongos infectados, bem como nas células endoteliais estimuladas *in vitro* com hemácias infectadas por *P. berghei* ANKA ou por *P. falciparum*. A capacidade do complexo LXA<sub>4</sub>- FPR2/ALXR em modular a expressão das moléculas de adesão, incluindo a de reduzir a expressão de ICAM-1 em células endoteliais estimuladas com TNF- $\alpha$  *in vitro*, tem sido descrita em outros modelos não infecciosos (153). Em condições inflamatórias, a sinalização de ICAM-1 está envolvida na ativação endotelial, no rearranjo do citoesqueleto de actina das células endoteliais, na regulação da permeabilidade vascular e na transmigração das células imunes para o parênquima cerebral (154). Diversos estudos também têm descrito que a expressão da HO-1 induzida pela LXA<sub>4</sub> atenua a disfunção endotelial tanto *in vivo* (155) como *in vitro* (118). A HO-1 é uma isoenzima que cataboliza o heme livre liberado em condições patológicas, especialmente as que estão associadas à hemólise intravascular, tal como queimaduras, microangiopatia e malária (156). De fato, a expressão de HO-1 está relacionada à proteção do tecido (156) e sua expressão limita o dano tecidual induzido durante a inflamação. Já foi demonstrado que a modulação farmacológica da expressão ou atividade da HO-1 auxilia a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (155). Além disso, a HO-1 inibe a expressão de diversas moléculas de adesão, especialmente a de



ICAM-1 (157). De forma interessante, a expressão de HO-1 é induzida após tratamento com LXA<sub>4</sub> e modula a expressão de moléculas de adesão em células estimuladas por TNF- $\alpha$  (118). Durante a MCE, a HO-1 é descrita por ter regulação diferente dependendo do tecido e do estágio do ciclo de vida do *Plasmodium* (134). A produção de HO-1 no tecido cerebral está associada com o aumento de sobrevivência de camundongos, edema cerebral diminuído e expressão de ICAM-1 reduzida (134). Entretanto, apesar da LXA<sub>4</sub> ter sido demonstrada por induzir a expressão de HO-1 no tecido cerebral em modelos de doenças não infecciosas (158), o seu efeito em modelo de malária ainda não havia sido investigado. Sendo assim, os nossos dados em conjunto com a literatura sugerem que a LXA<sub>4</sub> reduz a expressão de ICAM-1 por induzir a expressão de HO-1 atenuando desta forma, a disfunção cerebral durante a MCE.

Além do comprometimento cerebral, outra característica da malária grave é a disfunção pulmonar (68). Em humanos a SDRA induzida pela malária (M-SDRA) é caracterizada pela presença de eritrócitos parasitados, edema pulmonar e resposta inflamatória intensa (33). Estudos já mostraram que durante a SDRA associada à infecção por *PbA* observa-se diminuição da função pulmonar (74), expressão aumentada de VEGF (76), aumento da produção de citocinas e quimiocinas (74) e o acúmulo de leucócitos, principalmente de neutrófilos no tecido pulmonar (79).

A atividade anti-inflamatória da LXA<sub>4</sub> tem sido descrita em diversos modelos experimentais de doenças do trato respiratório como inflamação alérgica das vias respiratórias (159) e tuberculose (160). Corroborando com a literatura, mostramos nessa segunda parte do trabalho que o tratamento com a LXA<sub>4</sub> inibiu em parte o processo inflamatório intenso vinculado com a M-ARDS. A LXA<sub>4</sub> exógena preveniu o edema pulmonar, bem como preveniu o aumento da elastância, da pressão nas vias aéreas centrais (pressão de resistência) como nas vias aéreas distais (pressão de viscoelasticidade) observadas durante a infecção por *PbA*. Estudos já demonstraram que o tratamento com LXA<sub>4</sub> previne o edema pulmonar em modelo de ARDS induzida por LPS por preservar a integridade das junções aderentes da barreira hemato-alveolar (161); dificultar o acúmulo de agregados de neutrófilos e plaquetas no parênquima pulmonar (162); e por aumentar a capacidade das células epiteliais de absorver o transudado do espaço alveolar (163). De fato, corroborando com o descrito na literatura, em nosso modelo, a morfometria dos pulmões dos animais infectados pré-tratados com LXA<sub>4</sub> demonstrou redução do dano alveolar difuso,

especialmente no acúmulo dos neutrófilos no tecido pulmonar observado durante a malária grave experimental.

Apesar da LXA<sub>4</sub> melhorar as características morfofuncionais dos pulmões, de maneira semelhante ao que foi observado no tecido cerebral, não foi capaz de inibir a produção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 nem de quimiocinas relacionadas com o recrutamento de células inflamatórias como CXCL1/KC e CCL2 no tecido pulmonar. Por outro lado, diferentemente do observado no cérebro, a LXA<sub>4</sub> aumentou a produção da citocina IL-10 no tecido pulmonar. Nosso grupo já demonstrou que a reação inflamatória no tecido pulmonar é muito mais aguda e evidente do que a do tecido cerebral (74), sugerindo assim cinéticas de resposta inflamatória diferentes nesses dois tecidos. Além disso, estudos já demonstraram que a LXA<sub>4</sub> estimula a diferenciação de macrófagos resolutivos no sítio inflamatório, os quais passam a liberar mediadores imunomodulatórios como a IL-10 e promovem a fagocitose de células apoptóticas e restos celulares (100). O aumento de IL-10 também corrobora com a diminuição de neutrófilos no tecido pulmonar uma vez que esta citocina inibe a quimiotaxia de neutrófilos para o sítio inflamado (164). O acúmulo de neutrófilos nos pulmões pode ser desencadeado pela hemozoína (78) ou pela presença dos eritrócitos infectados e é observado já com 24 horas após a infecção (74). De fato, investigações histológicas e de ultraestrutura mostraram um infiltrado neutrofílico no septo alveolar de camundongos infectados com *PbA*. Além disso, já foi descrito que a depleção de neutrófilos aumentou a sobrevivência bem como reduziu a M-SDRA em camundongos infectados com *PbA* (81), sugerindo que os neutrófilos sejam células chave no desenvolvimento da SDRA induzida pela malária e que a inibição do acúmulo desta célula no tecido pulmonar pode ser protetora para o hospedeiro. No nosso modelo, o tratamento com LXA<sub>4</sub> durante a infecção por *PbA* reduziu o acúmulo de leucócitos, inclusive de neutrófilos no tecido pulmonar desses animais e essa redução também foi observada na circulação periférica. De acordo com essas observações, o tratamento com LXA<sub>4</sub> também foi capaz de prevenir o aumento dos níveis séricos de CXCL1 durante a infecção via receptor FPR2/ALXR, porém não de LTB<sub>4</sub>. Coletivamente estes resultados sugerem, até o momento, que o tratamento com LXA<sub>4</sub> previne a M-SDRA por mecanismos pulmonares e extrapulmonares.

Os neutrófilos alcançam a circulação sanguínea a partir da medula óssea após receber sinalização de fatores quimiotáticos do soro como CXCL1 produzida pelas

células endoteliais (165, 166). Este fato está de acordo com os nossos resultados e de outros grupos que mostram que a LXA<sub>4</sub> diretamente inibe a ativação as células endoteliais durante a MCE, o que provavelmente impede a produção sistêmica de mediadores pró-inflamatórios (125). Entretanto a neutralização *in vitro* de CXCL1 no plasma desses animais não impediu totalmente a migração desses neutrófilos. Esse dado sugere que outros mediadores quimiotáticos como LTB<sub>4</sub>, além do aumento da expressão de CXCR2 na superfície dos neutrófilos estariam envolvidos no deslocamento desses leucócitos (164). De fato, o tratamento com LXA<sub>4</sub> não inibiu a produção de LTB<sub>4</sub> no plasma desses animais nem alterou o aumento de CXCR2 nos neutrófilos medulares. O eixo CXCL-1/CXCR2/LTB<sub>4</sub> tem sido descrito como um mecanismo importante relacionado com o acúmulo de neutrófilos nos sítios inflamatórios (167). De acordo com Kolaczowska e Kubes (2013) os neutrófilos obedecem ao gradiente de múltiplos fatores quimiotáticos que os direcionam para os sítios inflamatórios *in vivo* (168). Além disso, os mediadores quimiotáticos CXCL1 e LTB<sub>4</sub> aparentemente ativam a mesma via de sinalização intracelular para induzir a migração neutrofílica (168), sugerindo que o efeito migratório do *Pbp* é devido a ação conjunta desses dois quimiotáticos.

Já foi descrito na literatura que a LXA<sub>4</sub> estimula a fagocitose de neutrófilos apoptóticos no sítio inflamatório a fim de inibir a perpetuação da resposta inflamatória (169). Entretanto, no nosso modelo não observamos um efeito regulatório da LXA<sub>4</sub> sobre a apoptose nem sobre a maturação dos neutrófilos de medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados por *PbA*. Alguns trabalhos demonstram que a LXA<sub>4</sub> diminui a disponibilidade de células blásticas circulantes em doenças mieloproliferativas (170). Entretanto, não está claro se a LXA<sub>4</sub> modula o crescimento das células progenitoras (167, 168).

O efeito da LXA<sub>4</sub> sobre a migração dos neutrófilos tanto *in vivo* como *in vitro* tem sido descrito (171, 172). No entanto, não existem dados sobre o efeito da LXA<sub>4</sub> na dinâmica de mobilização de neutrófilos para o sítio inflamatório, especialmente se a LXA<sub>4</sub> pode atuar em neutrófilos da medula óssea. A mobilização dos neutrófilos da medula óssea para o sítio inflamatório depende tanto do balanço de fatores produzidos no estroma medular quanto na expressão de receptores na sua membrana (173). Em resposta a uma infecção a expressão de mediadores envolvidos na permanência dos neutrófilos na medula como CXCL-12 e o seu receptor CXCR-4 está diminuída, por outro lado a expressão das citocinas CXCL-1 e

CXCL-2 e de seu receptor CXCR2 estão aumentadas promovendo assim a saída dessas células para a circulação sanguínea (164). Considerando isso, no presente estudo foram realizados ensaios de migração com tratamentos e estimulações tanto *in vivo* como *in vitro* com neutrófilos de medula de animais infectados. A capacidade migratória dos neutrófilos dos animais infectados e tratados com LXA<sub>4</sub> diminuiu. Além disso, a redução da quimiocinese e da quimiotaxia dos neutrófilos foi revertida quando os animais foram concomitantemente tratados com BOC-2 e LXA<sub>4</sub> demonstrando a ação da LXA<sub>4</sub> sobre a migração dos neutrófilos via o receptor FPR2/ALXR. Os mesmos resultados foram observados durante os ensaios *in vitro* confirmando o efeito direto da LXA<sub>4</sub> sobre os neutrófilos. Poucos estudos têm se dedicado em estudar o mecanismo de ação da LXA<sub>4</sub> na mobilização de neutrófilos. Recentemente foi demonstrado que, durante a sepse induzida por CLP, a LXA<sub>4</sub> diminuiu a migração de neutrófilos para o peritônio, porém induziu a fagocitose pelos mesmos de restos celulares e bactérias sem exacerbar a produção de radicais livres (171). A LXA<sub>4</sub>, através da ligação ao seu receptor, possui efeito de desativação de neutrófilos, pois atua em vias como PKC, PKA, MAPK e PI3K (174). Tais vias atuam diretamente em moléculas de adesão envolvidas na diapedese e transmigração de neutrófilos (174). Contudo, a migração dos leucócitos, inclusive de neutrófilos depende além da ativação, do remodelamento do citoesqueleto mais especificamente da polimerização dos filamentos de actina (175). A actina é a proteína citoplasmática mais abundante nas células e a sua polimerização em actina filamentosa (f-actina) é essencial para a motilidade celular (176). Nosso trabalho demonstrou que o tratamento com LXA<sub>4</sub> inibiu a polimerização dos filamentos de actina dos neutrófilos via FPR2/ALXR. Estudos já demonstraram que as vias de sinalização da PI3K gerando PIP3 a partir de PIP2 e da fosfolipase A2 agem em paralelo e são importantes para a quimiotaxia de neutrófilos [revisto em (177)]. Além disso, Lei Du e colaboradores (2012) demonstraram que o bloqueio da polarização da f-actina por citocalasina B inibe a formação da lamelipódia e os aglomerados de CD11b na membrana de neutrófilos diminuindo a sua transmigração para o parênquima pulmonar e melhorando o processo inflamatório durante a ARDS (178).

Desta forma a LXA<sub>4</sub> melhora o quadro inflamatório característico do modelo experimental de M-ARDS provavelmente por modular a produção sistêmica de mediadores inflamatórios e impedir o remodelamento do citoesqueleto dos neutrófilos.

## 6 CONCLUSÃO

### 6.1 Conclusões Parciais

- A comparação do desenvolvimento da malária grave revelou que a produção constitutiva maior de LXA<sub>4</sub> por camundongos Balb/C pode estar envolvida na resistência à malária grave característica desta cepa de animal;
- O antagonismo do receptor FPR2/ALXR levou ao desenvolvimento de complicações clínicas relacionadas à malária grave como edema cerebral, microvasculatura obstruída e aumento da expressão de ICAM-1;
- A administração de LXA<sub>4</sub> melhora o fluxo sanguíneo e reduz o número de vasos obstruídos no cérebro de camundongos infectados com *P. berghei* através da redução da ativação de células endoteliais;
- O pré-tratamento com a LXA<sub>4</sub> induz a melhora na função pulmonar por um mecanismo que envolve a alteração na polimerização de actina em neutrófilos medulares, causando diminuição da capacidade migratória dos mesmos.

### 6.2 Conclusão Geral

Coletivamente, os resultados sugerem que, durante a malária grave experimental, a administração de ligantes lipídicos anti-inflamatórios ou pró-resolutivos dos receptores FPR2/ALXR reduz a resposta inflamatória de forma tecido-específica.

## 7 REFERENCIAS

1. Reiter P. From Shakespeare to Defoe: malaria in England in the Little Ice Age. *Emerg Infect Dis.* 2000;6(1):1-11.
2. Hempelmann E, Krafts K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malar J.* 2013;12:232.
3. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors.* 2010;3(1):5.
4. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(6):701-18.
5. Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(3):229-37.
6. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010;9:115.
7. Gadelha P. Conforming strategies of public health campaigns to disease specificity and national contexts: Rockefeller Foundation's early campaigns against hookworm and malaria in Brazil. *Parassitologia.* 1998;40(1-2):159-75.
8. Payne D. Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum? *Parasitol Today.* 1988;4(4):112-5.
9. Ferreira MU, Da Silva-Nunes M. Evidence-based public health and prospects for malaria control in Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4(9):533-45.
10. WHO. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Guidelines for the Treatment of Malaria. Geneva: World Health Organization Copyright (c) World Health Organization 2015.; 2015.
11. White NJ, Ashley EA, Recht J, Delves MJ, Ruecker A, Smithuis FM, et al. Assessment of therapeutic responses to gametocytocidal drugs in Plasmodium falciparum malaria. *Malar J.* 2014;13:483.
12. Millar SB, Cox-Singh J. Human infections with Plasmodium knowlesi--zoonotic malaria. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(7):640-8.
13. Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW, et al. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):e1002401.

14. Jadin J. [Bibliography on Plasmodium berghei I. H. Vincke and M. Lips (1948-1964)]. *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol.* 1965;45(4):473-96.
15. Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(10):701-12.
16. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, et al. Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2002:35-57.
17. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:217-49.
18. Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):156-67.
19. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):744-57.
20. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in Plasmodium falciparum. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:445-70.
21. Cabrera A, Neculai D, Kain KC. CD36 and malaria: friends or foes? A decade of data provides some answers. *Trends Parasitol.* 2014;30(9):436-44.
22. Smith JD. The role of PfEMP1 adhesion domain classification in Plasmodium falciparum pathogenesis research. *Mol Biochem Parasitol.* 2014;195(2):82-7.
23. Nacer A, Claes A, Roberts A, Scheidig-Benatar C, Sakamoto H, Ghorbal M, et al. Discovery of a novel and conserved Plasmodium falciparum exported protein that is important for adhesion of PfEMP1 at the surface of infected erythrocytes. *Cell Microbiol.* 2015;17(8):1205-16.
24. Mohan A, Singh P, Kumar S, Mohan C, Pathak AK, Pandey RM, et al. Effect of change in symptoms, respiratory status, nutritional profile and quality of life on response to treatment for advanced non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2008;9(4):557-62.
25. Abdul Manan J, Ali H, Lal M. Acute renal failure associated with malaria. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2006;18(4):47-52.
26. WHO. WORLD MALARIA REPORT 2013.
27. WHO. Severe Malaria. *Tropical Medicine & International Health.* 2014;19(s1):7-131.

28. Zhang R, Lee WC, Lau YL, Albrecht L, Lopes SC, Costa FT, et al. Rheopathologic Consequence of Plasmodium vivax Rosette Formation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):e0004912.
29. Lopes SC, Albrecht L, Carvalho BO, Siqueira AM, Thomson-Luque R, Nogueira PA, et al. Paucity of Plasmodium vivax mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. *J Infect Dis*. 2014;209(9):1403-7.
30. Nayak KC, Mohini, Kumar S, Tanwar RS, Kulkarni V, Gupta A, et al. A study on pulmonary manifestations in patients with malaria from northwestern India (Bikaner). *J Vector Borne Dis*. 2011;48(4):219-23.
31. Hwang J, Cullen KA, Kachur SP, Arguin PM, Baird JK. Severe morbidity and mortality risk from malaria in the United States, 1985-2011. *Open Forum Infect Dis*. 2014;1(1):ofu034.
32. Tomar LR, Giri S, Bauddh NK, Jhamb R. Complicated malaria: a rare presentation of Plasmodium ovale. *Trop Doct*. 2015;45(2):140-2.
33. Milner DA, Jr., Valim C, Carr RA, Chandak PB, Fosiko NG, Whitten R, et al. A histological method for quantifying Plasmodium falciparum in the brain in fatal paediatric cerebral malaria. *Malar J*. 2013;12:191.
34. Milner DA, Whitten RO, Kamiza S, Carr R, Liomba G, Dzamalala C, et al. The systemic pathology of cerebral malaria in African children. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:104.
35. Mac-Daniel L, Ménard R. Plasmodium and mononuclear phagocytes. *Microb Pathog*. 2015;78:43-51.
36. Shio MT, Kassa FA, Bellemare MJ, Olivier M. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes Infect*. 2010;12(12-13):889-99.
37. Keller CC, Yamo O, Ouma C, Ong'echa JM, Ounah D, Hittner JB, et al. Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infect Immun*. 2006;74(9):5249-60.
38. Were T, Davenport GC, Yamo EO, Hittner JB, Awandare GA, Otieno MF, et al. Naturally acquired hemozoin by monocytes promotes suppression of RANTES in children with malarial anemia through an IL-10-dependent mechanism. *Microbes Infect*. 2009;11(8-9):811-9.



39. Deroost K, Pham TT, Opdenakker G, Van den Steen PE. The immunological balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiol Rev.* 2016;40(2):208-57.
40. Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol.* 2007;23(12):596-604.
41. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(9):722-35.
42. Odeh M. The role of tumour necrosis factor-alpha in the pathogenesis of complicated falciparum malaria. *Cytokine.* 2001;14(1):11-8.
43. De las Salas B, Segura C, Pabon A, Lopes SC, Costa FT, Blair S. Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of Plasmodium vivax isolates from Colombia. *Malar J.* 2013;12:347.
44. Maguire GP, Handojo T, Pain MC, Kenangalem E, Price RN, Tjitra E, et al. Lung injury in uncomplicated and severe falciparum malaria: a longitudinal study in Papua, Indonesia. *J Infect Dis.* 2005;192(11):1966-74.
45. Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JE, Avril M, et al. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature.* 498. England2013. p. 502-5.
46. Gleeson EM, O'Donnell JS, Preston RJ. The endothelial cell protein C receptor: cell surface conductor of cytoprotective coagulation factor signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(5):717-26.
47. Moxon CA, Wassmer SC, Milner DA, Chisala NV, Taylor TE, Seydel KB, et al. Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children. *Blood.* 2013;122(5):842-51.
48. Kim H, Higgins S, Liles WC, Kain KC. Endothelial activation and dysregulation in malaria: a potential target for novel therapeutics. *Curr Opin Hematol.* 2011;18(3):177-85.
49. Carvalho LJ, Moreira AaS, Daniel-Ribeiro CT, Martins YC. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(5):577-88.
50. Jain V, Lucchi NW, Wilson NO, Blackstock AJ, Nagpal AC, Joel PK, et al. Plasma levels of angiopoietin-1 and -2 predict cerebral malaria outcome in Central India. *Malar J.* 2011;10:383.

51. Conroy AL, Glover SJ, Hawkes M, Erdman LK, Seydel KB, Taylor TE, et al. Angiotensin-2 levels are associated with retinopathy and predict mortality in Malawian children with cerebral malaria: a retrospective case-control study\*. *Crit Care Med.* 2012;40(3):952-9.
52. Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, Fu W, Whitten RO, Milner D, et al. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *Am J Pathol.* 178. United States: 2011 American Society for Investigative Pathology. Published by Elsevier Inc; 2011. p. 2146-58.
53. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 100. United States 2007. p. 158-73.
54. Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, Zink MC. Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. *Microvasc Res.* 1998;55(1):65-76.
55. Nacer A, Movila A, Sohet F, Girgis NM, Gundra UM, Loke P, et al. Experimental cerebral malaria pathogenesis--hemodynamics at the blood brain barrier. *PLoS Pathog.* 2014;10(12):e1004528.
56. Storm J, Craig AG. Pathogenesis of cerebral malaria--inflammation and cytoadherence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:100.
57. MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol.* 1985;119(3):385-401.
58. Riganti M, Pongponratn E, Tegoshi T, Looareesuwan S, Punpoowong B, Aikawa M. Human cerebral malaria in Thailand: a clinico-pathological correlation. *Immunol Lett.* 1990;25(1-3):199-205.
59. Maneerat Y, Pongponratn E, Viriyavejakul P, Punpoowong B, Looareesuwan S, Udomsangpetch R. Cytokines associated with pathology in the brain tissue of fatal malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1999;30(4):643-9.
60. Ponsford MJ, Medana IM, Prapansilp P, Hien TT, Lee SJ, Dondorp AM, et al. Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *J Infect Dis.* 2012;205(4):663-71.
61. Claus CP, Tsuru-Aoyagi K, Adwanikar H, Walker B, Manvelyan H, Whetstone W, et al. Age is a determinant of leukocyte infiltration and loss of cortical volume after traumatic brain injury. *Dev Neurosci.* 2010;32(5-6):454-65.

62. Hawkes M, Elphinstone RE, Conroy AL, Kain KC. Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: the role of the endothelial barrier. *Virulence*. 2013;4(6):543-55.
63. Taylor TE, Molyneux ME. The pathogenesis of pediatric cerebral malaria: eye exams, autopsies, and neuroimaging. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1342(1):44-52.
64. de Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*. 2010;137(5):755-72.
65. Hansen DS. Inflammatory responses associated with the induction of cerebral malaria: lessons from experimental murine models. *PLoS Pathog*. 2012;8(12):e1003045.
66. Pai S, Qin J, Cavanagh L, Mitchell A, El-Assaad F, Jain R, et al. Real-time imaging reveals the dynamics of leukocyte behaviour during experimental cerebral malaria pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2014;10(7):e1004236.
67. Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(12):1113-21.
68. Taylor WR, Hanson J, Turner GD, White NJ, Dondorp AM. Respiratory manifestations of malaria. *Chest*. 2012;142(2):492-505.
69. Quispe AM, Pozo E, Guerrero E, Durand S, Baldeviano GC, Edgel KA, et al. *Plasmodium vivax* hospitalizations in a monoendemic malaria region: severe vivax malaria? *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(1):11-7.
70. Barbas CS, Isola AM, Caser EB. What is the future of acute respiratory distress syndrome after the Berlin definition? *Curr Opin Crit Care*. 2014;20(1):10-6.
71. Shaver CM, Bastarache JA. Clinical and biological heterogeneity in acute respiratory distress syndrome: direct versus indirect lung injury. *Clin Chest Med*. 2014;35(4):639-53.
72. Orwoll BE, Sapru A. Biomarkers in Pediatric ARDS: Future Directions. *Front Pediatr*. 2016;4:55.
73. Mascia L. Acute lung injury in patients with severe brain injury: a double hit model. *Neurocrit Care*. 2009;11(3):417-26.
74. Souza MC, Silva JD, Pádua TA, Capelozzi VL, Rocco PR, Henriques M. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;186(1):65-72.

75. 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.* 13. England2014. p. 230.
76. 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;6(5):e1000916.
77. Ortolan LS, Sercundes MK, Barboza R, Debone D, Murillo O, Hagen SC, et al. Predictive criteria to study the pathogenesis of malaria-associated ALI/ARDS in mice. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:872464.
78. 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;48(5):589-600.
79. 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;181(9):957-68.
80. Belnoue E, Potter SM, Rosa DS, Mauduit M, Gruner AC, Kayibanda M, et al. Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol.* 30. England2008. p. 544-53.
81. Senaldi G, Vesin C, Chang R, Grau GE, Piguet PF. Role of polymorphonuclear neutrophil leukocytes and their integrin CD11a (LFA-1) in the pathogenesis of severe murine malaria. *Infect Immun.* 1994;62(4):1144-9.
82. Zumla A, Rao M, Doodoo E, Maeurer M. Potential of immunomodulatory agents as adjunct host-directed therapies for multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Med.* 2016;14:89.
83. Watt G, Jongsakul K, Ruangvirayuth R. A pilot study of N-acetylcysteine as adjunctive therapy for severe malaria. *QJM.* 2002;95(5):285-90.
84. Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, McNeil YR, et al. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *J Exp Med.* 204. United States2007. p. 2693-704.
85. Yeo TW, Lampah DA, Rooslamati I, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, et al. A randomized pilot study of L-arginine infusion in severe falciparum malaria: preliminary safety, efficacy and pharmacokinetics. *PLoS One.* 8. United States2013. p. e69587.

86. Dondorp AM, Silamut K, Charunwatthana P, Chuasuwanchai S, Ruangveerayut R, Krintratun S, et al. Levamisole inhibits sequestration of infected red blood cells in patients with falciparum malaria. *J Infect Dis.* 2007;196(3):460-6.
87. Dormoi J, Briolant S, Pascual A, Desgrouas C, Travaillé C, Pradines B. Improvement of the efficacy of dihydroartemisinin with atorvastatin in an experimental cerebral malaria murine model. *Malar J.* 2013;12:302.
88. Reis PA, Estado V, da Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, et al. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003099.
89. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med.* 2001;7(6):687-92.
90. Ou SY, Chu H, Chao PW, Ou SM, Lee YJ, Kuo SC, et al. Effect of the use of low and high potency statins and sepsis outcomes. *Intensive Care Med.* 2014;40(10):1509-17.
91. Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SH, Frevort U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 2012;8(10):e1002982.
92. Finney CA, Hawkes CA, Kain DC, Dhabangi A, Musoke C, Cserti-Gazdewich C, et al. S1P is associated with protection in human and experimental cerebral malaria. *Mol Med.* 2011;17(7-8):717-25.
93. Souza MC, Silva JD, Pádua TA, Torres ND, Antunes MA, Xisto DG, et al. Mesenchymal stromal cell therapy attenuated lung and kidney injury but not brain damage in experimental cerebral malaria. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:102.
94. Solomon W, Wilson NO, Anderson L, Pitts S, Patrickson J, Liu M, et al. Neuregulin-1 attenuates mortality associated with experimental cerebral malaria. *J Neuroinflammation.* 2014;11:9.
95. Schweizer R, Kamat P, Schweizer D, Dennler C, Zhang S, Schnider JT, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improve vascular regeneration and reduce leukocyte-endothelium activation in critical ischemic murine skin in a dose-dependent manner. *Cytotherapy.* 2014.
96. Maron-Gutierrez T, Laffey JG, Pelosi P, Rocco PR. Cell-based therapies for the acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care.* 2014;20(1):122-31.

97. Corminboeuf O, Leroy X. FPR2/ALXR agonists and the resolution of inflammation. *J Med Chem.* 2015;58(2):537-59.
98. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev.* 2009;61(2):119-61.
99. Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(2):166-72.
100. Maderna P, Cottell DC, Toivonen T, Dufton N, Dalli J, Perretti M, et al. FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4 and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. *FASEB J.* 2010;24(11):4240-9.
101. Le Y, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 2002;23(11):541-8.
102. Le Y, Oppenheim JJ, Wang JM. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(1):91-105.
103. Gavins FN. Are formyl peptide receptors novel targets for therapeutic intervention in ischaemia-reperfusion injury? *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(6):266-76.
104. Dufton N, Hannon R, Brancaleone V, Dalli J, Patel HB, Gray M, et al. Anti-inflammatory role of the murine formyl-peptide receptor 2: ligand-specific effects on leukocyte responses and experimental inflammation. *J Immunol.* 2010;184(5):2611-9.
105. Giebeler A, Streetz KL, Soehnlein O, Neumann U, Wang JM, Brandenburg LO. Deficiency of formyl peptide receptor 1 and 2 is associated with increased inflammation and enhanced liver injury after LPS-stimulation. *PLoS One.* 2014;9(6):e100522.
106. Cattaneo F, Parisi M, Ammendola R. Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonists. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):7193-230.
107. Chiang N, Fierro IM, Gronert K, Serhan CN. Activation of lipoxin A(4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *J Exp Med.* 2000;191(7):1197-208.
108. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 2007;21(2):325-32.

109. Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(17):5335-9.
110. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349-61.
111. Bäck M, Powell WS, Dahlén SE, Drazen JM, Evans JF, Serhan CN, et al. Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid receptors: IUPHAR Review 7. *Br J Pharmacol*. 2014;171(15):3551-74.
112. Serhan CN, Fiore S, Levy BD. Cell-cell interactions in lipoxin generation and characterization of lipoxin A4 receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;744:166-80.
113. Chiang N, Serhan CN, Dahlén SE, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE, et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):463-87.
114. Maderna P, Godson C. Lipoxins: revolutionary road. *Br J Pharmacol*. 2009;158(4):947-59.
115. Morris T, Stables M, Gilroy DW. New perspectives on aspirin and the endogenous control of acute inflammatory resolution. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:1048-65.
116. Paul-Clark MJ, Van Cao T, Moradi-Bidhendi N, Cooper D, Gilroy DW. 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. *J Exp Med*. 2004;200(1):69-78.
117. Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Cisalpino D, Sousa LP, Vieira AT, et al. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol*. 2007;179(12):8533-43.
118. Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG, Fierro IM. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(3):C557-63.
119. Bonnans C, Gras D, Chavis C, Mainprice B, Vachier I, Godard P, et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of lipoxins in human airway epithelial cells. *Biomed Pharmacother*. 2007;61(5):261-7.
120. Machado FS, Aliberti J. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. *Immunol Res*. 2006;35(3):209-18.

121. Shirey KA, Lai W, Pletneva LM, Karp CL, Divanovic S, Blanco JC, et al. Role of the lipoxygenase pathway in RSV-induced alternatively activated macrophages leading to resolution of lung pathology. *Mucosal Immunol.* 2014;7(3):549-57.
122. Russell CD, Schwarze J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. *Immunology.* 2014;141(2):166-73.
123. Aliberti J, Serhan C, Sher A. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med.* 2002;196(9):1253-62.
124. Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1601-6.
125. Shryock N, McBerry C, Salazar Gonzalez RM, Janes S, Costa FT, Aliberti J. Lipoxin A(4) and 15-epi-lipoxin A(4) protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN-gamma in the brain. *PLoS One.* 2013;8(4):e61882.
126. Souza MC, Paixão FH, Ferraris FK, Ribeiro I, Henriques M. Artesunate Exerts a Direct Effect on Endothelial Cell Activation and NF- $\kappa$ B Translocation in a Mechanism Independent of Plasmodium Killing. *Malar Res Treat.* 2012;2012:679090.
127. Martins YC, Werneck GL, Carvalho LJ, Silva BP, Andrade BG, Souza TM, et al. Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. *Malar J.* 2010;9:85.
128. Araújo CV, Estado V, Tibiriçá E, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvasc Res.* 2012;84(2):218-21.
129. Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res.* 2000;87(12):1141-8.
130. Roffê E, Silva AA, Marino AP, dos Santos PV, Lannes-Vieira J. Essential role of VLA-4/VCAM-1 pathway in the establishment of CD8+ T-cell-mediated *Trypanosoma cruzi*-elicited meningoencephalitis. *J Neuroimmunol.* 2003;142(1-2):17-30.
131. Bates JH, Baconnier P, Milic-Emili J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. *J Appl Physiol* (1985). 1988;64(5):2204-14.



132. Spieth PM, Silva PL, Garcia CS, Ornellas DS, Samary CS, Moraes L, et al. Modulation of stress versus time product during mechanical ventilation influences inflammation as well as alveolar epithelial and endothelial response in rats. *Anesthesiology*. 2015;122(1):106-16.
133. Weibel J. Use of the abortion pill, RU-486, might cause endometriosis. *Reprod Toxicol*. 1990;4(4):337.
134. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007;13(6):703-10.
135. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science*. 2012;335(6071):936-41.
136. Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN, Jacobsen SE, Dubois CM, Kopp WC, et al. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol*. 1991;147(1):22-8.
137. Frosch AE, John CC. Immunomodulation in *Plasmodium falciparum* malaria: experiments in nature and their conflicting implications for potential therapeutic agents. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(11):1343-56.
138. Abreu TP, Silva LS, Takiya CM, Souza MC, Henriques MG, Pinheiro AA, et al. Mice rescued from severe malaria are protected against renal injury during a second kidney insult. *PLoS One*. 2014;9(4):e93634.
139. Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, Larsen R, et al. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15837-42.
140. Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK, Perretti M. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. *Inflamm Res*. 1998;47 Suppl 3:S158-65.
141. Cristante E, McArthur S, Mauro C, Maggioli E, Romero IA, Wylezinska-Arridge M, et al. Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(3):832-41.
142. Meisner JK, Sumer S, Murrell KP, Higgins TJ, Price RJ. Laser speckle flowmetry method for measuring spatial and temporal hemodynamic alterations throughout large microvascular networks. *Microcirculation*. 2012;19(7):619-31.

143. Romano M, Recchia I, Recchiuti A. Lipoxin receptors. *ScientificWorldJournal*. 2007;7:1393-412.
144. Pino P, Taoufiq Z, Nitchou J, Vouldoukis I, Mazier D. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost*. 2005;94(2):336-40.
145. Wu Y, Wang YP, Guo P, Ye XH, Wang J, Yuan SY, et al. A lipoxin A4 analog ameliorates blood-brain barrier dysfunction and reduces MMP-9 expression in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Mol Neurosci*. 2012;46(3):483-91.
146. Luo CL, Li QQ, Chen XP, Zhang XM, Li LL, Li BX, et al. Lipoxin A4 attenuates brain damage and downregulates the production of pro-inflammatory cytokines and phosphorylated mitogen-activated protein kinases in a mouse model of traumatic brain injury. *Brain Res*. 2013;1502:1-10.
147. 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;189(2):968-79.
148. El-Assaad F, Wheway J, Mitchell AJ, Lou J, Hunt NH, Combes V, et al. Cytoadherence of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells to murine brain and lung microvascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun*. 2013;81(11):3984-91.
149. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol*. 2015;27(3):200-15.
150. Frevert U, Nacer A, Cabrera M, Movila A, Leberl M. Imaging *Plasmodium* immunobiology in the liver, brain, and lung. *Parasitol Int*. 2014;63(1):171-86.
151. Ong PK, Melchior B, Martins YC, Hofer A, Orjuela-Sánchez P, Cabrales P, et al. Nitric oxide synthase dysfunction contributes to impaired cerebroarteriolar reactivity in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003444.
152. Cabrales P, Carvalho LJ. Intravital microscopy of the mouse brain microcirculation using a closed cranial window. *J Vis Exp*. 2010(45).
153. Chinthamani S, Odusanwo O, Mondal N, Nelson J, Neelamegham S, Baker OJ. Lipoxin A4 inhibits immune cell binding to salivary epithelium and vascular endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(7):C968-78.
154. Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol*. 2002;128(1-2):58-68.

155. Wang YF, Gu YT, Qin GH, Zhong L, Meng YN. Curcumin ameliorates the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia by upregulating heme oxygenase-1 expression in brain microvascular endothelial cells. *J Mol Neurosci*. 2013;51(2):344-51.
156. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:323-54.
157. Lu CY, Yang YC, Li CC, Liu KL, Lii CK, Chen HW. Andrographolide inhibits TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 expression via suppression of NADPH oxidase activation and induction of HO-1 and GCLM expression through the PI3K/Akt/Nrf2 and PI3K/Akt/AP-1 pathways in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2014;91(1):40-50.
158. Wu L, Liu ZJ, Miao S, Zou LB, Cai L, Wu P, et al. Lipoxin A4 ameliorates cerebral ischaemia/reperfusion injury through upregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Neurol Res*. 2013;35(9):968-75.
159. Haworth O, Levy BD. Lipoxins, resolvins and protectins: new leads for the treatment of asthma. *Expert Opin Drug Discov*. 2008;3(10):1209-22.
160. Chen M, Divangahi M, Gan H, Shin DS, Hong S, Lee DM, et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J Exp Med*. 2008;205(12):2791-801.
161. Cheng X, He S, Yuan J, Miao S, Gao H, Zhang J, et al. Lipoxin A4 attenuates LPS-induced mouse acute lung injury via Nrf2-mediated E-cadherin expression in airway epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2016;93:52-66.
162. Ortiz-Muñoz G, Mallavia B, Bins A, Headley M, Krummel MF, Looney MR. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 regulates neutrophil-platelet aggregation and attenuates acute lung injury in mice. *Blood*. 2014;124(17):2625-34.
163. Wang Q, Lian QQ, Li R, Ying BY, He Q, Chen F, et al. Lipoxin A(4) activates alveolar epithelial sodium channel, Na,K-ATPase, and increases alveolar fluid clearance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(5):610-8.
164. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 2011;17(11):1381-90.
165. Norling LV, Spite M, Yang R, Flower RJ, Perretti M, Serhan CN. Cutting edge: Humanized nano-proresolving medicines mimic inflammation-resolution and enhance wound healing. *J Immunol*. 2011;186(10):5543-7.

166. Feintuch CM, Saidi A, Seydel K, Chen G, Goldman-Yassen A, Mita-Mendoza NK, et al. Activated Neutrophils Are Associated with Pediatric Cerebral Malaria Vasculopathy in Malawian Children. *MBio*. 2016;7(1):e01300-15.
167. Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, et al. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity*. 2010;33(2):266-78.
168. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
169. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2000;164(4):1663-7.
170. Lefebvre JS, Marleau S, Milot V, Lévesque T, Picard S, Flamand N, et al. Toll-like receptor ligands induce polymorphonuclear leukocyte migration: key roles for leukotriene B4 and platelet-activating factor. *FASEB J*. 2010;24(2):637-47.
171. Wu B, Walker J, Spur B, Rodriguez A, Yin K. Effects of Lipoxin A4 on antimicrobial actions of neutrophils in sepsis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;94:55-64.
172. Jones CN, Dalli J, Dimisko L, Wong E, Serhan CN, Irimia D. Microfluidic chambers for monitoring leukocyte trafficking and humanized nano-proresolving medicines interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(50):20560-5.
173. Day RB, Link DC. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(9):1415-23.
174. Bozinovski S, Anthony D, Anderson GP, Irving LB, Levy BD, Vlahos R. Treating neutrophilic inflammation in COPD by targeting ALX/FPR2 resolution pathways. *Pharmacol Ther*. 2013;140(3):280-9.
175. Stenke L, Edenius C, Samuelsson J, Lindgren JA. Deficient lipoxin synthesis: a novel platelet dysfunction in myeloproliferative disorders with special reference to blastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1991;78(11):2989-95.
176. Carlier MF, Pernier J, Montaville P, Shekhar S, Kühn S, group CDaM. Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(16):3051-67.
177. Insall RH, Machesky LM. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell*. 2009;17(3):310-22.

178. Du L, Zhou J, Zhang J, Yan M, Gong L, Liu X, et al. Actin filament reorganization is a key step in lung inflammation induced by systemic inflammatory response syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(5):597-603.

## **8 ANEXOS**

### **8.1 ANEXO I – Publicações relacionadas ao assunto da tese (2013-2016)**



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## International Immunopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/intimp](http://www.elsevier.com/locate/intimp)Lipoxin A<sub>4</sub> attenuates endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria

Mariana C. Souza<sup>a,b,1</sup>, Tatiana A. Pádua<sup>a,b,1</sup>, Natália D. Torres<sup>a,b</sup>, Maria Fernanda Souza Costa<sup>a,b</sup>, André P. Candéa<sup>a,b</sup>, Thadeu Maramaldo<sup>a,b</sup>, Leonardo Noboru Seito<sup>a</sup>, Carmen Penido<sup>a,b</sup>, Vanessa Estado<sup>c</sup>, Barbara Antunes<sup>c</sup>, Leandro Silva<sup>d</sup>, Ana Acácia Pinheiro<sup>d</sup>, Celso Caruso-Neves<sup>d</sup>, Eduardo Tibiriçá<sup>c</sup>, Leonardo Carvalho<sup>e</sup>, Maria G. Henriques<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> National Institute for Science and Technology on Innovation on Neglected Diseases (INCT/IDN), Center for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Cardiovascular Investigation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>d</sup> Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Malaria Research, Instituto Oswaldo Cruz, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 November 2014

Received in revised form 23 December 2014

Accepted 24 December 2014

Available online 7 January 2015

## Keywords:

Endothelial dysfunction

Lipoxin

Malaria

Brain–blood barrier breakdown

## ABSTRACT

A breakdown of the brain–blood barrier (BBB) due to endothelial dysfunction is a primary feature of cerebral malaria (CM). Lipoxins (LX) are specialized pro-resolving mediators that attenuate endothelial dysfunction in different vascular beds. It has already been shown that LX<sub>4</sub> prolonged *Plasmodium berghei*-infected mice survival by a mechanism that depends on inhibiting IL-12 production and CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells in brain tissue; however, the effects of this treatment on endothelial dysfunction induced during experimental cerebral malaria (ECM) remains to be elucidated. Herein, we investigate the role of LX<sub>4</sub> on endothelial dysfunction during ECM. The treatment of *P. berghei*-infected mice with LX<sub>4</sub> prevented BBB breakdown and ameliorated behavioral symptoms but did not modulate TNF- $\alpha$  production. In addition, microcirculation analysis showed that treatment with LX<sub>4</sub> significantly increased functional capillary density in brains of *P. berghei*-infected C57BL/6 mice. Furthermore, histological analyses of brain sections demonstrated that exogenous LX<sub>4</sub> reduced capillary congestion that was accompanied by reduced ICAM-1 expression in the brain tissue. In agreement, LX<sub>4</sub> treatment of endothelial cells stimulated by *Plasmodium berghei* (Pb)- or *Plasmodium falciparum* (Pf)-parasitized red blood cells (RBCs) inhibited ICAM-1 expression. Additionally, LX<sub>4</sub> treatment restored the expression of HO-1 that is reduced during ECM. As well, LX<sub>4</sub> treatment inhibits PbRBC and PfRBC adhesion to endothelial cells that was reversed by the use of an HO-1 inhibitor (ZnPPiX). Our results demonstrate for the first time that LX<sub>4</sub> ameliorates endothelial dysfunction during ECM by modulating ICAM-1 and HO-1 expression in brain tissue.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Malaria is the most widespread parasitic disease, and despite the many efforts made to eradicate malaria, it still accounts for 1 million deaths per year [1]. Death by cerebral malaria is closely associated

with the adhesion of parasitized erythrocytes to brain vasculature and breakdown of the blood–brain barrier (BBB) [2,3]. In fact, it has been widely demonstrated that murine experimental cerebral malaria (ECM)-induced endothelial dysfunction depends on the adhesion of parasitized erythrocytes to cerebral microvasculature [4–6]; the production of inflammatory mediators, such as TNF- $\alpha$ , as well as increased expression of adhesion molecules on endothelial cells [7,8]. Recent advances concerning malaria treatment have suggested that an adjuvant therapy targeting endothelial activation improves patient outcome [9–11]. Indeed, prevention of BBB disruption has been shown to diminish ECM [3], which can be achieved via pharmacological induction of the stress-responsive protein heme oxygenase-1 (HO-1) and exposure to carbon monoxide, the end-product of HO-1 activity [12].

Lipoxins (LX) are products of arachidonic acid metabolism and are produced through sequential lipoxygenase activity following cell–cell

**Abbreviations:** AI, adhesion index; BBB, brain–blood barrier; BOC-2, N-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; CM, cerebral malaria; ECM, experimental cerebral malaria; ELISA, enzyme linked immuno sorbent assay; HO, heme oxygenase; ICAM, intercellular adhesion molecule; LX, lipoxin; NO, nitric oxide; Pb, *Plasmodium berghei*; Pf, *Plasmodium falciparum*; RBC, red blood cell; TNF, tumor necrosis factor; ZnPPiX, zinc protoporphyrin IX.

\* Corresponding author at: Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: [gracahenriques@fiocruz.br](mailto:gracahenriques@fiocruz.br) (M.G. Henriques).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.12.033>

1567-5769/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.



interactions in the inflammatory milieu (reviewed by [13]). The interaction of LXA<sub>4</sub> and its receptor, ALX has an anti-inflammatory and pro-resolving activity in several inflammatory models such as allergic airway inflammation [14], autoimmune diseases [15] and inflammatory diseases triggered by bacterial infection [16]. The effect of LXA<sub>4</sub> on endothelial cells includes the stimulation of cytoprotective pathways [17–20]. It has been widely reported that LXA<sub>4</sub> upregulates the expression of heme-oxygenase 1 (HO-1), a stress-responsive enzyme with cytoprotective activities [21]. In fact, the stimulation of HO-1 expression by LXA<sub>4</sub> in endothelial cells is responsible for the inhibition of cellular activation, including decreased expression of adhesion molecules [22].

Recently, Shryock and colleagues [23] demonstrated that, during severe malaria, treatment with LX epimers (15-epi-LXA<sub>4</sub>) prolonged survival by a mechanism that depends on inhibiting IL-12 production and CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cell accumulation in brain tissue. However, the effects of this treatment on endothelial dysfunction that is triggered during ECM remain to be elucidated. In the present study, we provide evidence that LXA<sub>4</sub> exerts a protective effect on brain's endothelial cells by beneficially impacting cerebral edema formation and microcirculation. The underlying mechanisms are shown to include the prevention of capillary rarefaction and anti-adhesive/anti-inflammatory effects on endothelial cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics statement

This work was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on Ethical Use of Laboratory Animals of the Oswaldo Cruz Foundation (permit number L052/12).

### 2.2. Animal preparation and experimental protocol

Male C57BL/6 mice (5–6 weeks old) were provided by the Oswaldo Cruz Foundation breeding unit (Rio de Janeiro, Brazil) and caged with free access to food and fresh water at the Farmanguinhos experimental facility, with a room temperature ranging from 22 to 24 °C in a 12-hour light/dark cycle. The animals were randomly assigned to three groups: uninfected, *P. berghei*-infected and LXA<sub>4</sub>-treated *P. berghei*-infected mice. *P. berghei* ANKA GFPcon 259cl2 was donated from Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4, Manassas, VA; deposited by CJ Janse and AP Waters, MR4 number: MRA-865). The infection was induced via intraperitoneal (*i.p.*) injection of  $5 \times 10^6$  *P. berghei*-parasitized red blood cells (*PbRBCs*) diluted in saline solution (200  $\mu$ l), which were withdrawn from a previously infected mouse of the same strain. Uninfected animals received saline solution (200  $\mu$ l, *i.p.*). LXA<sub>4</sub> treatment (0.5  $\mu$ g/kg/day in 200  $\mu$ l sterile saline) was performed by *i.p.* injection 2 h before infection. Untreated mice received the same volume of sterile saline. The treatment was performed daily, from day 1 to day 6 post-infection. Six days post-infection, a thick blood smear was performed for parasitemia determination using Diff-Quick staining. ECM was defined as the presentation of at least 2 of the following clinical signs of neurologic involvement: ataxia, limb paralysis, poor righting reflex, seizures, roll-over and coma. In addition, a set of 6 behavioral tests (transfer arousal, locomotor activity, tail elevation, wire maneuver, contact righting reflex, and righting in arena) adapted from the SHIRPA protocol [24,25] was used to provide a better estimate of the overall clinical status of the mice during infection. The performance in each test was assessed using the following scoring system: 0 to 5 (transfer arousal), 0 to 4 (locomotor activity), 0 to 4 (tail elevation), 0 to 4 (wire maneuver), 0 to 3 (contact righting reflex), and 0 to 3 (righting in arena). Tests were performed at day 0 and day 6 post-infection in 10 mice per group. The data are expressed as differences between the values registered at day 0 (pre-infection) and day 6 post-

infection, from each individual mouse. Lower numbers represent maximum performance, whereas higher scores represent severe behavioral impairment. During all experimental of the procedures, the mice were monitored daily, and those that presented impaired locomotor activity and no struggle response to sequential handling were euthanized.

### 2.3. TNF- $\alpha$ determination from brain tissue

TNF- $\alpha$  levels were evaluated from brain tissue. Briefly, brains from non-infected, *P. berghei*-infected and LXA<sub>4</sub>-treated *P. berghei*-infected mice were excised and homogenized in cell lysis buffer [20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (1:1000, Sigma-Aldrich, USA)] and immediately frozen at –80 °C. The total protein content of each tissue homogenate was evaluated using the Bradford method, followed by determination of cytokine production using a standard sandwich ELISA, performed according to manufacturer's instructions (BD Pharmingen, USA). The plates were read at 490 nm in M5 Spectrophotometer (Molecular Devices, USA). The results were expressed as ng of cytokine per mg of tissue.

### 2.4. Evaluation of blood–brain barrier disruption

BBB disruption was evaluated as previously described [26]. The mice were infected and treated as described above. On day 5 post-infection, mice received an intravenous (*i.v.*) injection of 1% Evans blue dye (Sigma-Aldrich, Brazil) and were euthanized 1 h later. Their brains were weighed and placed in formamide (2 ml, 37 °C, 48 h) to extract the Evans blue dye from the brain tissue. Absorbance was measured at 620 nm (Spectramax 190, Molecular Devices, CA, USA). The concentration of Evans blue dye was calculated using a standard curve. The data are expressed as mg of Evans blue dye per g of brain tissue.

### 2.5. Cerebral intravital microscopy with epi-illumination and fluorescence

For intravital microscopy, the mice were infected and treated as described above. At day 5 post-infection, they were anesthetized via *i.p.* injection with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Anesthesia was maintained via additional intravenous (*i.v.*) doses of 5 mg/kg via the tail vein. Core temperature was monitored with a rectal probe and was maintained at 37 °C with a homeothermic blanket (Harvard Apparatus, Boston, MA, USA).

To visualize the cerebral microcirculation, a craniotomy of the right parietal bone was performed using a drill to expose the *pia mater* microvasculature, as described previously [27]. This window also enables visualization of *in vivo* leukocyte recruitment [28]. The assessed field was continuously perfused with artificial cerebrospinal fluid at 37 °C, pH 7.35. The perfusate was continuously aerated with 10% O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> and 84% N<sub>2</sub> to maintain tension and gas levels comparable to physiological pH and to avoid local inflammation.

Following *i.v.* administration of fluorescein dextran (FITC-dextran 150), images of the microcirculation were acquired using Archimed 3.7.0 software (Microvision, Evry, France). The capillary count was made using Saisam 5.1.3 software (Microvision). Serial images were taken with 10 $\times$  ocular and 10 $\times$  objective lenses (Olympus BX150WI; Center Valley, PA, USA) for 1 min/field from four fields. Only the continuously perfused capillaries were counted to determine the mean functional capillary density, expressed as the number of capillaries/mm<sup>2</sup>.

To label circulating leukocytes, 0.3 mg/kg rhodamine 6G was *i.v.* injected. Fluorescing leukocytes were visualized via microscopy as described above. The leukocyte–endothelial interaction was evaluated by counting the number of leukocytes adhering to the venular wall (100  $\mu$ m long) over 30 s and expressed as the number of cells/min/100  $\mu$ m. Parameters were determined in *pia mater* venules with diameters ranging from 50 to 70  $\mu$ m.



## 2.6. Brain histology

Brains from uninfected, *P. berghei*-infected and LXA<sub>4</sub>-treated *P. berghei*-infected mice were carefully removed, fixed in 4% buffered formaldehyde, and paraffin-embedded. Five-micrometer-thick slices were cut and stained with hematoxylin and eosin. The cerebral microvasculature was analyzed in the cortical-medullary region. Occlusive vessels were examined in 30 consecutive fields under 400× magnification. Adhered parasitized red blood cells were assessed in 30 consecutive fields under 1000× magnification according to the following semi-quantitative scoring: 0 = no adhered parasitized red blood cells; 1 = unique adhered parasitized red blood cells; 2 = adhered rosettes; 3 = diffuse adhered cells.

## 2.7. Immunodetection of HO-1 and ICAM-1

Brains were removed from perfused mice and homogenized in ice-cold extraction buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40) freshly supplemented with phosphatase and protease inhibitors (10 mM NaF, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and 1× protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich, USA). The final protein concentration in each condition was determined using the DC™ Protein assay reagent (Bio-Rad, USA), using BSA as a standard. Aliquots containing 30 µg of protein were re-suspended in SDS-PAGE loading buffer, resolved on 11% SDS acrylamide gels and transferred onto PVDF Hybond™ membranes (Amersham, UK). After blocking with 5% non-fat dry milk/Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 for 1 h at room temperature, the membranes were probed overnight at 4 °C with specific primary antibodies followed by horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies. Rabbit polyclonal anti-mouse HO-1 (1:5000) and horseradish peroxidase-labeled goat polyclonal anti-rabbit antibodies (1:2500) were obtained from Enzo Life Sciences, Inc. (USA). Mouse monoclonal anti-mouse ICAM-1 (1:1000) and horseradish peroxidase-labeled goat monoclonal anti-mouse antibodies (1:500) were obtained from Santa Cruz Biotechnologies, Inc. (USA). Then, PVDF sheets were incubated with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:10,000) for 1 h and developed by an ECL®-plus reagent (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Biosciences). The bands were quantified by densitometry, using ImageJ (public domain) software programs.

The probed membranes were stripped with Re-Blot Plus Western Blot stripping solution (Millipore) for 30 min at room temperature and re-probed with rabbit polyclonal β-actin antibody to detect total levels of protein.

## 2.8. Endothelial cell stimulation

The murine thymic endothelioma cell line (tEnd.1) [29] and the human endothelial cell line ECV-304 [22] were kindly provided by Dr. T.C. Barja-Fidalgo (Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil). The endothelial cell lines ECV-304 or tEnd.1 were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. The cells were plated onto 24-well culture plates (Nunc, Rochester, NY, USA) and incubated (10<sup>4</sup> cells/well) at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> chambers for 24 h. Before each experiment, ECV-304 or tEnd.1 cells were pretreated or not with LXA<sub>4</sub> (10 nM) for 1 h, the LXA<sub>4</sub> receptor antagonist BOC-2 (N-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe, 40 nM) or the HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin IX (ZnPPIX, 50 µM). *P. falciparum*-infected RBCs (*Pf*RBCs, kindly provided by Dr. M.G. Zalis, Universidade Federal do Rio de Janeiro) or *P. berghei*-infected RBCs (*Pb*RBCs) were stained with CFSE (25 µM; Life Technologies, USA) for 30 min and then added to both non-treated or treated the ECV-304 or tEnd.1 cultures (50 erythrocytes/cell, 5% parasitemia).

## 2.9. Cytoadherence assay

ECV-304 and tEnd.1 cells were cultured and treated as described above, and *Pf*RBCs or *Pb*RBCs were allowed to adhere to the ECV-304 or tEnd.1 cultures for 1 h. Non-adherent erythrocytes were gently washed away with PBS, and the remaining cells were subsequently fixed in ethanol and stained with Giemsa (Merck, Brazil). The number of adhered erythrocytes per ECV-304 or tEnd.1 cell was determined by direct counting under 400× magnification. The data are expressed as an association index calculated as previously described [30]: Adhesion index (AI) = (cell with bound erythrocytes) / total cell number × (erythrocytes bound to cell) / (total cell number × 100).

## 2.10. Immunocytochemistry

ECV-304 or tEnd.1 pre-treatment and stimulation were performed as described above. The immunofluorescent studies were performed as described previously [26]. To evaluate ICAM-1 expression, cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde and 4% (w/v) sucrose, followed by blocking with 2% bovine serum albumin. The cells were then incubated with anti-human ICAM-1 (1:50, BD Pharmingen, USA) mAb or anti-mouse ICAM-1 (1:100 BD Pharmingen, USA) and subsequently incubated with the appropriate secondary FITC-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA). Microscopic acquisition of the fluorescent images was performed using a fluorescence microscope (Nikon, Japan), and the fluorescence intensity was measured using Volocity software (Perkin Elmer, USA).

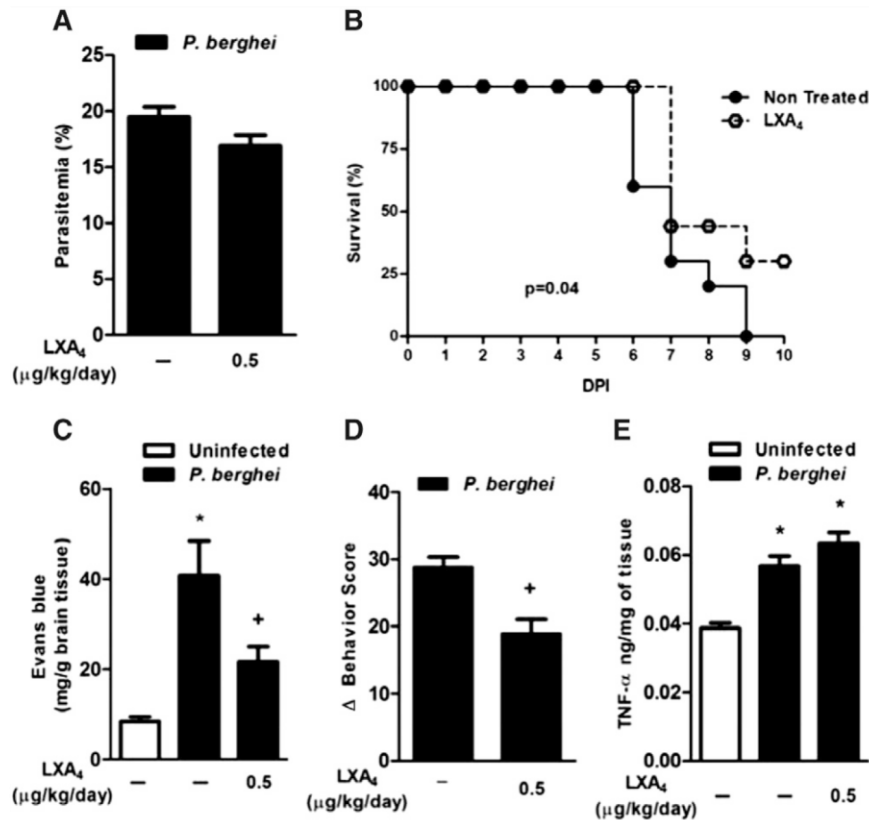
## 2.11. Statistical analysis

Statistical significance was assessed using ANOVA followed by the Bonferroni test. The results are expressed as the mean ± SEM, and the significance level in all cases was set at  $p \leq 0.05$ . A log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare the percent survival. The significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. LXA<sub>4</sub> prevents cerebral dysfunction induced by *P. berghei* infection independently of TNF-α production

To address the involvement of LXA<sub>4</sub> on vascular dysfunction during ECM *P. berghei*-infected C57BL/6 mice were treated with LXA<sub>4</sub> (0.5 µg/kg/day). Initially, LXA<sub>4</sub> dose-response curves were constructed, and from these curves the threshold dose was defined (Supplemental data 1). LXA<sub>4</sub> treatment did not alter parasitemia levels 5 d post-infection (Fig. Fig. 1A), however, in agreement with a previous study [23], prolonged the survival of *P. berghei*-infected mice (Fig. Fig. 1B). Treatment with LXA<sub>4</sub> reduced the Evans blue dye extravasation into brain tissue observed during ECM (Fig. Fig. 1C). It is important to note that treatment with LXA<sub>4</sub> did not modulate Evans blue dye extravasation to the brain tissue of uninfected mice (Supplementary data 2). Moreover, LXA<sub>4</sub> treatment further improved behavioral and functional scores in treated mice compared with untreated mice (Fig. Fig. 1D). To investigate if LXA<sub>4</sub> ameliorates vascular dysfunction by modulating TNF-α production that accounts for activation of endothelial cells, we investigated TNF-α production in brain tissue of LXA<sub>4</sub> treated *P. berghei*-infected mice. A significant increase in TNF-α production was observed in the brains of *P. berghei* infected C57BL/6 mice compared to uninfected mice, however, the increased levels of TNF-α induced by *P. berghei* infection were not affected by LXA<sub>4</sub> treatment (Fig. Fig. 1E).



**Fig. 1.** LXA<sub>4</sub> attenuates cerebral malaria. (A) Parasitemia levels were evaluated 5 days post-infection in C57BL/6 infected with *P. berghei* and treated with LXA<sub>4</sub> (0.5 μg/kg/day), as described in Materials and methods. The results are expressed as the mean ± SEM from at least six animals per group in two independent experiments. (B) Survival rates for C57BL/6 mice infected with *P. berghei* untreated (vehicle, closed symbols) or treated with LXA<sub>4</sub> (0.5 μg/kg/day, open circle). The log-rank test revealed significantly different survival curves when untreated *P. berghei*-infected (n = 10) and LXA<sub>4</sub>-treated *P. berghei*-infected (n = 10) C57BL/6 mice were compared (p = 0.04). (C) Evans blue dye extravasation within brain tissue from C57BL/6 mice uninfected (open bars) or *P. berghei*-infected (closed bars) 5 days prior. C57BL/6 mice were treated with LXA<sub>4</sub> (0.5 μg/kg/day). The results are expressed as the mean ± SEM from at least six animals per group in two independent experiments. (D) Behavioral and functional analyses were evaluated 5 days post-infection in C57BL/6 infected with *P. berghei* and treated with LXA<sub>4</sub> (0.5 μg/kg/day), as described in Materials and methods. The results of behavioral and functional analyses are expressed as differences between values registered pre- and post-infection (Δ) from at least six animals per group. (E) TNF-α levels from brain tissue were evaluated using ELISA. The results are expressed as the mean ± SEM of six animals per group. Statistically significant differences compared with the uninfected group (p < 0.05) are indicated by \*, and statistically significant differences compared with the *P. berghei*-infected group (p < 0.05) are indicated by +.

### 3.2. LXA<sub>4</sub> ameliorates cerebral microcirculation of *P. berghei*-infected mice

Accordingly, a significant decrease in functional capillary density was observed due to diminished numbers of spontaneously perfused capillaries in the brains of *P. berghei*-infected mice (Fig. Fig. 2A and C) compared to uninfected mice (Fig. Fig. 2A and B). This phenomenon was partially reversed in LXA<sub>4</sub>-treated mice (Fig. Fig. 2A and D). Accordingly, histological analyses of brain sections from infected mice treated with LXA<sub>4</sub> showed a reduction in the number of congested capillaries (Fig. Fig. 2E and H) compared to non-treated infected mice (Fig. Fig. 2E and G). In histological analyses of brain sections from uninfected mice it was not observed glial cell swelling neither capillary congestion (Fig. Fig. 2E and F). The diminished percentage of occluded vessels observed in LXA<sub>4</sub>-treated mice was accompanied by lower score of parasitized erythrocytes adhesion to brain vasculature (Fig. Fig. 2I and L) then score observed in brain tissue of non-treated infected mice (Fig. Fig. 2I and K). No leukocytes were observed adhering to brain vasculature of non-infected mice (Fig. Fig. 2J).

### 3.3. LXA<sub>4</sub> inhibits endothelial activation markers during ECM

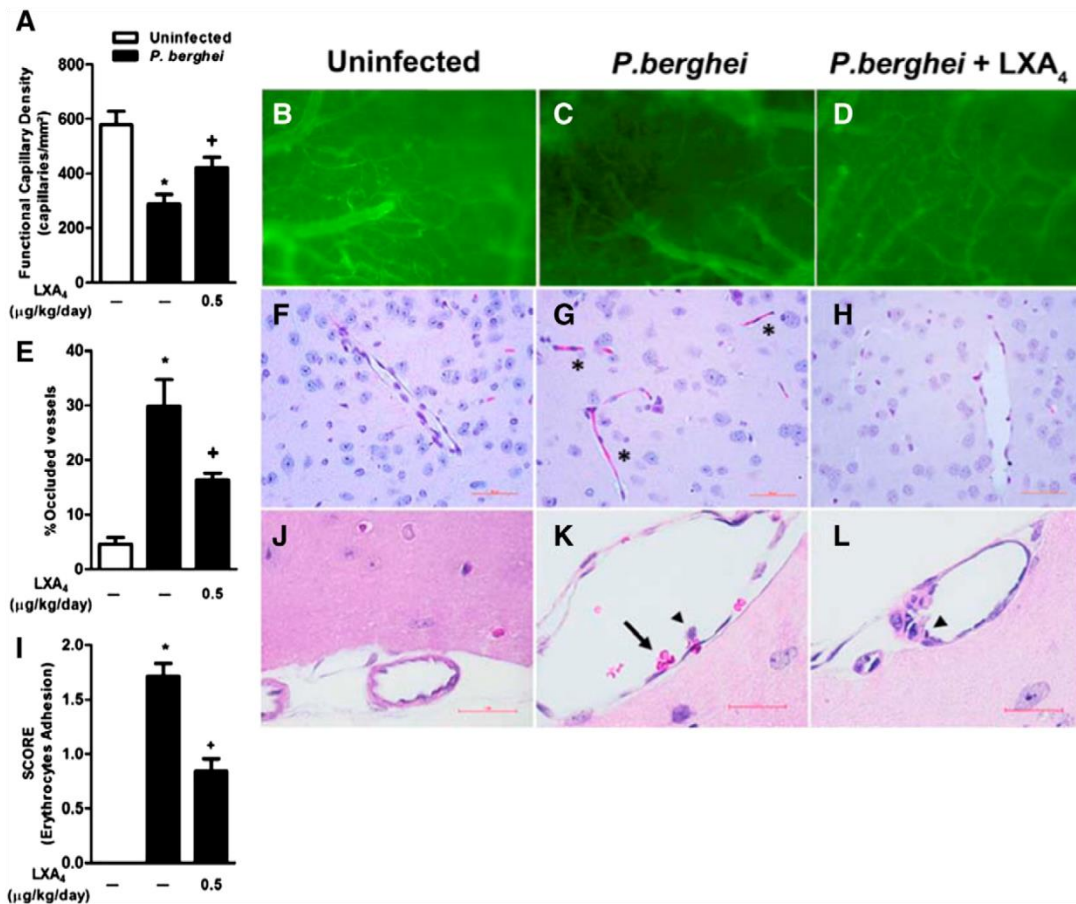
To investigate if the effects of LXA<sub>4</sub> are dependent of endothelial cell activation, the expression of endothelial activation marker ICAM-1 was

quantified in brain tissue of *P. berghei* infected mice, treated or not treated with LXA<sub>4</sub>. As expected, ICAM-1 expression was higher in *P. berghei* infected mice than in uninfected mice, and LXA<sub>4</sub> treatment reduced ICAM-1 expression in the brains of *P. berghei*-infected mice (Fig. Fig. 3A). Corroborating such results, the co-culture of murine endothelial cells (tEnd.1 cells) and red blood cells parasitized by *P. berghei* (PbRBCs) induced the expression of ICAM-1 expression (Fig. Fig. 3B). In agreement, *P. falciparum*-infected red blood cells (PfRBCs) also induced ICAM-1 expression in human endothelial cells (ECV-304 cells) (Fig. Fig. 3C). Interestingly, the treatment of both endothelial cell lines with LXA<sub>4</sub> impaired ICAM-1 expression when compared with the equivalent parasitized RBC-stimulated control group. Treatment with BOC-2 reversed the decreased ICAM-1 expression induced by LXA<sub>4</sub> (Fig. Fig. 3B and C).

### 3.4. LXA<sub>4</sub> triggers cytoprotective pathways during ECM

To address the hypothesis that LXA<sub>4</sub> triggers endothelial protective effects during ECM, we evaluated a mechanism by which LXA<sub>4</sub> ameliorates endothelial cell function in *P. berghei*-infected mice. To this end, the expression of HO-1 was quantified in brain tissue of *P. berghei* infected mice, treated or not treated with LXA<sub>4</sub>. Low levels of HO-1 were detected in the brains of *P. berghei* infected mice when compared with





**Fig. 2.** LXA<sub>4</sub> effects on brain vascular dysfunction during *P. berghei* infection. (A) Intravital microscopy was performed on brains from C57BL/6 mice either uninfected (open bars) or infected with *P. berghei* (closed bars) 5 days prior and functional capillary density were analyzed. Representative images of pial vessels in uninfected mice (B), *P. berghei*-infected mice (C) and *P. berghei*-infected and LXA<sub>4</sub>-treated (0.5 µg/kg/day; D). (E) The percentage of occluded vessels in brain sections recovered from uninfected (open bars), *P. berghei*-infected (closed bars) and *P. berghei*-infected and LXA<sub>4</sub>-treated (0.5 µg/kg/day) C57BL/6 mice. (I) Semi-quantitative analysis of cell adhesion in brain vessels. Values are expressed as the mean of 30 consecutive fields per slide from 6 animals in each group, and the score of erythrocyte adhesion was defined as described in the Materials and methods section. The results are expressed as the mean ± SEM from at least six animals per group in two independent experiments. Statistically significant differences compared with the uninfected group ( $p < 0.05$ ) are indicated by \*, and statistically significant differences compared with the *P. berghei*-infected group ( $p < 0.05$ ) are indicated by +. Representative photomicrographs of brains from uninfected mice (F and J), *P. berghei*-infected mice (G and K) and *P. berghei*-infected and LXA<sub>4</sub>-treated (0.5 µg/kg/day; H and L) demonstrating occluded vessels (\*), RBCs adhered to the endothelium (black arrows) and leukocytes adhered to the endothelium (head arrows).

uninfected mice; and LXA<sub>4</sub>-treated mice expressed similarly elevated levels of HO-1 over those observed in uninfected mice (Fig. Fig. 4A). Additionally, the co-culture of endothelial cells and parasitized red blood cells (either *Pb*RBCs or *Pf*RBCs) induced the adhesion of parasitized RBCs to the membranes of the respective endothelial cells. Adhesion was inhibited when both cell lines were pretreated with LXA<sub>4</sub> (10 nM) and treatment with BOC-2 (40 nM) reversed the inhibitory effect of LXA<sub>4</sub>. To evaluate the mechanism by which LXA<sub>4</sub> modulates parasitized RBC adhesion to endothelial cells, the cells were further treated with ZnPPiX (50 µM) to block the activity of HO-1. We observed that LXA<sub>4</sub>-reduced RBC adhesion was reversed by ZnPPiX pretreatment of both endothelial cell lines (Fig. Fig. 4B and C, Supplementary data 2).

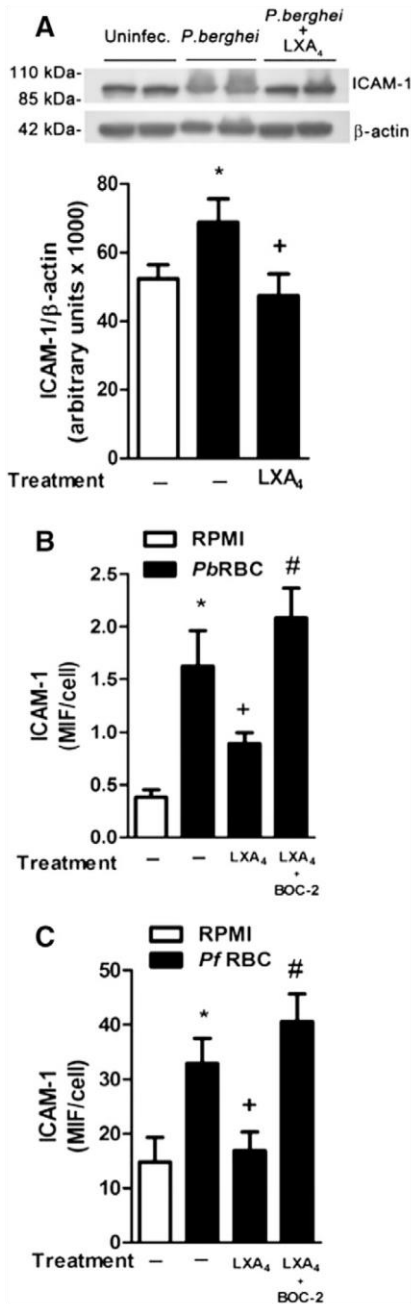
#### 4. Discussion

Herein, using an experimental model of cerebral malaria, we demonstrate for the first time that LXA<sub>4</sub> exerts an endothelial protective effect during ECM by inducing cytoprotective pathways. Despite its widely recognized role as anti-inflammatory mediator [13,19,31,32],

the role of LXA<sub>4</sub> during cerebral dysfunction induced by malaria infection is poorly understood.

Previous data in the literature have shown that treatment with the LXA<sub>4</sub> epimer improved mouse survival by inhibiting IL-12 production and CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cell accumulation in brain tissue [23]. In agreement with these results, we observed amelioration of major signs of ECM as cerebral edema and behavioral and functional scores. Interestingly, when we performed a dose–response experiment aimed to pharmacologically investigate the link between LXA<sub>4</sub> levels and its effects, we observed that lower doses were more effective. As described before, the LXA<sub>4</sub> receptor, ALX/FPRL<sub>1</sub> is a G-protein coupled receptor (GPCR) involved in cell- and agonist-specific signaling [33]. Furthermore, ALX/FPRL<sub>1</sub> is regulated by desensitization and agonist-induced internalization [34]. Thus, in our model, where LXA<sub>4</sub> is administered for 6 days, higher doses of LXA<sub>4</sub> are most likely inducing internalization and/or desensitization. In addition, LXA<sub>4</sub> did not interfere with parasitemia levels, supporting the evidence that LXA<sub>4</sub> modulates exclusively the host response to *P. berghei* infection.

Cerebral tissue damage induced during *P. berghei* infection is primarily due to inflammatory cell accumulation/activation, the production of



**Fig. 3.** LXA<sub>4</sub> inhibit ICAM-1 expression during *P. berghei* infection *in vivo* and *in vitro*. (A) Representative membrane preparations of uninfected (lanes 1 and 2, open bars), *P. berghei*-infected (lanes 3 and 4, closed bars) and *P. berghei*-infected and LXA<sub>4</sub>-treated (0.5 μg/kg/day; lanes 5 and 6) underwent immunoblotting for the detection of ICAM-1 in brain tissue. ICAM-1 expression levels were normalized to β-actin. The results are expressed as the means ± SEM (n = 6) of two independent experiments. Statistically significant differences compared with the uninfected group (p < 0.05) are indicated by \*, and statistically significant differences compared with the *P. berghei*-infected group (p < 0.05) are indicated by +. The murine tEnd.1 endothelial cell line (B) and human ECV-304 endothelial cell line (C) were used to determine ICAM-1 expression under parasitized RBC stimulation. ICAM-1 expression levels were evaluated in endothelial cells pretreated with LXA<sub>4</sub> (10 nM) or LXA<sub>4</sub> plus BOC-2 (40 nM) and stimulated with parasitized (*P. berghei* – *Pb*; *P. falciparum* – *Pf*) RBCs. The results are expressed as the MIF ± SEM from three independent experiments. Statistically significant differences compared with the parasitized RBC untreated group (p < 0.05) are indicated by +, significant differences compared with the LXA<sub>4</sub> treated group are indicated by #, and significant differences between unstimulated and parasitized RBC-stimulated cells are indicated by \*.

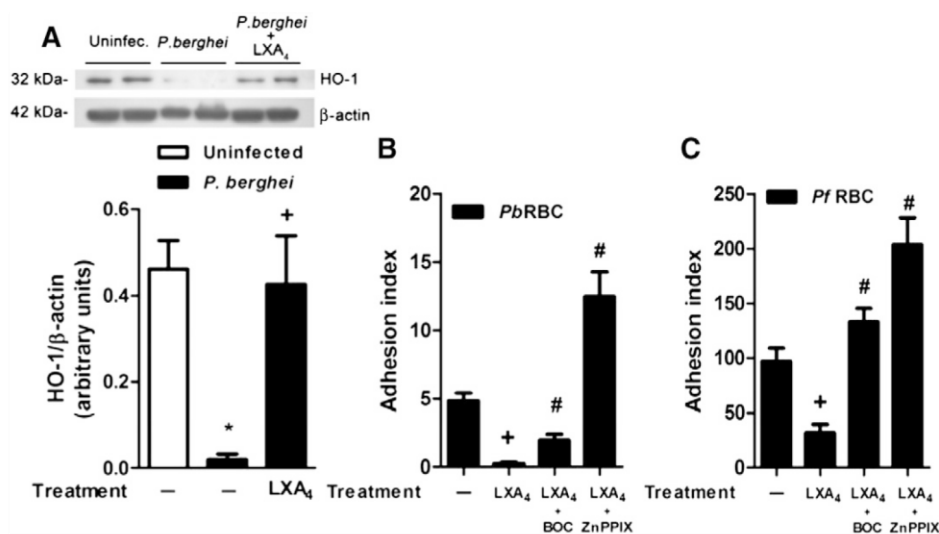
inflammatory mediators in the brain vasculature, and the breakdown of the BBB. This latter effect is induced by decreased expression of junction proteins in activated cerebral endothelial cells [3,35,36]. Lipoxins have been described to ameliorate BBB breakdown in non-infectious experimental models by modulating MMP9 expression and MAPK activation [37,38]. Compelling evidence suggests that the protective role of LXA<sub>4</sub> in diseases caused by apicomplexan parasites such as *Toxoplasma gondii* [39,40] depends on inhibition of cytokine production. Accordingly, increased production of IFN-γ and IL-12 has been demonstrated during ECM in the absence of endogenous LXA<sub>4</sub> [23]. It is noteworthy that IFN-γ and IL-12 are more relevant in lymphocyte activation rather than endothelial activation [41]. TNF-α has been demonstrated as a crucial cytokine in endothelial dysfunction during ECM [42,43]. However, in our model, LXA<sub>4</sub> did not modulate TNF-α production during ECM. As well, LXA<sub>4</sub> impairs the activation of TNF-α-stimulated endothelial cells [22,44], which suggests that prevention of brain edema formation in LXA<sub>4</sub>-treated mice does not depend on TNF-α production. Although the modulation of cytokines by LXA<sub>4</sub> treatment during severe malaria cannot be excluded, our results concerning cerebral dysfunction strongly suggested an additional role to the many played by this lipid mediator in ECM.

Although we did not observe a difference in lymphocyte accumulation in the brain tissue of LXA<sub>4</sub>-infected mice (data not shown), we observed an improved functional capillary density, a significant reduction in vascular occlusion in the brains of LXA<sub>4</sub>-treated mice and reduced *P. berghei*-infected erythrocytes adhered to brain vasculature. Indeed, ECM is associated with vasoconstriction and impaired responses to acetylcholine due to nitric oxide synthase dysfunction [45,46]. Thus, therapeutic approaches for improving endothelial function, such as the induction of HO-1 expression and reduction of ICAM-expression through the administration of either NO donors [47] or carbon monoxide [12], would be beneficial in *P. berghei* infection.

To confirm the hypothesis that LXA<sub>4</sub> is acting on endothelial dysfunction induced during ECM, the expression of endothelial cell activation marker, ICAM-1, was investigated. In the current study, LXA<sub>4</sub> impaired ICAM-1 expression in brain tissue of infected mice, as well as in *PbRBC*- and *PfRBC*-stimulated endothelial cells *in vitro*. The ability of the LXA<sub>4</sub>/ALX complex to modulate the expression of adhesion molecules has been described in other non-infectious models, including their capability to reduce the expression of ICAM-1 on TNF-α-stimulated endothelial cells *in vitro* [48,49]. Under inflammatory conditions, ICAM-1 signaling is involved in endothelial activation, the rearrangement of the endothelial actin cytoskeleton, the regulation of vascular permeability, and the transmigration of immune cells into the brain parenchyma [50,51]. The essential role of ICAM-1 in cytoadherence and vascular occlusion during ECM has been previously demonstrated [26]; however, until now, the direct effect of LXA<sub>4</sub> on the inhibition of ICAM-1 expression during ECM had not been shown.

Several studies have described that LXA<sub>4</sub>-induced HO-1 expression attenuates endothelial dysfunction both *in vivo* [52,53] and *in vitro* [22,54]. HO-1 is an isoenzyme that catabolizes free heme released under pathological conditions, especially in pathologies that are associated with intravascular hemolysis, such as burns, microangiopathy and malaria. HO-1 expression is related to tissue protection [21]. Indeed, the presence of HO-1 limits the damage induced during the inflammatory response, and its pharmacological up-regulation helps maintain BBB integrity under pathological conditions *in vivo* and *in vitro* [55]. It has been widely described that HO-1 inhibits the expression of several adhesion molecules, especially ICAM-1 [56,57]. As well, the modulation of adhesion molecules by LXA<sub>4</sub> via HO-1 expression in TNF-α-stimulated cells has already been demonstrated [22]. In addition, parasites export protein to erythrocyte membrane that allows parasitized red blood cell adhesion to adhesion molecules expressed on endothelial cells [42,58]. During ECM, HO-1 is known to be differentially regulated in certain tissues at different stages of the *Plasmodium* life cycle [12,59]. Furthermore, HO-1 production in brain tissue is associated with mouse survival,





**Fig. 4.** LXA<sub>4</sub>-induced HO-1 attenuates endothelial dysfunction induced by parasitized RBCs. (A) Representative membrane preparations of uninfected (lanes 1 and 2, open bars), *P. berghei*-infected (lanes 3 and 4, closed bars) and *P. berghei*-infected and LXA<sub>4</sub>-treated (0.5 μg/kg/day; lanes 5 and 6) underwent immunoblotting for the detection of HO-1 in brain tissue. HO-1 expression levels were normalized to β-actin. The results are expressed as the means ± SEM (n = 6) of two independent experiments. Statistically significant differences compared with the uninfected group (p < 0.05) are indicated by \*, and statistically significant differences compared with the *P. berghei*-infected group (p < 0.05) are indicated by +. The adhesion of PbRBCs (B) to tEnd.1 or PfRBCs (C) to ECV-304 was calculated using the adhesion index as described in the Materials and methods section. Adhesion index was evaluated in endothelial cells lines pretreated with LXA<sub>4</sub> (10 nM), LXA<sub>4</sub> plus BOC-2 (40 nM) and LXA<sub>4</sub> plus ZnPIX (50 μM) and stimulated with parasitized RBCs. The results are expressed as the mean ± SEM from three independent experiments. Statistically significant differences compared with the parasitized RBC untreated group (p < 0.05) are indicated by +, significant differences compared with the LXA<sub>4</sub> treated group are indicated by #.

decreased cerebral edema and decreased ICAM-1 expression [12]. However, even though LXA<sub>4</sub> has been demonstrated to induce HO-1 expression in non-infectious models *in vivo* [60], this effect has not been previously demonstrated in a malaria model. Thus, in our model, LXA<sub>4</sub> probably reduces the ICAM-1 expression by inducing the expression of HO-1.

Collectively, the results of this study suggest that LXA<sub>4</sub> attenuates cerebral dysfunction by regulating the expression of ICAM-1 and HO-1 both *in vivo* and *in vitro*.

### 5. Author's contributions

MCS and TAP designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper. NDT performed experiments and analyzed data. MFSC, APC, TM, LNS, VE, BA, LS performed experiments and analyzed data. ACA, CCN, and ET designed and supervised experiments. LC designed experiments and assisted in drafting this manuscript. MCS and MGH conceived the study, designed and supervised experiments and assisted in drafting this manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Dr. Octávio Menezes de Lima Junior at the Laboratory of Applied Pharmacology (Farmanguinhos, FIOCRUZ) for his critical reading of this manuscript. This work was supported by grants from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq: 481286/2013-6, 304588/2010-5 and 475262/2013), the Rio de Janeiro State Research Supporting Foundation Carlos Chagas Filho (FAPERJ: E-26/102335/2013, E-36/110605/2012, E-26/111.724/2013 and 111.272/2014), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES: 149/2007), and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ: 407766/2012).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.12.033>.

### References

- [1] Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2012;379:413–31.
- [2] Medana IM, Turner GD. Human cerebral malaria and the blood–brain barrier. *Int J Parasitol* 2006;36:555–68.
- [3] Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SHI, Frevort U. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog* 2012;8.
- [4] Baptista FG, Pamplona A, Pena AC, Mota MM, Pied S, Vigario AM. Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun* 2010;78:4033–9.
- [5] Amante FH, Haque A, Stanley AC, Rivera Fde L, Randall LM, Wilson YA, et al. Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental malaria. *J Immunol* 2010;185:3632–42.
- [6] McQuillan JA, Mitchell AJ, Ho YF, Combes V, Ball HJ, Golenser J, et al. Coincident parasite and CD8 T cell sequestration is required for development of experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2011;41:155–63.
- [7] Souza MC, Silva JD, Padua TA, Capelozzi VL, Rocco PRM, MdG Henriques. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. *Respir Physiol Neurobiol* 2013;186:65–72.
- [8] Haque A, Best SE, Unosson K, Amante FH, de Labastida F, Anstey NM, et al. Granzyme B expression by CD8 + T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2011;186:6148–56.
- [9] Bergmark B, Bergmark R, Beaudrap PD, Boum Y, Mwanga-Amumpaire J, Carroll R, et al. Inhaled nitric oxide and cerebral malaria: basis of a strategy for buying time for pharmacotherapy. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:e250–4.
- [10] Carvalho IJ, Moreira AD, Daniel-Ribeiro CT, Martins YC. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;109:577–88.
- [11] Kim H, Higgins S, Liles WC, Kain KC. Endothelial activation and dysregulation in malaria: a potential target for novel therapeutics. *Curr Opin Hematol* 2011;18:177–85.
- [12] Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphanyo S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* 2007;13:703–10.
- [13] Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:166–72.

- [14] Haworth O, Cernadas M, Yang R, Serhan CN, Levy BD. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nat Immunol* 2008;9:873–9.
- [15] Chan MM, Moore AR. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J Immunol* 2010;184:6418–26.
- [16] Chen M, Divangahi M, Gan H, Shin DS, Hong S, Lee DM, et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J Exp Med* 2008;205:2791–801.
- [17] Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. Aspirin-triggered lipoxin A4 blocks reactive oxygen species generation in endothelial cells: a novel antioxidant mechanism. *Thromb Haemost* 2007;97:88–98.
- [18] Cezar-de-Mello PF, Vieira AM, Nascimento-Silva V, Villela CG, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A4, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Br J Pharmacol* 2008;153:956–65.
- [19] Wu SH, Liao PY, Dong L, Chen ZQ. Signal pathway involved in inhibition by lipoxin A(4) of production of interleukins induced in endothelial cells by lipopolysaccharide. *Inflamm Res* 2008;57:430–7.
- [20] Fiorucci S, Distrutti E, Mencarelli A, Morelli A, Lauro SA, Cirino G, et al. Evidence that 5-lipoxygenase and acetylated cyclooxygenase 2-derived eicosanoids regulate leukocyte-endothelial adherence in response to aspirin. *Br J Pharmacol* 2003;139:1351–9.
- [21] Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:323–54.
- [22] Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG, Fierro IM. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C557–63.
- [23] Shryock N, McBerry C, Salazar Gonzalez RM, Janes S, Costa FT, Aliberti J. Lipoxin A(4) and 15-epi-lipoxin A(4) protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN-gamma in the brain. *PLoS One* 2013;8:e61882.
- [24] Martins YC, Werneck GL, Carvalho LJ, Silva BP, Andrade BG, Souza TM, et al. Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. *Malar J* 2010;9:85.
- [25] Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:177–88.
- [26] Souza MC, Paixao FH, Ferraris FK, Ribeiro I, Henriques M. Artesunate exerts a direct effect on endothelial cell activation and NF-kappaB translocation in a mechanism independent of *Plasmodium* killing. *Malar Res Treat* 2012;2012:679090.
- [27] Araújo CV, Estado V, Tibirica E, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvasc Res* 2012;84:218–21.
- [28] Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res* 2000;87:1141–8.
- [29] Ferraris FK, Rodrigues R, da Silva VP, Figueiredo R, Penido C, Henriques M. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. *Int Immunopharmacol* 2011;11:1–11.
- [30] Roffe E, Silva AA, Marino AP, dos Santos PV, Lannes-Vieira J. Essential role of VLA-4/VCAM-1 pathway in the establishment of CD8+ T-cell-mediated *Trypanosoma cruzi*-elicited meningoencephalitis. *J Neuroimmunol* 2003;142:17–30.
- [31] Menezes-de-Lima Jr O, Kassuya CA, Nascimento AF, Henriques M, Calixto JB. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006;80:123–35.
- [32] Pang H, Yi P, Wu P, Liu Z, Gong J, Hao H, et al. Effect of lipoxin A4 on lipopolysaccharide-induced endothelial hyperpermeability. *Sci World J* 2011;11:1056–67.
- [33] Romano M, Recchia I, Recchiuti A. Lipoxin receptors. *Sci World J* 2007;7:1393–412.
- [34] Le Y, Oppenheim JJ, Wang JM. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:91–105.
- [35] Pino P, Taoufiq Z, Nitcheu J, Vouldoukis I, Mazier D. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost* 2005;94:336–40.
- [36] de Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 2010;137:755–72.
- [37] Wu Y, Wang YP, Guo P, Ye XH, Wang J, Yuan SY, et al. A lipoxin A4 analog ameliorates blood-brain barrier dysfunction and reduces MMP-9 expression in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Mol Neurosci* 2012;46:483–91.
- [38] Luo CL, Li QQ, Chen XP, Zhang XM, Li LL, Li BX, et al. Lipoxin A4 attenuates brain damage and downregulates the production of pro-inflammatory cytokines and phosphorylated mitogen-activated protein kinases in a mouse model of traumatic brain injury. *Brain Res* 2013;1502:1–10.
- [39] Aliberti J, Hiény S, Reise Sousa C, Serhan CN, Sher A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat Immunol* 2002;3:76–82.
- [40] Aliberti J, Serhan C, Sher A. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med* 2002;196:1253–62.
- [41] Villegas-Mendez A, Greig R, Shaw TN, de Souza JB, Findlay EG, Stumhofer JS, et al. IFN-gamma producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol* 2012;189:968–79.
- [42] El-Assaad F, Wheway J, Mitchell AJ, Lou J, Hunt NH, Combes V, et al. Cytoadherence of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells to murine brain and lung microvascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 2013;81:3984–91.
- [43] Togbe D, de Souza PL, Fauconnier M, Boissay V, Fick L, Scheu S, et al. Both functional LTbeta receptor and TNF receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One* 2008;3:e2608.
- [44] Liao BC, Hsieh CW, Liu YC, Tzeng TT, Sun YW, Wung BS. Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor-alpha-induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF-kappaB activation: effects upon I kappa B and Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;229:161–71.
- [45] Ong PK, Melchior B, Martins YC, Hofer A, Orjuela-Sanchez P, Cabrales P, et al. Nitric oxide synthase dysfunction contributes to impaired cerebroarteriolar reactivity in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003444.
- [46] Cabrales P, Zanini GM, Meays D, Frangos JA, Carvalho LJ. Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *Am J Pathol* 2010;176:1306–15.
- [47] Orjuela-Sanchez P, Ong PK, Zanini GM, Melchior B, Martins YC, Meays D, et al. Transdermal glyceryl trinitrate as an effective adjunctive treatment with artemether for late-stage experimental cerebral malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5462–71.
- [48] Merched AJ, Serhan CN, Chan L. Nutritional disruption of inflammation-resolution homeostasis and atherogenesis. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4:12–24.
- [49] Chinthamani S, Odusanwo O, Mondal N, Nelson J, Neelamegham S, Baker OJ. Lipoxin A4 inhibits immune cell binding to salivary epithelium and vascular endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;302:C968–78.
- [50] Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol* 2000;165:3375–83.
- [51] Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 2002;128:58–68.
- [52] Jin SW, Zhang L, Lian QQ, Liu D, Wu P, Yao SL, et al. Posttreatment with aspirin-triggered lipoxin A4 analog attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice: the role of heme oxygenase-1. *Anesth Analg* 2007;104:369–77.
- [53] Wang YZ, Zhang YC, Cheng JS, Ni Q, Li PJ, Wang SW, et al. BML-111, a lipoxin receptor agonist, ameliorates 'two-hit'-induced acute pancreatitis-associated lung injury in mice by the upregulation of heme oxygenase-1. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2014;42:110–20.
- [54] Lv W, Lv C, Yu S, Yang Y, Kong H, Xie J, et al. Lipoxin A4 attenuation of endothelial inflammation response mimicking pancreatitis-induced lung injury. *Exp Biol Med* (Maywood) 2013;238:1388–95.
- [55] Wang YF, Gu YT, Qin GH, Zhong L, Meng YN. Curcumin ameliorates the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia by upregulating heme oxygenase-1 expression in brain microvascular endothelial cells. *J Mol Neurosci* 2013;51:344–51.
- [56] Lu CY, Yang YC, Li CC, Liu KL, Li CK, Chen HW. Andrographolide inhibits TNFalpha-induced ICAM-1 expression via suppression of NADPH oxidase activation and induction of HO-1 and GCLM expression through the PI3K/Akt/Nrf2 and PI3K/Akt/AP-1 pathways in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 2014;91:40–50.
- [57] Belhaj A, Dewachter L, Kerbaul F, Brimiouille S, Dewachter C, Naeije R, et al. Heme oxygenase-1 and inflammation in experimental right ventricular failure on prolonged overcirculation-induced pulmonary hypertension. *PLoS One* 2013;8:e69470.
- [58] Gullingsrud J, Saveria T, Amos E, Duffy PE, Oleinikov AV. Structure-function-immunogenicity studies of PfEMP1 domain DBL2betaPF11\_0521, a malaria parasite ligand for ICAM-1. *PLoS One* 2013;8:e61323.
- [59] Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, Larsen R, et al. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15837–42.
- [60] Wu L, Liu ZJ, Miao S, Zou LB, Cai L, Wu P, et al. Lipoxin A4 ameliorates cerebral ischaemia/reperfusion injury through upregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Neurol Res* 2013;35:968–75.



Tatiana Padua &lt;tatiana.ap2@gmail.com&gt;

---

**3A1016-435 Receipt of Paper by Journal of Leukocyte Biology**

---

jlb@journalstaff.com &lt;jlb@journalstaff.com&gt;

17 de outubro de 2016 08:07

Responder a: jlb@journalstaff.com

Para: tatiana.ap2@gmail.com

Dear Tatiana Padua,

On October 17, 2016 we received your manuscript entitled "Lipoxin A4 prevents malaria-induced acute respiratory distress syndrome by decreasing neutrophil motility in the bone marrow" by Tatiana Padua, Natália Torres, André Candéa, Maria Fernanda Costa, Johnatas Silva, Patrícia Rocco, Mariana Souza, and Maria das Graças Henriques. The manuscript has been assigned the Paper #: 3A1016-435.

All communications regarding this paper will be with your corresponding author, however, you will be notified once a decision is rendered. Should you have any questions, please contact the corresponding author or the JLB Managing Editor at [jlb@journalstaff.com](mailto:jlb@journalstaff.com).

If you are not already active with the Society, this is an excellent time to consider joining the Society of Leukocyte Biology (SLB). Membership includes substantial discounts for JLB page charges with your hopes that your article will be accepted for publication. SLB is a collegial and dynamic scientific community focused on the ever expanding research into leukocyte biology, with close attention to "cutting edge" topics, such as pattern recognition receptors, mucosal immunity, and host-pathogen interactions. Joining SLB is easy. Simply go to the SLB membership page (<https://leukocytebiology.org/Membership/Join-U.s.aspx>) to sign up online or download the application form. Note journal page charges are intended to recover partial costs of production due to a need to address rising costs due to our non-profit status (i.e., if compared to Trends or Nature journal series) as we seek to maintain the lowest costs for publication for all accepted ms. including free color. 100% of JLB "profits" above production costs support Society operations including:

- \* Peer community building and networking (yearly SLB meetings)
- \* Junior investigator professional development training
- \* Women and diversity initiatives for junior/established faculty
- \* Graduate student and postdoc travel meeting scholarships
- \* Member Journal Clubs
- \* General SLB operations and lower costs for student memberships
- \* JLB author benefits (i.e., journal features, web site, offsetting page and color charges, etc.)

Thank you for submitting your work to the Journal of Leukocyte Biology.

Sincerely,

Luis J. Montaner, D.V.M., M.Sc., D.Phil.  
Editor-In-Chief  
Journal of Leukocyte Biology  
9650 Rockville Pike  
Bethesda, MD 20814-3998

**Lipoxin A<sub>4</sub> prevents malaria-induced acute respiratory distress syndrome by decreasing neutrophil motility in the bone marrow**

Tatiana A. Pádua<sup>\*†1</sup>, Natalia D. Torres<sup>\*†1</sup>, André L. P. Candéa<sup>\*†</sup>, Maria Fernanda Souza Costa<sup>\*†</sup>, Johnatas D. Silva<sup>‡</sup>, Patricia R. M. Rocco<sup>‡</sup>, Mariana C. Souza<sup>\*†,2</sup>, Maria G. Henriques<sup>\*†,2</sup>

\*Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

†National Institute of Science and Technology of Innovation on Diseases of Neglected Populations (INCT-IDPN), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

‡Laboratory of Pulmonary Investigation, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Both authors contributed equally to this work.

**Summary sentence:** Cellular mechanism by which LXA<sub>4</sub> impairs neutrophil motility in the bone marrow and promotes the attenuation of malaria induced-ARDS.

**Running Title:** LXA<sub>4</sub> attenuates malaria-induced ARDS.

**Corresponding author information:** Laboratório de Farmacologia Aplicada, Farmanguinhos, Rua Sizenando Nabuco, 100, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, Brazil. Phone; 55-21-39772487. [gracahenriques@fiocruz.br](mailto:gracahenriques@fiocruz.br) and [marianasouza@fiocruz.br](mailto:marianasouza@fiocruz.br)

**Keywords:** *Plasmodium berghei*, lung, cytoskeleton remodeling, specialized pro-resolving mediators, ALX receptor.



## Abstract

The use of experimental models of severe malaria has demonstrated that malaria-induced acute respiratory distress syndrome (M-ARDS) may be triggered locally by hemozoin and parasitized erythrocytes or occur secondary to the systemic inflammatory response. Furthermore, experimental M-ARDS is well established to depend on neutrophil infiltration. Lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) is an anti-inflammatory eicosanoid whose effect on lung tissue during endotoxin-induced ARDS is thought to hinder the sequestration of neutrophil-platelet aggregates in the lung parenchyma. However, to date, the effect of LXA<sub>4</sub> on M-ARDS remains unclear. We hypothesized that LXA<sub>4</sub> prevented neutrophil accumulation in the lung tissue by modulating extrapulmonary inflammatory mechanisms in experimental M-ARDS. Male C57BL/6 mice were randomly assigned to the following four groups: non-infected; saline-treated *Plasmodium berghei*-infected; LXA<sub>4</sub>-treated *P. berghei*-infected (LXA<sub>4</sub> administered 1 h before infection), and *P. berghei*-infected mice treated with both LXA<sub>4</sub> and the ALX antagonist BOC-2. The treatments were performed daily (days 0 to 5 post-infection). On day 6, pre-treatment with LXA<sub>4</sub> prevented lung edema, lung mechanic impairment, and neutrophil accumulation in the pulmonary tissue and blood; however, the treatment did not affect neutrophil maturation, apoptosis, or chemokine (C-X-C motif) receptor 2 expression in the bone marrow. *In vitro* analysis showed that bone marrow neutrophils were unable to migrate. Additionally, *in vitro* treatment with LXA<sub>4</sub> prevented neutrophils from migrating towards plasma collected from *P. berghei*-infected mice. LXA<sub>4</sub> also impaired neutrophil cytoskeleton remodeling by inhibiting F-actin polarization. In conclusion, LXA<sub>4</sub> prevented M-ARDS by regulating neutrophil motility in the bone marrow through a mechanism involving cytoskeletal remodeling impairment.

## Review Article

# Endothelial-Leukocyte Interaction in Severe Malaria: Beyond the Brain

Mariana C. Souza,<sup>1,2</sup> Tatiana A. Padua,<sup>1,2</sup> and Maria G. Henriques<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Brasil 4365, Mangueiras, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>National Institute for Science and Technology on Innovation on Neglected Diseases (INCT/IDN), Center for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Maria G. Henriques; [gracahenriques@fiocruz.br](mailto:gracahenriques@fiocruz.br)

Received 19 June 2015; Revised 25 August 2015; Accepted 1 September 2015

Academic Editor: Pilar Alcaide

Copyright © 2015 Mariana C. Souza et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Malaria is the most important parasitic disease worldwide, accounting for 1 million deaths each year. Severe malaria is a systemic illness characterized by dysfunction of brain tissue and of one or more peripheral organs as lungs and kidney. The most severe and most studied form of malaria is associated with cerebral complications due to capillary congestion and the adhesion of infected erythrocytes, platelets, and leukocytes to brain vasculature. Thus, leukocyte rolling and adhesion in the brain vascular bed during severe malaria is singular and distinct from other models of inflammation. The leukocyte/endothelium interaction and neutrophil accumulation are also observed in the lungs. However, lung interactions differ from brain interactions, likely due to differences in the blood-brain barrier and blood-air barrier tight junction composition of the brain and lung endothelium. Here, we review the importance of endothelial dysfunction and the mechanism of leukocyte/endothelium interaction during severe malaria. Furthermore, we hypothesize a possible use of adjunctive therapies to antimalarial drugs that target the interaction between the leukocytes and the endothelium.

## 1. Introduction

Malaria is the most important parasitic disease worldwide. It is present in more than 100 countries, putting 1.2 billion people at risk and accounting for more than 800 thousand deaths each year [1, 2]. Cerebral malaria (CM) is the most severe form of malaria and is usually found in children under five years old [3]. Clinically, CM is defined by the identification of *P. falciparum* in peripheral blood, convulsions, and coma, after ruling out any other cause of coma such as meningitis [4, 5]. Pathological findings such as capillary congestion, production of proinflammatory cytokines, and adhesion of infected red blood cells (iRBC) to brain vasculature are responsible for cerebral complications associated with CM [6]. In some patients, a systemic illness called severe malaria (SM) is observed which is characterized by one or more peripheral organ dysfunctions as acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS) [7] and acute kidney injury [8, 9] and can be combined with

cerebral malaria signals [10]. Some authors suggest that SM is due to pathological events such as parasitized erythrocytes, leukocyte adhesion to the organ microvasculature, systemic production of cytokines, and cytotoxic lymphocyte activation [11, 12]. Despite systemic activation, the leukocyte/endothelial cell interaction differs depending on the studied organ. Here, we discuss endothelial dysfunction during severe malaria and the mechanisms by which leukocytes adhere to the endothelium in distinct organs during this pathology.

## 2. Leukocyte-Endothelium Interaction during Cerebral Malaria

A main characteristic of brain physiology is the immune privilege conferred by the BBB to brain tissue [13]. However, the BBB composition, especially in the postcapillary venule, allows leukocyte diapedesis during nonmalarial brain injury [14, 15].

During human cerebral malaria, the importance of infected red blood cells adhesion to brain microvasculature is well established [5]. Necropsy of fatal cases of severe malaria shows the adhesion of iRBC in the venules and capillaries, causing congestion [6, 16, 17]. The mechanism of iRBC adhesion to brain microvasculature is well described and depends on expression of membrane proteins such as *P. falciparum* erythrocyte membrane proteins (PfEMP1) [18]. However, the leukocyte-endothelium interaction during human cerebral malaria is not completely clarified [12, 16, 19, 20]. Indeed, it is well established that both endothelium [21] and leukocyte [22, 23] are activated in patients diagnosed with CM; however, how they orchestrate the brain injury to develop CM is still not well understood.

Endothelium activation markers have been used in clinical studies to predict malaria severity [24, 25]. During CM, the endothelium can be activated by different mechanisms as the binding of soluble proteins present in host serum [24], direct contact with iRBC [6], and activation induced by parasite-derived molecules as hemozoin [26] and GPI [27]. Necropsy performed in fatal cases of CM showed increased expression of adhesion molecules on brain microvasculature [28] supporting the idea that the endothelium is able to promote leukocyte adhesion. Some studies show the presence of leukocyte in brain vasculature lumen [16] or in perivascular space [29], although there are no lines of evidence of the importance of leukocyte adhesion to brain vasculature in development of human CM. However, it cannot be ruled out considering the lack of knowledge in this issue [16, 20].

The interaction between leukocytes and endothelial cells during human CM could not depend on cell-cell contact. Instead, leukocytes and lymphocytes produce inflammatory mediators as TNF- $\alpha$  which activate endothelial cells [28, 30]. Endothelial activation induced by TNF- $\alpha$  accounts for many factors involved in development of CM [31] as increased iRBC adhesion [30], expression of leukocyte chemotactic factors [32] and, costimulated by iRBC, increases ICAM-1 expression that improve iRBC adhesion [30].

On the other hand, the adhesion of leukocytes to brain vasculature is often observed during experimental cerebral malaria [33, 34]. A recent report revealed that the majority of leukocytes accumulated in the brain during experimental severe malaria are monocytes. These cells are responsible for the recruitment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to the CNS vasculature [35]. However, in the absence of monocytes, T cells are still recruited to the brain to initiate experimental cerebral malaria [35]. Observation of the microvessels within the brains of live animals demonstrated the marginalization of leukocytes and platelets aggregates in postcapillary brain venules but not in capillaries of *P. berghei*-infected mice, showing that leukocytes do not accumulate in brains tissue but induce endothelium dysfunction, leading to vascular leakage, neurological signs, and coma [35, 36]. The role of adhesion molecules, especially ICAM-1, in the leukocyte/endothelium interaction to promote cerebral dysfunction during experimental severe malaria is controversial. The impairment of the ICAM-1/ $\beta$ 2-integrin complex abolishes the development of cerebral dysfunction associated with *P. berghei* infection [36–38]. However, Ramos and colleagues

deleted ICAM-1 in different cells and showed that only ICAM-1 expressed in leukocytes accounts for experimental severe malaria [39]. The authors speculated that because endothelial cells do not express ICAM-1 counter receptor, leukocytes, platelets, and iRBC aggregates occlude brain microvessels and promote cerebral malaria [39].

A new approach of leukocyte and endothelium interaction in brain during CM has been proposed through interaction between MHC class I molecules and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Recent studies regarding experimental CM show that the membranes of endothelial cells and iRBC fuse by trogocytosis, resulting in the expression of *Plasmodium* antigens [40]. Endothelial cells preferentially phagocytize merozoites and, via proteasome digestion, present plasmodial antigens by MHC class I molecules to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, thus contributing to the adaptive immune response to *P. berghei* infection [41]. It is noteworthy that the same results were observed within *P. falciparum* phagocytosis by human endothelial cells [41]. However, *P. falciparum* phagocytosis by endothelial cells *in vivo* and its clinical relevance remain to be elucidated.

Overall, microvascular congestion observed in both human and experimental CM leads to severe cerebral endothelial damage, resulting in the breakdown of the BBB mainly at the level of postcapillary venules [16, 29, 31, 42]. The postcapillary venule BBB (Figure 1) is functionally distinct from other BBB areas and is in direct contact with the perivascular space [42]. In light of the new findings concerning brain anatomy in which the authors described the presence of lymphatic vessels in direct contact with the perivascular space in the central nervous system, in the next few years, the dynamics of the interaction between leukocytes and the endothelium during cerebral malaria will likely be unveiled [43].

### 3. Leukocyte-Endothelium Interaction in the Lung during Malaria

The brain is not the only organ affected during severe malaria. Twenty percent of patients diagnosed with severe malaria develop acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) [7, 9]. ALI/ARDS is a syndrome derived from pathological conditions such as sepsis and traumatic brain injury. ALI/ARDS diagnosis includes the identification of respiratory failure, diffuse alveolar damage, and inflammatory infiltration in lung tissue [44]. Necropsy in fatal cases of severe malaria revealed that patients present classical symptoms of ALI, including pulmonary edema, pulmonary capillary congestion, thickened alveolar septa, marked inflammatory response in lung tissue, and macrophages in the lumen of the pulmonary capillaries [11]. Murine experimental models of severe malaria also present pulmonary pathology such as edema, cell infiltration, tissue damage, and lung mechanical impairment [45–48]. Furthermore, the lung appears to be a large reservoir of metabolically active parasites, as described in an elegant study by Lovegrove et al. who evaluated the transcriptional responses to *Plasmodium* in different organs [49].

The lung vasculature in malaria infection is essential to initiate the *Plasmodium* cycle within the host. When merozoites leave the liver, they are located inside host-derived



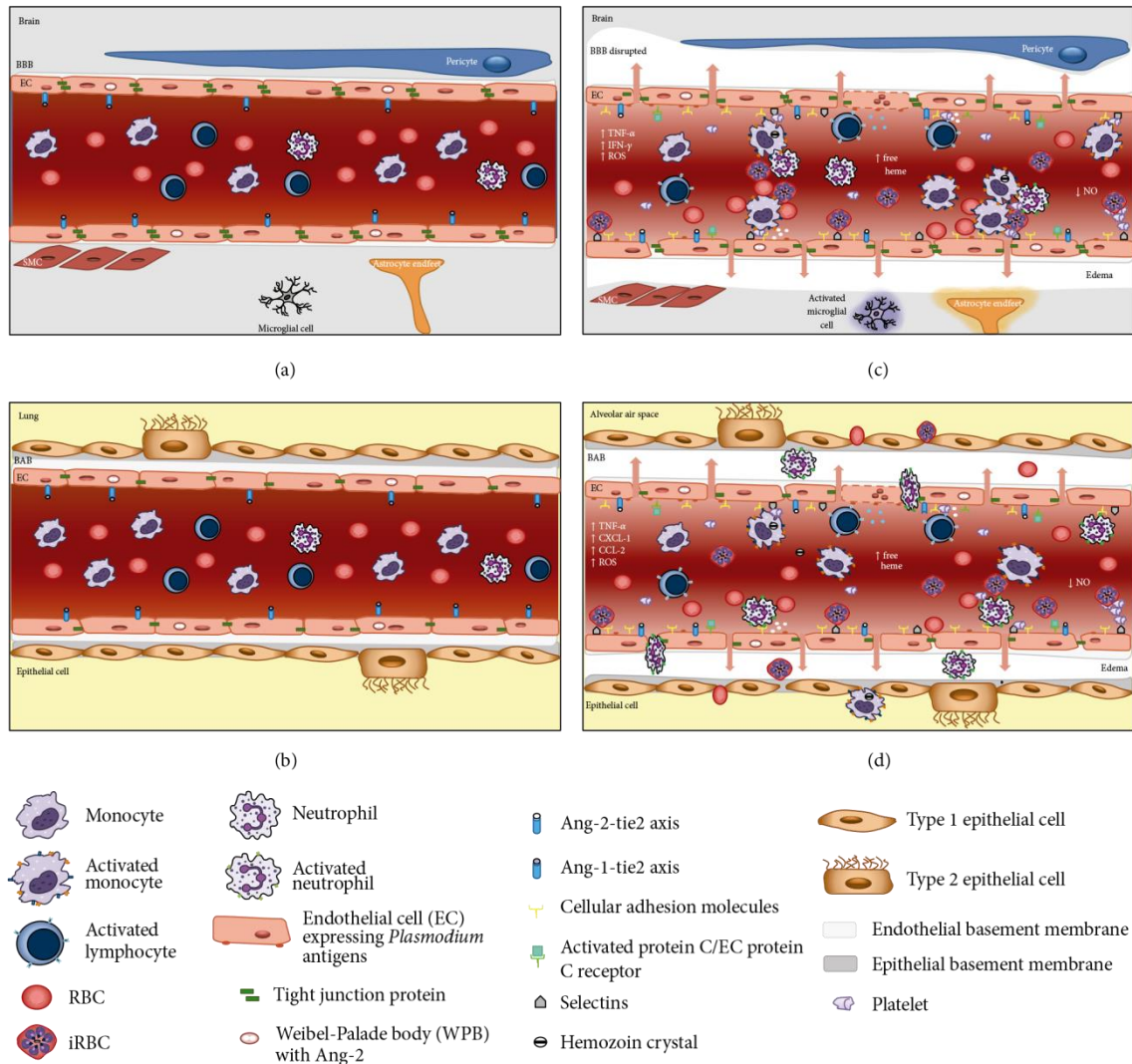


FIGURE 1: Blood barrier differences between brain and lung during malaria. (a) Cerebral microvasculature and (b) lung microvasculature without leucocytes attached in postcapillary venules and EC expressing Ang-1, under physiological conditions. (c) During severe malaria, we observe production of proinflammatory cytokines, increase of cellular adhesion molecules expression, release of Ang-2, decrease of NO, and adhesion of iRBC and leukocytes (mainly mononuclear cells) to brain vasculature leading to capillary congestion, BBB dysfunction, and edema. Such events activate the subjacent tissue (microglial cells and astrocytes). (d) Acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) associated with malaria. The augment of inflammatory cytokines and chemokines, release of Ang-2, and decrease of NO are responsible for activation of EC that increases the expression of cellular adhesion molecules allowing the margination and infiltration of iRBC, leucocytes, and platelets into blood vessels, interstitial tissue, and consequently alveolar air space. BBB: blood-brain barrier; BAB: blood-air barrier; EC: endothelial cell; ROS: reactive oxygen species; SMC: smooth muscle cell.

buds named merozoites, whose membranes are disrupted within the pulmonary capillary beds to allow merozoites to reach the erythrocytes [50, 51]. The close contact between infected erythrocytes and pulmonary endothelial cells triggers a remarkable inflammatory response 24 h after infection, characterized by intense inflammatory cell infiltration as well as the production of proinflammatory cytokines and chemokines in lung tissue that persists for at least five days after infection [45–47]. The quantity of parasites in lung

tissue defines the extent of chemokine production in lung tissue [52]. Chemokines such as CCL2, CXCL1, and CCL5 are produced in lungs during experimental malaria and are correlated with macrophage and neutrophil accumulation in pulmonary tissue [45, 53, 54]. Intravital studies in lungs of *Plasmodium*-infected mice revealed edema formation and the migration of monocytes and neutrophils to lung tissue [37]. However, due to the technical limitations in studying leukocyte mobility within the lung [55], until now, there have

been no available data on the dynamics of leukocytes and lung endothelium during malaria-triggered ALI [37]. Indeed, lung endothelial cells are activated during malaria infection and express adhesion molecules. P-selectin, in addition to L- and E-selectin, is part of a family of calcium-dependent (C-type) lectins whose activation induces the expression of  $\beta$ 2-integrins and consequent leukocyte arrest in the vasculature [56, 57]. P-selectin is expressed in both lung and brain endothelium during experimental malaria. This molecule mediates leukocyte rolling in brain microvessels of *P. berghei*-infected mice; however, it is not essential for development of experimental cerebral malaria signals [58]. On the other hand, the monocyte/macrophage accumulation in lungs of *P. berghei*-infected mice depends on the expression of ICAM-1 [52, 59], while ICAM-1 expression in the brains of infected mice does not account for leukocyte adhesion [60]. It is interesting to note that while inflammatory cell infiltration in cerebral tissue was not observed in the brain, neutrophil and macrophage infiltration is frequently observed in pulmonary interstitial lung tissue during malaria [45]. Indeed, differences in the blood-brain barrier and blood-air barrier tight junction constitution of the brain and lung are responsible for this phenomenon (Figure 1).

The morphological and biochemical differences between lung and brain endothelial cells account for the distinct inflammatory responses in both organs. Despite both endothelial cell types containing nonfenestrated endothelium, brain endothelial cells present fewer caveolae and are richer in tight junctions than lung endothelium [61, 62]. The lung endothelial bed is rich in adherens junctions and P-selectins and allows leukocyte transmigration by paracellular and transcellular pathways [61, 62]. Endothelial cells from lung tissue can be activated by VEGF [4], TNF- $\alpha$  [63], LPS [64], and *P. falciparum* infected erythrocytes, resulting in the reorganization of their junctional proteins [63]. In addition to inflammatory mediators and pathogen-associated molecular pattern (PAMP), the leukocyte contact also contributes to endothelial cell reorganization, triggering a dephosphorylation cascade followed by the endocytosis of VE-cadherins, which support leukocyte transmigration through lung endothelial cells [65]. Of note, in most organs, leukocyte transmigration happens almost exclusively in post-capillary venules. However, in the lung leukocyte transmigration occurs in capillaries of the blood-air barrier which are surrounded by epithelium forming alveoli [61].

In addition to the direct interaction between leukocytes and the endothelium described earlier, leukocytes can bind platelets and then adhere to the endothelium. Piguet and colleagues showed that platelet and mononuclear cell trapping occurs in the lungs of *P. berghei*-infected mice [66]. In addition, the authors observed that the impairment of platelet activation decreased leukocyte adhesion to the lung vasculature of *P. berghei*-infected mice [66]. The stimulation of the receptor P2Y<sub>1</sub> but not P2Y<sub>12</sub> on platelets induces the downstream activation of the RhoA pathway, resulting in platelet/leukocyte aggregation and migration to the lung [67]. In addition, platelets also contribute to the leukocyte/endothelium interaction by releasing microparticles. Neutrophils stimulated with platelet-derived microparticles

increased the expression of  $\alpha$ M integrin and adhered to pulmonary endothelial cells via ICAM-1 [68].

The study of leukocyte/endothelium interactions within the lung during malaria is limited but extremely important. Mice depleted of neutrophils showed reduced malaria associated ALI and delayed mortality [38], suggesting that further studies are necessary to show the mechanism of the leukocyte/endothelial interaction in the lung during severe malaria.

#### 4. Leukocyte/Endothelium Interaction during Malaria as a Target for Treatment

In accordance with the findings presented above both in human and animals, the leukocyte/endothelium interaction plays a role in the development of pathogenesis of severe malaria particularly in malaria-induced ALI [9, 12, 45, 47]. In fact, lung dysfunction triggered in both human and experimental malaria shares similarities with lung mechanics impairment, pulmonary edema, production of inflammatory cytokines, and inflammatory cells infiltration in lung tissue [9, 45]. Furthermore, the inflammatory response persists even after the host is cured of infection [10, 69, 70] (unpublished data), which suggests that modulation of inflammatory response in addition to antimalarial therapy would be helpful to patient outcome [71]. The leukocyte-endothelium interaction is not the most important factor regarding development of human cerebral malaria pathogenesis; however, it should not be neglected as actor in severe malaria-induced organ dysfunction.

Recently, Frosch and John suggested that an adjunctive therapy that impaired the inflammatory response induced during malaria should be combined with antimalarial drugs [72]. Several approaches have already aimed at the modulation of the malaria-induced inflammatory response. Figure 2 illustrates several potential targets described in the literature. Patients diagnosed with severe malaria have been treated with modulators of TNF- $\alpha$  production [73], CD36 expression [74, 75], NO precursors [70, 76], or adhesion of iRBC to vasculature [77] and presented decreased inflammation scores when compared to a placebo treated group. Despite evidence suggesting that the modulation of leukocyte and endothelial activation supports the outcome of severe malaria, it is not clear whether an adjunctive therapy targeting the leukocyte/endothelium interaction would predict patient outcome. It is worth noting that the most important class of antimalarial drug to treat severe malaria is artemisinin and its derivatives [78], which also have immunomodulatory activities in pathologies such as microbial infections, tumor growth, and inflammatory diseases [79–82]. Our group demonstrated that, in addition to its antimalarial properties, artesunate exerted a protective effect against severe malaria via its immunomodulatory properties by inhibiting endothelial cell activation, NF- $\kappa$ B nuclear translocation, and the subsequent expression of ICAM-1 [83].

Srinivas and colleagues studied the effect of treatment with activated protein C on a patient with severe malaria coinfecting with leptospirosis and observed a rapid outcome



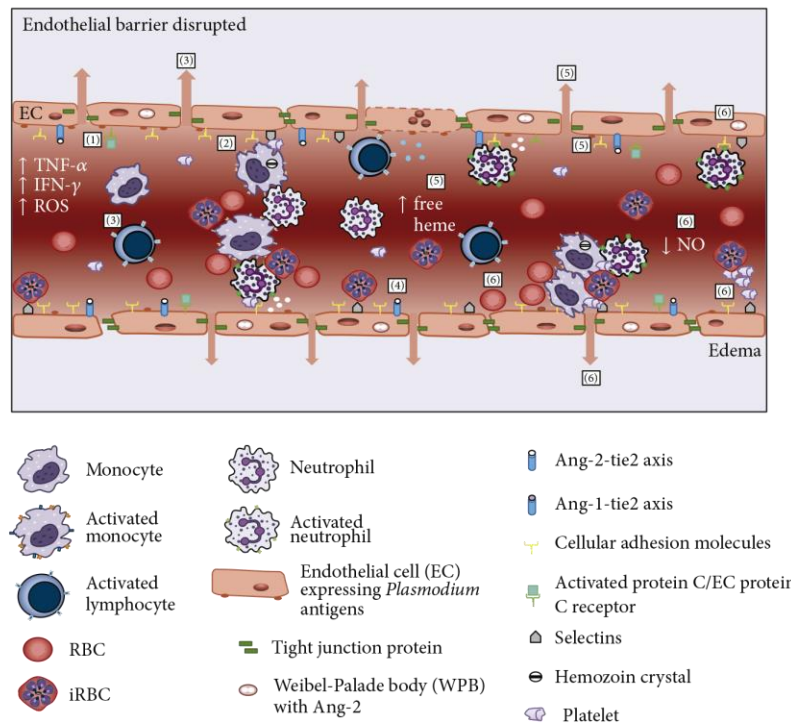


FIGURE 2: Targets of adjuvant therapies during malaria. Scheme showing several approaches that have been investigated aiming at modulation of malaria-induced inflammatory response. EC: endothelial cell; ROS: reactive oxygen species; SMC: smooth muscle cell. (1) *Activated protein C* binds to protein C receptor in activated EC cells decreasing the expression of adhesion molecules. (2) *Statins* decrease the production of chemokine and diminished the adhesion of leukocytes to brain microvasculature. (3) *Sphingosine-1-phosphate (S1P)* decreases the numbers of lymphocytes in brain vasculature and stabilizes the tight junction protein ZO-1 in brains. (4) *Neuregulin-1* and *bone marrow mesenchymal stromal cells* induce Ang-1, which promotes stabilization of EC tight junctions, EC desensitization to TNF- $\alpha$ , and downregulation of ICAM-1 and VCAM-1. (5) *Lipoxin A<sub>4</sub>* decreases production of proinflammatory cytokines, impairs EC activation, and inhibits the expression of cellular adhesion molecules involved in leukocyte adhesion by stimulating the activity of HO-1, which catabolizes free heme. (6) *L-Arginine* or *inhaled NO (iNO)* reduces pulmonary edema and, in addition, decreases cytoadherence of iRBC, hemorrhagic foci, and leukocyte and platelets adherence to brain vasculature by inhibiting of WPB exocytosis that impairs the release of Ang-2 and inhibiting TNF- $\alpha$  production and procoagulant activity of endothelial cells.

[84]. The binding of activated protein C to endothelial cell protein C receptor in activated endothelial cells avoided NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation and induced AKT signaling, which decreased the expression of adhesion molecules on the endothelial cell surface [18, 85]. Thus, activated protein C in malaria would increase endothelial barrier integrity, induce antiapoptotic pathways, and decrease adhesion molecule expression [86]. Other modulators of endothelial functions have been used to evaluate malaria outcome in humans and experimental models. Studies in which *P. berghei*-infected mice were treated with statins, a class of drugs that inhibit the rate-limiting step in cholesterol synthesis and that show pleiotropic effects, demonstrated that statins decreased the production of chemokines [87] and decreased the adhesion of leukocytes to the brain microvasculature [88] probably by inhibiting the binding site of LFA-1 on leukocytes [89]. Accordingly, *in vitro* treatment of human endothelial cells with statins followed by stimulation with *P. falciparum*-infected erythrocytes decreased the expression of adhesion molecules, suggesting that statins could exert an antiadhesive

role in the treatment of severe malaria [90]. Statins have not been tested in clinical trials for malaria adjunctive treatment. However, statins diminished the risk of sepsis-related mortality in patients, probably by decreasing the inflammatory response triggered during sepsis [91].

The endothelial barrier stabilizer sphingosine-1-phosphate (S1P) also rescued mice from severe malaria by decreasing the numbers of CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD45<sup>+</sup> cells in the brain vasculature of *P. berghei*-infected mice, likely decreasing ICAM-1 expression and stabilizing the tight junction protein ZO-1 in brains [36, 92]. Transfection of bone marrow mesenchymal stromal cells and administration of S1P and other endothelial barrier stabilizers such as neuregulin-1 induce the endogenous Ang-1 anti-inflammatory pathway, which promotes decreased vascular permeability by stabilizing endothelial cell tight junctions, endothelial cell desensitization to TNF- $\alpha$ , and downregulating ICAM-1 and VCAM-1. These Ang-1 actions result in decreased leukocyte/endothelial interaction and, consequently, host outcome [4, 93–97].

Another family of lipids has been studied for its anti-inflammatory activity during severe malaria. Lipoxins (LX) are products of arachidonic acid metabolism and are produced through sequential lipoxygenase activity following cell-cell interactions in the inflammatory milieu (reviewed by [98]). The interaction of LXA<sub>4</sub> and its receptor ALX has anti-inflammatory and proresolving activity in inflammatory models such as allergic airway inflammation [99] and autoimmune diseases [100] by reducing leukocyte adhesion to endothelial cells [101]. The administration of LXA<sub>4</sub> improved survival in *P. berghei*-infected mice by decreasing the production of proinflammatory cytokines but not the accumulation of CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells in brain tissue [102]. In addition to LXA<sub>4</sub> impairment of leukocyte activation, the mechanism of action of LXA<sub>4</sub> on endothelium during severe malaria was recently disclosed by intravital studies of the microvasculature of *P. berghei*-infected mice. The authors showed that treatment with LXA<sub>4</sub> did not modulate leukocyte adhesion to the brain vasculature or decrease the expression of  $\beta$ 2-integrin in leukocytes (unpublished data). On the other hand, treatment with LXA<sub>4</sub> impaired endothelial activation during severe malaria and restored the blood flow in brains of *P. berghei*-infected mice [33]. The authors also showed that LXA<sub>4</sub> exerted its effects by stimulating the activity of heme oxygenase 1 (HO-1), an isoenzyme that catabolizes free heme released under pathological conditions, especially in pathologies such as malaria which are associated with intravascular hemolysis [33]. HO-1 upregulation helps maintain BBB integrity under pathological conditions [103]. During the inflammatory response, HO-1 inhibits the expression of several adhesion molecules involved in leukocyte adhesion to endothelial cells [104, 105]. During experimental severe malaria, HO-1 is differentially regulated in certain tissues at different stages of *Plasmodium* life cycle [106, 107]. Furthermore, HO-1 production in brain tissue is associated with mouse survival, decreased cerebral edema, and decreased leukocyte adhesion to brain vasculature [106].

In hemolytic disorders such as malaria, low bioavailability of NO is observed, as free hemoglobin is a potent scavenger of this gaseous molecule [108]. Therefore, the administration of L-arginine or inhaled NO (iNO) has also been tested as adjunctive therapy in the treatment of severe malaria [4, 76]. Yeo and collaborators showed that impaired endothelial NO production occurred in severe malaria in both children and adults, supporting the idea that further trials of drugs that led to increased endothelial NO bioavailability could attenuate severe malaria symptoms [109]. Studies in which severe malaria patients were treated with inhaled nitric oxide demonstrated that NO reduced pulmonary edema in patients with malaria-derived ALI and decreased pulmonary capillary pressure through selective vasodilatory effects on postcapillary venules [110]. Thus, in severe malaria, nitric oxide is hypothesized to promote vascular quiescence, decrease cytoadherence of parasitized erythrocytes to the microvascular endothelium as a critical mediator of VEGF and Ang-1, and dampen inflammatory responses and thrombosis [4]. Nitric oxide (NO) is a short-lived free radical formed from L-arginine conversion that is involved in many important biological functions including neurotransmission, immune

system, cytokine modulation platelet inhibition, vascular homeostasis, and regulation of hematopoiesis [111]. Its production occurs through three different NO synthase (NOS) enzyme isoforms: neuronal NOS (nNOS or NOS1), inducible NOS (iNOS or NOS2), and endothelial NOS (eNOS or NOS3) [111]. The constitutive isoforms (neuronal and endothelial) are calcium/calmodulin dependent and permanently active, generating low concentrations of NO. The inducible isoform (iNOS) is only expressed when its transcription is activated by a variety of cytokines, growth factors, and inflammatory stimuli on target cells, leading to the release of high levels of NO [112]. In experimental severe malaria, treatment with exogenous NO (NO donor dipropylentriamine NONOate, DPTA-NO) showed improved pial blood flow, diminished hemorrhagic foci, and reduced leukocyte and platelet adherence to the brain vasculature [113, 114]. The authors hypothesize that NO attenuates malaria symptoms by (a) inhibition of Weibel-Palade body exocytosis and the consequent release of Ang-2 and increase in Ang-1 expression; (b) decreasing the endothelial expression of ICAM-1 and VCAM-1; (c) inhibiting TNF- $\alpha$  production; (d) inhibiting the procoagulant activity of endothelial cells; and (e) decreasing intravascular platelet aggregation [108, 110, 111].

Indeed, pathophysiological phenomena experienced during experimental severe malaria are not fully translated to human severe malaria [115–118]. Therefore, further studies should be performed before initiating clinical studies of immunomodulatory drugs as adjunctive therapy for severe malaria.

## Disclosure

Tatiana Pádua is a student of the Graduate Program in Cellular and Molecular Biology from Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

- [1] WHO, "WHO guidelines approved by the guidelines review committee," in *Guidelines for the Treatment of Malaria*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2015.
- [2] C. Murray and R. Chambers, "Keeping score: fostering accountability for children's lives," *The Lancet*, vol. 386, no. 9988, pp. 3–5, 2015.
- [3] K. B. Seydel, S. D. Kampondeni, C. Valim et al., "Brain swelling and death in children with cerebral malaria," *The New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 12, pp. 1126–1137, 2015.



- [4] H. Kim, S. Higgins, W. C. Liles, and K. C. Kain, "Endothelial activation and dysregulation in malaria: a potential target for novel therapeutics," *Current Opinion in Hematology*, vol. 18, no. 3, pp. 177–185, 2011.
- [5] S. C. Wassmer, T. E. Taylor, P. K. Rathod et al., "Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 93, no. 3, supplement, pp. 42–56, 2015.
- [6] T. E. Taylor and M. E. Molyneux, "The pathogenesis of pediatric cerebral malaria: eye exams, autopsies, and neuroimaging," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1342, no. 1, pp. 44–52, 2015.
- [7] A. Mohan, S. K. Sharma, and S. Bollineni, "Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria," *Journal of Vector Borne Diseases*, vol. 45, no. 3, pp. 179–193, 2008.
- [8] J. Abdul Manan, H. Ali, and M. Lal, "Acute renal failure associated with malaria," *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad*, vol. 18, no. 4, pp. 47–52, 2006.
- [9] W. R. J. Taylor, J. Hanson, G. D. H. Turner, N. J. White, and A. M. Dondorp, "Respiratory manifestations of malaria," *Chest*, vol. 142, no. 2, pp. 492–505, 2012.
- [10] G. P. Maguire, T. Handoyo, M. C. F. Pain et al., "Lung injury in uncomplicated and severe falciparum malaria: a longitudinal study in Papua, Indonesia," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 192, no. 11, pp. 1966–1974, 2005.
- [11] D. Milner Jr., R. Factor, R. Whitten et al., "Pulmonary pathology in pediatric cerebral malaria," *Human Pathology*, vol. 44, no. 12, pp. 2719–2726, 2013.
- [12] D. A. Milner Jr., R. O. Whitten, S. Kamiza et al., "The systemic pathology of cerebral malaria in African children," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, article 104, 2014.
- [13] M. G. Harris, P. Hulseberg, C. Ling et al., "Immune privilege of the CNS is not the consequence of limited antigen sampling," *Scientific Reports*, vol. 4, article 4422, 2014.
- [14] A. Alfieri, S. Srivastava, R. C. M. Siow et al., "Sulforaphane preconditioning of the Nrf2/HO-1 defense pathway protects the cerebral vasculature against blood-brain barrier disruption and neurological deficits in stroke," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 65, pp. 1012–1022, 2013.
- [15] N. M. Silva, R. M. Manzan, W. P. Carneiro et al., "*Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability," *Experimental Parasitology*, vol. 126, no. 2, pp. 167–177, 2010.
- [16] K. Dorovini-Zis, K. Schmidt, H. Huynh et al., "The neuropathology of fatal cerebral malaria in Malawian children," *The American Journal of Pathology*, vol. 178, no. 5, pp. 2146–2158, 2011.
- [17] G. G. MacPherson, M. J. Warrell, N. J. White, and S. Looareesuwan, "Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration," *The American Journal of Pathology*, vol. 119, no. 3, pp. 385–401, 1985.
- [18] L. Turner, T. Lavstsen, S. S. Berger et al., "Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor," *Nature*, vol. 498, no. 7455, pp. 502–505, 2013.
- [19] J. K. Patnaik, B. S. Das, S. K. Mishra, S. Mohanty, S. K. Satpathy, and D. Mohanty, "Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 51, no. 5, pp. 642–647, 1994.
- [20] C. Punsawad, Y. Maneerat, U. Chaisri, K. Nantavisai, and P. Viriyavejakul, "Nuclear factor kappa B modulates apoptosis in the brain endothelial cells and intravascular leukocytes of fatal cerebral malaria," *Malaria Journal*, vol. 12, article 260, 12 pages, 2013.
- [21] F. García, M. Cebrián, M. Dgedge et al., "Endothelial cell activation in muscle biopsy samples is related to clinical severity in human cerebral malaria," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 179, no. 2, pp. 475–483, 1999.
- [22] M. Krupka, K. Seydel, C. M. Feintuch et al., "Mild *Plasmodium falciparum* malaria following an episode of severe malaria is associated with induction of the interferon pathway in Malawian children," *Infection and Immunity*, vol. 80, no. 3, pp. 1150–1155, 2012.
- [23] S. Worku, M. Troye-Blomberg, B. Christensson, A. Björkman, and T. Fehniger, "Activation of T cells in the blood of patients with acute malaria: proliferative activity as indicated by Ki-67 expression," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 53, no. 3, pp. 296–301, 2001.
- [24] A. L. Conroy, S. J. Glover, M. Hawkes et al., "Angiopoietin-2 levels are associated with retinopathy and predict mortality in Malawian children with cerebral malaria: a retrospective case-control study," *Critical Care Medicine*, vol. 40, no. 3, pp. 952–959, 2012.
- [25] V. Jain, N. W. Lucchi, N. O. Wilson et al., "Plasma levels of angiopoietin-1 and -2 predict cerebral malaria outcome in Central India," *Malaria Journal*, vol. 10, article 383, 2011.
- [26] M. Prato, S. D'Alessandro, P. E. Van den Steen et al., "Natural haemozoin modulates matrix metalloproteinases and induces morphological changes in human microvascular endothelium," *Cellular Microbiology*, vol. 13, no. 8, pp. 1275–1285, 2011.
- [27] S. D. Tachado, P. Gerold, M. J. McConville et al., "Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway," *Journal of Immunology*, vol. 156, no. 5, pp. 1897–1907, 1996.
- [28] H. Armah, E. K. Wiredu, A. K. Doodoo, A. A. Adjei, Y. Tettey, and R. Gyasi, "Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 2, no. 1, pp. 123–131, 2005.
- [29] H. Brown, T. T. Hien, N. Day et al., "Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria," *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 25, no. 4, pp. 331–340, 1999.
- [30] Y. Wu, T. Szeszak, M. Stins, and A. G. Craig, "Amplification of *P. falciparum* cytoadherence through induction of a pro-adhesive state in host endothelium," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 10, Article ID e24784, 2011.
- [31] J. Storm and A. G. Craig, "Pathogenesis of cerebral malaria— inflammation and cytoadherence," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, article 100, 2014.
- [32] S. J. Chakravorty, C. Carret, G. B. Nash, A. Ivens, T. Szeszak, and A. G. Craig, "Altered phenotype and gene transcription in endothelial cells, induced by *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells: pathogenic or protective?" *International Journal for Parasitology*, vol. 37, no. 8–9, pp. 975–987, 2007.
- [33] M. C. Souza, T. A. Pádua, N. D. Torres et al., "Lipoxin A<sub>4</sub> attenuates endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria," *International Immunopharmacology*, vol. 24, no. 2, pp. 400–407, 2015.



- [34] A. Nacer, A. Movila, F. Sohet et al., "Experimental cerebral malaria pathogenesis—hemodynamics at the blood brain barrier," *PLoS Pathogens*, vol. 10, no. 12, Article ID e1004528, 2014.
- [35] S. Pai, J. Qin, L. Cavanagh et al., "Real-time imaging reveals the dynamics of leukocyte behaviour during experimental cerebral malaria pathogenesis," *PLoS Pathogens*, vol. 10, no. 7, Article ID e1004236, 2014.
- [36] A. Nacer, A. Movila, K. Baer, S. A. Mikolajczak, S. H. I. Kappe, and U. Frevvert, "Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria," *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 10, Article ID e1002982, 2012.
- [37] U. Frevvert, A. Nacer, M. Cabrera, A. Movila, and M. Leberl, "Imaging *Plasmodium* immunobiology in the liver, brain, and lung," *Parasitology International*, vol. 63, no. 1, pp. 171–186, 2014.
- [38] G. Senaldi, C. Vesin, R. Chang, G. E. Grau, and P. F. Piguet, "Role of polymorphonuclear neutrophil leukocytes and their integrin CD11a (LFA-1) in the pathogenesis of severe murine malaria," *Infection and Immunity*, vol. 62, no. 4, pp. 1144–1149, 1994.
- [39] T. N. Ramos, D. C. Bullard, M. M. Darley, K. McDonald, D. F. Crawford, and S. R. Barnum, "Experimental cerebral malaria develops independently of endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 16, pp. 10962–10966, 2013.
- [40] R. Jambou, V. Combes, M.-J. Jambou, B. B. Weksler, P.-O. Couraud, and G. E. Grau, "*Plasmodium falciparum* adhesion on human brain microvascular endothelial cells involves transmigration-like cup formation and induces opening of intercellular junctions," *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 7, Article ID e1001021, 2010.
- [41] S. W. Howland, C. M. Poh, L. Rénia, and J. Langhorne, "Activated brain endothelial cells cross-present malaria antigen," *PLoS Pathogens*, vol. 11, no. 6, Article ID e1004963, 2015.
- [42] T. Owens, I. Bechmann, and B. Engelhardt, "Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation," *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 67, no. 12, pp. 1113–1121, 2008.
- [43] A. Louveau, J. Smirnov, T. J. Keyes et al., "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels," *Nature*, vol. 523, no. 7560, pp. 337–341, 2015.
- [44] A. J. Sweatt and J. E. Levitt, "Evolving epidemiology and definitions of the acute respiratory distress syndrome and early acute lung injury," *Clinics in Chest Medicine*, vol. 35, no. 4, pp. 609–624, 2014.
- [45] M. C. Souza, J. D. Silva, T. A. Pádua, V. L. Capelozzi, P. R. M. Rocco, and M. D. G. Henriques, "Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria," *Respiratory Physiology & Neurobiology*, vol. 186, no. 1, pp. 65–72, 2013.
- [46] E. H. Aitken, E. M. Negri, R. Barboza et al., "Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome," *Malaria Journal*, vol. 13, article 230, 2014.
- [47] S. Epiphonio, M. G. Campos, A. Pamplona et al., "VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice," *PLoS Pathogens*, vol. 6, no. 5, Article ID e1000916, 2010.
- [48] L. S. Ortolan, M. K. Sercundes, R. Barboza et al., "Predictive criteria to study the pathogenesis of malaria-associated ALI/ARDS in mice," *Mediators of Inflammation*, vol. 2014, Article ID 872464, 12 pages, 2014.
- [49] F. E. Lovegrove, L. Peña-Castillo, N. Mohammad, W. C. Liles, T. R. Hughes, and K. C. Kain, "Simultaneous host and parasite expression profiling identifies tissue-specific transcriptional programs associated with susceptibility or resistance to experimental cerebral malaria," *BMC Genomics*, vol. 7, article 295, 2006.
- [50] K. Baer, C. Klotz, S. H. I. Kappe, T. Schnieder, and U. Frevvert, "Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature," *PLoS Pathogens*, vol. 3, article e171, 2007.
- [51] S. Thiberge, S. Blazquez, P. Baldacci et al., "In vivo imaging of malaria parasites in the murine liver," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 7, pp. 1811–1818, 2007.
- [52] K. Deroost, A. Tyberghein, N. Lays et al., "Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 48, no. 5, pp. 589–600, 2013.
- [53] P. E. Van den Steen, N. Geurts, K. Deroost et al., "Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 181, no. 9, pp. 957–968, 2010.
- [54] E. Belnoue, S. M. Potter, D. S. Rosa et al., "Control of pathogenic CD8<sup>+</sup> T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria," *Parasite Immunology*, vol. 30, no. 10, pp. 544–553, 2008.
- [55] M. R. Looney, E. E. Thornton, D. Sen, W. J. Lamm, R. W. Glenny, and M. F. Krummel, "Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung," *Nature Methods*, vol. 8, no. 1, pp. 91–96, 2011.
- [56] V. R. Krishnamurthy, M. Y. Sardar, Y. Ying et al., "Glycopeptide analogues of PSGL-1 inhibit P-selectin *in vitro* and *in vivo*," *Nature Communications*, vol. 6, article 6387, 2015.
- [57] C. R. Parish, "The role of heparan sulphate in inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 9, pp. 633–643, 2006.
- [58] V. Combes, A. R. Rosenkranz, M. Redard et al., "athogenic role of P-selectin in experimental cerebral malaria: importance of the endothelial compartment," *American Journal of Pathology*, vol. 164, no. 3, pp. 781–786, 2004.
- [59] N. Favre, C. da Laperousaz, B. Ryffel et al., "Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria," *Microbes and Infection*, vol. 1, no. 12, pp. 961–968, 1999.
- [60] J. Li, W.-L. Chang, G. Sun et al., "Intercellular adhesion molecule 1 is important for the development of severe experimental malaria but is not required for leukocyte adhesion in the brain," *The Journal of Investigative Medicine*, vol. 51, no. 3, pp. 128–140, 2003.
- [61] W. C. Aird, "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms," *Circulation Research*, vol. 100, no. 2, pp. 158–173, 2007.
- [62] L. E. Craig, J. P. Spelman, J. D. Strandberg, and M. C. Zink, "Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology," *Microvascular Research*, vol. 55, no. 1, pp. 65–76, 1998.
- [63] M. R. Gillrie, G. Krishnegowda, K. Lee et al., "Src-family kinase-dependent disruption of endothelial barrier function by *Plasmodium falciparum* merozoite proteins," *Blood*, vol. 110, no. 9, pp. 3426–3435, 2007.
- [64] P. Fu, P. V. Usatyuk, A. Lele et al., "c-Abl mediated tyrosine phosphorylation of paxillin regulates LPS-induced endothelial dysfunction and lung injury," *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 308, no. 10, pp. L1025–L1038, 2015.

- [65] F. Wessel, M. Winderlich, M. Holm et al., "Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin," *Nature Immunology*, vol. 15, no. 3, pp. 223–230, 2014.
- [66] P. F. Piguet, C. Da Laperrousaz, C. Vesin, F. Tacchini-Cottier, G. Senaldi, and G. E. Grau, "Delayed mortality and attenuated thrombocytopenia associated with severe malaria in urokinase- and urokinase receptor-deficient mice," *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 7, pp. 3822–3829, 2000.
- [67] R. T. Amison, S. Momi, A. Morris et al., "RhoA signaling through platelet P2Y(1) receptor controls leukocyte recruitment in allergic mice," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 135, no. 2, pp. 528–538, 2014.
- [68] R. F. Xie, P. Hu, Z. C. Wang et al., "Platelet-derived microparticles induce polymorphonuclear leukocyte-mediated damage of human pulmonary microvascular endothelial cells," *Transfusion*, vol. 55, no. 5, pp. 1051–1057, 2015.
- [69] C. Alves, J.-T. Chen, N. Patel et al., "Extracorporeal membrane oxygenation for refractory acute respiratory distress syndrome in severe malaria," *Malaria Journal*, vol. 12, article 306, 2013.
- [70] T. W. Yeo, D. A. Lampah, R. Gitawati et al., "Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine-reversible endothelial dysfunction in adults with *Falciparum malaria*," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 11, pp. 2693–2704, 2007.
- [71] T. P. Abreu, L. S. Silva, C. M. Takiya et al., "Mice rescued from severe malaria are protected against renal injury during a second kidney insult," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, Article ID e93634, 2014.
- [72] A. E. P. Frosch and C. C. John, "Immunomodulation in *Plasmodium falciparum* malaria: experiments in nature and their conflicting implications for potential therapeutic agents," *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 10, no. 11, pp. 1343–1356, 2012.
- [73] G. Watt, K. Jongsakul, and R. Ruangvirayuth, "A pilot study of N-acetylcysteine as adjunctive therapy for severe malaria," *QJM*, vol. 95, no. 5, pp. 285–290, 2002.
- [74] A. K. Boggild, S. Krudsood, S. N. Patel et al., "Use of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists as adjunctive treatment for *Plasmodium falciparum* malaria: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 49, no. 6, pp. 841–849, 2009.
- [75] L. Serghides, C. R. McDonald, Z. Lu et al., "PPAR $\gamma$  agonists improve survival and neurocognitive outcomes in experimental cerebral malaria and induce neuroprotective pathways in human malaria," *PLoS Pathogens*, vol. 10, no. 3, Article ID e1003980, 2014.
- [76] T. W. Yeo, D. A. Lampah, I. Rooslamati et al., "A randomized pilot study of L-arginine infusion in severe *Falciparum malaria*: preliminary safety, efficacy and pharmacokinetics," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7, Article ID e69587, 2013.
- [77] A. M. Dondorp, K. Silamut, P. Charunwatthana et al., "Levamisole inhibits sequestration of infected red blood cells in patients with falciparum malaria," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 196, no. 3, pp. 460–466, 2007.
- [78] A. Dondorp, F. Nosten, K. Stepniewska, N. Day, and N. White, "Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial," *The Lancet*, vol. 366, no. 9487, pp. 717–725, 2005.
- [79] M. E. Sarciron, C. Saccharin, A. F. Petavy, and F. Peyron, "Effects of artesunate, dihydroartemisinin, and an artesunate-dihydroartemisinin combination against *Toxoplasma gondii*," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 62, no. 1, pp. 73–76, 2000.
- [80] T. Efferth, H. Dunstan, A. Sauerbrey, H. Miyachi, and C. R. Chitambar, "The anti-malarial artesunate is also active against cancer," *International Journal of Oncology*, vol. 18, no. 4, pp. 767–773, 2001.
- [81] S. J. F. Kaptein, T. Efferth, M. Leis et al., "The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus *in vitro* and *in vivo*," *Antiviral Research*, vol. 69, no. 2, pp. 60–69, 2006.
- [82] J. Wang, H. Zhou, J. Zheng et al., "The antimalarial artemisinin synergizes with antibiotics to protect against lethal live *Escherichia coli* challenge by decreasing proinflammatory cytokine release," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 7, pp. 2420–2427, 2006.
- [83] M. C. Souza, F. H. Paixao, F. K. Ferraris, I. Ribeiro, and M. Henriques, "Artesunate exerts a direct effect on endothelial cell activation and NF- $\kappa$ B translocation in a mechanism independent of plasmodium killing," *Malaria Research and Treatment*, vol. 2012, Article ID 679090, 12 pages, 2012.
- [84] R. Srinivas, R. Agarwal, and D. Gupta, "Severe sepsis due to severe falciparum malaria and leptospirosis co-infection treated with activated protein C," *Malaria Journal*, vol. 6, article 42, 2007.
- [85] C. Guitton, A. Cottreau, N. Gérard et al., "Protective cross talk between activated protein C and TNF signaling in vascular endothelial cells: implication of EPCR, noncanonical NF- $\kappa$ B, and ERK1/2 MAP kinases," *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 300, no. 4, pp. C833–C842, 2011.
- [86] M. Riewald and R. A. Schuepbach, "Protective signaling pathways of activated protein C in endothelial cells," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, no. 1, pp. 1–3, 2008.
- [87] J. Dormoi, S. Briolant, A. Pascual, C. Desgrouas, C. Trauillé, and B. Pradines, "Improvement of the efficacy of dihydroartemisinin with atorvastatin in an experimental cerebral malaria murine model," *Malaria Journal*, vol. 12, article 302, 2013.
- [88] P. A. Reis, V. Estado, T. I. da Silva et al., "Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria," *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 12, Article ID e1003099, 2012.
- [89] G. Weitz-Schmidt, K. Welzenbach, V. Brinkmann et al., "Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 6, pp. 687–692, 2001.
- [90] Z. Taoufiq, P. Pino, N. N'Dilimabaka et al., "Atorvastatin prevents *Plasmodium falciparum* cytoadherence and endothelial damage," *Malaria Journal*, vol. 10, article 52, 2011.
- [91] S.-Y. Ou, H. Chu, P.-W. Chao et al., "Effect of the use of low and high potency statins and sepsis outcomes," *Intensive Care Medicine*, vol. 40, no. 10, pp. 1509–1517, 2014.
- [92] C. A. Finney, C. A. Hawkes, D. C. Kain et al., "SIP is associated with protection in human and experimental cerebral malaria," *Molecular Medicine*, vol. 17, no. 7-8, pp. 717–725, 2011.
- [93] M. C. Souza, J. D. Silva, T. A. Padua et al., "Mesenchymal stromal cell therapy attenuated lung and kidney injury but not brain damage in experimental cerebral malaria," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 6, pp. 102–117, 2015.
- [94] A. Nacer, A. Claes, A. Roberts et al., "Discovery of a novel and conserved *Plasmodium falciparum* exported protein that is important for adhesion of PfEMP1 at the surface of infected erythrocytes," *Cellular Microbiology*, vol. 17, no. 8, pp. 1205–1216, 2015.



- [95] W. Solomon, N. O. Wilson, L. Anderson et al., "Neuregulin-1 attenuates mortality associated with experimental cerebral malaria," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 11, article 9, 2014.
- [96] R. Schweizer, P. Kamat, D. Schweizer et al., "Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improve vascular regeneration and reduce leukocyte-endothelium activation in critical ischemic murine skin in a dose-dependent manner," *Cytotherapy*, vol. 16, no. 10, pp. 1345–1360, 2014.
- [97] T. Maron-Gutierrez, J. G. Laffey, P. Pelosi, and P. R. M. Rocco, "Cell-based therapies for the acute respiratory distress syndrome," *Current Opinion in Critical Care*, vol. 20, no. 1, pp. 122–131, 2014.
- [98] A. Ryan and C. Godson, "Lipoxins: regulators of resolution," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 10, no. 2, pp. 166–172, 2010.
- [99] O. Haworth, M. Cernadas, R. Yang, C. N. Serhan, and B. D. Levy, "Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon- $\gamma$  and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation," *Nature Immunology*, vol. 9, no. 8, pp. 873–879, 2008.
- [100] M. M.-Y. Chan and A. R. Moore, "Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated lipoxin A<sub>4</sub> production," *The Journal of Immunology*, vol. 184, no. 11, pp. 6418–6426, 2010.
- [101] S. Fiorucci, E. Distrutti, A. Mencarelli et al., "Evidence that 5-lipoxygenase and acetylated cyclooxygenase 2-derived eicosanoids regulate leukocyte-endothelial adherence in response to aspirin," *British Journal of Pharmacology*, vol. 139, no. 7, pp. 1351–1359, 2003.
- [102] N. Shryock, C. McBerry, R. M. S. Gonzalez, S. Janes, F. T. M. Costa, and J. Aliberti, "Lipoxin A<sub>4</sub> and 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub> protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN- $\gamma$  in the brain," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, Article ID e61882, 2013.
- [103] Y.-F. Wang, Y.-T. Gu, G.-H. Qin, L. Zhong, and Y.-N. Meng, "Curcumin ameliorates the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia by upregulating heme oxygenase-1 expression in brain microvascular endothelial cells," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 51, no. 2, pp. 344–351, 2013.
- [104] C.-Y. Lu, Y.-C. Yang, C.-C. Li, K.-L. Liu, C.-K. Lii, and H.-W. Chen, "Andrographolide inhibits TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 expression via suppression of NADPH oxidase activation and induction of HO-1 and GCLM expression through the PI3K/Akt/Nrf2 and PI3K/Akt/AP-1 pathways in human endothelial cells," *Biochemical Pharmacology*, vol. 91, no. 1, pp. 40–50, 2014.
- [105] A. Belhaj, L. Dewachter, F. Kerbaul et al., "Heme oxygenase-1 and inflammation in experimental right ventricular failure on prolonged overcirculation-induced pulmonary hypertension," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7, Article ID e69470, 2013.
- [106] A. Pamplona, A. Ferreira, J. Balla et al., "Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria," *Nature Medicine*, vol. 13, no. 6, pp. 703–710, 2007.
- [107] E. Seixas, R. Gozzelino, Â. Chora et al., "Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 37, pp. 15837–15842, 2009.
- [108] L. J. de Moura Carvalho, A. da Silva Moreira, C. T. Daniel-Ribeiro, and Y. C. Martins, "Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 109, no. 5, pp. 577–588, 2014.
- [109] T. W. Yeo, D. A. Lampah, E. Kenangalem et al., "Decreased endothelial nitric oxide bioavailability, impaired microvascular function, and increased tissue oxygen consumption in children with falciparum malaria," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 210, no. 10, pp. 1627–1632, 2014.
- [110] M. Hawkes, R. O. Opoka, S. Namasopo et al., "Inhaled nitric oxide for the adjunctive therapy of severe malaria: protocol for a randomized controlled trial," *Trials*, vol. 12, article 176, 2011.
- [111] B. Bergmark, R. Bergmark, P. D. Beaudrap et al., "Inhaled nitric oxide and cerebral malaria: basis of a strategy for buying time for pharmacotherapy," *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 31, no. 12, pp. e250–e254, 2012.
- [112] C. Bogdan, "Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update," *Trends in Immunology*, vol. 36, no. 3, pp. 161–178, 2015.
- [113] P. Cabrales, G. M. Zanini, D. Meays, J. A. Frangos, and L. J. M. Carvalho, "Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 203, no. 10, pp. 1454–1463, 2011.
- [114] G. M. Zanini, P. Cabrales, W. Barkho, J. A. Frangos, and L. J. M. Carvalho, "Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in mice," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 8, article 66, 2011.
- [115] J. Lou, R. Lucas, and G. E. Grau, "Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14, no. 4, pp. 810–820, 2001.
- [116] J. B. de Souza, J. C. R. Hafalla, E. M. Riley, and K. N. Couper, "Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease," *Parasitology*, vol. 137, no. 5, pp. 755–772, 2010.
- [117] A. G. Craig, G. E. Grau, C. Janse et al., "The role of animal models for research on severe malaria," *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 2, Article ID e1002401, 2012.
- [118] L. J. M. Carvalho, "Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria?" *Trends in Parasitology*, vol. 26, no. 6, pp. 271–272, 2010.

---

# Multiple Organ Dysfunction during Severe Malaria: The Role of the Inflammatory Response

---

Mariana Conceição de Souza,  
Tatiana Almeida Pádua and  
Maria das Graças Henriques

Additional information is available at the end of the chapter

---

8      **Abstract**

9      Severe malaria is a systemic illness characterized by the dysfunction of one or more  
10     peripheral organs, such as the lungs [acute respiratory distress syndrome (ARDS)] and  
11     kidneys [acute kidney injury (AKI)]. Several clinical and experimental studies suggest  
12     that features of the inflammatory response are related to the multi-organ dysfunction  
13     observed in severe malaria. Our group has been dedicated to studying the roles of pro-  
14     and anti-inflammatory mediators in the multi-organ dysfunction observed in experi-  
15     mental severe malaria, especially in the lungs, kidneys, and cerebrum. Herein, we  
16     explore severe malaria as a pathology derived from intense inflammatory responses in  
17     different organs and further distinguish and compare these organ-specific inflammatory  
18     responses. The pathophysiological mechanism of severe malaria is not fully elucidated;  
19     however, it is important to study it as a complex inflammatory response assembled by  
20     different actors, each one orchestrating a different mechanism.

21      **Keywords:** inflammation, cerebral malaria, acute respiratory distress syndrome, acute  
22      kidney injury, vascular permeability

---

23    **1. Introduction**

24    Severe malaria is a systemic illness characterized by one or more clinical manifestations, such  
25    as acute respiratory distress syndrome (ARDS), multiple convulsions, prostration, shock,  
26    abnormal bleeding, jaundice, and acute kidney injury (AKI) [1–3]. Severe malaria is exclusively  
27    attributed to *Plasmodium falciparum* infection. However, in the last 15–20 years, several reports  
28    of severe malaria attributed to *Plasmodium vivax* [4–6] and *Plasmodium knowlesi* [7–9] have been

1 described, which led the World Health Organization (WHO) to add these species as causes of  
 2 severe malaria [10]. According to the WHO, severe malaria evolves from an uncomplicated  
 3 illness due to several factors, such as the host response, parasite virulence, comorbidities, and  
 4 deficient health services for malaria patients. Beyond the three species cited above, *Plasmodium*  
 5 *malariae* and *Plasmodium ovale* also affect multiple organs in children and adults, however with  
 6 different intensity (**Table 1**). The multi-organ dysfunction observed during severe malaria is  
 7 associated with a systemic inflammatory response triggered by, among other factors, leukocyte  
 8 adhesion to organ microvasculature, parasitized erythrocytes and production of inflammatory  
 9 mediators [11, 12]. Despite the morphological and biochemical differences among *Plasmodium*  
 10 species, the mechanisms by which severe malaria develops appear to be similar. Herein, we  
 11 discuss the inflammatory response underlying the physiopathology of severe malaria and  
 12 human and experimental data. We further discuss triggers of the inflammatory response and  
 13 how chemical and cellular mediators of inflammation cause severe malaria-induced multi-organ  
 14 damage [6, 7, 9, 13–36].

	Clinical manifestation			
	ARDS	CM	Jaundice	AKI
Species				
<i>P. falciparum</i>	[13, 14]	[13, 15–22]	[13, 14, 16, 17, 23]	[13, 14, 16, 18, 24]
<i>P. vivax</i>	[6, 23, 25–27]	[27]	[ss]	[6, 18, 27]
<i>P. knowlesi</i>	[9, 28, 29]	–	[32, 36]	[31, 32, 36]
<i>P. malariae</i>	[31]	[6, 18, 27]	[7, 28–30]	[31, 32, 36]
<i>P. ovale</i>	[31, 33, 34]	–	[33, 35]	[31, 35]

15 ARDS, acute respiratory distress syndrome; CM, cerebral malaria; AKI, acute kidney injury.

16 **Table 1.** Studies describing severe malaria clinical manifestation according *Plasmodium* species.

## 17 **2. Molecular and cellular features of the malaria-induced inflammatory** 18 **response**

19 During severe malaria, leukocytes and lymphocytes produce soluble inflammatory mediators,  
 20 such as pro-inflammatory cytokines, which activate endothelial cells [37]. Furthermore,  
 21 proteins anchored on membranes of infected red blood cell (RBC) such as *P. falciparum*  
 22 erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), expressed by parasites, induce endothelium  
 23 activation resulting in increased expression of adhesion molecules [38, 39] and the activation  
 24 and adhesion of leukocytes to the microvasculature.

25 In both the pre-erythrocytic and erythrocytic phases, macrophages and monocytes are  
 26 responsible for the cytokine storm during an acute malarial infection [40]. Activation of  
 27 phagocytes is mediated by binding of the hemozoin/parasite DNA complex to TLR-9 and the

1 consequent downstream activation of inflammasome signaling [41]. The hemozoin released  
2 into circulation during infected RBC lysis is taken up by circulating monocytes and tissue  
3 macrophages and activates inflammasome intracellular protein complexes, such as NOD-,  
4 LRR-, and pyrin domain-containing (NLRP)3 and NLRP12, resulting in caspase 1 activation  
5 and the subsequent release of interleukin (IL)-1 $\beta$ , which is involved in fever during malaria  
6 bursts [40, 42]. In addition to inducing pro-inflammatory cytokines, some studies demonstrate  
7 that hemozoin can also induce the expression of anti-inflammatory cytokines in monocytes,  
8 such as IL-10, which tightly regulates IL-12 and regulated on activation, normal T-cell ex-  
9 pressed and secreted (RANTES) production [43]. These cytokines and chemokines, respec-  
10 tively, are directly involved in the development of the immune response [44]. Mononuclear  
11 cell activation leads to the production of TNF- $\alpha$  and IL-12 by neutrophils. These cytokines  
12 stimulate innate immune cells, such as natural killer (NK) cells and  $\gamma\delta$  T cells (including  $\gamma\delta$   
13 NKT cells), to rapidly produce IFN- $\gamma$ . As a consequence, IL-12 and IFN- $\gamma$  activate monocytes  
14 and macrophages to enhance the phagocytosis of infected RBCs (reviewed in [45, 46]) and  
15 produce reactive oxygen and nitrogen radicals, which kill parasites [47].

16 The activation of the cellular components of the innate immune system, such as dendritic cells  
17 (DCs), is important for the establishment of acquired immunity [40]. In the spleen, DCs present  
18 their processed antigens to naïve T cells (Th0) and induce a pro-inflammatory response (Th1)  
19 with mainly CD4<sup>+</sup> T cells that produce IFN- $\gamma$ . This lymphocyte subtype is involved in the  
20 beginning of malarial infection by further stimulating Th1 differentiation and subsequently  
21 stimulating B cells to produce specific antibodies to eliminate malaria parasites [46]. In  
22 addition, CD8<sup>+</sup> T cells act in the effector phase, contributing to permeability changes in the  
23 blood-brain barrier (BBB) through perforin-dependent mechanisms [48].

24 Beyond leukocytes and lymphocytes, endothelial cells also play a crucial role in the inflam-  
25 matory response during severe malaria. In the erythrocytic phase, endothelial activation  
26 accounts for many factors involved in the development of severe malaria [49], such as increased  
27 adhesion of infected RBCs [50], increased expression of chemokines [51], and increased  
28 adhesion of leukocytes to peripheral organ microvasculature [52]. Several soluble proteins  
29 have been described such as inflammatory markers of endothelial activation during severe  
30 malaria. The angiopoietin (Ang)-Tie2 axis is a critical regulator of endothelial quiescence,  
31 activation and dysfunction in infectious and oncologic diseases, atherosclerosis, and pulmo-  
32 nary hypertension [53, 54]. Ang-1 signals through its cognate receptor Tie-2 (a tyrosine kinase  
33 with immunoglobulin and endothelial growth factor homology domains), which is expressed  
34 on endothelial cells [53]. In addition, Ang-2 (partial/weak agonist of Tie-2) is released by  
35 endothelial cells and acts as an Ang-1 antagonist [55]. During cerebral malaria (CM), Ang-1  
36 exerts anti-inflammatory effects by decreasing adhesion molecule expression and maintaining  
37 the integrity of the BBB by reinforcing VE-cadherin tight junctions [53, 54]. In contrast, Ang-2  
38 is stored in Weibel-Palade bodies (WPB) within endothelial cells and is involved in the response  
39 to inflammatory stimuli. High levels of Ang-2 are observed in children with severe malaria  
40 [56]. In healthy subjects, the basal Ang-1 level is higher than that of Ang-2, while the opposite  
41 ratio is observed in fatal cases of severe malaria [57]. Another inflammatory marker of  
42 endothelial activation during severe malaria is the activation of endothelial cell protein C

1 receptor (EPCR). EPCR is widely expressed on endothelial cells and leukocytes, and its  
2 activation is associated with severe malaria [58, 59]. EPCR is referred to as the cell surface  
3 conductor of cytoprotective coagulation factor signaling because it enhances the conversion of  
4 protein C into its activated state, activated protein C (APC). The EPCR/APC complex has anti-  
5 inflammatory and endothelial cytoprotective activities that help maintain vascular integrity  
6 [60, 61]. The binding of infected RBCs to EPCR impairs the formation of the EPCR/APC  
7 complex, which may lead to sequestration, complement activation, and endothelial dysfunction,  
8 as reflected by Weibel-Palade (WP) body exocytosis, with the release of von Willebrand  
9 factor (vWF) and angiopoietin-2 and the increased expression of other endothelial receptors,  
10 such as ICAM-1 [60].

### 11 **3. Organ-specific inflammatory responses**

12 The inflammatory features described above occur in different organs and at different intensi-  
13 ties. Although there are few examples of leukocyte adhesion in the brain vasculature in the  
14 development of human cerebral malaria [62], necropsy in fatal cases of severe malaria reveals  
15 marked inflammatory cell infiltration in lung tissue [11]. Endothelium/leukocyte interactions  
16 in the lung differ from their interactions in the brain, likely due to differences in the BBB and  
17 the blood-air barrier tight junction compositions of the brain and lung endothelium. However,  
18 the malaria-induced inflammatory response that is responsible for kidney dysfunction is not  
19 related to inflammatory cell accumulation in renal tissue but depends on immunocomplex  
20 deposition and infected RBC adhesion to the renal vasculature [63].

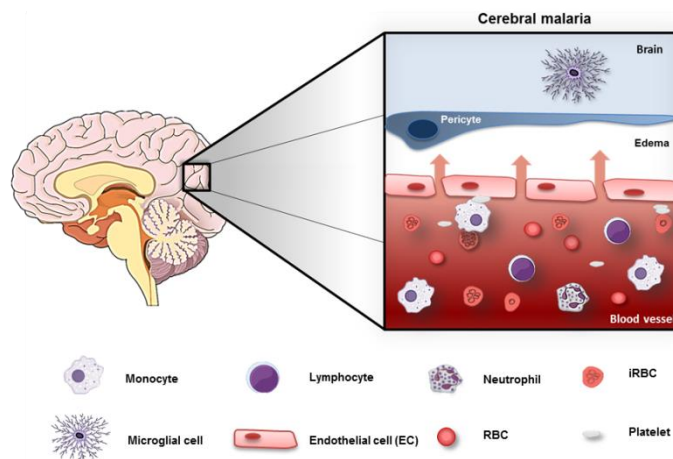
#### 21 **3.1. Inflammatory components in the development of cerebral malaria**

22 Cerebral malaria is mainly attributed to *P. falciparum* infection, especially in children under  
23 five years [64]. Cerebral complications during malaria are triggered by the mechanisms  
24 described above; however, the inflammatory response observed in the brain is unique.

25 Taylor and coworkers have been studying the pathogenesis of cerebral malaria (CM) and have  
26 observed three different pathologies: (i) CM1—presence of sequestered parasitized erythro-  
27 cytes in the cerebral microvasculature; (ii) CM2—presence of sequestered parasitized eryth-  
28 rocytes in the cerebral microvasculature and vascular pathology; and (iii) CM3—non-malarial  
29 components involved in cerebral damage. Inflammatory mediators are involved in CM1 and  
30 CM2. As described above, adhesion molecules and EPCR expressed in brain endothelial cells  
31 induce parasitized erythrocyte adhesion [58]. Likewise, during CM2, leukocytes are observed  
32 in the intravascular space, and plasmatic proteins are found in the brain tissue, suggesting  
33 edema formation [62]. The role of leukocytes in the pathogenesis of cerebral malaria is unclear.  
34 A main characteristic of brain anatomy is the presence of the BBB, which confers protection  
35 against circulating cell diapedesis into brain tissue. Nevertheless, the BBB composition of  
36 postcapillary venules allows leukocyte diapedesis during non-malarial brain injury [65, 66].  
37 However, leukocytes are not observed within brain tissue during CM2 [62, 67], suggesting an  
38 indirect contribution of these cells to the development of cerebral malaria. Cytokine production



1 by leukocytes during *P. falciparum* infection may contribute to brain endothelial cell activation,  
 2 indicating that leukocyte involvement in cerebral malaria does not depend on cell-cell contact  
 3 [68, 69]. Wassmer and colleagues hypothesized that higher endothelial responses to TNF- $\alpha$   
 4 increase the probability of a patient developing cerebral malaria. The authors suggest that  
 5 endothelial activation by TNF- $\alpha$  increases the expression of adhesion molecules, which  
 6 facilitates the binding of parasitized erythrocytes, leading to CM1/CM2. Thus, CM1/CM2 is a  
 7 pathogenesis triggered by parasitized erythrocytes but sustained by a local inflammatory  
 8 response (**Figure 1**).



9  
 10 **Figure 1** Inflammatory response during cerebral malaria—during cerebral malaria, it is possible to observe the presence of sequestered parasitized erythrocytes in the cerebral microvasculature, vascular pathology, leukocytes in the intravascular space and plasmatic proteins in brain tissue, suggesting edema formation. Figure created in the Mind the Graph platform ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).

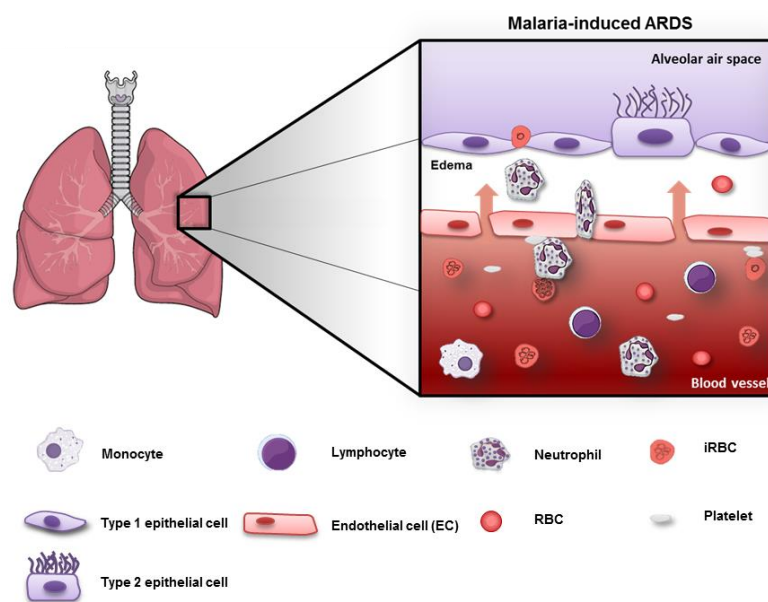
14 Although experimental models of severe malaria could not be used to predict human pathology,  
 15 they have been extensively used to elucidate cellular and molecular pathophysiological  
 16 processes. Several findings observed in human cerebral malaria are also observed in experimental  
 17 models, including cytokine activity [70], endothelial activation [71], and edema  
 18 formation [72]; however, the sequestration of parasitized erythrocytes during experimental  
 19 cerebral malaria (ECM) is not well understood. Recent evidence showed that *Plasmodium*  
 20 *berghei*-ANKA infected RBCs adhere to brain microvascular endothelial cells in a VCAM-1-  
 21 dependent manner [73]. In addition, another study suggests transient contact between infected  
 22 RBCs and the endothelium [74]. The expression of Pf-erythrocyte membrane protein (EMP)s  
 23 and their ability to adhere to host adhesion molecules depends on the expression of structural  
 24 proteins, such as knob-associated histidine-rich protein (KAHRP), that allow the formation of  
 25 knobs on erythrocyte membranes [75]. *Plasmodium* species incapable of forming knobs in  
 26 infected erythrocytes (knobless *Plasmodium*) show a passive adhesion of infected RBCs to  
 27 activated endothelial cells [75]. Thus, knobless *Plasmodium* activates endothelial cells to the  
 28 same extent as knob-forming *Plasmodium* [66, 73], which suggests that ECM may also be  
 29 induced by parasitized erythrocytes.



1 The participation of leukocytes and lymphocytes in ECM has been extensively described [76].  
 2 Different from that observed in humans, during ECM, the adhesion of leukocytes and  
 3 lymphocytes in the brain vasculature is well described [71, 74, 77]. In fact, monocytes, CD4<sup>+</sup> T  
 4 cells, CD8<sup>+</sup> T cells and platelets adhere in brain post capillary venules but do not transmigrate  
 5 to the brain tissue of *P. berghei* infected mice, supporting the idea that the brain disorder is due  
 6 to leukocyte induced-endothelial dysfunction. Thus, strategies targeting endothelial stabili-  
 7 zation revert ECM and prolong survival in mice [71, 78].

### 8 3.2. The inflammatory response in severe malaria-induced ARDS

9 Beyond the brain, the lungs are the most affected organ in severe malaria. Lung dysfunction  
 10 occurs in 20% of all cases of adults with falciparum [3] or vivax [27] severe malaria. In knowlesi  
 11 severe malaria, more than 50% of patients develop acute respiratory distress syndrome (ARDS)  
 12 (reviewed in [3]). Recently, the methods for ARDS diagnosis are redefined, and ARDS is now  
 13 classified as mild, moderate, or severe according to chest imaging, the origin of edema,  
 14 oxygenation, and respiratory dysfunction timing [79], which supports the idea that the  
 15 epidemiological data regarding malaria-induced ARDS may be underestimated. Nevertheless,  
 16 ARDS can be caused by direct lung injury (pulmonary infection, aspiration, lung contusion,  
 17 etc.) or by indirect lung injury (systemic inflammation, transfusion, burn injury, etc.) (reviewed  
 18 in [80]). Thus, during severe malaria, lung dysfunction can be triggered directly by adhesion  
 19 of infected RBCs to the lung vasculature or indirectly as a consequence of the activity of  
 20 endothelial activators (**Figure 2**).



21

22 **Figure 2** Inflammatory components observed in severe malaria-induced ARDS—in the lungs of patients with severe  
 23 malaria who develop ARDS, increases in vascular permeability, infected erythrocytes, and intense neutrophil infiltra-  
 24 tion are often observed. Figure created in the Mind the Graph platform ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).

1 Although CM is common in children, ARDS is often observed in adults [81]. In fact, the  
2 pathology observed in the lung tissue differs between adults and children. In children, few  
3 cases of pneumonia are observed [11], while an intense inflammatory cell infiltration is  
4 frequently noted [11, 82]. Milner and coworkers hypothesize that ARDS in children is an  
5 indirect effect of the inflammatory response induced by CM because non-specific lung  
6 dysfunction is observed. In fact, it has already been demonstrated that the inflammatory  
7 response triggered by brain injury directly affects the respiratory system by altering vascular  
8 permeability and allowing leukocyte influx into the lung parenchyma [83]. However, in adults,  
9 the presence of infected RBCs likely induces a local inflammatory response. Gillrie and  
10 coworkers proposed that merozoite-derived histones bind to pathogens-associated molecular  
11 patterns (PAMPs) expressed on endothelial cell membranes, leading to MAPK activation and  
12 the consequent production of pro-inflammatory mediators. In addition to the production of  
13 inflammatory mediators, *Plasmodium* also induces cell death and alterations in the expression  
14 of junctional proteins, which facilitates the influx of leukocytes to pulmonary tissue [84, 85].

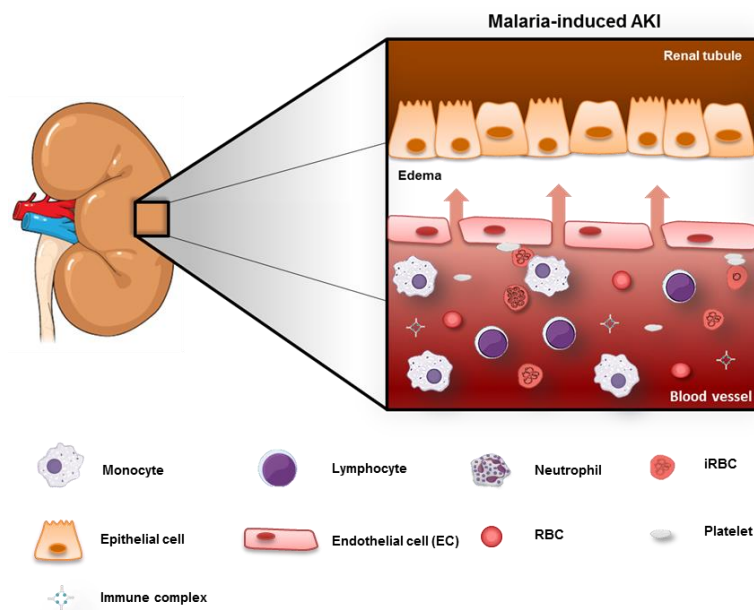
15 Experimental models of severe malaria have revealed that ARDS begins when merozoites  
16 activate endothelial cells within pulmonary capillary beds [86, 87]. Thus, some authors suggest  
17 that the erythrocytic cycle starts in the lung capillaries [86]. In addition to merozoites,  
18 hemozoin and the close contact between infected erythrocytes and pulmonary endothelial cells  
19 trigger an inflammatory response 24 h after infection. This is characterized by intense leukocyte  
20 infiltration, as well as the production of proinflammatory mediators in the lung tissue, which  
21 persists for at least five days after infection [88–91]. Different from that observed in brain  
22 pathology, the inflammatory cellular infiltration in the lungs is mainly composed of neutro-  
23 phils [90]. In fact, depletion of neutrophils impairs experimental severe malaria-induced ARDS  
24 and prolongs survival in mice [92, 93]. The participation of leukocytes in lung dysfunction  
25 during malaria may be explained, in part, by their interaction with the endothelium. In the  
26 brain, there is no leukocyte transmigration, while in the lung, tight junctional constitution and  
27 adhesion molecules expressed in the endothelium allow leukocyte transmigration and the  
28 consequent accumulation of these cells in the lung parenchyma. Thus, despite constitutional  
29 differences, the preservation of endothelial integrity in both the lungs and the brain may  
30 contribute to the attenuation of severe malaria symptoms.

### 31 3.3. The inflammatory response observed in severe malaria-induced acute kidney injury

32 Systemic disorders often result in secondary damage, such as functional and structural changes  
33 in the kidneys and consequent acute renal failure (ARF). The term ARF was replaced by the  
34 term acute kidney injury (AKI), which represents more than renal failure characteristics,  
35 according to the risk, injury, failure, loss, and end-stage renal failure (RIFLE) criteria [94, 95].  
36 At present, the RIFLE criteria are widely used to diagnose AKI [96]. Severe malaria-derived  
37 AKI (smAKI) is more common in adults than in children [81]. Beyond the AKI reported in  
38 severe cases of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria [97, 98], there have previously been reports of  
39 AKI in conjunction with the rare complications derived from infection with *P. ovale*, *P. malar-*  
40 *iae*, or *P. knowlesi* [35, 99, 100]. AKI is diagnosed in almost 50% of severe malaria cases. Currently,  
41 smAKI is diagnosed according to the WHO 2006 criteria; however, Thanachartwet and

1 colleagues suggest that, according the RIFLE criteria, these numbers are underestimated.  
 2 Instead, according the RIFLE criteria, almost 75% of severe malaria patients are developing  
 3 AKI [96].

4 The pathophysiology of smAKI is still unclear. Because AKI can develop as a secondary effect  
 5 of a systemic disease, some authors suggest that the systemic inflammatory response induced  
 6 in peripheral organs during severe malaria contributes to smAKI development [101]. However,  
 7 ultra-structural and histological studies of renal tissue in fatal cases of severe malaria reveal  
 8 an intense inflammatory cell accumulation, indicating that smAKI can also be locally induced  
 9 [18, 102].



10

11 **Figure 3** Severe malaria-induced AKI—during severe malaria-induced AKI, there is an intense mononuclear cell accumu-  
 12 lation in renal tissue, endothelial cell swelling, hypertrophy, and cytoplasmic vacuolation, suggesting endothelial  
 13 activation. Different from that observed in the lungs and brain, this suggests that AKI results from deposition of immu-  
 14 noglobulins in the kidneys. Figure created in the Mind the Graph platform ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).

15 In general, endothelial cell swelling, hypertrophy, and cytoplasmic vacuolation suggest  
 16 endothelial activation and are characteristic of smAKI [18, 102]. Such characteristics are similar  
 17 between affected organs [3, 62]; however, unlike brain endothelial cells [103], kidney endo-  
 18 thelial cells do not phagocytose infected RBCs. Regarding leukocytes, smAKI is characterized  
 19 by the intense presence of mononuclear cells in peritubular capillaries, but not neutrophils,  
 20 platelets, or eosinophils (**Figure 3**). Increased levels of plasmatic TNF- $\alpha$  [104], soluble uroki-  
 21 nase-type plasminogen activator receptor (suPAR) expression [105], and mononuclear  
 22 activation markers correlate with AKI in patients with severe malaria, suggesting that  
 23 mononuclear activation induces tissue damage. Furthermore, mononuclear cells do not

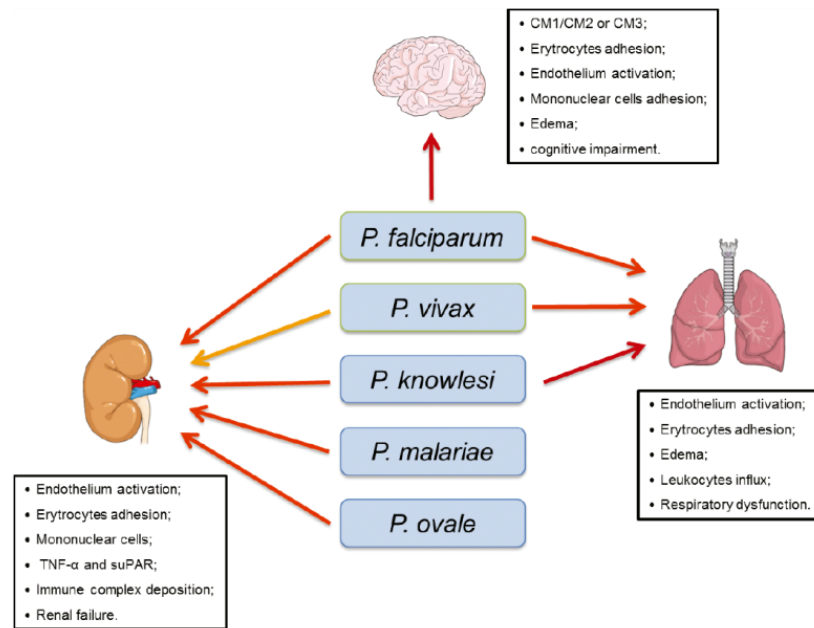
1 infiltrate the renal tissue interstitium as they do in the lungs [3], likely because, despite the  
2 activation of the renal endothelium, the tight junctions in renal tissue are not fully disrupted  
3 during severe malaria [106]. Another inflammatory characteristic that is mainly attributed to  
4 AKI is the deposition of immune complexes in the kidneys. The nephropathy associated with  
5 the deposition of immunoglobulin (Ig) isotypes G and M in the kidneys has previously been  
6 described in patients with severe malaria; however, the pathological events that result in  
7 immune complex deposition depend on the *Plasmodium* species and the time of patient death  
8 [107, 108].

9 Inflammatory components of AKI are also observed in experimental models of severe malaria.  
10 Endothelial dysfunction assessed through the evaluation of increased vascular permeability  
11 [109] and the expression of adhesion molecules [110] is also observed in experimental models  
12 of severe malaria. The activation of the glomerular endothelium may be involved in the  
13 accumulation of inflammatory cells and infected erythrocytes in glomeruli [111]. Furthermore,  
14 inflammatory cells present in the kidneys produce pro-inflammatory cytokines that perpetuate  
15 renal damage [111]. In fact, studies in which mice were rescued from severe malaria, i.e., were  
16 cured of *P. berghei* infection, showed that renal dysfunction persists for at least 14 days after  
17 cure, suggesting that severe malaria-induced AKI is mainly sustained by inflammatory  
18 components [112].

19 Overall, further studies are required to unveil the pathophysiology of smAKI. To date, it is not  
20 clear how kidney tissue damage begins. SmAKI may be a secondary effect of the systemic  
21 inflammatory response, may begin locally, or may be the sum of both of these processes;  
22 however, once established, smAKI persists even after parasite clearance by antimalarial drugs  
23 [24], which raise the possibility for new therapeutic approaches that target the inflammatory  
24 response in the kidney.

#### 25 **4. Conclusions**

26 The findings presented above show the influence of the inflammatory response in the devel-  
27 opment and perpetuation of severe malaria. It has been shown that *Plasmodium*-associated  
28 molecular patterns such as hemozoin/parasite DNA and proteins expressed on membrane of  
29 infected red blood cells trigger inflammatory response including macrophage activation, T cell  
30 differentiation, endothelial cell activation, and the production of several pro-inflammatory  
31 mediators. *Plasmodium*-induced inflammatory response occurs systemically, however, due to  
32 different anatomical and physiological characteristics, each organ develops a particular  
33 inflammatory response that may lead to organ dysfunction (**Figure 4**). Although brain  
34 dysfunction is associated with activation of endothelial cells by the cytoadhesion of infected  
35 erythrocytes, severe malaria-induced ARDS is correlated with inflammatory cell accumulation  
36 in lung parenchyma.



1

2 **Figure 4** According to the WHO, severe malaria can be caused by *P. falciparum*, *P. vivax*, and *P. knowlesi*. However, the  
 3 five *Plasmodium* species that infect humans are able to induce organ dysfunction due to a particular inflammatory response. Figure created in the Mind the Graph platform ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)).  
 4

5 Even though artemisinin derivatives are the treatment of choice for severe malaria, it accounts  
 6 only for antimalarial purpose. In the last few years, host-directed therapies for malaria and  
 7 other infectious diseases have been studied [113]. Several approaches aiming the inflammatory  
 8 response have been studied in patients diagnosed with uncomplicated malaria [114, 115];  
 9 however, the treatment of severe malaria includes only supportive treatment. On the other hand,  
 10 the use of experimental models of severe malaria suggested that the induction of  
 11 cytoprotective pathways in brain as well the administration of anti-inflammatory drugs  
 12 improve the survival of *P. berghei*-infected mice, especially when administrated as adjunctive  
 13 treatment to antimalarial drugs [71, 76, 116, 117]. Indeed, a robust clinical evidence is yet  
 14 necessary to provide the effectiveness of the treatment with inflammatory modulators as an  
 15 adjunctive therapy to antimalarial drugs to improve patient outcomes.

## 16 Acknowledgments

17 This work was supported by grants from the Brazilian Council for Scientific and Technological  
 18 Development (CNPq), Carlos Chagas Filho, the Rio de Janeiro State Research Supporting  
 19 Foundation (FAPERJ), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel  
 20 (CAPES), and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

## 1 Author details

2 Mariana Conceição de Souza<sup>1,2,3</sup>, Tatiana Almeida Pádua<sup>1,2,3</sup> and

3 Maria das Graças Henriques<sup>1,2,3\*</sup>

4 \*Address all correspondence to: gracahenriques@fiocruz.br

5 1 Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de

6 Janeiro, RJ, Brazil

AQ1

7 2 Center for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (Fioc-

8 cruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

9 3 National Institute of Science and Technology of Innovation on Diseases of Neglected Popu-  
10 lations (INCT-IDPN), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## 11 References

12 [1] Mohan, A., Sharma, S. K., Bollineni, S. (2008) Acute lung injury and acute respiratory  
13 distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis* 45, 179–93.

14 [2] Abdul Manan, J., Ali, H., Lal, M. (2006) Acute renal failure associated with malaria. *J*  
15 *Ayub Med Coll Abbottabad* 18, 47–52.

16 [3] Taylor, W. R., Hanson, J., Turner, G. D., White, N. J., Dondorp, A. M. (2012) Respiratory  
17 manifestations of malaria. *Chest* 142, 492–505.

18 [4] Rodriguez-Morales, A. J., Benitez, J. A., Arria, M. (2008) Malaria mortality in Venezuela:  
19 focus on deaths due to *Plasmodium vivax* in children. *J Trop Pediatr* 54, 94–101.

20 [5] Andrade, B. B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S. M., Clarencio, J., Camargo, L. M., Barral,  
21 A., Barral-Netto, M. (2010) Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflam-  
22 matory imbalance. *Malar J* 9, 13.

23 [6] Lacerda, M. V., Fragoso, S. C., Alecrim, M. G., Alexandre, M. A., Magalhaes, B. M.,  
24 Siqueira, A. M., Ferreira, L. C., Araujo, J. R., Mourao, M. P., Ferrer, M., Castillo, P.,  
25 Martin-Jaular, L., Fernandez-Becerra, C., del Portillo, H., Ordi, J., Alonso, P. L., Bassat,  
26 Q. (2012) Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium*  
27 *vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin Infect Dis* 55, e67–74.

28 [7] Cox-Singh, J., Hiu, J., Lucas, S. B., Divis, P. C., Zulkarnaen, M., Chandran, P., Wong, K.  
29 T., Adem, P., Zaki, S. R., Singh, B., Krishna, S. (2010) Severe malaria—a case of fatal  
30 *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J* 9, 10.



- 1 [8] Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., Shamsul, S. S., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman,  
2 H. A., Conway, D. J., Singh, B. (2008) *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely  
3 distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis 46, 165–71.
- 4 [9] William, T., Menon, J., Rajahram, G., Chan, L., Ma, G., Donaldson, S., Khoo,  
5 S., Frederick, C., Jelip, J., Anstey, N. M., Yeo, T. W. (2011) Severe *Plasmodium*  
6 *knowlesi* malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. Emerg Infect Dis  
7 17, 1248–55.
- 8 [10] WHO (2014) Severe malaria. Trop Med Int Health 19, 7–131.
- 9 [11] Milner, D., Jr., Factor, R., Whitten, R., Carr, R. A., Kamiza, S., Pinkus, G., Molyneux, M.,  
10 Taylor, T. (2013) Pulmonary pathology in pediatric cerebral malaria. Hum Pathol 44,  
11 2719–26.
- 12 [12] Milner, D. A., Jr., Whitten, R. O., Kamiza, S., Carr, R., Liomba, G., Dzamalala, C., Seydel,  
13 K. B., Molyneux, M. E., Taylor, T. E. (2014) The systemic pathology of cerebral malaria  
14 in African children. Front Cell Infect Microbiol 4, 104.
- 15 [13] Mohapatra, B. N., Jangid, S. K., Mohanty, R. (2014) GCRBS score: a new scoring system  
16 for predicting outcome in severe falciparum malaria. J Assoc Physicians India 62, 14–  
17 7.
- 18 [14] Sulaiman, H., Ismail, M. D., Jalalonmuhali, M., Atiya, N., Ponnampalavanar, S. (2014)  
19 Severe *Plasmodium falciparum* infection mimicking acute myocardial infarction. Malar  
20 J 13, 341.
- 21 [15] Kariuki, S. M., Abubakar, A., Newton, C. R., Kihara, M. (2014) Impairment of executive  
22 function in Kenyan children exposed to severe falciparum malaria with neurological  
23 involvement. Malar J 13, 365.
- 24 [16] Asma, U. E., Taufiq, F., Khan, W. (2014) Prevalence and clinical manifestations of  
25 malaria in Aligarh, India. Korean J Parasitol 52, 621-9.
- 26 [17] Khan, W., Zakai, H. A., Umm, E. A. (2014) Clinico-pathological studies of Plasmodium  
27 falciparum and Plasmodium vivax - malaria in India and Saudi Arabia. Acta Parasitol  
28 59, 206-12.
- 29 [18] Nayak, K. C., Kumar, S., Gupta, B. K., Gupta, A., Prakash, P., Kochar, D. K. (2014)  
30 Clinical and histopathological profile of acute renal failure caused by falciparum and  
31 vivax monoinfection: an observational study from Bikaner, northwest zone of Rajas-  
32 than, India. J Vector Borne Dis 51, 40-6.
- 33 [19] Milner, D. A., Jr., Lee, J. J., Frantzreb, C., Whitten, R. O., Kamiza, S., Carr, R. A., Pradham,  
34 A., Factor, R. E., Playforth, K., Liomba, G., Dzamalala, C., Seydel, K. B., Molyneux, M.  
35 E., Taylor, T. E. (2015) Quantitative assessment of multiorgan sequestration of parasites  
36 in fatal pediatric cerebral malaria. J Infect Dis 212, 1317–21.
- 37 [20] Milner, D. A., Jr., Vareta, J., Valim, C., Montgomery, J., Daniels, R. F., Volkman, S. K.,  
38 Neafsey, D. E., Park, D. J., Schaffner, S. F., Mahesh, N. C., Barnes, K. G., Rosen, D. M.,

- 1 Lukens, A. K., Van Tyne, D., Wiegand, R. C., Sabeti, P. C., Seydel, K. B., Glover, S. J.,  
 2 Kamiza, S., Molyneux, M. E., Taylor, T. E., Wirth, D. F. (2012) Human cerebral malaria  
 3 and *Plasmodium falciparum* genotypes in Malawi. *Malar J* 11, 35.
- 4 [21] Beare, N. A., Lewallen, S., Taylor, T. E., Molyneux, M. E. (2011) Redefining cerebral  
 5 malaria by including malaria retinopathy. *Future Microbiol* 6, 349–55.
- 6 [22] Montgomery, J., Milner, D. A., Jr., Tse, M. T., Njobvu, A., Kayira, K., Dzamalala, C. P.,  
 7 Taylor, T. E., Rogerson, S. J., Craig, A. G., Molyneux, M. E. (2006) Genetic analysis of  
 8 circulating and sequestered populations of *Plasmodium falciparum* in fatal pediatric  
 9 malaria. *J Infect Dis* 194, 115–22.
- 10 [23] Saravu, K., Rishikesh, K., Kamath, A., Shastry, A. B. (2014) Severity in *Plasmodium vivax*  
 11 malaria claiming global vigilance and exploration—a tertiary care centre-based cohort  
 12 study. *Malar J* 13, 304.
- 13 [24] Plewes, K., Haider, M. S., Kingston, H. W., Yeo, T. W., Ghose, A., Hossain, M. A.,  
 14 Dondorp, A. M., Turner, G. D., Anstey, N. M. (2015) Severe falciparum malaria treated  
 15 with artesunate complicated by delayed onset haemolysis and acute kidney injury.  
 16 *Malar J* 14, 246.
- 17 [25] Londhe, C., Ganeriwal, A., deSouza, R. (2014) Study of clinical profile of acute respi-  
 18 ratory distress syndrome and acute lung injury in *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector*  
 19 *Borne Dis* 51, 339–42.
- 20 [26] Kumari, M., Ghildiyal, R. (2014) Clinical profile of *Plasmodium vivax* malaria in children  
 21 and study of severity parameters in relation to mortality: a tertiary care centre per-  
 22 spective in Mumbai, India. *Malar Res Treat* 2014, 765657.
- 23 [27] Quispe, A. M., Pozo, E., Guerrero, E., Durand, S., Baldeviano, G. C., Edgel, K. A., Graf,  
 24 P. C., Lescano, A. G. (2014) *Plasmodium vivax* hospitalizations in a monoendemic malaria  
 25 region: severe vivax malaria? *Am J Trop Med Hyg* 91, 11–7.
- 26 [28] Seilmaier, M., Hartmann, W., Beissner, M., Fenzl, T., Haller, C., Guggemos, W., Hesse,  
 27 J., Harle, A., Bretzel, G., Sack, S., Wendtner, C., Loscher, T., Berens-Riha, N. (2014) Severe  
 28 *Plasmodium knowlesi* infection with multi-organ failure imported to Germany from  
 29 Thailand/Myanmar. *Malar J* 13, 422.
- 30 [29] Azidah, A. K., Mohd Faizal, M. A., Lili, H. Y., Zeehaida, M. (2014) Severe *Plasmodium*  
 31 *knowlesi* infection with multiorgan involvement in north east peninsular Malaysia. *Trop*  
 32 *Biomed* 31, 31–5.
- 33 [30] Nakaviroj, S., Kobasa, T., Teeranaipong, P., Putaporntip, C., Jongwutiwes, S. (2015) An  
 34 autochthonous case of severe *Plasmodium knowlesi* malaria in Thailand. *Am J Trop Med*  
 35 *Hyg* 92, 569–72.
- 36 [31] Hwang, J., Cullen, K. A., Kachur, S. P., Arguin, P. M., Baird, J. K. (2014) Severe morbidity  
 37 and mortality risk from malaria in the United States, 1985–2011. *Open Forum Infect Dis*  
 38 1, ofu034.



- 1 [32] Bellanger, A. P., Bruneel, F., Barbot, O., Mira, J. P., Millon, L., Houze, P., Faucher, J. F.,  
2 Houze, S. (2010) Severe *Plasmodium malariae* malaria in a patient with multiple sus-  
3 ceptibility genes. *J Travel Med* 17, 201–2.
- 4 [33] Strydom, K. A., Ismail, F., Freat, J. (2014) *Plasmodium ovale*: a case of not-so-benign  
5 tertian malaria. *Malar J* 13, 85.
- 6 [34] Haydoura, S., Mazboudi, O., Charafeddine, K., Bouakl, I., Baban, T. A., Taher, A. T.,  
7 Kanj, S. S. (2011) Transfusion-related *Plasmodium ovale* malaria complicated by acute  
8 respiratory distress syndrome (ARDS) in a non-endemic country. *Parasitol Int* 60, 114–  
9 6.
- 10 [35] Tomar, L. R., Giri, S., Bauddh, N. K., Jhamb, R. (2015) Complicated malaria: a rare  
11 presentation of *Plasmodium ovale*. *Trop Doct* 45, 140–2.
- 12 [36] Neri, S., Pulvirenti, D., Patamia, I., Zoccolo, A., Castellino, P. (2008) Acute renal failure  
13 in *Plasmodium malariae* infection. *Neth J Med* 66, 166–8.
- 14 [37] Odeh, M. (2001) The role of tumour necrosis factor-alpha in the pathogenesis of  
15 complicated falciparum malaria. *Cytokine* 14, 11–8.
- 16 [38] De las Salas, B., Segura, C., Pabon, A., Lopes, S. C., Costa, F. T., Blair, S. (2013) Adherence  
17 to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of *Plasmodium vivax* isolates  
18 from Colombia. *Malar J* 12, 347.
- 19 [39] Tripathi, A. K., Sullivan, D. J., Stins, M. F. (2006) *Plasmodium falciparum*-infected  
20 erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothe-  
21 lium through NF-kappaB. *Infect Immun* 74, 3262–70.
- 22 [40] Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., Golenbock, D. T. (2014) Innate sensing  
23 of malaria parasites. In *Nat Rev Immunol* 14, 744–57.
- 24 [41] Mac-Daniel, L., Menard, R. (2015) Plasmodium and mononuclear phagocytes. *Microb*  
25 *Pathog* 78, 43–51.
- 26 [42] Shio, M. T., Kassa, F. A., Bellemare, M. J., Olivier, M. (2010) Innate inflammatory  
27 response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes Infect* 122010, 889–99.
- 28 [43] Keller, C. C., Yamo, O., Ouma, C., Ong'echa, J. M., Ounah, D., Hittner, J. B., Vulule, J.  
29 M., Perkins, D. J. (2006) Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates  
30 interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-  
31 dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infect*  
32 *Immun* 74, 5249–60.
- 33 [44] Were, T., Davenport, G. C., Yamo, E. O., Hittner, J. B., Awandare, G. A., Otieno, M. F.,  
34 Ouma, C., Orago, A. S., Vulule, J. M., Ong'echa, J. M., Perkins, D. J. (2009) Naturally  
35 acquired hemozoin by monocytes promotes suppression of RANTES in children with  
36 malarial anemia through an IL-10-dependent mechanism. *Microbes Infect* 11, 811–9.

- 1 [45] Gazzinelli, R. T., Ropert, C., Campos, M. A. (2004) Role of the Toll/interleukin-1 receptor  
2 signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan  
3 parasites. *Immunol Rev* 201, 9–25.
- 4 [46] Deroost, K., Pham, T. T., Opdenakker, G., Van den Steen, P. E. (2015) The immunological  
5 balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiol Rev* 40, 208–57.
- 6 [47] Gowda, D. C. (2007) TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol* 23,  
7 596–604.
- 8 [48] Schofield, L., Grau, G. E. (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat*  
9 *Rev Immunol* 5, 722–35.
- 10 [49] Storm, J., Craig, A. G. (2014) Pathogenesis of cerebral malaria— inflammation and  
11 cytoadherence. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 100.
- 12 [50] Wu, Y., Szeszak, T., Stins, M., Craig, A. G. (2011) Amplification of *P. falciparum* cytoad-  
13 herence through induction of a pro-adhesive state in host endothelium. *PLoS One* 6,  
14 e24784.
- 15 [51] Chakravorty, S. J., Carret, C., Nash, G. B., Ivens, A., Szeszak, T., Craig, A. G. (2007)  
16 Altered phenotype and gene transcription in endothelial cells, induced by *Plasmodium*  
17 *falciparum*-infected red blood cells: pathogenic or protective? *Int J Parasitol* 37, 975–87.
- 18 [52] Maguire, G. P., Handojo, T., Pain, M. C., Kenangalem, E., Price, R. N., Tjitra, E., Anstey,  
19 N. M. (2005) Lung injury in uncomplicated and severe falciparum malaria: a longitu-  
20 dinal study in papua, Indonesia. *J Infect Dis* 192, 1966–74.
- 21 [53] Kim, H., Higgins, S., Liles, W. C., Kain, K. C. (2011) Endothelial activation and dysre-  
22 gulation in malaria: a potential target for novel therapeutics. *Curr Opin Hematol* 18,  
23 177–85.
- 24 [54] Carvalho, L. J., Moreira, A. D., Daniel-Ribeiro, C. T., Martins, Y. C. (2014) Vascular  
25 dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Mem Inst Oswaldo*  
26 *Cruz* 109(5), 577–588.
- 27 [55] Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X. Z., Wellems, T. E. (2013) Malaria biology and  
28 disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med* 19, 156–67.
- 29 [56] Conroy, A. L., Glover, S. J., Hawkes, M., Erdman, L. K., Seydel, K. B., Taylor, T. E.,  
30 Molyneux, M. E., Kain, K. C. (2012) Angiotensin-2 levels are associated with retinop-  
31 athy and predict mortality in Malawian children with cerebral malaria: a retrospective  
32 case-control study. *Crit Care Med* 40, 952–9.
- 33 [57] Jain, V., Lucchi, N. W., Wilson, N. O., Blackstock, A. J., Nagpal, A. C., Joel, P. K., Singh,  
34 M. P., Udhayakumar, V., Stiles, J. K., Singh, N. (2011) Plasma levels of angiotensin-1  
35 and -2 predict cerebral malaria outcome in Central India. *Malar J* 10, 383.
- 36 [58] Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E., Avril, M., Brazier, A.  
37 J., Freeth, J., Jespersen, J. S., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J. D.,

- 1 Higgins, M. K., Theander, T. G. (2013) Severe malaria is associated with parasite binding  
2 to endothelial protein C receptor. *Nature* 498, 502–5.
- 3 [59] Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., Lavstsen, T. (2013) Malaria's deadly grip:  
4 cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol* 15, 1976–  
5 83.
- 6 [60] Gleeson, E. M., O'Donnell, J. S., Preston, R. J. (2012) The endothelial cell protein C  
7 receptor: cell surface conductor of cytoprotective coagulation factor signaling. *Cell Mol*  
8 *Life Sci* 69, 717–26.
- 9 [61] Moxon, C. A., Wassmer, S. C., Milner, D. A., Jr., Chisala, N. V., Taylor, T. E., Seydel, K.  
10 B., Molyneux, M. E., Faragher, B., Esmon, C. T., Downey, C., Toh, C. H., Craig, A. G.,  
11 Heyderman, R. S. (2013) Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and  
12 inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children. *Blood*  
13 122, 842–51.
- 14 [62] Dorovini-Zis, K., Schmidt, K., Huynh, H., Fu, W., Whitten, R. O., Milner, D., Kamiza,  
15 S., Molyneux, M., Taylor, T. E. (2011) The neuropathology of fatal cerebral malaria in  
16 malawian children. *Am J Pathol*, 1782011, 2146–58.
- 17 [63] Das, B. S. (2008) Renal failure in malaria. *J Vector Borne Dis* 45, 83–97.
- 18 [64] Taylor, T. E., Molyneux, M. E. (2015) The pathogenesis of pediatric cerebral malaria: eye  
19 exams, autopsies, and neuroimaging. *Ann N Y Acad Sci* 1342, 44–52.
- 20 [65] Alfieri, A., Srivastava, S., Siow, R. C., Cash, D., Modò, M., Duchon, M. R., Fraser, P. A.,  
21 Williams, S. C., Mann, G. E. (2013) Sulforaphane preconditioning of the Nrf2/HO-1  
22 defense pathway protects the cerebral vasculature against blood-brain barrier disrup-  
23 tion and neurological deficits in stroke. *Free Radic Biol Med* 65, 1012–22.
- 24 [66] Silva, N. M., Manzan, R. M., Carneiro, W. P., Milanezi, C. M., Silva, J. S., Ferro, E. A.,  
25 Mineo, J. R. (2010) *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in  
26 C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the  
27 central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. *Exp Parasitol* 126,  
28 167–77.
- 29 [67] Milner, D. A., Jr., Valim, C., Carr, R. A., Chandak, P. B., Fosiko, N. G., Whitten, R.,  
30 Playforth, K. B., Seydel, K. B., Kamiza, S., Molyneux, M. E., Taylor, T. E. (2013) A  
31 histological method for quantifying *Plasmodium falciparum* in the brain in fatal paedri-  
32 atric cerebral malaria. *Malar J* 12, 191.
- 33 [68] Stanistic, D. I., Cutts, J., Eriksson, E., Fowkes, F. J., Rosanas-Urgell, A., Siba, P., Laman,  
34 M., Davis, T. M., Manning, L., Mueller, I., Schofield, L. (2014) gammadelta T cells and  
35 CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines  
36 associated with severe malaria. *J Infect Dis* 210, 295–305.
- 37 [69] Kinra, P., Dutta, V. (2013) Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment  
38 of severity of malaria. *Trop Biomed* 30, 645–53.

- 1 [70] Togbe, D., de Sousa, P. L., Fauconnier, M., Boissay, V., Fick, L., Scheu, S., Pfeffer, K.,  
2 Menard, R., Grau, G. E., Doan, B. T., Beloeil, J. C., Renia, L., Hansen, A. M., Ball, H. J.,  
3 Hunt, N. H., Ryffel, B., Quesniaux, V. F. (2008) Both functional LTbeta receptor and TNF  
4 receptor 2 are required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS*  
5 *One* 3, e2608.
- 6 [71] Souza, M. C., Pádua, T. A., Torres, N. D., Souza Costa, M. F., Candéa, A. P., Maramaldo,  
7 T., Seito, L. N., Penido, C., Estado, V., Antunes, B., Silva, L., Pinheiro, A. A., Caruso-  
8 Neves, C., Tibiriçá, E., Carvalho, L., Henriques, M. G. (2015) Lipoxin A4 attenuates  
9 endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria. *Int Immunopharmacol*  
10 24, 400–407.
- 11 [72] Pamplona, A., Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G., Epiphanyo, S., Chora, A.,  
12 Rodrigues, C. D., Gregoire, I. P., Cunha-Rodrigues, M., Portugal, S., Soares, M. P., Mota,  
13 M. M. (2007) Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of  
14 experimental cerebral malaria. *Nat Med* 13, 703–10.
- 15 [73] El-Assaad, F., Wheway, J., Mitchell, A. J., Lou, J., Hunt, N. H., Combes, V., Grau, G. E.  
16 (2013) Cytoadherence of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells to murine brain  
17 and lung microvascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 81, 3984–91.
- 18 [74] Frevert, U., Nacer, A., Cabrera, M., Movila, A., Leberl, M. (2014) Imaging Plasmodium  
19 immunobiology in the liver, brain, and lung. *Parasitol Int* 63, 171–86.
- 20 [75] Horrocks, P., Pinches, R. A., Chakravorty, S. J., Papakrivov, J., Christodoulou, Z., Kyes,  
21 S. A., Urban, B. C., Ferguson, D. J., Newbold, C. I. (2005) PfEMP1 expression is reduced  
22 on the surface of knobless *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *In J Cell Sci* 118,  
23 2507–18.
- 24 [76] Souza, M. C., Padua, T. A., Henriques, M. G. (2015) Endothelial-leukocyte interaction  
25 in severe malaria: beyond the brain. *Mediators Inflamm* 2015, 168937.
- 26 [77] Nacer, A., Movila, A., Sohet, F., Girgis, N. M., Gundra, U. M., Loke, P., Daneman, R.,  
27 Frevert, U. (2014) Experimental cerebral malaria pathogenesis—hemodynamics at the  
28 blood brain barrier. *PLoS Pathog* 10, e1004528.
- 29 [78] Nacer, A., Movila, A., Baer, K., Mikolajczak, S. A., Kappe, S. H. I., Frevert, U. (2012)  
30 Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria.  
31 *PLoS Pathog* 8, e1002982.
- 32 [79] Barbas, C. S., Isola, A. M., Caser, E. B. (2014) What is the future of acute respiratory  
33 distress syndrome after the Berlin definition? *Curr Opin Crit Care* 20, 10–6.
- 34 [80] Shaver, C. M., Bastarache, J. A. (2014) Clinical and biological heterogeneity in acute  
35 respiratory distress syndrome: direct versus indirect lung injury. *Clin Chest Med* 35,  
36 639–53.
- 37 [81] White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., Dondorp, A.  
38 M. (2014) Malaria. *Lancet* 383, 723-35.

- 1 [82] Nayak, K. C., Mohini, Kumar, S., Tanwar, R. S., Kulkarni, V., Gupta, A., Sharma, P.,  
2 Sirohi, P., Ratan, P. (2011) A study on pulmonary manifestations in patients with malaria  
3 from northwestern India (Bikaner). *J Vector Borne Dis* 48, 219–23.
- 4 [83] Mascia, L. (2009) Acute lung injury in patients with severe brain injury: a double hit  
5 model. *Neurocrit Care* 11, 417–26.
- 6 [84] Gillrie, M. R., Lee, K., Gowda, D. C., Davis, S. P., Monestier, M., Cui, L., Hien, T. T., Day,  
7 N. P., Ho, M. (2012) *Plasmodium falciparum* histones induce endothelial proinflammatory  
8 response and barrier dysfunction. *Am J Pathol* 180, 1028–39.
- 9 [85] Gillrie, M. R., Krishnegowda, G., Lee, K., Buret, A. G., Robbins, S. M., Looareesuwan,  
10 S., Gowda, D. C., Ho, M. (2007) Src-family kinase dependent disruption of endothelial  
11 barrier function by *Plasmodium falciparum* merozoite proteins. *Blood* 110, 3426–35.
- 12 [86] Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H., Schnieder, T., Frevert, U. (2007) Release of hepatic  
13 *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog* 3,  
14 e171.
- 15 [87] Thiberge, S., Blazquez, S., Baldacci, P., Renaud, O., Shorte, S., Menard, R., Amino, R.  
16 (2007) In vivo imaging of malaria parasites in the murine liver. *Nat Protoc* 2, 1811–8.
- 17 [88] Deroost, K., Tyberghein, A., Lays, N., Noppen, S., Schwarzer, E., Vanstreels, E., Komuta,  
18 M., Prato, M., Lin, J. W., Pamplona, A., Janse, C. J., Arese, P., Roskams, T., Daelemans,  
19 D., Opdenakker, G., Van den Steen, P. E. (2013) Hemozoin induces lung inflammation  
20 and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J*  
21 *Respir Cell Mol Biol* 48, 589–600.
- 22 [89] Souza, M. C., Silva, J. D., Pádua, T. A., Capelozzi, V. L., Rocco, P. R., Henriques, M. (2013)  
23 Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in  
24 murine malaria. *Respir Physiol Neurobiol* 186, 65–72.
- 25 [90] Aitken, E. H., Negri, E. M., Barboza, R., Lima, M. R., Alvarez, J. M., Marinho, C. R.,  
26 Caldini, E. G., Epiphanyo, S. (2014) Ultrastructure of the lung in a murine model of  
27 malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Malar J* 13,  
28 230.
- 29 [91] Epiphanyo, S., Campos, M. G., Pamplona, A., Carapau, D., Pena, A. C., Ataide, R.,  
30 Monteiro, C. A., Felix, N., Costa-Silva, A., Marinho, C. R., Dias, S., Mota, M. M. (2010)  
31 VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog* 6, e1000916.
- 32 [92] Senaldi, G., Vesin, C., Chang, R., Grau, G. E., Piguet, P. F. (1994) Role of polymorpho-  
33 nuclear neutrophil leukocytes and their integrin CD11a (LFA-1) in the pathogenesis of  
34 severe murine malaria. *Infect Immun* 62, 1144–9.
- 35 [93] Belnoue, E., Potter, S. M., Rosa, D. S., Mauduit, M., Gruner, A. C., Kayibanda, M.,  
36 Mitchell, A. J., Hunt, N. H., Renia, L. (2008) Control of pathogenic CD8+ T cell migration  
37 to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol*  
38 30, 544–53.

- 1 [94] Thompson, B. T., Cox, P. N., Antonelli, M., Carlet, J. M., Cassell, J., Hill, N. S., Hinds, C.  
2 J., Pimentel, J. M., Reinhart, K., Thijs, L. G. (2004) Challenges in end-of-life care in the  
3 ICU: statement of the 5th International Consensus Conference in Critical Care: Brussels,  
4 Belgium, April 2003: executive summary. *Crit Care Med* 32, 1781–4.
- 5 [95] Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. A., Mehta, R. L., Palevsky, P. (2004) Acute renal failure  
6 –definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information  
7 technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute  
8 Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 8, R204–12.
- 9 [96] Thanachartwet, V., Desakorn, V., Sahassananda, D., Kyaw Win, K. K., Supaporn, T.  
10 (2013) Acute renal failure in patients with severe falciparum malaria: using the WHO  
11 2006 and RIFLE criteria. *Int J Nephrol* 2013, 841518.
- 12 [97] Saravu, K., Rishikesh, K., Parikh, C. R. (2014) Risk factors and outcomes stratified by  
13 severity of acute kidney injury in malaria. *PLoS One* 9, e90419.
- 14 [98] Kaushik, R., Kaushik, R. M., Kakkar, R., Sharma, A., Chandra, H. (2013) *Plasmodium*  
15 *vivax* malaria complicated by acute kidney injury: experience at a referral hospital in  
16 Uttarakhand, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107, 188–94.
- 17 [99] Badiane, A. S., Diongue, K., Diallo, S., Ndong, A. A., Diedhiou, C. K., Deme, A. B., Ma,  
18 D., Ndiaye, M., Seck, M. C., Dieng, T., Ndir, O., Mboup, S., Ndiaye, D. (2014) Acute  
19 kidney injury associated with *Plasmodium malariae* infection. *Malar J* 13, 226.
- 20 [100] Barber, B. E., William, T., Grigg, M. J., Menon, J., Auburn, S., Marfurt, J., Anstey, N. M.,  
21 Yeo, T. W. (2013) A prospective comparative study of knowlesi, falciparum, and vivax  
22 malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from *Plasmodium*  
23 *knowlesi* and *Plasmodium vivax* but no mortality with early referral and artesunate  
24 therapy. *Clin Infect Dis* 56, 383–97.
- 25 [101] Nacher, M., Treeprasertsuk, S., Singhasivanon, P., Silachamroon, U., Vannaphan, S.,  
26 Gay, F., Looareesuwan, S., Wilairatana, P. (2001) Association of hepatomegaly and  
27 jaundice with acute renal failure but not with cerebral malaria in severe falciparum  
28 malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 65, 828–33.
- 29 [102] Nguansangiam, S., Day, N. P., Hien, T. T., Mai, N. T., Chaisri, U., Riganti, M., Dondorp,  
30 A. M., Lee, S. J., Phu, N. H., Turner, G. D., White, N. J., Ferguson, D. J., Pongponratn,  
31 E. (2007) A quantitative ultrastructural study of renal pathology in fatal *Plasmodium*  
32 *falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* 12, 1037–50.
- 33 [103] Howland, S. W., Poh, C. M., Renia, L. (2015) Activated brain endothelial cells cross-  
34 present malaria antigen. *PLoS Pathog* 11, e1004963.
- 35 [104] Day, N. P., Hien, T. T., Schollaardt, T., Loc, P. P., Chuong, L. V., Chau, T. T., Mai, N. T.,  
36 Phu, N. H., Sinh, D. X., White, N. J., Ho, M. (1999) The prognostic and pathophysiologic  
37 role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis* 180, 1288–  
38 97.

- 1 [105] Plewes, K., Royackers, A. A., Hanson, J., Hasan, M. M., Alam, S., Ghose, A., Maude, R.  
2 J., Stassen, P. M., Charunwatthana, P., Lee, S. J., Turner, G. D., Dondorp, A. M., Schultz,  
3 M. J. (2014) Correlation of biomarkers for parasite burden and immune activation with  
4 acute kidney injury in severe falciparum malaria. *Malar J* 13, 91.
- 5 [106] Wichapoon, B., Punsawad, C., Chaisri, U., Viriyavejakul, P. (2014) Glomerular changes  
6 and alterations of zonula occludens-1 in the kidneys of *Plasmodium falciparum* malaria  
7 patients. *Malar J* 13, 176.
- 8 [107] Ward, P. A. and Kibukamusoke, J. W. (1969) Evidence for soluble immune complexes  
9 in the pathogenesis of the glomerulonephritis of quartan malaria. *Lancet* 1, 283–5.
- 10 [108] Houba, V., Allison, A. C., Adeniyi, A., Houba, J. E. (1971) Immunoglobulin classes and  
11 complement in biopsies of Nigerian children with the nephrotic syndrome. *Clin Exp*  
12 *Immunol* 8, 761–74.
- 13 [109] van der Heyde, H. C., Bauer, P., Sun, G., Chang, W. L., Yin, L., Fuseler, J., Granger, D.  
14 N. (2001) Assessing vascular permeability during experimental cerebral malaria by a  
15 radiolabeled monoclonal antibody technique. *Infect Immun* 69, 3460–5.
- 16 [110] Rui-Mei, L., Kara, A. U., Sinniah, R. (1998) In situ analysis of adhesion molecule  
17 expression in kidneys infected with murine malaria. *J Pathol* 185, 219–25.
- 18 [111] Sinniah, R., Rui-Mei, L., Kara, A. (1999) Up-regulation of cytokines in glomeruloneph-  
19 ritis associated with murine malaria infection. *Int J Exp Pathol* 80, 87–95.
- 20 [112] Abreu, T. P., Silva, L. S., Takiya, C. M., Souza, M. C., Henriques, M. G., Pinheiro, A. A.,  
21 Caruso-Neves, C. (2014) Mice rescued from severe malaria are protected against renal  
22 injury during a second kidney insult. *PLoS One* 9, e93634.
- 23 [113] Zumla, A., Rao, M., Wallis, R. S., Kaufmann, S. H., Rustomjee, R., Mwaba, P., Vilaplana,  
24 C., Yeboah-Manu, D., Chakaya, J., Ippolito, G., Azhar, E., Hoelscher, M., Maeurer, M.  
25 (2016) Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress,  
26 and future prospects. *Lancet Infect Dis* 16, e47–63.
- 27 [114] Yeo, T. W., Lampah, D. A., Gitawati, R., Tjitra, E., Kenangalem, E., McNeil, Y. R., Darcy,  
28 C. J., Granger, D. L., Weinberg, J. B., Lopansri, B. K., Price, R. N., Duffull, S. B., Cele-  
29 rmajer, D. S., Anstey, N. M. (2007) Impaired nitric oxide bioavailability and l-arginine  
30 reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *J Exp Med* 204,  
31 2693–704.
- 32 [115] Yeo, T. W., Lampah, D. A., Rooslamati, I., Gitawati, R., Tjitra, E., Kenangalem, E., Price,  
33 R. N., Duffull, S. B., Anstey, N. M. (2013) A randomized pilot study of l-arginine infusion  
34 in severe falciparum malaria: preliminary safety, efficacy and pharmacokinetics. *PLoS*  
35 *One* 8, e69587.
- 36 [116] Souza, M. C., Silva, J. D., Padua, T. A., Torres, N. D., Antunes, M. A., Xisto, D. G., Abreu,  
37 T. P., Capelozzi, V. L., Morales, M. M., Pinheiro, A. A., Caruso-Neves, C., Henriques,  
38 M. G., Rocco, P. R. (2015) Mesenchymal stromal cell therapy attenuated lung and kidney

- 1 injury but not brain damage in experimental cerebral malaria. *Stem Cell Res Ther* 6,  
2 102.
- 3 [117] Reis, P. A., Estado, V., da Silva, T. L., d'Avila, J. C., Siqueira, L. D., Assis, E. F., Bozza, P.  
4 T., Bozza, F. A., Tibirica, E. V., Zimmerman, G. A., Castro-Faria-Neto, H. C. (2012) Statins  
5 decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria.  
6 *PLoS Pathog* 8, e1003099.

**AUTHOR QUERIES**

AQ1	Please check that the addresses and affiliation links have been displayed correctly.
-----	--



RESEARCH

Open Access



# Mesenchymal stromal cell therapy attenuated lung and kidney injury but not brain damage in experimental cerebral malaria

Mariana C Souza<sup>1</sup>, Johnatas D Silva<sup>2</sup>, Tatiana A Pádua<sup>1</sup>, Natália D Torres<sup>1</sup>, Mariana A Antunes<sup>2</sup>, Debora G Xisto<sup>2</sup>, Thiago P Abreu<sup>3</sup>, Vera L Capelozzi<sup>4</sup>, Marcelo M Morales<sup>5</sup>, Ana A. Sá Pinheiro<sup>3</sup>, Celso Caruso-Neves<sup>3</sup>, Maria G Henriques<sup>1,6</sup> and Patricia RM Rocco<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Introduction:** Malaria is the most relevant parasitic disease worldwide, and still accounts for 1 million deaths each year. Since current antimalarial drugs are unable to prevent death in severe cases, new therapeutic strategies have been developed. Mesenchymal stromal cells (MSC) confer host resistance against malaria; however, thus far, no study has evaluated the therapeutic effects of MSC therapy on brain and distal organ damage in experimental cerebral malaria.

**Methods:** Forty C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with  $5 \times 10^6$  *Plasmodium berghei*-infected erythrocytes or saline. After 24 h, mice received saline or bone marrow (BM)-derived MSC ( $1 \times 10^5$ ) intravenously and were housed individually in metabolic cages. After 4 days, lung and kidney morphofunction; cerebrum, spleen, and liver histology; and markers associated with inflammation, fibrogenesis, and epithelial and endothelial cell damage in lung tissue were analyzed.

**Results:** In *P. berghei*-infected mice, BM-MSCs: 1) reduced parasitemia and mortality; 2) increased phagocytic neutrophil content in brain, even though BM-MSCs did not affect the inflammatory process; 3) decreased malaria pigment detection in spleen, liver, and kidney; 4) reduced hepatocyte derangement, with an increased number of Kupffer cells; 5) decreased kidney damage, without effecting significant changes in serum creatinine levels or urinary flow; and 6) reduced neutrophil infiltration, interstitial edema, number of myofibroblasts within interstitial tissue, and collagen deposition in lungs, resulting in decreased lung static elastance. These morphological and functional changes were not associated with changes in levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , keratinocyte-derived chemokine (KC, a mouse analog of interleukin-8), or interferon- $\gamma$ , which remained increased and similar to those of *P. berghei* animals treated with saline. BM-MSCs increased hepatocyte growth factor but decreased VEGF in the *P. berghei* group.

**Conclusions:** BM-MSC treatment increased survival and reduced parasitemia and malaria pigment accumulation in spleen, liver, kidney, and lung, but not in brain. The two main organs associated with worse prognosis in malaria, lung and kidney, sustained less histological damage after BM-MSC therapy, with a more pronounced improvement in lung function.

\* Correspondence: prmrocco@biof.ufrj.br

<sup>2</sup>Laboratory of Pulmonary Investigation, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Av Carlos Chagas Filho, 373 Bloco G, Cidade Universitária, CEP-21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Souza et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Introduction

Malaria is the most relevant parasitic disease worldwide. Despite efforts toward its eradication, malaria still accounts for 1 million deaths each year [1]. Cerebral malaria is characterized by multiple organ dysfunction triggered by circulating parasitized red blood cells (RBCs). Besides the brain, highly vascularized organs such as the lungs and kidneys are especially affected during cerebral malaria. In fact, of patients with cerebral malaria 20–30 % develop acute respiratory distress syndrome (ARDS) [2] and 40–50 % develop acute renal failure [3]. Disruption of the blood–brain barrier (BBB), sequestration of parasitized RBCs in the brain, lung, and kidneys, and a systemic inflammatory response, including production of cytokines and activation of inflammatory cells, have been consistently observed in both human and nonprimate models of cerebral malaria [4]. Recent studies report that current antimalarial drugs are insufficient to prevent death in severe cases of malaria; thus, adjunctive therapies aiming to modulate the systemic inflammatory response triggered by malaria have been proposed [5].

The beneficial effects of cell therapy have been demonstrated not only in infectious diseases [6–8] but also in parasitic diseases [9–12]. Mesenchymal stromal cells (MSCs) attenuated liver injury by diminishing the production of proinflammatory mediators in schistosomiasis [10] and decreased liver fibrosis induced by *Trypanosoma cruzi* infection [11]. Using a model of noncerebral malaria, Belyaev et al. [12] reported that treatment of mice infected with *Plasmodium chabaudi* (a *Plasmodium* species that does not induce cerebral malaria) with lymphoid-primed multipotent progenitor cells decreased parasitemia, probably by inducing a phagocytic active cell population. Accordingly, experimental cerebral malaria (ECM)-resistant mice treated with cells expressing stem cell antigen-1 exhibited decreased parasitemia and an increased survival rate when compared with non-treated mice [13]. However, no study has thus far evaluated the effects of mesenchymal stem cell therapy on brain, spleen, liver, kidney, and lung damage in ECM. In the present study, we hypothesized that bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) might reduce mortality in ECM by acting not only in the brain but also in other organs.

## Methods

This work was carried out in strict accordance with the recommendations of the US National Research Council *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. The study protocol was approved by the Committee on Ethical Use of Laboratory Animals of the Oswaldo Cruz Foundation (permit number LW52/12) and by the Research Ethics Committee of the Federal University of Rio de Janeiro

Health Sciences Center (CEUA-CCS-019). All animals received humane care in compliance with the “Principles of Laboratory Animal Care” formulated by the National Society for Medical Research.

## Extraction, isolation, and characterization of BM-MSCs

Bone marrow cells were obtained from femurs and tibias. After isolation,  $1 \times 10^7$  bone marrow-derived cells were cultured (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) in T25 culture flasks (TPP, Schaffhausen, Switzerland) with Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 15 mM HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA), 15 % inactivated fetal bovine serum (FBS; Invitrogen), 100 units/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin antibiotic solution (Gibco, Carlsbad, MO, USA) [14]. On day 3 of culture, the medium was changed and nonadherent cells were removed. Adherent cells reaching 80 % confluence were passaged with 0.05 % trypsin–Ethylenediaminetetraacetic acid solution (Gibco) and then maintained in DMEM with 10 % FBS (complete medium). At the third passage, approximately  $1 \times 10^6$  cells were characterized as BM-MSCs according to the International Society of Cellular Therapy Consensus, i.e., adherent to plastic under standard conditions, expressing some surface markers (CD73, CD90, and CD105) and lacking expression of others (CD34, CD45, CD11b, and CD19), and demonstrating capacity to differentiate into mesenchymal lineages under *in vitro* conditions [15]. Flow cytometry was performed with antibodies against CD45 (leukocytes), CD34 (hematopoietic precursors), CD29 and CD45 (nonhematopoietic precursors), and Sca-1 (stem/progenitor cells) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The absence of CD34 and CD45 and the presence of CD29 and Sca-1 were used to identify MSCs [16]. To measure the small-angle forward scatter (FSC) intensity (~0–5°) and the limited-angle side scatter (SSC) intensity (~85–95°), a photodiode and a photomultiplier tube were used respectively. Additionally, the potential of MSCs to differentiate into mesenchymal lineages including osteoblasts and chondroblasts under *in vitro* conditions was evaluated. Osteogenic differentiation was induced by culturing MSCs for up to 3 weeks in DMEM 10 % FBS and 15 mM HEPES (Sigma), supplemented with  $10^{-8}$  M/dexamethasone (Sigma), 5 µg/ml ascorbic acid 2-phosphate (Sigma), and 10 mM/l β-glycerolphosphate (Sigma). To observe calcium deposition, cultures were stained with Alizarin Red S (Nuclear, São Paulo, SP, Brazil). To induce chondrogenic differentiation, MSCs were cultured in DMEM supplemented with 10 ng/ml transforming growth factor (TGF)-β1 (Sigma), 50 nM ascorbic acid 2-phosphate (Sigma), and 6.25 mg/ml insulin for 3 weeks. To confirm differentiation, cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 hour at room temperature and stained with Alcian Blue pH 2.5.

### Animal preparation and experimental protocols

A total of 92 C57BL/6 male mice (6–7 weeks old) were used. In 72 mice, the lung mechanics, renal function, and brain, spleen, liver, kidney, and lung histology were analyzed, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed in lung tissue. All experimental conditions were repeated in triplicate ( $n = 6/\text{group}$ ). The remaining 20 mice were used to evaluate the survival rate. Mice were provided by the Oswaldo Cruz Foundation breeding unit (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and kept in cages in a room at the Farmanguinhos experimental facility, with free access to food and fresh water, temperature ranging from 22 to 24 °C, and a standard 12-hour light/dark cycle, until experimental use. All animals were randomly assigned to two groups: uninfected or *Plasmodium berghei*-infected. *P. berghei* ANKA GFPcon 259 c12 was kindly provided by Dr. L. Carvalho (Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and is a donation from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center—MR4 (Manassas, VA, USA; deposited by C.J. Janse and A.P. Waters; MR4 number: MRA-865). Mice were infected by injection intraperitoneally (i.p.) of *P. berghei*-infected RBCs withdrawn from a previously infected mouse ( $5 \times 10^6$  infected RBCs diluted in 200  $\mu\text{l}$  sterile saline solution). Uninfected mice received saline alone (200  $\mu\text{l}$ , i.p.). Twenty-four hours after infection, the uninfected and *P. berghei* groups were further randomized into subgroups to receive saline (0.05 ml) or BM-MSC ( $1 \times 10^5$  in 0.05 ml saline) intravenously into the internal jugular vein. Five days after infection, surviving mice were euthanized by injection i.p. of a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) followed by pentobarbital sodium (150 mg/kg). Five days after infection, a thick blood smear was performed for determination of parasitemia by rapid panoptic staining (Laborclin, Paraná, Brazil).

To calculate the survival rate, lethality in the treated ( $n = 10$ ) and untreated ( $n = 10$ ) subgroups of *P. berghei*-infected mice was recorded daily until day 20 post infection.

### Immunofluorescent staining and flow cytometric analysis

Splenocytes from C57BL/6 mice were isolated by Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA). One hour after treatment, cells were washed and then incubated in PBS plus 10 % FBS and 0.1 % sodium azide (PBS-S; Sigma-Aldrich) and blocked with Fc $\gamma$ IIR monoclonal antibodies (mAbs; 1:100, CD16/CD32; BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) for 30 minutes at 4 °C. After blocking, cells were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mAb anti-mouse CD11b antibodies diluted in PBS-S and incubated for another 30 minutes at 4 °C. Cells were then washed and resuspended in PBS/0.1 % sodium azide for data acquisition in an Accuri flow cytometer (BD

Biosciences). FSC and SSC were set to exclude dead cells, and at least  $10^4$  lymphocytes were analyzed per sample. Control staining to determine the positive population was performed based on an irrelevant IgG isotype labeled with FITC. Once determined, the gate was rigorously maintained for all analyses. Data analysis was performed using FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

### Measurement of renal and lung function

Immediately after treatment with BM-MSCs, mice were allocated individually to metabolic cages and kept in a temperature-controlled room under a 12-hour light/dark cycle, with free access to food and water. After 24 hours of adaptation, 24-hour urine samples were collected from the different experimental groups 1 day before euthanasia, which was performed on postinfection day 5. Urine samples were clarified by centrifugation at  $600 \times g$  for 5 minutes and the supernatant was separated and stored at  $-20$  °C until use. Urine samples were assayed colorimetrically to determine total protein levels, using specific commercially available kits (Gold Analisa kit 498 M; Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil) in accordance with the manufacturer's instructions. On postinfection day 5, the animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg body weight) and xylazine (5 mg/kg body weight), tracheotomized, paralyzed (vecuronium bromide, 0.005 mg/kg intravenously), and ventilated with a constant flow ventilator (Samay VR15; Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay) set to the following parameters: rate 100 breaths/minute, tidal volume ( $V_T$ ) 0.2 ml, and fraction of inspired oxygen ( $\text{FiO}_2$ ) 0.21. The anterior chest wall was surgically removed and a positive end-expiratory pressure of 2  $\text{cmH}_2\text{O}$  was applied. Airflow and tracheal pressure ( $P_{tr}$ ) were measured. Lung mechanics were analyzed by the end-inflation occlusion method. In an open chest preparation,  $P_{tr}$  reflects transpulmonary pressure ( $P_L$ ). Static lung elastance ( $\text{Est}_L$ ) was determined by dividing the elastic recoil pressure ( $P_{el}$ ) by  $V_T$ . Lung mechanics parameters were measured ten times in each animal. All data were analyzed using ANADAT software (RHT-InfoData, Inc., Montreal, QC, Canada). All experiments lasted less than 15 minutes. Blood samples were then collected via cardiac puncture into heparinized tubes and centrifuged at  $600 \times g$  for 5 minutes to separate plasma. Urine and blood samples were assayed to determine the levels of creatinine (Gold Analisa kit 427E; Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil) and blood urea nitrogen (BUN; Gold Analisa kit 335; Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brazil). The glomerular filtration rate (GFR) was derived from the creatinine clearance.

Prior to removal of the brain, liver, kidney, spleen, and lungs, a laparotomy was performed, heparin injected intravenously, the trachea clamped at end expiration, and the abdominal aorta and vena cava sectioned to kill the animals by exsanguination.



### Brain, spleen, liver, kidney, and lung histology

The brain, liver, kidney, spleen, and lungs were fixed in 4 % buffered formaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 4- $\mu$ m-thick slices, which were stained with hematoxylin and eosin (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil). A five-point, semiquantitative, severity-based scoring system was used to assess the degree of injury as follows: 0 = normal tissue; 1 = damage to 1–25 % of total tissue examined; 2 = damage to 26–50 % of total tissue examined; 3 = damage to 51–75 % of total tissue examined; and 4 = damage to 76–100 % of total tissue examined. The following parameters were analyzed: presence of malaria pigment, inflammation, fibrosis, and histoarchitectural damage. Lung histology was also examined using an integrating eyepiece with a coherent system consisting of a grid with 100 points and 50 lines of known length coupled to a conventional light microscope (Olympus BX51; Olympus Latin America Inc., São Paulo, SP, Brazil). The number of mononuclear and polymorphonuclear cells in pulmonary tissue was determined by the point-counting technique [17] across ten random, noncoincident microscopic fields [18]. These analyses were performed by an expert in lung pathology blinded to the experimental protocol.

### ELISA in lung tissue

Levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)-1, hepatocyte growth factor (HGF), TGF- $\beta$ , and vascular endothelial growth factor (VEGF) were quantified in lung tissue. Briefly, the lungs were excised and homogenized in cell lysis buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 % Triton X-100, protease inhibitor cocktail (1:1000); Sigma-Aldrich), and immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The total protein content of each tissue homogenate was evaluated by the Bradford method, followed by determination of

cytokine production by a standard sandwich ELISA, performed in accordance with manufacturer instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Plates were read at 490 nm in an M5 Spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### Statistical analysis

Survival analysis was performed using the Kaplan–Meier method and the log-rank (Mantel–Cox) test. Comparison between groups was performed using two-way analysis of variance followed by Tukey's test. Parametric data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), and nonparametric data were expressed as median and interquartile range. All tests were performed using PASW Statistics for Windows, Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical significance was established as  $p < 0.05$ .

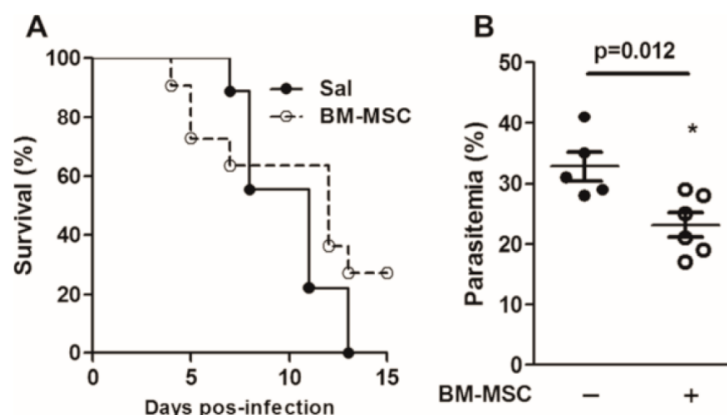
## Results

### BM-MSC treatment increased survival rate in *P. berghei*-infected mice

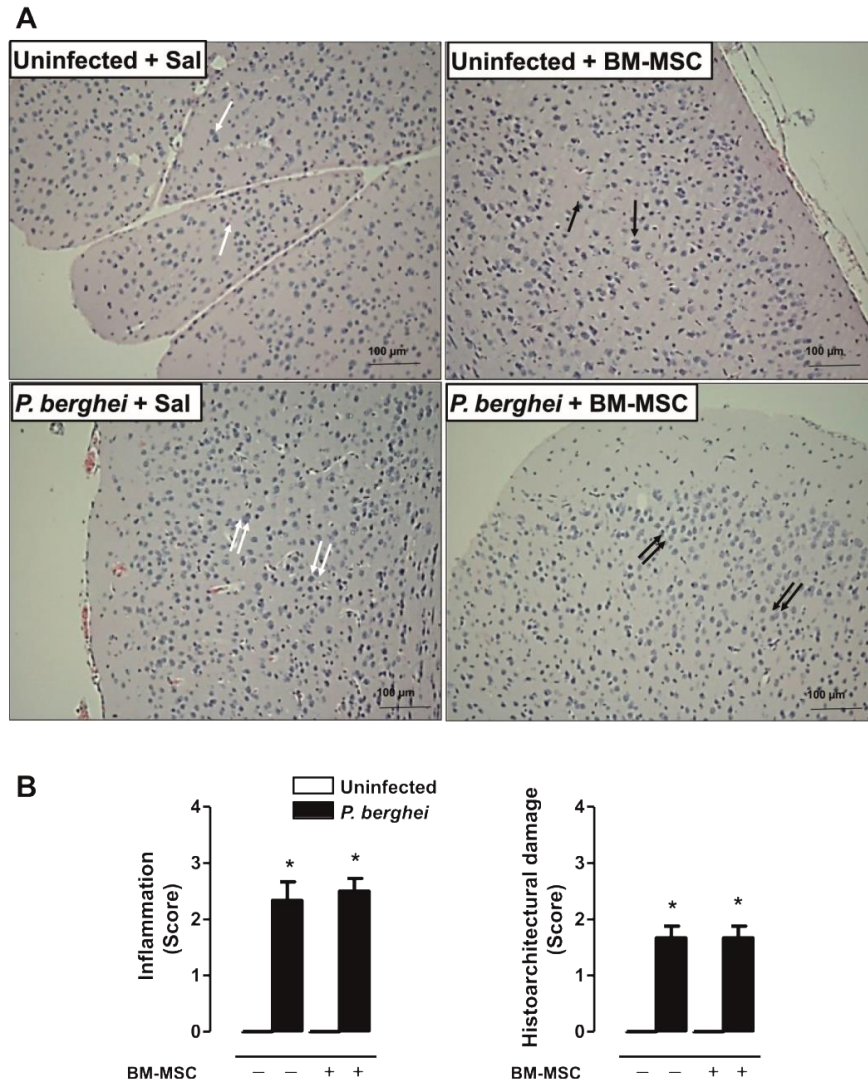
All untreated *P. berghei*-infected mice succumb to infection within 12 days. Even though BM-MSC therapy appeared to increase the mortality rate at early time points, evaluation of the full time course allows for the conclusion that BM-MSC therapy increased survival as compared with non-treatment of *P. berghei*-infected mice (Fig. 1a). At day 5 after infection, parasitemia was analyzed, and treatment with BM-MSCs was found to have decreased parasitemia levels (Fig. 1b).

### Cerebral damage observed during ECM was not modulated by BM-MSC administration

Photomicrographs of brain tissue (Fig. 2a) from uninfected and *P. berghei*-infected mice treated or not with BM-MSC were obtained on postinfection day 5. Brains collected from



**Fig. 1** Survival rate and parasitemia of *P. berghei*-infected mice. Mice were infected with  $5 \times 10^6$  parasitized RBCs or mock-infected with saline and, 24 hours after infection, were treated with BM-MSCs. **a** Survival of mice infected with *P. berghei*. **b** Parasitemia was analyzed 5 days after infection using light microscopy. Values are expressed as means  $\pm$  SD of six animals per group out of three experiments. BM-MSC bone marrow-derived mesenchymal stromal cell, Sal saline



**Fig. 2 a** Photomicrographs of brain tissue stained with hematoxylin and eosin. Original magnification  $\times 1000$ ; bars = 100  $\mu\text{m}$ . Mice were inoculated with  $5 \times 10^6$  parasitized RBCs or saline and treated with BM-MSCs. Brains were excised 5 days after infection. Normal brain cortex with neurons, astrocytes, and oligodendrocytes (single white arrows). Treatment with BM-MSCs did not affect the brain cortex, which displays normal neurons, astrocytes, and oligodendrocytes (black single arrows). In *P. berghei*-infected mice treated with saline, neurons were damaged, with an increased number of astrocytes and oligodendrocytes (double white arrows). In *P. berghei*-infected mice treated with BM-MSCs, brain damage was repaired, with an increased number of astrocytes and oligodendrocytes within neutrophils (double black arrows). **b** A semiquantitative, severity-based score was used to measure inflammation and histoarchitectural damage in brains of mice infected with *P. berghei* or mock-infected with saline. Twenty-four hours after infection, mice were treated with BM-MSCs. Values are expressed as median (interquartile range) of six animals in each group. \*Significantly different from uninfected group ( $p < 0.05$ ). BM-MSC bone marrow-derived mesenchymal stromal cell, Sal saline

both groups of uninfected mice (treated or not with BM-MSCs) exhibited similar histological patterns, characterized by normal brain cortex with neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. In brains from *P. berghei*-infected mice we observed neuron damage associated with an increased number of astrocytes and oligodendrocytes. In brains from BM-MSC-treated *P. berghei*-infected mice there was a further increase in the number of astrocytes and oligodendrocytes, suggesting tissue repair. Semiquantitative analysis of

brain damage revealed no significant differences in tissue inflammation or degree of histoarchitectural damage between the treated and nontreated *P. berghei*-infected groups (Fig. 2b). Neither malaria pigment nor fibrosis was detected in brain tissue of animals from either of the studied groups.

**BM-MSC treatment increased clearance of parasitized RBCs**  
Spleens from *P. berghei*-infected mice showed evidence of tissue damage, with activation of lymphocytes in white

pulp and increased deposition of malaria pigment in red pulp (Fig. 3b). BM-MSC administration did not affect spleen histology in uninfected mice (Fig. 3a, b); however, administration of BM-MSCs reduced levels of malaria pigment and increased the CD11b<sup>+</sup> cell count in spleens of *P. berghei*-infected mice (Fig. 3c).

#### **BM-MSC treatment increased the number of Kupffer cells in liver**

Administration of BM-MSCs to uninfected mice did not alter the liver architecture (Fig. 4a). In *P. berghei*-infected mice, we observed hepatocyte derangement, increased deposition of malaria pigment, and an increased number of Kupffer cells (Fig. 4b). After BM-MSC therapy, there was an increase in the number of regenerated hepatocytes and Kupffer cells (phagocytic cells) (Fig. 4a).

#### **BM-MSC treatment mitigated the histopathological features of *P. berghei*-induced kidney injury, but did not improve renal function**

Administration of BM-MSCs to uninfected mice did not affect the normal kidney architecture (Fig. 5a, b). *P. berghei* infection induced mesangial proliferation in the glomeruli accompanied by increased deposition of malaria pigment (Fig. 5a, b). *P. berghei*-infected mice treated with BM-MSCs exhibited restoration of mesangial cell architecture and tubular cells, as well as decreased deposition of malaria pigment (Fig. 5b).

Concerning renal function, *P. berghei*-infected mice exhibited a 50 % reduction in urinary flow (Fig. 6a), while there was a threefold increase in serum creatinine (Fig. 6b) and BUN (Fig. 6c) as compared with the uninfected group. The alterations in urinary flow and serum creatinine were reflected by a sixfold decrease in creatinine clearance (Fig. 6d). No changes in the BUN/serum creatinine ratio or in urinary creatinine levels were observed in the infected group (Fig. 6e and f, respectively). BM-MSC treatment in infected mice did not change any of these parameters. Interestingly, uninfected mice that received BM-MSCs had increased serum creatinine and a significant reduction in urinary creatinine. The baseline creatinine clearance of uninfected mice was therefore reduced by BM-MSC treatment. The enhancement in serum creatinine levels observed in uninfected mice treated with BM-MSCs led to a decrease in the BUN/serum creatinine ratio. Furthermore, we observed that the increased urinary protein/creatinine ratio (UPCr) induced by *P. berghei* was significantly lower after BM-MSC treatment (Fig. 6g).

#### **BM-MSC improved lung mechanics and reduced lung inflammation in *P. berghei*-infected mice**

*P. berghei*-infected mice also exhibited lung damage, as characterized by structural derangements, thickening of

the alveolar–capillary membrane, increased mononuclear cell and fibroblast counts, and malaria pigment deposition (Fig. 7a, b). After BM-MSC administration, reductions were observed in the thickness of the alveolar–capillary barrier, the number of myofibroblasts within interstitial tissue, collagen deposition (Fig. 7a), and neutrophil counts (Fig. 8b); however, there was an increase in the number of mononuclear cells (Fig. 8a).

Static lung elastance (Est,L) was increased in *P. berghei*-infected mice when compared with uninfected mice (Fig. 8c). BM-MSC administration reduced Est,L in *P. berghei*-infected mice.

*P. berghei*-infected mice exhibited increased levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CXCL-1/KC, and VEGF and reduced levels of TGF- $\beta$ 1 in lung tissue as compared with uninfected animals. No significant differences in HGF levels were observed between the *P. berghei*-infected and uninfected groups. BM-MSC administration increased TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, and HGF levels and reduced VEGF levels, but did not modulate the production of IFN- $\gamma$  or CXCL-1/KC in *P. berghei*-infected mice (Fig. 9).

## **Discussion**

In the model of ECM employed in this study, the reduction in mortality rate observed after BM-MSC therapy was not associated with a reduction in brain damage. Even though histological evidence of lung, liver, kidney, and spleen injury was reduced, only lung function improved after therapy. These morphological and functional changes were not associated with a reduction in proinflammatory mediators, but rather with decreased peripheral parasitemia.

The use of BM-MSCs in diseases characterized by brain dysfunction has been extensively described. Authors have reported that BM-MSCs exert a beneficial effect in a paracrine fashion, by enhancing synaptic transmission and ameliorating microglial signaling [19–21]. In addition, the use of BM-MSCs as a therapeutic approach that targets host defenses has been proposed in bacterial diseases, including tuberculosis [22] and parasitic diseases [10, 11]. It is interesting to note that the parasitic conditions in which BM-MSC therapy has been studied are characterized by involvement of specific organs, such as the liver and heart, which reinforces the need for studies of parasitosis that feature multiple organ dysfunction, such as malaria. Indeed, previous studies concerning cell therapy during malaria infection have already been performed [12, 13, 23]. However, our study was the first designed to evaluate the effects of BM-MSC therapy in multiple organ dysfunction during ECM.

Accordingly, for the present study we used a model of ECM known to be associated with multiple organ dysfunction [24]. Mice succumb to ECM between 5 and 10



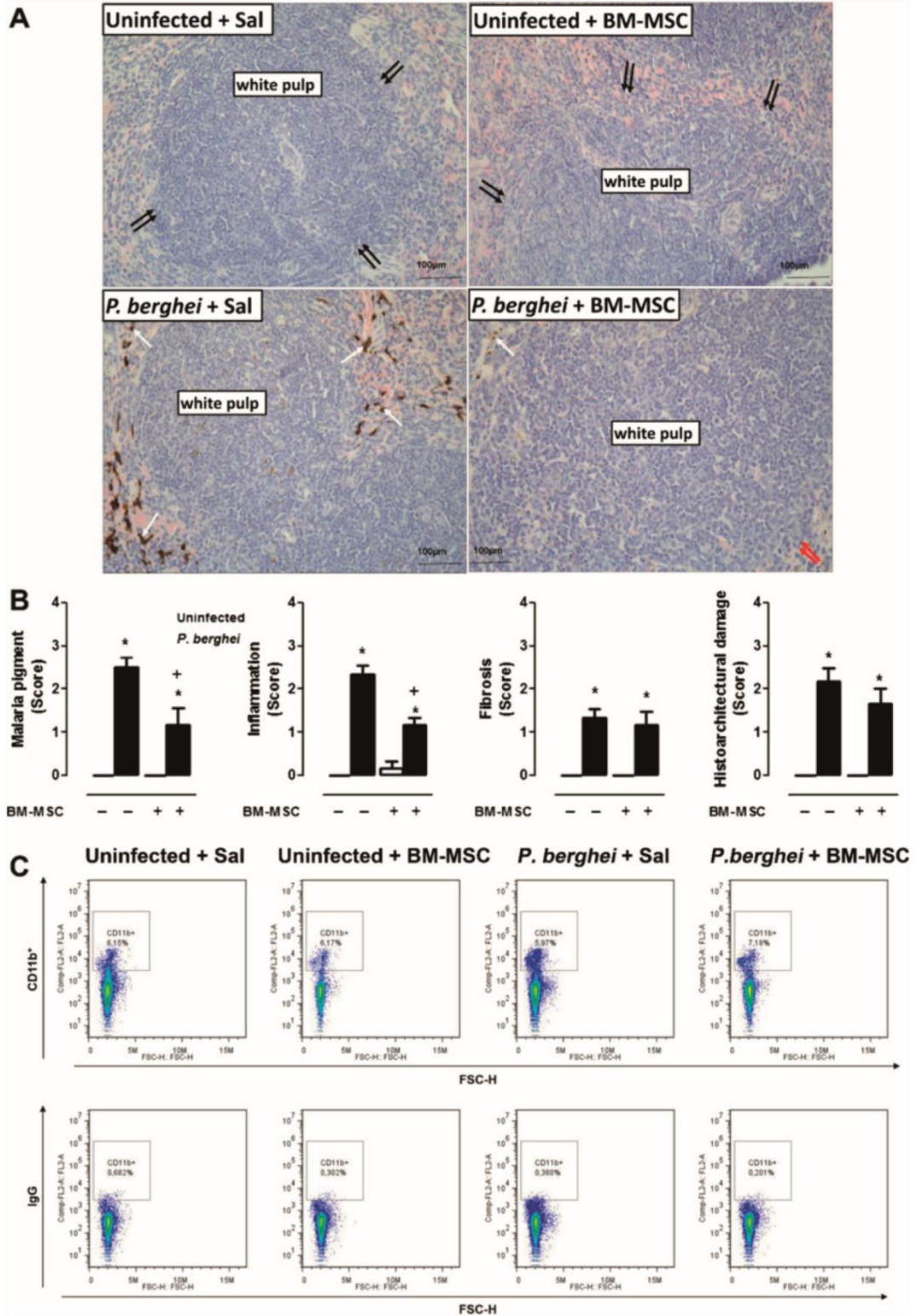
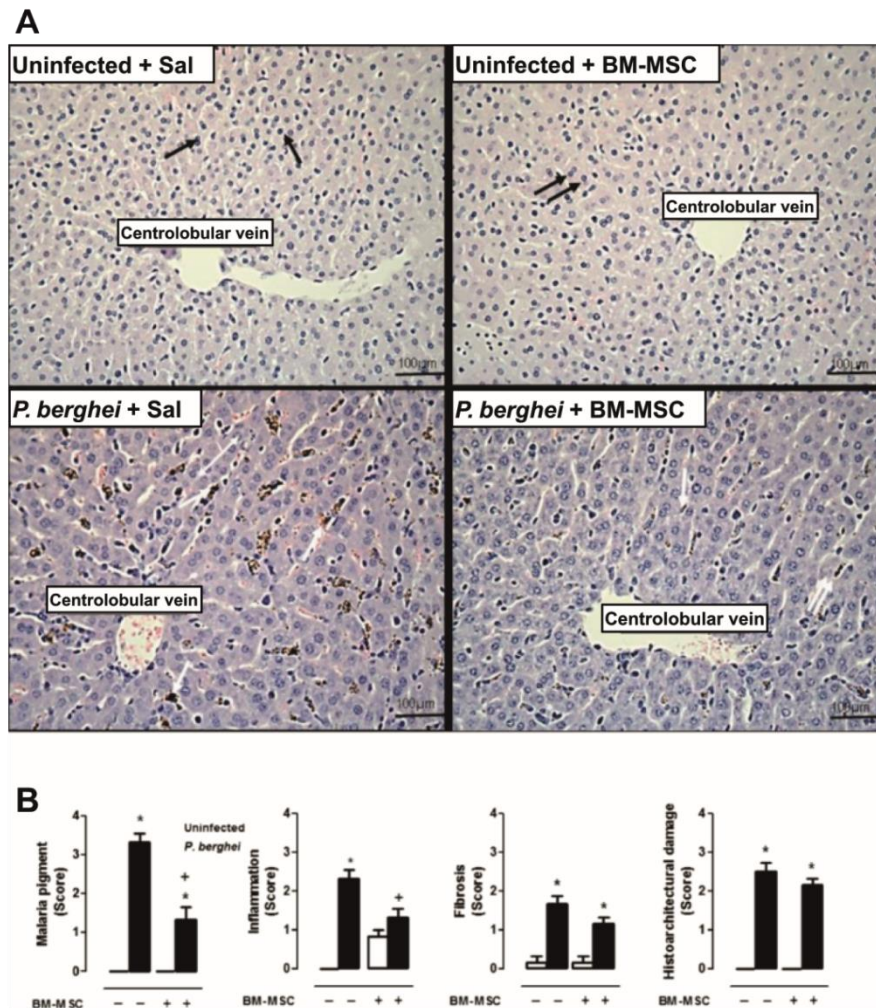


Fig. 3 (See legend on next page.)

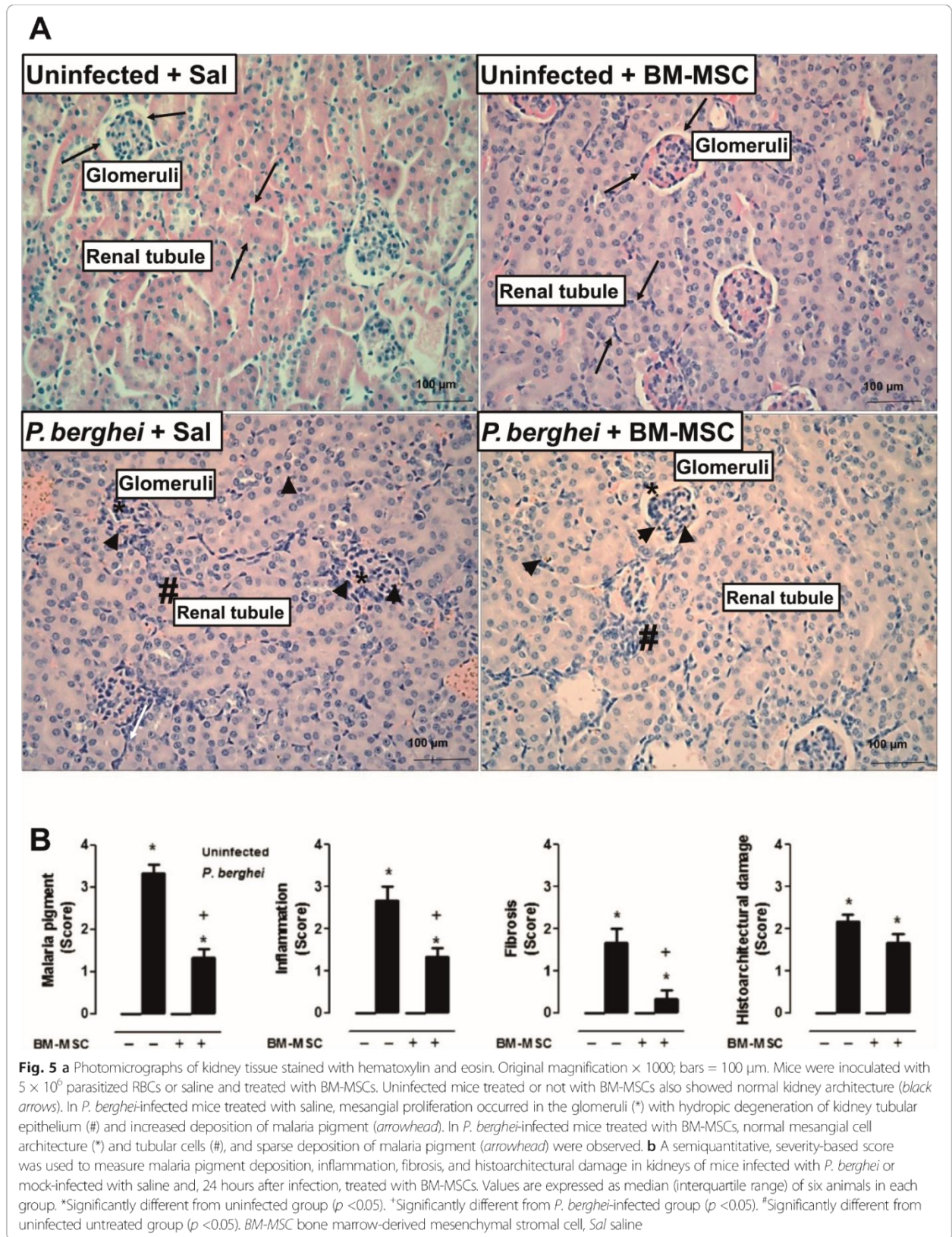
(See figure on previous page.)

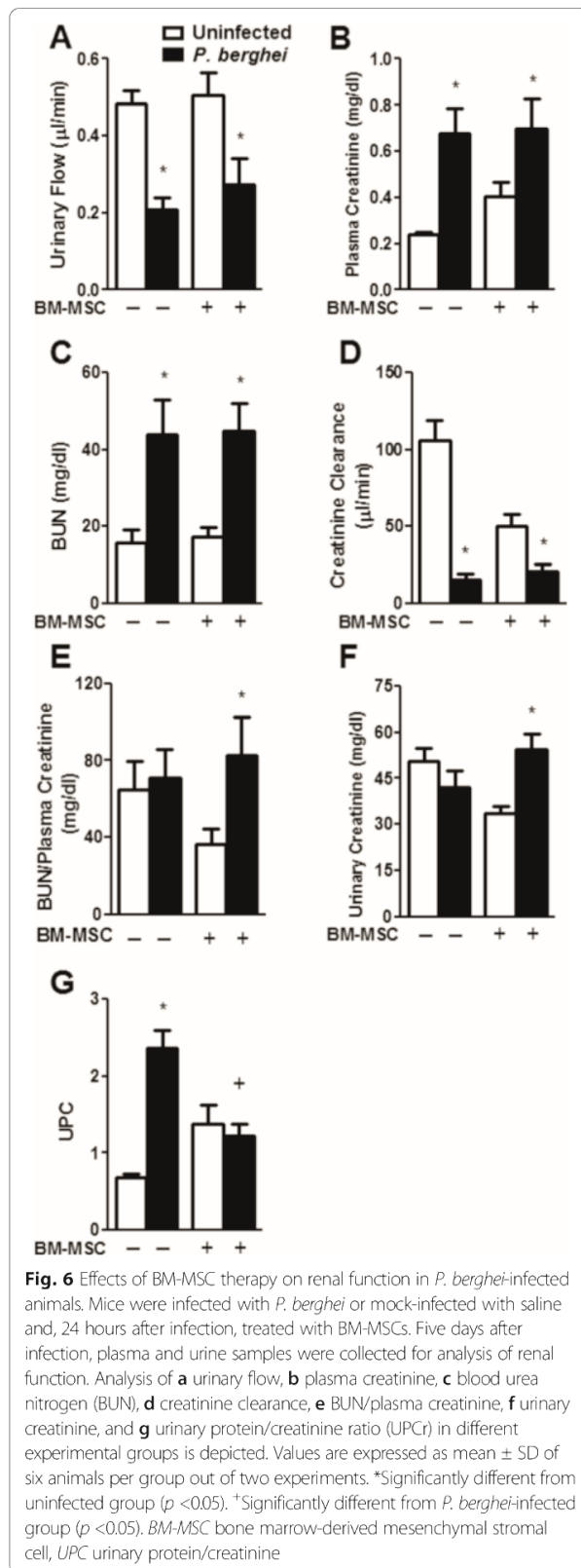
**Fig. 3 a** Photomicrographs of spleen tissue stained with hematoxylin and eosin. Original magnification  $\times 1000$ ; bars = 100  $\mu\text{m}$ . Mice were inoculated with  $5 \times 10^6$  parasitized RBCs or saline and treated with BM-MSCs. Splens were excised 5 days after infection. Normal spleen architecture with white pulp (double black arrows). Uninfected mice treated with BM-MSCs also displayed normal spleen architecture (double black arrows). In *P. berghei*-infected mice, spleen damage was observed with activation of lymphocytes in white pulp, increased deposition of malaria pigment in red pulp (single white arrows), and increased number of lymphoblasts and lymphocytes in white pulp (red double arrows). **b** A semiquantitative, severity-based score was used to measure malaria pigment deposition, inflammation, fibrosis, and histoarchitectural damage in spleens of mice infected with *P. berghei* or mock-infected with saline and, 24 hours after infection, treated with BM-MSCs. Values are expressed as median (interquartile range) of six animals in each group. \*Significantly different from uninfected group ( $p < 0.05$ ). †Significantly different from *P. berghei*-infected group ( $p < 0.05$ ). **c** Representative dot-plots demonstrating CD11b<sup>+</sup> fluorescence in splenocytes. BM-MSC bone marrow-derived mesenchymal stromal cell, FSC forward scatter, Sal saline



**Fig. 4 a** Photomicrographs of liver tissue stained with hematoxylin and eosin. Original magnification  $\times 1000$ ; bars = 100  $\mu\text{m}$ . Mice were inoculated with  $5 \times 10^6$  parasitized RBCs or saline and treated with BM-MSCs. Livers were excised 5 days after infection. Note the intact hepatocytes (single black arrows) involving the centrolobular vein. Administration of BM-MSCs did not alter the liver architecture (double black arrows) or centrolobular vein in control mice. *P. berghei*-infected, saline-treated mice exhibited hepatocyte derangement (double white arrowhead), increased deposition of malaria pigment, and an increased number of Kupffer cells (single white arrows). BM-MSC therapy increased the number of regenerated hepatocytes and Kupffer cells (double white arrows). **b** A semiquantitative, severity-based score was used to measure malaria pigment deposition, inflammation, fibrosis, and histoarchitectural damage in livers of mice infected with *P. berghei* or mock-infected with saline and, 24 hours after infection, treated with BM-MSCs. Values are expressed as median (interquartile range) of six animals in each group. \*Significantly different from uninfected group ( $p < 0.05$ ). †Significantly different from *P. berghei*-infected group ( $p < 0.05$ ). BM-MSC bone marrow-derived mesenchymal stromal cell, Sal saline





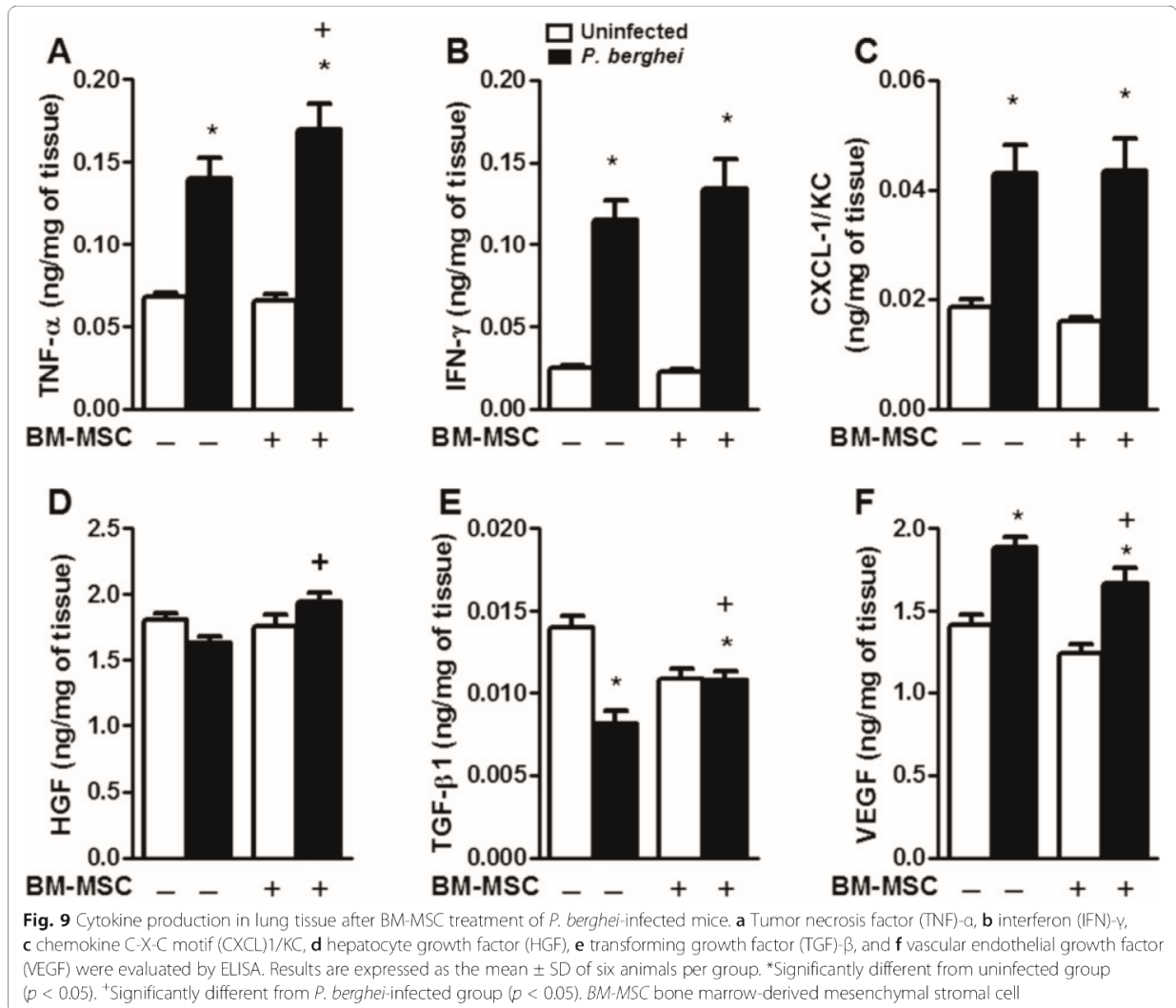


days post infection. Animals that survive longer than 7 days are considered resistant, and die from pathological conditions not related to ECM [4]. BM-MSCs were therefore administered 24 hours after *P. berghei* infection, when the inflammatory process in different organs was already present and intense. If treatment was started late in the course of malaria, when the mortality rate is high, this would have hampered interpretation of results. Mice were euthanized 5 days post infection because, at this time point, several pathological conditions were already present [25] but the mice were still alive; this approach prevented misinterpretation of results due to the presence of resistant animals.

Histologically, brains from mice with ECM exhibit cortical edema, congested capillaries, increased numbers of microglial cells, and glial cell swelling [26–28]. In addition, Nacer et al. [29] proposed recently that intracranial hypertension plays a crucial role in ECM development. The authors suggest that intracranial hypertension could be promoted by the presence of late-stage infected erythrocytes, i.e., schizonts, in postcapillary venules. Interestingly, the reduction in parasitemia shown in Fig. 1 was mainly due to reduction of early-stage (i.e., ring) forms, but not schizonts, which may explain why BM-MSC treatment did not improve brain tissue damage despite increasing the survival rate in *P. berghei*-infected mice. On the other hand, the number of astrocytes and oligodendrocytes was further increased, which suggests tissue repair [30]. Glial cells have been described as undergoing apoptosis during ECM [31]; nevertheless, the outcome of ECM does not depend on the attenuation of glial cell dysfunction [32, 33], suggesting that this process is not involved in ECM development. Furthermore, glial cells increase neutrophil survival and phagocytosis, which could provide protection against brain infection [34]. Since cell-based therapy decreases parasite load in noncerebral malaria models [12, 13], we hypothesized that BM-MSC administration would stimulate phagocytosis and promote parasite clearance, which has been extensively described in the literature as occurring in the spleen [35, 36]. The spleen is well characterized as a hematopoietic site during experimental malaria [37]; the increased numbers of constitutive hematopoietic stem progenitor cells observed in the spleen during *P. berghei* infection impair parasitemia exacerbation and increase mouse survival [23]. This fact corroborates the hypothesis that treatment with BM-MSCs promotes parasite clearance and increases survival of infected mice. In the present study, we observed a reduction in the levels of malaria pigment in the spleen after BM-MSC therapy, providing further evidence for the aforementioned improvement in parasite clearance.

In our experiment, C57Bl/6 mice infected with *P. berghei* developed not only ECM but also kidney injury, which was characterized by reduced urinary flow and creatinine clearance [38]. This renal function impairment has been





thus, our findings cannot be extrapolated to other models of malaria associated with different degrees of severity or to human malaria. Second, BM-MSCs were administered 1 day after infection, when the severity of ECM was reduced compared with day 5 [25]. However, if treatment had been started late in the course of malaria, the mortality rate would be high, hampering interpretation of the results. Additionally, as noted above, mice that survive longer than 7 days are considered resistant and die of pathological conditions not related to cerebral malaria [4]. Third, the observation time was relatively short (5 days post infection), precluding evaluation of the dynamics of malaria-induced multiple organ dysfunction. However, several organs were already damaged at day 5—including the brain, as demonstrated by impaired behavior and cognition. Fourth, no specific antimalarial therapy was given with BM-MSCs because this study was designed as a proof of concept rather than an evaluation of optimal therapy.

Fifth, BM-MSCs were not tracked within the organs because markers used for this purpose are usually present for up to 24 hours and our analysis was carried out on day 5, when many organs had already been affected by *P. berghei* infection.

### Conclusions

BM-MSC treatment increased survival and reduced parasitemia and malaria pigment deposition in the spleen, liver, kidney, and lung, but not in the brain. The two main organs associated with worse prognosis in malaria—the lung and the kidney—sustained less histological damage after BM-MSC therapy, with a more pronounced improvement in lung function.

### Abbreviations

ARDS: Acute respiratory distress syndrome; BBB: Blood-brain barrier; BM-MSC: Bone marrow mesenchymal stromal cell; BUN: Blood urea nitrogen; CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's

medium; ECM: Experimental cerebral malaria; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; Est.L: Static lung elastance; FBS: Fetal bovine serum; FiO<sub>2</sub>: Fraction of inspired oxygen; FITC: Fluorescein isothiocyanate; FSC: Forward scatter; GFR: Glomerular filtration rate; HGF: Hepatocyte growth factor; IFN: Interferon; i.p.: Intraperitoneally; mAb: Monoclonal antibody; MSC: Mesenchymal stromal cell; PBS: Phosphate-buffered saline; Pel: Elastic recoil pressure; P<sub>L</sub>: Transpulmonary pressure; Ptr: Tracheal pressure; RBC: Red blood cell; SD: Standard deviation; SSC: Side scatter; TGF: transforming growth factor; TNF: Tumor necrosis factor; UPCr: Urinary protein/creatinine ratio; VEGF: Vascular endothelial growth factor; V<sub>T</sub>: Tidal volume.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

MCS and JDS designed and performed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. TAP, NDT, MAA, DGX, TPA and VLC performed experiments and analyzed the data. MMM, AASP, CC-N, and MGH designed and supervised experiments. PRMR conceived the study, designed and supervised experiments, and assisted in drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Mr. Andre Benedito da Silva for animal care, Mrs. Ana Lucia Neves da Silva for her help with microscopy, and Mrs. Moira Elizabeth Schottler and Mr. Filipe Vasconcellos for their assistance in editing the article.

This work was supported by the Centers of Excellence Program (PRONEX-FAPERJ, to MMM and PRMR), the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq, to DGX, MMM, MGH, and PRMR), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, to JDS, MMM, and PRMR), the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ, to MCS, MMM, AASP, CC-N, MGH, and PRMR), INCT-INOVAR (to PRMR), and through Coordination Theme 1 (Health) of the European Community's 7th Framework Programme for Research (FP7) under grant agreement number HEALTH-F4-2011-282095 (TARKINAID, to PRMR) and Fundação Oswaldo Cruz (to MCS, TAP, NDT, and MGH).

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Av Brasil, 4365, Manguinhos, CEP-21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of Pulmonary Investigation, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Av Carlos Chagas Filho, 373 Bloco G, Cidade Universitária, CEP-21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>3</sup>Laboratory of Biochemistry and Cellular Signaling, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Av Carlos Chagas Filho, 373 Bloco G, Cidade Universitária, CEP-21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>4</sup>Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, Cerqueira César, CEP-01246903 São Paulo, SP, Brazil. <sup>5</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Av Carlos Chagas Filho, 373 Bloco G, Cidade Universitária, CEP-21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. <sup>6</sup>National Institute for Science and Technology on Innovation on Neglected Diseases (INCT/IDN), Center for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Av Brasil, 4365, Manguinhos, CEP-21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Received: 26 January 2015 Revised: 1 April 2015

Accepted: 11 May 2015 Published online: 22 May 2015

#### References

- Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2012;379:413–31.
- Mohan A, Sharma SK, Bollineni S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis*. 2008;45:179–93.
- Abdul Manan J, Ali H, Lal M. Acute renal failure associated with malaria. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2006;18:47–52.
- de Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*. 2010;137:755–72.
- Miller LH, Ackerman HC, Su XZ, Wellemes TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*. 2013;19:156–67.
- Ornellas DS, Maron-Gutierrez T, Ornellas FM, Cruz FF, Oliveira GP, Lucas IH, et al. Early and late effects of bone marrow-derived mononuclear cell therapy on lung and distal organs in experimental sepsis. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;178:304–14.
- Maron-Gutierrez T, Silva JD, Cruz FF, Alegria S, Xisto DG, Assis EF, et al. Insult-dependent effect of bone marrow cell therapy on inflammatory response in a murine model of extrapulmonary acute respiratory distress syndrome. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4:123.
- Walter J, Ware LB, Matthay MA. Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis. *Lancet Respir Med*. 2014;2:1016–26.
- Zhang Y, Mi JY, Rui YJ, Xu YL, Wang W. Stem cell therapy for the treatment of parasitic infections: is it far away? *Parasitol Res*. 2014;113:607–12.
- Xu H, Qian H, Zhu W, Zhang X, Yan Y, Mao F, et al. Mesenchymal stem cells relieve fibrosis of *Schistosoma japonicum*-induced mouse liver injury. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237:585–92.
- Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, de Carvalho AC, et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol*. 2004;164:441–7.
- Belyaev NN, Brown DE, Diaz AI, Rae A, Jarra W, Thompson J, et al. Induction of an IL-7-R(+)-c-Kit(hi) myeloid progenitor critically dependent on IFN-gamma signaling during acute malaria. *Nat Immunol*. 2010;11:477–85.
- Thakur RS, Tousif S, Awasthi V, Sanyal A, Atul PK, Punia P, et al. Mesenchymal stem cells play an important role in host protective immune responses against malaria by modulating regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2013;43:2070–7.
- Antunes MA, Abreu SC, Cruz FF, Teixeira AC, Lopes-Pacheco M, Bandeira E, et al. Effects of different mesenchymal stromal cell sources and delivery routes in experimental emphysema. *Respir Res*. 2014;15:118.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7.
- Nora CC, Camassola M, Bellagamba B, Ikuta N, Christoff AP, Meirelles Lda S, et al. Molecular analysis of the differentiation potential of murine mesenchymal stem cells from tissues of endodermal or mesodermal origin. *Stem Cells Dev*. 2012;21:1761–8.
- Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:394–418.
- Abreu SC, Antunes MA, Mendonca L, Branco VC, de Melo EB, Olsen PC, et al. Effects of bone marrow mononuclear cells from healthy or ovalbumin-induced lung inflammation donors on recipient allergic asthma mice. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5:108.
- Bae JS, Jin HK, Lee JK, Richardson JC, Carter JE. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to the reduction of amyloid-beta deposits and the improvement of synaptic transmission in a mouse model of pre-dementia Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10:524–31.
- Lee JK, Schuchman EH, Jin HK, Bae JS. Soluble CCL5 derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells and activated by amyloid beta ameliorates Alzheimer's disease in mice by recruiting bone marrow-induced microglia immune responses. *Stem Cells*. 2012;30:1544–55.
- Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24:59–64.
- Uhlin M, Andersson J, Zumla A, Maeurer M. Adjunct immunotherapies for tuberculosis. *In J Infect Dis*. 2012;205:5325–34.
- Asami M, Owhashi M, Abe T, Nawa Y. Susceptibility of multipotent haemopoietic stem cell deficient W/W<sup>v</sup> mice to *Plasmodium berghei*-infection. *Immunol Cell Biol*. 1991;69:355–60.
- Frevort U, Nacer A, Cabrera M, Movila A, Leberl M. Imaging *Plasmodium* immunobiology in the liver, brain, and lung. *Parasitol Int*. 2013;63:171–86.
- Souza MC, Silva JD, Padua TA, Capelozzi VL, Rocco PRM, Henriques MG. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;186:65–72.
- Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006;32:177–88.

27. Souza MC, Pádua TA, Torres ND, Souza Costa MF, Candéa AP, Maramaldo T, et al. Lipoxin A4 attenuates endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria. *Int Immunopharmacol.* 2015;24:400–7.
28. Souza MC, Paixao FH, Ferraris FK, Ribeiro I, Henriques M. Artesunate exerts a direct effect on endothelial cell activation and NF-kappaB translocation in a mechanism independent of Plasmodium killing. *Malar Res Treat.* 2012;2012:679090.
29. Nacer A, Movila A, Sohet F, Girgis NM, Gundra UM, Loke P, et al. Experimental cerebral malaria pathogenesis—hemodynamics at the blood brain barrier. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1004528.
30. Jeong HK, Ji KM, Kim J, Jou I, Joe EH. Repair of astrocytes, blood vessels, and myelin in the injured brain: possible roles of blood monocytes. *Mol Brain.* 2013;6:28.
31. Wiese L, Kurtzhals JA, Penkowa M. Neuronal apoptosis, metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice. *Exp Neurol.* 2006;200:216–26.
32. Helmers AJ, Lovegrove FE, Harlan JM, Kain KC, Liles WC. Failure of two distinct anti-apoptotic approaches to reduce mortality in experimental cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:823–5.
33. Hempel C, Hyttel P, Staalso T, Nyengaard JR, Kurtzhals JA. Erythropoietin treatment alleviates ultrastructural myelin changes induced by murine cerebral malaria. *Malar J.* 2012;11:216.
34. Xie L, Poteet EC, Li W, Scott AE, Liu R, Wen Y, et al. Modulation of polymorphonuclear neutrophil functions by astrocytes. *J Neuroinflammation.* 2010;7:53.
35. Amante FH, Haque A, Stanley AC, Rivera Fde L, Randall LM, Wilson YA, et al. Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental. *J Immunol.* 2010;185:3632–42.
36. Negreiros RMA, UFAM B, Makimoto FH, UFAM B, Santana LLO, UFAM B, et al. Experimental splenectomies and malaria in mice. *Acta Cir Bras.* 2009;24:437–41.
37. Villevall JL, Gearing A, Metcalf D. Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. II. Nonerythroid populations. *Exp Parasitol.* 1990;71:375–85.
38. Abreu TP, Silva LS, Takiya CM, Souza MC, Henriques MG, Pinheiro AA, et al. Mice rescued from severe malaria are protected against renal injury during a second kidney insult. *PLoS One.* 2014;9:e93634.
39. Rui-Mei L, Kara AU, Sinniah R. Dysregulation of cytokine expression in tubulointerstitial nephritis associated with murine malaria. *Kidney Int.* 1998;53:845–52.
40. Abreu SC, Antunes MA, Maron-Gutierrez T, Cruz FF, Ornellas DS, Silva AL, et al. Bone marrow mononuclear cell therapy in experimental allergic asthma: intratracheal versus intravenous administration. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;185:615–24.
41. Abreu SC, Antunes MA, de Castro JC, de Oliveira MV, Bandeira E, Ornellas DS, et al. Bone marrow-derived mononuclear cells vs. mesenchymal stromal cells in experimental allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;187:190–8.
42. Cruz FF, Antunes MA, Abreu SC, Fujisaki LC, Silva JD, Xisto DG, et al. Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012;182:26–36.
43. Mei SH, Haitzma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:1047–57.
44. Del Sorbo L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Curr Opin Crit Care.* 2011;17:1–6.
45. Epiphanyo 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;6:e1000916.
46. Araujo IM, Abreu SC, Maron-Gutierrez T, Cruz F, Fujisaki L, Carreira Jr H, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy in experimental pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *Crit Care Med.* 2010;38:1733–41.
47. Lang PA, Kasinathan RS, Brand VB, Duranton C, Lang C, Koka S, et al. Accelerated clearance of Plasmodium-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cell Physiol Biochem.* 2009;24:415–28.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 8.2 ANEXO II – Publicações durante o período do Doutorado (2013-2016)

1- Anti-inflammatory effects of methyl ursolate obtained from a chemically derived crude extract of apple peels: potential use in rheumatoid arthritis.

**Pádua TA**, de Abreu BS, Costa TE, Nakamura MJ, Valente LM, Henriques Md, Siani AC, Rosas EC.

Arch Pharm Res. 2014 Nov;37(11):1487-95. doi: 10.1007/s12272-014-0345-1. Epub 2014 Apr 15.

PMID: 24733672

2- Study of the antimalarial properties of hydroxyethylamine derivatives using green fluorescent protein transformed Plasmodium berghei.

Souza MC, **Pádua TA**, Torres ND, Costa MF, Facchinetti V, Gomes CR, Souza MV, Henriques Md.

Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Jun;110(4):560-5. doi: 10.1590/0074-02760140466. Epub 2015 May 26.

PMID: 26018449

3- Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis.

Rosas EC, Correa LB, **Pádua TA**, Costa TE, Mazzei JL, Heringer AP, Bizarro CA, Kaplan MA, Figueiredo MR, Henriques MG.

J Ethnopharmacol. 2015 Dec 4;175:490-8. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.014.

PMID: 26453933

4- Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages.

Correa LB, **Pádua TA**, Seito LN, Costa TE, Silva MA, Candéa AL, Rosas EC, Henriques MG.

J Nat Prod. 2016 Jun 24;79(6):1554-66. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01115. Epub 2016 May 26.

PMID: 27227459

5- *In vitro* and *in vivo* evaluation of DMSO and Azone as penetration enhancers for cutaneous application of celecoxib.

Senna TDA, Mata dos Santos HA, Kibwila DM, Leitão A, Pyrrho A, Pádula M, Rosas EC, **Pádua TA**, Lara MG, Pierre MBR.

*Submetido para Archives of Dermatol Res (03.10.16)*