

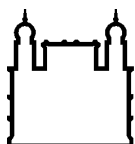
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**EFEITO DA LIPOXINA A₄ NA SÍNDROME DO DESCONFORTO
RESPIRATÓRIO AGUDO INDUZIDA DURANTE A MALÁRIA GRAVE
EXPERIMENTAL**

NATÁLIA DOMINGOS TORRES

Rio de Janeiro
Junho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Natália Domingos Torres

**EFEITO DA LIPOXINA A₄ NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO
AGUDO INDUZIDA DURANTE A MALÁRIA GRAVE EXPERIMENTAL**

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

Orientadores: Dra. Mariana Conceição de Souza

Dra. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques

RIO DE JANEIRO

Junho de 2016

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

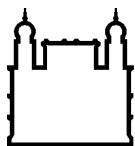
T693 Torres, Natália Domingos

Efeito da lipoxina A₄ na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo induzida durante a Malária grave experimental / Natália Domingos Torres. – Rio de Janeiro, 2016.
xv, 91 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.
Bibliografia: f. 60-75

1. Malária. 2. *P. berghei*. 3. Lipoxina. 4. SRAS. I. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Natália Domingos Torres

**EFEITO DA LIPOXINA A₄ NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO
AGUDO INDUZIDA DURANTE A MALÁRIA GRAVE EXPERIMENTAL**

ORIENTADOR (ES): Dra. Mariana Conceição de Souza
Dra. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Flávia Lima Ribeiro-Gomes - Presidente

Dra. Vera Carolina Bordallo Bittencourt – Membro e Revisora

Dra. Tatiana Maron Gutierrez - Membro

Dra. Ana Acacia Pinheiro Caruso Neves - Suplente

Dra. Vanessa Estato de Freitas Almeida – Suplente

Rio de Janeiro, 27 de Junho de 2016.

Ao homem da minha vida, Fernando
Dias.
Em meio a loucura desse caminho, foste
a minha razão.

AGRADECIMENTOS

Grande parte do que sou e conquistei devo a luta de meus pais, Pedro Malafaia e Deise Domingos, para me educar e passar todos os valores que hoje sigo. Obrigada por tudo, sou eternamente grata a vocês.

A minha prima Andréa Domingos, como sempre, minha mais bela inspiração de escritora. Não existe trabalho, resenha, ou mesmo uma simples frase, que eu não lembre da sua importância. Obrigada por me ensinar a traduzir sentimentos em palavras.

Ao AmoRR da minha vida, Fernando Dias, não tenho palavras que expressem a gratidão que sinto. Durante essa caminhada, você foi o melhor presente que eu poderia receber, foi o seu apoio e carinho que tornaram esse trabalho realidade. Existe uma quantidade infinita de números entre 0 e 1. Obviamente, existe um conjunto ainda maior entre o 0 e o 2. Alguns infinitos são maiores que outros. Mas, Fernando, meu AmoRR, você não imagina o tamanho da minha gratidão pelo nosso pequeno infinito. Eu não o trocaria por nada nesse mundo. Você me deu uma eternidade. Obrigada por estar sempre aqui, obrigada por ser quem és, obrigada por se tornar a minha razão quando eu só tinha a loucura. Obrigada por me ensinar a voar. Amo-te eternamente.

A minha orientadora e amiga, Dra. Mariana Souza, pela oportunidade e confiança designados a mim. Por todos os ensinamentos ao longo desses anos, tanto na vida pessoal como na profissional. Espero sempre te ter ao meu lado.

A minha coorientadora, Dra. Maria das Graças, pelos conselhos, dicas e por compartilhar sua sabedoria no desenvolvimento desse trabalho.

A Tatiana Pádua, obrigada pela ajuda e incentivo, tanto na bancada como na vida. Essa dissertação não seria assim sem a sua ajuda. Foi ótimo compartilhar das frustrações e realizações dessa caminhada, obrigada por tudo.

Ao André “Xuxu” Candea, o homem das quimiotaxias e o amigo de muitas piadas nerds. Que a força sempre esteja conosco!

A Maria Fernanda pela paciência e ajuda nas marcações e análises no citômetro.

A todo o laboratório de Farmacologia Aplicada, pessoas que nem sempre atuaram diretamente neste trabalho, mas que de alguma forma melhoraram-no. Obrigada pelos conselhos, por dividir as frustrações de western blotting's, pelas piadas, e, acima de tudo, obrigada por tornar cada dia mais leve com essa amizade.

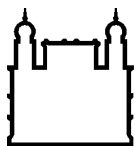
Ao laboratório de investigação pulmonar (UFRJ), em especial a professora Dra. Patrícia Rocco, obrigada por me acolher em seu laboratório e permitir que eu realizasse meus experimentos. Ao Johnatas Dutra pela ajuda na bancada.

Aos amigos que fiz na pós e ficam para a vida: Aline Processi, Alan Clavelland, Fabricio Mota, Gabrielly Sbano e Paula Finamore. As aulas e os trabalhos foram muito melhores com vocês.

Enfim, aos amigos, colegas e a todos aqueles que colaboram direta ou indiretamente para que este trabalho acontecesse. Aqueles que acreditaram em mim, muito obrigada!

Ao apoio financeiro das agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPERJ.

*“Ao infinito... e além!”
Buzz Lightyear*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

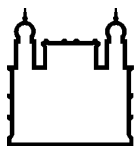
EFEITO DA LIPOXINA A4 NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO INDUZIDA DURANTE A MALÁRIA GRAVE EXPERIMENTAL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Natália Domingos Torres

A malária grave é caracterizada pelo aumento da pressão intracraniana, síndrome do desconforto respiratório agudo (SRAS), e disfunção de múltiplos órgãos. Dentre as características da SRAS induzida durante a malária podemos destacar a alteração da permeabilidade vascular, aumento da produção de citocinas e quimiocinas e o acúmulo de mononucleares e neutrófilos no tecido pulmonar. Alguns autores sugerem que a terapia direcionada a resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro durante infecções deva ser concomitante ao uso de antimicrobianos. As lipoxinas (LX) são eicosanóides considerados anti-inflamatórios e pró-resolutivos. De fato, já foi mostrado que a LXA₄ é capaz de reduzir o acúmulo de leucócitos no cérebro de camundongos infectados com *P. berghei*. No entanto, o papel da LXA₄ no comprometimento pulmonar induzido durante a malária grave não está claro. Em nosso estudo avaliamos o efeito da LXA₄ durante a SRAS induzida pela infecção por *P. berghei*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com *P. berghei* (10⁶ hemácias parasitadas via i.p.). Uma hora antes da infecção os animais foram tratados com LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) e o tratamento foi mantido por mais 4 dias seguidos. No quinto dia de infecção, foi avaliada a parasitemia por citometria de fluxo, contagem de leucócitos totais e neutrófilos circulantes; avaliação de edema cerebral e pulmonar; avaliação da mecânica pulmonar, histologia e dosagem de MPO do tecido pulmonar; produção de citocinas em pulmão e soro; avaliação da maturação e apoptose de neutrófilos da medula óssea; avaliação da migração de neutrófilos retirados da medula óssea. Nossos resultados mostram que o tratamento com LXA₄ foi capaz de aumentar em 60% a sobrevivência dos animais infectados no período de morte cerebral e diminuiu a formação de edema pulmonar e cerebral, porém sem alterar a parasitemia periférica. Observamos que a LXA₄ diminuiu as pressões de resistência (ΔP_1), viscoelasticidade (ΔP_2) e a elastância (Est, L) que aumentam durante a infecção por *P. berghei*. Esses dados confirmam a análise histológica que mostra que o tratamento com LXA₄ diminuiu a formação de pontos hemorrágicos, o espaçamento alveolar e o infiltrado inflamatório. No entanto, observamos que o tratamento com a LXA₄ não alterou a produção de IL-6, TNF- α , CXCL1 e CCL2, mas aumentou a produção de IL-10 no tecido pulmonar quando comparado aos animais infectados não tratados. Além disso, o tratamento com a LXA₄ diminuiu a contagem de leucócitos totais e neutrófilos circulantes concomitante à diminuição de CXCL1 no soro. Observamos que a redução do número de neutrófilos após o tratamento com LXA₄ não está relacionada com maturação ou apoptose dessas células. De forma interessante, constatamos que a LXA₄ reduziu a migração de neutrófilos tanto *ex vivo* como quando tais células foram tratadas e estimuladas *in vitro*. Em conjunto os resultados sugerem que a LXA₄ inibe o desenvolvimento da SRAS induzida por *P. berghei* devido a sua atuação direta em neutrófilos, reduzindo sua migração.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MALARIA-INDUCED ACUTE LUNG INJURY IS ATTENUATED AFTER TREATMENT WITH LIPOXIN A₄

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Natália Domingos Torres

Severe malaria is characterized by increased intracranial pressure, acute respiratory distress syndrome (SRAS), and multiple organ dysfunctions. During malaria induced SRAS is observed increased vascular permeability, cytokine and chemokine production and neutrophil and mononuclear cell accumulation in lung tissue. It has already been suggested that the therapy of host inflammatory response induced by infections should be performed concomitant to antimicrobial therapy. The lipoxins (LX) are described as anti-inflammatory eicosanoids. Interestingly, LXA₄ is able to reduce the accumulation of leukocytes in brain vasculature of *P. berghei*-infected mice. However, it is not clear if LXA₄ modulates the experimental severe malaria induced SRAS. In this study, we investigated the role of LXA₄ in lung tissue during malaria infection. C57Bl/6 mice were treated with LXA₄ (0,5 µg/kg/day, 200µl) followed by infection with 10⁶ parasitized red blood cell intraperitoneally. The treatment was given during 5 days and, at the fifth day after infection, the following parameters were evaluated: parasitemia; blood-brain barrier breakdown and pulmonary edema; circulating leukocyte numbers; lung mechanical and tissue preservation; MPO, cytokines and chemokines production in lung tissue; bone marrow neutrophils maturation, apoptosis and migration. We observed that the treatment with LXA₄ increased survival of *P. berghei*-infected mice, prevents BBB breakdown and decreases cerebral and pulmonary edema; however, we did not observe parasitemia modulation. The LXA₄ was also able to restore the basal levels of lung function by reducing the increased lung resistive (ΔP_1) and viscoelastic (ΔP_2) pressures, and the static elastance (Est) induced during *P. berghei* infection. Lung histological examination of *P. berghei*-infected mice treated with LXA₄ showed fewer areas with alveolar collapse, neutrophil infiltration and interstitial edema when compared to the *P. berghei*-infected non-treated mice. However, LXA₄ did not modulate IL-6, TNF- α , CXCL1 and CCL2 production, but increased IL-10 production in lung tissue when compared with *P. berghei*-infected non-treated mice. The treatment with LXA₄ reduced the number of peripheral neutrophils and CXCL1 production in serum of infected mice. Furthermore, we did not observed alteration in neutrophil maturation or apoptosis after treatment with LXA₄. In addition, we observed that treatment with LXA₄ reduced neutrophil migration ex vivo as well after in vitro treatment. Together our results suggest that LXA₄ inhibits malaria-induced SRAS by modulation neutrophil migration.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Histórico.....	16
1.2 Epidemiologia da doença	17
1.3 Características moleculares e celulares da resposta inflamatória induzida durante a malária	18
1.4 Malária grave.....	19
1.5 A síndrome respiratória aguda severa induzida durante a malária grave	20
1.6 Importância da terapia direcionada à resposta do hospedeiro no tratamento da malária	22
1.7 Mediadores lipídicos anti-inflamatórios: lipoxinas	23
1.8 A lipoxina como opção de tratamento para SRAS	26
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Aspectos éticos	28
3.2 Animais	28
3.3 Infecção com <i>P. berghei</i> e tratamento com LXA ₄	28
3.4 Modelo de edema cerebral e pulmonar	29
3.5 Sobrevida e avaliação da parasitemia	29
3.6 Análise de parâmetros cognitivos e comportamentais (SHIRPA).....	30
3.7 Mecânica pulmonar	31
3.8 Preparação dos pulmões para histologia, dosagem de citocinas e quimiocinas e contagem total e diferencial de leucócitos periféricos	32
3.9 Avaliação atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)	33
3.10 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....	34
3.11 Isolamento de células da medula óssea para análise do perfil celular e ensaio de migração	34

3.11.1	Análise do perfil de maturação e apoptose de neutrófilos	34
3.11.2	Ensaio de migração de neutrófilos.....	35
3.12	Análise Estatística.....	36
4.	RESULTADOS	37
5.	DISCUSSÃO	52
6.	CONCLUSÕES	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8.	ANEXOS I	76
9.	APÊNDICE	85

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1- Dose resposta LXA₄</i>	31
<i>Figura 2– Efeito da LXA₄ durante o desenvolvimento da SRAS</i>	39
<i>Figura 3 – Corte histológico pulmonar</i>	40
<i>Figura 4 – Atividade de MPO em tecido pulmonar após tratamento com LXA₄</i>	43
<i>Figura 6 - Efeito do pré-tratamento com LXA₄ na contagem de leucócitos total e diferencial</i>	44
<i>Figura 7 - Participação do CXCL1 na migração de neutrófilos</i>	45
<i>Figura 8– Efeito do pré-tratamento da LXA₄ na apoptose induzida em neutrófilos</i>	46
<i>Figura 9 – Efeito do pré-tratamento com LXA₄ na maturação de neutrófilos</i>	48
<i>Figura 10 – Avaliação do efeito do pré-tratamento com a LXA₄ na migração de neutrófilos ex vivo</i>	50
<i>Figura 11 – Efeito do pré-tratamento in vitro de LXA₄ na migração de neutrófilos estimulados in vitro</i>	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 15-LO 15-lipoxigenase
- 5-LO 5-lipoxigenase
- AA Ácido Araquidônico
- BOC-2 N-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe
- BSA Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumin)
- CCL Quimiocina da família CC
- CCR Receptor de CC quimiocina
- CD11b Cluster de diferenciação 11b (Inglês: Cluster of differentiation 11b)
- CD36 cluster de diferenciação 36 (Inglês: Cluster of differentiation 36)
- CECAL Centro de criação de animais de laboratório
- CEUA Comitê de ética do uso de animais
- CLP Ligação e perfuração cecal (Inglês: cecal ligation puncture)
- CO Monóxido de carbono
- CO₂ Dióxido de carbono
- CSA Condroítina sulfato A
- CXCL Quimiocina da família CXC
- CXCR Receptor de CXC quimiocina
- DNA Ácido Desoxirribonucleico
- ELISA Ensaio De Imunoabsorbância Ligado À Enzima
- Est,L Elastância

- FPR Receptores Formil Peptídeo (Inglês: formyl peptide receptor)
- GM-CSF Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (Inglês: granulocyte macrophage colony stimulating factor)
- GPI Glicosil- Fosfatidilinositol
- HE Hematoxilina Eosina
- HO-1 Heme oxigenase – 1
- I.P. Intraperitoneal
- I.V. Intravenoso
- ICAM Molécula de Adesão Intracelular (Inglês: Intracellular adhesion molecule)
- IFN- γ Interferon γ
- IL Interleucina
- LFA-1 Lymphocyte function-associated antigen 1
- LO Lipoxigenase
- LT Leucotrieno
- LT α Linfotoxina α
- LX Lipoxina
- MPO Mieloperoxidase
- OMS Organização Mundial de Saúde
- *P. berghei* *Plasmodium berghei*
- *P. falciparum* *Plasmodium falciparum*
- *P. knowlesi* *Plasmodium knowlesi*
- *P. malariae* *Plasmodium malariae*
- *P. ovale* *Plasmodium ovale*
- *P. vivax* *Plasmodium vivax*

- PbA *Plasmodium berghei* ANKA
- PBS Tampão fosfato salino (Inglês: phosphate buffered saline)
- PEEP Pressão positiva ao final da respiração (Inglês: Positive End-Expiratory Pressure)
- PfEMP Proteína da Membrana Eritrocitária do *Plasmodium Falciparum* (Inglês: *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein)
- PL Pressão Transpulmonar
- PPAR Receptores Ativados Por Proliferador De Peroxissoma (Inglês: peroxisome proliferator activated receptor)
- RPMI Meio de cultura desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute
- SFB Soro fetal bovino
- SHIRPA **S**mithKline Beecham, **H**arwell, **I**mperial College, **R**oyal London Hospital, **p**henotype assessment
- SRAS Síndrome Respiratória Aguda Severa
- TLR Receptor do tipo Toll (Inglês: toll like receptor)
- TNF- α Fator de Necrose Tumoral A (Inglês: Tumor Necrosis Factor α)
- VCAM Molécula de Adesão Vascular (Inglês: Vascular cell adhesion molecule)
- VEGF Fator De Crescimento Endotelial Vascular (Inglês: Vascular Endothelial Growth Factor)
- WHO World Health Organization
- $\Delta P1$ Pressão Resistência
- $\Delta P2$ Pressão de Viscoelasticidade

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A malária, palavra oriunda do italiano “mala aria” que significa “maus ares”, é uma doença parasitária que aflige os seres humanos há cerca de 50 mil anos. Acredita-se que a malária tenha sido a principal causa de morte entre os primatas ancestrais do *Homo sapiens*, como os Australopithecus. No entanto, os primeiros documentos que fazem referência a existência da malária datam a partir de 2.700 a.C. na China (1).

Em 1860, aproximadamente, Louis Pasteur introduziu no mundo científico o conceito de microrganismos, o que abriu novos horizontes para o estudo da patogenia de diversas doenças (2). Com base na teoria dos microrganismos, Charles Louis Alphonse Laveran deu o primeiro passo na descoberta da malária. Embora a enfermidade já existisse há séculos, somente em 1880, Laveran, então médico do exército francês em missão na Argélia, observara o *Plasmodium* pela primeira vez no interior das hemácias (3). A partir da descoberta do plasmódio como agente infeccioso da malária, o próximo passo foi identificar como esses organismos alcançavam a corrente sanguínea. Embora Laveran tenha cogitado a possibilidade da transmissão devido ao repasto sanguíneo de mosquitos, coube ao cirurgião Ronald Ross, em 1897, o mérito da descoberta do vetor. Ross identificou o desenvolvimento do plasmódio dentro do estômago de mosquitos Anopheles (4). Hoje sabe-se que a malária pode ser causada pelas espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (5) e, descrito mais recentemente, *P. knowlesi* (6).

O ciclo da doença é dividido em duas fases: a sexuada no vetor e a assexuada no hospedeiro vertebrado. A fase assexuada inicia-se na inoculação das formas esporozoítas infectantes diretamente na circulação do hospedeiro vertebrado. Estas formas alcançam o fígado, invadindo os hepatócitos onde sofrem proliferação esquizogônica pré-eritrocítica, caracterizada por inúmeras mitoses que originam o esquizonte hepático. O parasito passa por um processo de fragmentação citoplasmática e gera os merozoítas que rompem a membrana dos hepatócitos, caem na circulação sanguínea e invadem as hemácias. É importante ressaltar que as espécies *P. vivax* e *P. ovale* são capazes de se diferenciar em formas hipnozoítas, permanecendo latentes no fígado até se diferenciarem em meroítozas.

Ao invadir as hemácias, os merozoítas iniciam o ciclo eritrocítico seguindo os estágios de: trofozoíta jovem (anel), trofozoíta maduro, esquizonte e, novamente merozoítas. Com o rompimento da hemácia parasitada, os merozoítas são liberados, invadem novas hemácias e reiniciam o ciclo eritrocítico, que se repete em um prazo que varia com a espécie infectante (5).

1.2 Epidemiologia da doença

O número de casos de malária vem decaindo ao longo dos anos. Em 2000 foram reportados aproximadamente 262 milhões de casos, já em 2015 esse número foi de 214 milhões, dos quais 88% encontram-se na África. Contudo, somente no ano de 2015 a malária levou cerca de 438.000 pessoas ao óbito, grande parte crianças menores que 5 anos. Destas mortes, 90% foram somente na região da África (7).

Dos 21 países na região das Américas em que a doença é considerada endêmica, 13 obtiveram a redução na incidência maior ou igual a 75% em casos confirmados entre 2000 e 2011, incluindo o Brasil (8). Foram reportados cerca de 390.000 casos de malária nas Américas, destes, 37% ocorreram no Brasil (7). Na Venezuela, por exemplo, o número de casos de malária vem aumentando desde 2008, em 2014 foram registrados mais de 90.000 de casos da doença, a maior alta em 50 anos (7).

Grande parte dos casos relatados em território brasileiro são de plasmódio *vivax*, que, ao contrário do que se pensava, já é relacionado a casos de malária grave (8). A maior área afetada é a região amazônica, especialmente o estado do Amazonas que contribuiu com o maior número de casos (47%), seguido pelo Acre (22%). Na região extra-amazônica, foram reportados 203 casos em 2014, porém com um aumento de 15% nos casos de *P. falciparum*. A região Sudeste ainda é considerada área de risco para transmissão da doença (9). Em relatório da Secretaria de Vigilância e Saúde do estado do Rio de Janeiro, do ano de 2010 a 2015, foram reportados 490 casos confirmados de malária no estado, abrangendo casos importados e autóctones. O número de casos de malária autóctone no estado vem aumento gradativamente, apenas no primeiro trimestre de 2015, dos 11 casos reportados, 8 foram confirmados como extra-amazônicos (10).

Portanto, ainda é preciso investir em prevenção, diagnóstico e tratamento da doença, mas também é preciso gerar conhecimento sobre a patogenia da malária a fim de elucidar aspectos fisiopatogênicos fazendo com que a abordagem terapêutica da doença tenha um maior potencial de cura.

1.3 Características moleculares e celulares da resposta inflamatória induzida durante a malária

No hospedeiro vertebrado, em cada uma das duas fases do ciclo, (fase pré-eritrocítica e a fase eritrocítica), podem ser observadas diferentes populações leucocitárias e mediadores inflamatórios envolvidos (11).

Os plasmódios podem estimular a resposta inflamatória do hospedeiro de diferentes formas, como por exemplo pela ligação do complexo hemozoína/DNA ao receptor do tipo toll 9 (TLR9) (12), pela ação do Glicosil-Fosfatidilinositol (GPI) ligado ao TLR2 (13), após rompimento da hemácia e consequente liberação do heme através de TLR4 (14), (15, 16) ou pela adesão de hemácias infectadas ao endotélio (17, 18).

Uma vez dentro das hemácias, os parasitas exportam para a membrana dos eritrócitos proteínas próprias (19). As proteínas expressas na membrana são capazes de ativar leucócitos circulantes e se ligar a diferentes constituintes presentes na membrana das células endoteliais, como as integrinas molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), receptores lipídicos (CD36) e a condroitina sulfato A (CSA) (20). Desta forma, as células endoteliais se ativam e aumentam a expressão de moléculas de adesão e receptores para mediadores inflamatórios, gerando assim uma maior citoaderência de hemácias parasitadas e um maior acúmulo de leucócitos, que, por sua vez, contribuem para a chegada e adesão de novos leucócitos. Tal mecanismo pode ser considerado uma forma de proteção contra o sistema imune do hospedeiro, uma vez que a citoaderência impede a destruição do plasmódio no baço, facilitando assim a sua sobrevivência (21).

A produção exagerada de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios podem levar o hospedeiro a lesões teciduais como perda de função do endotélio, extravasamento proteico e até hemorragias gerando, assim, complicações

pulmonares, falência renal, anemia severa e congestão cerebral, levando-o à morte caso não haja tratamento específico adequado (22, 23).

1.4 Malária grave

Durante muitos anos a malária grave foi associada aos sintomas relacionados a danos no sistema nervoso central causado pela infecção pelo *Plasmodium falciparum*. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que o diagnóstico seja feito a partir da apresentação de dois ou mais dos sintomas relatados a baixo, em pacientes infectados por *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. knowlesi* (8). Devido à gravidade dos sintomas apresentados pelos plasmódios *knowlesi* e *vivax*, a OMS passou a reconhecê-los como causadores de malária grave (8). São considerados sintomas relacionados a malária grave: perda de consciência, prostração, convulsão, icterícia, dificuldade respiratória, edema pulmonar, sangramento anormal, anemia severa, acidose metabólica, hiperparasitemia, hipoglicemia, insuficiência renal e hiperlactatemia (Ilustração 1) (8).

A malária cerebral é um dos principais sintomas apresentados durante a malária grave e uma das maiores causas de morte em adultos e crianças (8). Apesar de amplamente estudado, os mecanismos celulares e moleculares do desenvolvimento da malária cerebral em pacientes ainda não são claros. Acredita-se que distúrbios metabólicos, oclusão de vasos por hemácias infectadas e a resposta inflamatória do hospedeiro, que incluem ativação do endotélio e produção sistêmica de citocinas e influxo de leucócitos no tecido, são fatores que podem levar ao rompimento da barreira hemato-encefálica e, conseqüentemente, à malária cerebral (24-26).

Grande parte da compreensão da fisiologia humana se deve ao estudo em modelos animais, e o mesmo é válido para a malária. Os modelos experimentais para o estudo da malária variam de acordo com a patologia que se pretende estudar. Assim como na malária humana, diferentes plasmódios causam diferentes patologias em roedores (27) e galináceos (28). Em modelos murinos os mais utilizados são *P. yoelli*, *P. chabaudi* e *P. berghei*, dos quais apenas o *P. berghei* induz malária grave. Os modelos que utilizam a infecção pelo *P. berghei* ANKA em camundongos C57Bl/6 visam elucidar aspectos decorrentes da malária grave, uma vez que a infecção por esta espécie é capaz de induzir patologias em camundongos



		Gênero	Principais sintomas
Malária grave		<i>Plasmodium falciparum</i>	Perda De Consciência, Prostração, Convulsão, Dificuldade Respiratória, Edema Pulmonar, Sangramento Anormal, Anemia Severa, Acidose Metabólica, Hiperparasitemia, Insuficiência Renal
		<i>Plasmodium vivax</i>	
		<i>Plasmodium knowlesi</i>	
		<i>Plasmodium malarie</i>	Cefaléia
		<i>Plasmodium ovale</i>	Febre Dor muscular



C57Bl/6

		Gênero	Principais sintomas
Malária grave experimental		<i>Plasmodium berghei</i> ANKA	Malária cerebral; ARDS; Insuficiência Renal; Anemia
		<i>Plasmodium chabaudi</i>	
		<i>Plasmodium yoelii</i>	

semelhantes às observadas em humanos, como induzir comprometimento das funções cerebrais, renais e pulmonares (Ilustração 1) (27).

Ilustração 1: Agente etiológico e as possíveis complicações decorrentes da infecção.

1.5 A síndrome respiratória aguda severa induzida durante a malária grave

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SRAS) é um quadro que acomete cerca de 10% dos pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (UTI), com uma taxa de mortalidade em torno de 40% (29). O desenvolvimento da SRAS é uma resposta a diferentes estímulos, como: pneumonia, infecção sistêmica ou múltiplos traumas (30). A inflamação pulmonar desencadeada durante a SRAS gera dano ao endotélio e epitélio pulmonar mediado pelo influxo de neutrófilos no espaço alveolar. Essa resposta leva a liberação de diferentes citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-1 β , IL-8 e TNF- α (31).

Assim como a manifestação cerebral, a malária causa uma intensa disfunção pulmonar, a SRAS (32, 33). Esta síndrome é observada em 5% dos pacientes sem complicação, e em 20-30% dos pacientes com malária grave (34). No entanto, os parâmetros para diagnóstico da SRAS foram recentemente alterados, sugerindo que os dados de malária pulmonar sejam maiores que os estimados pela OMS (35).

Autópsias feitas em pacientes com malária grave mostraram pulmões edemaciados, capilares pulmonares congestionados, espessamento da parede alveolar, hemorragias dentro dos alvéolos e extravasamento de fluido para a pleura e pericárdio (36, 37). Tais patologias são consequência da ativação do endotélio que resulta em aumento da expressão de moléculas de adesão, congestão dos vasos e

acúmulo celular nos pulmões (38, 39). Assim como nos estudos da malária cerebral, o estudo da malária pulmonar é limitado por aspectos éticos e por ser realizado em pacientes já em fase de tratamento, o que torna os modelos experimentais de malária grandes aliados na geração de conhecimento no assunto (40).

Para o estudo da SRAS induzida durante a malária experimental, já foram utilizadas diferentes cepas de camundongos assim como diferentes espécies de plasmódios (41, 42). O *P. berghei* ANKA, por exemplo, causa várias patologias associadas à malária grave, inclusive SRAS (43). Por outro lado, o *P. berghei* NK65 causa SRAS sem causar complicações cerebrais (42). Alguns autores sugerem que as patologias relacionadas a malária tem início no pulmão, quando as primeiras hemácias parasitadas por merozoítas oriundos do fígado atingem os capilares pulmonares (44). Nosso grupo mostrou que 24 horas após a infecção já é possível observar disfunção da mecânica pulmonar associada a presença de hemácias parasitadas, células inflamatórias e citocinas no tecido pulmonar em modelos de malária grave (43). Já em tempos mais tardios da infecção, assim como observado na patologia pulmonar ocasionada durante a malária humana, a presença de hemácias infectadas no pulmão de camundongos desencadeia uma intensa resposta inflamatória local. Tal resposta tem como característica as mesmas observadas em pacientes com a doença (ilustração 2) (41, 42, 45-50).

Grande parte do dano pulmonar ocasionado pela infecção por *P. berghei* é mediado por neutrófilos, que são ativados e atraídos pelas quimiocinas expressas durante a resposta inflamatória. Poucos estudos abrangem a lesão pulmonar em decorrência dos neutrófilos, porém sabe-se que assim que migram para o tecido, essas células tentam controlar a infecção e acabam por causar mais danos aos pulmões. No entanto, quando ocorre a inibição da migração de neutrófilos para o tecido pulmonar, é observada uma diminuição da produção de mediadores inflamatórios e a preservação da histoarquitetura do pulmão (51, 52). Os monócitos também representam um papel importante durante a resposta a infecção por *P. berghei*. Assim como neutrófilos e macrófagos, os monócitos já foram identificados em tecido pulmonar durante a malária grave, tanto em humanos, quanto em murinos. Geralmente os monócitos estudados durante a malária são visualizados com restos de hemozóina, sugerindo que essa população celular participe da fagocitose de células infectadas (51).

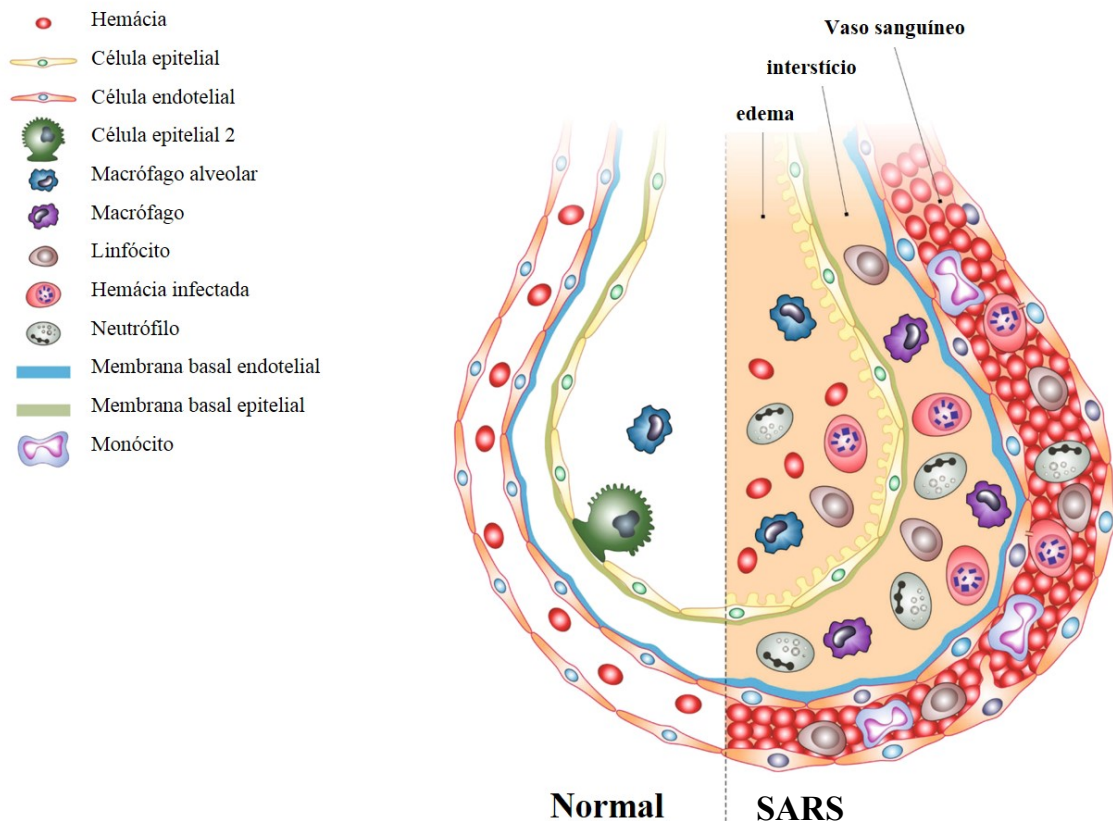


Ilustração 2: Representação de alvéolo pulmonar durante a malária grave (Adaptado de Aitken et al. Malaria Journal 2014 (53))

1.6 Importância da terapia direcionada à resposta do hospedeiro no tratamento da malária

Um dos grandes problemas para o tratamento da malária é a resistência que os plasmódios adquiriram a antimaláricos como a cloroquina e o artesunato (54). Devido a isso, a OMS propôs que o tratamento da malária seja uma terapia combinada, formada por um coquetel de pelo menos duas substâncias sendo uma delas obrigatoriamente um derivado de artemisinina, evitando-se assim o aparecimento de novas cepas resistentes (8, 55). No entanto uma nova abordagem terapêutica vem sendo proposta, a terapia direcionada para o paciente e não só para a eliminação do plasmódio (56).

Nos primeiros trabalhos com terapias direcionadas a pacientes de malária, os autores administraram corticoides, no entanto o tratamento não foi eficaz em proporcionar melhora do paciente (57, 58). Desta forma, surgiu a hipótese de que o

tratamento direcionado a um alvo terapêutico específico como a produção de mediadores inflamatórios (59), a ativação PPAR- γ estimulando a via anti-inflamatória deste receptor (60) ou a indução da vasodilatação (61, 62) poderia ser mais eficaz. Entretanto, nenhum estudo foi conclusivo. Os autores mostraram que estas terapias podem ser seguras, mas o sucesso depende de fatores como fase da doença em que os moduladores são administrados, período de tempo de administração, comorbidades paralelas do paciente entre outros (63).

Muitos estudos têm sido feitos em modelos experimentais com o intuito de auxiliar os clínicos a entender qual a melhor forma de tratamento direcionado ao paciente de malária. Já foi mostrado que a administração de doadores de óxido nítrico melhora a sobrevivência de camundongos infectados com *P. berghei* através da diminuição da expressão de moléculas de adesão no endotélio cerebral e consequente diminuição da adesão de leucócitos (64). Outros estudos mostraram que a administração de estatina, clinicamente utilizada no tratamento de doenças cardiovasculares, reduziu a resposta inflamatória cerebral em camundongos infectados com *P. berghei* (65). No entanto, a maior parte destes estudos observou o efeito de imunomoduladores apenas na recuperação da malária cerebral, mas até agora, poucos estudos se dedicaram a estudar a modulação da SRAS induzida durante a malária grave. Já foi mostrado que o tratamento com altas doses de dexametasona reduz a resposta inflamatória associada a SRAS induzida durante a malária (42). Recentemente nosso grupo mostrou que a administração de células-tronco mesenquimais leva ao aumento da sobrevivência dos animais pela atenuação da SRAS induzida durante a malária grave experimental, sugerindo que o tratamento da SRAS induzido pela malária pode ser benéfico para a recuperação do hospedeiro (66).

1.7 Mediadores lipídicos anti-inflamatórios: lipoxinas

Até o início dos anos de 1980, acreditava-se que a resposta inflamatória que não se tornasse crônica, se extinguiria a partir de resolução passiva. No entanto, Serhan e colaboradores mostraram que derivados do ácido araquidônico inibiam a atividade de neutrófilos *in vitro*. Como a biossíntese destes compostos exigia a atividade sequencial de diferentes lipoxigenases (LO), os autores chamaram tais compostos de lipoxinas (LX) (67). As lipoxinas LXA₄ e LXB₄ são derivados

eicosanóides, e, em camundongos, são sintetizadas após atividade sequencial das enzimas 15-LO e 5-LO sobre o ácido araquidônico e 15S-HETE, respectivamente, formando a LXA₄ no exterior celular (ilustração 2) (68-70). Mais recentemente, outros mediadores lipídicos anti-inflamatórios também foram descritos. Dentre eles estão as resolvinas E e D (derivadas do ácido eicosapentaenóico e docosahexaenóico respectivamente) e a maresina (derivada do ácido docosahexaenóico) (71). Tais mediadores foram denominados mediadores especializados em pró-resolução, ou mediadores SPM (do inglês *specialized pro-resolving mediators*). Os SPM são descritos como anti-inflamatórios por inibir a resposta inflamatória ou como pró-resolutivos por estimular uma resposta antagônica à resposta inflamatória, como estimulando a apoptose de células inflamatórias e a fagocitose das mesmas (68). Os SPM, incluindo as lipoxinas, são mediadores que se ligam aos receptores formil peptídeo (FPR) que são acoplados a proteína G. Os receptores acoplados a proteína G (GPCR) são formados por sete domínios transmembrana, com o terminal amino no meio extracelular e o terminal carboxila no meio intracelular (72). Os GPCRs podem ser ativados por ligantes como, por exemplo, hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento. Uma vez ativado o respectivo GPCR, a proteína G promoverá uma resposta intracelular específica, levando a ação de moléculas efetoras. Um exemplo é a adenilato ciclase, enzima que gera o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Alguns GPCR's já foram descritos por ter uma ação antagônica, onde por exemplo reduzem a via do AMPc (73). Em humanos são descritos três tipos de FPRs: FPR1, ALX/FPR2 e FPR3, enquanto em camundongos são descritos até agora oito subtipos (74).

As LX's têm ações específicas, como a de limitar o recrutamento, quimiotaxia e adesão de neutrófilos no local da inflamação, funcionando como um "freio" na sinalização para os neutrófilos circulantes e para os presentes no sítio inflamatório. Como exemplo, Takano e colaboradores observaram que a aplicação tópica de leucotrieno B₄ (LTB₄) em orelhas de camundongos induziu edema e intenso infiltrado de neutrófilos. Quando a LXA₄ foi adicionada, os autores observaram a redução do infiltrado celular e do edema, mostrando o efeito da LXA₄ no acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório (75). Ainda assim a LXA₄ pode agir em outras células de defesa, como nos macrófagos, sinalizando a fagocitose de restos celulares (76). Foi descrito por Nascimento-Silva e colaboradores, que a lipoxina pode, também, ativar vias citoprotetoras, como é o caso da heme oxigenase-1 (HO-1). Os autores sugerem que a LXA₄ contribui para a redução do acúmulo de leucócitos no leito vascular ao

induzir a expressão de HO-1 em células endoteliais ativadas, e, assim, inibir a expressão de moléculas de adesão (77).

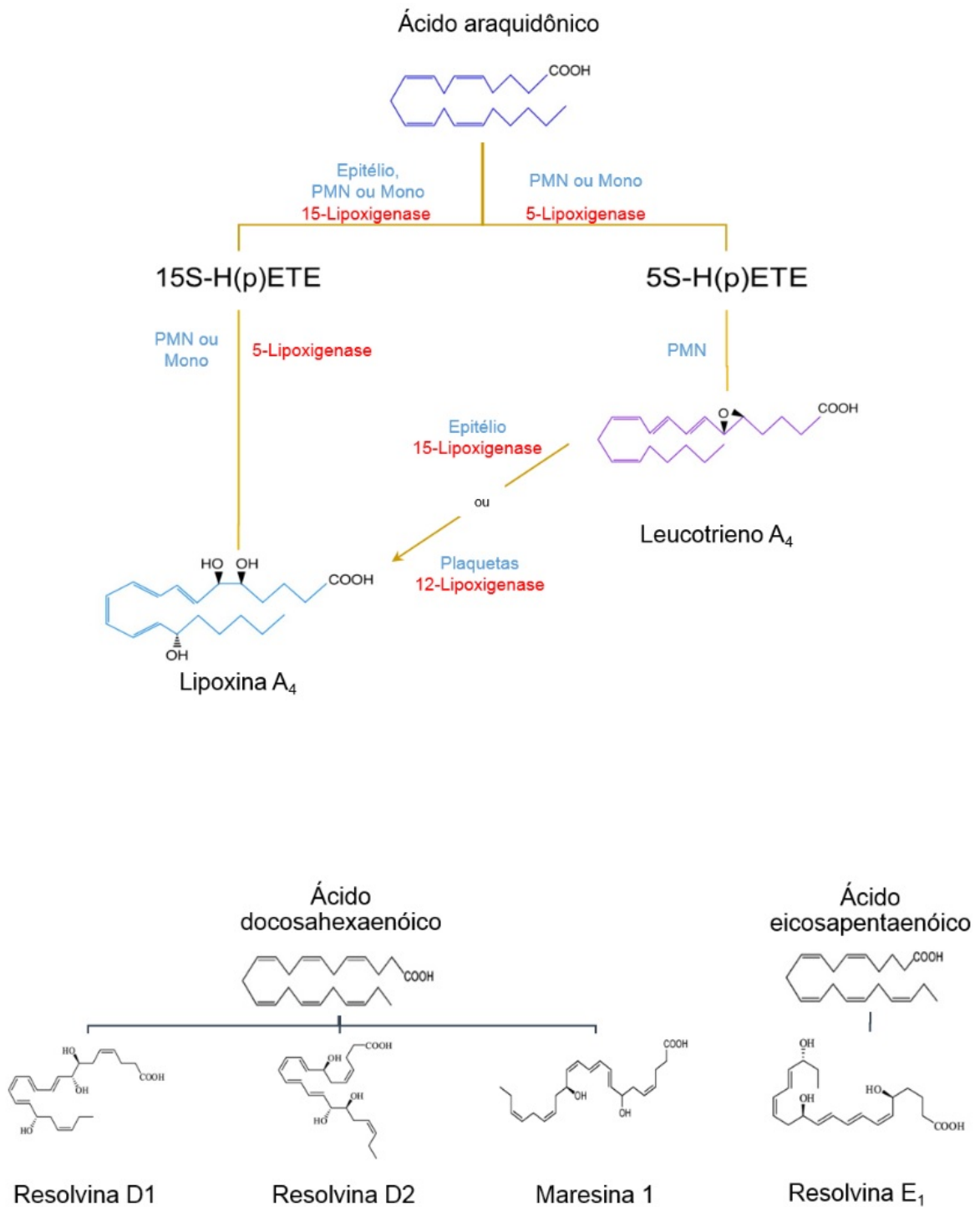


Ilustração 3: Cascata metabolização dos SPM

1.8 A lipoxina como opção de tratamento para SRAS

Vários estudos discorreram sobre o efeito anti-inflamatório da LXA₄ em modelos de SRAS. Um dos mecanismos de ação da LXA₄ no pulmão envolve a inibição da agregação de células, como neutrófilos e plaquetas, em paralelo à indução da produção de mediadores pró-resolutivos (78). Além da administração direta de LXA₄, a indução da produção de LXA₄ durante a SRAS também pode ser benéfica para recuperação do quadro de lesão pulmonar (79).

Além da atuação sobre células da resposta inflamatória pulmonar, a LXA₄ pode atuar sobre o endotélio pulmonar estabilizando as ligações juncionais e, assim estabilizando a camada endotelial e preservando o tecido (80). No entanto, não há dados na literatura quanto ao efeito da LXA₄ na recuperação da função pulmonar em casos de SRAS.

Pouco se sabe sobre o papel da lipoxina durante a malária grave experimental, sendo grande parte dos estudos voltados para o comprometimento cerebral. Recentemente Shryock e colaboradores (81) mostraram que animais infectados por *P. berghei* e tratados com o análogo estável da LXA₄, a 15-epi-LXA₄, apresentaram maior sobrevivência e números reduzidos de linfócitos no cérebro. No entanto, os autores não avaliaram o efeito da LXA₄ nos danos pulmonares causados pela infecção.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito do pré-tratamento com LXA₄ no dano pulmonar causado durante a malária grave experimental induzida por *P. berghei* ANKA.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Estudar o papel da LXA₄ *in vivo* no desenvolvimento da malária grave induzida pela infecção por *P. berghei*, avaliando os seguintes parâmetros: parasitemia, sobrevida, edema pulmonar e edema cerebral, análise comportamental;
- 2- Estudar o papel da LXA₄ na função pulmonar durante a malária grave experimental induzida por *P. berghei*, avaliando elastância estática, pressão de resistência e pressão de viscoelasticidade.
- 3- Avaliar a resposta inflamatória pulmonar induzida pela infecção por *P. berghei* após tratamento com LXA₄, observando parâmetros como produção de citocinas, quimiocinas e presença de células inflamatórias no tecido pulmonar.
- 4- Estudar o efeito da LXA₄ na mobilização de neutrófilos da medula durante a infecção por *P. berghei*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos previstos neste projeto estão licenciados na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), licença: L-052/12 sob a responsabilidade da Dra. Mariana Conceição de Souza; 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. O parasita foi gentilmente cedido pelo Dr Leonardo Carvalho do Laboratório de Pesquisa em Malária (IOC, FIOCRUZ) após doação do Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4, EUA, depositado por CJ Janse e AP Waters, sob código MRA-865).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 5 e 6 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos, até o momento da experimentação, no biotério do Laboratório de Farmacologia Aplicada, com livre acesso a água e ração, sendo submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas e aprovação da CEUA da Fundação Oswaldo Cruz.

3.3 Infecção com *P. berghei* ANKA e tratamento com LXA₄

Camundongos C57BL/6 foram infectados com *P. berghei* ANKA GFPcon 259cl2, por via intraperitoneal (i.p.), com 10⁶ hemácias parasitadas, oriundas de camundongos infectados doadores da mesma espécie. Os animais foram tratados por 5 dias com LXA₄ (0,5; 1 e 2 µg/kg/dia), ou seu antagonista de receptor BOC-2 (N-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe, 100 µg/kg/dia) + LXA₄ (0,5 µg/kg/dia), ou tampão fosfato-salino (PBS), ambos com volume final de 200 µl, por via intraperitoneal (i.p.).

Os animais foram tratados, 01 hora após o primeiro tratamento foi realizada a infecção e o tratamento permaneceu por mais 04 dias.

3.4 Modelo de edema cerebral e pulmonar

No quinto dia após a infecção, foi ministrado via intravenosa (i.v.) 150µL de Azul de Evans (2%). Após duas horas os camundongos foram sedados com xilazina/quetamina (20 mg/ml e 50 mg/ml respectivamente) e eutanasiados com Hypnol 3% (pentobarbital sódico 100 mg/Kg) para retirada de seus cérebros e pulmões, que foram pesados e reservados em 2 mL ou 4mL de formamida, respectivamente, por 48 horas em estufa a 37°C. Após este intervalo o sobrenadante foi recolhido e avaliado em espectrofotômetro ($\lambda=620\text{nm}$).

3.5 Sobrevida e avaliação da parasitemia

Os animais foram tratados com LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) ou PBS e posteriormente infectados conforme descrito acima (item 3.3). Ao final do sexto dia após a infecção, foi avaliada a parasitemia e os animais foram mantidos em biotério, com o mesmo ambiente acima citado, para avaliação da sobrevida.

A parasitemia foi avaliada por citometria de fluxo, onde 4 µL de sangue foi ressuspenso em 500 uL de PBS contendo 0,1% de azida e a suspensão celular foi imediatamente adquirida em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences), como descrito por Franke-Frayard e colaboradores (45). As escalas de tamanho e granulosidade foram definidas de forma a restringir os eritrócitos totais e o percentual de eritrócitos *PbGFP* infectados foi determinado pela intensidade de fluorescência. Pelo menos 10.000 eventos foram adquiridos no espaço-físico. As análises de dados foram realizadas utilizando software CellQuest (BD Immunocytometry Systems, EUA).

3.6 Análise de parâmetros cognitivos e comportamentais (SHIRPA)

Os parâmetros foram avaliados por meio de uma série de testes selecionados a partir do protocolo SHIRPA (SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment). Antes dos testes, os animais foram conduzidos ao local do experimento para minimizar os efeitos da transferência sobre o resultado dos testes (82). Os aparelhos foram devidamente limpos após a avaliação de cada animal, para evitar a influência de odores durante o teste (83).

Testes SHIRPA

A série de testes SHIRPA foi utilizada nesse estudo para avaliar alterações comportamentais e neurológicas durante o desenvolvimento da infecção por *P. berghei* (84). O SHIRPA é constituído de estudos comportamentais em animais, com metodologia e materiais padronizados e vem sendo utilizada em diferentes estudos (85). Inicialmente são feitas observações quantitativas e semiquantitativas de reflexos e funções sensoriais básicas (86). Esta série de 40 testes é baseada naquela desenvolvida por Irwin (87), e fornece um perfil comportamental e funcional a partir da avaliação do desempenho individual de cada animal (85). Utilizamos apenas alguns testes voltados para os parâmetros cognitivos e comportamentais, afim de avaliar o comprometimento cerebral dos camundongos.

Os testes foram realizados com os animais não infectados, em seguida estes mesmos camundongos foram tratados e infectados conforme descrito acima. Inicialmente, o animal é colocado em recipiente plástico e pesado. A seguir, ele é colocado em uma jarra de observação, localizada sobre uma mesa com fundo branco, e durante cinco minutos avaliamos a 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). Transcorrido o tempo, o animal é transferido para uma arena (“open field”) sem ser manuseado e é observado a excitação de transferência, atividade locomotora (número de entradas, com as quatro patas, em quadrados demarcados na arena em 30 segundos), elevação da cauda, escape ao toque e passividade posicional. O animal é então suspenso pela cauda e avaliado quanto à capacidade de posicionamento visual, força ao agarrar, tônus corporal, beliscada nos dedos da pata traseira e manobra do arame. Em

seguida o animal é colocado em uma grade e precisa virar-se e subir a mesma. A seguir, o animal é contido pelo dorso em uma restrição supina e são avaliados o comprimento corporal, cor da pele, tônus dos membros, tônus abdominal, lacrimejação, salivação, mordida provocada, reflexo postural. Os parâmetros observados foram classificados atribuindo-se pontos numa escala de 0 a 5 para cada comportamento avaliado, onde 0 significa o comportamento normal e 5 impossibilidade de realizar o teste. Ao final os pontos são somados e é determinado um score com base no mesmo animal antes da infecção e após a infecção.

3.7 Mecânica pulmonar

Esta metodologia foi realizada em colaboração com o laboratório de investigação Pulmonar, localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ, sob a coordenação da Dra. Patrícia Rieken Macedo Rocco.

Cinco dias após o início do tratamento, os animais foram sedados (diazepam, 1 mg via i.p.), anestesiados (pentobarbital sódico, 20 mg/kg via i.p.), submetidos a traqueostomia e foram registrados os sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Em seguida os animais foram paralisados com brometo de vecurônio ($0,005 \text{ mg/kg}^{-1}$ via i.v.) e mecanicamente ventilados com um ventilador de fluxo constante (Samay VR15; Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay) utilizando os seguintes parâmetros: taxa respiratória = 100 respirações/min, volume corrente (V_t) = 0.2ml, fração e inspiração de oxigênio (F_{iO_2}) = 0.21. A parte anterior da caixa torácica foi removida cirurgicamente, de forma a preservar os pulmões. Imediatamente antes da perfuração do diafragma foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP - positive end-expiratory pressure) de 2 cmH_2O . A utilização da PEEP evita o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica. Após 10 minutos do período de ventilação, a mecânica pulmonar foi apurada. Os parâmetros da mecânica respiratória foram obtidos através do método da oclusão ao final da inspiração (88).

O método de oclusão ao final da inspiração permite analisar os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão (89-92). 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 $P_{el,L}$ 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 (ΔP_1) que corresponde a Pressão máxima menos P_i , pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta (ΔP_2), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inomogêneo 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.

Os dados da mecânica pulmonar foram obtidos pelo menos 10 vezes em cada animal e analisados usando o software de análise ANADAT (RHT-InfoData, Inc., Montreal, Quebec, Canada).

3.8 Preparação dos pulmões para histologia, dosagem de citocinas e quimiocinas e contagem total e diferencial de leucócitos periféricos

No quinto dia de infecção, foi feita a contagem de leucócitos total em câmara de Neubauer utilizando líquido de Türk (ácido acético 2%) e a distensão sanguínea dos animais. As lâminas foram coradas em panótico (Panótico rápido – Laborclin – Brasil) para fixação e coloração das células. A contagem diferencial de células se deu por microscopia óptica em óleo de imersão, contando 100 células/lâmina. Os resultados foram expressos em função do número de leucócitos totais. Após, os animais foram sedados com xilazina/quetamina (20 mg/ml e 50 mg/ml respectivamente) e anestesiados com Hypnol 3% (pentobarbital sódico). Após 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. Ao final, parte dos camundongos tiveram seus órgãos retirados, fixados em formalina (formaldeído 37%) durante 72 horas, clivados e embebidos em parafina

líquida. Foram então submetidos a microtomia, obtendo-se cortes de 4 µm de espessura e de forma seriada, respeitando um intervalo de 80 µm entre eles. Após esta etapa, o material foi submetido à desidratação em soluções hidroalcoólicas de concentrações crescentes, à clarificação em xilol e, em seguida à coloração com hematoxilina e eosina (HE), foram montados em lâminas de vidro com meio próprio (goma damar) para análise morfológica geral em microscópio óptico. Os animais restantes tiveram seus pulmões extraídos e macerados com os respectivos tampões para análise de citocinas e quimiocinas através de ELISA, e atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO).

3.9 Avaliação atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima mieloperoxidase, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando metodologia de Bradley e colaboradores (93) modificada por De Young e colaboradores (94).

Após o modelo de infecção e tratamento *in vivo*, os animais foram eutanasiados e seus pulmões foram extraídos e macerados com 1 ml de solução de Hanks (9,7 g/L; sem cálcio e sem magnésio). As amostras foram centrifugadas a 1952 G por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet homogeneizado com 500 µl de NaCl 0,2%, em seguida homogeneizado novamente com NaCl 1,6%. As amostras foram centrifugadas mais uma vez como descrito, o sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspensionado em 1 mL de hexadeciltrimetilamônio brometo (HTAB). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1700 G por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 15300 G por 15 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido para análise da atividade MPO. Para isso, as amostras foram plaqueadas com solução de Hank's e orto-Dianisidina e reservadas por 15 minutos a 37°C. Foi então adicionado 50 µL de H₂O₂ e reservadas por 10 minutos a 37°C. A reação foi parada utilizando 50 µL de azida sódica 1% e a atividade enzimática foi determinada através de leitura em espectrofotômetro (SpectraMax M5 – EUA) a 460nm. Em seguida, o mesmo sobrenadante recolhido para quantificação foi submetido a dosagem de proteína pelo método de Bradford, utilizando o guia fornecido pelo fabricante: Sigma-Aldrich. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M5 – EUA) a 595 nm. A concentração de proteína nas amostras foi determinada a partir de valores

obtidos com a curva padrão realizada com diferentes diluições de albumina de soro bovino (BSA). Os resultados foram expressos em quantidade de MPO ativa em relação a quantidade de proteína presente.

3.10 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

As concentrações de IL-6, TNF- α , IL-10, CXCL1 e CCL2 em extrato pulmonar, assim como de CXCL1 e CCL2 no soro, foram realizadas através do ensaio enzimático ELISA, utilizando-se kits comerciais da R&D Systems. Os pulmões foram macerados em 1 mL de tampão de lise celular (Cell lysis buffer). As amostras foram centrifugadas a 10.000 G por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e avaliado.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M5 – EUA) a 490nm. A concentração das citocinas nas amostras foi determinada a partir de valores obtidos com a curva padrão realizada com diferentes diluições da proteína recombinante fornecida pelo fabricante.

3.11 Isolamento de células da medula óssea para análise do perfil celular e ensaio de migração

Os animais foram anestesiados e submetidos a perfusão com solução salina heparinizada como descrito anteriormente.

O fêmur e a tíbia foram cirurgicamente removidos e as epífises ósseas foram retiradas. Utilizando uma agulha de 21 G, a medula óssea foi lavada com 2 mL de solução de Hank's (sem cálcio e sem magnésio) contendo 0.5 mL de citrato de sódio 1.8%. O lavado foi submetido a centrifugação a 400 G por 15 minutos a 20°C, com aceleração e desaceleração mínimas. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 2 mL de Solução de Hank's.

3.11.1 *Análise do perfil de maturação e apoptose de neutrófilos*

As células obtidas no isolamento da medula óssea foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placa de 96 poços com fundo em U numa

concentração de 10^6 células/poço. A placa foi centrifugada e o sobrenadante descartado.

As células foram incubadas por 30 minutos com PBS contendo 0,1% de azida e 10% soro bovino fetal, para inativação dos sítios inespecíficos. Os anticorpos foram diluídos em PBS azida 0,1%, ambos na proporção de 1:100 e as células foram marcadas incubadas por 30 minutos na solução. As marcações foram feitas com os seguintes anticorpos: anti-Ly6G (FITC) para determinação dos neutrófilos; anti-CD11b para avaliação da maturação; anexina V (APC) e iodeto de propídeo (PI) para análise de morte celular. Ao término da marcação, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Beckton Dickinson - EUA). Os granulócitos foram selecionados primeiramente de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) e a porcentagem de neutrófilos anti-Ly6G⁺ foi determinada através de uma região física correspondente a fluorescência do anticorpo. Pelo menos 10.000 eventos foram adquiridos na região física correspondente aos neutrófilos. Para análise da maturação, foi determinada uma região física, de acordo com a expressão de CD11b⁺ entre as células Ly6G⁺. A avaliação da morte celular por necrose e apoptose foi realizada através da marcação com anexina V e iodeto de propídeo (PI) na região de células Ly6G⁺. A análise foi feita no software Flowjo.

3.11.2 *Ensaio de migração de neutrófilos*

As células obtidas da medula óssea no item 3.11 foram submetidas ao gradiente de percoll 65% e 72% para separação dos polimorfonucleares presentes. Uma vez montado, os gradientes foram centrifugados a 1200 G por 35 minutos a 20°C com aceleração e desaceleração mínimas. As células foram recolhidas do anel intermediário entre os níveis de percoll, lavadas (centrifugação a 400 G por 15 minutos a 20°C), contadas em contador de partículas (Beckman Coulter – EUA) e foram preparadas lâminas para verificação dos níveis de pureza. Nos experimentos só foram utilizados gradientes com pureza $\geq 90\%$.

A quimiotaxia e quimiotaxia foram realizadas em câmara de 48 poços (câmara de Boyden – Neuro Probe Inc. – EUA) com membrana de policarbonato (filtro de policarbonato de 5 μm , Neuro Probe – EUA) conforme preconizado por Arraes e colaboradores (95). Para a quimiotaxia, os neutrófilos foram plaqueados no poço superior (2×10^5 células/mL) e migraram em direção a quimiocina CXCL1 (30 ng/mL) ou plasma proveniente de animal não infectado ou infectado com *P. berghei*, ambos plaqueados no poço inferior. Como controle negativo, utilizou-se meio RPMI

(RPMI-1640 medium, Sigma-Culture - USA). Na quimiocinese os neutrófilos isolados da medula óssea foram plaqueados em câmara de Boyden, onde não havia estímulo nos poços inferiores, somente meio RPMI.

Para o tratamento *in vitro* dos neutrófilos, as células provenientes de animais não infectados foram isoladas, pré-tratadas com lipoxina A₄ (10nM) ou BOC -2 e LXA₄ (40 nM e 10nM, respectivamente) por 1 hora e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ antes do estímulo, sendo reservado um grupo controle no qual foi utilizado apenas meio RPMI puro. Em seguida, os poços foram lavados e as células foram plaqueadas em câmara de Boyden para avaliação da migração frente aos estímulos CXCL1 ou plasma, como descrito anteriormente.

Uma vez colocadas em câmara de Boyden, a mesma foi incubada por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A câmara foi então desmontada para retirada da membrana que foi corada em panótico (Panótico rápido – Laborclin – Brasil) para fixação e coloração das células. Em seguida, os neutrófilos foram contados em microscópio ótico (1000x) abrangendo 15 campos seguidos na linha média de cada poço. O experimento foi realizado em quadruplicata e os resultados expressos em número de neutrófilos/campo.

3.12 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Eles foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA) e do pós-teste de Bonferroni. O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida. Em ambos os testes foi considerando significativa os valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Como demonstrado na literatura, a LXA₄ é um mediador anti-inflamatório que possui um papel anti-inflamatório durante a malária cerebral experimental (81). Para avaliar o papel da LXA₄ em nosso modelo de malária grave, realizamos uma dose resposta afim de obter a melhor concentração de trabalho. Observamos que o efeito da LXA₄ é dose dependente, onde somente a menor dose (0,5µg/Kg/dia) foi capaz de inibir a formação de edema cerebral (**figura 1A**), sem, com isso alterar os níveis de parasitemia (**figura 1B**). Durante o desenvolvimento da malária grave experimental induzida pela infecção por *P. berghei* em camundongos C57Bl/6, a maior parte dos animais morrem entre 5 a 9 dias quando apresentam sintomas de comprometimento neurológico (**figura 1C**, área cinza). O pré-tratamento com LXA₄ protegeu 60% dos camundongos infectados no período de morte por malária cerebral (**figura 1C**) assim como diminuiu os indices de avaliação de disfunção cerebral causado pela infecção (**figura 1D**).

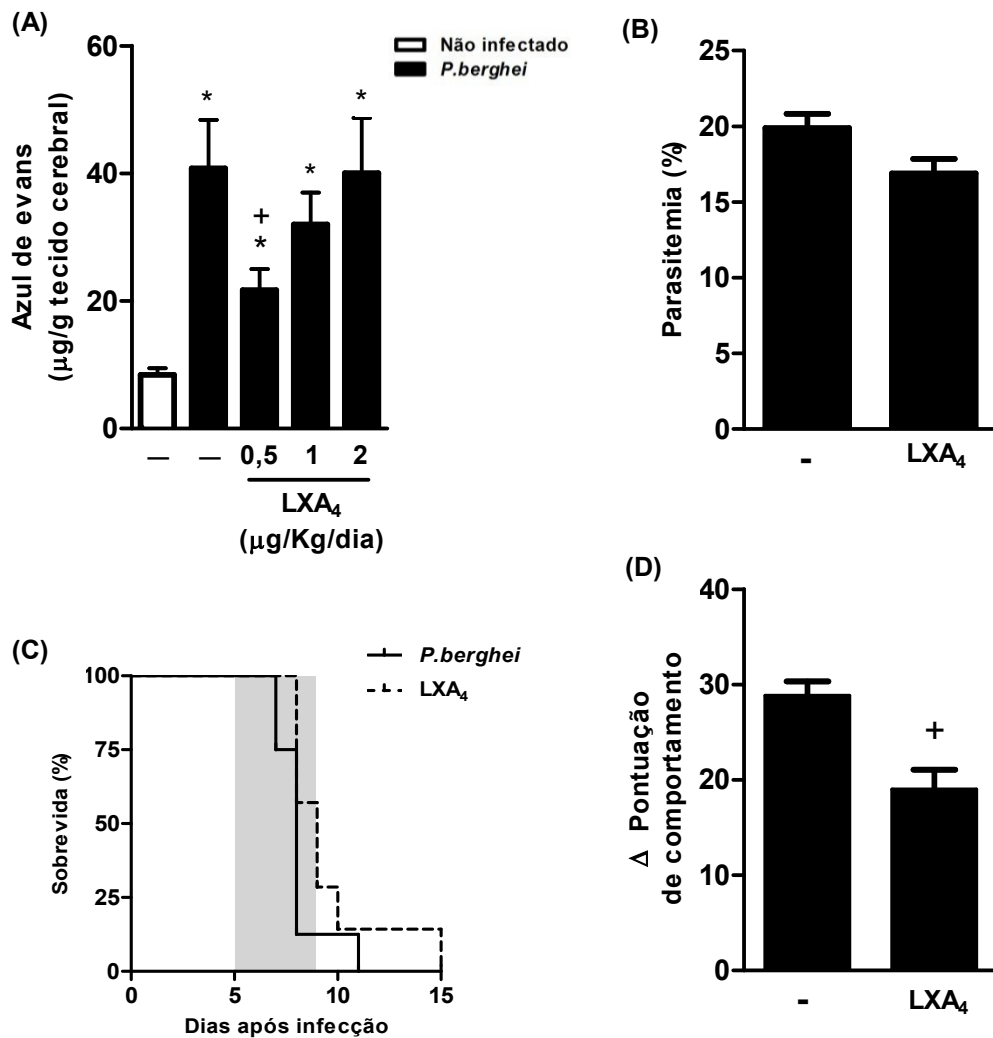


Figura 1 – Dose resposta de LX A₄. Efeito do tratamento com diferentes doses de LX A₄ (0,5; 1 ou 2 $\mu\text{g/kg/dia}$) em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* no modelo de edema cerebral. **(A)** Edema cerebral em animais não infectados (barra branca), animais infectados com *P. berghei* (barra preta) tratados ou não com LX A₄. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entres os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*), ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados. **(B)** Parasitemia, avaliada através de citometria de fluxo, de animais infectados tratados ou não com LX A₄ (0,5 $\mu\text{g/kg/dia}$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste *t*; $p \leq 0,05$) são expressas por (+). **(C)** Sobrevida de animais infectados com *P. berghei* não tratados ou pré-tratados com LX A₄ (0,5 $\mu\text{g/kg/dia}$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 12 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste de Log-rank (Mantel-Cox) $p \leq 0,05$) entres os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*). **(D)** Pontuação de comportamento de animais submetidos a alguns testes selecionados do SHIRPA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste *t*; $p \leq 0,05$) são expressas por (+).

Assim como o parâmetro cerebral, outro comprometimento estudado durante a malária grave experimental é a SRAS. No modelo experimental utilizando *P. berghei* em camundongos C57Bl/6, ocorre edema pulmonar, infiltrado inflamatório, bem como disfunção do órgão (43). Em nosso estudo constatamos que o pré tratamento com a LXA₄ foi capaz de reduzir a formação de edema pulmonar causado pela infecção (**figura 2A**), bem como diminuir a elastância estática (Est) (**figura 2B**), a pressão de resistência ($\Delta P1$) (**figura 2C**) e a viscoelasticidade ($\Delta P2$) (**figura 2D**) quando comparados ao grupo infectado não tratado.

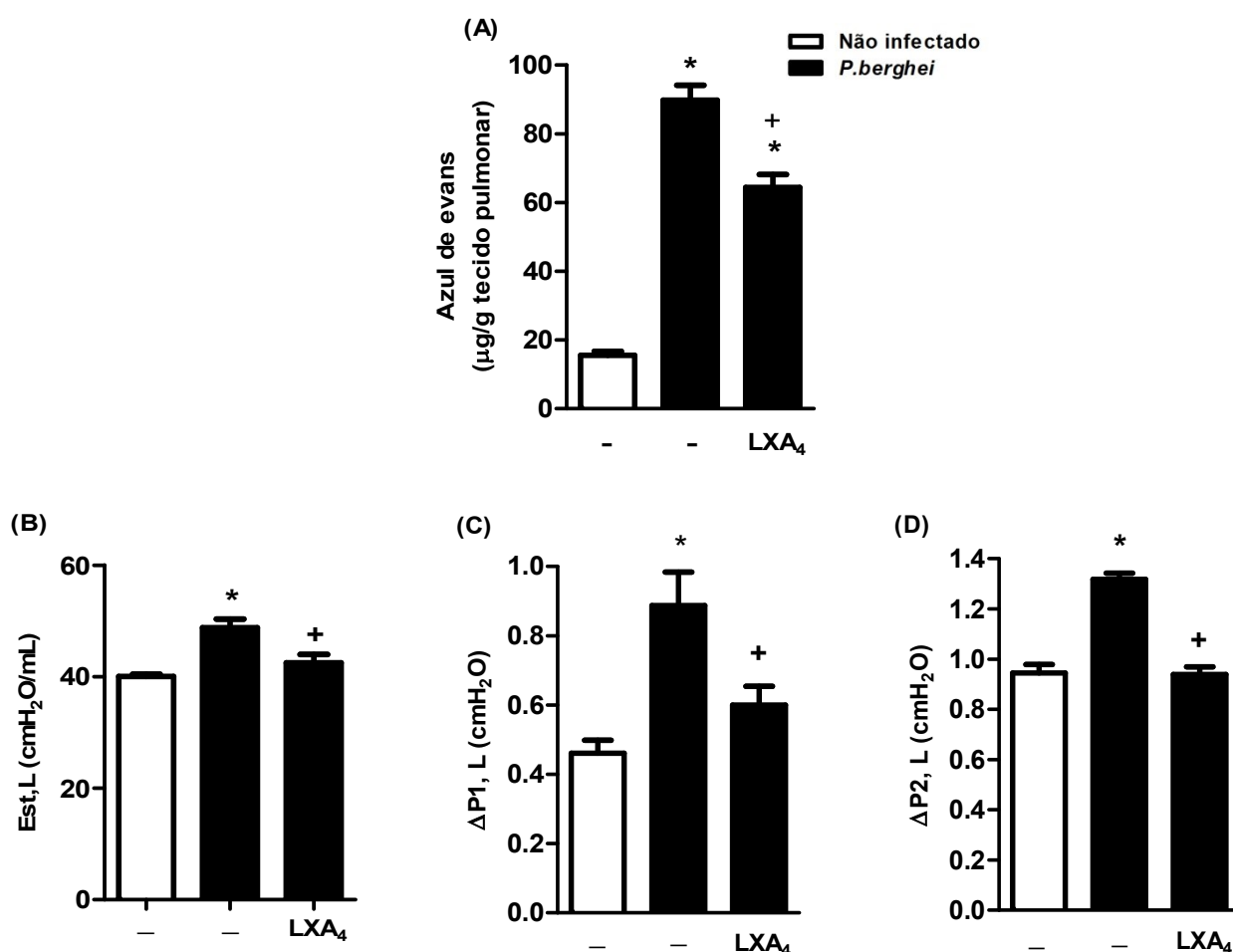


Figura 2– Efeito do pré-tratamento com LXA₄ durante o desenvolvimento da SARS. Efeito do pré-tratamento com LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) durante o desenvolvimento da SARS induzida por *P. berghei* em camundongos C57Bl/6. (A) Edema pulmonar; (B) elastância estática (Est); (C) pressão de resistência ($\Delta P1$) e (D) viscoelasticidade ($\Delta P2$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo (10 a 15 aferições por animal). As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entre os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*), ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados.

Realizamos a análise histológica dos pulmões dos camundongos submetidos a mecânica pulmonar para que pudéssemos visualizar o comprometimento tecidual. De acordo com a análise histológica dos pulmões (**figura 3**), o grupo infectado, quando comparado ao grupo não infectado, apresentou pontos hemorrágicos, aumento do espessamento da parede alveolar e grande influxo inflamatório. No entanto, o tratamento com LXA₄ foi capaz de preservar a arquitetura tecidual, apresentando diminuição tanto nos pontos hemorrágicos, como no espaçamento alveolar e no infiltrado inflamatório celular.

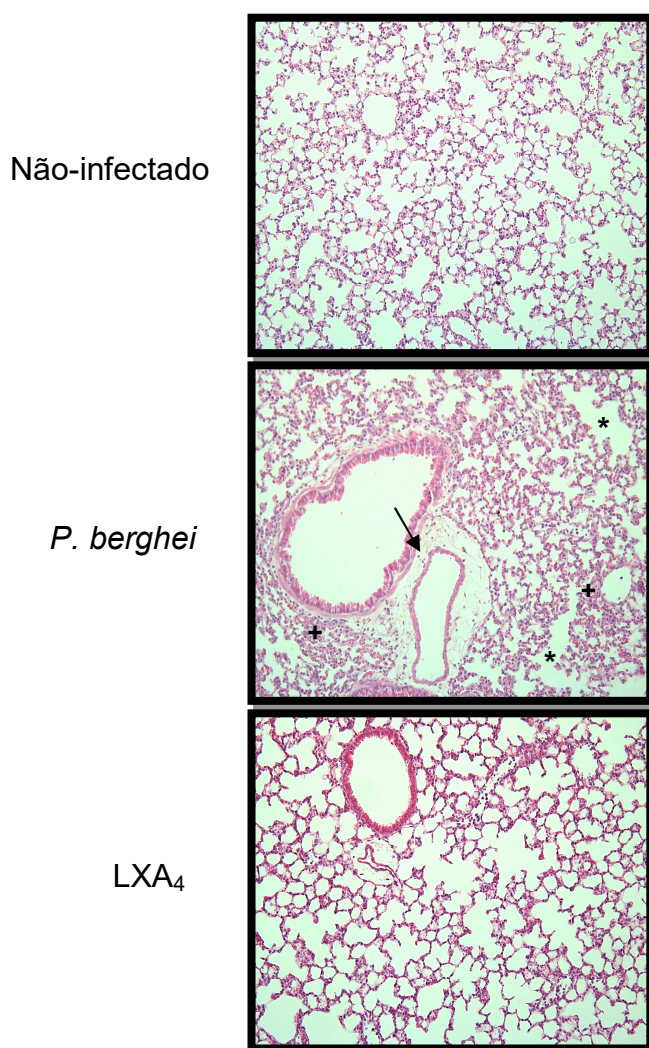


Figura 3 – Análise morfológica dos pulmões. Corte histológico de pulmão de camundongos C57Bl/6 6 dias após a infecção por *P. berghei*. Parte dos animais infectados foram tratados com LXA₄. Os pulmões foram recolhidos, processados, cortados e as lâminas coradas por HE conforme descrito na seção de Material e Métodos. Setas indicam o espessamento peribronquialveolar; (*) indicam quebra de septo alveolar; (+) indicam infiltrado inflamatório.

Para corroborar os resultados obtidos através da análise histológica, analisamos indiretamente a presença de neutrófilos no tecido pulmonar. O ensaio para determinar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nos pulmões de camundongos infectados por *P. berghei* demonstrou que durante a infecção no tecido, ocorre um aumento da atividade da MPO quando comparada ao grupo não infectado. No entanto, o tratamento com LXA₄ foi capaz de diminuir a atividade de MPO no tecido pulmonar (**figura 4**).

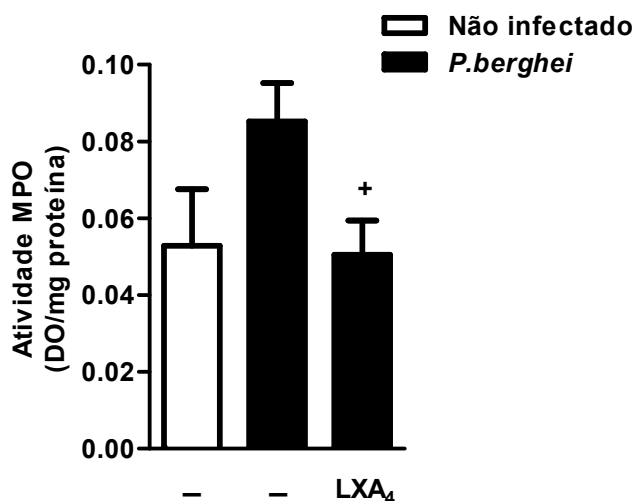


Figura 4 – Atividade de MPO em tecido pulmonar após tratamento com LXA₄
Atividade de MPO em tecido pulmonar de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei*, tratados ou não com LXA₄ (0,5 µg/kg/dia). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entre os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*), ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados.

Conforme descrito anteriormente, o desenvolvimento da SRAS durante a malária experimental depende da presença de infiltrado inflamatório (52). Uma vez observada a diminuição de células inflamatórias no tecido pulmonar, avaliamos o papel da LXA₄ na produção de citocinas como IL-6, TNF- α e IL-10, que estão ligadas à patogênese da malária (48) e ao desenvolvimento da SRAS de origem infecciosa (96, 97).

De fato, os animais infectados apresentaram um aumento de IL-6 (**figura 5A**), TNF- α (**figura 5B**), CXCL1 (**figura 5C**) e CCL2 (**figura 5D**) quando comparados com animais não infectados. Entretanto, não foi observada alteração na produção IL-10 (**figura 5C**) quando comparado com o grupo não infectado. Foi observado que o tratamento com LXA₄ não alterou a produção de IL-6 (**figura 5A**), TNF- α (**figura 5B**), CXCL1 (**figura 5C**) e CCL2 (**figura 5D**) quando comparada ao grupo infectado sem tratamento, no entanto foi capaz de induzir o aumento de IL-10 (**figura 5C**) no tecido em relação aos grupos controle (infectado e não-infectado).

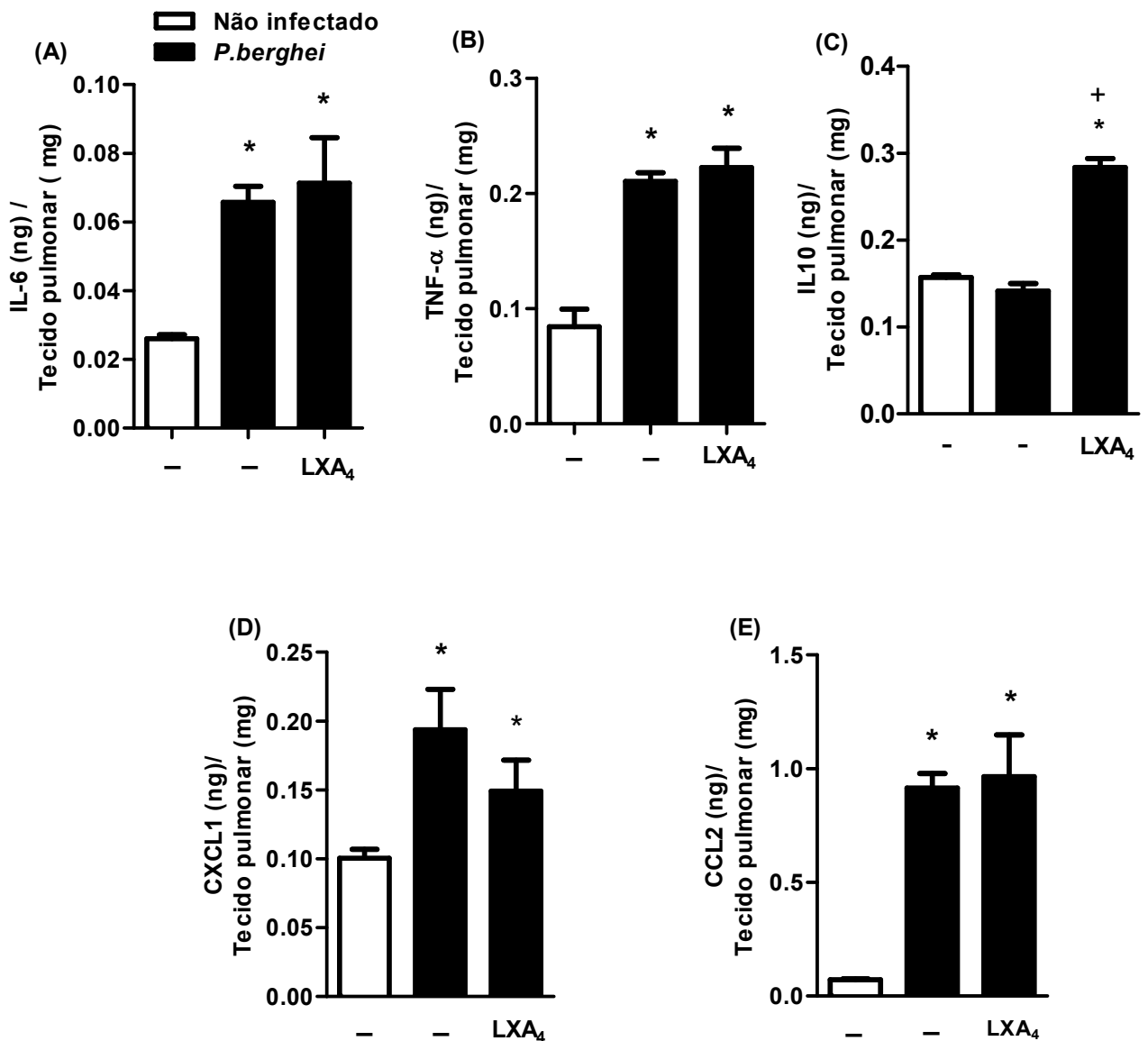


Figura 5– Produção de citocinas e quimiocinas em tecido pulmonar durante tratamento com LXA₄ Produção de citocinas e quimiocinas em tecido pulmonar de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei*, tratados ou não com LXA₄ (0,5 μ g/kg/dia). Dosagens de IL-6 (A), TNF- α (B), IL-10 (C), CXCL1 (D) e CCL2 (E) em tecido pulmonar, foram determinadas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entre os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*) ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados.

Na **figura 6**, observa-se que a infecção por *P. berghei* foi capaz de induzir o aumento de leucócitos totais (**figura 6A**) e neutrófilos (**figura 6B**) na circulação periférica, levando também a um aumento de mononucleares (**figura 6C**) quando comparados ao grupo não infectado. O tratamento com LXA₄ reduziu o número de leucócitos periféricos, assim como neutrófilos e mononucleares circulantes. Utilizamos o BOC-2 como antagonista do receptor FPR1 (receptor da LXA₄), afim de comprovar o efeito do tratamento e observamos que o BOC-2 reverteu os efeitos da LXA₄, exceto na contagem de mononucleares, onde o número de células diminuiu em relação ao grupo infectado.

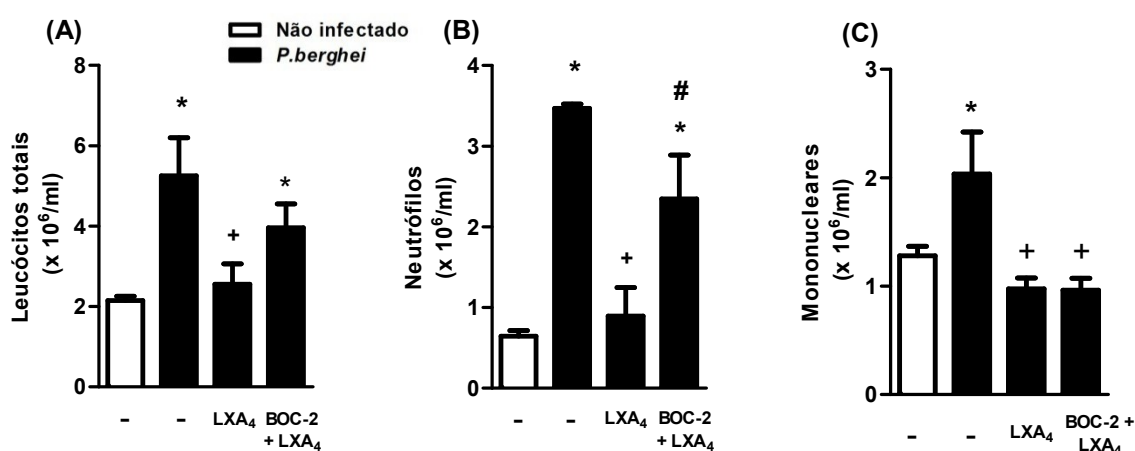


Figura 6 - Efeito do pré-tratamento com LXA₄ na contagem de leucócitos total e diferencial Efeito do pré-tratamento com LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) ou BOC-2 (1mg/kg/dia) + LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) sobre número de leucócitos totais (**A**), neutrófilos (**B**) e mononucleares (**C**) periféricos durante infecção por *P. berghei* em camundongos C57Bl/6. A contagem de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer enquanto a contagem de neutrófilos e mononucleares foi realizada em distensão sanguínea utilizando coloração por panótico. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entre os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*) ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados e (#) indica a diferença entre os grupos infectados tratados.

Uma vez observada a diminuição de neutrófilos periféricos após tratamento com LXA₄, dosamos a quimiocina CXCL1 no plasma (**figura 7A**). Observamos que a infecção por *P. berghei* induziu o aumento dos níveis de CXCL1 no plasma quando comparado ao grupo não infectado. Tal aumento foi inibido após tratamento com a LXA₄. Verificamos que ao utilizamos o BOC-2, ocorre um aumento na produção de CXCL1 semelhante ao observado no grupo infectado (**Figura 7A**).

A **figura 7B** mostra que o soro de animais infectados induz a quimiotaxia de neutrófilos, no entanto quando a quimiocina CXCL1 presente no plasma foi neutralizada com anticorpo anti-CXCL1, os níveis de migração dos neutrófilos caem mas permanecem aumentados em relação grupo estimulado com soro de animal normal

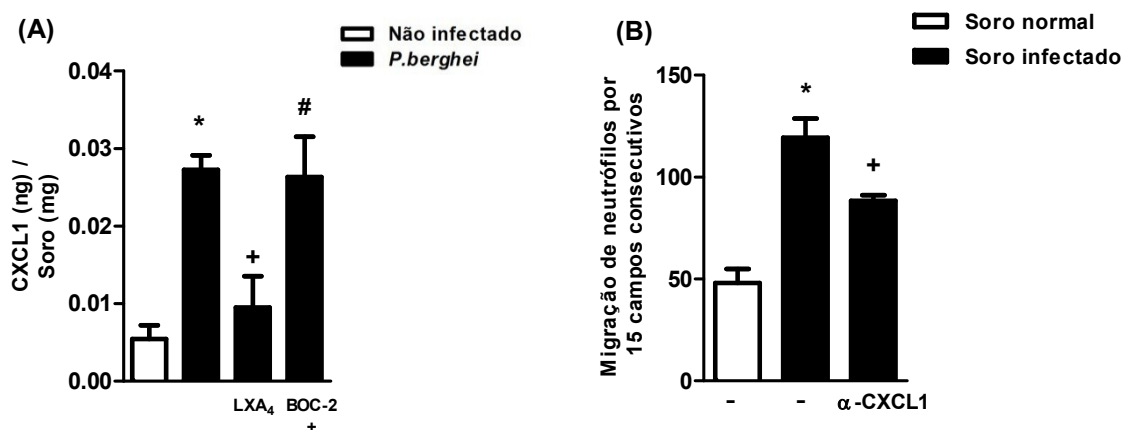


Figura 7 - Participação do CXCL1 na migração de neutrófilos (A) Produção de CXCL1 em soro de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei*, tratados ou não com LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) ou LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) + BOC-2 (1mg/kg/dia), determinada pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. **(B)** Quimiotaxia de neutrófilos retirados da medula de camundongos não infectados e estimulados *in vitro* com plasma recolhido de camundongos não infectados ou 5 dias após a infecção com *P. berghei*. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entres os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*) ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados e (#) indica a diferença entre os grupos infectados tratados.

Uma das hipóteses levantadas para a diminuição dos números de neutrófilos no sangue após tratamento com LXA₄ seria a apoptose dos mesmos ainda na medula óssea. Observamos na **Figura 8** que a infecção por *P. berghei* induz a apoptose tardia de neutrófilos quando comparado ao grupo não infectado, porém o tratamento com LXA₄ ou LXA₄ e BOC-2, mantiveram os níveis equivalentes ao grupo infectado (**figura 8A**).

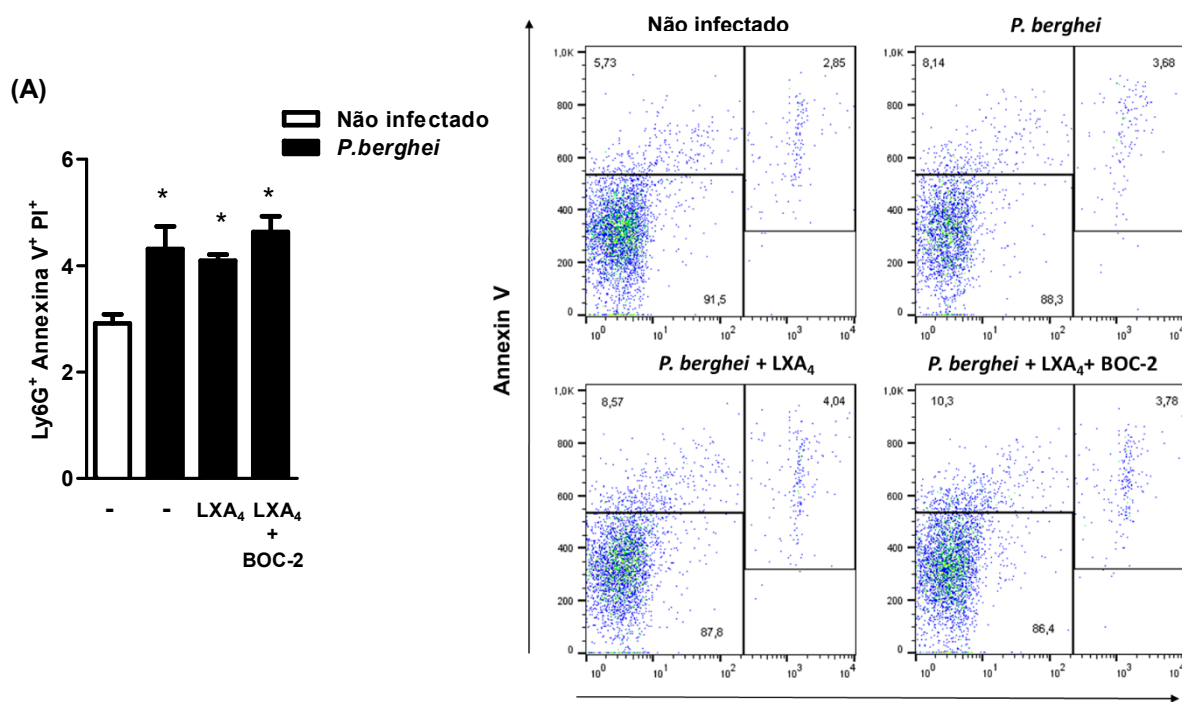


Figura 8– Efeito do pré-tratamento da LXA₄ na apoptose induzida em neutrófilos Efeito do pré-tratamento da LXA₄ na apoptose induzida em neutrófilos retirados da medula óssea de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei* e tratados ou não com LXA₄ (0.5µg/kg/dia) ou LXA₄ (0.5µg/kg/dia) e BOC-2 (1mg/kg/dia). **(A)** Neutrófilos foram marcados com anticorpo anti-Ly6G, anexina V e iodeto de propídeo (PI), adquiridos no citômetro de fluxo (FACS) e os dados foram analisados no FlowJo. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entres os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*). **(B)** Dotplots representativos mostrando a porcentagem de células Ly6G⁺/anexina V⁺/PI⁺ na medula óssea de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei* e tratados ou não com LXA₄.

Visto que o tratamento diminuiu o número de neutrófilos periféricos, no entanto sem induzir a apoptose dos mesmos na medula óssea, investigamos a possibilidade de a LXA₄ modular a atividade dos neutrófilos dentro da medula óssea. Foi observado que a infecção por *P. berghei* diminui a porcentagem de neutrófilos Ly6G⁺ na medula óssea quando comparado a animais não infectados (**figura 9A e C**). O tratamento com a LXA₄ aumentou a porcentagem de neutrófilos, mas sem retornar aos níveis basais. Já o tratamento com BOC-2 não reverteu o efeito da LXA₄ (**figura 9A e C**). Foram avaliados, ainda, a porcentagem de neutrófilos maduros na medula óssea através da identificação das células CD11b^{hi}. Verificamos que a infecção por *P. berghei* induz o aumento da porcentagem de neutrófilos maduros na medula, no entanto nem o tratamento com a LXA₄, ou o tratamento com LXA₄ + BOC-2 foram capazes de modular esses valores (**figura 9B e C**).

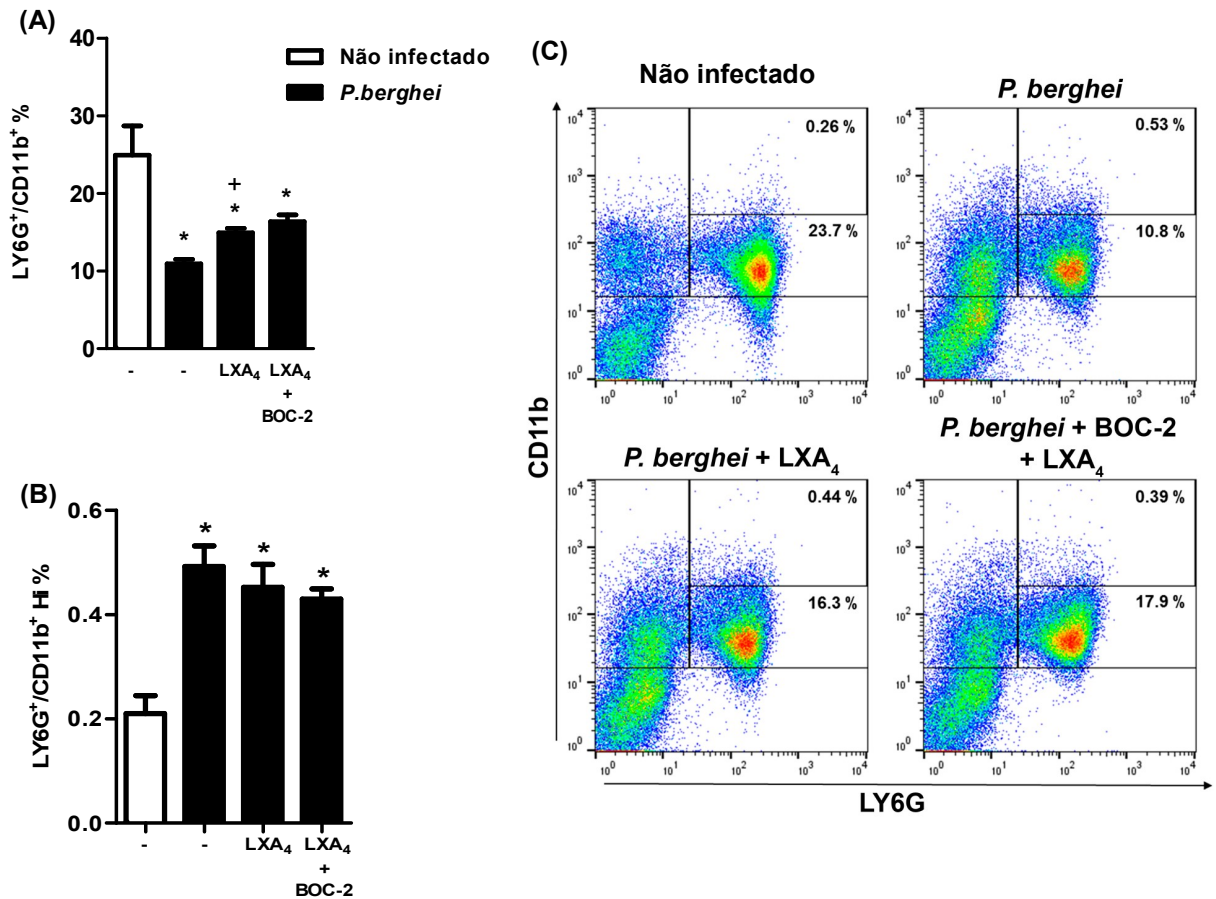


Figura 9 – Efeito do pré-tratamento com LXA₄ na maturação de neutrófilos. Efeito do pré-tratamento com LXA₄ na maturação de neutrófilos na medula óssea de camundongos C57Bl/6 infectados ou não com *P. berghei*, tratados ou não com LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) ou LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) e BOC-2 (1mg/kg/dia). Neutrófilos foram marcados com anticorpo anti-Ly6G e anti-CD11b, adquiridos no citômetro de fluxo (FACS) e os dados foram analisados no FlowJo. **(A)** Percentual total de neutrófilos em diferentes estágios de maturação na medula óssea; **(B)** Percentual de neutrófilos maduros localizados na medula óssea. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entres os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*) ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados. **(C)** Dotplots representativos mostrando a porcentagem de células Ly6G⁺/CD11b⁺ na medula óssea de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei* e tratados ou não com LXA₄ ou LXA₄ e BOC-2.

Em seguida avaliamos se a LXA₄ estaria interferindo na migração dos neutrófilos. Inicialmente avaliamos o efeito do tratamento *in vivo* com LXA₄ sobre a mobilidade espontânea dos neutrófilos. Em ensaio de quimiotaxia verificamos que neutrófilos oriundos de medula óssea de camundongos infectados por *P. berghei* migram espontaneamente em maior número que neutrófilos oriundos de camundongos não infectados. De maneira interessante, o tratamento *in vivo* com LXA₄ reduziu a taxa de migração espontânea; tal redução foi revertida após tratamento com BOC-2 (**figura 10A**).

Posteriormente, avaliamos se a re-estimulação *in vitro* modularia a capacidade migratória dos neutrófilos retirados de camundongos não infectados ou infectados por *P. berghei*, tratados ou não com LXA₄ ou LXA₄ e BOC-2. Primeiramente submetemos os neutrófilos a quimiotaxia utilizando soro de animal não infectado como estímulo migratório e verificamos o mesmo padrão de resposta, onde neutrófilos de animais infectados migraram mais que neutrófilos de animais não infectados (**figura 10B**). Neutrófilos de camundongos infectados com *P. berghei* e tratados com LXA₄ migraram menos quando comparados a neutrófilos de animais infectados e o co-tratamento com BOC-2 reverteu este padrão migratório (**figura 10B**). Em seguida, estimulamos os neutrófilos com soro de animais infectados e observamos que neutrófilos recolhidos de camundongos não infectados migram em maior número quando comparado com a taxa migratória de neutrófilos que receberam soro de animais não infectados como estímulo migratório (**figura 10C**). Porém os neutrófilos recolhidos dos animais infectados, sejam eles tratados ou não, tiveram um perfil migratório semelhante ao visto nos gráficos mostrados na **figura 10A e 10B**, ou seja, mesmo com a re-estimulação não houve aumento do nível de migração dos neutrófilos, e a LXA₄ permaneceu impedindo a migração dos mesmos (**figura 10C**).

Ao utilizarmos a 15-epi-LXA₄, um análogo estável da LXA₄, na avaliação da migração de neutrófilos da medula óssea de camundongos infectados com *P. berghei*, observamos os mesmos resultados das **figuras 10A, 10B e 10C**, onde o tratamento *in vivo* com 15-epi-LXA₄ foi capaz de inibir as taxas de migração tanto na quimiotaxia (**figura 10D**) quanto na quimiotaxia (**Figura 10E**).

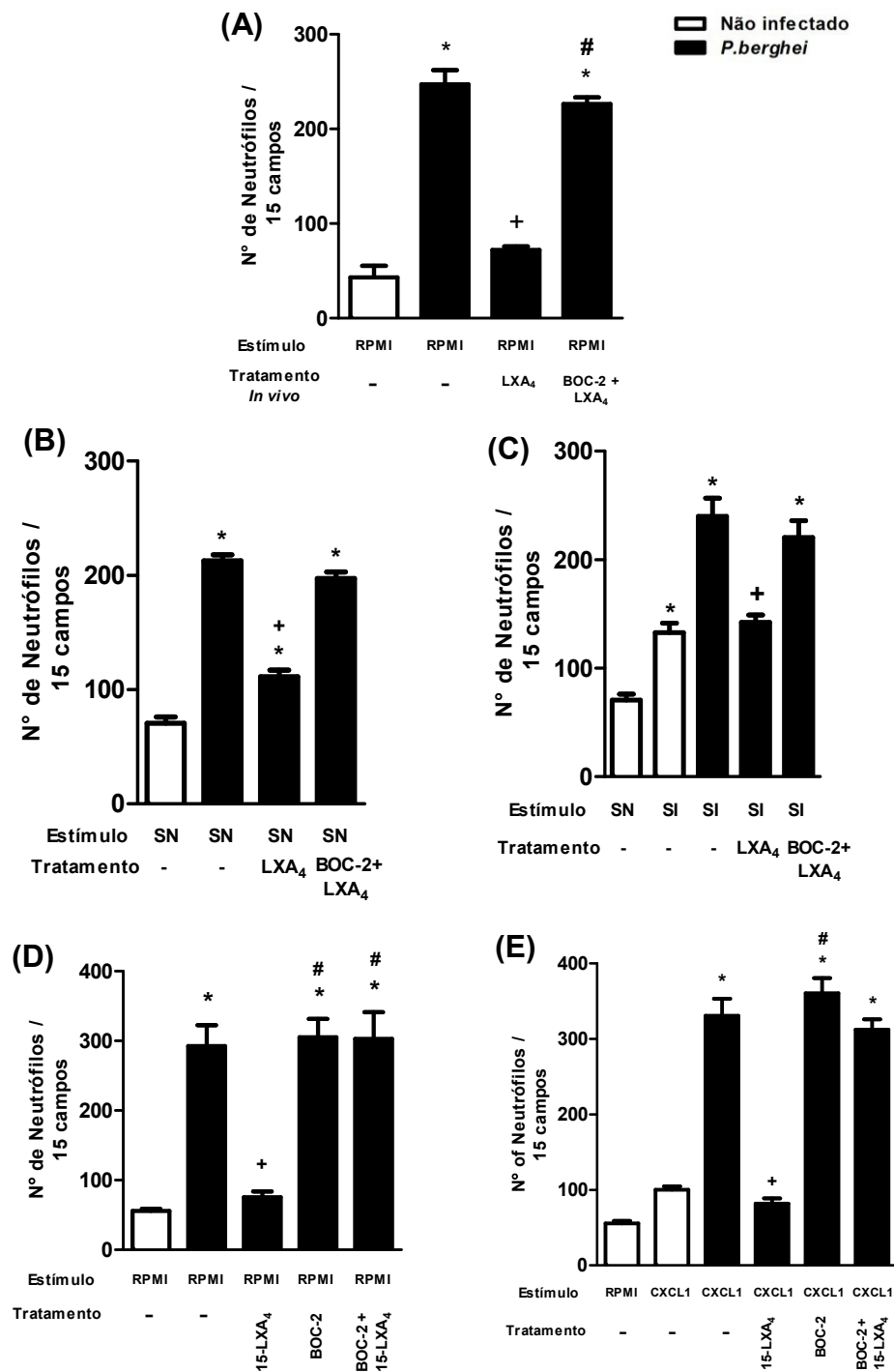


Figura 10 – Avaliação do efeito do pré-tratamento com a LXA₄ na migração de neutrófilos ex vivo. Quimiocinese (A), quimiotaxia utilizando como estímulo soro de animal não infectado (SN) (B) e quimiotaxia utilizando como estímulo soro de animais infectados com *P. berghei* (SI) (C) de neutrófilos retirados da medula óssea de camundongos C57Bl/6 infectados ou não com *P. berghei*, tratados ou não com LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) ou LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) e BOC-2 (1mg/kg/dia). Efeito do pré-tratamento *in vivo* com 15-epi-LXA₄ (0,5 µg/Kg/dia) na quimiocinese (D) e quimiotaxia utilizando como estímulo CXCL1 (E) de neutrófilos retirados da medula óssea de camundongos C57Bl/6 infectados ou não com *P. berghei*, tratados ou não com 15-epi-LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) ou 15-epi-LXA₄ (0,5 µg/kg/dia) e BOC-2 (1mg/kg/dia). Os ensaios foram realizados em câmara de Boyden. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entres os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*) ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados e (#) indica a diferença entre os grupos infectados tratados.

Nossos resultados sugerem que a LXA₄, em nosso modelo *in vivo*, esteja de alguma forma atuando no neutrófilo, impedindo a sua migração. Portanto avaliamos se a ação é direta através do ensaio de tratamento *in vitro* com a LXA₄. Neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos não infectados foram pré-tratados *in vitro* com LXA₄ (10 nM) ou BOC-2 e LXA₄ (40 nM e 10 nM, respectivamente), em seguida foram colocados em câmara de Boyden para migrar frente aos estímulos soro de animal infectado ou não (**figura 11A**) ou CXCL1 (**figura 11B**). Novamente observamos que o soro oriundo de animal infectado é capaz de induzir a migração. Verificou-se, também, que o tratamento com LXA₄ manteve o mesmo padrão de resposta da quimioquinesa e quimiotaxia *in vivo*, onde o tratamento inibiu a migração de neutrófilos quando comparado ao grupo estimulado com soro infectado (**figura 11A**) ou com o grupo estimulado com CXCL1 (**figura 11B**). A adição de BOC-2 ao tratamento com a LXA₄ reverteu a inibição causada pela LXA₄ tanto quando os neutrófilos foram estimulados com soro de animais infectados (**figura 11A**) quanto por CXCL1 (**figura 11B**).

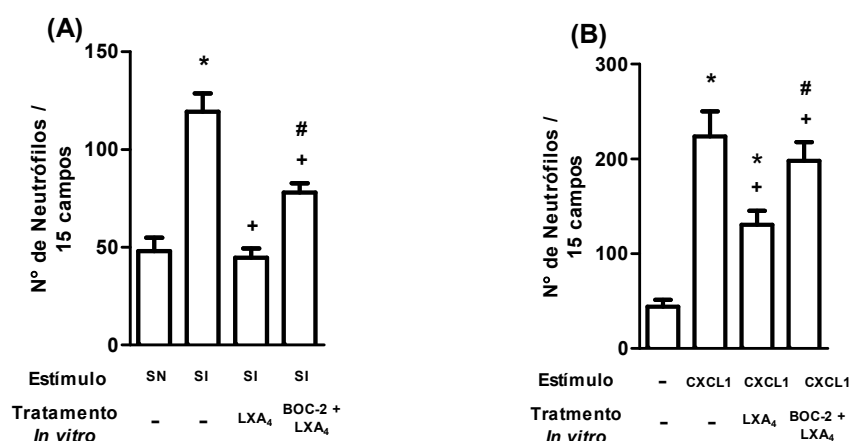


Figura 11 – Efeito do pré-tratamento *in vitro* de LXA₄ na migração de neutrófilos estimulados *in vitro*. Efeito do pré-tratamento *in vitro* de LXA₄ (10 nM) ou BOC-2 e LXA₄ (40 nM e 10 nM, respectivamente) na migração de neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos não-infectados. Quimiotaxia de neutrófilos utilizando como estímulo soro de animal não infectado (SN), soro de animais infectados com *P. berghei* (SI) (**A**); ou CXCL1 (**B**). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos independentes. As diferenças estatisticamente significativas (teste *one-way* ANOVA e Bonferroni; $p \leq 0,05$) entres os grupos infectado e não-infectado são indicados por um (*) ao passo que (+) indica as diferenças entre os grupos infectados e (#) indica a diferença entre os grupos infectados tratados.

5. DISCUSSÃO

A malária grave é uma doença que mata cerca de 2 milhões de pessoas no mundo anualmente (98) e é caracterizada pela presença de uma ou mais patologias específicas como edema cerebral, síndrome respiratória aguda severa (SRAS), lesão renal aguda e disfunção de diversos órgãos. Atualmente o tratamento da malária visa apenas a eliminação do parasita, no entanto, alguns autores sugerem que a modulação da resposta inflamatória causada durante a infecção deva ser concomitante à administração do antimalárico (56, 99). Ainda assim, não está claro se o tratamento visando a melhora da SRAS induzida durante a malária grave seria benéfico a recuperação do hospedeiro.

A LXA₄ foi primeiramente descrita por Serhan, Hamberge Samuelsson em 1984, como um medidor lipídico cuja presença no organismo está ligada a resolução do processo inflamatório (68-70). Em camundongos, as lipoxinas são sintetizadas após atividade sequencial das enzimas 15-LO e 5-LO sobre o ácido araquidônico (AA) e o 15S-HETE, respectivamente, formando a LXA₄ (100). Recentemente, nosso grupo mostrou que a LXA₄ é capaz de melhorar a resposta inflamatória durante a malária grave cerebral experimental (Anexo I), porém ainda não há dados na literatura sobre a atuação desse mediador durante a fase pulmonar da malária grave experimental.

Alguns estudos já descreveram características da SRAS durante a malária grave experimental, tais como diminuição da função pulmonar, aumento da produção de citocinas (43) e quimiocinas (101) e o acúmulo de mononucleares e neutrófilos no tecido pulmonar (42). Além disso, estudos anteriores mostram que diferentes linhagens de camundongos possuem diferentes respostas a infecção pelo *P. berghei* (41). A linhagem DBA, por exemplo, quando infectado com *P. berghei* apresenta SRAS sem comprometimento cerebral; já o Balb/c desenvolve hiperparasitemia sem desenvolver nem SRAS nem comprometimento cerebral (41). De acordo com o descrito anteriormente na literatura (102) e por nosso grupo (43), utilizamos camundongos C57Bl/6, pois essa linhagem possui susceptibilidade a malária grave quando infectada por *P. berghei*, incluindo comprometimento cerebral e pulmonar.

Num primeiro momento avaliamos o tratamento com LXA₄ durante o desenvolvimento da malária cerebral. De forma interessante, observamos que a LXA₄ em sua menor dosagem foi capaz de inibir a formação de edema cerebral.

Embora o tratamento com a LXA₄ não tenha contribuído para uma maior sobrevivência ao longo do tempo, observamos que entre o 4º e o 9º dia (período de morte por malária cerebral) os camundongos tratados sobreviveram mais que o grupo infectado. A melhora na disfunção cerebral também foi vista em relação ao dano cognitivo, onde, mais uma vez, o tratamento se mostrou eficaz na preservação contra comprometimento cerebral. Constatamos que a preservação do tecido cerebral pela LXA₄ ocorreu sem modulação da parasitemia, sugerindo que a LXA₄ melhora a resposta do hospedeiro atuando somente nos mecanismos inflamatórios. Grande parte do comprometimento cerebral, ocasionado durante a malária experimental, se dá devido ao acúmulo celular, principalmente de linfócitos T CD8⁺ (103), rompimento da barreira hematoencefálica (104) e produção exacerbada de mediadores inflamatórios no endotélio cerebral (27). Embora haja diminuição da adesão de hemácias e do edema cerebral, o tratamento com LXA₄ não se mostrou eficaz em inibir a adesão de leucócitos na vasculatura cerebral.

A LXA₄ tem um importante papel na resposta inflamatória, agindo em diferentes populações celulares (75, 76). Já foi descrito que a LXA₄ pode modular a expressão de ICAM-1 em células endoteliais estimuladas *in vitro* (105, 106), o que culminaria na redução do influxo leucocitário (107, 108). De acordo com esses dados, observamos que a LXA₄ inibiu a expressão de ICAM-1 *in vivo* e *in vitro* por induzir a via citoprotetora de expressão de hemeoxigenase 1. Em conjunto esses dados sugerem que a administração de LXA₄ atenua os danos cerebrais causados durante a infecção pelo *P. berghei* através da modulação da ativação de células endoteliais (Anexo I). Assim como no edema cerebral, a LXA₄ reduziu o edema pulmonar, no entanto, a SRAS observada durante a infecção pelo *P. berghei* tem outros componentes inflamatórios que não são observados na malária cerebral, sugerindo que a LXA₄ poderia ter outros mecanismos de ação além da ação sobre o endotélio.

Como uma das formas de avaliar se a LXA₄ também modula a função pulmonar, analisamos a mecânica pulmonar a fim de mensurar a funcionalidade do tecido pulmonar frente à infecção por *P. berghei*. Sabe-se que durante a SRAS induzida durante a malária grave experimental, ocorre um aumento da elastância e das pressões resistiva e viscoelástica (43). A LXA₄ foi capaz de reduzir as pressões resistiva e viscoelástica, bem como a elastância, quando comparadas ao grupo infectado não tratado. Esses dados são corroborados pelos resultados observados na histologia pulmonar desses animais, uma vez que a LXA₄ diminuiu o edema

intersticial e influxo inflamatório. Ortiz-Muñoz e colaboradores, mostraram que a LXA₄ foi capaz de reduzir a adesão entre neutrófilos e plaquetas no pulmão em dois modelos experimentais de SRAS, uma por instilação de LPS e outra por lesão pulmonar aguda associada à transfusão, contribuindo para uma melhora na lesão pulmonar (78). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima secretada por neutrófilos e encontrada nos tecidos onde há a formação do processo inflamatório e infiltrado destas células, sendo este um dos marcadores para a presença de neutrófilos no tecido estudado (109, 110). Como forma de comprovar os achados histológicos, dosamos a MPO em tecido pulmonar e observamos que o tratamento com LXA₄ foi capaz de reduzir os níveis de MPO em relação ao grupo infectado, retomando valores semelhantes ao grupo controle não infectado, sugerindo que a o pré-tratamento com LXA₄ reduz o acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar durante a malária grave experimental. De fato, a diminuição do número de neutrófilos no tecido pulmonar justifica a melhora da função pulmonar uma vez que já foi demonstrado que a depleção de neutrófilos melhora a SRAS desenvolvida durante a malária grave experimental (51, 52).

Além de neutrófilos, citocinas e quimiocinas são mediadores químicos fundamentais no desenvolvimento da malária grave experimental (48). De fato, já foi mostrado que citocinas e quimiocinas estão envolvidas no desenvolvimento da SRAS induzida durante a malária grave experimental (43, 111) como em SRAS originadas de quadros infecciosos sistêmicos ou locais (96, 97). De forma interessante, o modelo de infecção por *P. berghei* em camundongos C57Bl/6, embora culmine no desenvolvimento da SRAS e malária cerebral, não apresenta aumento na expressão de VEGF, diferente do observado em outras linhagens (41). Em dados não mostrados, observamos que a dosagem de VEGF no tecido pulmonar no modelo experimental utilizado nesse estudo mostrou um padrão semelhante ao observado na literatura, onde a infecção por *P. berghei* em camundongos C57/Bl6 não é capaz de aumentar a expressão de VEGF em relação ao controle não infectado. Da mesma forma, o tratamento com a LXA₄ não interfere na produção do VEGF (dados não mostrados). Dosamos, ainda, IL-6, TNF- α , IL-10, CXCL1 e CCL2 em tecido pulmonar a fim de avaliar se LXA₄ estaria envolvida na melhora da resposta inflamatória através da modulação na produção destas citocinas e quimiocinas. Nossos resultados mostram que a LXA₄ induziu o aumento de IL-10, o que pode ter contribuído para uma melhora na resposta inflamatória, porém sem interferir na produção de IL-6 e TNF- α . Estudos mostram que durante a infecção por

P. berghei não há aumento da produção de IL-10, o que estaria relacionado com a resposta inflamatória exacerbada. Fazalul e colaboradores demonstraram que a IL-27, citocina considerada pró-inflamatória na malária, seria responsável por suprimir a produção de IL-10. Uma vez neutralizada a IL-27 em camundongos infectados com *P. berghei*, observou-se um aumento de IL-10, culminando por uma preservação dos tecidos durante a resposta inflamatória (112). Esses dados sugerem que a melhora da SRAS induzida durante a malária grave experimental após pré-tratamento com LXA₄ esteja relacionada com ação direta deste mediador em diferentes populações celulares, como na modulação da resposta Th1/Th2.

Com base nos dados anteriores, observamos que o pré-tratamento com a LXA₄ diminuiu o número total de leucócitos periféricos, especialmente o número de neutrófilos, bem como reestabeleceu a níveis basais os números de mononucleares periféricos. Embora já tenha sido descrito a atuação da LXA₄ na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (113), não existem estudos que descrevam o papel da LXA₄ na redução periférica de neutrófilos nem sua mobilização da medula óssea. Desta forma hipotetizamos que o pré-tratamento com a LXA₄ atue sobre mecanismos que envolvam a migração de neutrófilos da medula óssea.

Diversos mecanismos de mobilização de neutrófilos da medula óssea já foram demonstrados. Durante a homeostasia, fatores como CXCL12 retêm os neutrófilos na medula óssea evitando a neutrofilia. O CXCL12 se liga no CCR4 presente na membrana de neutrófilos medulares sinalizando para que os mesmos fiquem no estroma. Outro fator presente na manutenção destas células na medula óssea é o fator derivado de células estromais (SDF-1). Em modelo murino foi observado que este quimiotático, pertencente à família dos CXCL12, atua via CCR4, contribuindo para a retenção de células na medula óssea. Durante a infecção por *P. berghei* em camundongos C57Bl/6, foi observado que o SDF-1 α produzido no baço é importante para impedir a formação da malária grave experimental (114). Durante a resposta inflamatória, como a observada em nosso modelo, acontece a produção de CXCL1 que se liga ao CXCR2 dos neutrófilos. Este receptor atua de forma antagônica ao CCR4, e, uma vez estimulado, culmina na internalização de CCR4 e leva a saída do neutrófilo da medula óssea (115). Já foi demonstrado que o aumento da produção de CXCL1 durante a SRAS induzida por LPS é importante para migração dessas células (116). Desta forma, realizamos a dosagem de CXCL1, desta vez no soro, e observamos que a produção de CXCL1 induzida durante a infecção por *P. berghei* foi inibida pelo pré-tratamento com LXA₄. No entanto, ao bloquearmos o CXCL1 em

ensaio de migração (figura 7b), também observamos que o CXCL1 não é o único fator responsável pela migração de neutrófilos em nosso modelo, sugerindo que a LXA₄ esteja modulando a mobilização nos neutrófilos na medula óssea. Um dos mediadores quimiotáticos importantes para a ativação e migração de leucócitos para o sítio inflamatório é o LTB₄. Derivado do metabolismo do ácido araquidônico pela enzima fosfolipase A2, sua síntese é perpetuada mesmo após ativação celular principalmente em neutrófilos e macrófagos ativadas (117). O papel dos LT's durante a malária ainda não é bem definido. Sabe-se que no desenvolvimento da malária experimental cerebral, camundongos infectados apresentam aumento de LTB₄ no soro (118) que pode estar relacionada com o desenvolvimento da malária cerebral (119). Dados ainda não publicados do nosso grupo mostram que, em tecido pulmonar, o LTB₄ é produzido nos tempos iniciais da infecção por *P. berghei*, no entanto, ao longo do desenvolvimento da doença a produção é diminuída, ao ponto que no quinto dia de infecção a quantidade retorna ao nível basal. Nosso grupo ainda observou que camundongos deficientes em expressar 5-LO, durante a infecção por *P. berghei*, não apresentam melhora da resposta inflamatória em comparação aos animais controle infectado. Desta forma, acreditamos que durante a malária, quimiocinas, citocinas e outros mediadores inflamatórios tenham uma ação diferenciada da descrita usualmente em outros modelos infecciosos, o que explica o efeito da LXA₄ identificado neste estudo.

A interação de neutrófilos com a LXA₄ já é bastante descrita na literatura (78, 120, 121). Além da modulação da capacidade migratória, a LXA₄ usa como um dos mecanismos para controle da resposta inflamatória neutrofílica a apoptose de neutrófilos (revisto em (122)), no entanto, em nosso modelo, a LXA₄ não alterou os níveis de apoptose induzido pela infecção pelo *P. berghei*. Outro mecanismo possível para justificar a redução dos números de neutrófilos periféricos após tratamento com a LXA₄ é a modulação da maturação dos neutrófilos na medula óssea. Como descrito por Pelus e Hoggatt, alguns eicosanoides podem interferir na hematopoiese (123). Já foi mostrado que células da medula óssea são capazes de produzir derivados da lipoxigenase, como o leucotrieno C₄ e LXA₄. No entanto esses mediadores não seriam capazes de induzir diferenciação ou proliferação, a não ser via presença de GM-CSF (124). Entretanto, pacientes de leucemia mielóide crônica em crise blástica, ou seja, com aumento da produção de células mielóides, têm níveis de LXA₄ diminuído quando comparado a fase não blástica (125).

Como forma de avaliar se a LXA₄ estaria interferindo na maturação de neutrófilos no modelo usado nesse estudo, analisamos o perfil de expressão LY6G/CD11b, descrito como marcadores de maturação de neutrófilos. Em situações fisiológicas, a diminuição da expressão de CD11 indica que o neutrófilo está apto a evadir da medula óssea (126). Atuando em paralelo, neutrófilos que apresentam uma maior expressão de LY6G, são células maduras aptas a migrarem da medula óssea (127). No entanto, a expressão de CD11b também pode ser usada como um marcador de ativação e migração de diferentes populações celulares, inclusive neutrófilos (128), além de já ser descrito que a infecção por *P. berghei* é capaz de induzir ao aumento desta integrina (129). Observamos que o tratamento com LXA₄, assim como o tratamento com BOC-2, não foram capazes de alterar os níveis de CD11b em neutrófilos retirados da medula óssea quando comparados ao grupo infectado. Este dado nos sugere que, uma das possíveis formas pelas quais a LXA₄ esteja atuando sobre a redução do infiltrado leucocitário, seja através da inibição da mobilidade do neutrófilo, evitando seu egresso da medula óssea.

Como dito anteriormente, em diferentes modelos experimentais foi demonstrado que a LXA₄ possui um importante papel na inibição da migração de neutrófilos, seja em animais submetidos a sepse por CLP (113) ou em neutrófilos isolados de humanos e estimulados *in vitro* com diferentes quimiotáticos (130). De fato, nossos resultados demonstram que o tratamento *in vivo* com a LXA₄ inibiu a migração espontânea de neutrófilos *ex vivo*. Além disso, o tratamento *in vitro* dos neutrófilos com LXA₄ também inibiu a migração induzida pelo soro de animais infectados reduzindo a migração das células para os níveis basais de migração. Considerando-se que a LXA₄ inibe o aumento da quantidade sérica de CXCL1 e que outros fatores quimiotáticos estão presentes no soro de animais infectados, sugere-se que a LXA₄ também iniba a produção ou a resposta a estes outros fatores. Já foi demonstrado que o tratamento sistêmico com LXA₄ reduziu a migração de neutrófilos para o peritônio em modelos de peritonite induzida por zimosan A (131). Recentemente Wu e colaboradores compararam o efeito da LXA₄ com seu análogo comercial a 15-epi-LXA₄ na resposta inflamatória sistêmica induzida em modelo de sepse. Embora a 15-epi-LXA₄ seja mais estável, ambas as moléculas foram capazes de diminuir a inflamação sistêmica e o acúmulo de neutrófilos no peritônio de animais submetidos ao modelo de sepse por ligação e perfuração do ceco. (132). Da mesma forma, ao utilizarmos a 15-epi-LXA₄, observamos a inibição na migração de neutrófilos, tanto na quimiocinese quanto na quimiotaxia estimulada por CXCL1.

Como o pré-tratamento *in vivo* com a LXA₄ não permite afirmar que a LXA₄ exerce um efeito direto sobre os neutrófilos, avaliamos seu efeito *in vitro* sobre neutrófilos isolados da medula óssea. Demonstramos que o tratamento *in vitro* de neutrófilos com LXA₄ reduziu a migração dos mesmos quando foram utilizados como quimiotáticos o plasma de animais infectados por *P. berghei* ou CXCL1, quimiocina encontrada aumentada durante a infecção por *P. berghei* em nossos experimentos, indicando que a LXA₄ afeta a resposta da célula aos quimiotáticos induzidos pela infecção. De fato, estudos realizados *in vitro* mostraram que a LXA₄ diminui a produção de IL-8 através da diminuição da translocação de fatores de transcrição, como o NFκB e o c-Fos para o núcleo de neutrófilos estimulados com LPS (133). De forma semelhante, a LXA₄ modula a fosforilação de proteínas em neutrófilos ativados, especialmente aquelas relacionadas com migração (134), sugerindo que o efeito da LXA₄ possa estar diretamente relacionado a fatores intracelulares responsáveis pela migração dos neutrófilos.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a LXA₄ possui um importante papel na modulação da resposta inflamatória durante a infecção por *P. berghei*, sendo capaz de atuar no tecido pulmonar de forma a prevenir lesões teciduais. Um dos possíveis mecanismos é a atuação direta em neutrófilos, culminando numa diminuição da migração celular, que ao menos em parte, pode ser devido à modulação de importantes vias responsáveis pela a mobilidade celular.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante este estudo demonstram que a LXA₄ é capaz de reduzir os parâmetros de SRAS ocasionadas pela infecção por *P. berghei*. Os resultados sugerem que a ação da LXA₄ acontece tanto nas células endoteliais, prevenindo a formação de edemas, como em neutrófilos, impedindo a sua saída da medula óssea.

- A LXA₄ inibe o desenvolvimento da malária grave induzida pela infecção por *P. berghei*, impedindo a formação de edema pulmonar e cerebral, o que aumentou a sobrevivência dos animais no período em que acontece a morte por malária cerebral, no entanto não alterou os níveis de parasitemia.
- O tratamento com LXA₄ inibiu a perda de função pulmonar durante a malária grave experimental, mantendo os níveis basais de elastância estática, pressão de resistência e pressão de viscoelasticidade. Esses dados corroboram a análise histológica, onde foi observado menor formação de edema intersticial, menos pontos hemorrágicos, assim como menor infiltrado celular.
- O tratamento com LXA₄ não modulou a produção de IL-6, TNF- α , CXCL1 e CCL2 no tecido pulmonar, no entanto aumentou a produção IL-10 no pulmão. O tratamento com a LXA₄ diminuiu o número de leucócitos totais e neutrófilos periféricos em animais infectados. Apesar de a LXA₄ inibir a produção de CXCL1 no soro de animais infectados, a redução do número de neutrófilos periféricos não é exclusivamente dependente da presença de CXCL1.
- A redução do número de neutrófilos após o tratamento com a LXA₄ não está relacionado a alteração na maturação nem apoptose destas células na medula óssea. Por outro lado, o tratamento *in vivo* impediu a ativação e migração *ex vivo* de neutrófilos. Comprovamos que a LXA₄ atua diretamente sobre os neutrófilos uma vez que o tratamento *in vitro* impediu a migração destas células frente a diferentes estímulos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bruce-Chwatt LJ. History of malaria from prehistory to eradication 1988.
2. Portocarrero V. Pasteur e a microbiologia. 1991;5:69 - 81.
3. Laveran A. Note sur un nouveau parasite trouve dan le sang des malades atteints de fièvre palustre 1880. 1235 -6 p.
4. Maciel JM. Microbiologia & Parasitologia. edição a, editor: Editora ULBRA; 2003. 160 p.
5. Rey L. Bases da Parasitologia Médica. edição a, editor. Guanabara Koogan 2001.
6. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Plasmodium knowlesi: the emerging zoonotic malaria parasite. Acta Trop. 2013;125(2):191-201.
7. World Malaria Report 2015 [Internet]. 2015. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>.
8. WHO. Severe Malaria. Tropical Medicine & International Health. 2014;19(s1):7-131.
9. Brasil MdS. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. 2015.
10. Janeiro SdEdRd. Boletim Epidemiológico 001/2015. 2015.
11. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. Nat Rev Immunol. 2005;5(9):722-35.

12. Mac-Daniel L, Menard R. Plasmodium and mononuclear phagocytes. *Microb Pathog.* 2015;78:43-51.
13. Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, 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. *J Immunol.* 1996;156(5):1897-907.
14. Porto BN. PAPEL DO HEME (FERRO PROTOPORFIRINA IX) NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA: MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS Universidade Federal Fluminense: Universidade Federal Fluminense; 2005 [Available from: http://www.bdttd.ndc.uff.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=334].
15. Orjih AU, Banyal HS, Chevli R, Fitch CD. Hemin lyses malaria parasites. *Science.* 1981;214(4521):667-9.
16. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, et al. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(11):1030-43.
17. 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.
18. Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infect Immun.* 2006;74(6):3262-70.
19. Pasini EM, Braks JA, Fonager J, Klop O, Aime E, Spaccapelo R, et al. Proteomic and genetic analyses demonstrate that Plasmodium berghei blood stages export a large and diverse repertoire of proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(2):426-48.

20. Cooke BM. Molecular approaches to malaria: seeking the whole picture. *Parasitol Today*. 2000;16(10):407-8.
21. Chakravorty SJ, Hughes KR, Craig AG. Host response to cytoadherence in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 2):221-8.
22. Clark IA, Alleva LM, Mills AC, Cowden WB. Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(3):509-39, table of contents.
23. Hatabu T, Kawazu S, Aikawa M, Kano S. Binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the membrane-bound form of Fractalkine/CX3CL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15942-6.
24. van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol*. 2006;22(11):503-8.
25. Grau GE, Craig AG. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiol*. 2012;7(2):291-302.
26. 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.
27. 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.
28. de Macchi BM, Miranda FJ, de Souza FS, de Carvalho EC, Albernaz AP, do Nascimento JL, et al. Chickens treated with a nitric oxide inhibitor became more resistant to *Plasmodium gallinaceum* infection due to reduced anemia, thrombocytopenia and inflammation. *Vet Res*. 2013;44:8.

29. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *Jama*. 2016;315(8):788-800.
30. Horie S, Laffey JG. Recent insights: mesenchymal stromal/stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome. *F1000Res*. 2016;5.
31. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis*. 2013;5(3):326-34.
32. Taylor W. Respiratory Manifestations of Malaria. 2012;142(2):492–505.
33. Hanson JP, Lam SW, Mohanty S, Alam S, Pattnaik R, Mahanta KC, et al. Fluid resuscitation of adults with severe falciparum malaria: effects on Acid-base status, renal function, and extravascular lung water. *Crit Care Med*. 2013;41(4):972-81.
34. Mohan A, Sharma SK, Bollineni S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis*. 2008;45(3):179-93.
35. 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.
36. Duarte MI, Corbett CE, Boulos M, Amato Neto V. Ultrastructure of the lung in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1985;34(1):31-5.
37. Corbett CE, Duarte MI, Lancellotti CL, Silva MA, Andrade Junior HF. Cytoadherence in human falciparum malaria as a cause of respiratory distress. *J Trop Med Hyg*. 1989;92(2):112-20.
38. Taylor WR, White NJ. Malaria and the lung. *Clin Chest Med*. 2002;23(2):457-68.

39. Taylor WR, Canon V, White NJ. Pulmonary manifestations of malaria : recognition and management. *Treat Respir Med.* 2006;5(6):419-28.
40. 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.
41. Epiphanio S, Campos MG, Pamplona A, Carapau D, Pena AC, Ataide R, et al. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. *PLoS Pathog.* 2010;6(5):e1000916.
42. 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.
43. 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.
44. Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog.* 2007;3(11):e171.
45. Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, et al. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;137(1):23-33.
46. Fonager J, Pasini EM, Braks JA, Klop O, Ramesar J, Remarque EJ, et al. Reduced CD36-dependent tissue sequestration of *Plasmodium*-infected erythrocytes is detrimental to malaria parasite growth in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(1):93-107.

47. Piguet PF, Kan CD, Vesin C, Rochat A, Donati Y, Barazzone C. Role of CD40-CVD40L in mouse severe malaria. *Am J Pathol.* 2001;159(2):733-42.
48. Angulo I, Fresno M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(6):1145-52.
49. 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.
50. Hee L, Dinudom A, Mitchell AJ, Grau GE, Cook DI, Hunt NH, et al. Reduced activity of the epithelial sodium channel in malaria-induced pulmonary oedema in mice. *Int J Parasitol.* 2011;41(1):81-8.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Lalloo DG, Shingadia D, Bell DJ, Beeching NJ, Whitty CJ, Chiodini PL. UK malaria treatment guidelines 2016. *J Infect.* 2016;72(6):635-49.
55. Frosch AE, Venkatesan M, Laufer MK. Patterns of chloroquine use and resistance in sub-Saharan Africa: a systematic review of household survey and molecular data. *Malar J.* 2011;10:116.

56. Zumla A, Rao M, Wallis RS, Kaufmann SH, Rustomjee R, Mwaba P, et al. Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(4):e47-63.
57. Warrell DA, White NJ, Warrell MJ. Dexamethasone deleterious in cerebral malaria. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1982;285(6355):1652.
58. Hoffman SL, Rustama D, Punjabi NH, Surampaet B, Sanjaya B, Dimpudus AJ, et al. High-dose dexamethasone in quinine-treated patients with cerebral malaria: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis.* 1988;158(2):325-31.
59. Watt G, Jongsakul K, Ruangvirayuth R. A pilot study of N-acetylcysteine as adjunctive therapy for severe malaria. *Qjm.* 2002;95(5):285-90.
60. Serghides L. The Case for the Use of PPARgamma Agonists as an Adjunctive Therapy for Cerebral Malaria. *PPAR Res.* 2012;2012:513865.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Zanini GM, Cabrales P, Barkho W, Frangos JA, Carvalho LJ. Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during Plasmodium berghei ANKA infection in mice. *J Neuroinflammation.* 2011;8:66.

65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:101-37.
69. Serhan CN. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1212(1):1-25.
70. Serhan CN, Samuelsson B. Lipoxins: a new series of eicosanoids (biosynthesis, stereochemistry, and biological activities). *Adv Exp Med Biol.* 1988;229:1-14.
71. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol.* 2010;177(4):1576-91.
72. Hauache OM. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001;45(3):228-39.
73. Wang Y, Kong Y, Shei GJ, Kang L, Cvijic ME. Development of a cyclic adenosine monophosphate assay for Gi-coupled G protein-coupled receptors by utilizing the endogenous calcitonin activity in Chinese hamster ovary cells. *Assay Drug Dev Technol.* 2011;9(5):522-31.

74. Gavins FN. Are formyl peptide receptors novel targets for therapeutic intervention in ischaemia-reperfusion injury? *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(6):266-76.
75. Takano T, Clish CB, Gronert K, Petasis N, Serhan CN. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *J Clin Invest.* 1998;101(4):819-26.
76. Stenson C, Mitchell S, Lappin D, Brady HR, Godson C. Biphasic regulation of leukocyte trafficking by lipoxins. *Adv Exp Med Biol.* 2002;507:543-9.
77. 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.
78. Ortiz-Munoz 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.
79. Fang X, Abbott J, Cheng L, Colby JK, Lee JW, Levy BD, et al. Human Mesenchymal Stem (Stromal) Cells Promote the Resolution of Acute Lung Injury in Part through Lipoxin A4. *J Immunol.* 2015;195(3):875-81.
80. 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.
81. 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.

82. Takahashi A, Kato K, Makino J, Shiroishi T, Koide T. Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. *Behav Genet.* 2006;36(5):763-74.
83. Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res.* 2006;169(1):10-20.
84. Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, Witherden AS, et al. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett.* 2001;306(1-2):89-92.
85. Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome.* 1997;8(10):711-3.
86. Lalonde R, Dumont M, Staufenbiel M, Strazielle C. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res.* 2005;157(1):91-8.
87. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia.* 1968;13(3):222-57.
88. 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.
89. Bates JH, Ludwig MS, Sly PD, Brown K, Martin JG, Fredberg JJ. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. *J Appl Physiol* (1985). 1988;65(1):408-14.

90. Bates JH, Decramer M, Chartrand D, Zin WA, Boddener A, Milic-Emili J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. *J Appl Physiol* (1985). 1985;59(3):732-7.
91. Bates JH, Rossi A, Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol* (1985). 1985;58(6):1840-8.
92. Kochi T, Okubo S, Zin WA, Milic-Emili J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol* (1985). 1988;64(6):2636-46.
93. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982;78(3):206-9.
94. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989;26(3-4):335-41.
95. Arraes SM, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Auxiliadora Martins M, et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood*. 2006;108(9):2906-13.
96. Monteiro AP, Soledade E, Pinheiro CS, Dellatorre-Teixeira L, Oliveira GP, Oliveira MG, et al. Pivotal role of the 5-lipoxygenase pathway in lung injury after experimental sepsis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(1):87-95.
97. Chen N, Wu Q, Chi G, Soromou LW, Hou J, Deng Y, et al. Prime-O-glucosylcimifugin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol*. 2013;16(2):139-47.

98. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005;434(7030):214-7.
99. Newton CR, Krishna S. Severe *falciparum* malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther*. 1998;79(1):1-53.
100. Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(2):166-72.
101. Liu M, Amodu AS, Pitts S, Patrickson J, Hibbert JM, Battle M, et al. Heme Mediated STAT3 Activation in Severe Malaria. *PLoS One*. 2012;7(3).
102. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphonio S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007;13(6):703-10.
103. Shaw TN, Stewart-Hutchinson PJ, Strangward P, Dandamudi DB, Coles JA, Villegas-Mendez A, et al. Perivascular Arrest of CD8+ T Cells Is a Signature of Experimental Cerebral Malaria. *PLoS Pathog*. 2015;11(11):e1005210.
104. Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SHI, Frevert U. Neuroimmunological Blood Brain Barrier Opening in Experimental Cerebral Malaria. *PLoS Pathog*. 2012;8(10).
105. Merched AJ, Serhan CN, Chan L. Nutrigenetic disruption of inflammation-resolution homeostasis and atherogenesis. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4(1):12-24.
106. 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.

107. Wagener FA, da Silva JL, Farley T, de Witte T, Kappas A, Abraham NG. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;291(1):416-23.
108. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood.* 2001;98(6):1802-11.
109. Cross AS, Sakarya S, Rifat S, Held TK, Drysdale BE, Grange PA, et al. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem.* 2003;278(6):4112-20.
110. Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods.* 1985;14(3):157-67.
111. 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.* 48. United States 2013. p. 589-600.
112. Fazalul Rahiman SS, Basir R, Talib H, Tie TH, Chuah YK, Jabbarzare M, et al. Interleukin-27 exhibited anti-inflammatory activity during *Plasmodium berghei* infection in mice. *Trop Biomed.* 2013;30(4):663-80.
113. 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.
114. Garnica MR, Souto JT, Silva JS, de Andrade HF, Jr. Stromal cell derived factor 1 synthesis by spleen cells in rodent malaria, and the effects of in vivo supplementation of SDF-1alpha and CXCR4 receptor blocker. *Immunol Lett.* 2002;83(1):47-53.

115. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2423-31.
116. Planagumà A, Domènech T, Pont M, Calama E, García-González V, López R, et al. Combined anti CXC receptors 1 and 2 therapy is a promising anti-inflammatory treatment for respiratory diseases by reducing neutrophil migration and activation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2015;34:37-45.
117. Luster AD, Tager AM. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(9):711-24.
118. Babu KS, Salvi SS. Aspirin and asthma. *Chest.* 2000;118(5):1470-6.
119. Xiao L, Patterson PS, Yang C, Lal AA. Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(4):668-73.
120. Conte FP, Menezes-de-Lima O, Jr., Verri WA, Jr., Cunha FQ, Penido C, Henriques MG. Lipoxin A(4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. *Br J Pharmacol.* 2010;161(4):911-24.
121. Filep JG, Zouki C, Petasis NA, Hachicha M, Serhan CN. Anti-inflammatory actions of lipoxin A(4) stable analogs are demonstrable in human whole blood: modulation of leukocyte adhesion molecules and inhibition of neutrophil-endothelial interactions. *Blood.* 1999;94(12):4132-42.
122. Filep JG, El Kebir D. Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem.* 2009;108(5):1039-46.
123. Pelus LM, Hoggatt J. Pleiotropic effects of prostaglandin E2 in hematopoiesis; prostaglandin E2 and other eicosanoids regulate hematopoietic stem and progenitor cell function. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011;96(1-4):3-9.

124. Stenke L, Mansour M, Edenius C, Reizenstein P, Lindgren JA. Formation and proliferative effects of lipoxins in human bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;180(1):255-61.
125. Lindgren JA, Stenke L, Mansour M, Edenius C, Laurén L, Näsman-Glaser B, et al. Formation and effects of leukotrienes and lipoxins in human bone marrow. *J Lipid Mediat.* 1993;6(1-3):313-20.
126. Day RB, Link DC. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(9):1415-23.
127. 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.
128. Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost.* 2007;98(2):262-73.
129. Mac-Daniel L, Buckwalter MR, Berthet M, Virk Y, Yui K, Albert ML, et al. Local immune response to injection of Plasmodium sporozoites into the skin. *J Immunol.* 2014;193(3):1246-57.
130. 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.
131. 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.
132. Wu B, Walker JA, Temmermand D, Mian K, Spur B, Rodriguez A, et al. Lipoxin A(4) promotes more complete inflammation resolution in sepsis compared to

stable lipoxin A(4) analog. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2013;89(1):47-53.

133. József L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(20):13266-71.

134. Ohira T, Bannenberg G, Arita M, Takahashi M, Ge Q, Van Dyke TE, et al. A stable aspirin-triggered lipoxin A4 analog blocks phosphorylation of leukocyte-specific protein 1 in human neutrophils. J Immunol. 2004;173(3):2091-8.

8. ANEXOS I

Neste trabalho tivemos como objetivo avaliar o papel da administração de LXA₄ exógena no desenvolvimento da malária cerebral. Observamos que a LXA₄ possui um papel protetor no modelo de malária severa frente a diferentes doses de LXA₄, sendo capaz de inibir a formação de edema na sua menor dosagem, também diminuindo a parasitemia, e aumentando a sobrevivência dos animais no período que acontece a morte por malária cerebral. Verificamos que a melhora da função cerebral está relacionada a recuperação da funcionalidade endotelial. De fato, observamos que a LXA₄ desativa as células endoteliais por via da indução da via citoprotetora da hemeoxigenase-1.



Lipoxin A₄ attenuates endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria



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

^a Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b 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

^c Laboratory of Cardiovascular Investigation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e 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 LXA₄ prolonged *Plasmodium berghei*-infected mice survival by a mechanism that depends on inhibiting IL-12 production and CD8⁺IFN- γ ⁺ 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 LXA₄ on endothelial dysfunction during ECM. The treatment of *P. berghei*-infected mice with LXA₄ prevented BBB breakdown and ameliorated behavioral symptoms but did not modulate TNF- α production. In addition, microcirculation analysis showed that treatment with LXA₄ significantly increased functional capillary density in brains of *P. berghei*-infected C57BL/6 mice. Furthermore, histological analyses of brain sections demonstrated that exogenous LXA₄ reduced capillary congestion that was accompanied by reduced ICAM-1 expression in the brain tissue. In agreement, LXA₄ treatment of endothelial cells stimulated by *Plasmodium berghei* (*Pb*)- or *Plasmodium falciparum* (*Pf*)-parasitized red blood cells (RBCs) inhibited ICAM-1 expression. Additionally, LXA₄ treatment restored the expression of HO-1 that is reduced during ECM. As well, LXA₄ treatment inhibits *Pb*RBC and *Pf*RBC adhesion to endothelial cells that was reversed by the use of an HO-1 inhibitor (ZnPPiX). Our results demonstrate for the first time that LXA₄ 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- α , 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 (M.G. Henriques).

¹ These authors equally contributed to this work.

interactions in the inflammatory milieu (reviewed by [13]). The interaction of LXA₄ 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 LXA₄ on endothelial cells includes the stimulation of cytoprotective pathways [17–20]. It has been widely reported that LXA₄ 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 LXA₄ 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-LXA₄) prolonged survival by a mechanism that depends on inhibiting IL-12 production and CD8⁺IFN- γ ⁺ 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 LXA₄ 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 LXA₄-treated *P. berghei*-infected mice. *P. berghei* ANKA GFPcon 259c12 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 5×10^6 *P. berghei*-parasitized red blood cells (*PbRBCs*) diluted in saline solution (200 μ l), which were withdrawn from a previously infected mouse of the same strain. Uninfected animals received saline solution (200 μ l, *i.p.*). LXA₄ treatment (0.5 μ g/kg/day in 200 μ 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- α determination from brain tissue

TNF- α levels were evaluated from brain tissue. Briefly, brains from non-infected, *P. berghei*-infected and LXA₄-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% O₂, 6% CO₂ and 84% N₂ 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/mm².

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 μ m long) over 30 s and expressed as the number of cells/min/100 μ m. Parameters were determined in *pia mater* venules with diameters ranging from 50 to 70 μ m.

2.6. Brain histology

Brains from uninfected, *P. berghei*-infected and LXA₄-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 Na₃VO₄, 5 mM Na₄P₂O₇ 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 (10⁴ cells/well) at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂ chambers for 24 h. Before each experiment, ECV-304 or tEnd.1 cells were pretreated or not with LXA₄ (10 nM) for 1 h, the LXA₄ 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 (PfRBCs, kindly provided by Dr. M.G. Zalis, Universidade Federal do Rio de Janeiro) or *P. berghei*-infected RBCs (PbRBCs) 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 PfRBCs or PbRBCs 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 Velocity 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 ≤ 0.05. A log-rank (Mantel–Cox) test was used to compare the percent survival. The significance level was set at p ≤ 0.05.

3. Results

3.1. LXA₄ prevents cerebral dysfunction induced by *P. berghei* infection independently of TNF-α production

To address the involvement of LXA₄ on vascular dysfunction during ECM *P. berghei*-infected C57BL/6 mice were treated with LXA₄ (0.5 µg/kg/day). Initially, LXA₄ dose-response curves were constructed, and from these curves the threshold dose was defined (Supplemental data 1). LXA₄ 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 LXA₄ reduced the Evans blue dye extravasation into brain tissue observed during ECM (Fig. Fig. 1C). It is important to note that treatment with LXA₄ did not modulate Evans blue dye extravasation to the brain tissue of uninfected mice (Supplementary data 2). Moreover, LXA₄ treatment further improved behavioral and functional scores in treated mice compared with untreated mice (Fig. Fig. 1D). To investigate if LXA₄ ameliorates vascular dysfunction by modulating TNF-α production that accounts for activation of endothelial cells, we investigated TNF-α production in brain tissue of LXA₄ 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 LXA₄ treatment (Fig. Fig. 1E).

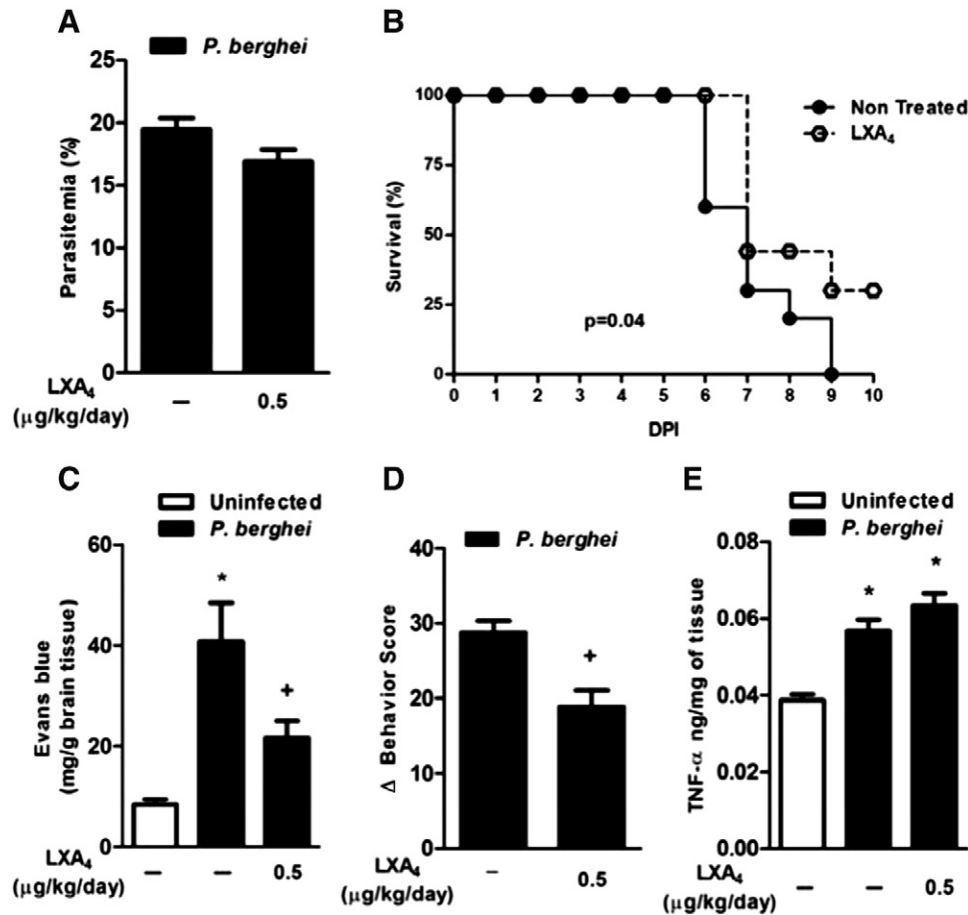


Fig. 1. LXA₄ attenuates cerebral malaria. (A) Parasitemia levels were evaluated 5 days post-infection in C57BL/6 infected with *P. berghei* and treated with LXA₄ (0.5 µg/kg/day), as described in Materials and methods. The results are expressed as the mean ± SEM from at least six animals per group in two independent experiments. (B) Survival rates for C57BL/6 mice infected with *P. berghei* untreated (vehicle, closed symbols) or treated with LXA₄ (0.5 µg/kg/day, open circle). The log-rank test revealed significantly different survival curves when untreated *P. berghei*-infected (n = 10) and LXA₄-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 LXA₄ (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 LXA₄ (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. LXA₄ 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 LXA₄-treated mice (Fig. Fig. 2A and D). Accordingly, histological analyses of brain sections from infected mice treated with LXA₄ 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 LXA₄-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. LXA₄ inhibits endothelial activation markers during ECM

To investigate if the effects of LXA₄ 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 LXA₄. As expected, ICAM-1 expression was higher in *P. berghei* infected mice than in uninfected mice, and LXA₄ 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 LXA₄ 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 LXA₄ (Fig. Fig. 3B and C).

3.4. LXA₄ triggers cytoprotective pathways during ECM

To address the hypothesis that LXA₄ triggers endothelial protective effects during ECM, we evaluated a mechanism by which LXA₄ 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 LXA₄. Low levels of HO-1 were detected in the brains of *P. berghei* infected mice when compared with

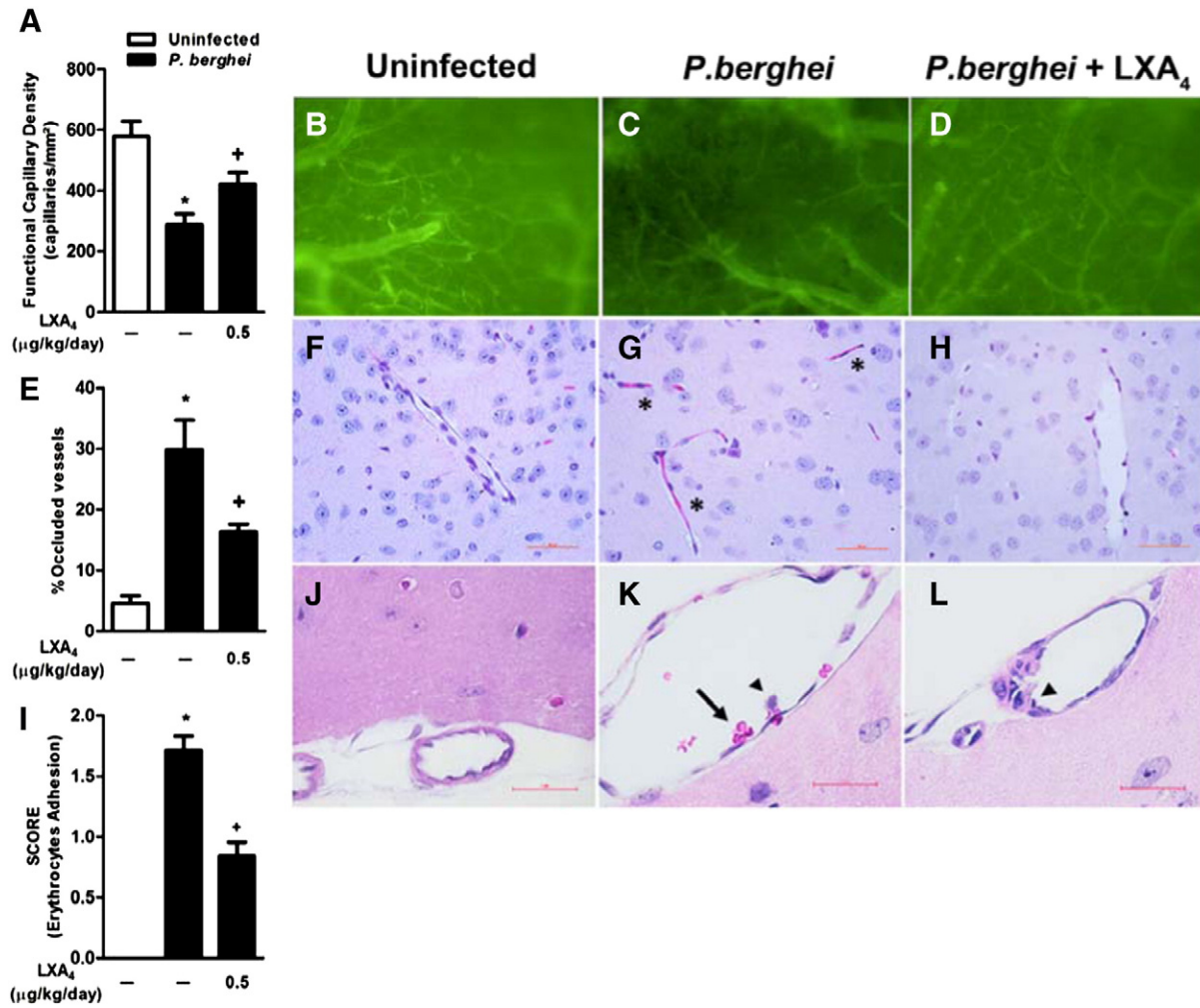


Fig. 2. LXA₄ effects on brain vascular dysfunction during *P. berghei* infection. (A) Intravital microscopy was performed on brains from C57BL/6 mice either uninfected (open bars) or infected with *P. berghei* (closed bars) 5 days prior and functional capillary density were analyzed. Representative images of pial vessels in uninfected mice (B), *P. berghei*-infected mice (C) and *P. berghei*-infected and LXA₄-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 LXA₄-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 ± 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 LXA₄-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 LXA₄-treated mice expressed similarly elevated levels of HO-1 over those observed in uninfected mice (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 LXA₄ (10 nM) and treatment with BOC-2 (40 nM) reversed the inhibitory effect of LXA₄. To evaluate the mechanism by which LXA₄ 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 LXA₄-reduced RBC adhesion was reversed by ZnPPiX pretreatment of both endothelial cell lines (Fig. 4B and C, Supplementary data 2).

4. Discussion

Herein, using an experimental model of cerebral malaria, we demonstrate for the first time that LXA₄ 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 LXA₄ during cerebral dysfunction induced by malaria infection is poorly understood.

Previous data in the literature have shown that treatment with the LXA₄ epimer improved mouse survival by inhibiting IL-12 production and CD8⁺IFN-γ⁺ 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 LXA₄ levels and its effects, we observed that lower doses were more effective. As described before, the LXA₄ receptor, ALX/FPRL, is a G-protein coupled receptor (GPCR) involved in cell- and agonist-specific signaling [33]. Furthermore, ALX/FPRL is regulated by desensitization and agonist-induced internalization [34]. Thus, in our model, where LXA₄ is administered for 6 days, higher doses of LXA₄ are most likely inducing internalization and/or desensitization. In addition, LXA₄ did not interfere with parasitemia levels, supporting the evidence that LXA₄ 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

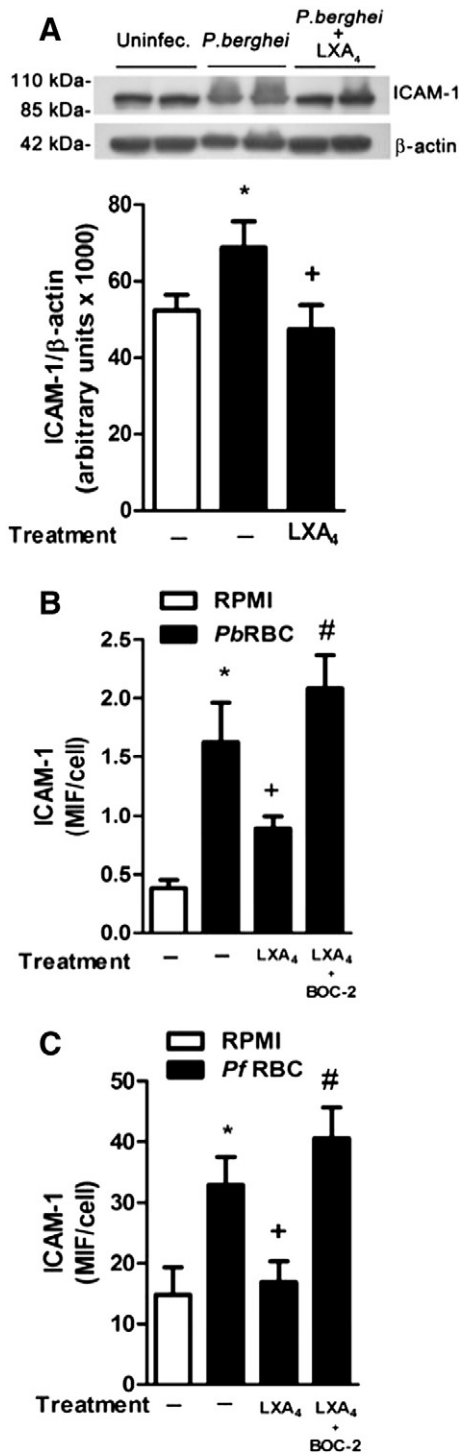


Fig. 3. LXA₄ inhibit ICAM-1 expression during *P. berghei* infection *in vivo* and *in vitro*. (A) Representative membrane preparations of uninfected (lanes 1 and 2, open bars), *P. berghei*-infected (lanes 3 and 4, closed bars) and *P. berghei*-infected and LXA₄-treated (0.5 μg/kg/day; lanes 5 and 6) 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 LXA₄ (10 nM) or LXA₄ plus BOC-2 (40 nM) and stimulated with parasitized (*P. berghei* – P_b; *P. falciparum* – P_f) 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 LXA₄ 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 LXA₄ 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 LXA₄ [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, LXA₄ did not modulate TNF-α production during ECM. As well, LXA₄ impairs the activation of TNF-α-stimulated endothelial cells [22,44], which suggests that prevention of brain edema formation in LXA₄-treated mice does not depend on TNF-α production. Although the modulation of cytokines by LXA₄ 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 LXA₄-infected mice (data not shown), we observed an improved functional capillary density, a significant reduction in vascular occlusion in the brains of LXA₄-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 LXA₄ is acting on endothelial dysfunction induced during ECM, the expression of endothelial cell activation marker, ICAM-1, was investigated. In the current study, LXA₄ impaired ICAM-1 expression in brain tissue of infected mice, as well as in *PbRBCs*- and *PfRBCs*-stimulated endothelial cells *in vitro*. The ability of the LXA₄/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 LXA₄ on the inhibition of ICAM-1 expression during ECM had not been shown.

Several studies have described that LXA₄-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 LXA₄ *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,

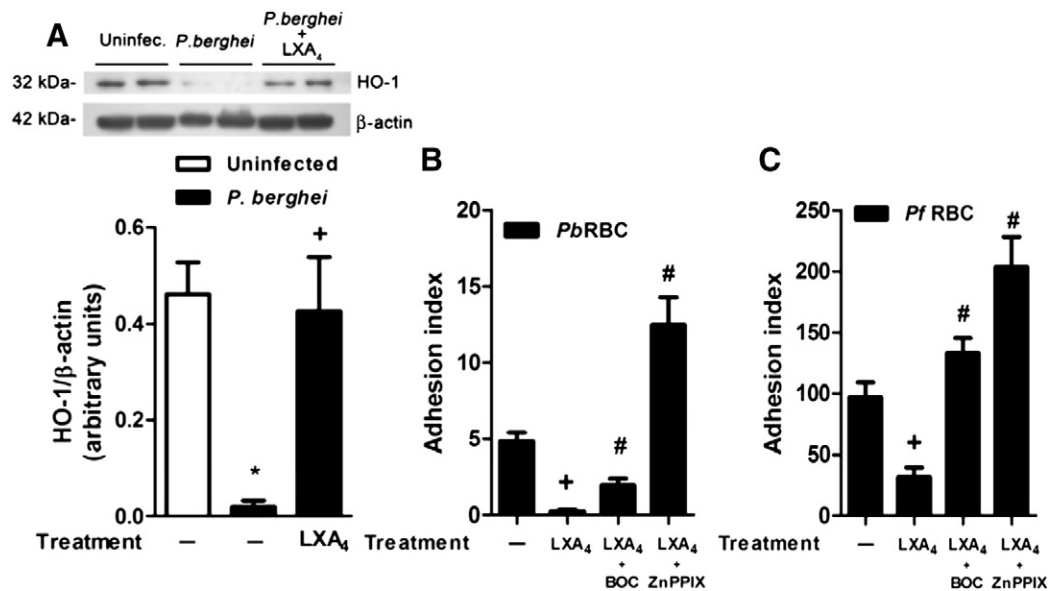


Fig. 4. LXA₄-induced HO-1 attenuates endothelial dysfunction induced by parasitized RBCs. (A) Representative membrane preparations of uninfected (lanes 1 and 2, open bars), *P. berghei*-infected (lanes 3 and 4, closed bars) and *P. berghei*-infected and LXA₄-treated (0.5 μ g/kg/day; lanes 5 and 6) underwent 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 \pm 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 LXA₄ (10 nM), LXA₄ plus BOC-2 (40 nM) and LXA₄ plus ZnPPiX (50 μ M) and stimulated with parasitized RBCs. The results are expressed as the mean \pm 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 LXA₄ treated group are indicated by #.

decreased cerebral edema and decreased ICAM-1 expression [12]. However, even though LXA₄ 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, LXA₄ probably reduces the ICAM-1 expression by inducing the expression of HO-1.

Collectively, the results of this study suggest that LXA₄ 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, Frevert 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, Vigarito 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. *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 LJ, 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 antioxidative 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, Nitchou 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 expression of cell adhesion molecules by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol* 2012;189:968–79.
- [42] El-Asaad 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 Sousa 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, Lii 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, Brimioulle 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.

9. APÊNDICE

RESEARCH

Open Access



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

Mariana C Souza¹, Johnatas D Silva², Tatiana A Pádua¹, Natália D Torres¹, Mariana A Antunes², Debora G Xisto², Thiago P Abreu³, Vera L Capelozzi⁴, Marcelo M Morales⁵, Ana A. Sá Pinheiro³, Celso Caruso-Neves³, Maria G Henriques^{1,6} and Patricia RM Rocco^{2*}

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 5×10^6 *Plasmodium berghei*-infected erythrocytes or saline. After 24 h, mice received saline or bone marrow (BM)-derived MSC (1×10^5) 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- α , keratinocyte-derived chemokine (KC, a mouse analog of interleukin-8), or interferon- γ , 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: pmrocco@biof.ufrj.br

²Laboratory 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

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, 1×10^7 bone marrow-derived cells were cultured (37 °C, 5 % CO₂) 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 1×10^6 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/l 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 cl2 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 (5×10^6 infected RBCs diluted in 200 μl sterile saline solution). Uninfected mice received saline alone (200 μl , 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 (1×10^5 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 γ 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 (FiO_2) 0.21. The anterior chest wall was surgically removed and a positive end-expiratory pressure of 2 cmH $_2$ 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 (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- μ 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)- α , interferon (IFN)- γ , chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)-1, hepatocyte growth factor (HGF), TGF- β , 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°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

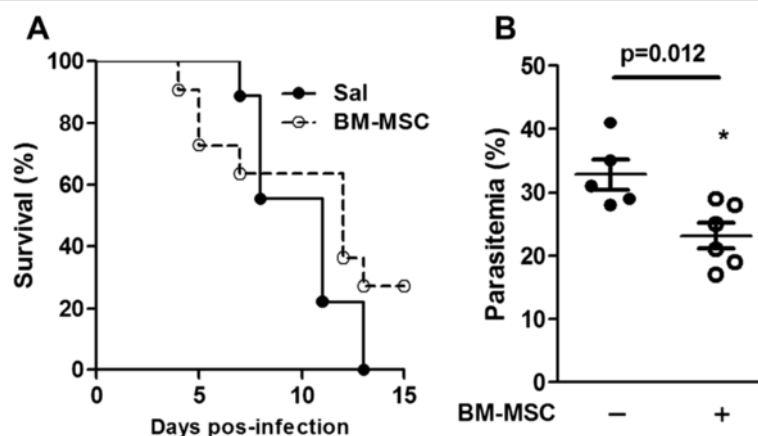


Fig. 1 Survival rate and parasitemia of *P. berghei*-infected mice. Mice were infected with 5×10^6 parasitized RBCs or mock-infected with saline and, 24 hours after infection, were treated with BM-MSCs. **a** Survival of mice infected with *P. berghei*. **b** Parasitemia was analyzed 5 days after infection 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

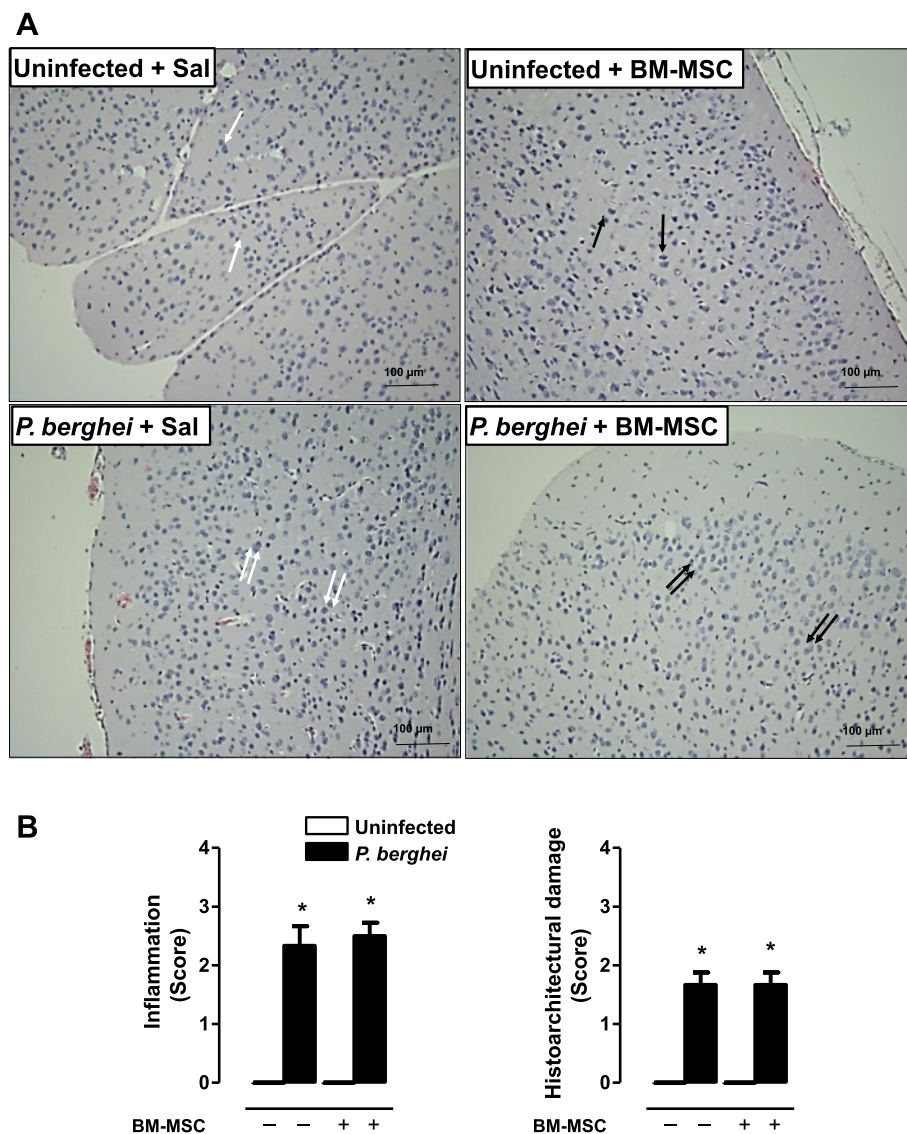


Fig. 2 a Photomicrographs of brain tissue stained with hematoxylin and eosin. Original magnification $\times 1000$; bars = 100 μm . Mice were inoculated with 5×10^6 parasitized RBCs or saline and treated with BM-MSCs. Brains were excised 5 days after infection. Normal brain cortex with neurons, astrocytes, 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⁺ 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- α , IFN- γ , CXCL-1/KC, and VEGF and reduced levels of TGF- β 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- α , TGF- β 1, and HGF levels and reduced VEGF levels, but did not modulate the production of IFN- γ 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

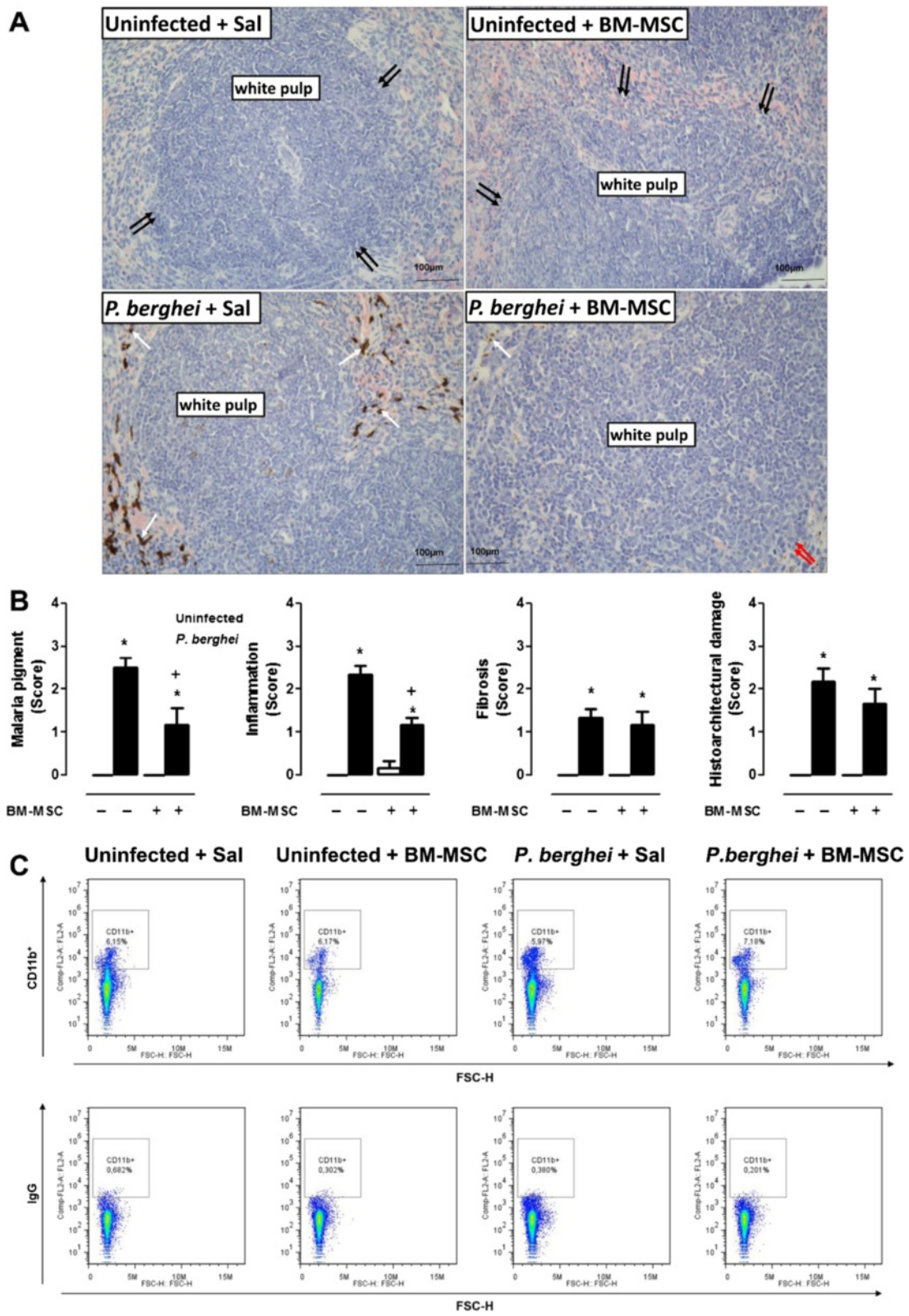


Fig. 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 3 a Photomicrographs of spleen tissue stained with hematoxylin and eosin. Original magnification $\times 1000$; bars = 100 μm . Mice were inoculated with 5×10^6 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⁺ fluorescence in splenocytes. BM-MSC bone marrow-derived mesenchymal stromal cell, FSC forward scatter, Sal saline

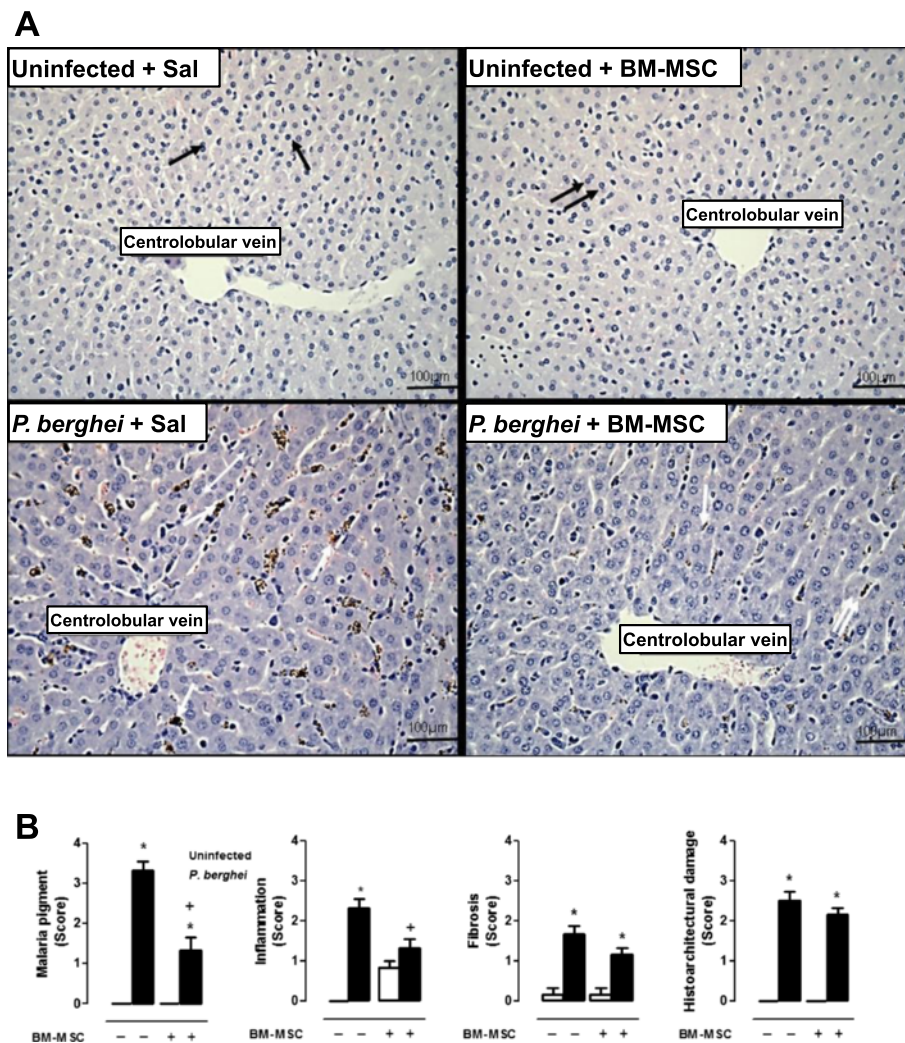
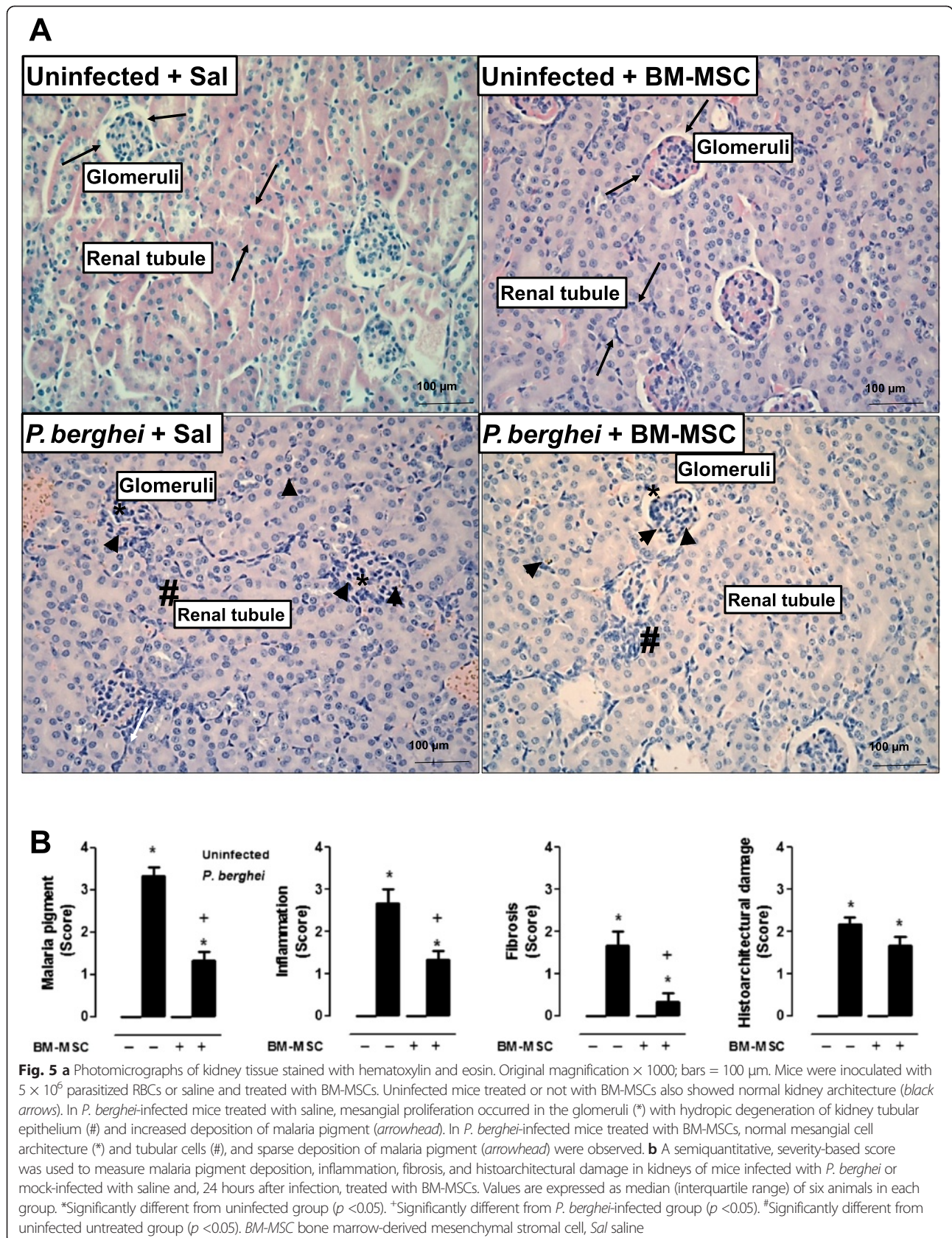
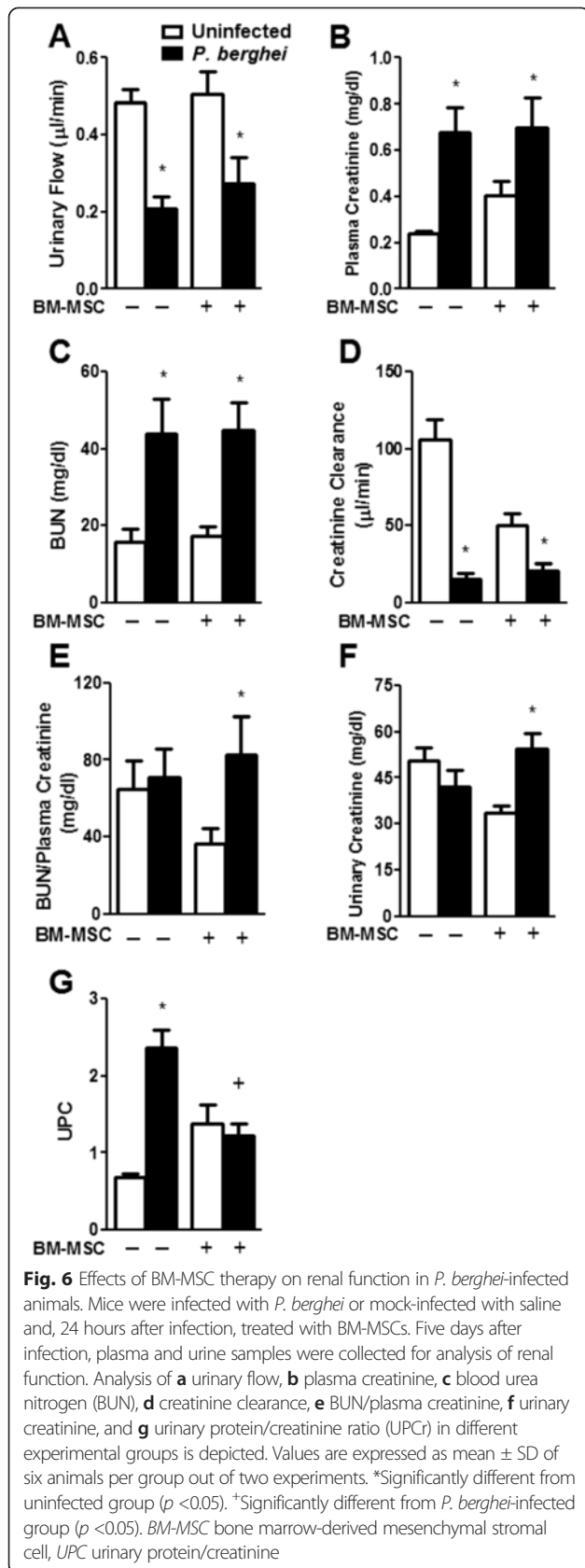


Fig. 4 a Photomicrographs of liver tissue stained with hematoxylin and eosin. Original magnification $\times 1000$; bars = 100 μm . Mice were inoculated with 5×10^6 parasitized RBCs or saline and treated with BM-MSCs. Livers were excised 5 days after infection. Note the intact hepatocytes (single black 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

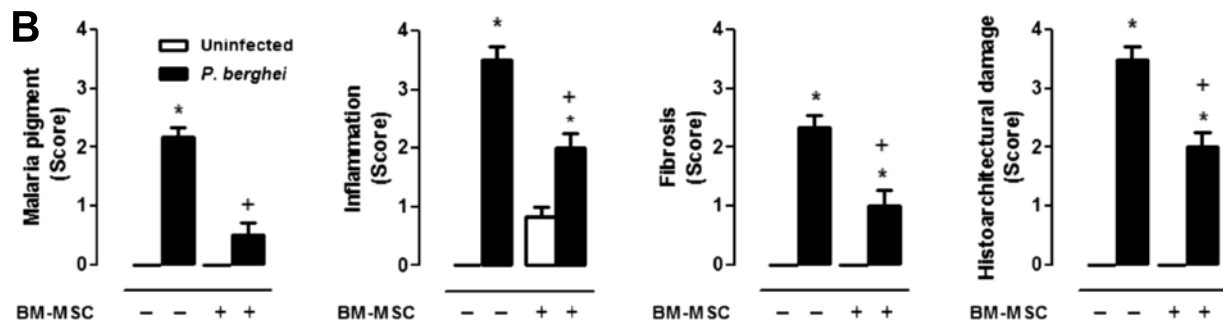
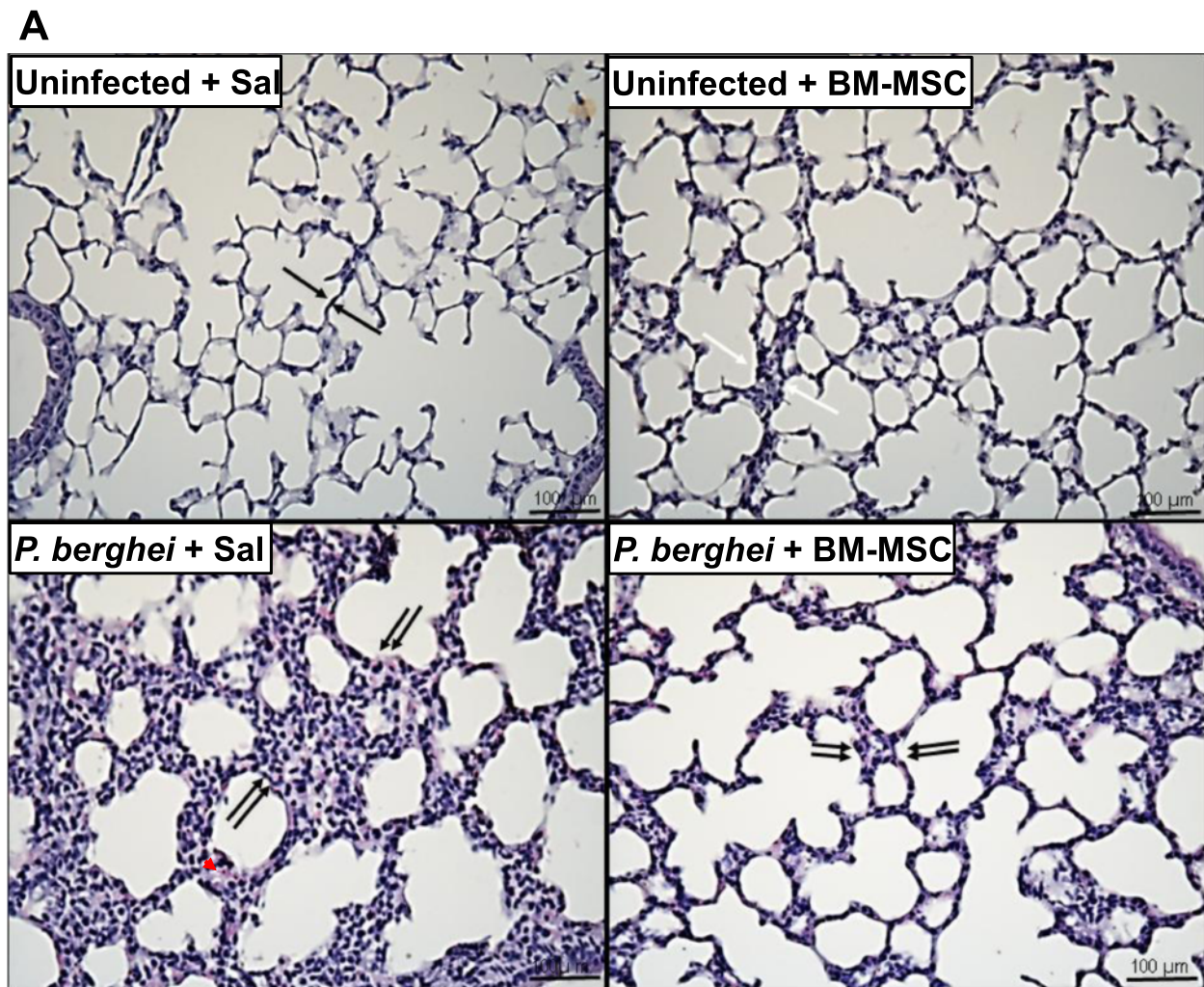


Fig. 7 a Photomicrographs of lung parenchyma stained with hematoxylin and eosin. Original magnification $\times 1000$; bars = 100 μm . In uninfected mice treated or not with BM-MSs, normal architecture was observed with intact alveolar–capillary barrier (black arrows and white arrows, respectively). *P. berghei* infection induced lung damage, associated with structural disarrangement, thickening of the alveolar–capillary barrier by mononuclear cells (double black arrows) and malaria pigment deposition (red arrowhead), and increased number of fibroblasts (double black arrows). Treatment with BM-MSs reduced thickening of the alveolar–capillary barrier and decreased the number of myofibroblasts within interstitial tissue (double black arrow) and collagen deposition (double black arrows). **b** A semiquantitative, severity-based score was used to measure malaria pigment deposition, inflammation, fibrosis, and histoarchitectural damage in lungs of mice infected with *P. berghei* or mock-infected with saline and, 24 hours after infection, treated with BM-MSs. Values are expressed as the 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-MS bone marrow-derived mesenchymal stromal cell, Sal saline

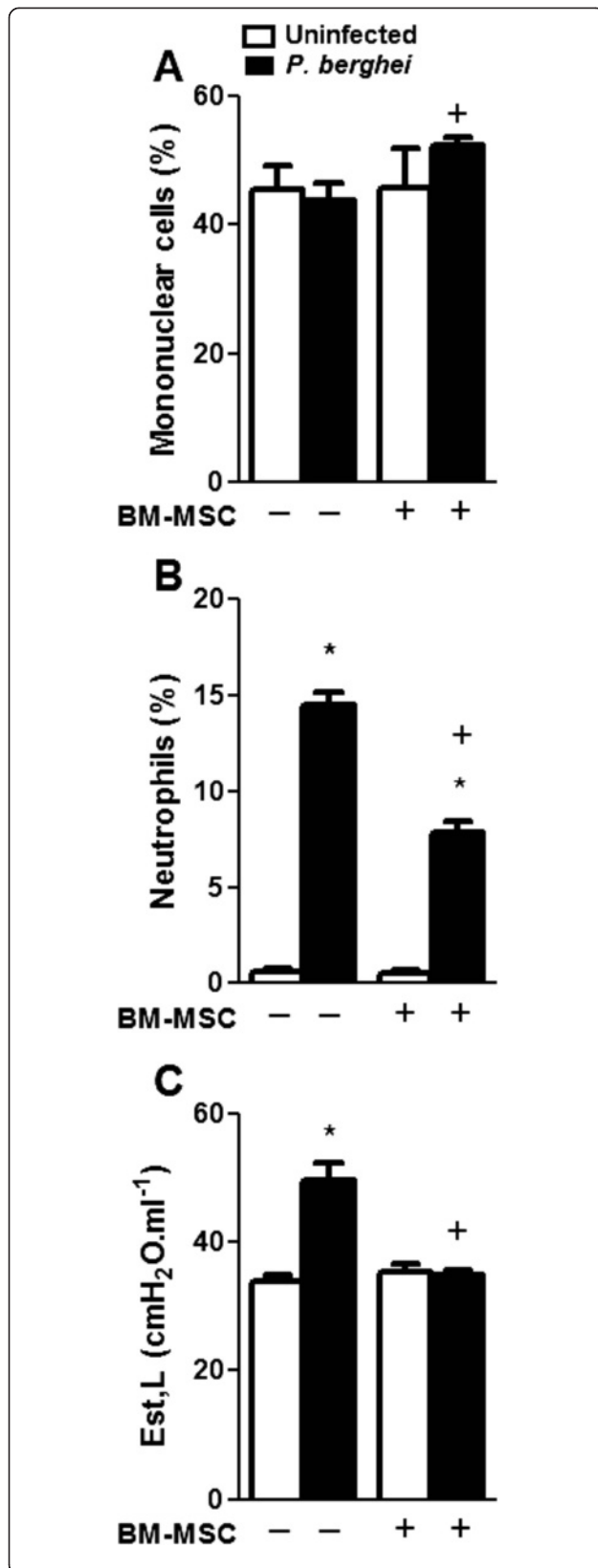
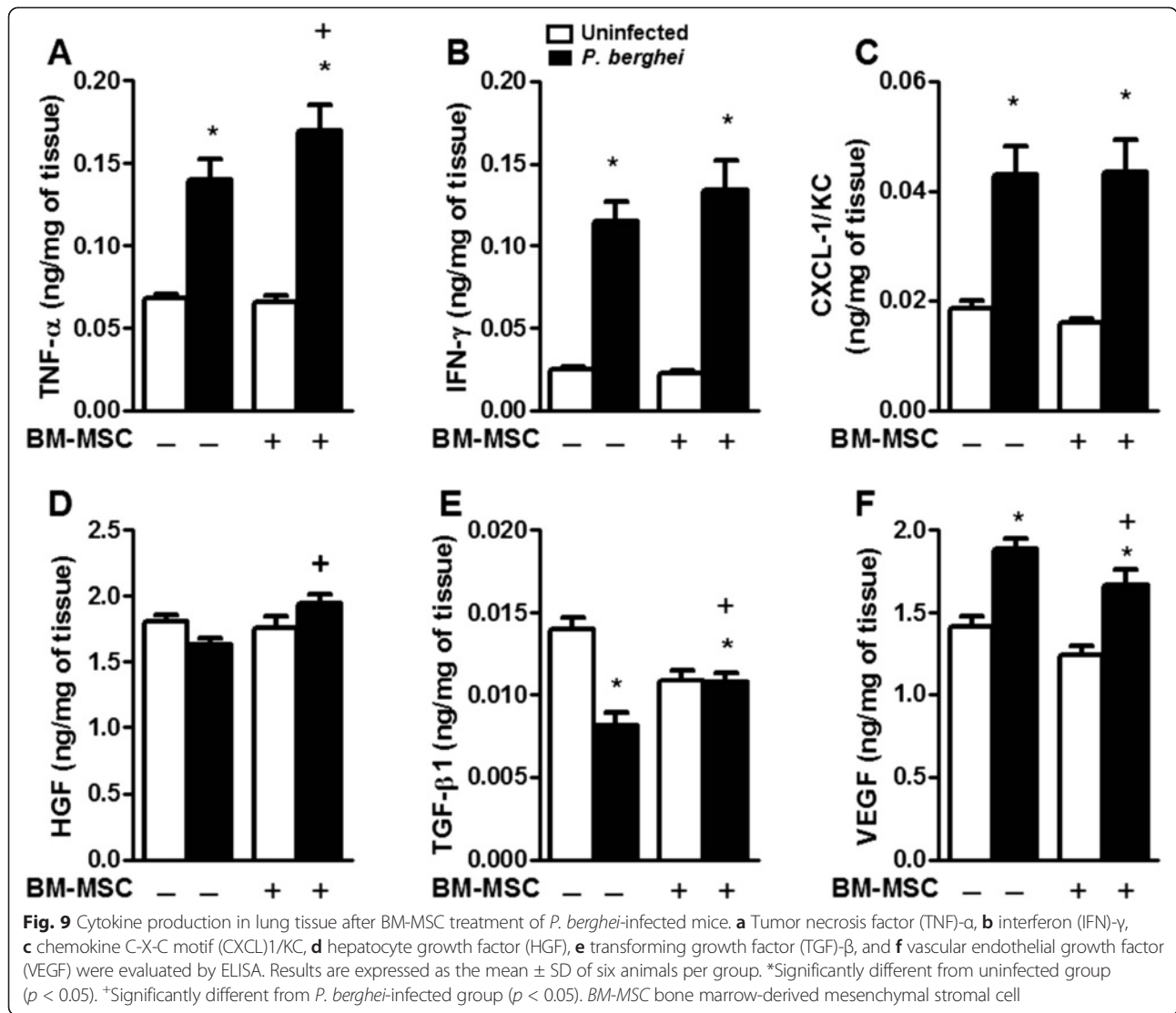


Fig. 8 Fraction area of mononuclear cells (a) and neutrophils (b). Static lung elastance (Est,L) (c). Values are the mean ± SD of six animals in each group. *Significantly different from uninfected group ($p < 0.05$). +Significantly different from *P. berghei*-infected group ($p < 0.05$). BM-MSC bone marrow-derived mesenchymal stromal cell

associated with increased parasitemia [39]. Interestingly, even though tissue parasitemia and inflammatory infiltration were reduced, BM-MSCs did not improve renal function. This dissociation between reduction in kidney damage and absence of improvement in renal function may be attributable to the duration of the analysis period, since, in previous studies, mice that survived ECM continued to exhibit evidence of kidney injury 21 days after clearance of parasitemia [38].

Some studies have reported that BM-MSCs attenuate lung inflammation and fibrosis as well as improve pulmonary function in noninfectious models [40–42]. A previous study concerning BM-MSC treatment of infectious diseases suggests that lung injury attenuation was associated with disease recovery [43]. Even though cell-based therapies have already been used in malaria infection, no study had thus far investigated the effects of BM-MSCs on ECM-associated lung damage. BM-MSCs reduced lung tissue parasitemia as well as neutrophil infiltration despite an increase in mononuclear cell counts. Additionally, BM-MSC treatment reduced lung tissue damage and fibrosis, thus improving pulmonary function, which may suggest an association between attenuation of general lung dysfunction and the outcome of ECM. In this context, it is known that any therapy which regulates the lung injury-induced inflammatory cascade may also reduce distal organ dysfunction [44]. The reduction of malaria pigment deposition in lung tissue could also result in decreased neutrophil accumulation, thus improving lung morphofunction. However, attenuation of lung injury after BM-MSC therapy is not exclusively associated with diminished parasitemia, since malaria-induced lung injury is not necessarily a direct consequence of parasitemia [45]. We thus speculate that BM-MSCs may improve lung morphofunction for several reasons: (1) intravenously administered BM-MSCs accumulate mainly in lung tissue [46]—more beneficial effects would thus occur in the lung than in other organs; (2) the decrease in tissue parasitemia would be associated with increased numbers of lung tissue phagocytic cells [47]; and (3) VEGF, which is the main factor implicated in malaria-induced lung injury [45], would be reduced. Corroborating these hypotheses, we observed that the number of macrophages was indeed increased and levels of VEGF were indeed reduced in lung tissue.

This study has some limitations that should be addressed. First, ECM was induced by *P. berghei* inoculation;



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; FiO₂: 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_L: 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_T: 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 Vasconcelos 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

¹Laboratory of Applied Pharmacology, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Av Brasil, 4365, Manguinhos, CEP-21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Laboratory 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. ³Laboratory 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. ⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, Cerqueira César, CEP-01246903 São Paulo, SP, Brazil. ⁵Laboratory 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. ⁶National 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, Welles 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) myelolymphoid 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.
- Uhlir M, Andersson J, Zumla A, Maeurer M. Adjunct immunotherapies for tuberculosis. *In J Infect Dis*. 2012;205:S325–34.
- Asami M, Owhashi M, Abe T, Nawa Y. Susceptibility of multipotent haemopoietic stem cell deficient W/W^v 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, Hellbok 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, Staal 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. Villeval 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, Haitsma 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. Epiphonio 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



Study of the antimalarial properties of hydroxyethylamine derivatives using green fluorescent protein transformed *Plasmodium berghei*

Mariana Conceição Souza^{1,2/+}, Tatiana Almeida Padua^{1,2}, Natalia Domingos Torres^{1,2}, Maria Fernanda de Souza Costa^{1,2}, Victor Facchinetti³, Claudia Regina Brandão Gomes³, Marcus Vinícius Nora Souza³, Maria das Graças Henriques^{1,2}

¹Laboratório de Farmacologia Aplicada ³Departamento de Síntese Orgânica, Farmanguinhos ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Gestão da Inovação em Doenças Negligenciadas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

A rapid decrease in parasitaemia remains the major goal for new antimalarial drugs and thus, in vivo models must provide precise results concerning parasitaemia modulation. Hydroxyethylamine comprise an important group of alkanolamine compounds that exhibit pharmacological properties as proteases inhibitors that has already been proposed as a new class of antimalarial drugs. Herein, it was tested the antimalarial property of new nine different hydroxyethylamine derivatives using the green fluorescent protein (GFP)-expressing Plasmodium berghei strain. By comparing flow cytometry and microscopic analysis to evaluate parasitaemia recrudescence, it was observed that flow cytometry was a more sensitive methodology. The nine hydroxyethylamine derivatives were obtained by inserting one of the following radical in the para position: H, 4-Cl, 4-Br, 4-F, 4-CH₃, 4-OCH₃, 4-NO₂, 4-NH₂ and 3-Br. The antimalarial test showed that the compound that received the methyl group (4-CH₃) inhibited 70% of parasite growth. Our results suggest that GFP-transfected P. berghei is a useful tool to study the recrudescence of novel antimalarial drugs through parasitaemia examination by flow cytometry. Furthermore, it was demonstrated that the insertion of a methyl group at the para position of the sulfonamide ring appears to be critical for the antimalarial activity of this class of compounds.

Key words: experimental malaria - novel antimalarial drugs - hydroxyethylamine

Malaria is the most relevant parasitic disease and, despite the many efforts made to eradicate malaria, the disease still accounts for 0.5 million deaths per year globally (WHO 2015). In Brazil, despite the number of cases has been decreasing, it still accounts for 177,767 cases in 2013 (de Pina-Costa et al. 2014, WHO 2015). The current antimalarial treatment recommended by World Health Organization (WHO) is artemisinin-based combination therapy because of artemisinin's efficacy and ability to lower the rate at which resistance emerges (WHO 2010). However, several cases of resistance to artemisinin derivatives have been observed, first at the Cambodia-Thailand border (Dondorp et al. 2010) and now spread across Southeast Asia (Ashley et al. 2014). Such a scenario compels the discovery of novel antimalarial drugs. Several approaches have been used in antimalarial drug discovery, including the use of drugs that prevent transmission or new infection, stop relapse or can be used in cases of uncomplicated and severe malaria (Aguilar et al. 2012a, Anthony et al. 2012). However, a rapid decrease in parasitaemia remains the major goal for new drugs (Burrows et al. 2013).

The biological activities of hydroxyethylamine core have been extensively studied. Hydroxyethylamines have been described as human immunodeficiency virus

(HIV) protease inhibitors (Ghosh et al. 2014) and, over the last several years, this class have been studied for their antimalarial activity (de Souza et al. 2012). The antimalarial mechanism of action of hydroxyethylamines comprises the selective inhibition of plasmodium proteases such as falcipain and plasmepsin without interfering with human proteases (Muthas et al. 2005, Rathi et al. 2013). Indeed, the study of hydroxyethylamine derivatives as a new class of antimalarial drugs could represent a safe antimalarial drug. Recently, it was demonstrated that the insertion of a cyclohexyl group in hydroxyethylamine core synthesised from alkylamines increase the antimalarial of such molecule (de Souza et al. 2012).

Herein, it was tested newly synthesised nine different hydroxyethylamine derived from ring-opening of the (2S,3S)-Boc-phenylalanine epoxide with benzylamine in refluxing isopropanol, according its antimalarial activity using the mouse in vivo model of infection with green fluorescent protein-expressing *Plasmodium berghei* (PbGFP).

MATERIALS AND METHODS

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 (Fiocruz) (Rio de Janeiro, Brazil) (permit LW52/12).

Mice and the model of infection - C57BL/6 mice (4-5 weeks old) were provided by the Fiocruz breeding unit and caged with free access to food and fresh water in a room at the Farmanguinhos experimental

doi: 10.1590/0074-02760140466

Financial support: CNPq, FAPERJ, CAPES, FIOCRUZ

+ Corresponding author: marianasouza@fiocruz.br

Received 9 December 2014

Accepted 24 April 2015

facility, with a temperature ranging from 22-24°C and a 12 h light/dark cycle, until use.

For the nontransfected and PbGFP ANKA infection [GFPcon 259c12 was kindly provided by Dr L Carvalho (Fiocruz) and is a donation from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center - MR4, deposited by CJ Janse and AP Waters (MRA-865)], the mice were intraperitoneally (i.p.) inoculated with 5×10^6 *P. berghei*-parasitised red blood cells withdrawn from a previously infected mouse. Artesunate, chloroquine or primaquine was orally administered to mice on the third day of infection (100 mg/kg, diluted in 10% ethanol and 90% propylene glycol; Farmanguinhos). For the evaluation of survival rate, lethality was registered every day until day 14 post-infection. Mice were euthanised by an i.p. injection with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) prior to pentobarbital (150 mg/kg).

Parasitaemia evaluation - At the indicated time points after infection, a thin blood smear was performed for parasitaemia determination by Diff-Quick staining. The determination of parasitaemia by microscopy was performed by counting five fields of approximately 200 erythrocytes per field. To evaluate parasitaemia by flow

cytometry, 4 μ L of blood was resuspended in 500 μ L of phosphate buffered saline/0.1% azide and the cell suspension was immediately submitted to flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences), as described (Frank-Fayard et al. 2004). Forward scatter and side scatter were set to gate the total erythrocytes and the percentage of PbGFP-infected erythrocytes was determined by fluorescence intensity. At least 10,000 events were acquired in the gate. The data analyses were performed using CellQuest software (BD Immunocytometry Systems, USA).

Antimalarial activity of hydroxyethylamine derivatives - The target compounds 5a-i were obtained as previously described (Facchinetti et al. 2014, Moreth et al. 2014). To evaluate the in vivo antimalarial efficacy of hydroxyethylamine derivatives, the PbGFP four-day suppressive test was used (Fidock et al. 2004). Two hours after infection with PbGFP, mice were randomly assigned to 11 groups: nontreated (vehicle, 200 μ L i.p.), artesunate treated [10 mg/kg/day diluted in 5% dimethyl sulfoxide (DMSO)] and a group for each hydroxyethylamine derivatives (5a-i; 10 mg/kg/day diluted in 5% DMSO). Mice were treated daily up to day 4 after infection when parasitaemia determination was performed by

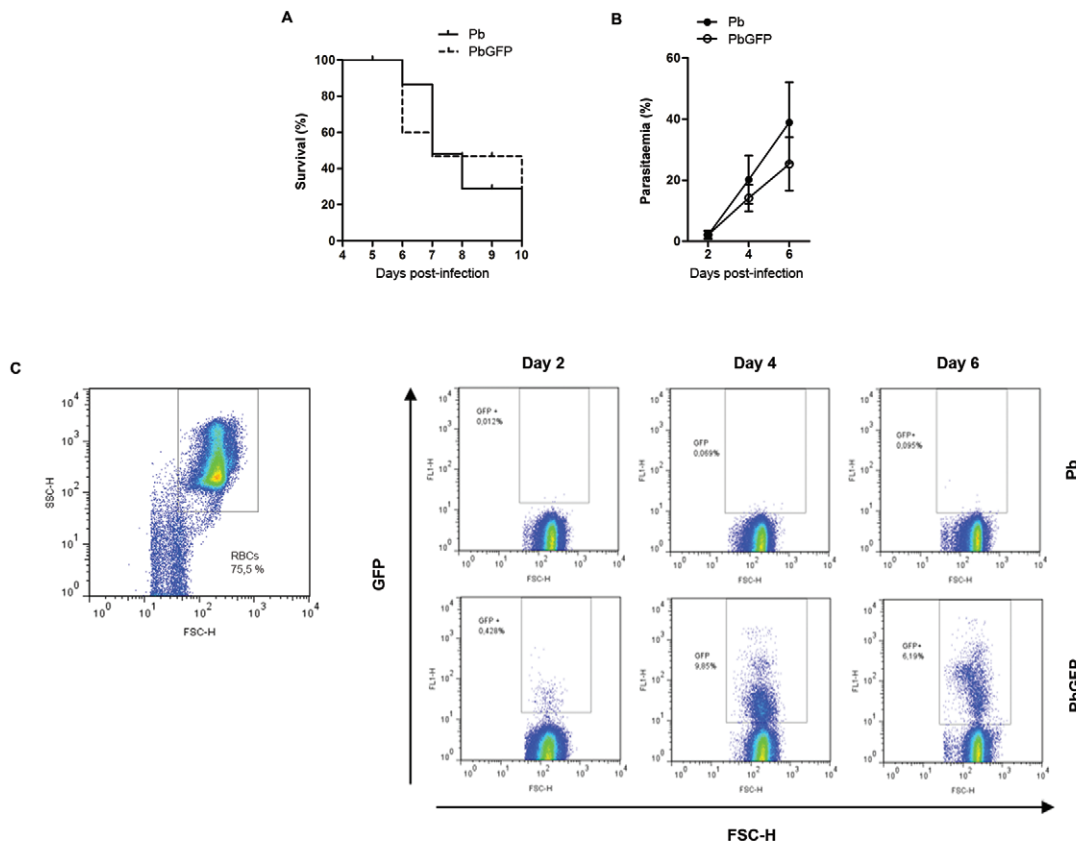


Fig. 1A: survival rates for C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (Pb) (solid line) or green fluorescent protein-expressing Pb (PbGFP) (dashed line). The log-rank test revealed no differences in the survival curves when the Pb-infected ($n = 10$) and PbGFP-infected C57BL/6 mice ($n = 10$) were compared. Evolution of parasitaemia in Pb (black symbols) or PbGFP-infected (white symbols) mice measured by microscopy (B) or cytometry (C). The results are expressed as the mean \pm standard deviation from at least six animals per group in two different experiments. Gating strategy used to isolate total red blood cells (RBCs) based on forward scatter (FSC) and side scatter (SSC), and representative dot-plots demonstrate the increase in fluorescence, as indicated by an increase in GFP expression in the RBCs is shown in C.

flow cytometry. The results are expressed as drug activity as described previously (Fidock et al. 2004). The difference between the mean value of the control group (taken as 100%) and that of the experimental groups was calculated and expressed as percent reduction (= activity) using the following equation: activity = 100 - [(mean parasitaemia treated/mean parasitaemia control) x 100].

Statistical analysis - A log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare the percentages of survival and the significance level was set at $p < 0.05$. The correlation coefficient and Bland-Altman limit were calculated. Additional statistical significance was assessed using ANOVA followed by the Newman-Keuls t test. The results are expressed as the mean \pm standard error of the means and the significance level in all cases was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Comparison of recrudescence test using Pb and PbGFP-infected mice - In view of the importance to observe the rapid decrease of parasitaemia after antimalarial treatment, it was first compared two methodologies used to the test of new antimalarial drugs (Aguiar et al. 2012b, de Souza et al. 2012). It was observed that Pb and PbGFP-infected mice exhibited similar survival curves ($p = 1.00$) (Fig. 1A). In addition, the parasitaemia in the Pb and PbGFP groups, as counted by microscopy, was not statistically different and increased up to day 6 post-infection (Fig. 1B). PbGFP-infected erythrocytes were further counted by flow cytometry and it was observed increased levels of parasitaemia up to day 6 post-infection (Fig. 1C). A positive correlation was observed between the parasitaemia counted by microscopy from Pb and PbGFP-infected mice (Fig. 2A). In addition, the evaluation of parasitaemia from PbGFP-infected mice analysed by microscopy or by flow cytometry revealed a significant positive linear correlation ($p = 0.006$) (Fig. 2B). To confirm that two different methodologies would infer the same result, it was performed a Bland-Altman analysis that also indicated that the evaluation of parasitaemia by cytometry and by microscopy are equivalent (bias = 0.1%; 95% limit of agreement = 4.2%) (Fig. 2C).

Concerning recrudescence studies, up to 48 h after treatment with chloroquine, no infected erythrocytes were found in the blood smears obtained from treated mice (Fig. 3A-C, respectively). However, using flow cy-

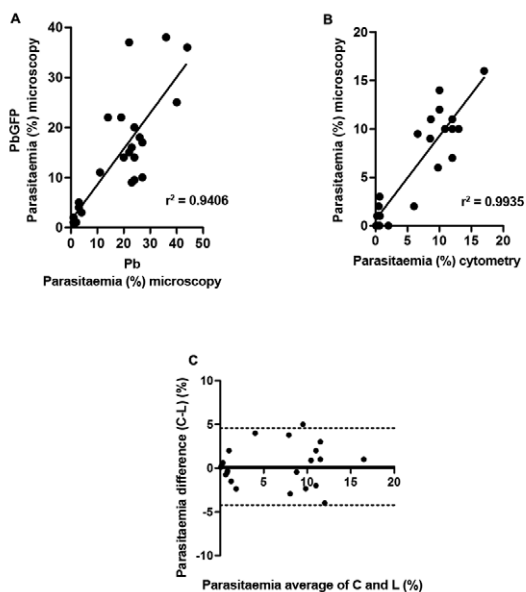


Fig. 2: correlation analyses of parasitaemia estimated by microscopy and cytometry. A: correlation between parasitaemia in mice infected with *Plasmodium berghei* (Pb) or green fluorescent protein-expressing Pb (PbGFP) evaluated by microscopy; B: correlation between parasitaemia in PbGFP-infected mice evaluated by microscopy and cytometry; C: Bland-Altman plot representing the bias (0.1%) and 95% limit of agreement (4.2%) for the parasitaemia evaluation.

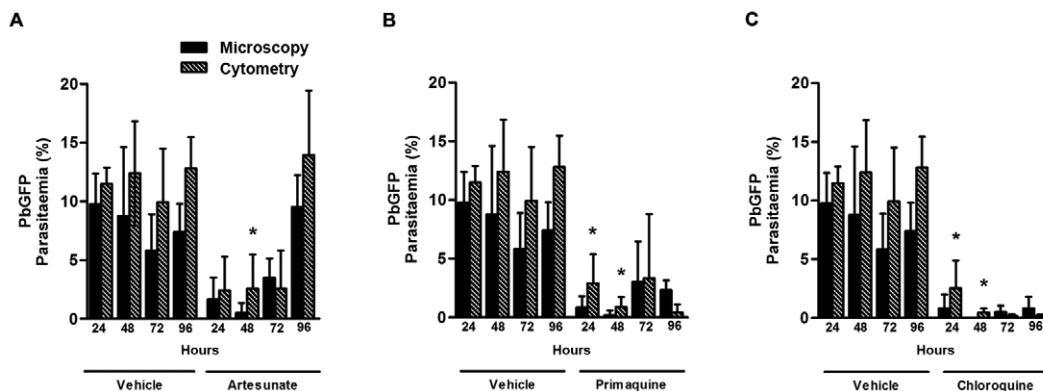


Fig. 3: evaluation of recrudescence after treatment with antimalarial drugs. Mice were infected with green fluorescent protein-expressing *Plasmodium berghei* (PbGFP) and treated with artesunate (A), chloroquine (B) or primaquine (C) at day 3 post-infection and parasitaemia was evaluated up to 96 h after treatment. Parasitaemia was evaluated by microscopy (black bars) and cytometry (hatched bars). The results are expressed as the mean \pm standard deviation from at least six animals per group in two different experiments. Statistically significant differences compared to the group evaluated by microscopy ($p < 0.05$) are indicated by an asterisk.

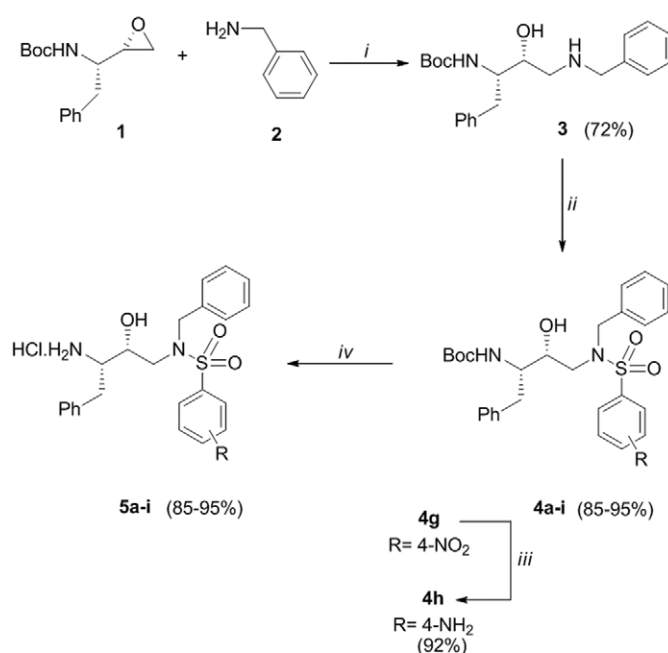


Fig. 4: reaction and conditions (*i*: isopropanol, reflux, 16 h; *ii*: Et₃N, DMF, RC₆H₄SO₂Cl, CH₂Cl₂, r.t., 4 h; *iii*: H₂, Pd/C 10%, EtOH, r.t., 16 h; *iv*: HCl gas, EtOH, r.t., 4 h).

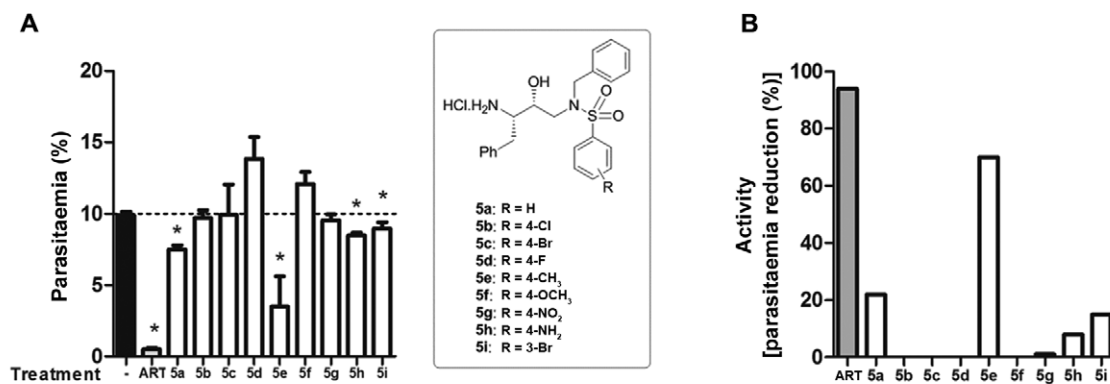


Fig. 5: antimalarial activity of the hydroxyethylamine derivatives. The mice were treated daily with artesunate (ART) or derivatives (10 mg/kg/day; intraperitoneally). Drug activity was evaluated at day 4 after infection and is expressed as (A) parasitaemia levels or as (B) activity, according to the following equation: activity = 100 - [(mean parasitaemia treated/mean parasitaemia control) x 100]. It was used at least six animals per group in two different experiments.

ometry, an increase in the parasitaemia of treated mice was observed, especially in mice treated with primaquine or chloroquine. At 72 h and 96 h after treatment, infected erythrocytes were observed in the blood smears at the same extent observed by flow cytometry.

Antimalarial activity of hydroxyethylamine derivatives - Because PbGFP is an effective model to study antimalarial drugs, PbGFP-infected mice were treated

with nine hydroxyethylamine derivatives ((2*S*,3*R*)-2-(amino)-[4-(*N*-benzylarenesulfonamido)-3-hydroxy-1-phenylbutane]. The preparation of the target compounds 5a-i (Fig. 4) has been previously described (Facchinetti et al. 2014, Moreth et al. 2014).

Of the nine tested compounds, 5a and 5e showed antimalarial activity. Compound 5e was able to reduce 70% of the parasitaemia and was the most active substance of this series (Fig. 5).

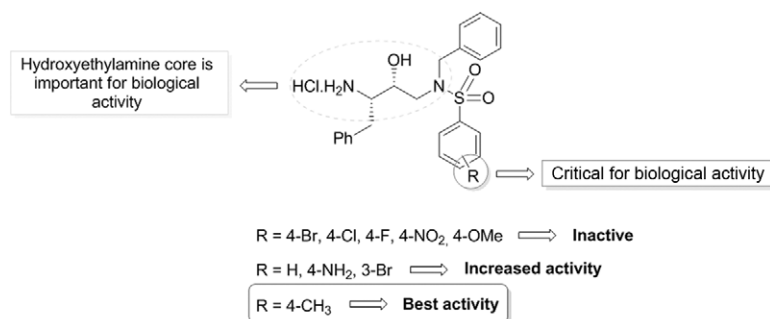


Fig. 6: structure-activity relationship for the studied hydroxyethylamine 5a-i series.

DISCUSSION

Herein, it was proposed the study of newly synthesised hydroxyethylamine derivatives as antimalarial compounds using PbGFP. Furthermore, it was observed that parasitaemia evaluation by flow cytometry reveal low parasitaemia levels, which is not observed by microscopic analysis.

As described before, according the Medicine for Malaria Venture, the “ideal” candidate profile of an antimalarial drug is whom account for fast parasite clearance over 48 h after treatment (Burrows et al. 2013). In such way, it is important to use techniques for parasite evaluation that lead to accurate results. The construction of PbGFP was performed by Franke-Fayard et al. (2004) and has been used in a wide range of studies (Sultan et al. 1999, Sanchez et al. 2004, Tewari et al. 2010, de Souza et al. 2012), including the screening of novel antimalarial drugs (de Souza et al. 2012, Lam et al. 2013, Wang et al. 2014). It is interesting to note the presence of infected erythrocytes up to 48 h after treatment with chloroquine by flow cytometry that was not detected by microscopic analysis. Flow cytometry allows faster and accurate parasitaemia examination because this technique can identify small amounts of parasites in the blood (Malleret et al. 2011). Although flow cytometry is a costly and complex technology to examine parasitaemia for routine diagnosis purposes, the required instrumentation and materials are widely available in research and development institutions for research purpose (Shapiro et al. 2013). Parasitaemia evaluation by microscopic examination, despite widely used as main test for diagnosis purposes (WHO 2015), is labour and time-consuming, as well as dependent on microscopist training and ability (Payne 1988). Limitations for PbGFP usage as a tool for the discovery of pyrimethamine-based drugs should be addressed, since the construction of PbGFP required the insertion of pyrimethamine-resistant gene at the same vector where GFP gene is insert aiming to select the successfully transfected parasites.

Hydroxyethylamine derivative has been used in different biological approaches, as HIV-1 protease inhibitor (Ghosh et al. 2014) and inhibitor of β -secretase 1, an enzyme associated with neurodegeneration (Nordeman et al. 2014). As well, the hydroxyethylamine-based compounds has been tested as antimalarial drugs since this

compounds are able to inhibit the activity of plasmepsin (Muthas et al. 2005) and falcipain (Rathi et al. 2013), main enzymes involved in parasite development (Blackman 2008). It was previously showed that hydroxyethylamine derivatives (ciclohexyl group inserted in hydroxyethylamine core) synthesised from alkylamines presented antimalarial activity (de Souza et al. 2012). Herein, it was tested the in vivo activity of new nine different ((2S,3R)-2-(amino)-[4-(N-benzylarenesulfonamido)-3-hydroxy-1-phenylbutane derivatives and observed that the insertion of a methyl group at the *para* position of the sulfonamide ring appears to be critical for the antimalarial activity of this class of compounds (Fig. 6). Interestingly, hydroxyethylamine exhibits no toxic effect on erythrocytes and does not inhibit human proteases (Muthas et al. 2005), suggesting that hydroxyethylamine derivatives would be safe and effective novel antimalarial drugs. In fact, its biological activity may be attributed to a secondary alcohol structural element, which mimics the tetrahedral intermediate during metabolite cleavage by proteases (Cunico et al. 2009). In addition, Jaudzems et al. (2014) showed that the insertion of two methyl group in hydroxyethylamine-based compounds increased compound activity on *Plasmodium faciparum* enzymes when compared to nonmethylated compound.

Together, our results suggest that PbGFP is a useful tool to study the recrudescence of novel antimalarial drugs through parasitaemia examination by flow cytometry. Furthermore, it was demonstrated that the insertion of a methyl group at the *para* position of the sulfonamide ring appears to be critical for the antimalarial activity of this class of compounds.

REFERENCES

- Aguiar ACC, da Rocha EMM, de Souza NB, França TCC, Krettli AU 2012a. New approaches in antimalarial drug discovery and development - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 831-845.
- Aguiar ACC, Santos RM, Figueiredo FJB, Cortopassi WA, Pimentel AS, França TCC, Meneghetti WR, Krettli AU 2012b. Antimalarial activity and mechanisms of action of two novel 4-aminoquinolines against chloroquine-resistant parasites. *PLoS ONE* 7: e37259.
- Anthony MP, Burrows JN, Duparc S, Moehrle J, Wells TN 2012. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malar J* 11: 316-341.

- Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runcharoen R, Hien TT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htut Y, Han KT, Aye KH, Mokuolu OA, Olaosebikan RR, Folaranmi OO, Mayxay M, Khanthavong M, Hongvanthong B, Newton PN, Onyamboko MA, Fanello CI, Tshefu AK, Mishra N, Valecha N, Phyto AP, Nosten F, Yi P, Tripura R, Borrmann S, Bashraheil M, Peshu J, Faiz MA, Ghose A, Hossain MA, Samad R, Rahman MR, Hasan MM, Islam A, Miotto O, Amato R, MacInnis B, Stalker J, Kwiatkowski DP, Bozdech Z, Jeeyapant A, Cheah PY, Sakulthaew T, Chalk J, Intharabut B, Silamut K, Lee SJ, Vihokhern B, Kunasol C, Imwong M, Tarning J, Taylor WJ, Yeung S, Woodrow CJ, Flegg JA, Das D, Smith J, Venkatesan M, Plowe CV, Stepniewska K, Guerin PJ, Dondorp AM, Day NP, White NJ 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 371: 411-423.
- Blackman MJ 2008. Malarial proteases and host cell egress: an “emerging” cascade. *Cell Microbiol* 10: 1925-1934.
- Burrows JN, van Huijsduijnen RH, Möhrle JJ, Oeuvray C, Wells TN 2013. Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malar J* 12: 187-207.
- Cunico W, Gomes CR, Moreth M, Manhanini DP, Figueiredo IH, Penido C, Henriques MG, Varotti FP, Krettli AU 2009. Synthesis and antimalarial activity of hydroxyethylpiperazine derivatives. *Eur J Med Chem* 44: 1363-1368.
- de Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFS, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT 2014. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 618-633.
- de Souza MC, Gonçalves-Silva T, Moreth M, Gomes CR, Kaiser CR, Henriques MO, de Souza MV 2012. Synthesis and in vivo antimalarial evaluation of novel hydroxyethylamine derivatives. *Med Chem* 8: 266-272.
- Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NP, Socheat D, von Seidlein L 2010. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol* 8: 272-280.
- Facchinetti V, Gomes CRB, de Souza MVN, Vasconcelos TRA, Wardell S, Wardell JL 2014. Solvates of two ethyl 6-(2-(aryl)-4-oxothiazolidin-3-yl)-1-ethyl-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylates. *J Chem Crystallogr* 44: 471-479.
- Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S 2004. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* 3: 509-520.
- Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, Sinden RE, Waters AP, Janse CJ 2004. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 137: 23-33.
- Ghosh AK, Schiltz GE, Rusere LN, Osswald HL, Walters DE, Amano M, Mitsuya H 2014. Design and synthesis of potent macrocyclic HIV-1 protease inhibitors involving P1-P2 ligands. *Org Biomol Chem* 12: 6842-6854.
- Jaudzems K, Tars K, Maurops G, Ivdrā N, Otkovs M, Leitans J, Kanepe-Lapsa I, Domraceva I, Mutule I, Trapencieris P, Blackman MJ, Jirgensons A 2014. Plasmepsin inhibitory activity and structure-guided optimization of a potent hydroxyethylamine-based antimalarial hit. *ACS Med Chem Lett* 5: 373-377.
- Lam CFC, Pearce AN, Tan SH, Kaiser M, Copp BR 2013. Discovery and evaluation of thiazinoquinones as anti-protozoal agents. *Mar Drugs* 11: 3472-3499.
- Malleret B, Claser C, Ong AS, Suwanarusk R, Sriprawat K, Howland SW, Russell B, Nosten F, Rénia L 2011. A rapid and robust tri-color flow cytometry assay for monitoring malaria parasite development. *Sci Rep* 1: 118-128.
- Moreth M, Gomes CR, Lourenço MC, Soares RP, Rocha MN, Kaiser CR, de Souza MV, Wardell SM, Wardell JL 2014. Syntheses and antimycobacterial activities of (2S,3R)-2-(amino)-4-(arenesulfonamido)-3-hydroxy-1-phenylbutane derivatives. *Med Chem* 10: 189-200.
- Muthas D, Noteberg D, Sabnis YA, Hamelink E, Vrang L, Samuelsen B, Karlén A, Hallberg A 2005. Synthesis, biological evaluation and modeling studies of inhibitors aimed at the malarial proteases plasmepsins I and II. *Bioorg Med Chem* 13: 5371-5390.
- Nordeman P, Estrada S, Odell LR, Larhed M, Antoni G 2014. (11) C-labeling of a potent hydroxyethylamine BACE-1 inhibitor and evaluation in vitro and in vivo. *Nucl Med Biol* 41: 536-543.
- Payne D 1988. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ* 66: 621-626.
- Rathi B, Singh AK, Kishan R, Singh N, Latha N, Srinivasan S, Pandey KC, Tiwari HK, Singh BK 2013. Functionalized hydroxyethylamine based peptide nanostructures as potential inhibitors of falcipain-3, an essential proteases of *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem* 21: 5503-5509.
- Sanchez BA, Mota MM, Sultan AA, Carvalho LH 2004. *Plasmodium berghei* parasite transformed with green fluorescent protein for screening blood schizontocidal agents. *Int J Parasitol* 34: 485-490.
- Shapiro HM, Apte SH, Chojnowski GM, Hanscheid T, Rebelo M, Grimberg BT 2013. Cytometry in malaria - a practical replacement for microscopy? *Curr Protoc Cytom* 11: Unit 11.20.
- Sultan AA, Thathy V, Nussenzweig V, Menard R 1999. Green fluorescent protein as a marker in *Plasmodium berghei* transformation. *Infect Immun* 67: 2602-2606.
- Tewari R, Straschil U, Bateman A, Bohme U, Cherevach I, Gong P, Pain A, Billker O 2010. The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies. *Cell Host Microbe* 8: 377-387.
- Wang J, Kaiser M, Copp BR 2014. Investigation of indolglyoxamide and indolacetamide analogues of polyamines as antimalarial and antitrypanosomal agents. *Mar Drugs* 12: 3138-3160.
- WHO - World Health Organization 2010. *Guidelines for the treatment of malaria*, 2nd ed., WHO, Geneva, 194 pp.
- WHO - World Health Organization 2015. World malaria report 2014. Available from: who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/.