

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

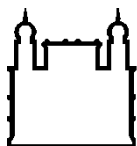
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Avaliação do papel da heme oxigenase na plaquetopenia e na injúria pulmonar aguda durante a malária experimental murina**

**Isaclusia Gomes de Azevedo Quintanilha**

**Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto**

Rio de Janeiro  
2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

***ISACLAUDIA GOMES DE AZEVEDO QUINTANILHA***

**Avaliação do papel da heme oxigenase na plaquetopenia e na injúria pulmonar aguda durante a malária experimental murina**

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

**Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto**

Rio de Janeiro  
2017

Azevedo-Quintanilha, Isaclaudia Gomes de.

Avaliação do papel da heme oxigenase na plaquetopenia e na injúria pulmonar aguda durante a malária experimental murina / Isaclaudia Gomes de Azevedo-Quintanilha. - Rio de Janeiro, 2017.

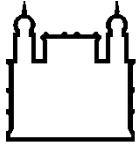
150 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Hugo Caire de Castro Faria Neto.

Bibliografia: f. 94-133

1. Malária pulmonar. 2. plaqueta. 3. heme oxigenase. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

**AUTOR: Isaclaudia Gomes de Azevedo Quintanilha**

**Avaliação do papel da heme oxigenase na plaquetopenia e na injúria pulmonar aguda durante a malária experimental murina**

**Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto**

**Aprovada em 15 de março de 2017**

### **EXAMINADORES:**

**Prof<sup>a</sup>. – Dra Alda Maria da Cruz - Presidente – IOC**

**Prof. – Dra Mariana Conceição de Souza - FARMANGUINHOS**

**Prof<sup>a</sup>. – Dra Vanessa Estado – IOC**

**Prof. – Dr Fernando Augusto Bozza – Suplente - INI**

**Prof. – Dr Paulo Totino –Revisor e Suplente – IOC**

Rio de Janeiro

**AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr Hugo Caire de Castro Faria Neto, por me dar a chance de trabalhar com seu grupo, e por todo aprendizado que me proporcionou.

Agradeço a Dra Adriana Vieira de Abreu por abrir as portas da ciência para mim, por acreditar em mim, por sempre estar disposta a me ajudar (independente do fuso), por me ouvir, tirar minhas dúvidas, discutir resultados, por todo o carinho.

À Dra Patricia Bozza pelo exemplo de trabalho, dinamismo e todo incentivo. E ao Dr Valber Frutuoso por estar sempre me apoiando e disposto a ajudar.

Ao meu irmão(zão) científico ao Ms André Costa Ferreira, por todos os experimentos intermináveis que ele esteve ao meu lado, por todas as vezes “que não estava mais afim de brincar”, por sempre estar disposto a embarcar em meus desenhos experimentais de dias inteiro. Enfim, por estar ao meu lado me apoiando. À Dra Isabel Moraes, pelas conversas até o experimento acabar, por sempre me apoiar quando eu “inventava” de acrescentar algo mais no meu projeto, por ser advogada do contra sempre que foi necessário, por todas as conversas, lamentações e alegrias. Vocês dois foram muito importantes para realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal.

À Dra Andrea Surrage, minha grande mãe de “TOC”, me inspirando a sempre organizar tudo. À Dra Patrícia Reis, por sua solicitude, boas conversas tanto as intelectuais como as triviais, por ser uma grande amiga e exemplo de pesquisadora. À Dra Adriana Ribeiro, por ter me levado para o laboratório e sempre estar disposta a esclarecer as minhas dúvidas e acalmar meus desesperos.

As alunas de iniciação científica Mayara e Priscila, que ajudaram sempre prontamente, todos os fins de semana, tendo carona ou não, sempre dispostas para novas aventuras e cores. E a todos os demais do grupo do laboratório de IMUNOFARMACOLOGIA que ajudaram direta ou indiretamente nas discussões, nos resultados, ou na simples troca de experiência, meu muito obrigada a todos vocês.

À secretária Rose Branco que mantém as engrenagens do laboratório rodando, sempre disposta a resolver nossos problemas, mas também pelo bom humor e boas risadas nos almoços. Em especial pela amizade e conselhos nos mais diversos temas.

A todos os companheiros dos outros laboratórios de nosso prédio.

Ao Dr Paulo Totino por ter aceitado o trabalho de revisar minha tese e de ser suplente. À Dra Alda, ao Dra Mariana Conceição de Souza e a Dra Vanessa Estado, por terem aceitado tão prontamente participar da minha banca. E também ao Dr Fernando Bozza por ter aceitado ser suplente.

À equipe do apoio laboratorial sempre resolvendo nossos problemas. Ao pessoal do biotério por realizar seu trabalho com solicitude e bom humor. À equipe da limpeza e aos seguranças pela preocupação com o nosso bem estar e pelas notícias sobre o mundo lá fora.

As agências de fomento, CNPq, FAPERJ e CAPES por todo o suporte financeiro.

A minha família e ao meu marido que sempre me apoiaram e incentivaram a estudar, por me amparar sempre que necessário e por acreditar em mim. E a Deus e Nossa Senhora por estarem sempre ao meu lado, me dando forças para continuar.

## EPÍGRAFE

*“A ciência é composta de erros, que por sua vez,  
são passos em direção a verdade.”*

*Júlio Verne*

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA MALÁRIA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. CICLO DO PARASITO.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. FISIOPATOLOGIA.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.1. Resposta Imune Inata: PAMPS e DAMPS na infecção malárica.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.2.Reconhecimento dos PAMPs e DAMPs.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.3. Desenvolvimento da imunopatologia na malária.....</b>	<b>15</b>
<b>1.5. HEME OXIGENASE.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.1. A Citoproteção.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5.2. HO-1 na malária.....</b>	<b>23</b>
<b>1.6. PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6.1.Plaquetas.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6.2.Imunopatogênese da plaquetopenia na malária.....</b>	<b>30</b>
<b>1.7.MALÁRIA PULMONAR.....</b>	<b>33</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>



2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. Animais.....	37
3.2. Infecção com <i>P. berghei</i> NK65 ou com <i>P. berghei</i> ANKA .....	37
3.3. Tratamentos.....	38
3.4. Desenho Experimental.....	38
3.5. Obtenção de tecidos.....	40
3.6. Curva de Sobrevida.....	40
3.7. Lavado broncoalveolar (LBA).....	40
3.8. Contagem total e diferencial das células do sangue periférico e do LBA.....	41
3.9. Dosagem de proteínas pelo método do BCA.....	41
3.10. Dosagem de citocinas através do ensaio imunossorvente ligado à enzima ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , ELISA) .....	41
3.11. Permeabilidade vascular.....	42
3.12. Análises histológicas.....	43
3.13. Citometria de fluxo.....	43
3.13.1. Contagem de Plaqueta.....	43
3.13.2. Agregação Plaquetária.....	44
3.13. Análise da Plaquetopoiese .....	44
3.14. Western blotting.....	45
3.15. Análises estatísticas.....	46
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1. A infecção por <i>Plasmodium berghei</i> NK65 ( <i>P. berghei</i> NK65 ) induz parasitemia e	47

<b>alto taxa de mortalidade em animais C57Bl/6.....</b>	
<b>4.2. A infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz migração de células para o espaço alveolar.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3. A infecção por <i>P. berghei</i> NK65 desencadeia infiltração leucocitária no tecido pulmonar.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4. A infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz a formação do edema pulmonar.....</b>	<b>51</b>
<b>4.5. A infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz a liberação de quimiocinas no LBA e no pulmão.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6. A infecção com <i>P. berghei</i> NK65 leva a uma acentuada plaquetopenia.....</b>	<b>55</b>
<b>4.7. Aumento da agregação plaquetária em decorrência da infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....</b>	<b>56</b>
<b>4.8. Infecção malárica leva a inibição da plaquetopoiese.....</b>	<b>57</b>
<b>4.9. A infecção por <i>P. berghei</i> NK65 pode estar interferindo no número de plaquetas no pulmão.....</b>	<b>59</b>
<b>4.10. A infecção por <i>P. berghei</i> NK65 gera aumento na expressão de Heme Oxigenase (HO-1) no pulmão.....</b>	<b>60</b>
<b>4.11. O tratamento com indutor Cobalto Protoporfina IX (CoPPIX) e com inibidor Zinco Protoporfirina IX (ZNPPIX) da atividade da HO-1 não interfere com a parasitemia e com peso corporal dos animais após a infecção.....</b>	<b>61</b>
<b>4.12. O tratamento com CoPPIX protege os animais de sucumbirem de malária pulmonar.....</b>	<b>63</b>
<b>4.13. O tratamento com CoPPIX leva a uma diminuição da migração celular para o LBA durante a infecção malárica.....</b>	<b>64</b>
<b>4.14. O tratamento com CoPPIX leva a um aumento do número de células no sangue periférico durante a infecção malárica.....</b>	<b>66</b>
<b>4.15. O tratamento com CoPPIX diminui o infiltrado leucocitário pulmonar durante a infecção malárica.....</b>	<b>68</b>
<b>4.16. O tratamento com CoPPIX interfere de maneira protetora na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar durante a infecção malárica.....</b>	<b>70</b>

<b>4.17. O tratamento CoPPIX e ZnPPIX não interfere com a liberação de quimiocinas inflamatórias durante a infecção malárica.....</b>	<b>73</b>
<b>4.18. O tratamento com CoPPIX e ZnPPIX aumenta a expressão da HO-1 nos animais controle.....</b>	<b>75</b>
<b>4.19. O tratamento com CoPPIX interfere na plaquetopenia durante a infecção malárica.....</b>	<b>76</b>
<b>4.20. O tratamento com CoPPIX e ZnPPIX interfere com a concentração de plaquetas no pulmão.....</b>	<b>78</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>93</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>

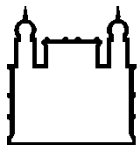
## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1	Áreas com ocorrência de malária no mundo.....	1
Figura 1.1.2	Áreas com ocorrência de malária no Brasil.....	2
Figura 1.2.1	Ciclo do <i>Plasmodium sp.</i> .....	7
Figura 1.4.1	Esquema da citoaderência.....	17
Figura 1.6.1	Estímulos da HO-1.....	20
Figura 3.4.1	Desenho Experimental 1.....	39
Figura 3.4.2	Desenho Experimental 2.....	39
Figura 4.1.1	Parasitemia e curva de sobrevida na infecção <i>P. berghei</i> NK65.....	47
Figura 4.2.1	Número de leucócitos (mononucleares e polimorfonucleares) no LBA dos animais infectados <i>P. berghei</i> NK65.....	49
Figura 4.3.1	Análises histológicas de pulmão de animais infectados com <i>P. berghei</i> NK65.....	50
Figura 4.4.1	Formação de edema pulmonar na infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	52
Figura 4.5.1	Nível de quimiocinas no homogenato do tecido pulmonar e no LBA dos animais infectado por <i>P. berghei</i> NK65.....	54
Figura 4.6.1	Plaquetopenia na infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	55
Figura 4.7.1	Agregação plaquetária na infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	56
Figura 4.8.1	Inibição da plaquetopoiese na infecção por <i>P. berghei</i> ANKA.....	57
Figura 4.8.2	Inibição da plaquetopoiese na infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	58
Figura 4.9.1	Produção de plaquetas no pulmão na infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	59
Figura 4.10.1	Aumento da expressão de HO-1 no pulmão durante a infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	60
Figura 4.11.1	Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX no desenvolvimento da infecção malárica.....	62
Figura 4.12.1	Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX na mortalidade desencadeada pela infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	63
Figura 4.13.1	Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX no recrutamento celular para o pulmão após a infecção <i>P. berghei</i>	65

	<b>NK65.....</b>	
Figura 4.14.1	<b>Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX no recrutamento celular no sangue periférico após a infecção com <i>P. berghei</i> NK65.....</b>	67
Figura 4.15.1	<b>Pulmão dos animais tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX.....</b>	68
Figura 4.15.2	<b>Análises histológicas de pulmão de animais infectados por <i>P. berghei</i> NK65, e tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX.....</b>	69
Figura 4.16.1	<b>Extravasamento de proteínas nos animais infectados por <i>P. berghei</i> NK65 e tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX.....</b>	70
Figura 4.16.2	<b>Integridade da barreira alvéolo-capilar em animais infectados por <i>P. berghei</i> NK65 e tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX.....</b>	72
Figura 4.17.1	<b>Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX na liberação de quimiocinas.....</b>	74
Figura 4.18.1	<b>Animais controle tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX apresentam maior expressão da enzima HO-1 no pulmão.....</b>	75
Figura 4.19.1	<b>Animais infectados por <i>P. berghei</i> NK65 e tratados com CoPPIX não apresentam plaquetopenia.....</b>	77
Figura 4.20.1	<b>Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX na expressão de <math>\alpha</math>IIb (CD41) no pulmão.....</b>	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.3.1	<b>Modelos experimentais murinos para o estudo da malária.....</b>	10
Tabela 1.6.1	<b>Grânulos secretórios de plaquetas e seus conteúdos.....</b>	27
Tabela 3.9.1	<b>Anticorpos usado nos ensaios de ELISA.....</b>	42



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

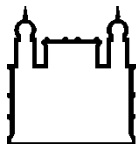
## **Avaliação do papel da heme oxigenase na plaquetopenia e na injúria pulmonar aguda durante malária experimental murina**

### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

Isaclusia Gomes de Azevedo Quintanilha

A malária é uma doença infecciosa grave, causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, transmitido de uma pessoa para outra pela picada do mosquito do gênero *Anopheles*. Segundo a OMS a malária ocasiona até 500 mil mortes por ano. A injúria pulmonar desencadeada pela malária pode ocorrer tanto em casos graves quanto não graves, já tendo sido relatado em infecções ocasionadas pelos cinco tipos de Plasmódio infectantes de humano. O processo infeccioso envolve a interação de diversas células e uma intensa resposta do hospedeiro buscando controlar a infecção. As plaquetas podem interagir com hemácias parasitadas, leucócitos e o endotélio, e acumular em focos inflamatórios. Esse acúmulo pode levar a eventos de obstrução e aumento da liberação de mediadores inflamatórios, sendo este um fenômeno importante no microambiente pulmonar. A indução da enzima heme oxigenase é importante na resposta do hospedeiro frente ao heme livre e a diversos outros PAMPs e DAMPs, como ADP, ATP, LPS gerado por doenças infecciosas ou não. Além disso, o papel do isotipo heme oxigenase-1 já foi demonstrado na malária experimental cerebral e em casos clínicos. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo determinar a influência da proteína heme oxigenase na plaquetopenia e na injúria pulmonar aguda durante a infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65. E neste trabalho observamos que o nosso modelo de malária foi capaz de gerar uma injúria pulmonar intensa, uma vez que os animais infectados apresentaram a evolução esperada da infecção através da análise da parasitemia; e do aumento da liberação de mediadores inflamatórios, do edema e da migração de células para o pulmão. O nosso modelo também apresentou plaquetopenia acentuada, acompanhada de agregação plaquetária a hemácias e a leucócitos avaliados no sangue periférico e foi sugestivo para redução de produção de plaquetas nos dois principais sítios, ou seja, tanto na medula óssea como no pulmão. Ao realizamos o tratamento dos animais infectados e controles com o indutor da atividade da enzima HO-1 o cobalto protoporfirina IX (CoPPIX), ou com o inibidor da atividade a zinco protoporfirina IX (ZnPPIX), observamos mudanças no quadro inflamatório. O tratamento dos animais com o CoPPIX e com ZnPPIX, não desencadeou diferença na evolução da infecção com relação a parasitemia. Contudo os animais tratados com CoPPIX apresentaram uma melhora no quadro de injúria pulmonar, com menor infiltrado inflamatório, no tecido pulmonar e maior número de células no sangue periférico e não houve formação de edema. Complementarmente observamos uma menor queda no número de plaquetas, influenciada por uma possível maior produção no pulmão. Nossos dados sugerem que a HO-1 influencia na injúria pulmonar e na plaquetopenia durante a infecção malárica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## ABSTRACT

### TESE DE DOUTORADO

Isa Claudia Gomes de Azevedo Quintanilha

Malaria is a serious infectious disease caused by the protozoan of the genus *Plasmodium*, transmitted from one person to another by the mosquito bite of the genus *Anopheles*. According to WHO, malaria causes up to 500,000 deaths per year. Malaria-triggered lung injury can occur in both severe and non-severe cases and has been reported in infections caused by the five types of *Plasmodium sp.* The infectious process involves the interaction of several cells and an intense host response seeking to control the infection. Platelets may interact with parasitized erythrocytes, leukocytes and the endothelium, and accumulate in the inflammatory loci. This accumulation can lead to obstruction events and increase the release of inflammatory mediators, being this an important phenomenon in the pulmonary microenvironment. Induction of the heme oxygenase enzyme is important in the host's response to free heme and to several other PAMPs and DAMPs like ADP, ATP, LPS generated by infectious or non-infectious diseases. In addition, an important role for the heme oxygenase-1 isotype has been demonstrated in experimental cerebral malaria and in clinical cases. Therefore, the present work aims to determine the influence of heme oxygenase protein in thrombocytopenia and acute pulmonary injury during *Plasmodium berghei NK65* infection. In this work we showed that our malaria model was able to generate an intense lung injury, since we observed that the infected animals presented the expected evolution of the infection through the parasitemia analysis; and increased release of inflammatory mediators, edema, and migration of cells into the lung. Our model also presented marked thrombocytopenia, accompanied by platelet aggregation to red blood cells and leukocytes, evaluated in peripheral blood, and was suggestive of reduced platelet production in the two main sites, that is, both bone marrow and lung. When we performed the treatment of the infected animals and controls with the HO-1 inducer cobalt protoporphyrin IX (CoPPIX) or inhibitor zinc protoporphyrin IX (ZnPPIX), we observed changes in the inflammatory picture. The treatment of the animals with CoPPIX and with ZnPPIX showed no difference in the evolution of the infection in relation to parasitemia. However, the animals treated with CoPPIX showed an improvement in lung injury, with a lower inflammatory infiltrate in the pulmonary tissue and a greater number of cells in the peripheral blood, no formation of edema and a smaller decrease in the number of platelets. Our data suggest that HO-1 influences lung injury and thrombocytopenia during malaria infection.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	-Terapia combinada com artemisinina ( <i>artemisinin-based combination therapies</i> )
AGM	-Anemia grave da malária
ARDS	-Síndrome da angústia respiratória aguda ( <i>Acute respiratory distress syndrome</i> )
BCA	- Ácido bicinconínico ( <i>Bicinchoninic acid</i> )
BSA	-Albumina sérica bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CCL-2/MCP-1	-Proteína quimioatraente de monócitos 1 (monocyte chemotactic protein-1)
CCL-5/RANTES	-Regulada pela ativação, expressas e secretadas pelos linfócitos T normais/quimioatraentes de linfócitos T ativadas e eosinófilos ( <i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secrete</i> )
CD	- Grupo de diferenciação ( <i>Cluster of differentiation</i> )
CEUA	- Comitê de Ética e Uso Animal
CoPIX	- Cobalto Protoporfirina IX
CS	- Proteína circunsporozoíta ( <i>Circumsporozoite protein</i> )
CSA	- Sulfato de condroitina A ( <i>Chondroitin sulfate A</i> )
CXCL-1/KC	- Quimiocina derivada de queratinócitos ( <i>Keratinocyte-derived chemokine</i> )
CXCL-8/IL-8	-Inlerleucina 8 (Interleucin 8)
DDT	- Dicloro-difenil-tricloroetano ( <i>dichlorodiphenyltrichloroethane</i> )
DEPC	- Dietilpirocarbonato ( <i>Diethylpyrocarbonate</i> )
DNA	- Ácido desoxirribonucléico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
ELISA	-Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
EMP	- Proteína de membrana eritrocitária ( <i>Erythrocyte membrane protein</i> )
E-Selectina	- Selectina E ( <i>E-Selectin</i> )
GAG	-Glicosaminoglicanos ( <i>glycosaminoglycans</i> )

GPI	- Glicofosfatidilinositol ( <i>Glycosylphosphatidylinositol</i> )
GM-CSF	-Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos ( <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> )
HO	-Heme Oxigenase
HNP	- Hemácia não parasitada
HP	- Hemácia parasitada
HUVEC	Células endoteliais de cordão umbilical humano ( <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> )
HZ	- Hemozoína ( <i>Haemozoin</i> )
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular 1 ( <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> )
IFN- $\gamma$	-Interferon- $\gamma$ ( <i>interferon-gamma</i> )
LBA	-Lavado Broncoalveolar
LFA-1	- Antígeno associado a função de linfócitos-1 (lymphocyte function-associated antigen-1)
LPS	- Lipopolisacarídeo ( <i>Lipopolysaccharide</i> )
MAC-1	- Complexo de ativação de membrana-1 ( membrane-activated complex-1)
MC	- Malária cerebral
MCE	-Malária Cerebral Experimental
MEC	-Matriz Extra Celular
MHC	-Complexo principal de Histocompatibilidade ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
MIP-1 $\alpha$	- Proteínas inflamatórias de macrófagos 1 $\alpha$ ( <i>Macrophage inflammatory proteins</i> )
MyD88	- Proteína adaptadora de diferenciação mielóide 88 ( <i>Myeloid differentiation primary-response protein-88</i> )
OMS	- Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
PAMP	-Padrões moleculares associados a patógenos ( <i>Pathogen-associated molecular</i>

*patterns)*

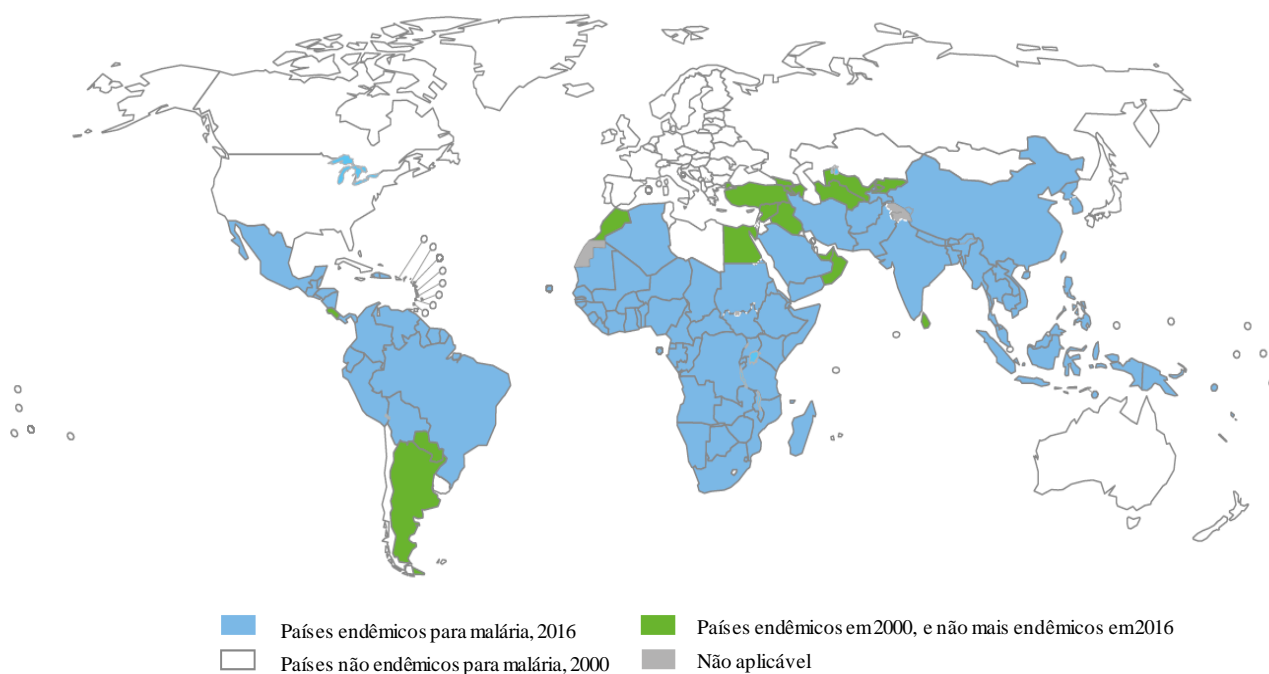
PbA	- <i>Plasmodium berguei</i> Anka
PBMC	-Células mononucleares do sangue periférico ( <i>peripheral blood monuclear cell</i> )
PDTIS	-Programa de desenvolvimento tecnológico em insumos para saúde
PECAM-1	-Molécula de adesão celular plaqueta-endotélio-1 ( <i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i> )
PNCM	-Programa Nacional de Controle da Malária
PPR	-Receptores de reconhecimento padrão ( <i>Pattern recognition receptors</i> )
RNA	- Ácido ribonucléico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
SIVEP	-Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
TGF- $\beta$	-Fator de crescimento- $\beta$ ( <i>Transforming growth factor beta</i> )
TLR	- Receptores semelhantes ao Toll ( <i>Toll-like receptors</i> )
TNF	- Fator de Necrose Tumoral ( <i>Tumor necrosis factor</i> )
TPO	- Trombopoetina
VCAM-1	- Proteína de adesão de células vasculares 1 ( <i>Vascular cell adhesion protein 1</i> )
vWF	- Fator de von Willebrand
ZnPPiX	- Zinco Protoporfirina IX

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo transmitidos através do repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* (Baker, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a malária continua sendo um grande problema de saúde pública. Em 2015 estima-se que ocorreram em torno de 212 milhões de casos ao redor do mundo, com 429 mil casos fatais (OMS, 2016). O mesmo relatório descreve que a mortalidade mundial por malária teve uma redução de mais de 21% entre 2010 e 2015. Contudo, a maioria das mortes por malária continua sendo de crianças, tendo sido estimado em 70% no ano de 2015, o que corresponde a uma morte a cada 2 minutos em média (OMS, 2016).

A maior incidência de casos de malária ocorre na África, no Sudeste Asiático e Américas Central e do Sul. Dentre estas áreas tropicais, a maior parte dos casos ocorre na África Subsaariana. Segundo dados da OMS, a maior parte da morbidade e da mortalidade continua sendo atribuída a infecções pelo *Plasmodium falciparum* (OMS, 2016).



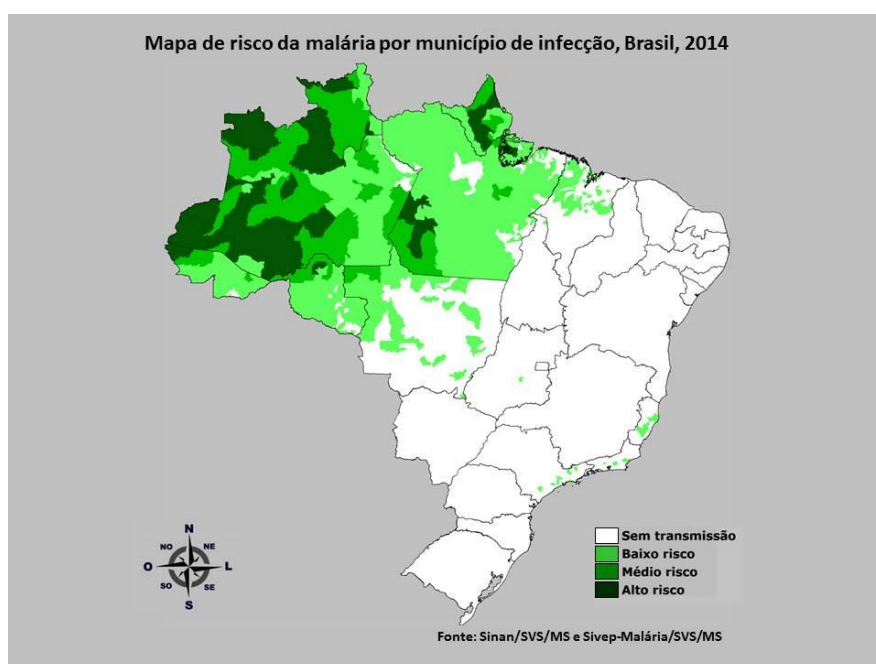
□ *Figura 1.1.1: Áreas com ocorrência de malária no mundo. Distribuição dos casos de malária ao redor do mundo. Adaptado da OMS, 2016*

Nas Américas, a malária ocorre em 18 países, onde estima-se que 132 milhões de pessoas encontram-se em áreas de risco, e mais 21 milhões em áreas de alto risco. Entre os anos de 2010 e 2015 o número de casos reportados caiu em torno de 31%, sendo o principal

agente de malária nesta região o *Plasmodium vivax*. O Brasil, no ano de 2015, foi responsável por 24% dos casos de malária (OMS, 2016).

A malária continua a ser um grave problema no Brasil, principalmente na região da Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, parte do Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, que é responsável por volta de 99,5% dos casos do país (SIVEP, 2011; SUS, 2016). A alta incidência dificulta o turismo e os efeitos debilitantes da doença reduzem a capacidade produtiva da população e, portanto, da região como um todo. No Brasil existem três espécies de plasmódios causadores da malária: *P. falciparum*, *P. vivax* e *Plasmodium malariae*. No final da década de 80 o número de casos de malária vivax suplantou os casos de malária falciparum e desde então tem sido a forma predominante, sendo responsável por mais de 80% dos casos de malária no Brasil (OMS, 2016).

No ano de 2015 foram por volta de 150 mil casos confirmados de malária no Brasil, sendo mais de 90% dos casos autóctones (SUS, 2016). No Brasil, as áreas de transmissão são classificadas de acordo com o seu Índice Parasitário Anual (IPA), sendo classificado como de alto risco de transmissão aqueles municípios com  $IPA \geq 50$  casos/1000 habitantes, de médio risco com IPA entre 10 e 50 casos/1000 habitantes, de baixo risco aqueles que possuem menos de 10 casos/1000 habitante e sem risco são as áreas com IPA menor de 1 caso/1000 habitantes. Como observamos na figura 1.1.2, ainda são muitos os municípios no Brasil classificados como de alto e médio risco de transmissão.



*Figura 1.1.2: Áreas com ocorrência de malária no Brasil. No Brasil os municípios são classificados de acordo com o índice parasitário anual em alto risco  $\geq 50$  casos/1000 habitantes, de médio risco entre 10 e 50 casos/1000 habitantes, de baixo risco  $< 10$  casos/1000 habitante e sem risco  $< 1$  caso/1000 habitantes. SUS, 2016*

A luta pela erradicação e/ou controle da malária data de muito tempo. Desde os tempos de Hipócrates já se recomendava a drenagem dos pântanos (Cunha and Cunha, 2008).

A OMS há muito tem feito campanhas de erradicação mundial visando controlar a epidemia. As estratégias de controle têm levado em consideração as características de cada região, mas de uma maneira geral são baseadas em três pilares: o diagnóstico precoce, o tratamento imediato e o controle do vetor.

O diagnóstico precoce da malária é muito importante, pois permite a identificação dos indivíduos que são fontes de contaminação. A gota espessa é amplamente utilizada na detecção de *Plasmodium* sp., uma vez que a grande concentração de sangue por campo microscópico favorece o encontro do parasito (OMS, 2016; Saúde, 2009). Os testes rápidos de diagnóstico, que utilizam anticorpos monoclonais para proteínas do parasito (Check-Pf<sup>®</sup>, Malar-Check<sup>®</sup>-específico para *P. falciparum* e ICT-PfPv<sup>®</sup>, Optimal<sup>®</sup>-diferencia *P. falciparum* de outras espécies) têm sido muito utilizado pela rapidez e facilidade de manuseio. Uma terceira forma de análise e diagnóstico, porém pouco aplicada, consiste na identificação do DNA do parasito através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase do tipo nested (PCR nested); esta metodologia tem muito valor em estudos epidemiológicos (OMS, 2016; OMS, 2010; Saúde, 2009).

Em relação ao tratamento da malária, quanto mais imediato, maior a probabilidade de redução dos efeitos da doença e prevenção de mortes. O esquema recomendado para o tratamento de malária nos casos de infecções por *P. falciparum*, desde 2006, tem sido os combinados de artemisinina (ACT), considerando a grande resistência do parasito a cloroquina, sulfadoxina-piremetamina, amidaquina e quinina. Porém, em casos de malária gerados por *P. vivax* ou *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) é necessário o uso de primaquina, que é importante na eliminação das formas hipnozoítas do fígado (OMS, 2016; OMS, 2010).

A prevenção da malária tem como chave o controle do vetor para redução da transmissão. Para o controle do vetor são utilizados dois métodos principais: o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, e a aplicação de inseticidas nas paredes internas das residências. O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) foi muito importante na eliminação da malária em diversos lugares do mundo inclusive em alguns estados brasileiros desde a década de 70, porém o seu uso gera um grande problema ambiental, tendo sido proibida a sua utilização nos anos 2000. Atualmente, os organoclorados também têm sido utilizados em algumas regiões, porém os inseticidas sintéticos derivados de piretrinas, os piretróides, são os mais usados. Dependendo do inseticida usado e do tipo de superfície que ele é aplicado, sua efetividade pode variar de 3 a 12 meses (OMS, 2011; OMS, 2016).

## 1.2. CICLO DO PARASITO

A malária é transmitida para hospedeiros vertebrados, como camundongos, macacos e humanos através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, quando infectadas pelos protozoários do gênero *Plasmodium*. O gênero *Plasmodium* pertence ao filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Haemosporida e família *Plasmodiidae* (Antinori e cols., 2012; Collins, 2012). Os representantes deste filo caracterizam-se pela presença do complexo apical, que é um conjunto de estruturas e proteínas importante na invasão celular (Gaur and Chitnis, 2011) e todas as espécies da ordem Haemosporidae são parasitos intracelulares obrigatórios que se desenvolvem em dois hospedeiros: um vertebrado, no qual ocorre a reprodução assexuada, e outro invertebrado, no qual ocorre a reprodução sexuada por fertilização (Rey, 2008).

A infecção no hospedeiro vertebrado tem início quando os mosquitos injetam os esporozoítos, durante o repasto sanguíneo, no tecido subcutâneo (ou na corrente sanguínea de maneira muito menos frequente). Estima-se que os esporozoítos podem levar até uma hora para penetrarem nos vasos sanguíneos e/ou vasos linfáticos (Amino e cols., 2006; Gueirard e cols., 2010; Voza e cols., 2012) (figura 1.2.1). Na corrente sanguínea os esporozoítos migram passivamente aos sinusóides hepáticos. Os esporozoítos ativamente atravessam a barreira sinusóide para ganhar acesso aos hepatócitos. Alguns trabalhos, utilizando o modelo murino, demonstram que os parasitos podem transpassar as células de Kupffer, utilizando-a assim como porta de entrada para o fígado, podendo este processo levar a morte destas células (Frevert e cols., 2006; Klotz and Frevert, 2008; Lindner e cols., 2011; Menard e cols., 2008).

O processo de entrada no hepatócitos requer a ação de moléculas de adesão, que permitem o processo de endocitose do parasito. Ainda não está claro qual o estímulo necessário para que os esporozoítos deixem de migrar e se estabeleçam em um determinado hepatócito. Acredita-se que seja o encontro com os proteoglicanos expressos nos hepatócitos que determine esse evento. Sabe-se que o domínio de trombospondina (TSP) da proteína circunsporozoíta (CS) e as proteínas adesivas relacionadas a trombospondina (TRAP), são os responsáveis pela interação com os proteoglicanos de heparan sulfato expressos na superfície dos hepatócitos e das células de Kupffer (Miller e cols., 2002; Schofield and Grau, 2005).

Uma vez os parasitos dentro dos hepatócitos, estes formam um tipo de vacúolo parasitóforo. A membrana do vacúolo parasitóforo constitui a principal interface entre o parasito e o hospedeiro, sendo derivada da membrana citoplasmática do hospedeiro, mas com adições de proteína e possivelmente lipídeos de origem parasitária. A membrana do vacúolo parasitóforo está envolvida, portanto, nas interações entre o parasito e o hospedeiro, como a

captação de nutrientes (Lindner e cols., 2011). Dentro do vacúolo parasitóforo os parasitos ganham um formato arredondado e perdem o aparelho apical, sendo denominado de criptozoítas, iniciando um estágio de reprodução assexuada, conhecido como estágio pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica. Os parasitos neste estágio multiplicam-se excessivamente e dão origem as formas denominadas esquizontes. A liberação de merozoítas para circulação sanguínea ocorre por meio dos merossomos, (Lindner e cols., 2012; Rey, 2008), que são vesículas extracelulares formadas a partir da membrana plasmática da célula infectada, que dificulta o reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro (Sturm e cols., 2006).

Quando a infecção é ocasionada por *P. vivax* ou *P. ovale*, alguns esporozoítos, ainda no fígado, não se multiplicam, permanecendo quiescentes, sendo chamados de hipnozoítas. E essas formas, por mecanismos ainda não esclarecidos, podem iniciar após um variável intervalo de tempo, um novo ciclo sanguíneo responsável pelas recaídas da doença (Markus, 2010). O ciclo hepático, dependendo da espécie parasitária, tem a duração média de 14 dias, respondendo pelo tempo de incubação da doença.

Estudos mais recentes conduzidos por Gueirard e cols (2010) evidenciam que os esporozoítas que ficam na derme, e/ou os que seguem pelos vasos linfáticos e atingem os linfonodos, podem se desenvolver em merozoítos infectantes, sendo liberados através de merossomos (estrutura vesicular). Os esporozoítos que seguem para os linfonodos são importantes para geração da resposta imune do hospedeiro, através da apresentação de antígenos por células dendríticas, às células T CD8<sup>+</sup> (Chakravarty e cols., 2007). Os esporozoítos que ficam na derme também podem migrar para os folículos pilosos, sítio de privilégio imunológico (Meyer e cols., 2008), onde permanecem dormentes ou em crescimento lento, sugerindo que essas formas possam atuar como um reservatório de merozoítos infectantes, e/ou atuem como fontes de antígenos para os linfonodos drenantes (Gueirard e cols., 2010). Contudo Voza e cols. (2012), ao analisar o desenvolvimento das formas exoeritrocíticas encontradas na pele, concluíram que estes não são aptos a iniciar o estágio sanguíneo da infecção. Os achados contraditórios sobre o papel das formas exoeritrocíticas encontradas na derme e nos linfonodos, necessitam ser mais estudados para que possamos compreender melhor o que ocorre nestes sítios na infecção malárica.

O ciclo intraeritrocítico começa com o rompimento do merossomo, que parece ocorrer nos capilares pulmonares, e subsequente invasão de hemácias do hospedeiro pelos merozoítos. Os merozoítos se desenvolvem em trofozoítos maduros, que sofrerão divisão celular formando o esquizonte sanguíneo. O desenvolvimento intraeritrocítico completo, com subsequente lise das hemácias, pode se dar em ciclos de 24 horas (*P. knowlesi*), de 48 horas



(*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*) ou de 72 horas (*P. malariae*), e libera merozoítos que infectarão outros eritrócitos, desencadeando o pico febril (Figura 1.2.1).

A entrada nas hemácias pelos merozoítos e nos hepatócitos pelos esporozoítos é mediada pelos receptores encontrados nas organelas do complexo apical do parasito (roptrias, micronemas e grânulos densos), que definem o filo Apicomplexa e se ligam a células do hospedeiro. As proteínas dos hospedeiros já conhecidas por ser alvo de ligação dos parasitos, para entrada destes nas hemácias, são: proteínas do sistema sanguíneo Duffy, glicoforina A, B e C, banda 3 (Gaur and Chitnis, 2011; Miller e cols., 2002).

Alguns trofozoítos evoluem a formas que não possuem mais a capacidade de divisão celular, os gametócitos. Não se sabe muito bem quais os mecanismos indutores da formação dos gametócitos, porém na malária vivax, eles já estão presentes na circulação periférica a partir do segundo dia de manifestação clínica. Já na malária falciparum, só é possível encontrar os gametócitos, em média, após sete dias de infecção. Os gametócitos presentes na circulação periférica podem ser ingeridos por outro anofelino que venha alimentar-se do sangue do hospedeiro, iniciando assim o ciclo sexuado do parasito no hospedeiro invertebrado (figura 1.2.1). A infecção pelo plasmódio gera 2 tipos de gametócitos: o macrogametócito (feminino) e o microgametócito (masculino). Os macrogametócitos (femininos) são mais numerosos no sangue, tem formato um pouco diferente dependendo da espécie, podendo ser arredondados e ocupando quase todo o volume da hemácia, nos casos de *P. vivax*, de *P. ovale* ou de *P. malariae*; já os de *P. falciparum* têm forma de banana. Os microgametócitos quanto à forma são semelhantes ao feminino, porém quando sugados com o sangue pelos anofelinos, os gametócitos masculinos arredondam-se e emitem várias expansões flagelares providas de um núcleo. Ao se desprenderem da célula, essas estruturas dotadas de rápido movimento vibratório passam a constituir os gametas masculinos. O processo, quase instantâneo, é denominado exflagelação. Os macrogametas resultam de discretas modificações dos macrogametócitos. No estômago do mosquito ocorre o encontro dos gametas e a formação do zigoto, que sob a forma oocineto penetra no epitélio intestinal, e transforma-se em oocisto que darão origem aos esporozoítos que migram até a glândula salivar, sendo passado para o hospedeiro vertebrado, no próximo repasto sanguíneo (Schofield and Grau, 2005).

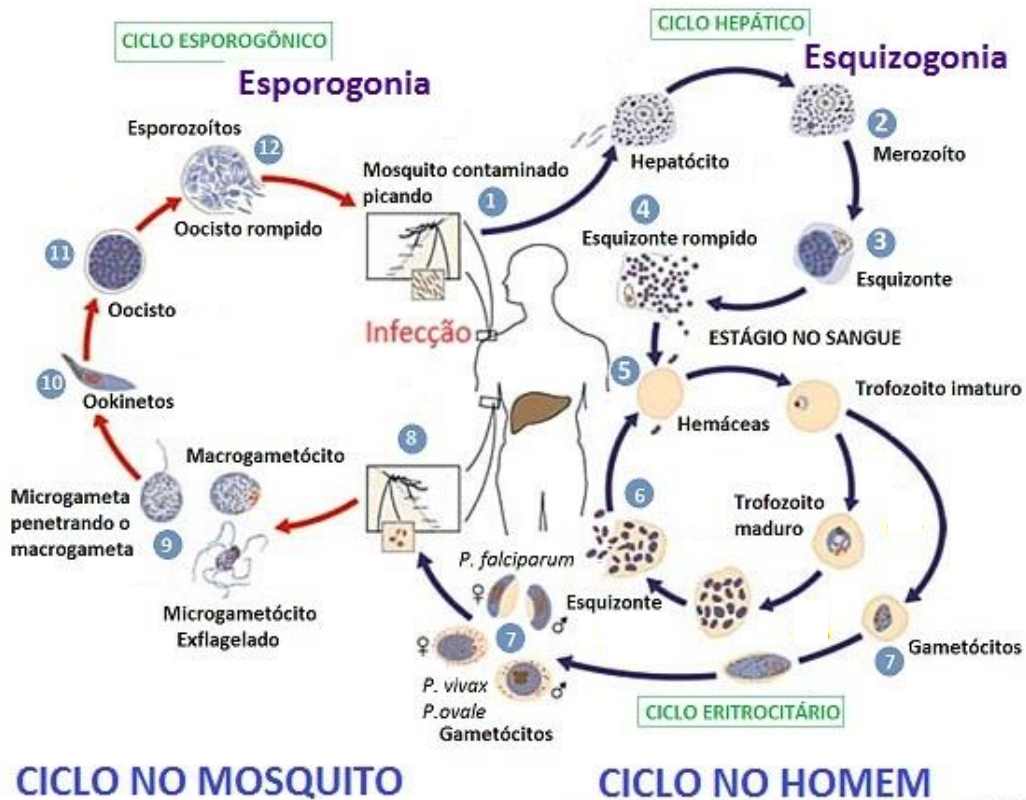


Figura 1.2.1: Ciclo do *Plasmodium* sp. Ciclo demonstrando a fase sexuada (ciclo esporogônico) que ocorre no hospedeiro invertebrado e a fase assexuada (ciclo hepático e ciclo sanguíneo) que ocorrem no hospedeiro vertebrado. Figura adaptada a partir de CDC

Atualmente cinco espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* são consideradas capazes de infectar humanos: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. knowlesi* (Antinori e cols., 2012).

- *P. ovale* foi descoberto em 1922 por Stephens, e é encontrado na parte tropical do Continente Africano e na Índia. Esta espécie causa uma infecção conhecida como febre terça benigna, que se caracteriza por acessos febris a cada 48 horas. Não são conhecidos casos de malária grave em decorrência da infecção por esta espécie, porém ela pode gerar recaída por apresentar a forma hipnozoíta em seu ciclo de desenvolvimento (Antinori e cols., 2012).
- *P. malariae* foi identificado em 1886 por Camillo Golgi, e é encontrado em toda área endêmica para malária, sendo mais frequente na África Sub-Saariana e no sudoeste do Pacífico. Esta espécie é conhecida por causar febre quartã, que é caracterizada por acessos febris a cada 72 horas. Apesar de raramente ser fatal, recorrências de malária malarie são comuns e podem ser longas, durando em alguns casos até 30 anos após a primeira infecção. (Antinori e cols., 2012).

- O *P. vivax* também foi identificado em 1886 por Camillo Golgi, e encontrado na Ásia, América do Sul e Oceania. Esta espécie é comumente caracterizado por causar febre terçã benigna, por ter um ciclo de acessos febris de 48 horas. A infecção por *P. vivax* desencadeia febre aguda e anemia. Apesar de ser considerada por muitos anos como uma infecção benigna, tem sido descrito cada vez mais casos de malária grave em decorrência da infecção com *P. vivax* (Lacerda e cols., 2012b). Essa espécie também apresenta forma hipnozoíta, podendo gerar recaída das doença (Antinori e cols., 2012).
- *P. falciparum* que é responsável pela grande maioria dos casos de infecções graves e letais, foi descoberto em 1880 por Charles Alphonse Laveran. O *P. falciparum* é endêmico na África subsaariana e em toda região tropical. Esta espécie causa a febre terçã maligna com acessos febris em intervalos de 36 a 48 horas, sendo o responsável pela ocorrência de malária cerebral que é a principal “causa mortis” entre pessoas acometidas pela malária. (Antinori e cols., 2012).
- *P. knowlesi* foi descrito pela primeira vez pelo italiano Giuseppe Franchini na circulação de *Macaca fascicularis*, sendo identificada a primeira vez no homem por Knowles e Das Gupta em 1932 (Collins, 2012), e é encontrado principalmente na Malásia. A doença causada por *P. knowlesi* é uma zoonose, sendo caracterizada por acessos febris a cada 24 hora. Casos de malária grave em decorrência da infecção por esta espécie já foram documentados (Antinori e cols., 2012; Cox-Singh e cols., 2010; Fatih e cols., 2012; Singh e cols., 2004).

Com o desenvolvimento da infecção os primeiros sintomas da malária são inespecíficos, e incluem uma sensação de mal-estar, cefaléia, fadiga, dores musculares e desconforto abdominal, que são seguidos por febre irregular. A tríade sintomática da malária é formada pela associação de febre, calafrios e cefaléia. A inespecificidade dos sintomas leva a uma demora do paciente em procurar um hospital, levando a um diagnóstico e tratamento tardio, que proporciona o surgimento das complicações clínicas mais graves da doença, como acidose metabólica (principalmente estresse respiratório), síndrome do desconforto respiratório (ARDS), malária cerebral (MC) e anemia grave da malária (AGM) (Schofield and Grau, 2005). Nas áreas de baixa transmissão é comum ocorrerem distúrbios adicionais como falência renal, edema pulmonar, choque e icterícia. A malária placentária também é uma complicação séria, que ocasiona insuficiência placentária com baixo ganho de peso e pode levar a perda do feto (OMS, 2016). Na malária ocorre também uma plaquetopenia acentuada, que não é acompanhada de hemorragia, por isso muitas vezes não é considerada como um dos sinais de gravidade, contudo, estudo de casos de crianças com malária falciparum foi visto correlação positiva entre morte e maior plaquetopenia (Lacerda e cols., 2011).

### 1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS

Protozoários do gênero *Plasmodium* podem infectar tanto humanos, quanto símios, galináceos ou roedores, sendo a infecção espécie-específica. Diante do amplo espectro de hospedeiros vertebrados capazes de serem infectados, a utilização de modelos animais para entender a fisiopatologia da malária humana é muito disseminada. O uso do modelo animal tem vantagens e desvantagens, porém tem sido essencial no esclarecimento dos mecanismos fisiopatogênicos, do desencadeamento da resposta imunitária dos hospedeiros e dos mecanismos genéticos de resistência a infecção.

O modelo murino é o mais amplamente utilizado na pesquisa; para tanto são utilizados: *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium berghei* (Tabela 1.3.1). Na malária, os modelos murinos são utilizados, por exemplo, em malária cerebral experimental (MCE), no desenvolvimento de vacinas, bem como para compreensão de mecanismos imunes como a imunoregulação por citocinas (Caillard e cols., 1992; LaCrue e cols., 2011; Li e cols., 2001; Stevenson and Riley, 2004).

A infecção com *Plasmodium berghei* da cepa NK65 (*P. berghei* NK65) é um dos modelos para o estudo da fisiopatologia da malária (Findlay e cols., 2010; Mueller e cols., 2012; Niikura e cols., 2008; Verma e cols., 2011; Yoshimoto e cols., 1998). *P. berghei* NK65 tem sido utilizado para estudos de injúria pulmonar, apresentando uma intensa inflamação nesse órgão acompanhada de acúmulo de células e formação de edema (Deroost e cols., 2013; Van den Steen e cols., 2010). Outro ponto importante sobre a infecção com PbNK65 é que as complicações cerebrais geradas nesse modelo são leves, ou mesmo, inexistentes (Tabela 1.3.1) (Lacerda-Queiroz e cols., 2011; Nacer e cols., 2012).

Tabela 1.3.1: Modelos experimentais murinos para o estudo da malária.

Parasito	Cepa	Linhagem do Camundongo	Letalidade	Análise Experimental
<i>P. chabaudi chabaudi</i>	AS	CBA C57BL/6 BALB/c	Não Letal	Resposta Imune Malária Cerebral Vacina
		129sv A/J DBA/2	Letal	Quimioterapia Resistência a infecção Resposta imune Anemia Malária Cerebral
	CB	CBA C57BL/6	Letal	Resposta Imune
<i>P. chabaudi adami</i>		BALB/c C57BL/6	Não Letal	Resposta Imune
<i>P. yoelli</i>	17XL	CBA BALB/c C57BL/6 DBA Swiss	Letal	Resposta Imune Malária Cerebral Fase pré-eritrocítica do ciclo Anemia Vacina
	YM	CBA BALB/c C57BL/6 DBA	Letal	Vacina Hipoglicemia
	17XNL	CBA BALB/c C57BL/6 DBA	Não Letal	Resposta Imune Vacina Fase pré-eritrocítica do ciclo Anemia
<i>P. vinckei vinckei</i>		BALB/c	Letal	Quimioterapia Resposta Imune Vacina Anemia
<i>P. vinckei petteri</i>	CR	C57BL/6 BALB/c	Não Letal	Resposta Imune
<i>P. berghei</i>	ANKA	BALB/c C57BL/6 CBA	Letal	Malária Cerebral Injúria Pulmonar Vacina Anemia
	K173	BALB/c CBA DBA C57BL/6	Letal	Malária Celeral
	NK65	DBA C57BL/6	Letal	Injúria Pulmonar Vacina Quimioterapia

(de Souza e cols., 2010a; Klotz and Frevert, 2008; Lamb e cols., 2006; Li e cols., 2001; Li e cols., 2011; Matuschewski, 2013; Taylor-Robinson, 2010; Teixeira and Gomes, 2013)

Contudo, há diferenças entre a malária humana e murina. Dentre as principais diferenças podemos ressaltar, que na malária murina o nível de parasitemia é muito maior. O sequestro de hemácias parasitadas em órgãos como o fígado, pulmão, tecido adiposo e cérebro são pouco reportados na malária murina, porém ocorre intensa adesão de leucócitos, de maneira inversa a doença humana (Combes e cols., 2006). Além disso, a infecção do animal é realizada, em sua grande maioria, por via intraperitoneal ou intravenosa, não ocorrendo a fase exoeritrocítica da infecção. Entretanto, cabe ressaltar que nenhuma manifestação patológica é atribuída a essa fase no hospedeiro vertebrado (Garcia, 2010; Li e cols., 2011).

#### **1.4. FISIOPATOLOGIA**

A fisiopatologia da malária é caracterizada pela ação direta do parasito sobre as células vermelhas do sangue do hospedeiro vertebrado, através de sua invasão e crescimento, levando à destruição das hemácias propiciando à anemia, bem como a adesão das hemácias parasitadas ao endotélio. Além disso, o reconhecimento do parasito pelo sistema imune inicia uma rápida e robusta reposta inflamatória na tentativa de controlar a infecção. No entanto, é importante ressaltar que esta rápida e potente resposta do sistema imune inato está relacionada as manifestações clínicas da malária, tanto de maneira direta ou por amplificar os efeitos da resposta imune adaptativa (Schofield, 2007; Stevenson and Riley, 2004).

##### **1.4.1 Resposta imune inata: PAMPS e DAMPS na infecção malárica**

Para o início da resposta imune inata é necessário que haja um reconhecimento direto por parte do organismo de moléculas presentes nos patógenos conhecidos como Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs). A presença do patógeno também pode contribuir para danos teciduais, com subsequente liberação de substâncias do hospedeiro que são reconhecidas pelo sistema imune inato, e leva a um aumento da resposta inflamatória, identificadas como Padrão Molecular Associado a Perigo (DAMPs). Tanto os PAMPs como os DAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes nas células do sistema imune inato (Broz and Monack, 2013; Stuart e cols., 2013).

Estudos indicam que o principal PAMP dos parasitos do gênero *Plasmodium* é o glicosilfosfatidilinositol (GPI), tendo sido identificado, não somente nas formas sanguíneas, mas em todos os estágios de desenvolvimento do parasito (Gowda and Davidson, 1999). O GPI é encontrado em todas as células eucarióticas, porém em baixas concentrações. Contudo, parasitos protozoários apresentam grande quantidade de GPI em sua membrana. A principal

função do GPI é ancorar proteínas a membrana plasmática (Arrighi and Faye, 2010; Ikezawa, 2002).

Na literatura já foi descrito que a administração de GPI purificado de *P. falciparum*, em camundongos CBA/Ca foi capaz de modular a expressão de citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da malária, como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL-1 e IL-2), gerando uma resposta inflamatória muito semelhante a uma infecção por malária na fase aguda (Schofield and Hackett, 1993). De fato em estudos *in vitro* observou-se que ao estimular com GPI purificado de *P. falciparum* macrófagos peritoneais murinos provenientes de animais pré-estimulados com tioglicolato (meio de cultura utilizado para induzir migração e pré-ativação celular), macrófagos da linhagem J774A.1 e RAW264.7, células dendríticas murinas e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), houve a liberação de TNF e IL-12 e a síntese de óxido nítrico (NO) (de Souza e cols., 2010b; Kumar e cols., 2012; Naik e cols., 2000; Schofield and Hackett, 1993; Tachado e cols., 1996; Vijaykumar e cols., 2001). Ademais o aumento da expressão moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão de célula endotélio vascular 1 (VCAM-1) foi observado em células HUVEC estimuladas com GPI purificado de *P. falciparum* (Schofield e cols., 1996). E em estudos clínicos com populações do oeste do Quênia a falta de anticorpos anti-GPI, foi relacionada ao agravamento do quadro de malária (Naik e cols., 2000), sugerindo um importante envolvimento do GPI na patogênese das formas graves da malária.

O heme é uma outra molécula importante associada a patogênese das formas graves da malária. O heme é um grupo prostético que consiste de um átomo de ferro em seu estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ), contido no centro de um anel orgânico heterocíclico chamado protoporfirina IX. Esse grupo protético é produzido tanto por mitocôndrias (em todas as células que a possuem), quanto pelos apicoplastos dos parasitos do filo Apicomplexa do qual o plasmódio faz parte (van Dooren e cols., 2012). As hemeoproteínas estão envolvidas no transporte de oxigênio, transferência de elétrons, peroxidases, oxidases, óxido nítrico redutase e catálise química (Wagener e cols., 2003). Quando o heme não está ligada a sua porção protéica, é denominada heme livre, e circula no sangue complexado a proteínas do soro (hemepexina e albumina) (Wegiel e cols., 2015).

Uma vez que o heme faz parte de diversas proteínas, o dano tecidual gera sua liberação, e ele passa a ser considerado um DAMP importante em diversas doenças, como na sepse bacteriana (Wegiel e cols., 2015). O heme liberado em situações de hemólise ou de hemorragia tem um papel quimiotático, atraindo neutrófilos e estimulando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), amplificando a resposta inflamatória (Monteiro e cols., 2011; Porto e cols., 2007). Ao estimular *in vitro* com heme ocorre a deflagração precoce da

apoptose de neutrófilos (Arruda e cols., 2004), e uma diminuição da resposta pró-inflamatória de linfócitos T e macrófagos (Cambos e cols., 2010). Em condições de homeostase, o efeito pró-oxidante do heme livre é controlado através da inserção do heme em hemeproteínas. Porém em situações de estresse oxidativo algumas hemeproteínas podem liberar seu grupo heme, e assim catalisar a produção de radicais livres e/ou peroxidação lipídica de maneira incontrolável (Gozzelino 2010).

Durante a infecção malárica a hemoglobina é utilizada como fonte de nutriente para replicação pelo plasmódio. A digestão da hemoglobina leva a liberação de heme (Francis e cols., 1997). Diversos trabalhos apontam o heme como capaz de gerar uma inflamação semelhante a infecção malárica, resultando em disfunção na produção de eritrócitos (Dalko e cols., 2013). Na malária já foi demonstrado que o tratamento com heme foi capaz de interferir no desenvolvimento da malária cerebral experimental (ECM), diminuindo a resposta pró-inflamatória de astrócitos e micróglia e o dano cerebral (Dalko e cols., 2016).

Outro PAMP associado a infecção malárica é a hemozoína (Bonifacio e cols., 2008; Ropert e cols., 2008). A hemozoína é formada no vacúolo digestório do parasita através da cristalização da molécula de heme, sendo uma alternativa para detoxificação do heme. Estudo recente de malária pulmonar experimental demonstrou alta correlação positiva entre inflamação pulmonar e concentração de hemozoína. No mesmo trabalho foi observado que a injeção de hemozoína proveniente da cultura de *P. falciparum* foi capaz de gerar um quadro inflamatório pulmonar muito semelhante ao de infecção malárica. Indicando que a hemozoína pode ter um papel importante no quadro inflamatório da malária (Deroost e cols., 2013).

Os efeitos da hemozoína geram grande discussão na literatura, pelo grande volume de dados contrastante, como por exemplo, tanto induzir (Coban e cols., 2005) como inibir (Skorokhod e cols., 2004) a maturação de células dendríticas, por modular a liberação de citocinas de células do tipo Th1 e Th2 (Anyona e cols., 2012; Coban e cols., 2005; Sherry e cols., 1995) e também tem efeito sobre a resposta de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de humanos, diminuindo a sua capacidade fagocítica, a liberação de citocinas e induzindo a peroxidação lipídica (Barrera e cols., 2011; Deshpande and Shastry, 2004; Schwarzer e cols., 1992). Além disso, ao analisar macrófagos peritoneais de animais BALB/c infectados com *P. chabaudi chabaudi*, ou estimulados *in vitro* com hemozoína de *P. chabaudi chabaudi* ou hemozoína sintética, estas células apresentaram deficiências na apresentação de antígenos à células T de hibridoma 1E5.11 sugerindo que a fagocitose da hemozoína poderia estar afetando o processamento e a apresentação de antígeno (Scorza e cols., 1999). Contudo, as variações na resposta imune gerada pela hemozoína podem ter



relação com a metodologia escolhida, pois estas preparações de hemozoína sintética são heterogêneas, e contém vários bioativos ainda não caracterizados (Schofield, 2007).

#### 1.4.2 Reconhecimento dos PAMPs e DAMPs

O reconhecimento do parasito ou de seus produtos bioativos pelo hospedeiro se dá por várias famílias de receptores de reconhecimento de padrão (RRP). Os membros da família de receptores semelhantes ao Toll (TLR) são os mais estudados dentro da fisiopatologia da malária, sendo os receptores TLR-2, TLR-4 e TLR-9, os mais relacionados a resposta imune na malária. Nos últimos anos os receptores da família de receptores de oligomerização de ligação de nucleotídeos (do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors-NOD*), principalmente o NLRP-3, também têm sido associados à patogênese da malária (Gazzinelli e cols., 2014).

O receptor TLR-4 desempenha um papel importante no reconhecimento do *P. falciparum* por interagir com GPI e heme e, assim, desencadear a expressão de mediadores inflamatórios tanto em PBMCs quanto em macrófagos peritoneais provenientes de animais C57BL/6 (Figueiredo e cols., 2007; Krishnegowda e cols., 2005). Em um estudo de caso realizado em Uganda, que comparou crianças com malária cerebral e crianças com malária não complicada, observou-se que polimorfismos no receptor TLR-2 estariam levando a uma resposta inflamatória menos intensa e a uma maior proteção (Greene e cols., 2012). Nesse sentido também já foi demonstrado que ao estimular com GPI macrófagos derivados de células de medula óssea provenientes de animais C57BL/6 deficientes para TLR-2 (TLR2<sup>-/-</sup>) e PBMCs tratadas com anti-TLR-2, uma menor produção de citocinas como TNF. Esses trabalhos demonstram ainda que a proteína intracelular adaptadora codificada pelo gene 88 responsável pela primeira diferenciação mielóide (MyD88) (Coban e cols., 2007; Krishnegowda e cols., 2005; Kumar e cols., 2012; Langhorne e cols., 2008) é uma importante proteína adaptadora de TLR, em processos infecciosos desencadeados pelo *Plasmodium* sp.

A proteína MyD88 também foi demonstrada ser importante para o reconhecimento da hemozoína pelo TLR-9, e na resposta imune induzida na infecção por *P. yoelli* (Fu e cols., 2012). Estudos *in vivo* com injeção de hemozoína de *P. falciparum* e de hemozoína sintética em animais TLR9<sup>-/-</sup> e em animais deficientes para MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>) demonstraram menor liberação de citocinas inflamatórias no plasma (Coban e cols., 2005). Animais MyD88<sup>-/-</sup> demonstraram ainda, uma menor produção de citocinas como TNF e IFN- $\gamma$ , tendo os sintomas da doença gerada pela infecção com *P. chabaudi chabaudi* (AS) atenuados (Franklin e cols., 2007), e quando infectados com *P. berghei* NK65 apresentaram uma menor injúria

hepática, como resultado de uma menor liberação de IL-12 (Adachi e cols., 2001). A ausência da proteína MyD88 foi capaz de gerar maior sobrevivência em animais infectados com *P. berghei* ANKA, enquanto os animais selvagens morreram de malária cerebral experimental (Coban e cols., 2007).

Outra família de receptores que tem sido demonstrada ser importante na infecção malárica é a dos receptores do tipo NOD. Existem evidências que a hemozoína associada com DNA, ou isoladamente, desencadeia a formação de inflamossoma pelo receptor NALP-3 e AIM-2 e liberação de IL-1 $\beta$ , fenômeno importante por levar a um aumento da temperatura corporal (Dostert e cols., 2009; Kalantari e cols., 2014). Sabe-se que a infecção malárica com *P. chabaudi adami* DS em animais deficientes para NLRP-3 e IL-1 $\beta$ , leva a um aumento da sobrevivência dos animais e a diminuição da hipotermia. Em contrapartida, a injeção com hemozoína sintética em animais selvagens foi capaz de induzir IL-1 $\beta$ , através do complexo NLRP-3, ASC e caspase 1 (Shio e cols., 2009). Além disso, foi demonstrado que em situações de coinfeção de malária e bactérias há uma superexpressão dos receptores do inflamossoma que torna o animal mais suscetível a um choque séptico (Ataide e cols., 2014). Contudo, os receptores da família NOD parecem não ser essenciais para os fenômenos desencadeadores na malária cerebral experimental causada pela infecção com *P. berghei* ANKA (Kordes e cols., 2011), estando possivelmente mais intimamente ligada aos fenômenos de paroxismo e febre durante a infecção malárica.

### **1.4.3 Desenvolvimento da imunopatologia na malária**

Após o reconhecimento do parasito pelo sistema imunológico inicia-se uma resposta imuno-inflamatória no hospedeiro neutralizando os efeitos gerados pela infecção. O parasito da malária, por ser um organismo intracelular obrigatório de hemácias, seria destruído com a passagem da hemácia parasitada (HP) pelo baço, o que torna o sequestro de HPs em sítios distantes deste órgão um mecanismo importante de sobrevivência (Schofield, 2007). O sequestro se dá através da adesão das HPs nas células endoteliais dos capilares ou nas vênulas pós-capilar de vários órgãos. O sequestro de HPs pode levar à obstrução mecânica da microvasculatura, contribuindo para dano local ou órgão específico (Baruch, 1999; Miller e cols., 2002; Schofield and Grau, 2005). Todo este fenômeno é bem estudado em infecções por *P. falciparum*, não sendo claro até hoje se é comum para outras espécies de plasmódio.

A presença do parasito na hemácia leva à formação de protusões em sua membrana, que são importantes para a adesividade destas. Em infecções por *P. falciparum*, a proteína presente na superfície das hemácias recebe o nome de proteína de membrana eritrocítica 1

(PfEMP-1), que é codificada por uma grande e diversificada família de genes *var* que esta envolvida na variação antigênica clonal, que modificam a cada nova multiplicação (Baruch, 1999; Claessens e cols., 2012; Miller e cols., 2002). O sequestro de hemácias parasitadas por *P. vivax*, não é claro, Carvalho e cols (2010) demonstraram que é possível a citoadesão durante a malária vivax através de ensaios *in vitro*, além disso este parasita possui a família de genes *vir* semelhantes aos genes *var* de *P. falciparum*, que é envolvida na variação antigênica entre os ciclos replicativos. Contudo ainda não é claro se a citoadesão de vivax realmente é importante para o desenvolvimento da doença como visto em malária falciparum (Carvalho e cols., 2010; del Portillo e cols., 2001)

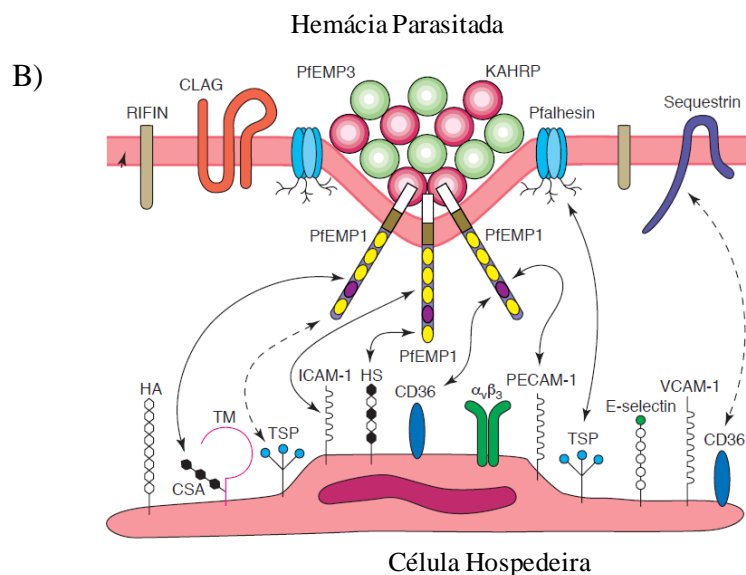
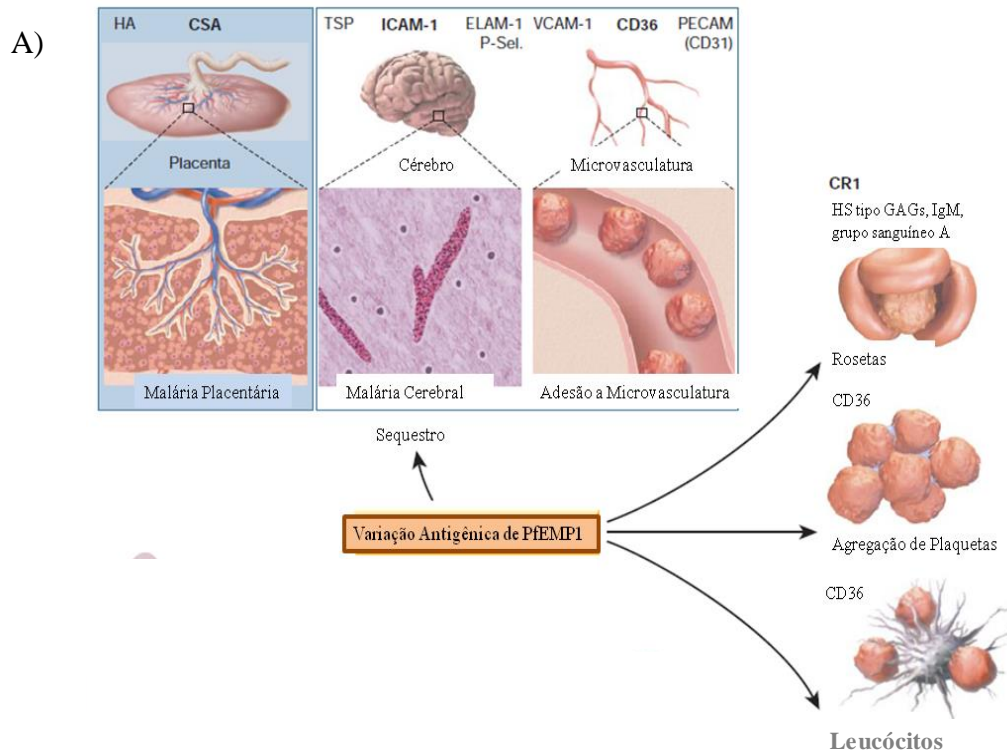
Os domínios adesivos dos parasitos presentes na membrana das hemácias se ligam a vários receptores de membrana das células do hospedeiro (figura 1.4.1-B). Na malária cerebral, moléculas como ICAM-1, VCAM-1 têm papel fundamental no sequestro de hemácias nos vasos sanguíneos (Janes e cols., 2011; Mo e cols., 2008; Wu e cols., 2011). No caso das complicações placentárias, sabe-se que existem alelos da PfEMP-1 com afinidade para o sulfato de condroitina A (CSA). Porém, outras moléculas de adesão como o CD36, a molécula de adesão celular plaqueta-endotélio-1 (PECAM-1; CD31), integrinas CD18, trombospondina (TSP), selectina E (E-selectina; CD62-E) e o ácido hialurônico presente em células endoteliais vasculares, também são importantes no processo de remoção das hemácias da circulação, como podemos observar na figura 1.4.1-A (Baruch, 1999; Faille e cols., 2009a; Hughes e cols., 2010; Miller e cols., 2002; Schofield and Grau, 2005; Wu e cols., 2011).

Além de ligar-se ao endotélio as HPs também ligam-se a hemácias não parasitadas (HNP) num processo conhecido como formação de rosetas (figura 1.14.1-A). Este processo é mediado, na maioria das vezes, por CR1 (CD35), pela ligação ao grupo de antígenos sanguíneos ABO, por imunoglobulinas e pelos glicosaminoglicanos (GAG) (Cserti-Gazdewich e cols., 2012; Urban and Roberts, 2002; Vigan-Womas e cols., 2012).

A ligação de HP aos leucócitos de maneira direta ou indireta se dá via CD36 e CD51 (subunidade  $\alpha_v$  dos heterodímeros  $\alpha_v\beta_3$  ou  $\alpha_v\beta_5$ ), podendo inibir as funções de células dendríticas (Urban and Roberts, 2002). O acúmulo de leucócitos e a liberação de fatores de coagulação são importantes no desenvolvimento da malária cerebral, assim como em outras síndromes graves associadas à malária, uma vez que leva à formação de agregados e obstrução dos vasos sanguíneos (Grau e cols., 2003; Ryg-Cornejo e cols., 2012; Schofield and Grau, 2005).

Em casos de malária cerebral, anemia grave da malária (AGM) e, mesmo na malária não complicada, também já foi observado acúmulo de plaquetas nos vasos, formando agregados com HP através de CD36. Também foi encontrado micropartículas plaquetárias

aderidas ao endotélio e a hemácias, através das moléculas CD36 e CD31 (Combes e cols., 2006; Cserti-Gazdewich e cols., 2012; Faille e cols., 2009a; Hunt and Grau, 2003). Este acúmulo de plaqueta parece ser um determinante da plaquetopenia grave da malária (Bakhubaira, 2013; Lacerda e cols., 2011).



**Figura 1.4.1 : Esquema da citoaderência.** Em A, Citoaderência de Hemácias parasitadas (HP) e não parasitadas (HNP) a órgãos alvos, através da ligação da PfEMP1 a receptores das células do hospedeiro. Adaptada de Miller, 2002. Em B, Representação dos domínios adesivos presentes em hemácias parasitadas, ligando a moléculas na célula do hospedeiro. Adapato de Cooke 2000. Abreviaturas: HA, ácido hialurônico; TSP, trombospondina; ELAM-1, molécula de adesão endotélio/leucócito; P-Sel., Pselectina; VCAM-1, molécula de adesão célula vasculatura 1; PECAM (CD31), molécula de adesão célula plaqueta 1; CR1, receptor do complemento 1; HS-tipo GAGs, glicosaminoglicanos semelhantes a heparan sulfato; IgM, imunoglobulina M.

O sequestro das HPs, e a liberação de toxinas que ocorre com rompimento das hemácias, dão início a uma resposta de fase aguda local, que envolve a ativação do endotélio e a produção local de citocinas e quimiocinas, resultando em um aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (Schofield, 2007). A liberação sistêmica das citocinas e quimiocinas amplifica a infiltração celular, o sequestro de HP (Schofield and Grau, 2005; Stevenson and Riley, 2004). Com a repetição dos eventos de adesão e rompimento das HPs, e consequente liberação de parasitas e debris celulares na circulação, ocorre a ativação de células T CD8<sup>+</sup> e T  $\gamma\delta$ , que liberam mais citocinas e quimiocinas local ou sistemicamente, levando por fim ao dano endotelial (Hansen e cols., 2007).

Muitos estudos demonstram associação entre a gravidade da doença e o aumento da liberação de citocinas imunomodulatórias, incluindo TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 (p70) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), bem como das quimiocinas CCL-3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL-4 (MIP-1 $\beta$ ), CXCL-8/IL-8 e CCL-2/MCP-1 (Bostrom e cols., 2012; Bouyou-Akotet e cols., 2004; Lyke e cols., 2004; Ochiel e cols., 2005). Crianças com malária grave apresentam altos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e CCL-2/MCP-1 (Bostrom e cols., 2012; Rovira-Vallbona e cols., 2012). A quimiocina CCL-2/MCP-1, além de associada a malária grave em crianças, também tem sido associada à malária placentária, sendo comum elevados níveis desta quimiocina em primigestas com malária (Bouyou-Akotet e cols., 2004). A anemia grave e a síndrome respiratória desencadeadas na malária têm sido associadas a baixos níveis de IL-10 (Awandare e cols., 2006; Kurtzhals e cols., 1998). Assim, o balanço na regulação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode ser crucial na extensão de danos patológicos, tanto em humanos como em modelos experimentais (Niikura e cols., 2011; Stanicic e cols., 2014; Wu e cols., 2015).

## **1.5. HEME OXIGENASE**

A heme oxigenase é uma proteína encontrada virtualmente em todas as espécies, em procariotos, fungos, plantas e em humanos, regulando uma variedade de processos (Li and Stocker, 2009; Terry e cols., 2002). As proteínas heme oxigenase são ancoradas ao retículo endoplasmático por uma sequência hidrofóbica de amino ácidos contidos na parte carboxi-terminal da proteína. A ação catalítica da HO leva a quebra do heme livre presente na célula e geração de metabólitos. A quebra do complexo anel protoporfirina que é o heme libera três subprodutos, de maneira equimolar, o íon de ferro livre (Fe<sup>2+</sup>), monóxido de carbono (CO) e biliverdina (Montellano, 2000; Wagener e cols., 2003). A biliverdina é subsequentemente

metabolizada para bilirrubina pela biliverdina redutase, enquanto o ferro livre é sequestrado por ferritinas intracelular ou ativamente exportado da célula (Calay and Mason, 2014; Dulak and Jozkowicz, 2014)

Existem duas isoformas de heme oxigenase encontrada em humanos: a heme oxigenase 1 (HO-1), e a heme oxigenase 2 (HO-2) (Maines e cols., 1986; McCoubrey e cols., 1997), que apresentam diferenças com relação aos genes que as expressam (HMOX1 e HMOX2, respectivamente), aos níveis de expressão nos diferentes tipos celulares, e tecidos e à regulação (Maines, 1997; Wagener e cols., 2003). Contudo, as isoformas são altamente conservadas entre as espécies ao longo da evolução.

O baço, o testículo e o cérebro são órgãos com alta atividade da enzima HO. A isoforma HO-2 é abundante no cérebro, testículo, fígado e células endoteliais cerebrais (McCoubrey e cols., 1997). Em condições de estresse oxidativo, HO-2 pode degradar heme rapidamente, aumentando os níveis de monóxido de carbono (CO) e biliverdina (BV) (Munoz-Sanchez and Chanez-Cardenas, 2014; Nath e cols., 2000; Vukomanovic e cols., 2016). A isoforma HO-2 é constitutivamente expressa e a sua atividade é regulada principalmente pela presença do substrato e por pouco outros agentes como opiáceos e glicocorticoides adrenais (Li and David Clark, 2000; Liu e cols., 2000).

O baço é o único órgão que em condições normais, sem estresse, a isoforma HO-1 é a forma predominante. (Gozzelino e cols., 2010). A HO-1 é a principal isoforma envolvida na degradação do heme em condições de estresse. A expressão gênica da HO-1 é fortemente induzida por agentes ou condições que aumentam o estresse oxidativo (figura 1.6.1) em condições fisiológicas normais, muitas células expressam baixas ou indetectáveis níveis dessa isoforma. A via de regulação mais conhecida se baseia no fato do estresse oxidativo suprimir a atividade de Bach1. Bach1 é um repressor transcricional que se liga a vários elementos responsivos ao estresse (do inglês stress-responsive elements-StREs) na região promotora do gene *HMOX1*, inibindo a sua transcrição (Ogawa e cols., 2001; Zenke-Kawasaki e cols., 2007). Bach1 possui um sítio de ligação para heme, pelo qual o heme induz mudanças de conformação em Bach1 (Hira e cols., 2007). A inibição da ligação de Bach1 aos StREs, induz a exportação nuclear de Bach1, sua poliubiquitinação pela proteína ligase ubiquitina E3 responsiva ao heme (do inglês heme-responsive E3 ubiquitin-protein ligase-HOIL-1) e, subsequente, sua degradação pela via do 26S proteossoma (Zenke-Kawasaki e cols., 2007). As espécies reativas de oxigênio podem também agir diretamente nos grupos sulfidril de Bach1 para inibir sua ligação aos StREs, promovendo a exportação nuclear e posterior degradação (Ishikawa e cols., 2005). Assim, a liberação de Bach 1 dos StREs na região promotora de gene *HMOX1* permite que o fator de transcrição responsivo ao estresse 2 (*do*

inglês *oxidative-stress responsive transcription factor-NF-E2-related factor-2-Nrf2*) acesse aos StREs e induza a transcrição do *HMOX1* (Alam e cols., 1999; Sun e cols., 2002).

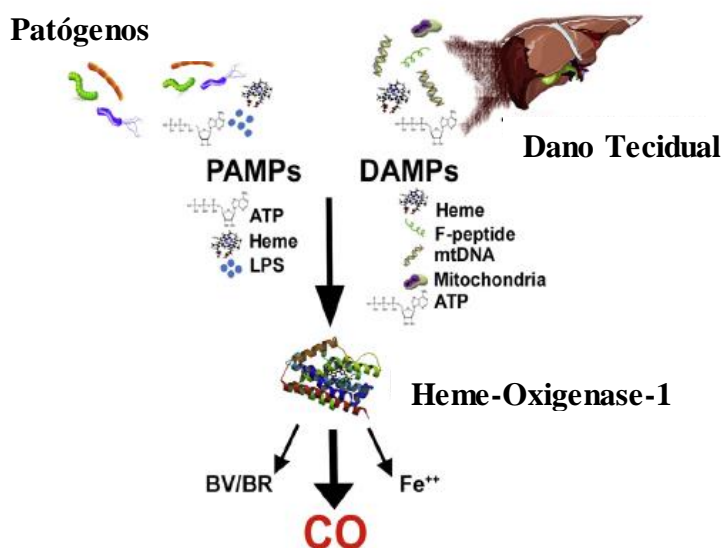


Figura 1.5.1. **Estímulos da HO-1.** Uma série de Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Perigo (DAMPs) são libertados como resultado de lesão ou infecção nos tecidos, e estes aumentam a expressão de Heme Oxygenase-1 como um gene de resposta ao estresse celular. A ação da enzima HO-1 no heme resulta na geração de produtos bioativos, incluindo os pigmentos biliares, monóxido de carbono e ferro.

### 1.5.1 A Citoproteção

O efeito citoprotetor de HO-1 foi demonstrado pela primeira vez quando submeteram culturas de fibroblastos humanos e culturas de células endoteliais, a situação de estresse oxidativo, e induzirem nestas células o aumento da expressão de HO-1, desencadeando uma resposta citoprotetora, sendo observado uma menor lise celular (Balla e cols., 1992a; Balla e cols., 1992b; Vile e cols., 1994). Além disso, têm sido demonstrado clinicamente, o aumento dos níveis de HO-1 em uma ampla variedade de condições inflamatórias, tais como lesão de isquemia/reperfusão, aterosclerose, asma, doença de Alzheimer e insuficiência renal aguda (Agarwal and Nick, 2000; Akamatsu e cols., 2004; Amersi e cols., 1999; Maines, 2000; Siow e cols., 1999; Tullius e cols., 2001). A produção de HO-1 é muito elevada em doenças inflamatórias durante a fase de resolução da inflamação, tendo um íntima relação com o aumento da liberação de IL-10 (Otterbein e cols., 2000; Willis e cols., 1996).

A proteção celular mediada por HO é suportado em modelos animais de choque endotóxico, isquemia, hiperóxia, inflamação aguda dentre outros (Hancock e cols., 1998; Li e cols., 2000; Otterbein e cols., 1999a; Tamion e cols., 2001). O aumento da expressão de HO-1

confere forte resistência ao estresse, lesão celular e a morte induzida por lipopolissacarídeo, ao passo que o bloqueio da atividade da HO aborta a citoproteção, resultando em danos graves nos tecidos.

A catálise do heme realizada pela da HO-1 evita o acúmulo de heme livre dentro das células. Este mecanismo citoprotetor deve, no entanto, ser acoplado à indução da expressão de uma ferritina de cadeia H (FtH) para evitar os efeitos pró-oxidantes do Fe lábil produzido pelo catabolismo do heme. Esta noção é consistente com a observação de que a transfecção de FtH, levando a um aumento de expressão, pode mimetizar os efeitos citoprotectores de HO-1, ou seja, menor susceptibilidade ao estresse oxidativo e apoptose em células HeLa, assim como menor apoptose de células hepática em modelos de isquemia e reperfusão (Berberat e cols., 2003; Cozzi e cols., 2004; Cozzi e cols., 2003; Pham e cols., 2004). Além disso, o CO produzido pela reação de catálise exercida pela HO-1 pode prevenir a liberação do heme das hemoproteínas. Uma vez ligado aos grupos heme de hemoproteínas, o CO inibe a oxidação de  $Fe^{2+}$ , limitando assim a oxidação de hemoproteínas e impedindo a liberação de heme (Ferreira e cols., 2008; Pamplona e cols., 2007).

Outro produto final do catabolismo do heme por HO-1 que também pode impedir o efeito pró-oxidante do heme livre é a biliverdina. Esta molécula tem propriedades antioxidantes e pode ser convertida pela biliverdina redutase em bilirrubina que é um antioxidante lipossolúvel (Sedlak e cols., 2009; Stocker e cols., 1987). Devido à sua natureza lipofílica, o heme livre pode agir como um pró-oxidante principalmente dentro membranas celulares. Assim, este efeito deletério pode ser inibido pela bilirrubina, o que explicaria a capacidade de HO-1 inibir (através da produção de bilirrubina) a peroxidação lipídica em células expostas ao heme livre ou TNF (Seixas e cols., 2009).

As propriedades citoprotetoras de HO-1 na vasculatura são em grande parte fornecidas pelos seus produtos enzimáticos CO, biliverdina e bilirrubina (Calay and Mason, 2014; Loboda e cols., 2008). O CO é um importante vasodilatador, também inibe a agregação plaquetária, suprime produção de citocinas, e é anti-apoptótico e anti-inflamatório (Brouard e cols., 2000; Otterbein e cols., 2000). Da mesma forma, a biliverdina e a bilirrubina são potentemente citoprotetores, anti-oxidante e anti-inflamatório (He e cols., 2015; Sarady-Andrews e cols., 2005; Soares e cols., 2004). HO-1 é portanto uma enzima induzível que confere propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiapoptóticas ao endotélio, em adição as suas ações pró-angiogênicas e reparadoras de tecidos (Birrane e cols., 2013; Calay and Mason, 2014; Dulak and Jozkowicz, 2014; Ishikawa e cols., 2001; Shin e cols., 2015; Stocker and Perrella, 2006; Yet e cols., 2003).



Outro possível mecanismo pelo qual HO-1 funciona como uma proteína citoprotetora e anti-inflamatória seria através da redução da expressão de moléculas de adesão. Trabalhos demonstram que tanto o heme como a inibição da atividade HO induz o aumento da expressão de ICAM-1 em células endoteliais, e do influxo de leucócitos para tecidos como fígado, baço, pâncreas e músculos (Rucker e cols., 2001; Wagener e cols., 1999; Wagener e cols., 2001). Além disso, a regulação positiva de HO-1 diminui a expressão de moléculas de adesão como P-selectina e E-selectina, e a adesão de leucócitos em modelo de choque endotóxico (Vachharajani e cols., 2000). Foi demonstrado que a indução de HO-1 inibe a indução de P-selectina nas vênulas mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, subsequentemente, diminui a ligação de leucócitos, e a expressão de ICAM-1 em modelo de lesão arterial (Hayashi e cols., 1999). Nesse contexto, a atividade da HO pode diminuir a adesão tanto pelo esgotamento do heme, quanto por gerar anti-oxidantes a biliverdina/bilirrubina e o CO.

O estudo de caso de um paciente deficiente em *HMOX1* demonstrou que a ausência da enzima desencadeou lesão endotelial, níveis elevados no plasma de fator vonWillebrand, ICAM-1, coagulação e defeitos de fibrinólise, inflamação generalizada e aterosclerose prematura. O paciente morreu aos seis anos sofrendo de retardo do crescimento, anemia, leucocitose, trombocitose, anormalidade da coagulação, níveis séricos elevados de haptoglobina, ferritina e heme, uma baixa concentração bilirrubina sérica e hiperlipidemia. A autópsia revelou a presença de depósitos amilóides, macrófagos espumosos, estrias gordurosas e placas fibrosas (Kawashima e cols., 2002; Yachie e cols., 1999). Esse caso de deficiência de HO-1 é um exemplo que confirma a importância da expressão da HO na homeostasia e o seu envolvimento com a expressão de moléculas de adesão.

Contudo, é possível que HO-1 possa exercer efeitos citoprotetores através de mecanismos que atuam independentemente da sua atividade enzimática, ao interagir com outras vias de sinalização (Lin e cols., 2007). Por exemplo, verificou-se que HO-1 protege as células endoteliais de sofrer apoptose mediada pelo TNF (Soares e cols., 1998), um efeito posteriormente expandido para muitos outros agonistas proapoptóticos como o ligante CD95/Fas (Ke e cols., 2002). Tanto a exposição de células de linhagem macrófágicas (RAW 246) quanto de animais C57BL/6 estimulados com LPS tiveram aumento da expressão de HO-1 e, conseqüentemente, diminuição dos níveis de citocinas próinflamatórias como TNF, IL-1 $\beta$ , MIP-1b, acompanhada de uma elevação da liberação de IL-10 mediada pela via de MAPK-3/p38 (Otterbein e cols., 2000).

### 1.5.2. HO na malária

O papel da enzima HO-1 tem sido muito estudado nos modelos de malária. Sabe-se que animais C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA apresentam malária cerebral experimental associado a uma maior concentração de heme livre no plasma, em comparação com camundongos BALB/c, que não apresenta sinais de neuroinflamação. A contribuição do heme livre à patogênese desta doença é demonstrada pela observação de que quando administrado a camundongos BALB/c após infecção por *P. berghei* ANKA, o heme livre desencadeia o aparecimento de malária cerebral neste modelo até então resistente (Ferreira e cols., 2008; Pamplona e cols., 2007). Outros trabalhos demonstraram que o aumento da expressão de HO-1 em animais infectados com *P. berghei* ANKA foi capaz de aumentar a expressão de genes antioxidantes, levando os animais a ter uma melhora no quadro de malária cerebral experimental (Linares e cols., 2013).

Os dados do modelo murino são confirmados pela recente constatação de que heme também se acumula no plasma de crianças com malária cerebral desencadeada por *P. falciparum*, sugerindo que o heme livre pode ter um efeito patológico semelhante na malária humana (Sambo e cols., 2010). Relato de casos de mulheres grávidas infectadas com *P. falciparum*, demonstraram correlação positiva entre a expressão dos genes *Nfr2* e de HO-1 nos monócitos CD14<sup>+</sup> circulantes e uma menor parasitemia e maior peso ao nascer, indicando que o *Nfr2* e de HO-1 podem contribuir para um melhor prognóstico na malária placentar.

O heme livre também contribui para a patogênese das formas não-encefálicas de malária grave. Camundongos DBA/2 infectados por *P. chabaudi chabaudi*, exibem altas concentrações de TNF e de heme livre no plasma, desenvolvendo uma forma letal de insuficiência hepática associada à morte celular programada dos hepatócitos. A neutralização do TNF circulante ou do heme livre utilizando anticorpos anti-TNF ou aumentando a expressão de HO-1 no fígado, respectivamente, protege os hepatócitos de sofrer morte celular programada e suprime o aparecimento de insuficiência hepática (Seixas e cols., 2009). Ao infectar animais BALB/c com *P. yoelii*, e induzir a inibição da atividade da enzima HO-1 pelo uso de zinco protoporfirina IX houve um aumento da inflamação, do estresse oxidativo, da apoptose dos hepatócitos e da lesão hepática, enquanto a estimulação da atividade da HO-1 pela cobalto protoporfirina IX teve efeito oposto. Esses dados sugerem que a indução seletiva de HO-1 no fígado seria benéfica para a restauração da função hepática após a depuração do parasito (Dey e cols., 2014).

Contudo, a infecção de animais C57BL/6 com *P. berghei* ANKA e *P. yoeli* obtidos da dissecação do mosquito *Anopheles stephensi* demonstrou que a expressão de HO-1 é

aumentada no fígado, o que levou a um aumento da carga hepática dos parasitas, fenômeno também observado em camundongos tratados com monóxido de carbono e com biliverdina, enquanto camundongos deficientes para o gene *HMOX1* tiveram uma resolução completa da infecção. Estes achados sugerem que, embora estimulando a inflamação, o estágio hepático da infecção induz a expressão de HO-1, que modula a resposta inflamatória do hospedeiro, protegendo os hepatócitos infectados. Esta condição permite o desenvolvimento da fase hepática da infecção e é um exemplo de como a HO pode apresentar tanto um papel protetor quanto patogênico na infecção malárica (Epiphany e cols., 2008).

## **1.6. PLAQUETOPENIA NA MALÁRIA**

### **1.6.1. Plaquetas**

As plaquetas são células anucleadas com formato discoide e possuem um diâmetro de 1 a 3  $\mu\text{m}$ . Um indivíduo saudável possui de  $150\text{-}350 \times 10^9$  (plaquetas/L) (Gremmel e cols., 2016; Thiery and Bessis, 1956; Thon and Italiano, 2012). A capacidade das plaquetas para aderir a parede de vasos lesados, e formar agregados foi descrita pela primeira vez no século XIX por Bizzozero (de Gaetano and Cerletti, 2002). Além do seu papel na trombose e hemostasia, (Davi and Patrono, 2007; Ruggeri, 2002), as plaquetas participam de outros processos fisiopatológicos incluindo inflamação, aterogênese (Lindemann e cols., 2007), defesa do hospedeiro (Engelmann and Massberg, 2013) e crescimento tumoral e metástase (Gay and Felding-Habermann, 2011).

A produção da plaqueta inicia-se com a maturação do megacariócito a partir do seu progenitor hematopoiético. Os megacariócitos são células hematopoiéticas poliploides, especializadas para produzir e liberar plaquetas e precursores de plaquetas na circulação (Gordon e cols., 1990; Long e cols., 1982; Morita e cols., 2011). A produção de plaquetas é um fenômeno que envolve eventos de endomitose levando ao desenvolvimento da poliploidia; modificações de membranas e citoesqueleto; evolução de grânulos dirigida por fatores de transcrição; apoptose; e é tempo dependente. A megacariocitopoiese é conduzida pela trombopoietina (TPO). Embora TPO e outras citocinas sejam críticas no desenvolvimento e formação de megacariócitos, não são necessárias para os estágios tardios da plaquetopoiese *in vitro* (Machlus and Italiano, 2013).

Os megacariócitos maduros estendem longas ramificações chamadas de próplaquetas, que são liberadas nos sinusóides vasculares da medula óssea. Cada megacariócito pode estender de 10 a 20 próplaquetas, cada uma começando como uma protusão que vai se

alongando e afinando ao longo do tempo (Machlus and Italiano, 2013). As plaquetas serão formadas nas pontas das pró-plaquetas. Ao longo do desenvolvimento das plaquetas, estas passam a receber suas organelas e grânulos essenciais para suas funções, que são transportados a partir do megacariócito por microtúbulos (Italiano e cols., 1999; Richardson e cols., 2005).

Recentemente foi descoberto um novo intermediário, a pré-plaqueta, que é formada durante o processo de maturação. Pré-plaquetas são partículas anucleadas e discóides, que são maiores do que as plaquetas (medem de 3 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e que tem a capacidade de se transformar em pró-plaquetas quando caem na circulação. Desta forma, o novo modelo proposto é o de que megacariócitos liberam pré-plaquetas nos sinusóides e estas por sua vez, são transformadas espontânea e rapidamente em próplaquetas. As próplaquetas sofrem um processo rápido de fissão que resulta na formação de plaquetas maduras na circulação (Machlus and Italiano, 2013; Thon e cols., 2012; Thon e cols., 2010). Os eventos moleculares envolvidos na libertação de plaquetas individuais a partir de pré-plaquetas são complexos e não totalmente esclarecidos. Porém, sabe-se que o processo de cisalhamento aumenta a liberação de plaquetas *in vitro* (Dunois-Larde e cols., 2009; Italiano, 2013), fato este que foi observado também em estudos utilizando microscopia intravital de camundongos nos sinusóides medulares (Junt e cols., 2007).

Embora a medula óssea seja o local tradicional da produção de plaquetas, modelos demonstram que este fenômeno pode ocorrer na corrente sanguínea e no pulmão. Ao analisar amostras de sangue de cães e gatos foram encontradas células gigantes, interpretadas como megacariócitos, com morfologia um pouco diferente dos encontrados na medula. Os pesquisadores encontraram ainda, nas amostras relatadas anteriormente, núcleos com vesículas contendo parte de citoplasma anexado e núcleos intravasculares aparentemente nus, indicando que o megacariócito estava num estado de produção ativa de plaquetas e perdeu seu citoplasma como resultado da formação de plaquetas, (Behnke and Forer, 1998; Howell and Donahue, 1937; Schwertz e cols., 2010).

Estudos subsequentes indicaram que os megacariócitos estão presentes nos pulmões de coelhos, ratos, e camundongos e que a sua concentração varia de acordo com o estado fisiológico do animal. Ou seja, a concentração de megacariócitos aumenta quando os animais tornam-se plaquetopênicos (Davis e cols., 1997; Jordan, 1940; Pederson, 1974; Zucker-Franklin and Philipp, 2000). Os megacariócitos encontrados nos pulmões apresentavam extensões citoplasmáticas consistentes com proplaquetas (Howell and Donahue, 1937; Jordan, 1940). Megacariócitos também foram rotineiramente identificados em exames de pulmões humanos em necropsias forenses, e seu número está aumentado em situações de síndrome do

desconforto respiratório agudo (ARDS), queimaduras, coagulação intravascular disseminada e trombose (Bozza e cols., 2009; Davis e cols., 1997; Italiano, 2013; Mandal e cols., 2007).

Acredita-se que os megacariócitos se originam na medula, são transportados para os pulmões no sangue venoso, e ficam presos em microvasos pulmonares devido às suas dimensões (Levine e cols., 1993; Pederson, 1974; Zucker-Franklin and Philipp, 2000). A retenção de megacariócitos nos microvasos seria esperada devido ao seu grande diâmetro (50-100µm), complexidade nuclear, e a rigidez citoesquelética (Machlus and Italiano, 2013; Weyrich and Zimmerman, 2013). Embora a captura física de megacariócitos em microvasos pulmonares seja provavelmente um importante mecanismo de acumulação, moléculas de adesão na superfície dos megacariócitos também podem contribuir para a retenção intravascular no pulmão, particularmente em condições em que o endotélio pulmonar esteja ativado por causa de inflamação, infecção ou injúria (Avraham e cols., 1993; Bozza e cols., 2009; Fuentes e cols., 2010).

A membrana plasmática das plaquetas é formada por bicamada lipídica semelhante a de outras células sanguíneas. Na superfície da membrana plasmática das plaquetas existem muitas glicoproteínas que são necessárias para diversas funções exercidas pela plaqueta. Por meio das glicoproteínas as plaquetas interagem com estruturas subendoteliais das paredes dos vasos lesados para a ativação, adesão e agregação plaquetária, bem como para a retração do coágulo (Kunicki, 1988; White and Escolar, 1993; White e cols., 1995a; White e cols., 1995b).

Além da membrana plasmática externa, os sistemas de membranas em plaquetas humanas compreendem o sistema tubular denso (resíduo do retículo endoplasmático liso de megacariócitos) (Gremmel e cols., 2016), e o sistema canalicular aberto. O sistema canalicular aberto é usado para o transporte de componentes plasmáticos, tais como fibrinogênio, para serem armazenados, e podem também servir como via para a libertação de conteúdo granular durante a ativação plaquetária (Escolar and White, 1991; White and Clawson, 1982; White and Escolar, 1991). Nas plaquetas em repouso os canais do sistema canalicular aberto podem ser evaginados, e assim proporcionar as partes de membrana necessárias para as plaquetas ativadas aumentarem sua área de superfície mais de quatro vezes (Gremmel e cols., 2016). Em pacientes com síndromes que levam a ter certas plaquetas hipogranulares são encontrados estruturas membranares semelhantes a complexo de Golgi, que seriam resíduos dos megacariócitos (White, 2005; White e cols., 2004). Assim como o retículo endoplasmático rugoso são vistos somente em pacientes com rápido turnover plaquetário e geralmente repletos de ribossomos.

As plaquetas possuem três tipos principais de organelas secretoras: os  $\alpha$ -grânulos (Berger e cols., 1996; Blair and Flaumenhaft, 2009; Golebiewska and Poole, 2015), os grânulos densos (Berger e cols., 1996) e os lisossomos (Gremmel e cols., 2016) (Tabela 1.5.1). Além disso, as plaquetas contêm mitocôndrias simples (importantes para o metabolismo energético e como provedor de cálcio), glicosomas (reservatório de glicogênio plaquetário) (White, 1999) e cadeias e aglomerados elétron densos (sua função não é conhecida) (White, 2002).

**Tabela 1.6.1: Grânulos secretórios de plaquetas e seus conteúdos.**

Grânulo secretório	Tipo	Exemplos
$\alpha$ -Grânulos	Proteínas integrais de membranas	$\alpha$ IIb $\beta$ 3 (IIb/IIIa- CD41/CD61), GPIb-IX-V, GPVI, P-selectina
	Coagulantes, anticoagulantes e proteínas fibrinolíticas	Factores V, IX, XIII, antitrombina, proteína S, inibidor da via do fator tecidual, plasminogênio, $\alpha$ 2-macroglobulina
	Proteínas de adesão	Fibrinogênio, fator de von Willebrand, trombospondina
	Quimiocinas	CXCL1 (GRO- $\alpha$ ), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL5 (RANTES)
	Fatores de crescimento	Fator de crescimento epidermal, fator de crescimento de hepatócito, fator de crescimento insulín-like, fator de crescimento transformante $\beta$
	Fatores angiogênicos e inibidores	Fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento derivado de plaqueta, angiostatina, endostatina
	Proteínas microbidas	Timosina- $\beta$ 4, trombocidinas 1 e 2
	Mediadores imunológicos	Percursor do Complemento C3 e C4, IgG
Grânulos Densos	Cátions	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup>
	Fosfatases	Fosfatos polifosfato, pirofosfato
	Aminas bioativas	Serotonina, histamina
	Nucleotídeos	Nucleotídeos ADP, ATP, UTP, GTP
Lisossomos	Enzimas degradantes de proteínas	Catepsinas, elastase, colagenase, carboxipeptidase
	Enzimas degradantes de carboidratos	Glucosidase, galactosidase, manosidase
	Enzimas que cleavam Éster fosfatases	Fosfatase ácida

O citoesqueleto das plaquetas possuem muitos microtúbulos e microfilamentos de actina que formam um sistema que suporta a membrana contrátil e forma a matriz em que

todas as organelas são suspensas. Quando ocorre a ativação plaquetária, o sistema de actina citoplasmática e os microtúbulos movem os  $\alpha$ -grânulos e os corpos densos para o centro das plaquetas, o que pode resultar em secreção do seu conteúdo através do sistema canalicular (Escolar e cols., 1986; White and Krumwiede, 1987). Outro mecanismo de liberação dos grânulos é a sua fusão com a membrana plasmática. Esse processo pode ser mediado por diversos receptores contidos nos grânulos e na membrana plasmática, sendo regulado por chaperonas (Ferro-Novick and Jahn, 1994; Flaumenhaft e cols., 1999; Morgenstern e cols., 1987).

As plaquetas humanas podem ser ativadas por numerosos agonistas como o fator de von Willebrand (VWF) e o colágeno, além da trombina e do ADP que desempenham papéis importantes na ativação plaquetária (Gremmel e cols., 2016). As plaquetas ativadas têm vários mecanismos através dos quais podem fornecer sinais a leucócitos, células endoteliais e outras células alvo. A mais conhecida é a rápida secreção de mediadores solúveis com atividade de sinalização endócrina-parácrina (Vieira-de-Abreu e cols., 2012; Weyrich and Zimmerman, 2004). As quimiocinas plaquetárias CXC4 (PF4) e o CCL-5/RANTES são exemplos de fatores secretados por grânulos alfa de plaquetas ativadas que realizam funções de sinalização intercelular complexas em situações de homeostase e de inflamação (Chan e cols., 2012; Fang e cols., 2014; Kasper e cols., 2007; Liu e cols., 2002; Vieira-de-Abreu e cols., 2012).

Quando as plaquetas são ativadas por trombina, há a indução de degranulação com liberação de mediadores inflamatórios, fatores antibacterianos, síntese de IL-1 $\beta$ , e de fator tecidual. Ocorre também a formação de agregados de plaqueta-monócito que desencadeia a expressão e liberação de novas citocinas, quimiocinas e enzimas inflamatórias (Vieira-de-Abreu e cols., 2012; Weyrich and Zimmerman, 2004). O colágeno também é um conhecido estimulador de agregação plaqueta-plaqueta na homeostase, podendo ativar plaquetas através da integrina  $\alpha$ IIbB3 (CD41/CD61) ou pelo GPVI e induzir a síntese de IL-1 $\beta$  e de fator tecidual.

As plaquetas tem um extensivo repertório de receptores de superfície que transmitem sinais para seu interior, e desencadeiam vias de transdução de sinais. A maioria desses receptores foram estudados pelo seu papel na homeostase e são alvos de manipulação terapêutica em doenças trombóticas. Adicionalmente, muitos desses receptores têm papel importante na atividade inflamatória de plaquetas (Brass e cols., 2011; Coughlin, 2005; Davi and Patrono, 2007; Fredman e cols., 2010; Freedman, 2005). Por exemplo, a ativação dos receptores acoplados a proteína G de plaquetas, como o PAR-1 e PAR-4 induzem uma transdução de sinal dentro da plaqueta que ativa a integrina  $\alpha$ IIbB3 (CD41/CD61), que é

ligante de fibrinogênio, gerando também a agregação plaqueta-plaqueta (Coller and Shattil, 2008; Coughlin, 2005; Freedman, 2005).

A integrina  $\alpha$ IIBB3 (CD41/CD61) é uma integrina muito expressa em plaquetas, sendo induzida por diversos receptores como PAR, P2Y dentre outros (Coller and Shattil, 2008; Shattil e cols., 2010). Essa integrina esta envolvida na interação de plaquetas com monócitos, com o endotélio de vasos inflamados e também com patógenos (Bhatt and Topol, 2003; Muhlestein, 2010; Pabla e cols., 1999). Outras integrinas presentes na plaqueta também possuem tanto um papel homeostático quanto na inflamação como  $\alpha$ VB3,  $\alpha$ 2B1,  $\alpha$ 5B1 e  $\alpha$ 6B1 (Kasirer-Friede e cols., 2007; Shattil e cols., 2010; Zimmerman, 2009).

Dados recentes demonstram que plaquetas humanas e murinas expressam receptores do tipo toll (TLRs), adicionando uma família chave de receptores inflamatórios, bem como de vias intracelulares, ao repertório das plaquetas. O fato das plaquetas expressarem membros da família TLR implica essas células como "sensores" microbianos e sugere que evoluíram como efetores de inflamação e respostas imunes, além de desempenharem funções hemostáticas essenciais (Beaulieu and Freedman, 2010; Blasius and Beutler, 2010; Garraud and Cognasse, 2010; Ginsberg and Henson, 1978; Saba e cols., 1984; Semple and Freedman, 2010; Takeuchi and Akira, 2010; Vieira-de-Abreu e cols., 2012; Zhao e cols., 2002).

Entretanto, quando as plaquetas são ativadas em situações patológicas podem contribuir para quebra da barreira endotelial, levando ao extravasamento de fluidos e formação de edema (Bozza e cols., 2009; Vieira-de-Abreu e cols., 2012). As interações plaqueta-endotélio e plaqueta-leucócito-endotélio podem alterar as propriedades anticoagulantes do endotélio não perturbado, e assim, induzir estado pró-trombótico no endotélio. Isso pode ocorrer em resposta a patógenos invasores e ser desencadeado por uma variedade de estímulos patológicos (Damas e cols., 2006; Gawaz e cols., 2005; von Hundelshausen e cols., 2007).

Agregados de plaquetas ativadas com cada uma das principais classes de leucócitos têm sido reportados em amostras clínicas e/ou modelos inflamatórios. A formação de agregado de plaquetas com monócitos parece ser o mais comum e desencadeia um aumento da concentração deste leucócito nos sítios inflamatório. Ao ativar as plaquetas, elas passam a expressar P-selectina em alta concentração, que se liga ao ligante para P-selectina nos leucócitos (PSGL-1), ativando a expressão de B2 integrinas nos leucócitos e tornando-os mais adesivos e mais propícios a transmigrarem para sítios inflamatórios. Esta forma de *priming* realizada pela plaqueta ativada também ativaria a transcrição de outros genes que codificam citocinas, quimiocinas e enzimas inflamatórias no monócito (Blanks e cols., 1998; Chiang e cols., 2007; da Costa Martins e cols., 2006; Evangelista e cols., 2007; Freedman, 2005;



Goncalves e cols., 2011; Huo e cols., 2003; Lehr e cols., 1997; Lorant e cols., 1995; Michelson e cols., 2001; Rinder e cols., 1994; van Gils e cols., 2009; Wang e cols., 2007; Zarbock e cols., 2009; Zarbock e cols., 2006).

Existem evidências que as plaquetas regulam a diferenciação, ativação e maturação de células dendríticas. O CD40L derivado de plaquetas promove a diferenciação e/ou maturação de células dendríticas, que ocupam uma posição única na interface entre os membros do sistema imune inato e adaptativo, podendo modular direta ou indiretamente as respostas efetoras dos linfócitos (Czapiga e cols., 2004; Elzey e cols., 2011; Elzey e cols., 2003; Kaneider e cols., 2003; Martinson e cols., 2004; Vieira-de-Abreu e cols., 2012; Weyrich and Zimmerman, 2004). Ademais, a sinalização via plaquetas ativadas incluem a ativação de linfócitos B e produção de imunoglobulinas, potencialmente mediada pela interação de plaquetas com células T citotóxicas via CD40L (Cognasse e cols., 2007; Elzey e cols., 2008). Portanto, as plaquetas têm sido reconhecidas como células importantes para a integralidade das respostas imunes, por serem capazes de interagir e estimular tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa.

### **1.6.2 Imunopatogênese da plaquetopenia da Malária**

A plaquetopenia é uma complicação comum aos cinco tipos de plasmódio que infectam humanos (Antinori e cols., 2013; Lacerda e cols., 2011; Tomar e cols., 2015; William e cols., 2011), sendo considerado um indivíduo como plaquetopênico quando apresenta o número de plaquetas menor que  $150 \times 10^9$  plaquetas/L. Apesar de não ser considerado como um dos sinais críticos de malária grave, a plaquetopenia foi associada à gravidade, e foi um preditor independente de morte em um estudo com crianças com malária falciparum (Gerardin e cols., 2002). Contudo, a plaquetopenia não é considerado um biomarcador de gravidade na malária falciparum, e ainda não foi validado como um marcador de gravidade na malária vivax (Antinori e cols., 2016; Lacerda e cols., 2011).

Acredita-se que a patogênese da plaquetopenia induzida pela malária é multifatorial e envolve a supressão da medula óssea, destruição de plaquetas mediada por anticorpos, fagocitose de plaquetas, adesão ao endotélio ativado e interações com eritrócitos parasitados e leucócitos levando ao sequestro destes agregados e o estresse (Faille e cols., 2009b; Lacerda e cols., 2012a).

O mecanismo amplamente aceito para explicar a plaquetopenia desencadeada pela infecção malárica é o desenvolvimento de autoanticorpos plaquetários, e subsequente fagocitose por macrófagos. Em estudos de casos de malária vivax e de malária falciparum foi

identificado a produção de imunoglobulinas G e E contra plaquetas, sendo em alguns casos correlacionado com maior gravidade da doença (Kelton e cols., 1983; Seka-Seka e cols., 2004; Yamaguchi e cols., 1997). Também em modelo experimental, a infecção de animais C57Bl/6 com *P. berghei* ANKA demonstrou significativa correlação inversa entre a queda no número de plaquetas e o aumento da associação entre plaquetas e imunoglobulinas (Grau e cols., 1988). Com relação a fagocitose de plaquetas Coelho e cols. (2013) demonstraram que plaquetas provenientes de pacientes plaquetopênicos são mais propícias a serem fagocitadas por macrófagos, do que as plaquetas provenientes de pacientes não plaquetopênicos, sugerindo que as plaquetas dos pacientes plaquetopênicos apresentam algum diferencial que a leva a fagocitose.

Contudo Gramaglia e cols. (2005) relataram que destruição plaquetária mediada por anticorpos anti-plaquetários seria responsável por no máximo 15% da plaquetopenia observada, uma vez que em modelo de infecção com *P. berghei* ANKA em camundongos deficientes em células B apresentaram plaquetopenia profunda de 83%. Por outro lado quando eles utilizaram animais deficientes para RAG1 (não produz linfócitos T e B funcionais), CD4 ou CD8 houve um significativa proteção contra a plaquetopenia, além de níveis mais baixos de TNF, IFN-  $\gamma$ , e IL-12. Portanto os anticorpos anti-plaquetas seriam necessário, mas não suficiente para a patogênese da malária, em vez disso, populações de células T desempenhariam papéis fundamentais na plaquetopenia malárica. Sugere-se então que exista uma complexa interação bidirecional entre imunidade mediada por células e plaquetas durante a malária grave experimental que regula ambas as respostas, alterando inclusive a produção e/ou liberação de citocinas próinflamatória (Gramaglia e cols., 2005). A associação de imunidade mediada por células tais como o balanço da produção e/ou liberação de citocinas e quimiocinas com plaquetopenia foram documentadas em vários estudos de casos de infecções tanto por *P. falciparum* quanto por *P. vivax*. Baixos níveis de TGF- $\beta$  e RANTES, correlacionam com maior gravidade da malária e plaquetopenia, assim como elevados níveis de citocinas próinflamatórias como enquanto IL-1, IL-10, TNF (Casals-Pascual e cols., 2006; Hanisch e cols., 2015; Raza e cols., 2014).

A ativação e formação de agregados também seria uma hipótese para explicar a plaquetopenia em decorrência da malária. O acúmulo de plaquetas, em contato com leucócitos e hemozoína, foi detectado em microvasos cerebrais em estudos histológico de malária cerebral fatal pediátrica (Grau e cols., 2003). Ensaios *in vitro* demonstraram que plaquetas também interagem diretamente com as hemácias parasitadas, causando a formação de agregados de hemácias com plaquetas (Pain e cols., 2001; Wassmer e cols., 2004). A análise de estudos *in vitro*, e amostras clínicas histológicas, sugeriram que as plaquetas aderentes

podem atuar como pontes entre hemácias parasitadas e as células endoteliais ativadas (Wassmer e cols., 2004). A análise da parasitemia de crianças malásias com malária cerebral demonstrou correlação positiva entre o grau de plaquetopenia e à densidade de parasitemia (Wassmer e cols., 2008). Quando fizeram ensaio de agregação utilizando o plasma e hemácias parasitadas provenientes desses pacientes induziu baixa agregação de plaquetas a hemácias parasitadas, porém, quando os ensaios foram repetidos tendo o plasma ajustado a concentração plaquetária para dentro da faixa fisiológica normal, ocorreu aglomeração maciça de hemácias e plaquetas (Wassmer e cols., 2008). Estudos da etiologia da plaquetopenia associada a malária em voluntários infectados experimentalmente por *P. falciparum*, e em pacientes com malária registrou uma diminuição da contagem de plaquetas circulantes coincidindo com o início da ativação das células endoteliais e com liberação do fator de von Willebrand que é uma proteína importante para agregação plaquetária (VWF) (de Mast e cols., 2007).

Outra forma de explicar a plaquetopenia na malária seria através da indução de apoptose plaquetária. Esta teoria foi comprovada experimentalmente por Piguet e cols. (2002), ao infectar camundongos C57Bl/6 com *P. berghei* ANKA, e observar uma acentuada plaquetopenia acompanhada, do aumento no número de micropartículas derivada de plaquetas no plasma, e da ativação das caspases 1,3,6,8 e 9 nas plaquetas, sendo o fenômeno revertido quando feito o tratamento com anticorpo para bloquear CD40L, ou com o inibidor de caspases ZVAD (Piguet e cols., 2002). Além da diminuição da plaquetopenia o tratamento com ZVAD foi capaz de diminuir a mortalidade, sugerindo que as caspases tem um papel importante durante a malária.

O estresse oxidativo também tem sido visto como um potencial gerador de plaquetopenia. A ativação de células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, levam a produção espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), para matarem os microrganismos. A presença desses radicais livres durante a infecção por plasmódios já está bem estabelecida (Pabon e cols., 2003; Reis e cols., 2010; Reis e cols., 2012). Sendo assim enquanto algumas hemácias estão sendo lisadas, é possível que ocorra a lise de plaquetas, sendo esperado que o aumento da ROS e RNS pode levar ao aumento então da lise plaquetária. Já foi demonstrado que os níveis plasmáticos de peroxidação lipídica foram mais elevados em pacientes plaquetopênicos que em pacientes não plaquetopênicos. Assim como as plaquetas de pacientes plaquetopênicos infectados por *P. vivax* foi observado maior peroxidação lipídica, em relação a plaquetas provenientes de pacientes não plaquetopênicos. Estes resultados sugerem que o efeito do estresse oxidativo nas plaquetas pode ser importante

na patogênese da plaquetopenia encontrada na malária por *P. vivax*. (Araujo e cols., 2008; Erel e cols., 2001).

## 1.7. MALÁRIA PULMONAR

O dano tecidual pulmonar desencadeado pela malária é reportado há mais de 200 anos, porém o nosso conhecimento sobre a patologia e a melhor forma de tratamento ainda é limitada. As manifestações pulmonares associadas à malária podem gerar a síndrome do desconforto respiratória aguda (do inglês acute respiratory distress syndrome-ARDS). As complicações pulmonares são comuns em infecções causadas por *P. falciparum* e *P. vivax* (Tan e cols., 2008), porém podem ocorrer em decorrência da infecção por *P. ovale* (Haydoura e cols., 2010), *P. malarie* (Lozano e cols., 1983) e *P. Knowlesi* (William e cols., 2011). A ARDS associada à malária pode ocorrer simultaneamente a outras síndromes como a malária cerebral (Blanloeil e cols., 1980; Taylor e cols., 2006; Taylor and White, 2002), ou isoladamente, sendo mais comum em indivíduos adultos não imunes, como por exemplo, viajantes que retornam de países endêmicos (Gerardin e cols., 2007; Mohan e cols., 2008).

A complicação da malária pulmonar mais comum é o acúmulo de líquidos no pulmão chamado de edema pulmonar. O edema pulmonar é desencadeado pelo aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, levando à perda de fluido intravascular (Taylor e cols., 2006; Taylor and White, 2002), com acúmulo de macrófagos seguido de resposta inflamatória intravascular. A resposta imune gerada no pulmão também pode levar a obstrução das vias aéreas, com diminuição da ventilação, das trocas gasosas e aumento de células com atividade fagocítica (Anstey e cols., 2002; Taylor e cols., 2006).

O comprometimento pulmonar é mais comum de ocorrer após o início do tratamento, quando o paciente não apresenta mais parasitemia detectável (Kumar e cols., 2007; Price e cols., 2007; Sarkar e cols., 2010). Sugere-se que o agravamento da injúria pulmonar evoluindo para ARDS em malária falciparum seja devido ao sequestro de parasitos periféricos, de maneira secundária a expressão de moléculas de adesão que facilitam a citoaderência das HPs às células endoteliais (Anstey e cols., 2007). A adesão das HPs leva a uma obstrução da microcirculação, desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica associada a um grande número de células inflamatórias que migram para o parênquima pulmonar e levam à produção de altos níveis de citocinas. Citocinas como TNF, IL-1 liberadas por monócitos e macrófagos, regulam a expressão de IL-6 e CXCL-8/IL-8, por exemplo, e aumentam a expressão de moléculas de adesão endoteliais e a ativação de macrófagos (MacPherson e cols., 1985; Mohan e cols., 2008; Taylor and White, 2002).

O sequestro de hemácias parasitadas na microvasculatura pulmonar não ocorre em infecções por *P. ovale*. Entretanto trabalhos recentes demonstraram que em infecções por *P. vivax* as HPs são capazes de aderir ao endotélio, porém de maneira bem menos intensa que com *P. falciparum* (Carvalho e cols., 2010). Sendo assim, a teoria da obstrução da microvasculatura não é suficiente para explicar a ocorrência de ARDS na malária ovale e na malária vivax. Lacerda e cols (2012) demonstraram que a injúria pulmonar foi a principal causa das mortes ocasionadas pela infecção com *P. vivax*, com uma massiva infiltração no espaço intersticial e formação de edema alveolar, confirmando a literatura existente (Anstey e cols., 2007; Lacerda e cols., 2012a). Portanto, a infiltração celular e a sua ação no foco inflamatório, parecem ter um papel importante nos fenômenos observados na injúria pulmonar da malária não causada por *P. falciparum*.

O quadro clínico do paciente pode progredir rapidamente para falência respiratória. Os sinais clínicos de comprometimento pulmonar desencadeados pela malária, são de difícil diagnóstico por serem confundidos com pneumonia, uma vez que os pacientes com ARDS associada à malária apresentam intensa falta de ar, tosse, dispnéia, expectoração e dor no peito (Rajput e cols., 2000). O tratamento destes pacientes consiste em uso do esquema terapêutico de acordo com a espécie infectante e, em alguns casos, se faz necessário o uso da ventilação mecânica não invasiva (Agarwal e cols., 2007).

O papel da HO-1 na injúria pulmonar desencadeada pela malária, só foi estudado por um grupo. Pereira e cols. (2016) fizeram a infecção em camundongos da linhagem DBA/2 com *P. berghei* ANKA. E encontraram níveis aumentados de RNA mensageiro para HO-1 bem como da expressão da proteína. Adicionalmente, eles trataram os animais com heme e os animais não desenvolveram injúria pulmonar associada a infecção. Além disso, o tratamento com heme mostrou uma melhora dos parâmetros respiratórios, altos níveis de VEGF nos soros e uma diminuição na permeabilidade vascular no pulmão. Portanto, a indução de HO-1 em situações de injúria pulmonar desencadeada pela infecção malárica poderia ser protetora.

Ainda não está claro qual todo o papel da resposta imune gerada pelo hospedeiro, em resposta à infecção. Uma vez que a malária pulmonar em pacientes se desenvolve principalmente após o início do tratamento, quando ocorre a liberação de muitos PAMPs e DAMPs, como o heme, na circulação que são importantes para a ativação de proteínas como a heme oxigenase, presente em diversas células (Van den Steen e cols., 2013). Além disso plaquetas são células capazes de aderir ao endotélio ativado e formar agregados com hemácias e leucócitos levando a piora de quadro de malária cerebral experimental e humana (Grau e cols., 2003; Srivastava e cols., 2008; Wassmer e cols., 2003; Wassmer e cols., 2004). Na literatura observamos que ao infectar com *P. berghei* ANKA camundongos que não possuem

o receptor para o fator ativador de plaquetas (PAF) (PAFR<sup>-/-</sup>) a inflamação pulmonar foi marcadamente reduzida, com menor migração de células e ausência virtual de alterações na permeabilidade vascular (Lacerda-Queiroz e cols., 2012). E em trabalhos anteriores do nosso grupo constatamos o aumento da expressão do gene para heme oxigenase na plaqueta de pacientes com malária vivax. Hipotetizamos neste trabalho que a modulação da atividade da proteína heme oxigenase interfere na plaquetopenia, e nos fenômenos que ocasionam a injúria pulmonar durante a infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65.

Na literatura observamos que ao infectar com *P. berghei* ANKA camundongos que não possuem o receptor para o fator ativador de plaquetas (PAF) (PAFR<sup>-/-</sup>) a inflamação pulmonar foi marcadamente reduzida, com menor migração de células e ausência virtual de alterações na permeabilidade vascular.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Nosso principal objetivo é determinar a influência da proteína heme oxigenase na plaquetopenia e na injúria pulmonar aguda durante a infecção pelo *P. berghei* NK65.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Analisar a evolução da injúria pulmonar desencadeada pela infecção *P. berghei* NK65;
- Avaliar e caracterizar plaquetopenia durante a infecção com *P. berghei* NK65;
- Analisar o papel da heme oxigenase na plaquetopenia durante a infecção com *P. berghei* NK65;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57Bl/6, cedidos pelo Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Durante os experimentos os animais foram mantidos no Biotério do Pavilhão Ozório de Almeida do Instituto Oswaldo Cruz. Animais machos com peso entre 20 a 25g foram mantidos em gaiolas plásticas de micro isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight, Brasil) com livre acesso a água e ração, com temperatura controlada entre 22 a 24°C e ciclos de claro e escuro com duração de 12 horas. Os animais receberam uma dose de vermífugo (20 µL Petzi Plus/Vetbrands em 180 µL de salina) por via oral (gavagem) e foram utilizados uma semana após o tratamento. Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz sob as licenças nº P-0528/08 e L025/15.

#### 3.2. Infecção com *P. berghei* NK65 ou com *P. berghei* ANKA

Para infecção dos animais foi utilizado o *P. berghei* NK65 cedido gentilmente pelo Dra. Juliana Tavares do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. E o *P. berghei* ANKA cedido gentilmente pelo Dr. Leonardo Carvalho do Laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Oswaldo Cruz.

Para estocagem, dos parasitos utilizados ao longo do estudo, o sangue de animais infectados apresentando parasitemia de até 10% foi obtido por punção cardíaca. O sangue recolhido foi centrifugado (centrífuga Eppendorf mod. 5415C) por cinco minutos a 500 G. O soro foi descartado e as hemácias foram ressuspensas em uma solução de glicerol tamponada e mantidas em nitrogênio líquido.

Para realização da infecção, primeiro o sangue, em estoque, foi descongelado e inoculado em alguns animais, chamados de animais passagem. A parasitemia dos animais passagem foi monitorada até chegar a 10% e, então, o sangue desses animais foi utilizado para infectar os animais usados nos experimentos. O inóculo utilizado para infecção com *P. berghei* NK65 foi de  $10^4$  hemácias parasitadas em 200 µL de PBS (NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4), via intraperitoneal (i.p.). Já para infecção com *P. berghei* ANKA foi utilizado o inóculo de  $10^5$  hemácias parasitadas. Os animais controle receberam  $10^4$  ou  $10^5$  hemácias não parasitadas (HNP) em 200 µL de PBS, de acordo com a cepa de plasmódio utilizada para infecção.



Para determinação da parasitemia, foi feito um pequeno corte com tesoura na extremidade da cauda dos animais, permitindo a coleta de aproximadamente dez microlitros de sangue utilizado para confecção de lâminas de distensão sanguínea. As lâminas foram coradas em *kit* Panótico (Laborclin) através de imersão por um minuto em cada uma das soluções que compõem o *kit*. Foi contado o número de hemácias parasitadas entre cem hemácias totais através de microscopia de luz, utilizando o microscópio óptico (OLYMPUS mod. CX31).

Após verificação da parasitemia, 1 $\mu$ L do sangue do animal foi diluído em 999 $\mu$ L de PBS, e o número de hemácias foi estimado em câmara de Neubauer (Neubauer Improved). O número total de hemácia contadas, aliado a porcentagem de hemácias parasitadas foi usado para determinar o volume total de sangue a ser utilizado para fazer os inóculos.

### **3.3 Tratamentos**

Para cada experimento foi preparado uma solução nova das drogas Cobalto Protoporfirina IX/CoPPIX (PORPHIRIN-Logan, Utah) e Zinco Protoporfirina IX/ZnPPIX (PORPHIRIN-Logan, Utah), na concentração de 5mg/Kg. A droga CoPPIX é utilizada como um indutor da enzima HO-1, enquanto a droga ZnPPIX é utilizado como um inibidor da atividade (Pamplona e cols., 2007). As drogas foram diluídas em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%/Salina (HEMAFARMA) não estéril contendo DMSO (Sigma), na concentração de 0,5%. A solução Salina com 0,5% de DMSO (Sigma) foi administrada como controle do tratamento. As soluções de CoPPIX, ZnPPIX e Salina com DMSO (Sigma) foram armazenadas a -20°C ao longo do experimento, sendo sonicadas (2510-BRANSON) por 20 minutos, todos os dias antes de iniciar a injeção. Foram administrados 200 $\mu$ L de solução por via intraperitoneal, durante oito dias, iniciando no dia seguinte a infecção.

### **3.4. Desenho experimental**

Os experimentos foram realizados seguindo o desenho experimental da figura 3.4.1, sendo diferentes os animais utilizados para curva de sobrevivência, dos utilizados para as análises da produção de plaquetas, dos utilizados para as outras análises. Contudo foi realizada a contagem de parasitemia de todos os animais utilizados.

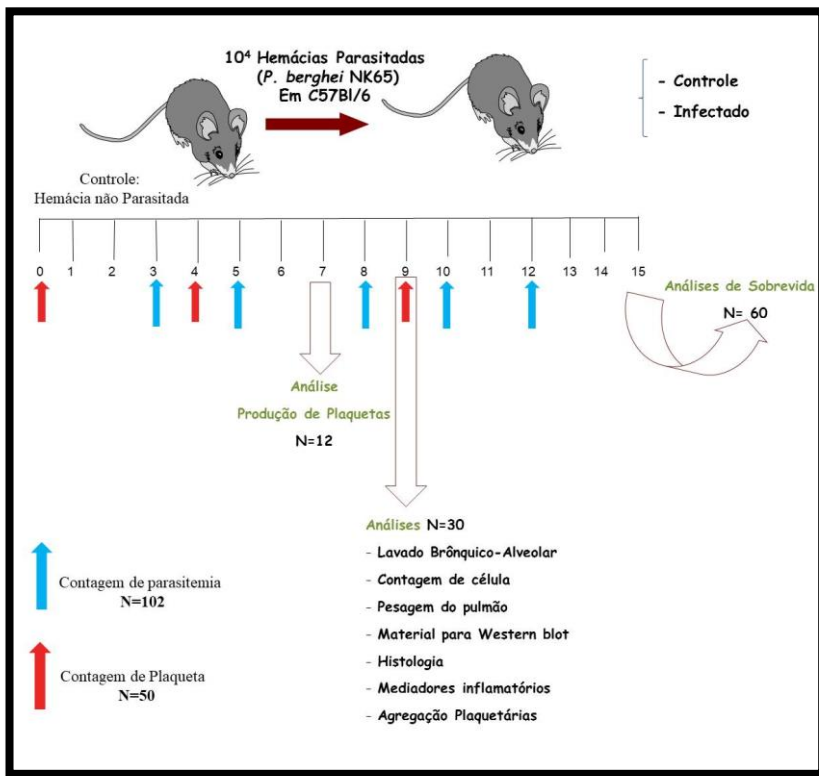


Figura 3.4.1. **Desenho Experimental 1.** Descrição de todos os animais e experimentos realizados durante a primeira parte do trabalho.

Após iniciarmos o tratamento os experimentos foram realizados seguindo o desenho experimental da figura 3.4.2, sendo diferentes os animais utilizados para curva de sobrevida, dos utilizados para as análises de histologia, dos utilizados para análise de azul de Evans, dos utilizados para as outras análises. Contudo foi realizada a contagem de parasitemia e do peso corporal de todos os animais utilizados para curva de sobrevida e para as análises gerais.

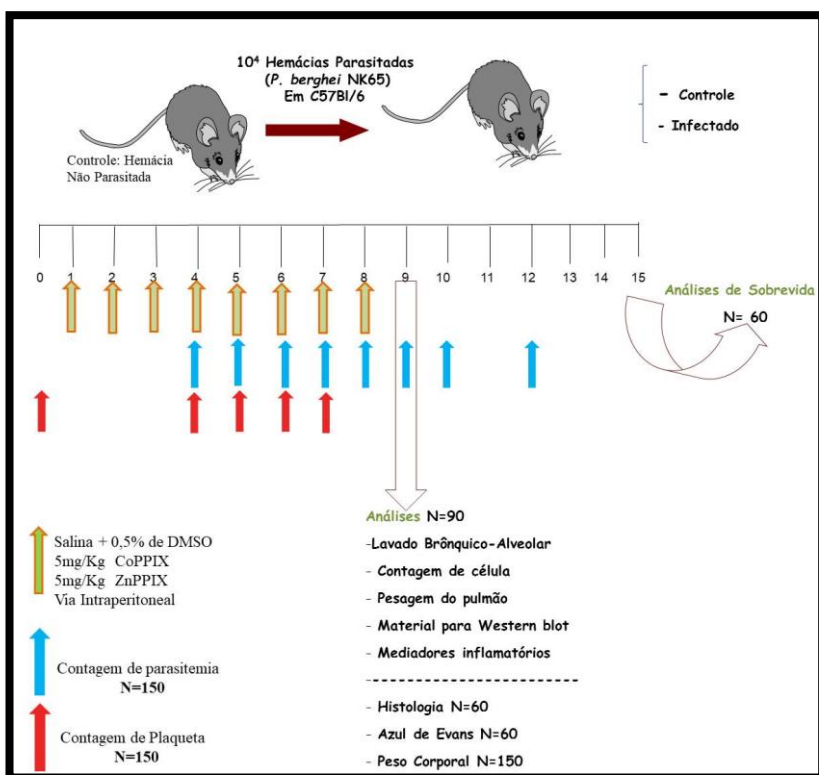


Figura 3.4.2. **Desenho Experimental 2.** Descrição de todos os animais e experimentos realizados após início do tratamento com cobalto protoporfirina IX (CoPPiX) e zinco protoporfirina IX (ZnPPiX).

### **3.5. Obtenção de tecidos**

Para a obtenção de tecidos para diversas análises, posteriormente descritas, animais controle e infectados foram profundamente anestesiados com isoflurano (Abott) por via inalatória. Após a anestesia os animais foram então perfundidos com 5 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (HEMAFARMA) não estéril, para exclusão de leucócitos e hemácias não aderidos aos vasos. O sistema de perfusão continha um escalpe de 26G (BD) acoplado a uma bomba peristáltica (MINIPULS 3-GILSON) que bombeava a salina para o coração do animal, e assim sendo distribuído por todos os vasos. Após a perfusão, a cavidade torácica e peritoneal foram expostas para retirada do pulmão, que foi pesado. O pulmão foi dividido: uma metade do pulmão foi utilizada para análise da razão do peso seco dividido pelo peso molhado após secagem que se deu através de cinco sessões de 30 segundos cada, no aparelho de micro-ondas. A outra metade foi colocado em criotubo e congelado instantaneamente em gelo seco e armazenada a -20°C, para posterior análise de citocinas e western blotting.

### **3.6. Curva de sobrevida**

Os animais foram infectados e acompanhados a parasitemia e a sobrevida até quinze dias após a infecção. Este procedimento foi repetido após o início dos tratamentos.

### **3.7. Lavado broncoalveolar (LBA)**

Os animais foram submetidos à eutanásia pela inalação de isoflurano e procedeu-se a coleta de amostras de lavado broncoalveolar (LBA). Após a eutanásia, foi feita a exposição da traqueia e secção dos músculos adjacentes. Em seguida, foi aberto um pequeno orifício na região proeminente da cartilagem traqueal para a inserção de uma cânula acoplada a uma agulha de 21G (BD). O lavado broncoalveolar foi obtido pela injeção de 1mL de PBS gelado, seguida pela aspiração do conteúdo, sendo este procedimento repetido por 3 vezes. Ao término do processo, recuperava-se um volume aproximado de 0,9 mL do LBA por camundongo. O LBA foi utilizado para contagem total e diferencial de leucócitos e para dosagem de proteínas.

### **3.8. Contagem total e diferencial das células do sangue periférico e do LBA**

A contagem total de leucócitos do sangue periférico e do LBA foi efetuada em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 10X), após diluição das mesmas em solução de Turk. As células de sangue periférico foram diluídas oitenta vezes, e a do LBA foram diluídas cinco vezes. A análise diferencial de leucócitos do sangue periférico foi realizada em distensão sanguínea e do LBA através de citoesfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin3- Shandon – 0,05 g por 5 minutos). Tanto as distensões sanguíneas quanto os citoesfregaços foram corados pelo *kit* Panótico (Laborclin), através de imersão por um minuto em cada uma das soluções que compõe o *kit*. Foram contados 100 leucócitos consecutivos tanto citoesfregaço quanto na distensão sanguínea em microscópio de luz, com objetiva de imersão em óleo (aumento de 100X). O valor absoluto de cada tipo de leucócito tanto no sangue periférico quanto no LBA foi calculado a partir da porcentagem diferencial em relação ao número total de leucócitos.

### **3.9. Dosagem de proteínas pelo método do BCA (Pierce)**

Para dosagem de proteínas, o LBA foi centrifugado a 0,2 g por 5 minutos, e o sobrenadante foi alíquotado e utilizado no método de BCA (Pierce). O reagente de trabalho foi preparado juntando-se 50 partes de Reagente **A** e uma parte de Reagente **B**. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir da albumina de soro bovino (BSA) fornecida pelo fabricante. Um total de 25 µL das amostras de sobrenadante de LBA foram adicionadas aos poços contendo 200 µL de Reagente de Trabalho. A placa de fundo chato (Nunc) foi incubada na estufa (Labline) a 37°C por 30 minutos e a leitura das amostras foi realizada a 562 nm no espectrofotômetro (Spectra Max 190-Molecular Devices).

### **3.10. Dosagem de quimiocinas ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA)**

Para as análises de níveis de quimiocinas, metade do pulmão foi homogeneizado em 250 µL de tampão de lise (5M NaCl, 1M Tris, 10% Triton X-100) contendo um coquetel de inibidores de protease (Complete mini EDTA-free /Roche) por trinta segundos, usando o dispersor Ultra-Turrax Disperser T-10 basic (IKA). Após a homogeneização dos tecidos, estes foram centrifugados a 0,2 g por 5 minutos e o sobrenadante foi alíquotado e armazenado a -

20°C. Para realização do ELISA placas de fundo chato (Nunc) de 96 poços para ensaio em volume reduzido foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (50µL/poço) e seladas com filme plástico (tabela 3.9.1). Após incubação overnight a 4°C, as placas foram lavadas quatro vezes com 100µL/poço de tampão de lavagem (PBS/0,05% de Tween® 20) e incubadas por 1 hora com 50µL/poço da solução de bloqueio (PBS +1g de BSA (Sigma Aldrich)) à temperatura ambiente. Em seguida as amostras bem como a curva padrão (50µL/poço) foram diluídas em solução de bloqueio contendo 0,05% de Tween® 20 foram aplicadas na placa (tabela 3.9.1). Após nova incubação overnight a 4°C, as placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção, diluído em solução de bloqueio contendo 0,05% de Tween® 20 (50µL/poço) foi adicionado. Após uma hora de incubação com o anticorpo de detecção (tabela 3.9.1), as placas foram lavadas oito vezes com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (50µL/poço de 25uL de Streptavidina-peroxidase (R&D) em 5mL de Tampão de bloqueio contendo 0,05% de Tween® 20). Trinta minutos após a incubação no escuro, foi acrescida a solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi parada com solução de parada (50µL/poço de 10,65mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), água MilliQ 1L) e a absorbância a 405 nm foi determinada em espectrofotômetro (Spectra Max 190-Molecular Devices).

Tabela 3.10.1: **Anticorpos usados nos ensaios de ELISA**

Citocina	Anticorpo de captura	Primeiro ponto da curva do recombinante	Anticorpo de detecção
CCL-2/MCP-1 (R&D, dual set)	0,2 µg/mL	250 pg/mL	0,05 µg/mL
CCL-5/RANTES(R&D, dual set)	2 µg/mL	2000 pg/mL	0,4 µg/mL

### 3.11. Permeabilidade vascular

Para análise da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, controle e infectados foram anestesiados com isoflurano (Abott) e submetidos a uma injeção intravenosa de 2% de azul de Evans (Sigma) em 100 µL PBS. Após 1 hora, os animais foram anestesiados e perfundidos conforme descrito anteriormente. Os tecidos foram retirados e deixados por 18 horas em 4mL de solução de formamida (VETEC) na estufa (REVCO Technologies modelo RC03000TVBB) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, para extração do corante, um total de 200 µL do corante extraído foi adicionado a placa de fundo chato (Nunc). Uma curva padrão iniciando-se em 40µg/mL do corante azul de Evans (Sigma) em formamida (VETEC) foi construída através de

diluições seriadas, e aplicada na placa em duplicata. A leitura das amostras foi realizada a 620 nm no espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra Max 190).

### **3.12. Análises histológicas**

Animais controles e infectados foram anestesiados com isoflurano (Abott) e submetidos a perfusão com solução salina conforme descrito anteriormente. O pulmão foi retirado e deixados na formalina 3,7% a 4°C. O processamento histológico foi realizado através de desidratação em série alcoólica crescente de etanol passando por álcool 80%, 85%, 90%, 95% e etanol absoluto. Posteriormente, foi realizada diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina a 56 °C. Os blocos foram cortados em micrótomo à espessura de 5 µm e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para análise morfológica. Os cortes histológicos foram fotografados em microscópio Olympus BX41 acoplado a sistema fotográfico, no aumento de 200 vezes.

### **3.13. Citometria de fluxo**

#### **3.13.1. Contagem de Plaqueta**

Para realização da contagem de plaquetas no sangue periférico foram retirados 2 µL de sangue da cauda dos animais. Este sangue foi transferido imediatamente para uma solução contendo 47 µL de solução tamponada HT (Hepes 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 mM, albumina de soro bovino 0,35 %, glicose 5,5 mM, pH 7,4), 1 µL de solução ácido citrato dextrose- ACD (ácido cítrico 8 g/L, citrato de sódio 22,4 g/L, glicose 2 g/L, pH 5,1) e 0,5 µL de anticorpo anti-CD41a marcado com fluoróforo APC (BD Pharmingen), seguindo-se incubação por 30 minutos, protegido da luz. Após a incubação foi adicionado 250 µL da solução de lise (FACS lysing - BD), e as amostras foram incubadas por mais 10 minutos a temperatura ambiente, sendo em seguida armazenadas na geladeira até o momento da leitura. Para leitura no citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD), foi utilizado 40 µL de *beads* (SPHEROTM AccuCount Particles- *Spherotech, Inc.*) de tamanho conhecido e 40 µL da solução que contém o sangue dos animais. As beads são maiores que as plaquetas e utilizadas num volume conhecido, além de não apresentam fluorescência, permitindo assim a identificação e quantificação das plaquetas. As análises foram realizadas utilizando o programa Cell Quest (BD).

### **3.13.2. Agregação Plaquetária**

Para realização da análise da agregação plaquetária, 100µL do sangue periférico dos animais foi obtido por punção cardíaca, utilizando agulha de 21G, contendo 20 µL da solução anticoagulante composta por tampão PSG (pipes 5mM, NaCl 145 mM, glicose 5,5 mM, KCl 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 µM, pH 6,8), 10 U/mL heparina (Hepamaxs-Blau) e 0,5 µM prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>, Cayman Chemical). Este sangue foi transferido imediatamente para 2,4 mL de solução anticoagulante. Para as análises 50 µL da suspensão foram utilizados para cada marcação. Para a análise da agregação de plaquetária as plaquetas foram marcadas com 0,5 µL de anti-CD41a (BD Pharmingen) marcado com fluoróforo APC; os monócitos com 0,8 µL de anticorpo anti-CD14 marcado (BD Pharmingen) com fluoróforo PE, as hemácias com 0,8 µL de anticorpo anti-TER119 marcado (BD Pharmingen) com fluoróforo PE, e os neutrófilos com anti-Ly6G marcado com fluoróforo PE e 0,6 µL anti-CD11b marcado (BD Pharmingen) com fluoróforo PE-Cy7. Foi utilizado neste trabalho os seguintes isotipos controles: 0,5 µL de IgG1 rato anti-mouse APC, 0,8 µL de IgG1 rato anti-mouse PE, e 0,6 µL de IgG2b rato anti-mouse PE-Cy<sup>TM</sup>7. As amostra foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz. Após a incubação foi adicionado 250 µL da solução de lise (FACS lysing-BD), e incubadas por mais 10 minutos a temperatura ambiente, seguindo-se o armazenamento na geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD). As análises foram realizadas utilizando o programa Cell Quest (BD).

### **3.14. Análise da Plaquetopoiese**

Para a análise da plaquetopoiese, amostras de medula de animais foram obtidas a partir dos dois fêmures e tíbias através da lavagem com 1mL de solução tamponada HT, utilizando uma agulha de 22G. A lavagem foi feita em placa de petri e o excesso de tampão foi descartado usando pipeta pasteur. O cordão medular foi cortado e aos cortes foram adicionamos 100 µL de solução tamponada HT contendo 5% de soro de camundongo (Jackson Immunoresearch), sendo em seguida transferidos para placa de 48 poços. Posteriormente 100 µL de solução tamponada HT, contendo 5% de soro de camundongo e 1µL da sonda antiCD41a (Dylight 488- Emfret Analytics Product) foram adicionados, acompanhado por incubação de 3 horas na estufa a 37°C. Após a incubação, foi feita a visualização das amostras em microscópio de fluorescência invertido (Olympus). Foram

capturados 20 campos no aumento de 20X e contado o número de megacariócitos com prolongamentos que é um indicio de plaquetopoiese.

### 3.15. Western Blotting

A partir da dosagem de proteínas, os sobrenadantes do pulmão macerado foram diluídas em tampão Laemmli de forma que fossem adicionados 40 µg de proteínas totais/poço no gel. Em seguida, as proteínas foram desnaturadas através de aquecimento a 100°C por 10 minutos e depois aplicadas no gel. Após o procedimento de desnaturação, aplicou-se 40 µL de cada amostra/ poço no gel. O tampão Laemmli 4x consistiu de solução de Trizma Base (Sigma) 1 M pH 6,8, SDS 8%, glicerol 40 % (Invitrogen), β- mercaptoetanol 20 % (Sigma), azul de bromofenol (Sigma) para colorir e água Milli-Q.

As amostras foram submetidas à eletroforese (em gel de acrilamida 12% para a análise da expressão da enzima HO-1 e de 9% para expressão da subunidade CD41, 1,5 mm, BioRad) com a aplicação de 125 V por uma hora e meia e em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM (Merck), glicina 192 mM pH 8 (ICN Medicals) e 20 % de metanol (Merck) em água Milli-Q). A transferência foi realizada a 100 V por 50 minutos em sistema molhado (BioRad). A solução de salina tamponada por Tris 10 x (TBS) continha Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (Merck), NaCl 150 mM (Merck), em água Mili-Q; e para fazer o TBS 1x bastou-se diluir o TBS 10x em água Milli-Q. Após a transferência, a membrana dcontendo as amostras para análise de CD41a foi incubada por 1 hora com solução bloqueadora de leite a 5 % em TBS/T (adição de Tween 20 a 0,05 %, Sigma). E a membrana para análise da enzima HO-1 foi incubada por 1 hora com solução bloqueadora de BSA a 5 % em TBS/T (adição de Tween 20 a 0,05 %, Sigma).

Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS/T e incubada *overnight* com um dos seguintes anticorpos: anticorpo policlonal de coelho contra anti-CD41a de camundongo (abcam), e anticorpo policlona de coelho contra HO-1 de camundongo (abcam). Para a diluição do anticorpo contra CD41a, utilizou-se a proporção 1:500 em leite desnatado a 5% em TBS/T e para o anti-HO-1 uma diluição de 1:500 em BSA a 5 % em TBS/T (adição de Tween 20 a 0,05 %, Sigma). A membrana que continha as amostras para a análise da expressão de CD41a, o protocolo foi lavar três vezes por cinco minutos com TBS/T e incubada por uma hora e meia com anticorpo de coelho anti-IgG de mouse conjugada à peroxidase (Vector) diluído 10.000 vezes. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos com TBS sem Tween® e imersa numa solução composta por partes iguais de



*SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce) e SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer Solution (Pierce)* por 20 minutos. Após este período, o excesso de solução foi removido e a membrana foi encerrada em um cassete contendo um filme (Kodak) fotossensível para revelação. Já membrana que continha às amostras para a análise da expressão de HO-1, o protocolo foi lavar três vezes por cinco minutos com TBS/T e incubamos por 30 minutos com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho acoplado a fluoróforo (IRDye 680-RD) diluído 20.000 vezes. Após a incubação foi realizada a revelação no equipamento Odssey Clx (Uniscience).

O controle de carregamento foi feito pela detecção da expressão de  $\beta$ -actina. As duas membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com TBS/T. As membranas ficaram incubando por 15 minutos na solução de stripping (Uniscience), depois foram realizadas mais três vezes lavagens por cinco minutos com TBS/T. As membranas foram então bloqueadas por 30 minutos e então foi adicionado anticorpo primário de coelho anti- $\beta$ -actina de camundongo (Sigma) por 30 minutos, a temperatura ambiente no agitador (Labline). Após este período foi realizada novamente três lavagens por cinco minutos com TBS/T, seguindo-se a incubação por 30 minutos com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho acoplado a fluoróforo (IRDye 800-RD) diluído 20.000 vezes e a revelação no aparelho Odssey Clx (Uniscience).

### **3.16. Análises estatísticas**

Na primeira parte deste trabalho, enquanto foi realizado a padronização do modelo e as análises plaquetárias foi utilizado o teste estatístico de “t” student. Os resultados obtidos utilizando os tratamento analisados utilizando o teste one-way-ANOVA, com pós teste Newman-Keuls Multiple Comparison. Os valores de  $p \leq 0.05$  foram considerados significativos. Nas curvas de sobrevida foi usado o teste Log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon tests. Todos os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média (SD).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. A infecção por *Plasmodium berghei* NK65 causa parasitemia e alta taxa de mortalidade em animais C57Bl/6.

O primeiro parâmetro que fomos avaliar foi se a infecção com *P. berghei* NK65, era capaz de gerar o fenótipo de infecção esperado em camundongos da linhagem C57Bl/6. Van den Steen e cols. (2010) utilizou o mesmo modelo empregado neste trabalho, e demonstraram que com oito dias de infecção já ocorre o desenvolvimento da injúria pulmonar desencadeada pela malária, com uma taxa de sobrevivência em torno de 10% após o décimo segundo dia, sendo este o intervalo para o desenvolvimento da malária pulmonar. Tendo como base a literatura realizamos tanto esfregaços sanguíneos quanto a análise da sobrevivência até o décimo quinto dia de infecção. Com relação à análise do esfregaço sanguíneo, quantificamos o percentual de hemácias parasitadas, e observamos um aumento da parasitemia a partir do quinto dia de infecção, seguido por um aumento gradativo até o décimo segundo dia, último dia analisado (figura 4.1.1-A).

A segunda análise feita foi o percentual de sobrevivência apresentado pelo grupo infectado (figura 4.1.1-B). Percebemos que os animais infectados começaram a morrer no nono dia de infecção. A maior mortalidade foi vista entre nove e doze dias após a infecção, sendo a taxa de sobrevivência ao final do período de observação entre 10-20%, o que confirma os dados da literatura.

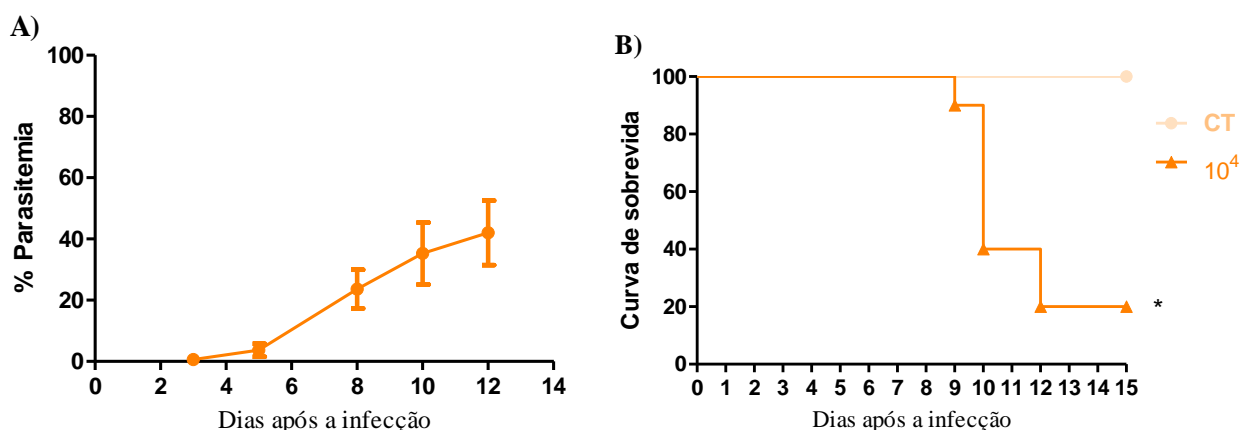


Figura 4.1.1: **Parasitemia e curva de sobrevivência na infecção com *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com 10<sup>4</sup> hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10<sup>4</sup> hemácias parasitadas (HP), e foram realizadas distensões sanguíneas para análise da parasitemia. Em A, parasitemia dos animais. Em B, curva de sobrevivência. Gráficos representativos de três experimentos, sendo cada linha a média de dez animais por grupo experimental; (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados.

#### **4.2. A infecção por *P. berghei* NK65 induz migração de células para o espaço alveolar**

A migração e o recrutamento leucocitário representa um importante mecanismo da resposta imunológica inata (Matute-Bello e cols., 2011). Após a obtenção do lavado brônquio alveolar (LBA), nos dias oito e dez após a infecção foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos. Constatamos que após oito dias de infecção houve uma intensa migração de células, que se manteve alta também dez dias após a infecção (figura 4.2.1-A). A análise da contagem diferencial nos mostrou que o tipo celular mais preponderante foi o das células mononucleares (figura 4.2.1-B). Enquanto o número de polimorfonucleares não sofreu alterações significativas quando comparados com o observado para os animais não infectados (figura 4.2.1-C).

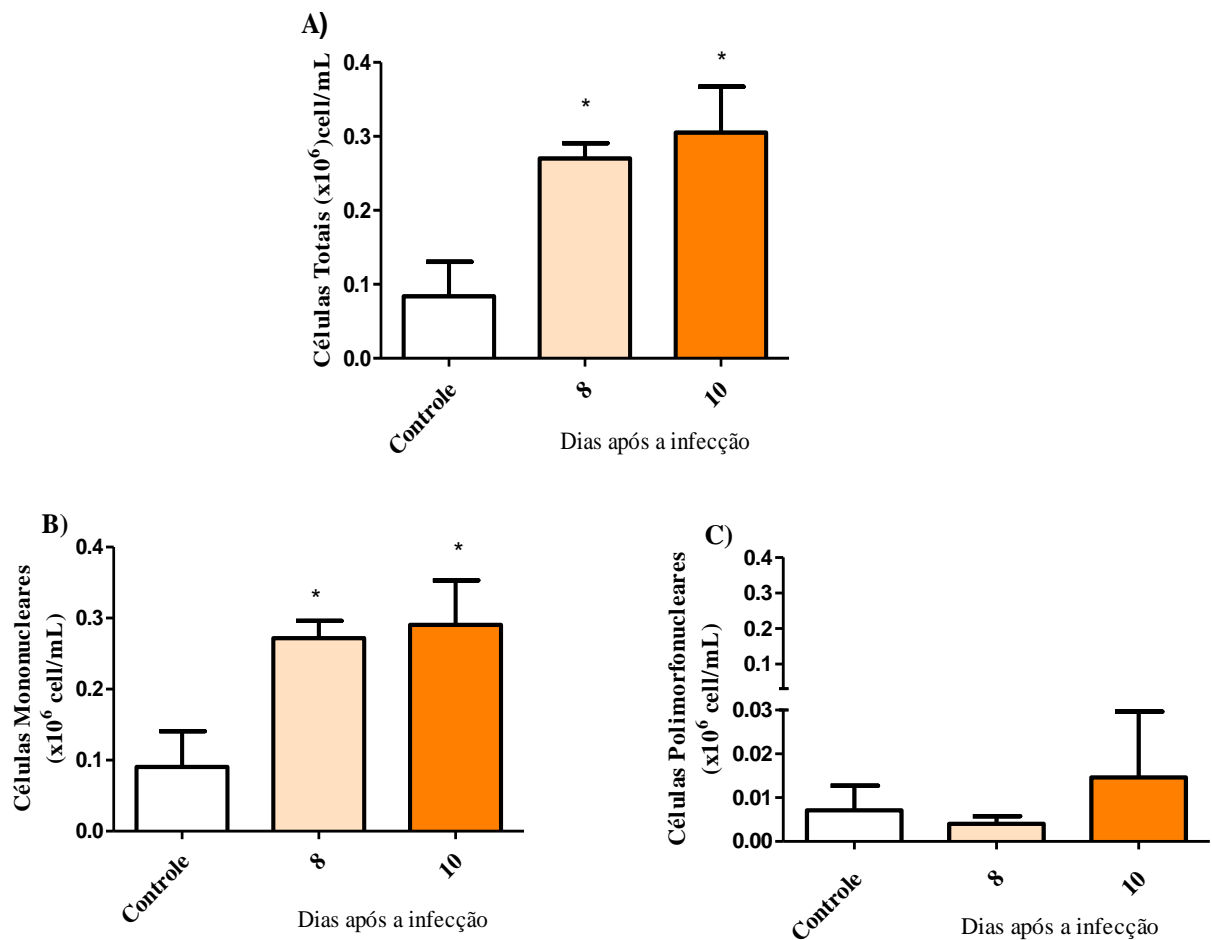


Figura 4.2.1: Número de leucócitos (mononucleares e polimorfonucleares) no LBA dos animais infectados por *P. berghei* NK65. Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p.  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou  $10^4$  hemácias parasitadas (HP), e foram eutanasiados oito ou dez dias após a infecção. O LBA foi coletado e o número total e diferencial de células foi contado. A contagem de célula total foi realizada na solução de Turk, e o diferencial por citoesfregaço da amostra, corado por Panótico. Em A, número de células totais. Em B, número de células mononucleares. Em C, número de células polimorfonucleares. Gráfico representativo de três experimentos, sendo cada barra a média de cinco animais; (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados.

### 4.3. A infecção por *P. berghei* NK65 desencadeia infiltração leucocitária no tecido pulmonar

A literatura demonstra que a injúria pulmonar associada à malária é desencadeada por um processo inflamatório intenso, aliado a uma grande migração celular (Anstey e cols., 2002). Para confirmarmos se a migração celular vista no LBA era acompanhada por migração de células no parênquima pulmonar, analisamos cortes histológicos dos animais infectados e dos seus respectivos controles. Escolhemos estudar o nono dia de infecção por ser o momento que inicia a mortalidade dos animais em decorrência da infecção, e também porque já foi demonstrado haver formação de edema pulmonar com extravasamento de proteínas para o LBA a partir do oitavo dia de infecção (Van den Steen e cols., 2010).

Os cortes histológicos de tecido pulmonar foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina. Na figura 4.3.1-A, temos a fotomicrografia dos pulmões dos animais controles, enquanto na figura 4.3.1-B observamos na fotomicrografia que o pulmão do animal infectado, apresenta um intenso infiltrado inflamatório.

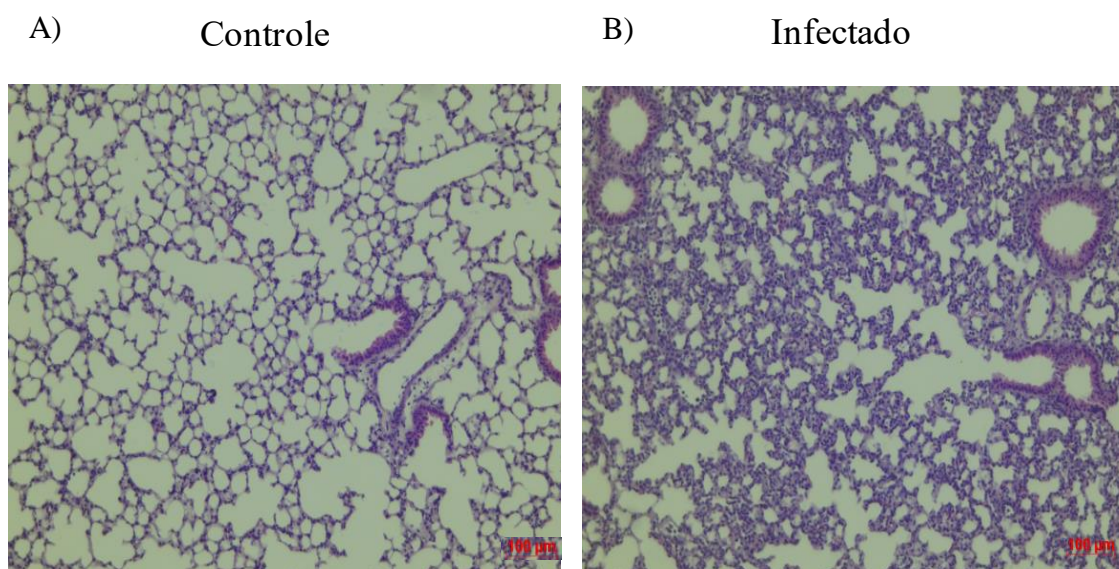


Figura 4.3.1: **Análises histológicas de pulmão de animais infectados com *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP) e foram eutanasiados nove dias após a infecção. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As fotomicrografias mostram intenso infiltrado celular nos animais infectados (B) quando comparado com os animais controle (A). Os padrões demonstrados nas fotos são representativos de três experimentos, contendo cinco animais cada. Aumento de 10X. Barra indicativa de tamanho de  $100\mu\text{m}$  no canto direito inferior das fotomicrografias.

#### **4.4. A infecção por *P. berghei* NK65 induz a formação do edema pulmonar**

Muitas doenças pulmonares, durante seu estabelecimento e formação do quadro inflamatório, levam a alterações estruturais importantes, como formação de edema, acúmulo de infiltrado inflamatório e produção de muco (Churg e cols., 2005). Sabendo disso, após a perfusão, os pulmões foram pesados. Na figura 4.4.1-A observamos que após nove dias de infecção, os animais infectados apresentaram peso pulmonar total mais elevado quando comparado ao seu controle. Em seguida examinamos a razão entre o peso seco e o peso molhado após a secagem do exudado e vimos que nos animais infectados a razão era maior, demonstrando que os animais infectados apresentavam uma maior quantidade de líquido no pulmão (figura 4.4.1-B).

Outra forma de análise de formação de edema muito usual é a quantificação do exsudado protéico no lavado broncoalveolar (LBA). A avaliação de proteínas no LBA é utilizada como marcador de disfunção da barreira alvéolo-capilar e de injúria pulmonar aguda (Guidot e cols., 2006; Ware and Matthay, 2001). Após nove dias de infecção, o LBA foi coletado e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas. Como mostrado na figura 4.4.1-C, observamos que os animais após a infecção, apresentam um grande extravasamento de proteínas em relação ao controle, confirmando que os pulmões dos animais infectados apresentavam formação de edema.

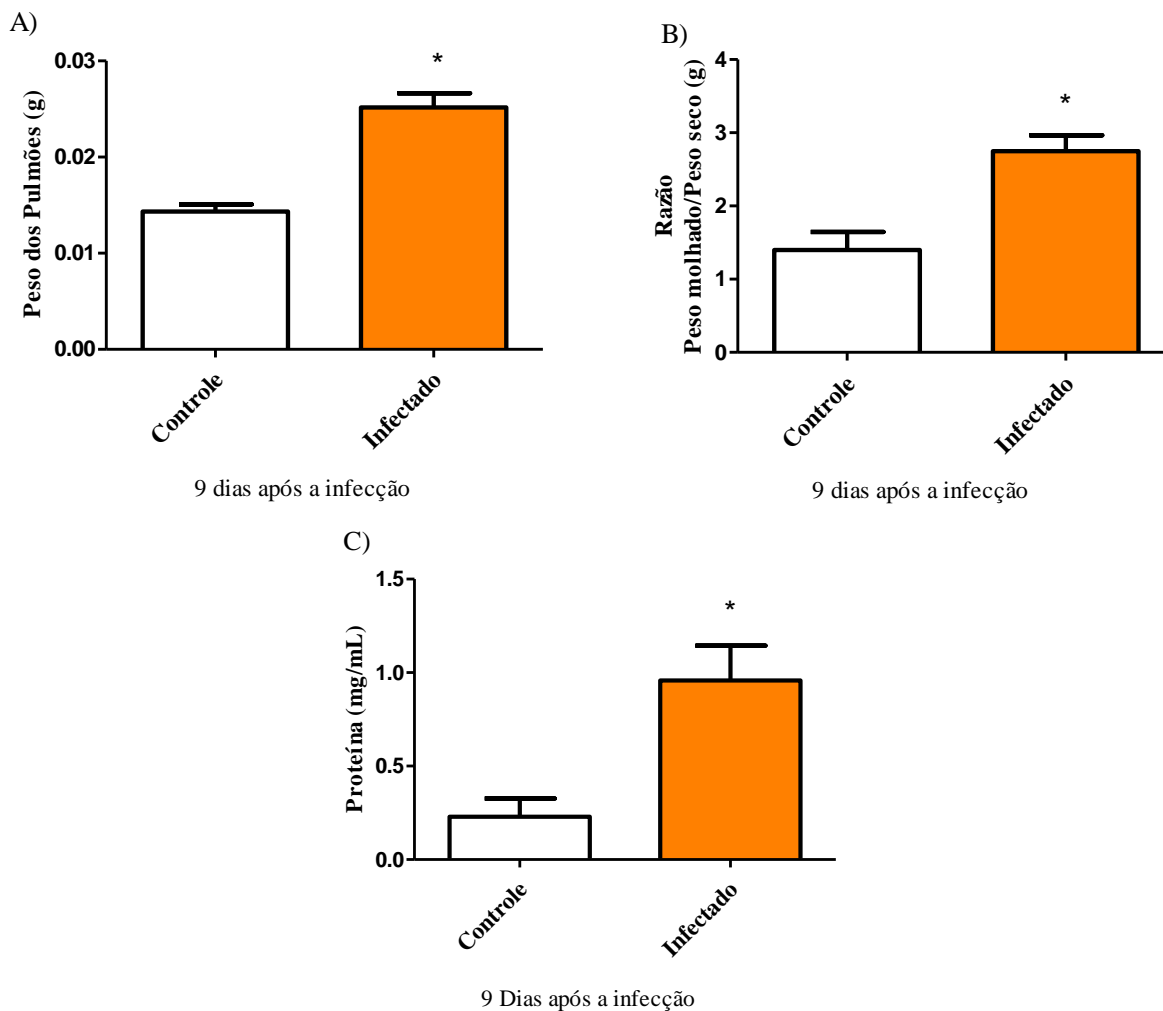


Figura 4.4.1: **Formação de edema pulmonar na infecção por *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP), e foram eutanasiados nove dias após a infecção. Em A, peso total dos pulmões. Em B, razão entre peso molhado e peso seco dos pulmões. Em C, concentração de proteínas no LBA. Gráficos representativos de três experimentos; sendo cada barra a média de cinco animais; (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados.

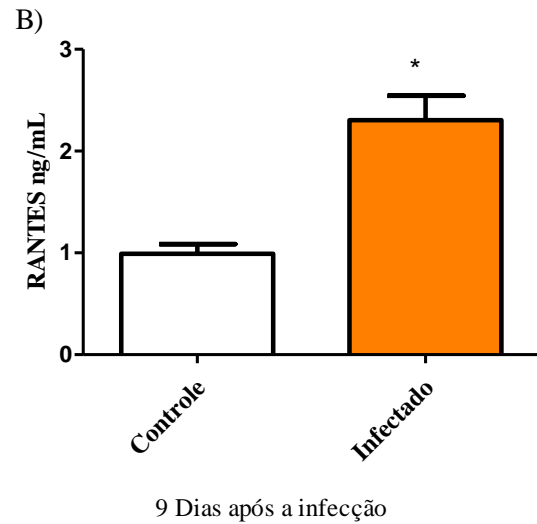
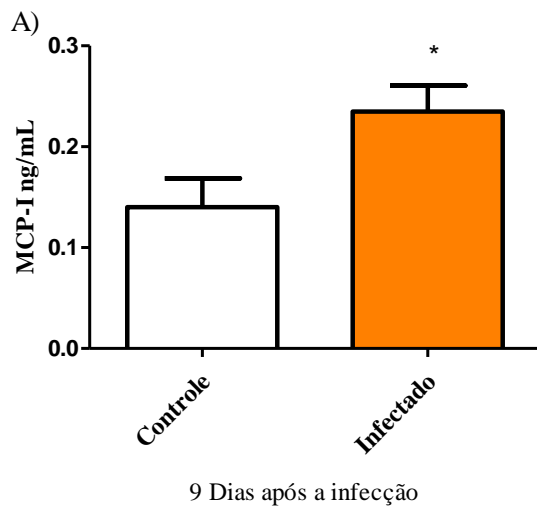
#### **4.5. Infecção por *P. berghei* NK65 induz a liberação de quimiocinas no LBA e no Pulmão**

A produção/ liberação de citocinas e quimiocinas, está descrito na literatura como um importante evento no curso da doença causada pelo *Plasmodium* sp. e principalmente nas manifestações graves decorrentes da infecção, como a malária cerebral (Clark and Rockett, 1994; Randall and Engwerda, 2010). Desta forma, resolvemos investigar se a infecção com *P. berghei* NK65 poderia alterar o padrão de produção de algumas quimiocinas importantes na malária.

O pulmão e o LBA foram recolhidos nove dias após a infecção para processamento e análise de quimiocinas pelo método de ELISA. Podemos observar na figura 4.1.1 que os animais infectados tiveram os níveis das quimiocinas CCL-2/MCP-1 (A e C) e CCL-5/RANTES (B e D) elevados em relação aos seus controles tanto no macerado de pulmão quanto no LBA respectivamente. A análise destes dados nos indica que há um aumento na liberação de mediadores inflamatórios importantes no pulmão em resposta à infecção pelo *P. berghei* NK65.



## Pulmão



## LBA

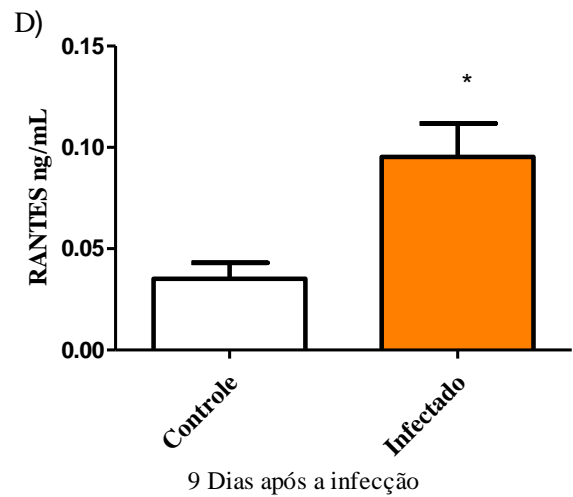
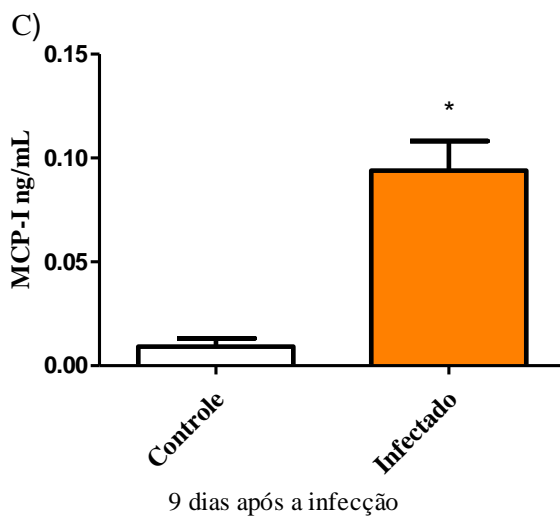


Figura 4.5.1: Nível de quimiocinas no homogenato do tecido pulmonar e no LBA dos animais infectados por *P. berghei* NK65. Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP), e foram eutanasiados nove dias após a infecção. Os pulmões e os LBA foram removidos e processados para ELISA. Em A, CCL-2/MCP-1, no B, CCL-5/RANTES, ambos avaliados no macerado de pulmão. Em C, CCL-2/MCP-1, no D, CCL-5/RANTES, ambos avaliados no LBA. Gráficos representativos de três experimentos, sendo cada barra a média cinco animais; (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados.

#### 4.6. A infecção por *P. berghei* NK65 leva a uma acentuada plaquetopenia

A plaquetopenia é considerada uma manifestação hematológica frequente na malária, tanto por *P. vivax* quanto por *P. falciparum* (Lacerda e cols., 2011). Uma vez que este fenômeno é tão comum na malária clínica, fomos avaliar se em nosso modelo estaria ocorrendo plaquetopenia. Para tanto, retiramos sangue periférico e processamos para análise de citometria.

Observamos que os animais controle apresentaram um número de plaquetas relativamente igual ao longo dos dias. Contudo, quando avaliamos a contagem de plaqueta dos animais infectados, há uma queda significativa no número de plaquetas no nono dia de infecção. Levando-nos a considerar que nosso modelo se assemelha a doença humana no que diz respeito a ocorrência de plaquetopenia.

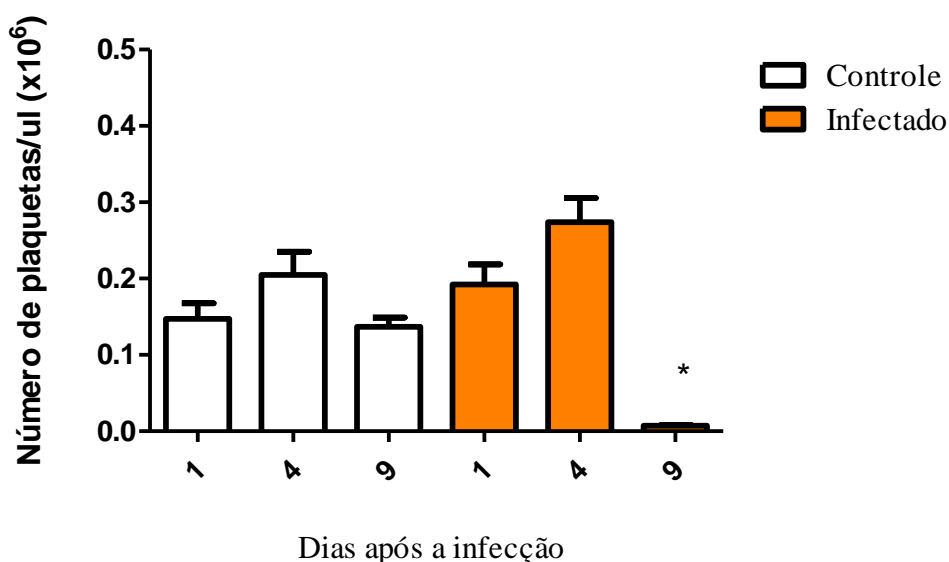


Figura 4.6.1: **Plaquetopenia na infecção por *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com 10<sup>4</sup> hemácias não parasitadas (HNP) ou com 10<sup>4</sup> hemácias parasitadas (HP) e o número de plaquetas circulantes foram analisadas nos dias um, quatro e nove após a infecção. O sangue foi retirado pela cauda e marcado com anticorpo CD41<sup>+</sup> para identificação de plaqueta. Quantidade específica de beads, de tamanho conhecido, foram adicionadas as amostras para quantificação das plaquetas, por citometria. Gráfico representativo de cinco experimentos, sendo cada barra a média de cinco animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais com nove dias de infecção em relação aos animais com quatro dias de infecção.

#### 4.7. Aumento da agregação plaquetária em decorrência da infecção por *P. berghei* NK65

A agregação plaquetária é um fenômeno muito comum e importante nos processos de coagulação (Berndt e cols., 2014). Adicionalmente a agregação de plaquetas a leucócitos tem ganhado importância por sua participação em diversas doenças, como a dengue (Badimon and Vilahur, 2014; Hottz e cols., 2014; Rossaint and Zarbock, 2015; van Es e cols., 2014).

Ao constatar que nosso modelo apresenta uma plaquetopenia acentuada, fomos avaliar se a ativação plaquetária, através de eventos de agregação, estaria influenciando na diminuição da contagem de plaqueta periférica. Observamos, por citometria de fluxo, que no nono dia de infecção as plaquetas estavam agregadas com hemácias (figura 4.7.1-A), com monócitos (figura 4.7.1-B) e com neutrófilos (figura 4.7.1-C). Estes resultados nos sugerem que a infecção leva à ativação e consequente heteroagregação de plaquetas, contribuindo para a subestimação do número de plaquetas na contagem periférica.

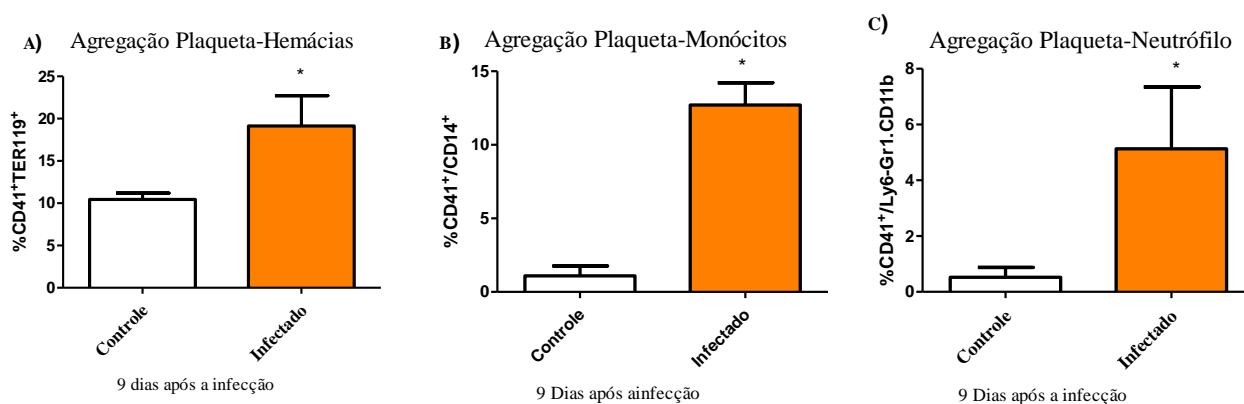


Figura 4.7.1: **Agregação plaquetária na infecção por *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP), e nove dias após a infecção foi feito punção cardíaca dos animais e o sangue foi processado para citometria. Em A, análise da agregação de plaquetas com hemácias através da marcação com CD41<sup>+</sup> e TER119<sup>+</sup>, respectivamente. Em B, análise da agregação de plaquetas com monócitos, através da marcação com CD41<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup>, respectivamente. Em C, análise da agregação de plaquetas com neutrófilos através da marcação com CD41<sup>+</sup> e Ly6-Gr1.CD11b, respectivamente. Gráfico representativo de dois experimentos, sendo cada barra a média cinco animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados.

#### 4.8. Infecção malárica leva à inibição da plaquetopoiese

As plaquetas são provenientes de megacariócitos que são células grandes (50-100 $\mu$ m) encontradas principalmente na medula óssea (Machlus and Italiano, 2013). Diante das observações anteriores e de dados da literatura que mostram uma acentuada plaquetopenia durante a infecção malárica (Lacerda e cols., 2011), fomos analisar se a infecção malárica poderia estar influenciando de alguma maneira o desenvolvimento plaquetário. Escolhemos trabalhar com duas cepas de plasmódio o *P. berghei* ANKA e o *P. berghei* NK65, para tentar identificar se este é um fenômeno realmente comum a infecção malárica.

Observamos que ao infectar os animais com o *P. berghei* ANKA, que também gera complicações pulmonares associadas à malária (de Azevedo-Quintanilha e cols., 2016; Lovegrove e cols., 2008), há uma diminuição da formação de plaquetas tanto quatro (figura 4.8.1- B), quanto seis (figura 4.8.1-D) dias após a infecção em relação aos seus controles não infectados (figura 4.8.1-A e B, respectivamente). As setas demonstram projeções dos megacariócitos nas figuras 4.8.1-A e C, e nas figuras 4.8.1-B e D os megacariócitos sem projeções. Essas projeções são os prolongamentos que originarão plaquetas. Assim sendo, estas observações sugerem uma diminuição na produção de plaquetas desencadeada pela infecção malárica.

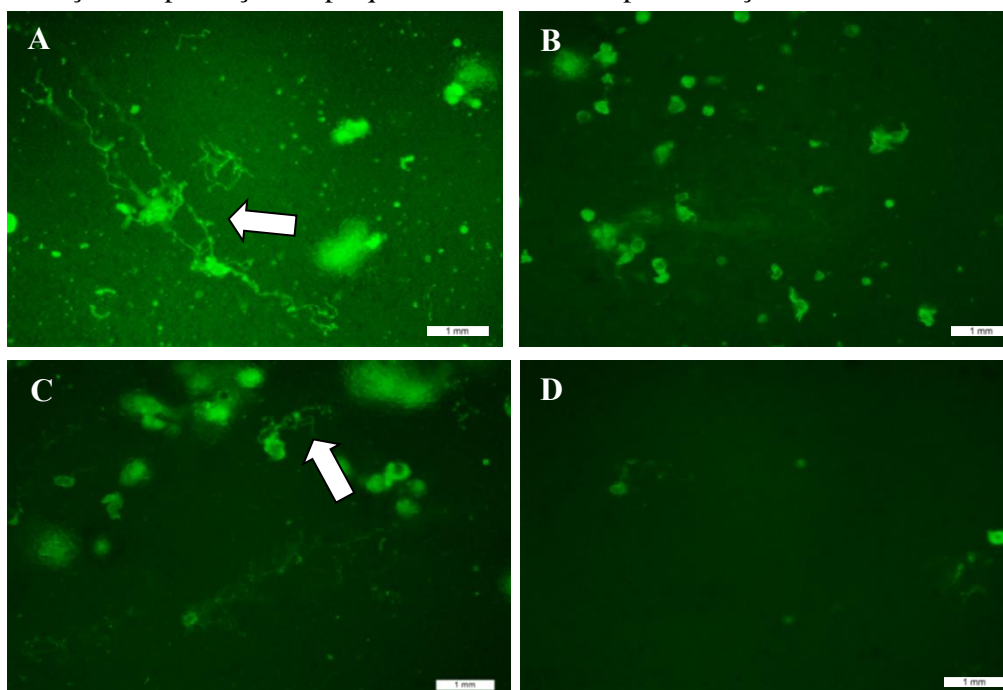


Figura 4.8.1: **Inibição da plaquetopoiese na infecção por *P. berghei* ANKA.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^5$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^5$  hemácias parasitadas (HP) e foi feito o lavado medular quatro e seis dias após a infecção. O lavado medular foi processado, marcado com CD41<sup>+</sup> e analisado em microscópio invertido de fluorescência. As setas indicam megacariócitos com projeções de pró-plaquetas em A e C. Em A, medula de animal controle, quatro dias após a infecção. Em B, medula de animal infectado quatro dias após a infecção. Em C, medula de animal controle, seis dias após a infecção. Em D, medula de animal infectado, seis dias após a infecção. Imagem representativa de um experimento.

Com relação aos animais infectados com o *P. berghei* NK65, que foi a cepa utilizada nas outras análises deste trabalho, escolhemos analisar a produção no sétimo dia de infecção, procurando determinar se o efeito de redução no número de plaquetas no nono dia de infecção seria em resposta a alguma alteração anterior na produção. Observamos que há uma diminuição da formação de plaquetas sete dias após a infecção (figura 4.8.2- B), em relação ao seu controle não infectado (figura 4.8.2-A). Essa menor produção de plaquetas foi quantificada baseada na contagem de megacariócitos com prolongamentos característicos de formação de plaquetas e podemos confirmar no gráfico (figura 4.8.2-C) que os animais infectados apresentam significativamente menos megacariócitos com prolongamentos em relação aos animais controle (setas na figura 4.8.2-A e B). Essas observações sugerem que a diminuição na produção de plaquetas desencadeada pela infecção malárica não é um evento dependente da cepa de plasmódio utilizado na infecção.

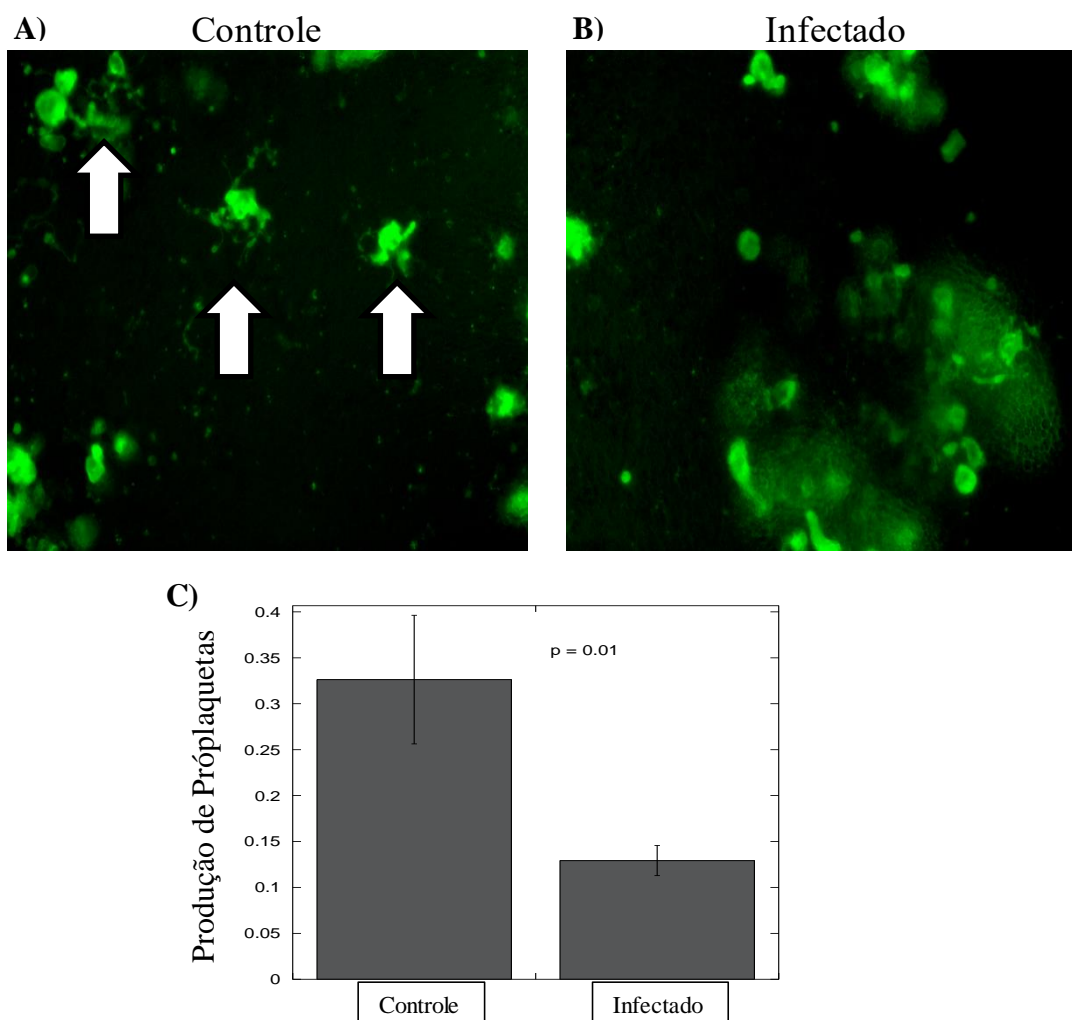


Figura 4.8.2: **Inibição da plaquetopoiese na infecção com *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP), sete dias após a infecção foi feito lavado medular. O lavado medular foi processado, marcado com CD41<sup>+</sup> e analisado em microscópio invertido de fluorescência. As setas indicam megacariócitos com projeções de pró-plaquetas. Em A, medula de animal controle. Em B, medula de animal infectado. Em C, gráfico representativo de dois experimentos, sendo cada barra a média de três animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparados animais infectados em relação aos controles não infectados.

#### 4.9. A infecção por *P. berghei* NK65 pode estar interferindo no número de plaquetas no pulmão

Megacariócitos são rotineiramente observados nos pulmões humanos em exames ou necrópsias forenses, estando seu número aumentado em situações de síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), queimaduras, coagulação intravascular disseminada e trombose. As análises realizadas indicam o pulmão como um sítio importante de plaquetopoiese (Mandal e cols., 2007; Weyrich and Zimmerman, 2013). Fomos então analisar se no pulmão teríamos diferença na quantidade de plaquetas. Realizamos essa análise através da detecção da subunidade  $\alpha$ IIb (CD41) da integrina  $\alpha$ IIbB3 em macerado de pulmão de animais infectados e controle, nove dias após a infecção, pelo método de western blotting. Preliminarmente encontramos que o pulmão dos animais infectados apresentaram menor expressão da subunidade  $\alpha$ IIb (CD41) que os animais controle. Este resultado nos sugere uma menor produção de plaquetas nos animais infectados, mas experimentos adicionais precisam ser feitos para confirmar estes resultados.

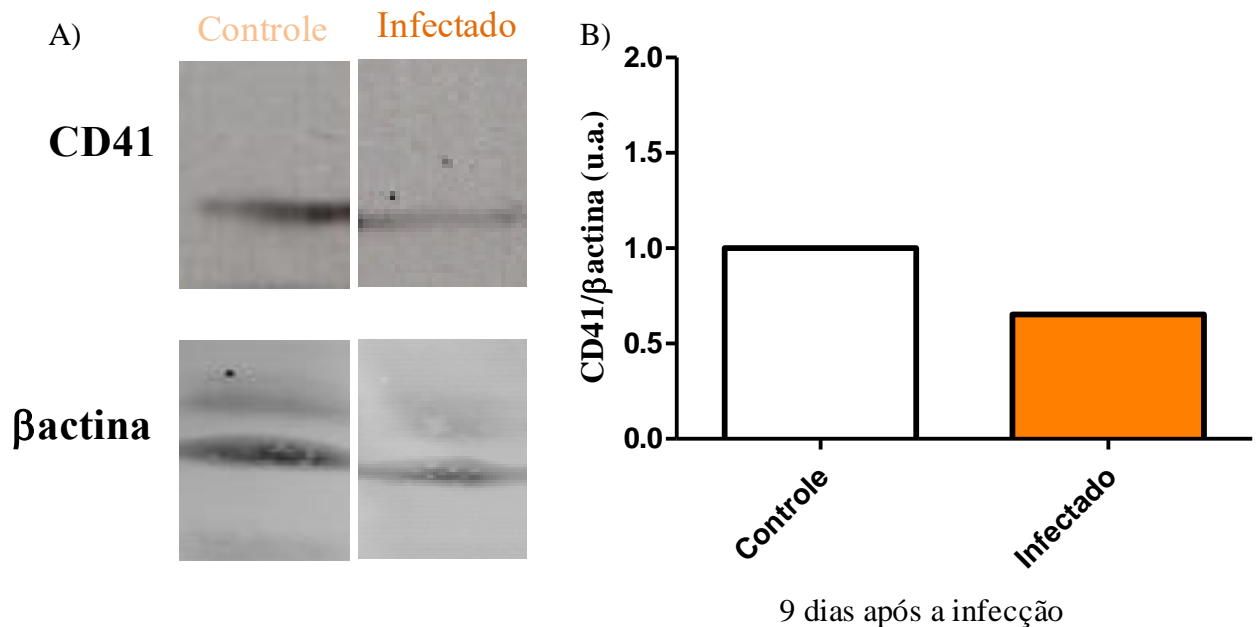


Figura 4.9.1: **Produção de plaquetas no pulmão na infecção por *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP), e nove dias após a infecção foi retirado o pulmão e processado para realização de western blotting. Em A, gel contendo amostra de pulmão macerado de animal controle e animal infectado. Em B, razão entre a densitometria das bandas de CD41 normalizada pela banda de  $\beta$ actina, e dividido pelo controle. Gráfico de um animal.

#### 4.10. A infecção por *P. berghei* NK65 gera aumento na expressão de Heme Oxigenase (HO-1) no pulmão

Sabendo que a heme oxigenase 1 (HO-1) é aumentada nos modelos de malária cerebral e malária não grave murina (Linares e cols., 2013; Pamplona e cols., 2007), e que as manifestações pulmonares ocorrem principalmente após o início do tratamento anti-malárico, quando há uma exarcebção da resposta imune diante da quantidade de PAMPs e DAMPs liberados neste processo (Taylor e cols., 2012), nos perguntamos se em nosso modelo poderíamos ter uma contribuição da enzima HO-1.

Analizamos preliminarmente, através de western blotting a expressão da enzima HO-1 no pulmão dos animais controle e infectados. Observamos que há um aumento da expressão da proteína nove dias após a infecção (figura 4.10.1-A), confirmado pela densidometria das bandas (figura 4.10.1-B). Estes dados sugerem de maneira preliminar que a HO-1 pode ter um papel na injúria pulmonar induzida pela malária.

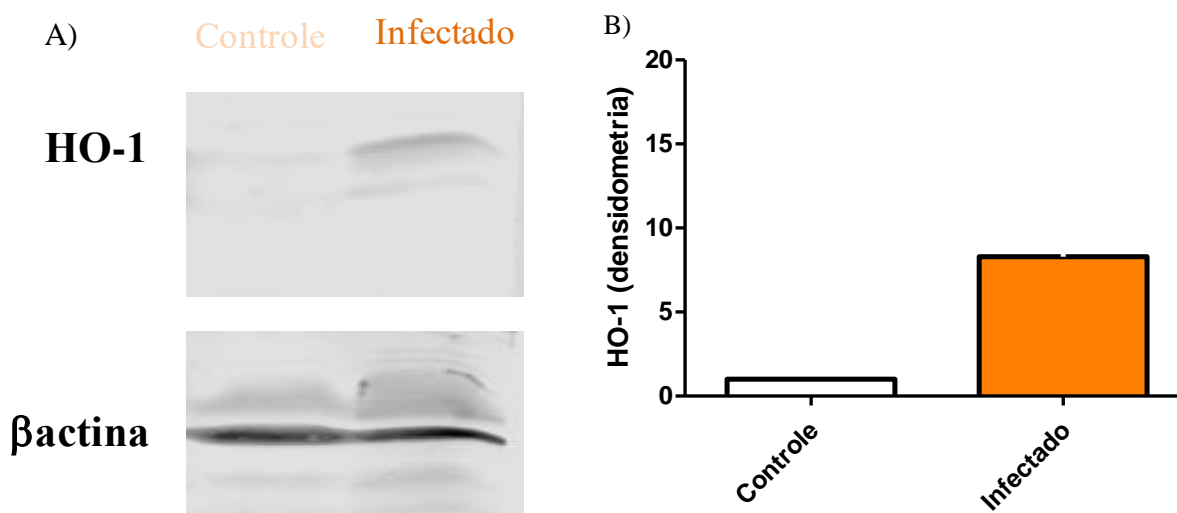


Figura 4.10.1: **Aumento da expressão de HO-1 no pulmão durante infecção por *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP), e nove dias após a infecção foi retirado o pulmão e processado para realização de western blotting. Em A, gel contendo amostra de pulmão macerado de animal controle e animal infectado. Em B, razão entre a densidometria das bandas de CD41 normalizada pela banda de βactina, e dividido pelo controle. Gráfico de um animal.

#### **4.11. O tratamento com o indutor Cobalto Protoporfina IX e com o inibidor Zinco Protoporfirina IX, da atividade da HO-1 não interfere com a parasitemia e com peso corporal dos animais após a infecção**

A HO-1 pode ser induzida por diversos estímulos como já relatado neste trabalho (seção 1.6 da Introdução). Farmacologicamente, existem alguns ativadores e inibidores clássicos que já foram utilizados em trabalhos sobre o papel da enzima HO-1 na injúria cerebral (Pamplona e cols., 2007) e hepática (Dey e cols., 2014) decorrente da infecção malárica. Para confirmar se a HO-1 possui algum papel na malária pulmonar, utilizamos a cobalto protoporfina (CoPPIX) como indutora e a zinco protoporfirina IX (ZnPPIX) como inibidora da atividade da HO-1.

Em nosso trabalho começamos a tratar os animais no dia seguinte à infecção e administramos uma dose diária de 5mg/Kg CoPPIX ou 5mg/Kg de ZnPPIX, por oito dias consecutivos. Observamos que os tratamentos não interferiram com a parasitemia entre os grupos infectados (figura 4.11.1-A). Também não houve diferença no peso corporal dos animais entre os controles tratados, e mesmo os animais infectados perdendo peso não houve diferença entre os grupos. Esses dados nos sugerem que o tratamento não está interferindo com o estabelecimento da infecção.



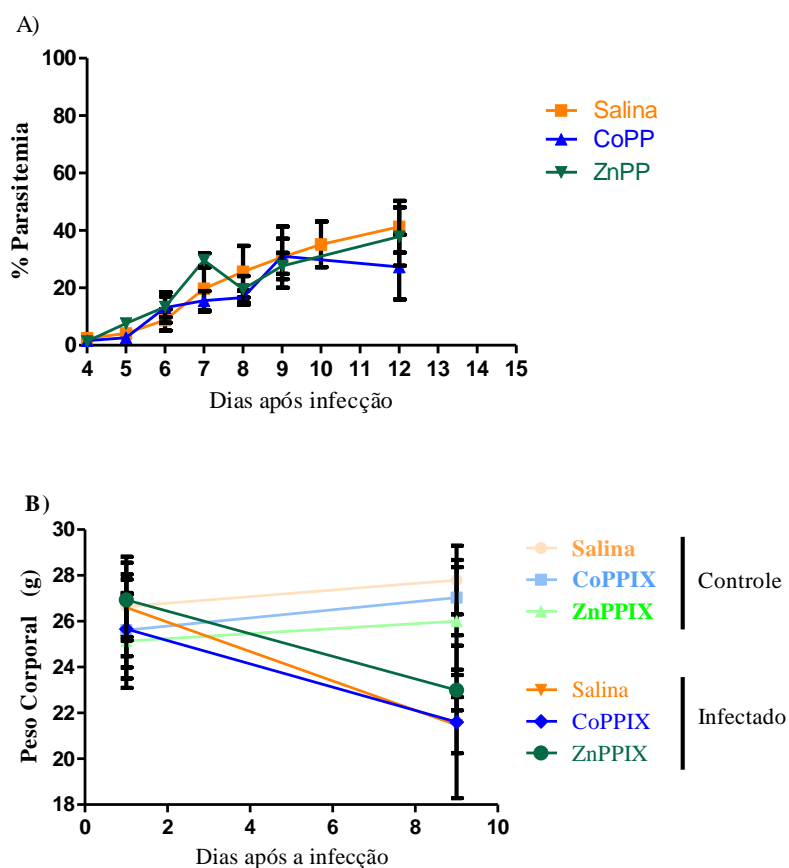


Figura 4.11.1: **Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX no desenvolvimento da infecção malárica.** Animais C57B/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX). Foram realizadas distensões sanguíneas para análise da parasitemia e pesagem dos animais para acompanhamento do ganho de peso. Em A, gráfico da parasitemia dos animais. Em B, gráfico do peso corporal dos animais. Dados obtidos a partir da média de cinco experimentos, vinte cinco animais por grupo experimental.

#### 4.12 O tratamento com CoPPIX protege os animais de sucumbirem de malária pulmonar

A modulação da enzima HO-1 na malária cerebral experimental (Pamplona e cols., 2007) e na injúria pulmonar (Pereira e cols., 2016) demonstrou ser importante na sobrevivência dos animais. Em nosso trabalho observamos que os animais tratados com salina apresentaram uma extensa mortalidade iniciada nove dias após a infecção, com um pico no décimo dia (figura 4.12.1-A), enquanto os animais tratados com ZnPPIX sucumbiram todos até o décimo primeiro dia de infecção (figura 4.12.1-A). Contudo, somente dois animais de dez tratados com CoPPIX morreram entre o décimo primeiro e o décimo segundo dia de infecção (figura 4.12.1-A). Esses dados nos indicam que o tratamento com CoPPIX tem um efeito protetor levando a uma maior sobrevivência dos animais infectados.

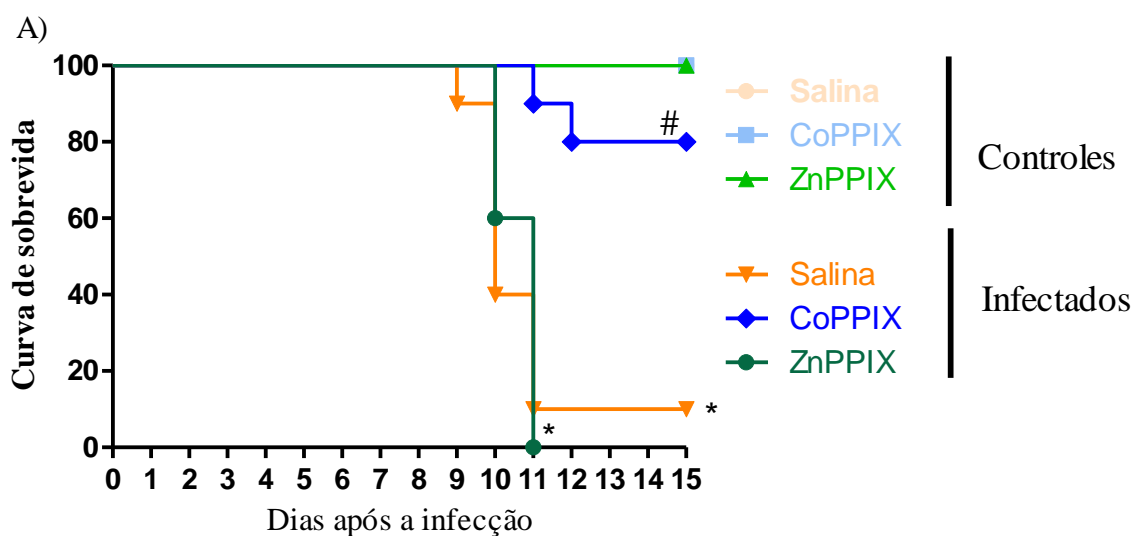


Figura 4.12.1: **Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX na mortalidade desencadeada pela infecção por *P. berghei* NK65.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX). Em A, curva de sobrevivência. Gráfico representativo de um experimento, sendo cada linha a média de dez animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados, e (#) indica  $p \leq 0.05$  animais infectados tratados com CoPPIX em relação aos outros animais infectados tratados com Salina ou com ZnPPIX.

### **4.13. O tratamento com COPPIX leva a uma diminuição da migração celular para o LBA durante a infecção malárica**

Já é descrito na literatura que a atividade da HO-1 interfere com a migração celular (Ha e cols., 2015; Moraes e cols., 2012), principalmente no contexto de doenças inflamatórias. Para confirmar se a atividade da HO-1 estaria interferindo na migração celular, realizamos a contagem de células no LBA. Observamos que há um aumento da migração de células totais para o LBA em todos os grupos infectados em relação aos seus controles (figura 4.13.1-A), nove dias após a infecção.

Contudo, quando analisamos os grupos infectados tratados com o indutor da atividade da HO-1, a CoPPIX, observamos uma migração significativamente menor do que nos grupos infectados não tratados ou tratados com ZnPPIX (figura 4.13.1-A). Não houve diferença significativa entre o grupo infectado não tratado e o grupo infectado tratado com o ZnPPIX (figura 4.13.1-A). Quando analisado os subtipos de leucócitos presentes, observamos uma preponderância de células mononucleares (figura 4.13.1-B) em relação aos polimorfonucleares que não foram observados nos animais infectados (figura 4.13.1-C). Assim como os níveis de leucócitos totais, os de células mononucleares estavam diminuídos nos animais infectados tratados com CoPPIX, quando comparados com os outros dois grupos de animais infectados (figura 4.13.1-B). Este resultado nos indica que o tratamento com o CoPPIX leva a uma menor migração de células inflamatórias para o pulmão dos animais infectados, indicando diminuição do infiltrado.

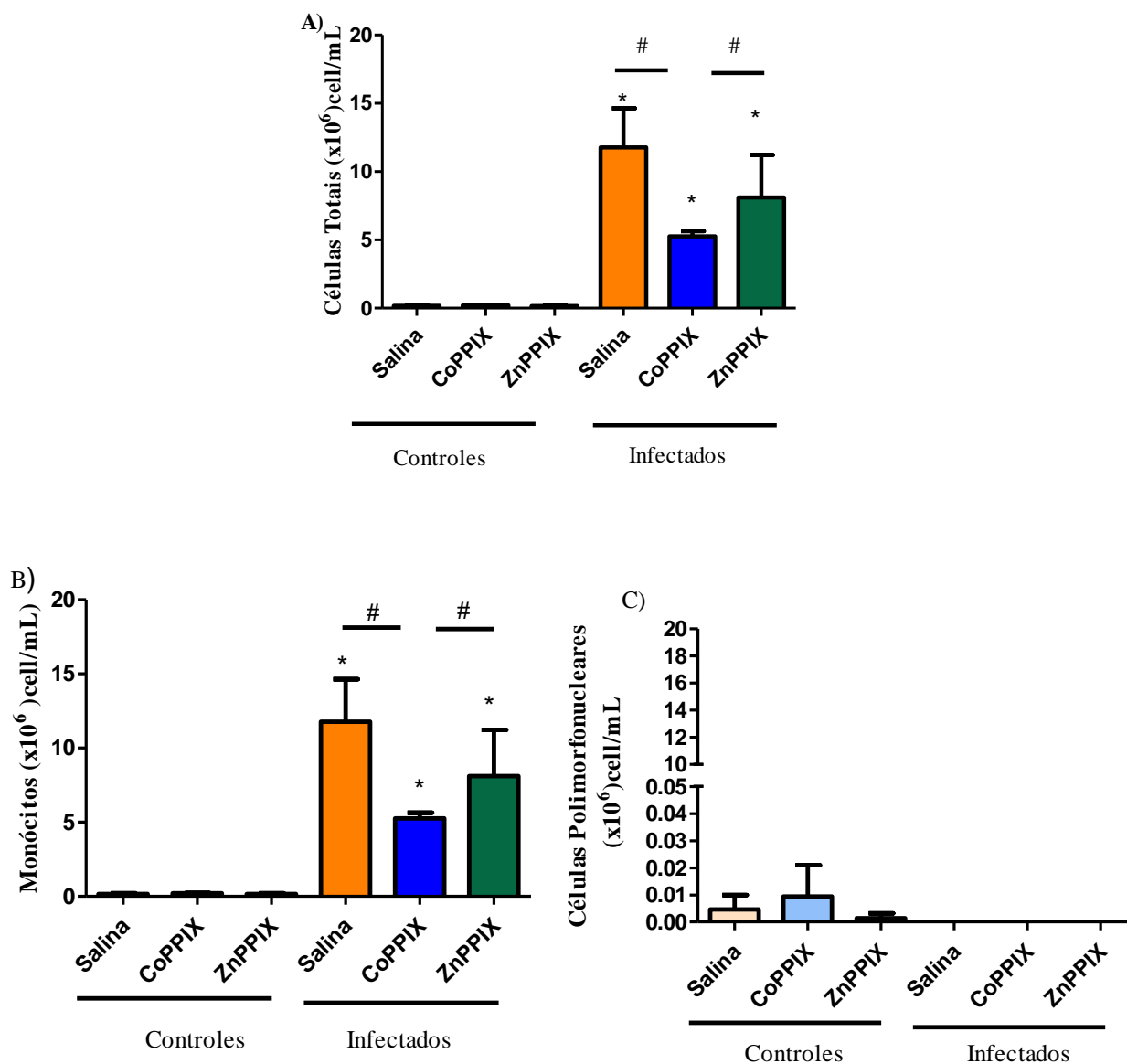


Figura 4.13.1: Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX no recrutamento celular para o pulmão após infecção por *P. berghei* NK65. Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p.  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX) e foram eutanasiado nove dias após a infecção, para coleta do LBA e contagem do número de leucócitos. A contagem de célula total foi realizada na solução de Turk, e o diferencial por citoesfregaço da amostra, corado por Panótico. Em A, número de células totais. Em B, número de células mononucleares. Em C, número de células polimorfonucleares. Gráfico representativo de três experimentos, sendo cada barra a media de cinco animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados, e (#) indica  $p \leq 0.05$  animais infectados tratados com CoPPIX em relação aos outros animais infectados tratados com Salina ou com ZnPPIX.

#### **4.14. O tratamento com CoPPIX leva a um aumento do número de células no sangue periférico durante a infecção malárica**

No resultado anterior observamos que a atividade da HO-1 interferiu na migração celular para o pulmão dos animais infectados. Para analisar como estaria o perfil de migração celular no sangue periférico, realizamos a contagens de leucócitos total e diferencial nove dias após a infecção. Observamos que há um aumento do número de células totais somente no grupo infectado e tratado com CoPPIX, tanto em relação ao seu controle quanto em relação aos outros dois grupos de animais infectados (figura 4.14.1). Este perfil de resposta foi observado também na contagem diferencial de mononucleares (figura 4.14.1-B) e polimorfonucleares (figura 4.14.1-C), sendo o principal tipo celular presente o dos polimorfonucleares. Este resultado nos sugere que o tratamento com CoPPIX leva há uma menor saída de células inflamatórias da circulação periférica dos animais infectados.

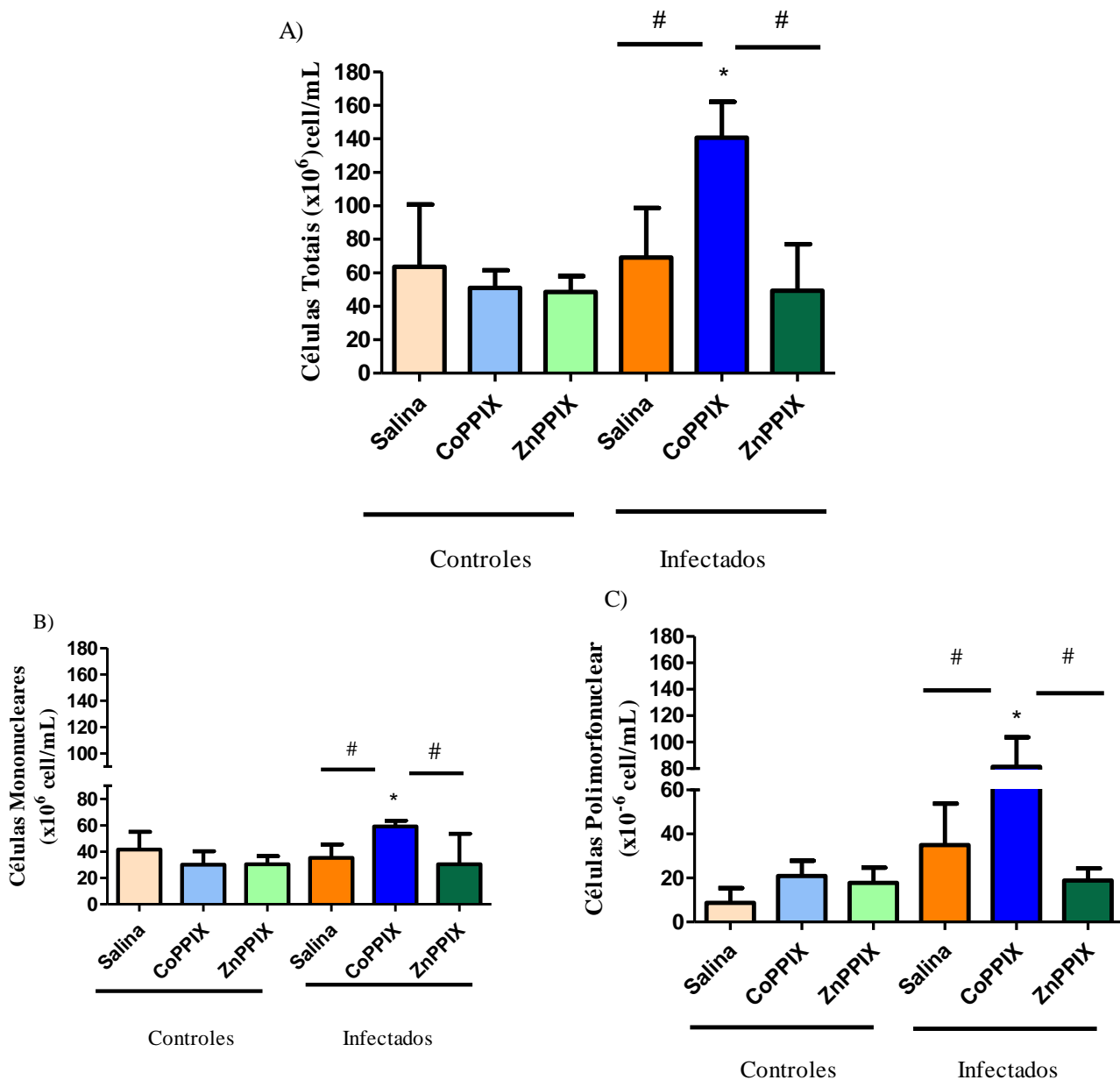


Figura 4.14.1: Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPiX no recrutamento celular no sangue periférico após infecção por *P. berghei* NK65. Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. 10<sup>4</sup> hemácias não parasitadas (HNP) ou 10<sup>4</sup> hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPiX (ZnPPiX) e foram eutanasiado nove dias após a infecção, para realização de punção cardíaca e contagem do número de leucócitos. A contagem de células totais foi realizada na solução de Turk, e o diferencial por distensão sanguínea, corado por Panótico. Em A, número de células totais. Em B, número de células mononucleares. Em C, número de células polimorfonucleares. Gráfico representativo de três experimentos, sendo cada barra a media de cinco animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados, e (#) indica  $p \leq 0.05$  animais infectados tratados com CoPPIX em relação aos outros animais infectados tratados com Salina ou com ZnPPiX.

#### 4.15. O tratamento com CoPPIX diminui o infiltrado leucocitário pulmonar durante a infecção malárica

Dados da literatura demonstram que o aumento da indução da expressão da HO-1 por heme, no modelo de injúria pulmonar associada a malária, desencadeia um processo inflamatório intenso (Pereira e cols., 2016). Em nosso trabalho analisamos macroscopicamente os pulmões, nove dias após a infecção. Observamos que o tratamento com CoPPIX (figura 4.15.1-B) e com ZnPPIX (figura 4.15.1-C) não leva a nenhuma modificação macroscópica em relação ao animal controle tratado com salina (figura 4.15.1-A). Ao analisarmos os pulmões dos animais infectados tratados com salina (figura 4.15.1-D) ou com ZnPPIX (figura 4.15.1-F) observam uma coloração mais escura indicativa de um comprometimento pulmonar mais intenso. Já os pulmões dos animais tratados com CoPPIX apresentaram uma coloração menos escura, indicando um quadro inflamatório mais brando (figura 4.15.1-E).

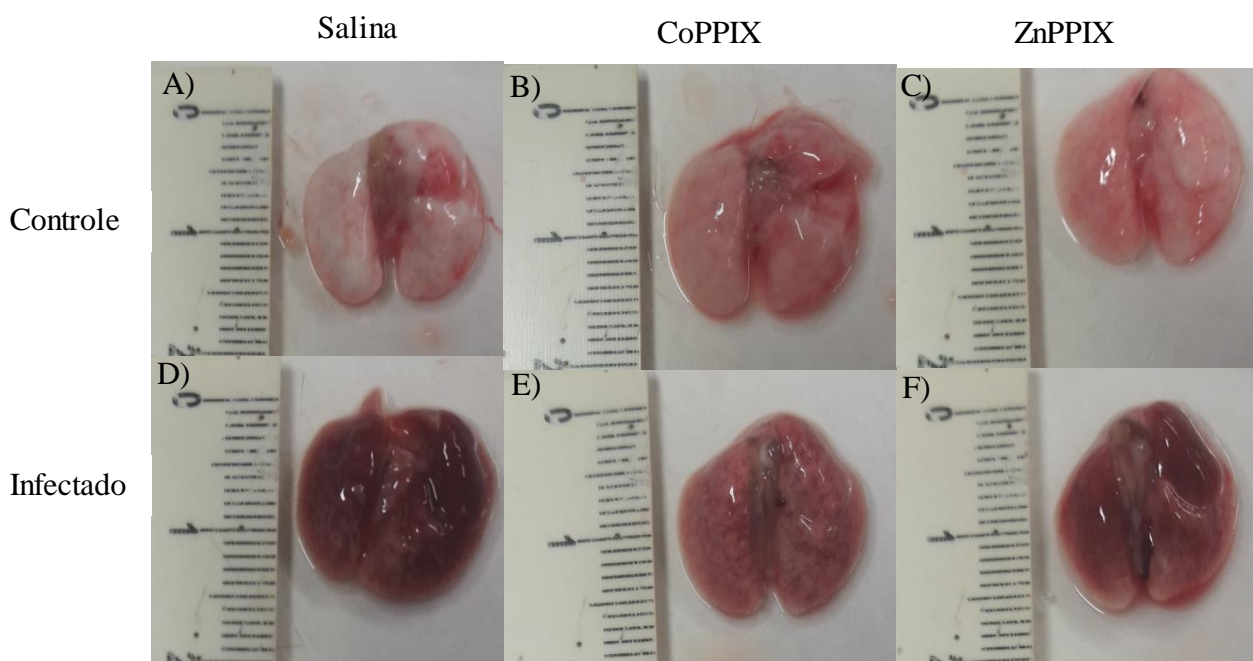


Figura 4.15.1: **Pulmão dos animais tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX) e foram eutanasiados nove dias após a infecção. As fotos mostram em A, Controle Salina. Em B, Controle CoPPIX. Em C, Controle ZnPPIX. Em D, Infectado Salina. Em E, Infectado CoPPIX. Em F, Infectado ZnPPIX. Fotos representativas de cinco animais por grupo experimental, e dois experimentos independentes.

Ao analisarmos as fotomicrografias dos cortes histológicos dos pulmões, observamos o mesmo perfil de resposta encontrado nas análises macroscópicas. O tratamento com CoPPIX (figura 4.15.2-B) e com ZnPPIX (figura 4.15.2-C) não leva a nenhuma modificação em relação ao animal controle tratado com salina (figura 4.15.1-A). Ao analisarmos os pulmões dos animais infectados tratados com salina (figura 4.15.2-D) ou com ZnPPIX (figura 4.15.2-F) encontramos um maior infiltrado celular (demonstrado pela coloração mais intensa) e diversos pontos hemorrágicos (identificados pelas pontas de setas) indicando um comprometimento pulmonar mais intenso. As fotomicrografias dos pulmões dos animais tratados com ZnPPIX apresentam ainda células aderidas a paredes dos vasos pulmonares (identificadas na figura por seta), indicando uma ativação endotelial e sugerindo uma possível obstrução do vaso. Já os pulmões dos animais tratados com CoPPIX apresentaram um infiltrado menos intenso indicando um quadro inflamatório mais brando (figura 4.15.2-E).

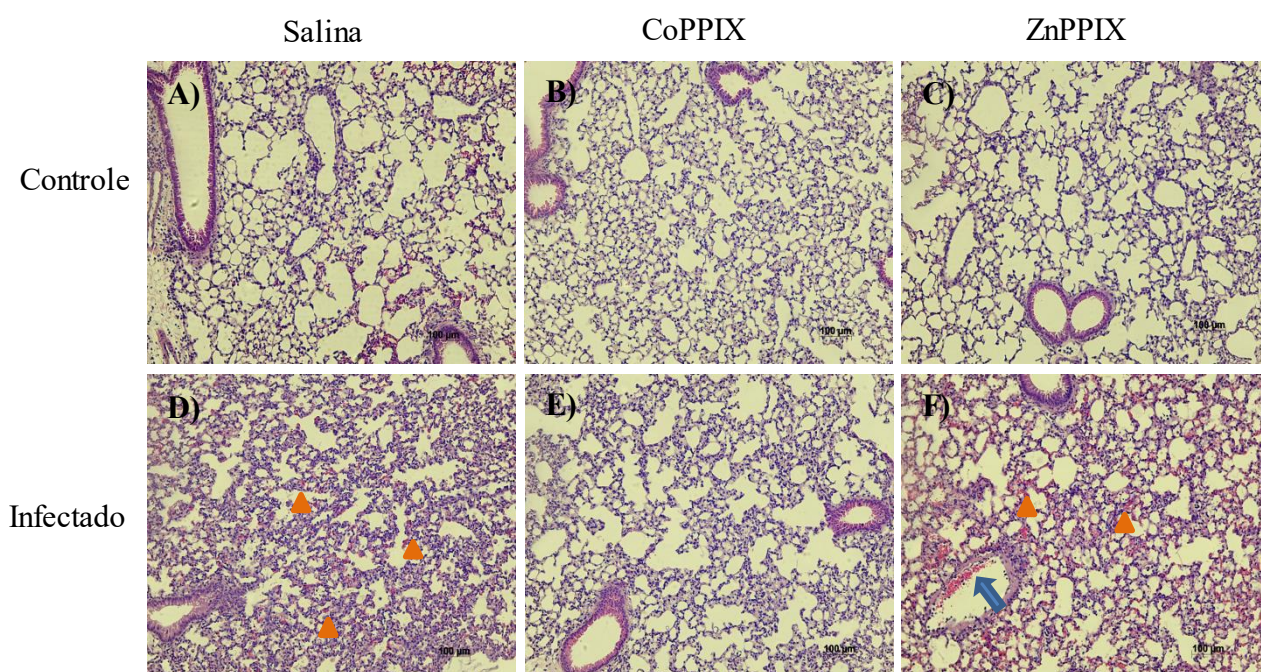


Figura 4.15.2: **Análises histológicas de pulmão de animais infectados por *P. berghei* NK65, e tratados com CoPPIX ou ZnPPIX.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX) e foram eutanasiados nove dias após a infecção. As fotos mostram em A, Controle Salina. Em B, Controle CoPPIX. Em C, Controle ZnPPIX. Em D, Infectado Salina. Em E, Infectado CoPPIX. Em F, Infectado ZnPPIX. Ponta de seta indicando pontos hemorrágicos e seta indicando células aderidas a parede dos vasos. Fotos representativas de 5 animais por grupo experimental, e dois experimentos independentes. Aumento de 10X. Barra indicativa de tamanho de 100µm no canto direito inferior das fotomicrografias.



#### 4.16. O tratamento com CoPPIX interfere de maneira protetora na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar durante a infecção malárica

Nós observamos, nove dias após a infecção, que os animais infectados apresentaram um extravasamento de proteína para o LBA significativo em relação aos seus controles não infectados. Contudo, os animais infectados tratados com CoPPIX apresentaram um extravasamento significativamente menor do que a dos grupos infectados tratados somente com salina ou com ZnPPIX (figura 4.16.1-A). Os grupos infectados salina e ZnPPIX não apresentaram diferença significativa entre eles. Este resultado nos indica que o tratamento com CoPPIX levou a uma menor permeabilidade da barreira alvéolo-capilar.

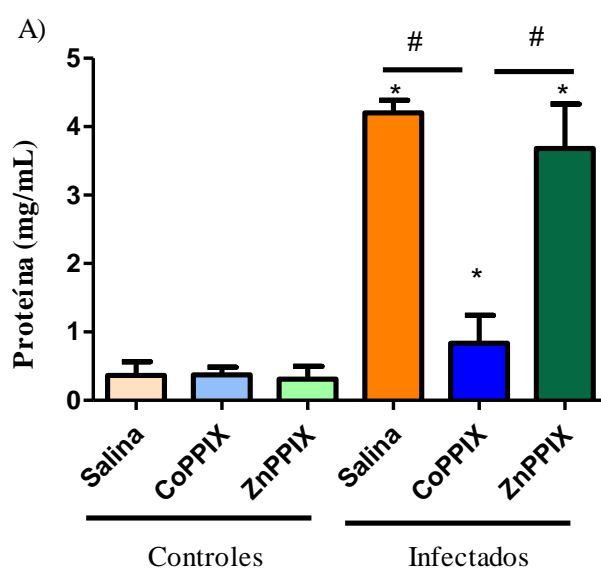


Figura 4.16.1: **Extravasamento de proteína nos animais infectados por *P. berghei* NK65 e tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX) e foram eutanasiados nove dias após a infecção. Em A, gráfico de dosagem de proteínas. Gráfico representativo de três experimentos, sendo cada barra a média de 8-10 animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados, e (#) indica  $p \leq 0.05$  animais infectados tratados com CoPPIX em relação aos outros animais infectados tratados com Salina ou com ZnPPIX.

Para confirmar o nosso resultado de permeabilidade vascular utilizamos o método de azul de Evans. O corante Azul de Evans é utilizado desde 1987 para análise da barreira hemato-encefálica em animais com malária cerebral experimental (Thumwood e cols., 1988). Como observamos na figura 4.16.2-E-G, os animais infectados apresentam uma maior permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, por ter uma grande retenção do corante no tecido em relação aos seus controles (figura 4.16-B-D). Contudo, os animais infectados tratados com CoPPIX (figura 4.16.2-F) apresentaram pouca retenção do corante, em relação aos outros grupos de animais infectados tratados com salina (figura 4.16.2-E) ou com ZnPPIX (figura 4.16.2-G). A quantificação deste resultado é mostrada na figura 4.16.1-A. Estes resultados sugerem que os animais tratados com CoPPIX possuem a barreira alveolar mais íntegra, sugerindo um papel para HO-1 na manutenção da integridade da barreira alvéolo-capilar.

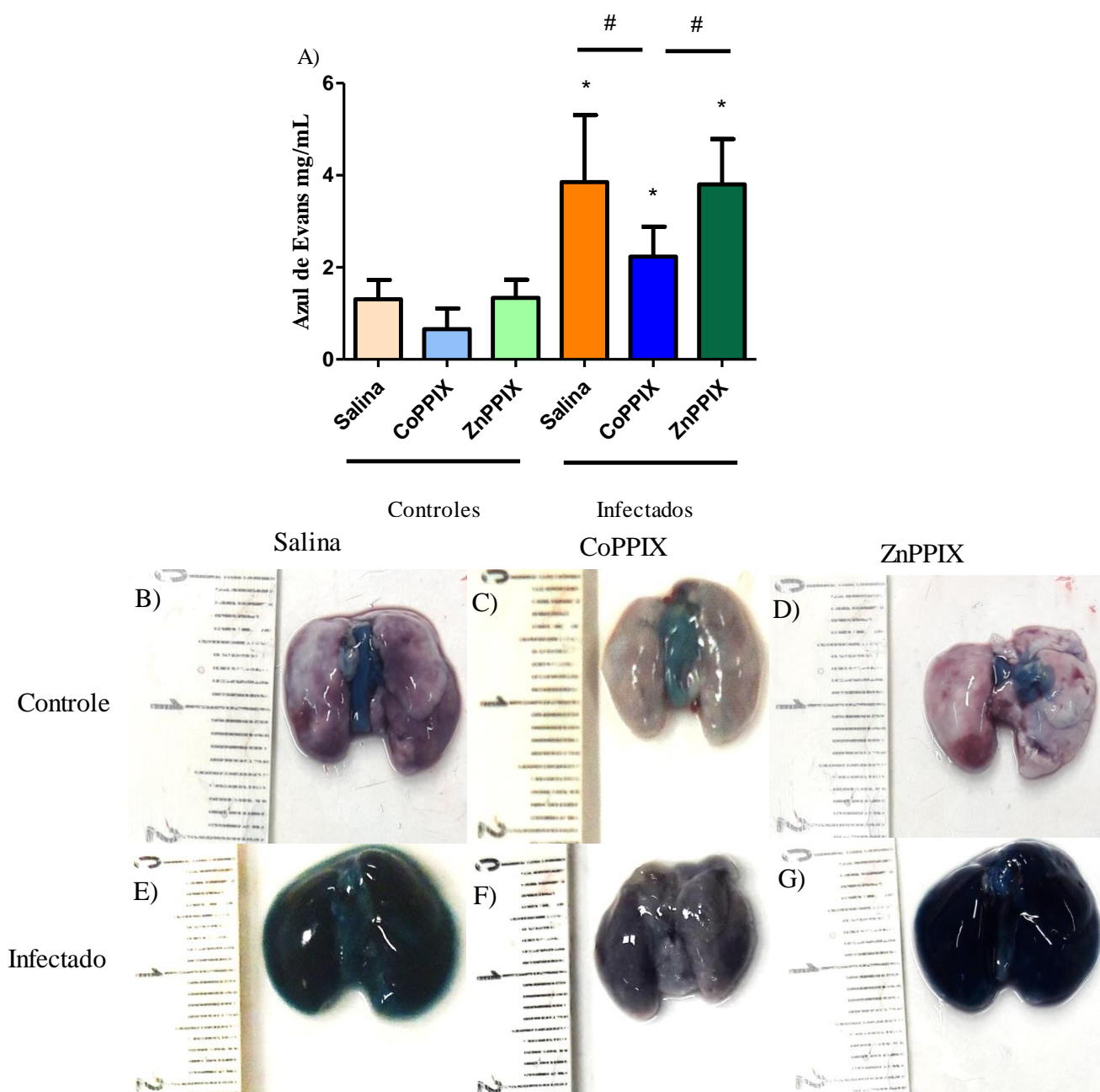


Figura 4.16.2: **Integridade da barreira alvéolo-capilar em animais infectados por *P. berghei* NK65 e tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX) e foram eutanasiados nove dias após a infecção. Em A, Gráfico com o nível de azul Evans extravasado para o tecido. Em B, controle Salina. Em C, controle CoPPIX. Em D, controle ZnPPIX. Em E, Infetado Salina. Em F, Infetado CoPPIX. Em G, Infetado com ZnPPIX. Gráfico A de um experimento, sendo cada barra a média de 8-10 animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados, e (#) indica  $p \leq 0.05$  animais infectados tratados com CoPPIX em relação aos outros animais infectados tratados com Salina ou com ZnPPIX. Fotos representativas de dez animais por grupo experimental, em um experimento independente.

#### **4.17 O tratamento CoPPIX e ZnPPIX não interfere com a liberação de quimiocinas inflamatórias durante a infecção malárica**

O aumento da expressão/atividade da enzima da HO-1 interfere com a produção e liberação de várias citocinas e quimiocinas como TNF, IL-10 e IFN- $\gamma$  e MCP-1 em diversos modelos experimentais e clínicos (Lee e cols., 2016a; Lee e cols., 2015; Yu e cols., 2015). Para analisar se em nosso modelo a HO-1 está interferindo com a liberação de quimiocinas, nós fizemos ELISA do macerado de pulmão, do LBA e do plasma, nove dias após a infecção.

Como esperado observamos um aumento significativo da liberação das quimiocinas CCL-2/MCP-I (figura 4.17.1-A, C e E) e CCL-5/RANTES (figura 4.17.1-B, D e F) após a infecção, em todos os sítios analisados. Contudo, o tratamento com CoPPIX ou ZnPPIX não interferiu com a liberação das quimiocinas induzidas pela infecção em nenhum dos compartimentos analisados. Estes resultados nos indicam que a inibição encontrada por nós na migração de células gerada pelo tratamento com CoPPIX, não parece ser mediada por CCL-2/MCP-I ou CCL-5/RANTES.

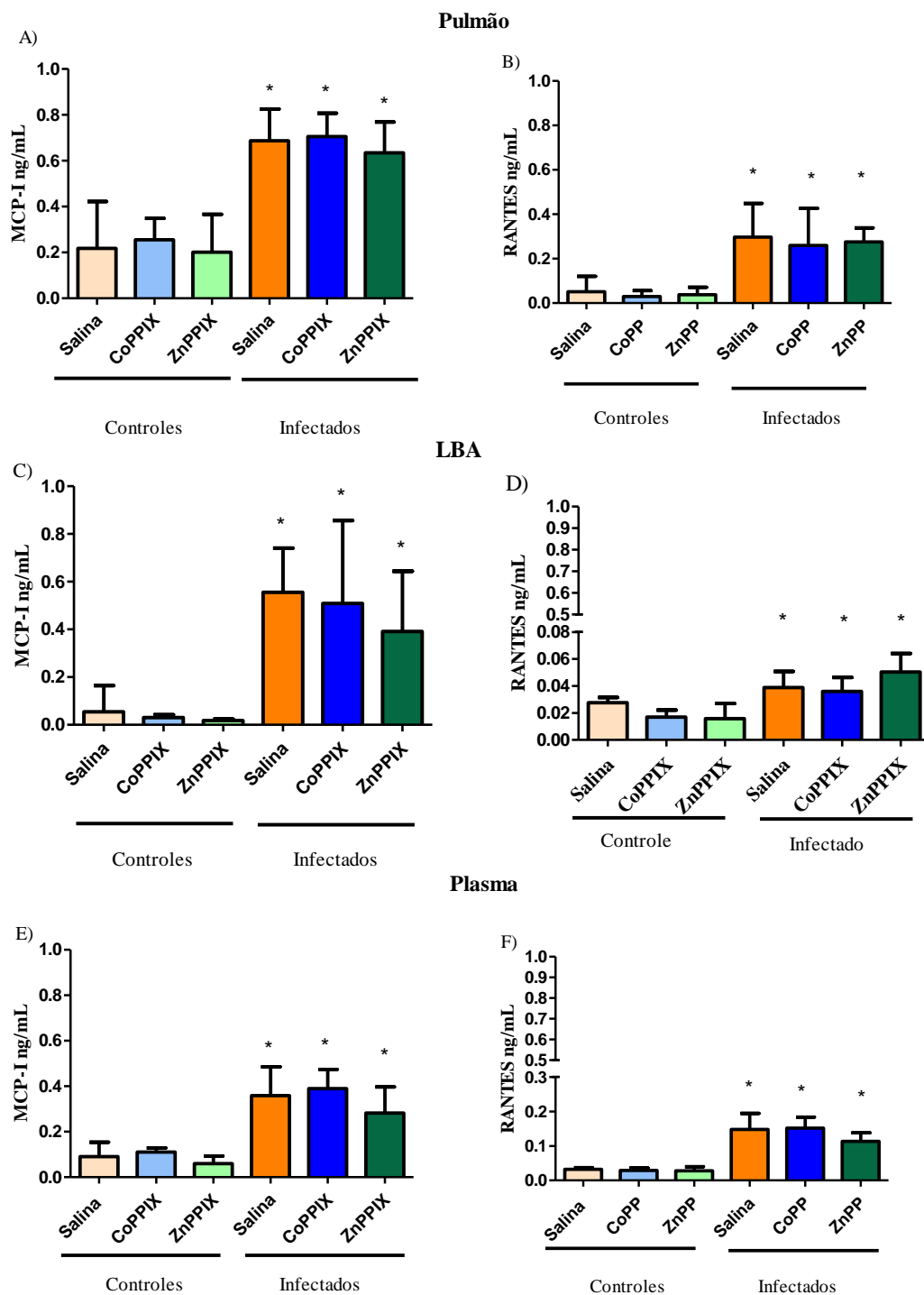


Figura 4.17.1: **Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX na liberação de quimiocinas.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX) e foram eutanasiados nove dias após a infecção. Os pulmões, LBA e sangue periférico (plasma) foram removidos e processados para ELISA. Em A, CCL-2/MCP-1, em B, CCL-5/RANTES, macerado de pulmão. Em C, CCL-2/MCP-1 e em D, CCL-5/RANTES, no LBA. Em E, CCL-2/MCP-1, em F, CCL-5/RANTES, no plasma. Gráficos representativos de três experimentos, sendo cada barra a média de 5 animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados, e (#) indica  $p \leq 0.05$  animais infectados tratados com CoPPIX em relação aos outros animais infectados tratados com Salina ou com ZnPPIX.

#### 4.18. O tratamento com CoPPIX e ZnPPIX aumenta a expressão da HO-1 nos animais controle

Já sendo bem estabelecido na literatura (Pereira e cols., 2016), e também por nós neste trabalho (resultado 4.10), que ocorre um aumento da expressão da HO-1 com a infecção malárica, decidimos, por tanto analisar se a expressão da enzima era influenciada com o tratamento que estamos utilizando, através da técnica de western blotting.

Os nossos resultados preliminares mostram que o tratamento com CoPPIX e ZnPPIX leva a um aumento da expressão da enzima HO-1 nos animais controle e infectados (figura 4.18.1-A), confirmada pela densidometria das bandas (figura 4.18.1-B). Embora estes experimentos precisem ser repetidos para confirmação.

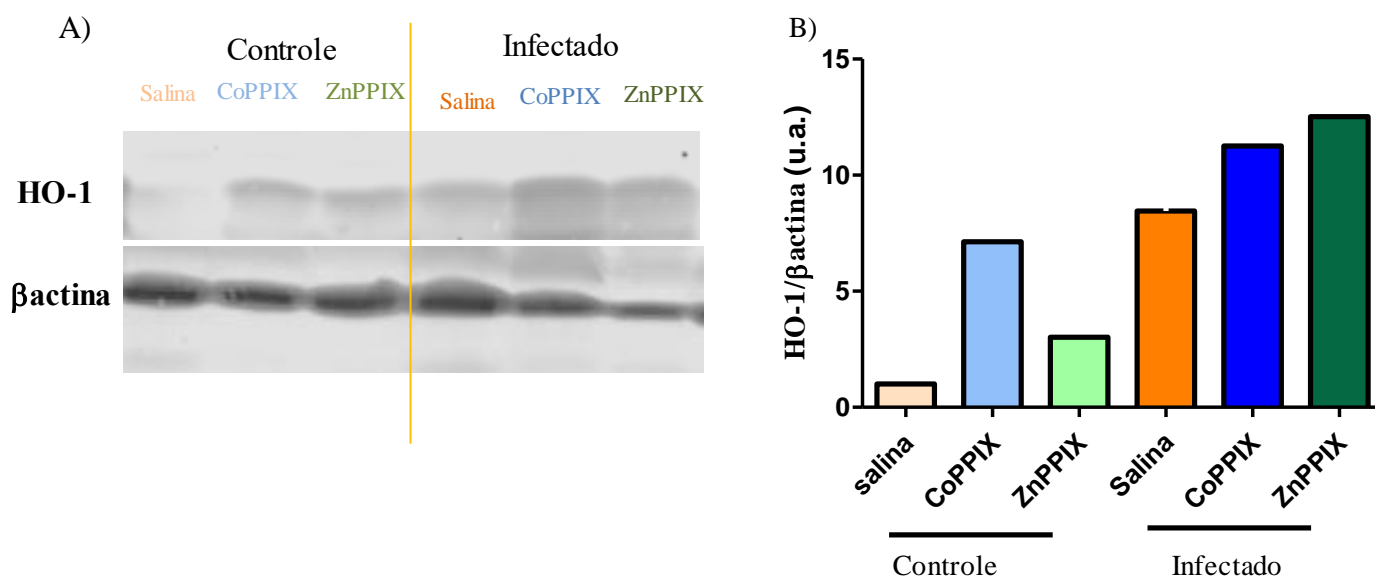


Figura 4.18.1: **Animais controle tratados com CoPPIX ou com ZnPPIX apresentam maior expressão da enzima HO-1 no pulmão.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX) e foram eutanasiados nove dias após a infecção. Os pulmões foram retirados e processados para análise por western blotting. Em A, gel contendo amostra de pulmão macerado de animal controle e animal infectado, respectivamente. Em B, razão entre a densidometria das bandas de CD41 normalizada pela banda de  $\beta$ actina, e dividido pelo controle. Gráfico de um animal por grupo. Gráfico de um experimento, contendo dois animais nos grupos salina.

#### **4.19. O tratamento com CoPPIX interfere na plaquetopenia durante a infecção malárica**

Na literatura existem alguns relatos em modelos de isquemia/reperfusão (Tamura e cols., 2013; Woolbright and Jaeschke, 2013) e de arteriosclerose (Durante, 2011) que relacionam o aumento da expressão da HO-1 com a diminuição da ativação de plaquetas, através da inibição de processos de agregação.

Em nosso modelo acompanhamos o número de plaquetas periféricas até o sétimo dia de infecção, no qual já havíamos observado redução do processo de plaquetopoiese. Confirmando os dados apresentados anteriormente, os animais controle, tratados ou não, mantiveram um número de plaquetas relativamente constante ao longo de todo experimento (figura 4.19.1-A e B). Já os animais infectados e tratados com salina e ZnPPIX apresentam uma queda no número de plaquetas no sangue periférico nos dias seis e sete após a infecção (figura 4.19.1-A e B). Por outro lado, os animais infectados tratados com CoPPIX não apresentam esta queda acentuada (figura 4.19.1-A e B). Este resultado nos sugere que o aumento na atividade da HO-1 interfere com o número de plaquetas no sangue periférico.

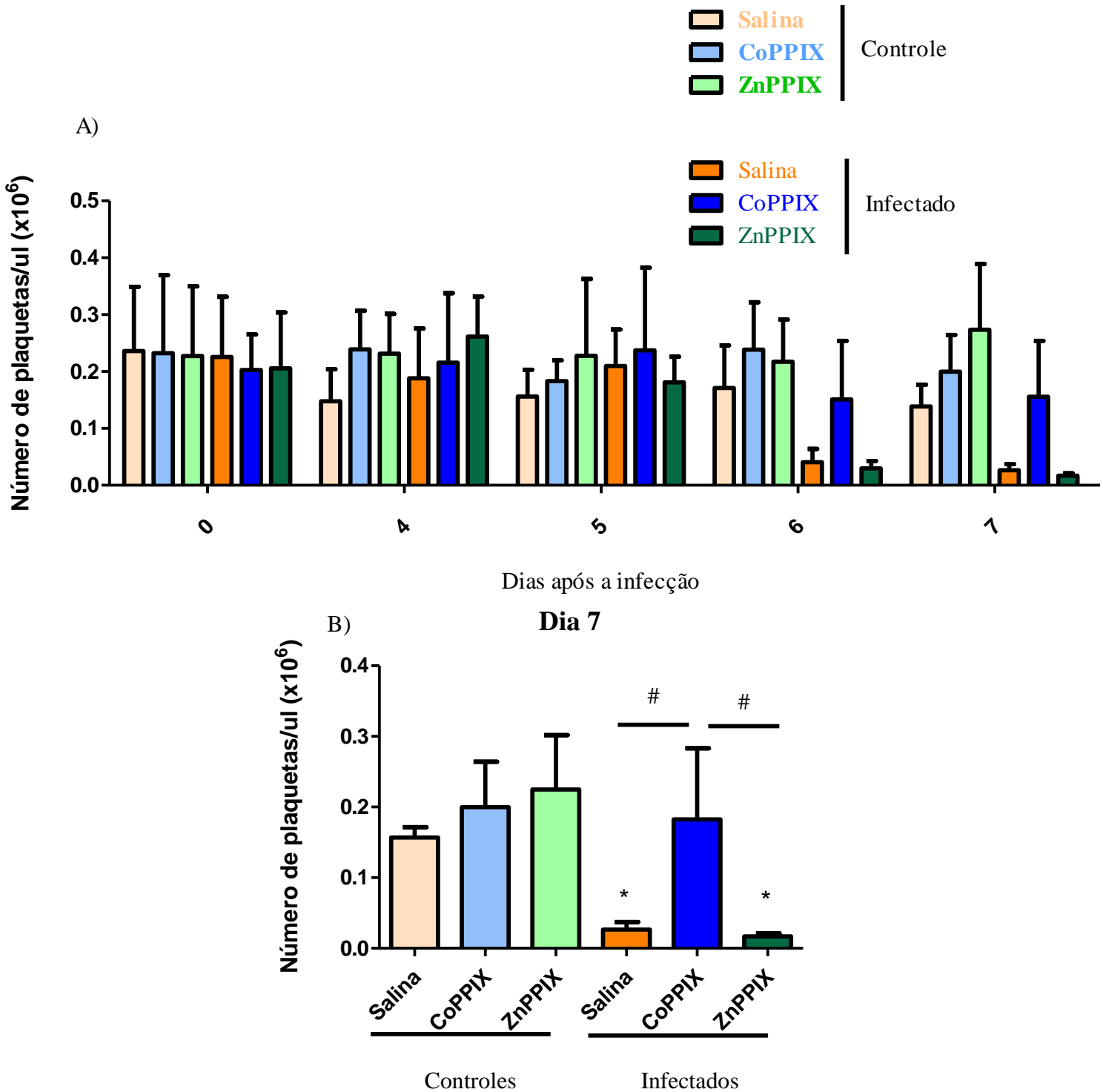


Figura 4.19.1: **Animais infectados por *P. berghei* NK65 e tratados com CoPPIX não apresentam plaquetopenia.** Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX). Foi coletado sangue da cauda dos animais em vários momentos ao longo do experimento. Em A, contagem de plaqueta ao longo do experimento. Em B, contagem de plaqueta no sétimo dia de infecção. Gráficos contendo a junção cinco experimentos, sendo cada barra é a média de 15-25 animais, onde (\*) indica  $p \leq 0.05$  quando comparado animais infectados em relação aos controles não infectados, e (#) indica  $p \leq 0.05$  animais infectados tratados com CoPPIX em relação aos outros animais infectados tratados com Salina ou com ZnPPIX.



#### 4.20. O tratamento com CoPPIX e ZnPPIX interfere com a concentração de plaquetas no pulmão

O pulmão, como já falado anteriormente é considerado um possível sítio de produção de plaqueta, sendo conhecido também como um órgão propício à formação de agregados celulares que obstruem os vasos durante a malária (Franke-Fayard e cols., 2005; Van den Steen e cols., 2013). Em nosso trabalho fomos analisar através de western blotting a expressão da subunidade  $\alpha$ IIb (CD41) da integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 que é muito presente na membrana das plaquetas.

Preliminarmente observamos que o pulmão dos animais tratados apresentou uma densidade maior de CD41. Este fenômeno foi observado nos animais controle e nos animais infectados (figura 4.20.1-A e confirmado em 4.20.1-B pela densidometria). De maneira mais intensa nos animais controle e infectados tratados com CoPPIX. Este resultado nos sugere que os tratamentos (indução e inibição da HO-1), podem estar induzindo na produção de plaquetas no pulmão. Porém estes resultados precisam ser confirmados.

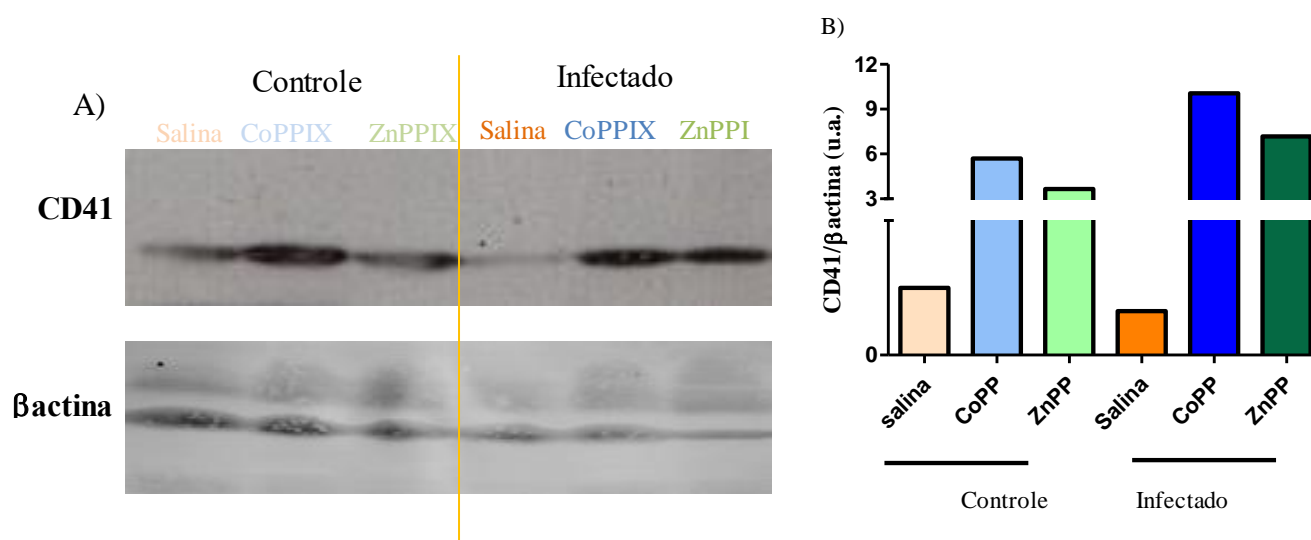


Figura 4.20.1: Efeito do tratamento com CoPPIX ou com ZnPPIX na expressão de  $\alpha$ IIb (CD41) no pulmão. Animais C57Bl/6 foram inoculados via i.p. com  $10^4$  hemácias não parasitadas (HNP) ou com  $10^4$  hemácias parasitadas (HP). Os animais receberam diariamente, a partir do dia um de infecção, injeções i.p. de salina com 0,5% de DMSO (Salina), 5mg/Kg de CoPPIX (CoPPIX) ou de 5 mg/Kg ZnPPIX (ZnPPIX) e foram eutanasiados nove dias após a infecção. Os pulmões foram retirados e processados para análise por western blotting. Em A, gel contendo amostra de pulmão macerado de animal controle e animal infectado, respectivamente. Em B, razão entre a densidometria das bandas de CD41 normalizada pela banda de  $\beta$ actina, e dividido pelo controle. Gráfico de um animal por grupo. Gráfico de um experimento.

## 5. DISCUSSÃO

A malária é uma doença grave e desencadeia até 500 mil mortes por ano em especial na África Subsaariana (OMS, 2016). No Brasil, a malária ocorre na região da Amazônia Legal e gera problemas financeiros pela diminuição do turismo e pela grande morbidade gerada (Saúde, 2003). A injúria pulmonar em decorrência da malária é também uma complicação importante e ocorre em um terço dos adultos com malária grave, sendo mais comum em mulheres grávidas (Mohan e cols., 2008; Rajput e cols., 2000; Schofield, 2007; Torres e cols., 1997).

A injúria pulmonar é, portanto, bem estabelecida como uma característica da malária grave em decorrência da infecção por *P. falciparum*, mas também ocorre na malária gerada por *P. vivax* (sendo esta a forma prevalente no Brasil), *P. ovale* e *P. malariae* (Mohan e cols., 2008; Tan e cols., 2008). A injúria pulmonar caracteristicamente ocorre após o início do tratamento com antimalárico e é considerada uma manifestação da resposta inflamatória exacerbada (Anstey e cols., 2007; Anstey e cols., 2002; Gachot e cols., 1995; Tan e cols., 2008). Na injúria pulmonar aguda em decorrência da malária ocorre obstrução das vias aéreas, diminuição da ventilação e das trocas gasosas e aumento da atividade fagocítica pulmonar (Anstey e cols., 2002; Taylor e cols., 2006).

No presente trabalho investigamos a influência da proteína heme oxigenase na plaquetopenia e na injúria pulmonar aguda durante a infecção pelo *P. berghei* NK65. A infecção por esse parasito tem sido utilizada como modelo para estudar a fisiopatologia da malária pulmonar (Nakazawa, 2005; Van den Steen e cols., 2010). Em nosso trabalho investigamos, primeiramente, se a infecção pelo *P. berghei* NK65, em camundongos C57BL/6, poderia gerar infecção com características de malária pulmonar. Para tanto avaliamos o crescimento do parasito, por esfregaços sanguíneos, e observamos um aumento progressivo da parasitemia e uma grande letalidade, com pico entre nono e o décimo segundo dia de infecção. O grupo de Van den Steen, já havia utilizado o *P. berguei* NK65 para analisar a injúria pulmonar associada a malária e encontrou uma intensa resposta inflamatória, com elevada mortalidade até o décimo segundo dia de infecção, associado com intenso infiltrado celular e a liberação de mediadores inflamatório. Portanto, o curso da infecção observado por nós foi similar ao já descrito anteriormente (Deroost e cols., 2013; Van den Steen e cols., 2010).

Durante o processo inflamatório de doenças como pneumonias ou ARDS ocorre a disfunção da barreira semipermeável entre o sangue e o interstício pulmonar, que é formada pelas células endoteliais da vasculatura pulmonar. Essa disfunção na barreira pode resultar no movimento de fluidos e macromoléculas para o interstício e para as vias aéreas pulmonares,

processos que contribuem significativamente para alta morbidade e mortalidade de pacientes com ARDS (Churg e cols., 2005). Em nosso trabalho encontramos uma maior permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e consequente formação de edema.

Nossos resultados indicam um aumento do peso dos pulmões, seguido por um grande extravasamento de proteínas no lavado bronco-alveolar, demonstrando um edema pulmonar acentuado nos animais infectados. Nos trabalhos de malária pulmonar experimental desenvolvido pelos grupos de Lovegrove e cols. (2008), de Epiphany e cols. (2010), Van de Steen e cols. (2010) e Azevedo-Quintanilha e cols. (2016) também houve formação de edema pulmonar. Todos esses trabalhos demonstraram uma correlação entre a elevada produção de citocinas, o extravasamento de proteínas, e o aumento do peso dos pulmões.

Ao ocorrer a disfunção da barreira alvéolo-capilar e a consequente formação do edema, ocorre também um aumento na migração de células para os espaços alveolares e para o parênquima pulmonar (Churg e cols., 2005; Puneet e cols., 2005; Reiss e cols., 2012). Esta relação entre edema e infiltrado inflamatório é comumente encontrada em pacientes infectados com H1N1 e em modelos experimentais de ARDS, induzido por injeção intratraqueal de LPS ou de instilação de ácido clorídrico (HCl) (Hagau e cols., 2010; Reiss e cols., 2012; Yeh e cols., 2007).

Nos estudos de casos de pacientes com complicações pulmonares por malária é comum encontrar nas radiografias torácicas um denso infiltrado pulmonar. Na maioria dos casos, esse infiltrado inicia-se após o tratamento antimalárico, podendo estar aliado a outras complicações como malária cerebral, falência renal aguda, dentre outras (Asiedu and Sherman, 2000; Aursudkij e cols., 1998; Hiekkanen e cols., 2001; Lomar e cols., 2005; Mohan e cols., 2008; Price e cols., 2007; Sarkar e cols., 2010; Tan e cols., 2008; Torres e cols., 1997).

Aliado à citoadesão das HPs, a intensa migração de leucócitos para o sítio inflamatório gera uma resposta inflamatória intensa, levando ao dano tecidual (Agarwal e cols., 2007; Anstey e cols., 2007; Feldman and Singer, 1987; Lovegrove e cols., 2008). Uma possível explicação para essa intensa resposta inflamatória ser gerada pós-tratamento é que com o rompimento da hemácia e a morte do parasito ocorre a liberação de bioprodutos, e eventos de reperfusão. A soma desses fenômenos levaria ao aumento da atividade fagocítica no sítio inflamatório, com exacerbada liberação de citocinas e quimiocinas, e a uma intensa ativação celular, o que leva ao dano tecidual (Anstey e cols., 2002; von Mach e cols., 2003). Nas nossas análises histológicas, podemos observar um extenso infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar, acompanhado de áreas hemorrágicas e de infiltrado celular aderido aos

vasos, corroborando com a literatura, tanto nos estudos de casos clínicos, como nos modelos experimentais.

Nos modelos experimentais de malária, é comum encontrarmos infiltrado leucocitário, ao invés de hemácias parasitadas ocasionando obstrução mecânica. Contudo, recentemente um trabalho muito elegante demonstrou um acúmulo preferencial de hemácias parasitadas por *P. berghei* Anka no tecido pulmonar, esplênico e adiposo (Franke-Fayard e cols., 2010). Portanto, acreditamos que a interação entre leucócitos e hemácias aderidas aos capilares pulmonares em decorrência da infecção levam a uma resposta inflamatória aumentada e a uma maior expressão de moléculas de adesão, que aumentam a migração e aderência de plaquetas, leucócitos e hemácias parasitadas e não parasitadas.

Em nosso trabalho, percebemos alteração na migração celular avaliada no LBA, o que vai de acordo com vários modelos de injúria pulmonar (Jin e cols., 2003; Kawakami e cols., 1997; Steinmuller e cols., 2006; Sumida, 1995). Contudo, Lovergrove e cols. (2008) e Azevedo-Quintanilha cols. (2016) descrevem a ausência de migração celular visível no LBA, quando os animais foram infectados com *P. berghei* ANKA, enquanto van den Steen e cols. (2010) demonstraram que animais infectados com *P. berghei* NK65 apresentam aumento de migração de células no LBA. Ao contrapor os nossos dados com a literatura, percebemos que a migração de células estimada no LBA pode ter relação com a cepa de plasmódio utilizado. Porém, ambos os trabalhos citados anteriormente demonstram aumento no número de células no parênquima pulmonar e, no entanto, em estudos de caso de malária pulmonar não é comum a análise do LBA.

Corroborando com a literatura, o principal tipo celular encontrado em nossas análises do LBA foram células mononucleares (Lovegrove e cols., 2008; Van den Steen e cols., 2010). Monócitos e/ou macrófagos são células que desempenham um papel importante na patogênese da malária, por serem células efetoras na produção de citocinas e na fagocitose de hemácias parasitadas (Chimma e cols., 2009; Lovegrove e cols., 2008; Price e cols., 2007), já tendo sido comprovado a sua importância na patogênese da anemia grave da malária (Ogonda e cols., 2010) e na malária cerebral (Oakley e cols., 2009).

Diversos trabalhos demonstram que o perfil de citocinas liberadas durante a malária é importante para o desenvolvimento das formas graves, como a malária cerebral (Armah e cols., 2005; Bostrom e cols., 2012; Marsh and Snow, 1997), e também do dano cognitivo desencadeado pela malária cerebral experimental induzida por *P. berghei* ANKA (Reis e cols., 2012). Ao analisar a produção de quimiocinas no tecido pulmonar e no LBA de animais infectados com *P. berghei* NK65, observamos uma maior liberação de CCL-2/MCP-1 e CCL-5/RANTES nos animais infectados quando comparados aos animais controle. Estudos

clínicos de pacientes com malária apresentando comprometimento pulmonar em decorrência da infecção com *P. vivax* ou *P. falciparum*, demonstraram níveis elevados de citocinas e quimiocinas. Níveis elevados de citocinas no plasma de pacientes com malária podem estar relacionadas com a propagação da resposta inflamatória, pela ativação celular e consequente liberação de outras citocinas e quimiocinas. Este fenômeno pode levar ao aumento da citoaderência de hemácias e leucócitos às células endoteliais, e aumentar a expressão de moléculas de adesão gerando assim a quebra da barreira alvéolo-capilar e a formação de edema (Gachot e cols., 1995; Hiekkänen e cols., 2001; Mohan e cols., 2008; Torres e cols., 1997).

Nossos resultados encontram similaridades também com modelo de ARDS induzida pela injeção de LPS, onde ocorre uma produção elevada de citocinas e quimiocinas como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8/IL-8, IL-12, CCL-2/MCP-1, dentre outras (van Zoelen e cols., 2011; Yamaguchi e cols., 2012; Yeh e cols., 2007). Em modelos experimentais de infecção com H1N1 em camundongos selvagens ou deficientes para TNF, foi possível observar uma correlação positiva entre agravamento do quadro inflamatório pulmonar e aumento da expressão e/ou liberação de mediadores inflamatório como o CCL-2/MCP-1 e do fator de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ 1) (Damjanovic e cols., 2011). Além disso, foi observada uma maior liberação de quimiocinas como o CCL-5/RANTES pelas células pulmonares endoteliais infectadas com o vírus respiratório sincicial (RSV), com consequente aumento da inflamação local (Casola e cols., 2001).

Na malária humana e experimental é comum ocorrerem mudanças metabólicas, alteração da expressão de citocinas e sequestro de células na microcirculação do cérebro e de outros tecidos (Lacerda e cols., 2012a; Schofield and Grau, 2005). Uma das etapas mais importantes no processo infeccioso é a resposta imunoinflamatória que envolve, entre outros eventos, a migração de células para a região tecidual, com acúmulo dos mesmos em focos inflamatórios. Neste contexto, as plaquetas são células que tem recebido muita atenção nas últimas décadas em diversas doenças infecciosas bacterianas (Freitas e cols., 2012) e virais (Choe e cols., 2013; Hottz e cols., 2013). Porém, as plaquetas têm sido implicadas de maneira muito controversa no cenário da fisiopatologia da malária. No presente trabalho, investigamos também uma possível relação entre a plaquetopenia e ativação plaquetária e a injúria pulmonar decorrente da infecção pelo *P. berghei* NK65.

A plaquetopenia, que constitui na queda acentuada no número de plaquetas circulantes, é uma complicação comum tanto na malária vivax quanto na falciparum (Bakhubaira, 2013; Lacerda e cols., 2011; Yamaguchi e cols., 1997), porém as suas causas ainda não foram totalmente elucidadas. Diversas hipóteses têm sido propostas para tentar

explicar as causas da plaquetopenia, entre elas: o sequestro de plaquetas no baço como resultado da ligação específica de imunoglobulinas G a antígenos maláricos ligados a plaquetas (Grau e cols., 1988; Kelton e cols., 1983; Panasiuk, 2001; Yamaguchi e cols., 1997); e a ativação endotelial e consequente agregação das plaquetas ao endotélio, uma vez que em voluntários infectados com *P. falciparum* houve um aumento nos níveis de fator de von Willebrand (vWF) e uma correlação negativa entre os níveis de vWF e a contagem de plaquetas (de Mast e cols., 2007). A plaquetopenia pode estar relacionada também com a fagocitose de plaquetas (Coelho e cols., 2013; Jaff e cols., 1985). Adicionalmente, trabalhos demonstram que durante a infecção malárica experimental a plaquetopenia pode estar relacionada com a ativação e apoptose plaquetária (Piguet and Vesin, 2002).

A plaquetopenia na malária e em outras síndromes é correlacionada, portanto, com a ativação plaquetária (Lacerda e cols., 2011; Sharron e cols., 2012). A importância da agregação plaquetária na plaquetopenia e para o desenvolvimento de doenças já foi demonstrada em pacientes infectado com *Helicobacter pylori*, bem como em experimentos *in vitro* com esse patógeno. Nesses trabalhos, foi comprovado que ocorre a agregação de plaquetas com *Helicobacter pylori*, mediada por P-selectina, e consequentemente ocorre o estímulo para a apoptose das plaquetas sugerindo, então, que a infecção leva a plaquetopenia por induzir a agregação de plaquetas com a bactéria e consequente apoptose plaquetária (Gursel e cols., 2010; Yeh e cols., 2010). Em nosso trabalho encontramos que a infecção levou a uma acentuada plaquetopenia a partir do sexto dia de infecção e podemos sugerir que esta queda acentuada no número de plaquetas se correlaciona com agregação plaquetária, uma vez que identificamos a formação de agregados plaquetários tanto com hemácias, quanto com leucócitos, no sangue periférico de nossos animais. Contudo, não podemos afirmar a participação da adesão plaquetária ao endotélio porque não foram realizadas estas análises.

A ativação e agregação plaquetária são correlacionadas também com o aumento da gravidade da sepse humana e experimental (Gursel e cols., 2010; Lopes-Pires e cols., 2015; Veloso e cols., 2013). Experimentos *ex vivo* demonstraram que ao estimular as plaquetas com estímulos liberados durante a sepse, como o ADP e trombina, levou a ativação plaquetária e consequente agregação (Secor e cols., 2013). Estudos clínicos e experimentais com a bactéria gram-positiva *Streptococcus*, demonstrou que durante a infecção há ativação plaquetária, que por sua vez, aumenta o estado adesivo das plaquetas levando a uma piora do quadro inflamatório (Svensson e cols., 2016). Agregados de plaquetas e hemácias parasitadas também são encontrados em vasos cerebrais de indivíduos que morreram de malária cerebral por *P. falciparum* (Combes e cols., 2006; Grau e cols., 2003; van der Heyde e cols., 2006).

Diversos trabalhos têm demonstrado que plaquetas em cocultura com hemácias infectadas por *P. falciparum* facilitam a ligação dessas hemácias parasitadas as células endoteliais cerebrais e conseqüente ativação destas células, sugerindo um envolvimento das plaquetas nos eventos de obstrução vascular comuns na malária cerebral (Wassmer e cols., 2004; Wassmer e cols., 2011). Trabalhos da literatura demonstram que a depleção de plaquetas no início da infecção com *P. berghei* ANKA leva a uma maior sobrevivência dos animais C57Bl/6, sugerindo que a depleção plaquetária de alguma forma inibiu a formação de malária cerebral (van der Heyde e cols., 2005). Também em modelo de malária cerebral experimental, observou-se menor incidência de malária cerebral quando utilizados camundongos deficientes para P-selectina, uma selectina muito importante para adesão plaquetária (Sun e cols., 2003). Nesse contexto, a adesão preferencial de hemácias parasitadas por *P. berghei* ANKA ao tecido pulmonar mostrado pelo grupo Frake-Fayard e cols. (2010) poderia ser decorrente da formação de agregados na microvasculatura pulmonar.

A agregação de plaquetas a leucócitos, principalmente a monócitos, também são eventos importantes em doenças como a diabetes (Patko e cols., 2012), a dengue (Chinnappan e cols., 2016; Hottz e cols., 2014), na infecção pelo vírus HIV (Nkambule e cols., 2015; Singh e cols., 2012), em doenças cardiovasculares (Olsson e cols., 2016; Rahman e cols., 2016), em doenças hepáticas crônicas (Sayed e cols., 2010) e no câncer (Chang e cols., 2015). Acredita-se que a agregação de plaquetas ativadas leva a ativação dos leucócitos, desencadeando um aumento na produção e/ou liberação de citocinas e quimiocinas e uma super-regulação de moléculas de adesão. Nossos dados sugerem que todos estes eventos de ativação celular mediado por plaquetas podem estar presentes na infecção por *P. berghei* NK65, uma vez observamos uma agregação aumentada de plaquetas com monócitos e neutrófilos.

Além da interação de plaquetas com monócitos, os agregados de plaquetas com neutrófilos têm sido muito estudados, e são relatadas como deletérias em diversos modelos de inflamação pulmonar. Na injúria pulmonar induzida por ácido é frequente a formação de agregado de plaqueta com neutrófilo, e o bloqueio de P-selectina leva a uma melhora do quadro inflamatório (Zarbock e cols., 2006). A depleção de plaquetas no modelo murino de injúria pulmonar causada ao aerolisar os animais com LPS de *Salmonella enteritidis*, aboliu a migração de neutrófilos para o pulmão (Grommes e cols., 2012). Também no modelo de injúria pulmonar ocasionada por transfusão (do inglês transfusion related acute lung injury - TRALI) foi identificado o sequestro de plaquetas no pulmão de maneira dependente de neutrófilo (Looney e cols., 2009). Assim como a formação de armadilhas de redes de neutrófilos (do inglês neutrophil extracellular trap- NET) induzidas por plaqueta no pulmão de animais com TRALI (Caudrillier e cols., 2012).

Durante os processos inflamatórios ocorre uma rápida eliminação de plaquetas que é acompanhada de um aumento na produção dessa célula (Haas e cols., 2015; Jenne and Kubes, 2015). Contudo, em nosso trabalho, ao analisarmos o processo de plaquetopoiese durante a infecção malárica, observamos uma inibição da produção de plaquetas a partir de megacariócitos na medula óssea. Vimos ainda que este fenômeno parece ser independente da cepa de plasmódio utilizado, uma vez que a diminuição do processo de plaquetopoiese foi observada em infecções com diferentes cepas de *P.berghei* (*P. berghei* ANKA e *P. berghei* NK65). Geralmente, a perturbação no processo de produção de plaquetas é um fenômeno reconhecido em outras síndromes como a dengue (Noisakran e cols., 2012a), na doença trombocitopenica autoimune (Iraqi e cols., 2015; Perdomo e cols., 2013; Yang e cols., 2010) e na obesidade (Beaulieu e cols., 2014). Estudo sobre a plaquetopenia na dengue demonstrou que células com fenótipo de megacariócito possuem alta concentração de RNA do vírus da dengue, facilitando, por exemplo, a fagocitose do vírus quando o megacariócito ou a plaqueta aderem a um monócito. Porém, esse fenômeno poderia estar contribuindo para a morte destas células e, conseqüentemente, para o baixo número de plaquetas circulantes (Noisakran e cols., 2012b).

Já foi demonstrado que o tratamento de precursores de megacariócitos provenientes de cordão umbilical com plasma de pacientes acometidos por trombocitopenia autoimune, leva a maturação de megacariócitos com menor poliploidia, menor liberação de plaquetas e menor apoptose (Iraqi e cols., 2015; Perdomo e cols., 2013; Yang e cols., 2010). Beaulieu e cols. (2014) avaliaram o papel das plaquetas na obesidade, e demonstraram que pessoas obesas tem aumento de IL-1 $\beta$ , do receptor de IL-1 (IL-1R1) e de genes inflamatórios regulados por eles na plaqueta. Camundongos submetidos à dieta com alto teor de calorias apresentaram alteração no funcionamento de megacariócitos mediado por IL-1 $\beta$  e pelo receptor de IL-1 (IL-1R1), que levaram ao aumento da ploidia e a produção de genes pró-trombóticos e inflamatórios e, conseqüentemente, a adesividade em plaquetas. O mesmo perfil foi observado ao estimular-se células de linhagem megacariócíticas humanas com IL-1 $\beta$ . Com isso ficou constatado que pessoas obesas tem uma perturbação na produção de plaquetas que leva a liberação de plaquetas mais ativadas e propicias a aderir aos vasos podendo gerar doenças cardiovasculares.

Analisamos também a presença de plaquetas no pulmão através da marcação da subunidade  $\alpha$ IIB (CD41) da integrina  $\alpha$ IIB $\beta$ <sub>3</sub> (CD41/CD61). A subunidade  $\alpha$ IIB (CD41) é um marcador presente tanto em plaquetas como em megacariócitos (Machlus and Italiano, 2013), então, não é possível diferenciar esses dois tipos celulares. Nós encontramos uma maior



expressão de CD41 no pulmão dos animais não infectados quando comparados aos infectados. Estes dados nos sugerem que a infecção poderia estar interferindo com a produção de plaquetas também no pulmão, uma vez que o pulmão tem sido descrito como um sítio de produção de plaquetas extra-medular (Weyrich and Zimmerman, 2013) e que os nossos dados na medula demonstram que há disfunções nos megacariócitos devido ao processo infeccioso causada pelo *P. berghei* NK65.

Em estudos de casos de pacientes com dano alveolar difuso, foi encontrado grande número de megacariócito intrapulmonar e baixa contagem de plaquetas circulantes (Mandal e cols., 2007). Estudos em pacientes com problemas cardiovasculares, ou ratos com injúria pulmonar induzida por prolongada exposição a oxigênio, demonstrou que quando há injúria pulmonar ocorre diminuição do número de megacariócitos no pulmão e conseqüente menor número de plaquetas no sangue periférico (Xiao da e cols., 2006). Xiao e cols. (2006) hipotetizaram que o pulmão injuriado não conseguiria reter megacariócitos e por isso a produção e liberação de plaquetas seria prejudicada, ao mesmo tempo que ocorreria uma maior ativação das plaquetas remanescentes.

As plaquetas não são vistas somente como vilãs na infecção malárica. Experimentos *in vitro* demonstraram que plaquetas humanas podem inibir o crescimento e matar *P. falciparum*, sugerindo que as plaquetas são protetoras em estágios iniciais da infecção (McMorran e cols., 2009; Peyron e cols., 1989). As plaquetas possuem um efeito benéfico também durante a infecção malárica murina, visto que em experimentos usando camundongos infectados com *P. chabaudi* os animais tornaram-se mais suscetíveis a infecção ao serem tratados com inibidor plaquetário (McMorran e cols., 2009). Assim, as plaquetas podem ser importantes no combate a infecção malárica. Contudo, observamos que o nosso modelo desencadeia uma plaquetopenia acentuada que esta relacionada a uma maior ativação e agregação plaquetária e a uma menor produção de plaquetas tanto na medula quanto no pulmão. Em acordo com a literatura, o nosso trabalho sugere que as plaquetas remanescentes encontram-se ativadas e por isso contribuindo para um prognóstico ruim.

Durante a infecção malárica, ocorre intensa liberação de heme. O heme é um grupo prostético essencial, que tem papel importante em numerosas reações redox, em defesas antioxidantes e em vários estágios da cadeia de transporte de elétrons em procariotas e mitocôndrias eucarióticas (Dutra and Bozza, 2014). Os parasitas do filo Apicomplexa, que incluem os agentes causadores da malária, toxoplasmose e vários parasitas importantes do gado, tem o uso do heme como crítico para a sobrevivência, embora as funções de heme nesses organismos permanecem não compreendidas (van Dooren e cols., 2012). Contudo, a presença do heme livre proveniente do hospedeiro durante a infecção leva a indução da

enzima Heme Oxigenase 1 (HO-1), que faz a catálise deste e libera importantes produtos antioxidantes, que podem auxiliar na defesa contra a infecção.

O papel da enzima HO-1 é conflitante entre infecções parasitárias. Luz e cols (2012) demonstraram que a infecção por *Leishmania chagasi* desencadeia a produção HO-1 por macrófagos murinos. O tratamento com ativador da HO-1, a cobalto protoporfirina IX (CoPPIX), aumentou a carga parasitária tanto em camundongos C57Bl/6, como macrófagos humanos. Além disso, a regulação positiva de HO-1 por CoPPIX diminuiu a produção de TNF, estes dados sugerem que a ativação de HO-1 é importante para o desenvolvimento da infecção (Luz e cols., 2012). Por outro lado na infecção de camundongos C57Bl/6 por *Trypanosoma cruzi*, o Nrf2, que é um importante ativador transcricional do gene da HO-1, e a enzima HO-1 foram induzidos pelo tratamento com CoPPIX. O tratamento com CoPPIX também reduziu parasitemia e o parasitismo tecidual, enquanto o uso do estanho protoporfirina IX (SnPPIX), um inibidor da atividade de HO-1, aumentou a parasitemia de *T. cruzi* no sangue. Porém, o tratamento com CoPPIX não influenciou com os mecanismos de apoptose de células infectadas, indução de IFN de tipo I ou NO. Os dados sugerem que o estresse oxidativo contribui para a persistência do parasita no hospedeiro, sendo portanto a indução da enzima HO-1 importante para a inibição da infecção (Paiva e cols., 2012).

Em nosso trabalho tratamos os animais com o indutor da atividade da HO-1, CoPPIX e com o inibidor zinco protoporfirina IX (ZnPPIX). Observamos que a o tratamento com CoPPIX e com o ZnPPIX não interferiu com os parâmetros de análise do desenvolvimento da infecção, que são a parasitemia e o peso corporal dos animais. Contudo, ao analisarmos a curva de sobrevivência, vimos que o tratamento com o CoPPIX levou a um aumento significativo na sobrevivência dos animais. Na literatura encontramos vários trabalhos mostrando que a indução da atividade da HO-1, na maioria das vezes pelo tratamento com CoPPIX, consegue inibir a rejeição ao transplante cardíaco levando a uma maior sobrevivência dos animais transplantados (Luo e cols., 2014; Sato e cols., 2001; Soares e cols., 1998; Yamashita e cols., 2006). Também foi visto que o tratamento com CoPPIX em camundongos da linhagem ICR grávidos infectados com a bactéria *Brucella abortus* inibe o aborto, enquanto a infecção por si leva a diminuição da expressão da enzima HO-1 (Tachibana e cols., 2008). Na malária cerebral experimental induzida pela infecção por *P. berghei* ANKA em animais C57Bl/6, foi demonstrado que o tratamento com estatina levou a uma maior sobrevivência dos animais, que foi acompanhada do aumento da expressão do gene da HO-1 (Reis e cols., 2012). Similarmente, o tratamento com CoPPIX levou a maior sobrevivência em animais BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA, que é outro importante modelo de malária cerebral experimental (Pamplona e cols., 2007). Também no modelo de malária pulmonar induzida por *P. berghei* NK65 em

animais DBA/2, houve aumento da sobrevivência ao tratar os animais com heme, que é um importante indutor da HO-1 (Pereira e cols., 2016).

Em nosso modelo observamos também que ao tratar os animais infectados com *P. berghei* NK65 com o CoPPIX, houve uma melhora significativa do quadro inflamatório. A melhora foi caracterizada por uma diminuição do edema pulmonar, identificada por um menor extravasamento de proteína para o LBA e pelo método de azul de Evans, bem como uma menor migração de células para o LBA e para o pulmão dos animais tratados. Observamos ainda que, com relação ao sangue periférico, estes animais apresentaram uma maior contagem de células, que seria um indicativo das células não estarem migrando para o tecido. De fato, ao infectar animais BALB/c com vírus influenza A e tratar com heme (como indutor da HO-1) houve aumento da expressão da HO-1 e melhora no quadro inflamatório pulmonar desencadeado pela infecção, identificada por menor migração de célula para o pulmão e menor formação de edema. Nos experimentos *in vitro* usando células de carcinoma pulmonar imortalizada A549, o tratamento com heme foi capaz de matar o parasita, porém, nos experimentos *in vivo*, isso não foi observado (Wang e cols., 2017).

No modelo de injúria pulmonar desenvolvida por instilação com água do mar em coelhos, ao realizar o tratamento com gás hidrogênio, teve melhora de todos os parâmetros inflamatórios. Foi observado menor edema determinado por quantidade de proteína no lavado brônquio-alveolar, menor migração de células para o pulmão avaliada na histologia, e menor peroxidação lipídica. Essas observações foram explicadas pelo aumento da expressão de Nrf2 e de HO-1 (Diao e cols., 2016). No modelo de injúria pulmonar ocasionada por inalação de Br2 houve aumento da concentração de heme no LBA, no plasma e no tecido pulmonar, correlacionando positivamente com a liberação de mediadores inflamatórios, edema e migração celular. Contudo, ao aumentar a degradação do heme via HO-1 houve melhora do quadro inflamatório (Lam e cols., 2016). Também o tratamento com a erva *Picrasma quassiodes* em modelo de injúria pulmonar induzida por LPS em animais C57Bl/6 levou a diminuição da injúria pulmonar e aumento da expressão da enzima HO-1 (Lee e cols., 2016b). O papel da HO-1 em todos esses modelos de injúria pulmonar confirmam os nossos dados de que a indução da enzima é importante para um melhor prognóstico.

Quando fomos avaliar a liberação de mediadores inflamatórios em nosso modelo, optamos por avaliar duas quimiocinas muito importantes para o desenvolvimento da malária e para a atividade plaquetária o CCL-2/MCP-1 e a CCL-5/RANTES (de Azevedo-Quintanilha e cols., 2016; Machlus e cols., 2016). Contudo, em nosso trabalho observamos que o tratamento dos animais com CoPPIX ou com ZnPPIX não interferiu com a produção e/ ou liberação dessas quimiocinas com relação ao grupo infectado que foi tratado com salina. A

interferência da HO-1 com a produção e/ou liberação de citocinas e quimiocinas é bem documentada. No modelo já citado de infecção com vírus influenza A, o tratamento com heme levou a diminuição de CCL-2/MCP-1 e TNF tanto no LBA quanto no macerado de pulmão. Contudo, não houve diferença na liberação de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 (Wang e cols., 2017). Em cultura de células endoteliais da artéria aorta de suínos pré-tratada com flavonóides e estimuladas com TNF houve uma inibição da liberação de CCL-2/MCP-1, ao mesmo tempo que um aumento da expressão de HO-1. O efeito se repetiu ao tratar as células com CoPPIX ou ao abolir a expressão do gene da HO-1 (Zheng e cols., 2010). No LBA dos animais instilados com água do mar, houve diminuição significativa da liberação de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6, quando os animais foram tratados com gás hidrogênio, ou seja, quando apresentaram aumento na expressão de HO-1 (Diao e cols., 2016).

Quando foi avaliado o papel da HO-1 no modelo de injúria pulmonar associada a malária, em camundongos DBA/2 infectada por *P. berghei* ANKA, através do pré-tratamento (2 dias antes da infecção), associado a um pós-tratamento (nova injeção 4 dias após a infecção) com heme, houve uma melhora do quadro inflamatório no pulmão. Foi encontrado diminuição da expressão (avaliação do RNA mensageiro) no pulmão e dos níveis séricos de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e CCL-2/MCP-1 (Pereira e cols., 2016). Esses resultados contrastantes aos nossos, podem estar relacionado ao fato de analisarmos modelos diferentes de malária pulmonar, inclusive utilizando técnicas também diferentes, uma vez que analisamos por ELISA as quimiocinas no macerado de pulmão. Contudo, é necessário que analisemos uma gama maior de quimiocinas além de analisar citocinas em nosso trabalho, para confirmarmos se a modulação realmente não esta acontecendo.

Obtivemos em nosso modelo um resultado curioso ao observarmos um aumento da expressão da enzima HO-1 no pulmão dos animais controle e infectados após o tratamento tanto com CoPPIX quanto com ZnPPIX. Entretanto, Yu e cols. (2016), tratou animais acometidos de injúria pulmonar induzida pela injeção de LPS, com heme (no papel de indutor da HO-1), ZnPPIX ou com os dois juntos e, ao avaliar a expressão da HO-1 nos animais controle (sem LPS) percebeu aumento da expressão quando tratou com o combinado de heme com ZnPPIX. Enquanto todos os animais injetados com LPS tiveram aumento da expressão da HO-1. Porém, os animais desafiados com LPS e tratados com heme tiveram um aumento significativamente maior que os animais LPS não tratados, enquanto o grupo LPS tratado com ZnPPIX teve um aumento significativamente menor em relação ao grupo só LPS. Estes dados da literatura sugerem que mesmo o CoPPIX e o ZnPPIX tendo o papéis opostos com relação a ativação da enzima HO-1, também podem interferir com a sua expressão. Já foi mostrado que o CoPPIX é capaz de aumentar a expressão e a atividade da enzima HO-1 em células tronco

de músculo esquelético (Heather-Marie e cols. 2015), em cultura primária de hepatócitos (Liu e cols., 2013) e no tecido hepático de ratos que foram induzidos a morte cerebral (Fang e cols., 2015). Também foi observado aumento da proteína HO-1 no plasma de ratos Wistar pré-tratados com CoPPIX, e desafiados com LPS de *Escherichia coli* (Piotrowski e cols., 2014).

Trabalhos anteriores do nosso grupo analisaram o sequenciamento do RNA de plaquetas proveniente de pacientes infectados com malária vivax, em comparação com plaquetas provenientes de indivíduos saudáveis (dados ainda não publicados). Neste trabalho foi demonstrado que o RNA para HO-1 é o gene mais aumentado em relação aos controles, sugerindo que a HO-1 teria um papel importante nas plaquetas durante a infecção malária. Ao analisarmos o papel da HO-1 na plaquetopenia, observamos que os animais infectados tratados com CoPPIX não apresentavam queda na contagem de plaqueta periférica.

É documentado na literatura que a enzima HO-1 tem um papel importante em inibir a agregação plaquetária em condições de estresse (Peng e cols., 2004). A agregação plaquetária, como já falado anteriormente, é fator importante de agravamento em muitos quadros inflamatórios. A enzima HO-1 parece ter um papel importante inibindo a agregação plaquetária em doenças cardiovasculares (Li e cols., 2013) e na injúria hepática ocasionada por eventos de isquemia e reperfusão (Tamura e cols., 2013). Esses trabalhos nos indicam que a ativação da enzima HO-1 estaria levando a uma menor ativação plaquetária e consequente agregação, que influenciaria na contagem de plaqueta periférica. Está descrito na literatura que fatores de crescimento liberados por plaquetas levam ao aumento na acumulação nuclear do fator Nrf2 em osteoblastos, que por sua vez reduziria o estresse oxidativo e diminuiria o risco de lesão (Tohidnezhad e cols., 2014). Estes dados estão de acordo com o nosso trabalho, ao indicar que a modulação exercida pela enzima HO-1 nas plaquetas leva uma melhora nos eventos inflamatórios analisados.

Observamos também um aumento na expressão da subunidade  $\alpha$ Ib (CD41) no pulmão dos animais controle e infectados quando tratados tanto com CoPPIX quanto com ZnPPIX, sendo mais expressivo nos tratados com CoPPIX. Não encontramos correlação na literatura da expressão da subunidade  $\alpha$ Ib e a enzima HO-1. Acreditamos que apesar do aumento da expressão de CD41 ocorrer frente aos dois tratamentos, estaria ocorrendo uma modulação diferenciada. Os animais tratados CoPPIX apresentaram mais plaquetas no sangue periférico, que poderia ser reflexo do aumento de produção de plaquetas no pulmão. Já nos animais tratados com ZnPPIX, que encontram-se plaquetopênicos, o aumento de expressão de CD41 pode ser devido ao fato das plaquetas estarem mais ativadas e expressando mais integrinas em sua superfície, levando ao maior acúmulo destas células no pulmão como

resíduo da adesão ao endotélio. Esta explicação é suportada pelo fato de que apesar da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (CD41/CD61) ser a mais expressa na superfície de plaquetas, mesmo em repouso, a ativação plaquetária leva a modulação desta não só pela mudança em sua conformação, mas também pelo aumento do número de moléculas na superfície (Wencel-Drake e cols., 1986; Woods e cols., 1986). Contudo, precisamos de mais experimentos para confirmar como o tratamento está influenciando nas plaquetas no pulmão.

Outro ponto importante que deve ser levado em consideração ao avaliar a atividade da enzima HO-1, é o papel dos produtos gerados pela catálise realizada por esta. A reação de quebra do heme pela HO-1 leva à liberação de monóxido de carbono (CO), de  $\text{Fe}^{2+}$  (que passa rapidamente pela reação de Fenton e deixa de ser tóxico) e de biliverdina (rapidamente reduzida a bilirrubina pela enzima citosólica biliverdina redutase). A liberação desses produtos é importante para a proteção exercida pela enzima HO-1. O papel da biliverdina, bilirrubina e/ou da enzima biliverdina redutase foi importante na melhora de quadro de injúria pulmonar (Kosaka e cols., 2013; Sarady-Andrews e cols., 2005), no remodelamento de artérias durante a gestação (Ha e cols., 2015), na diabetes tipo 1 e tipo 2 (Mishra and Ndisang, 2014), no Alzheimer (Barone e cols., 2014), na artrite (Bonelli e cols., 2012) e na pancreatite aguda (Nuhn e cols., 2013).

Em diversos modelos foi demonstrado melhora do quadro inflamatório quando realizado o tratamento com monóxido de carbono, como por exemplo, na dor neuropática da diabete (Castany e cols., 2016), na injúria causada por eventos de isquemia e reperfusão (Akamatsu e cols., 2004), diminuição da rejeição em transplantes cardíacos (Otterbein e cols., 2016; Sato e cols., 2001) e injúria pulmonar ocasionado por hiperóxia (Otterbein e cols., 1999b). Na malária, a exposição de animais C57Bl/6 infectados com *P.berghei* ANKA ao monóxido de carbono (CO) levou a redução da incidência de malária cerebral experimental, sem afetar a parasitemia. Contudo o tratamento impediu a ruptura da barreira hematoencefálica, congestão da microvasculatura cerebral e neuroinflamação, incluindo sequestro no cérebro de células T  $\text{CD8}^+$  (Jeney e cols., 2014; Pamplona e cols., 2007).

O tratamento com o monóxido de carbono é também relacionado a modulação da adesividade plaquetária. Animais que receberam transplante cardíaco e foram tratados com CO fizeram menor rejeição ao enxerto, sendo associada à inibição da agregação plaquetária, da trombose, do infarto do miocárdio e da apoptose. Verificou-se também que a expressão de HO-1 por células endoteliais *in vitro* inibe a agregação plaquetária e protege células endoteliais de apoptose, sendo ambas as ações mediadas pela geração de monóxido de carbono (Sato e cols., 2001). Portanto, não podemos descartar que os fenômenos observados

por nós neste trabalho sejam mediados, em parte, por alguns dos produtos gerados pela ação enzimática da HO-1.

A indução da HO-1 e liberação dos seus produtos de catálise são importantes nos fenômenos que levam a inibição da ativação e agregação de leucócitos, plaquetas e células endoteliais (Gozzelino e cols., 2010; Loboda e cols., 2008; Ryter e cols., 2006; Wagener e cols., 2003), que são fenômenos chaves na fisiopatologia da malária experimental e clínica (Schofield and Grau, 2005; Schofield and Mueller, 2006; Van den Steen e cols., 2013). Em nosso trabalho, sugerimos que ao usar o indutor da atividade da enzima HO-1, ocorreu uma melhora do quadro inflamatório que é estabelecido no pulmão em decorrência da infecção malárica, e que a melhora observada está relacionada a uma menor plaquetopenia e ativação plaquetária. Contudo, estudos adicionais são necessários para que possamos compreender melhor a resposta gerada a infecção, e nos permita assim descobrir novas estratégias de tratamento.

## 6. CONCLUSÃO

- Animais C57BL/6 infectados com PbNK65 apresentaram alta parasitemia e mortalidade no pico da infecção concomitante com o desenvolvimento de comprometimento pulmonar;
- A indução da malária pulmonar levou a uma plaquetopenia acentuada, desencadeada por intensa ativação plaquetária e menor produção de plaquetas tanto na medula óssea quanto no pulmão.
- A indução ou inibição da enzima heme oxigenase 1 não influencia no crescimento do parasita, ou seja, no desenvolvimento da infecção.
- A maior ativação da enzima HO-1 levou a uma maior sobrevida dos animais, devido a formação de um quadro inflamatório pulmonar menos intenso.
- A maior ativação da enzima HO-1, inibiu a plaquetopenia acentuada desencadeada pela infecção malárica.

## 7. PERSPECTIVAS

- Dosagem da atividade da enzima heme oxigenase através da quantificação de heme e de bilirrubina no plasma.
- Dosagem dos mediadores inflamatórios TNF, IFN- $\gamma$ , IL-10 e fator plaquetário 4 no plasma, no lavado brônquio-alveolar e no pulmão.
- Avaliação de marcadores de morte celular nas plaquetas circulantes.
- Avaliação da produção de plaquetas após os tratamentos com CoPPIX e ZnPPIX.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi K, H Tsutsui, S Kashiwamura, E Seki, H Nakano, O Takeuchi, K Takeda, K Okumura, L Van Kaer, H Okamura, S Akira, and K Nakanishi. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol* 2001.167:5928-34.
- Agarwal A, and HS Nick. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J Am Soc Nephrol* 2000.11:965-73.
- Agarwal R, A Nath, and D Gupta. Noninvasive ventilation in Plasmodium vivax related ALI/ARDS. *Intern Med* 2007.46:2007-11.
- Akamatsu Y, M Haga, S Tyagi, K Yamashita, AV Graca-Souza, R Ollinger, E Czismadia, GA May, E Ifedigbo, LE Otterbein, FH Bach, and MP Soares. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2004.18:771-2.
- Alam J, D Stewart, C Touchard, S Boinapally, AM Choi, and JL Cook. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 1999.274:26071-8.
- Amersi F, R Buelow, H Kato, B Ke, AJ Coito, XD Shen, D Zhao, J Zaky, J Melinek, CR Lassman, JK Kolls, J Alam, T Ritter, HD Volk, DG Farmer, RM Ghobrial, RW Busuttil, and JW Kupiec-Weglinski. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999.104:1631-9.
- Amino R, S Thiberge, S Shorte, F Frischknecht, and R Menard. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. *C R Biol* 2006.329:858-62.
- Anstey NM, T Handojo, MC Pain, E Kenangalem, E Tjitra, RN Price, and GP Maguire. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis* 2007.195:589-96.
- Anstey NM, SP Jacups, T Cain, T Pearson, PJ Ziesing, DA Fisher, BJ Currie, PJ Marks, and GP Maguire. Pulmonary manifestations of uncomplicated falciparum and vivax malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. *J Infect Dis* 2002.185:1326-34.
- Antinori S, A Corona, AL Ridolfo, L Galimberti, D Ricaboni, L Milazzo, and M Corbellino. Imported Plasmodium vivax malaria with severe thrombocytopaenia: can it be severe malaria or not? *Malar J* 2016.15:105.

- Antinori S, L Galimberti, L Milazzo, and M Corbellino. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012.4:e2012013.
- Antinori S, L Galimberti, L Milazzo, and M Corbellino. *Plasmodium knowlesi*: the emerging zoonotic malaria parasite. *Acta Trop* 2013.125:191-201.
- Anyona SB, P Kempaiah, E Raballah, GC Davenport, T Were, SN Konah, JM Vulule, JB Hittner, CW Gichuki, JM Ong'echa, and DJ Perkins. Reduced systemic bicyclic prostaglandin-E2 and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia. *Am J Hematol* 2012.87:782-9.
- Araujo CF, MV Lacerda, DS Abdalla, and ES Lima. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008.103:517-21.
- Armah H, EK Wired, AK Dodoo, AA Adjei, Y Tettey, and R Gyasi. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *Int J Environ Res Public Health* 2005.2:123-31.
- Arrighi RB, and I Faye. *Plasmodium falciparum* GPI toxin: a common foe for man and mosquito. *Acta Trop* 2010.114:162-5.
- Arruda MA, AG Rossi, MS de Freitas, C Barja-Fidalgo, and AV Graca-Souza. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol* 2004.173:2023-30.
- Asiedu DK, and CB Sherman. Adult respiratory distress syndrome complicating *Plasmodium falciparum* malaria. *Heart Lung* 2000.29:294-7.
- Ataide MA, WA Andrade, DS Zamboni, D Wang, C Souza Mdo, BS Franklin, S Elian, FS Martins, D Pereira, G Reed, KA Fitzgerald, DT Golenbock, and RT Gazzinelli. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS Pathog* 2014.10:e1003885.
- Aursudkij B, P Wilairatana, S Vannaphan, DS Walsh, VR Gordeux, and S Looreesuwan. Pulmonary edema in cerebral malaria patients in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998.29:541-5.
- Avraham H, S Cowley, SY Chi, S Jiang, and JE Gropman. Characterization of adhesive interactions between human endothelial cells and megakaryocytes. *J Clin Invest* 1993.91:2378-84.

- Awandare GA, B Goka, P Boeuf, JK Tetteh, JA Kurtzhals, C Behr, and BD Akanmori. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria with respiratory distress. *J Infect Dis* 2006.194:1438-46.
- Badimon L, and G Vilahur. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med* 2014.276:618-32.
- Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 2010.172:57-65.
- Bakhubaira S. Hematological Parameters in Severe Complicated *Plasmodium falciparum* Malaria among Adults in Aden. *Turk J Haematol* 2013.30:394-9.
- Balla G, HS Jacob, J Balla, M Rosenberg, K Nath, F Apple, JW Eaton, and GM Vercellotti. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 1992a.267:18148-53.
- Balla J, HS Jacob, G Balla, K Nath, and GM Vercellotti. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins: a possible mechanism limiting shock damage. *Trans Assoc Am Physicians* 1992b.105:1-6.
- Barone E, F Di Domenico, C Mancuso, and DA Butterfield. The Janus face of the heme oxygenase/biliverdin reductase system in Alzheimer disease: it's time for reconciliation. *Neurobiol Dis* 2014.62:144-59.
- Barrera V, OA Skorokhod, D Baci, G Gremo, P Arese, and E Schwarzer. Host fibrinogen stably bound to hemozoin rapidly activates monocytes via TLR-4 and CD11b/CD18-integrin: a new paradigm of hemozoin action. *Blood* 2011.117:5674-82.
- Baruch DI. Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999.12:747-61.
- Beaulieu LM, and JE Freedman. The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb Res* 2010.125:205-9.
- Beaulieu LM, E Lin, E Mick, M Koupenova, EO Weinberg, CD Kramer, CA Genco, K Tanriverdi, MG Larson, EJ Benjamin, and JE Freedman. Interleukin 1 receptor 1 and interleukin 1beta regulate megakaryocyte maturation, platelet activation, and transcript profile during inflammation in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014.34:552-64.
- Behnke O, and A Forer. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl* 1998.61:3-23.
- Berberat PO, M Katori, E Kaczmarek, D Anselmo, C Lassman, B Ke, X Shen, RW Busuttill, K Yamashita, E Csizmadia, S Tyagi, LE Otterbein, S Brouard, E Tobiasch, FH Bach,

- JW Kupiec-Weglinski, and MP Soares. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2003.17:1724-6.
- Berger G, JM Masse, and EM Cramer. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood* 1996.87:1385-95.
- Berndt MC, P Metharom, and RK Andrews. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia* 2014.20 Suppl 4:15-22.
- Bhatt DL, and EJ Topol. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2003.2:15-28.
- Birrane G, H Li, S Yang, SD Tachado, and S Seng. Cigarette smoke induces nuclear translocation of heme oxygenase 1 (HO-1) in prostate cancer cells: nuclear HO-1 promotes vascular endothelial growth factor secretion. *Int J Oncol* 2013.42:1919-28.
- Blair P, and R Flaumenhaft. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009.23:177-89.
- Blanks JE, T Moll, R Eytner, and D Vestweber. Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates beta 2-integrin mediated cell attachment to ICAM-1. *Eur J Immunol* 1998.28:433-43.
- Blanloeil Y, D Baron, AY de Lajartre, and F Nicolas. [Acute respiratory distress syndrome (ARDS) in cerebral malaria (author's transl)]. *Sem Hop* 1980.56:1088-90.
- Blasius AL, and B Beutler. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010.32:305-15.
- Bonelli M, A Savitskaya, CW Steiner, E Rath, M Bilban, O Wagner, FH Bach, JS Smolen, and C Scheinecker. Heme oxygenase-1 end-products carbon monoxide and biliverdin ameliorate murine collagen induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2012.30:73-8.
- Bonifacio A, S Finaurini, C Krafft, S Parapini, D Taramelli, and V Sergio. Spatial distribution of heme species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* by use of resonance Raman imaging and multivariate analysis. *Anal Bioanal Chem* 2008.392:1277-82.
- Bostrom S, P Giusti, C Arama, JO Persson, V Dara, B Traore, A Dolo, O Doumbo, and M Troye-Blomberg. Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to *Plasmodium falciparum* infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J* 2012.11:109.
- Bouyou-Akotet MK, M Kombila, PG Kremsner, and E Mavoungou. Cytokine profiles in peripheral, placental and cord blood in pregnant women from an area endemic for *Plasmodium falciparum*. *Eur Cytokine Netw* 2004.15:120-5.

- Bozza FA, AM Shah, AS Weyrich, and GA Zimmerman. Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009.40:123-34.
- Brass LF, KM Wannemacher, P Ma, and TJ Stalker. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. *J Thromb Haemost* 2011.9 Suppl 1:66-75.
- Brouard S, LE Otterbein, J Anrather, E Tobiasch, FH Bach, AM Choi, and MP Soares. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 2000.192:1015-26.
- Broz P, and DM Monack. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 2013.13:551-65.
- Caillard V, A Beaute-Lafitte, AG Chabaud, and I Landau. Plasmodium vinckei petteri: identification of the stages sensitive to arteether. *Exp Parasitol* 1992.75:449-56.
- Calay D, and JC Mason. The multifunctional role and therapeutic potential of HO-1 in the vascular endothelium. *Antioxid Redox Signal* 2014.20:1789-809.
- Cambos M, S Bazinet, E Abed, J Sanchez-Dardon, C Bernard, R Moreau, M Olivier, and T Scorza. The IL-12p70/IL-10 interplay is differentially regulated by free heme and hemozoin in murine bone-marrow-derived macrophages. *Int J Parasitol* 2010.40:1003-12.
- Carvalho BO, SC Lopes, PA Nogueira, PP Orlandi, DY Bargieri, YC Blanco, R Mamoni, JA Leite, MM Rodrigues, IS Soares, TR Oliveira, G Wunderlich, MV Lacerda, HA del Portillo, MO Araujo, B Russell, R Suwanarusk, G Snounou, L Renia, and FT Costa. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 2010.202:638-47.
- Casals-Pascual C, O Kai, CR Newton, N Peshu, and DJ Roberts. Thrombocytopenia in falciparum malaria is associated with high concentrations of IL-10. *Am J Trop Med Hyg* 2006.75:434-6.
- Casola A, RP Garofalo, H Haeberle, TF Elliott, R Lin, M Jamaluddin, and AR Brasier. Multiple cis regulatory elements control RANTES promoter activity in alveolar epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 2001.75:6428-39.
- Castany S, M Carcole, S Leanez, and O Pol. The role of carbon monoxide on the anti-nociceptive effects and expression of cannabinoid 2 receptors during painful diabetic neuropathy in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2016.233:2209-19.

- Caudrillier A, K Kessenbrock, BM Gilliss, JX Nguyen, MB Marques, M Monestier, P Toy, Z Werb, and MR Looney. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2012.122:2661-71.
- Chakravarty S, IA Cockburn, S Kuk, MG Overstreet, JB Sacci, and F Zavala. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med* 2007.13:1035-41.
- Chan O, JD Burke, DF Gao, and EN Fish. The chemokine CCL5 regulates glucose uptake and AMP kinase signaling in activated T cells to facilitate chemotaxis. *J Biol Chem* 2012.287:29406-16.
- Chang YW, PW Hsieh, YT Chang, MH Lu, TF Huang, KY Chong, HR Liao, JC Cheng, and CP Tseng. Identification of a novel platelet antagonist that binds to CLEC-2 and suppresses podoplanin-induced platelet aggregation and cancer metastasis. *Oncotarget* 2015.6:42733-48.
- Chiang EY, A Hidalgo, J Chang, and PS Frenette. Imaging receptor microdomains on leukocyte subsets in live mice. *Nat Methods* 2007.4:219-22.
- Chimma P, C Roussillon, P Sratongno, R Ruangveerayuth, K Pattanapanyasat, JL Perignon, DJ Roberts, and P Druilhe. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* 2009.5:e1000631.
- Chinnappan S, VS Ramachandrappa, K Tamilarasu, UM Krishnan, AK Pillai, and S Rajendiran. Inhibition of Platelet Aggregation by the Leaf Extract of *Carica papaya* During Dengue Infection: An In Vitro Study. *Viral Immunol* 2016.29:164-8.
- Choe WH, YU Cho, JD Chae, and SH Kim. Pseudothrombocytopenia or platelet clumping as a possible cause of low platelet count in patients with viral infection: a case series from single institution focusing on hepatitis A virus infection. *Int J Lab Hematol* 2013.35:70-6.
- Churg AM, JL Myers, HD Tazelaar, and JL Wright. *Thurlbeck's Pathology of the Lung*. Thieme Medical Publishers, Inc. 2005.3rd edition:1157.
- Claessens A, Y Adams, A Ghumra, G Lindergard, CC Buchan, C Andisi, PC Bull, S Mok, AP Gupta, CW Wang, L Turner, M Arman, A Raza, Z Bozdech, and JA Rowe. A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012.109:E1772-81.
- Clark IA, and KA Rockett. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol Today* 1994.10:410-2.

- Coban C, KJ Ishii, T Kawai, H Hemmi, S Sato, S Uematsu, M Yamamoto, O Takeuchi, S Itagaki, N Kumar, T Horii, and S Akira. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005.201:19-25.
- Coban C, KJ Ishii, S Uematsu, N Arisue, S Sato, M Yamamoto, T Kawai, O Takeuchi, H Hisaeda, T Horii, and S Akira. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol* 2007.19:67-79.
- Coelho HC, SC Lopes, JP Pimentel, PA Nogueira, FT Costa, AM Siqueira, GC Melo, WM Monteiro, A Malheiro, and MV Lacerda. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. *PLoS One* 2013.8:e63410.
- Cognasse F, H Hamzeh-Cognasse, S Lafarge, P Chavarin, M Cogne, Y Richard, and O Garraud. Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins. *Exp Hematol* 2007.35:1376-87.
- Coller BS, and SJ Shattil. The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* 2008.112:3011-25.
- Collins WE. *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. *Annu Rev Entomol* 2012.57:107-21.
- Combes V, N Coltel, D Faille, SC Wassmer, and GE Grau. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 2006.36:541-6.
- Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005.3:1800-14.
- Cox-Singh J, J Hiu, SB Lucas, PC Divis, M Zulkarnaen, P Chandran, KT Wong, P Adem, SR Zaki, B Singh, and S Krishna. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J* 2010.9:10.
- Cozzi A, B Corsi, S Levi, P Santambrogio, G Biasiotto, and P Arosio. Analysis of the biologic functions of H- and L-ferritins in HeLa cells by transfection with siRNAs and cDNAs: evidence for a proliferative role of L-ferritin. *Blood* 2004.103:2377-83.
- Cozzi A, S Levi, B Corsi, P Santambrogio, A Campanella, G Gerardi, and P Arosio. Role of iron and ferritin in TNFalpha-induced apoptosis in HeLa cells. *FEBS Lett* 2003.537:187-92.
- Cserti-Gazdewich CM, A Dhabangi, C Musoke, I Ssewanyana, H Ddungu, D Nakiboneka-Ssenabulya, N Nabukeera-Barungi, A Mpimbaza, and WH Dzik. Cytoadherence in paediatric malaria: ABO blood group, CD36, and ICAM1 expression and severe *Plasmodium falciparum* infection. *Br J Haematol* 2012.159:223-36.

- Cunha CB, and BA Cunha. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J Vector Borne Dis* 2008.45:194-9.
- Czapiga M, AD Kirk, and J Lekstrom-Himes. Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation. *Exp Hematol* 2004.32:135-9.
- da Costa Martins PA, JM van Gils, A Mol, PL Hordijk, and JJ Zwaginga. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J Leukoc Biol* 2006.79:499-507.
- Dalko E, V Gaudreault, J Sanchez Dardon, R Moreau, and T Scorza. Preconditioning with heme decreases *Plasmodium chabaudi* adami parasitemia and inhibits erythropoiesis in BALB/c mice. *PLoS One* 2013.8:e54744.
- Dalko E, D Genete, F Auger, C Dovergne, C Lambert, F Herbert, PA Cazenave, J Roland, and S Pied. Heme dampens T-cell sequestration by modulating glial cell responses during rodent cerebral malaria. *Brain Behav Immun* 2016.58:280-290.
- Damas JK, M Jensenius, T Ueland, K Otterdal, A Yndestad, SS Froland, JM Rolain, B Myrvang, D Raoult, and P Aukrust. Increased levels of soluble CD40L in African tick bite fever: possible involvement of TLRs in the pathogenic interaction between *Rickettsia africae*, endothelial cells, and platelets. *J Immunol* 2006.177:2699-706.
- Damjanovic D, M Divangahi, K Kugathasan, CL Small, A Zganiacz, EG Brown, CM Hogaboam, J Gauldie, and Z Xing. Negative regulation of lung inflammation and immunopathology by TNF-alpha during acute influenza infection. *Am J Pathol* 2011.179:2963-76.
- Davi G, and C Patrono. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007.357:2482-94.
- Davis RE, PE Stenberg, J Levin, and JH Beckstead. Localization of megakaryocytes in normal mice and following administration of platelet antiserum, 5-fluorouracil, or radiostrontium: evidence for the site of platelet production. *Exp Hematol* 1997.25:638-48.
- de Azevedo-Quintanilha IG, A Vieira-de-Abreu, AC Ferreira, DO Nascimento, AM Siqueira, RA Campbell, TP Teixeira Ferreira, TM Gutierrez, GM Ribeiro, ES PM, AR Carvalho, PT Bozza, GA Zimmerman, and HC Castro-Faria-Neto. Integrin alphaDbeta2 (CD11d/CD18) mediates experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome (MA-ARDS). *Malar J* 2016.15:393.



- de Gaetano G, and C Cerletti. Platelet adhesion and aggregation and fibrin formation in flowing blood: a historical contribution by Giulio Bizzozero. *Platelets* 2002.13:85-9.
- de Mast Q, E Groot, PJ Lenting, PG de Groot, M McCall, RW Sauerwein, R Fijnheer, and A van der Ven. Thrombocytopenia and release of activated von Willebrand Factor during early *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2007.196:622-8.
- de Souza JB, JC Hafalla, EM Riley, and KN Couper. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 2010a.137:755-72.
- de Souza JB, M Runglall, PH Corran, LC Okell, S Kumar, DC Gowda, KN Couper, and EM Riley. Neutralization of malaria glycosylphosphatidylinositol in vitro by serum IgG from malaria-exposed individuals. *Infect Immun* 2010b.78:3920-9.
- del Portillo HA, C Fernandez-Becerra, S Bowman, K Oliver, M Preuss, CP Sanchez, NK Schneider, JM Villalobos, MA Rajandream, D Harris, LH Pereira da Silva, B Barrell, and M Lanzer. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 2001.410:839-42.
- Deroost K, A Tyberghein, N Lays, S Noppen, E Schwarzer, E Vanstreels, M Komuta, M Prato, JW Lin, A Pamplona, CJ Janse, P Arese, T Roskams, D Daelemans, G Opendakker, and PE Van den Steen. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013.48:589-600.
- Deshpande P, and P Shastry. Modulation of cytokine profiles by malaria pigment--hemozoin: role of IL-10 in suppression of proliferative responses of mitogen stimulated human PBMC. *Cytokine* 2004.28:205-13.
- Dey S, S Mazumder, AA Siddiqui, MS Iqbal, C Banerjee, S Sarkar, R De, M Goyal, S Bindu, and U Bandyopadhyay. Association of heme oxygenase 1 with the restoration of liver function after damage in murine malaria by *Plasmodium yoelii*. *Infect Immun* 2014.82:3113-26.
- Diao M, S Zhang, L Wu, L Huan, F Huang, Y Cui, and Z Lin. Hydrogen Gas Inhalation Attenuates Seawater Instillation-Induced Acute Lung Injury via the Nrf2 Pathway in Rabbits. *Inflammation* 2016.39:2029-2039.
- Dostert C, G Guarda, JF Romero, P Menu, O Gross, A Tardivel, ML Suva, JC Stehle, M Kopf, I Stamenkovic, G Corradin, and J Tschopp. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One* 2009.4:e6510.
- Dulak J, and A Jozkowicz. Novel faces of heme oxygenase-1: mechanisms and therapeutic potentials. *Antioxid Redox Signal* 2014.20:1673-6.

- Dunois-Larde C, C Capron, S Fichelson, T Bauer, E Cramer-Borde, and D Baruch. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood* 2009.114:1875-83.
- Durante W. Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011.16:2372-88.
- Dutra FF, and MT Bozza. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* 2014.5:115.
- Elzey BD, TL Ratliff, JM Sowa, and SA Crist. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb Res* 2011.127:180-3.
- Elzey BD, NW Schmidt, SA Crist, TP Kresowik, JT Harty, B Nieswandt, and TL Ratliff. Platelet-derived CD154 enables T-cell priming and protection against *Listeria monocytogenes* challenge. *Blood* 2008.111:3684-91.
- Elzey BD, J Tian, RJ Jensen, AK Swanson, JR Lees, SR Lentz, CS Stein, B Nieswandt, Y Wang, BL Davidson, and TL Ratliff. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* 2003.19:9-19.
- Engelmann B, and S Massberg. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013.13:34-45.
- Epiphanyo S, SA Mikolajczak, LA Goncalves, A Pamplona, S Portugal, S Albuquerque, M Goldberg, S Rebelo, DG Anderson, A Akinc, HP Vornlocher, SH Kappe, MP Soares, and MM Mota. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. *Cell Host Microbe* 2008.3:331-8.
- Erel O, H Vural, N Aksoy, G Aslan, and M Ulukanligil. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clin Biochem* 2001.34:341-4.
- Escolar G, M Krumwiede, and JG White. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol* 1986.123:86-94.
- Escolar G, and JG White. The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells* 1991.17:467-85; discussion 486-95.
- Evangelista V, Z Pamuklar, A Piccoli, S Manarini, G Dell'elba, R Pecce, N Martelli, L Federico, M Rojas, G Berton, CA Lowell, L Totani, and SS Smyth. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* 2007.109:2461-9.
- Faille D, V Combes, AJ Mitchell, A Fontaine, I Juhan-Vague, MC Alessi, G Chimini, T Fusai, and GE Grau. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J* 2009a.23:3449-58.

- Faille D, F El-Assaad, MC Alessi, T Fusai, V Combes, and GE Grau. Platelet-endothelial cell interactions in cerebral malaria: the end of a cordial understanding. *Thromb Haemost* 2009b.102:1093-102.
- Fang H, S Zhang, W Guo, S Cao, B Yan, Y Lu, and J Li. Cobalt protoporphyrin protects the liver against apoptosis in rats of brain death. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015.39:475-81.
- Fang S, B Liu, Q Sun, J Zhao, H Qi, and Q Li. Platelet factor 4 inhibits IL-17/Stat3 pathway via upregulation of SOCS3 expression in melanoma. *Inflammation* 2014.37:1744-50.
- Fatih FA, A Siner, A Ahmed, LC Woon, AG Craig, B Singh, S Krishna, and J Cox-Singh. Cytoadherence and virulence - the case of *Plasmodium knowlesi* malaria. *Malar J* 2012.11:33.
- Feldman RM, and C Singer. Noncardiogenic pulmonary edema and pulmonary fibrosis in falciparum malaria. *Rev Infect Dis* 1987.9:134-9.
- Ferreira A, J Balla, V Jeney, G Balla, and MP Soares. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med (Berl)* 2008.86:1097-111.
- Ferro-Novick S, and R Jahn. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 1994.370:191-3.
- Figueiredo RT, PL Fernandez, DS Mourao-Sa, BN Porto, FF Dutra, LS Alves, MF Oliveira, PL Oliveira, AV Graca-Souza, and MT Bozza. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2007.282:20221-9.
- Findlay EG, R Greig, JS Stumhofer, JC Hafalla, JB de Souza, CJ Saris, CA Hunter, EM Riley, and KN Couper. Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection. *J Immunol* 2010.185:2482-92.
- Flaumenhaft R, K Croce, E Chen, B Furie, and BC Furie. Proteins of the exocytotic core complex mediate platelet alpha-granule secretion. Roles of vesicle-associated membrane protein, SNAP-23, and syntaxin 4. *J Biol Chem* 1999.274:2492-501.
- Francis SE, DJ Sullivan, Jr., and DE Goldberg. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 1997.51:97-123.
- Franke-Fayard B, J Fonager, A Braks, SM Khan, and CJ Janse. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog* 2010.6:e1001032.
- Franke-Fayard B, CJ Janse, M Cunha-Rodrigues, J Ramesar, P Buscher, I Que, C Lowik, PJ Voshol, MA den Boer, SG van Duinen, M Febbraio, MM Mota, and AP Waters.

- Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005.102:11468-73.
- Franklin BS, SO Rodrigues, LR Antonelli, RV Oliveira, AM Goncalves, PA Sales-Junior, EP Valente, JI Alvarez-Leite, C Ropert, DT Golenbock, and RT Gazzinelli. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes Infect* 2007.9:881-90.
- Fredman G, TE Van Dyke, and CN Serhan. Resolvin E1 regulates adenosine diphosphate activation of human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010.30:2005-13.
- Freedman JE. Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis. *Circulation* 2005.112:2725-34.
- Freitas C, MC Assis, AM Saliba, VM Morandi, CC Figueiredo, M Pereira, and MC Plotkowski. The infection of microvascular endothelial cells with ExoU-producing *Pseudomonas aeruginosa* triggers the release of von Willebrand factor and platelet adhesion. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012.107:728-34.
- Frevert U, I Usynin, K Baer, and C Klotz. Nomadic or sessile: can Kupffer cells function as portals for malaria sporozoites to the liver? *Cell Microbiol* 2006.8:1537-46.
- Fu Y, Y Ding, T Zhou, X Fu, and W Xu. *Plasmodium yoelii* blood-stage primes macrophage-mediated innate immune response through modulation of toll-like receptor signalling. *Malar J* 2012.11:104.
- Fuentes R, Y Wang, J Hirsch, C Wang, L Rauova, GS Worthen, MA Kowalska, and M Poncz. Infusion of mature megakaryocytes into mice yields functional platelets. *J Clin Invest* 2010.120:3917-22.
- Gachot B, M Wolff, G Nissack, B Veber, and F Vachon. Acute lung injury complicating imported *Plasmodium falciparum* malaria. *Chest* 1995.108:746-9.
- Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med* 2010.30:93-129.
- Garraud O, and F Cognasse. Platelet Toll-like receptor expression: the link between "danger" ligands and inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010.9:322-33.
- Gaur D, and CE Chitnis. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. *Curr Opin Microbiol* 2011.14:422-8.
- Gawaz M, H Langer, and AE May. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005.115:3378-84.
- Gay LJ, and B Felding-Habermann. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011.11:123-34.

- Gazzinelli RT, P Kalantari, KA Fitzgerald, and DT Golenbock. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 2014.14:744-57.
- Gerardin P, C Rogier, AS Ka, P Jouvencel, V Brousse, and P Imbert. Prognostic value of thrombocytopenia in African children with falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2002.66:686-91.
- Gerardin P, C Rogier, AS Ka, P Jouvencel, B Diatta, and P Imbert. Outcome of life-threatening malaria in African children requiring endotracheal intubation. *Malar J* 2007.6:51.
- Ginsberg MH, and PM Henson. Enhancement of platelet response to immune complexes and IgG aggregates by lipid A-rich bacterial lipopolysaccharides. *J Exp Med* 1978.147:207-17.
- Golebiewska EM, and AW Poole. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 2015.29:153-62.
- Goncalves R, X Zhang, H Cohen, A Debrabant, and DM Mosser. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 2011.208:1253-65.
- Gordon MY, AD Bearpark, D Clarke, and CR Dowding. Haemopoietic stem cell subpopulations in mouse and man: discrimination by differential adherence and marrow repopulating ability. *Bone Marrow Transplant* 1990.5 Suppl 1:6-8.
- Gowda DC, and EA Davidson. Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitol Today* 1999.15:147-52.
- Gozzelino R, V Jeney, and MP Soares. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010.50:323-54.
- Gramaglia I, H Sahlin, JP Nolan, JA Frangos, M Intaglietta, and HC van der Heyde. Cell-rather than antibody-mediated immunity leads to the development of profound thrombocytopenia during experimental *Plasmodium berghei* malaria. *J Immunol* 2005.175:7699-707.
- Grau GE, CD Mackenzie, RA Carr, M Redard, G Pizzolato, C Allasia, C Cataldo, TE Taylor, and ME Molyneux. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis* 2003.187:461-6.
- Grau GE, PF Piguet, D Gretener, C Vesin, and PH Lambert. Immunopathology of thrombocytopenia in experimental malaria. *Immunology* 1988.65:501-6.
- Greene JA, N Sam-Agudu, CC John, RO Opoka, PA Zimmerman, and JW Kazura. Toll-like receptor polymorphisms and cerebral malaria: TLR2 Delta22 polymorphism is

- associated with protection from cerebral malaria in a case control study. *Malar J* 2012.11:47.
- Gremmel T, AL Frelinger, 3rd, and AD Michelson. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 2016.42:191-204.
- Grommes J, JE Alard, M Drechsler, S Wantha, M Morgelin, WM Kuebler, M Jacobs, P von Hundelshausen, P Markart, M Wygrecka, KT Preissner, TM Hackeng, RR Koenen, C Weber, and O Soehnlein. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2012.185:628-36.
- Gueirard P, J Tavares, S Thiberge, F Bernex, T Ishino, G Milon, B Franke-Fayard, CJ Janse, R Menard, and R Amino. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010.107:18640-5.
- Guidot DM, HG Folkesson, L Jain, JI Sznajder, JF Pittet, and MA Matthay. Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006.291:L301-6.
- Gursel O, AA Atay, AE Kurekci, F Avcu, O Nevruz, Z Senses, E Ozturk, A Hasimi, and O Ozcan. Platelet aggregation in children with *Helicobacter pylori* infection. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010.16:637-42.
- Ha JG, L Li, D Lee, S Na, KS Ha, YM Kim, JH Ko, and JY Hwang. The Effects of Heme Oxygenase By-Products on the Proliferation and Invasion of HUVECs, HTR-8/SVneo Cells, 3A(tPA 30-1) Cells, and HESCs Under Varying Oxygen Concentrations. *Reprod Sci* 2015.22:1530-8.
- Haas S, J Hansson, D Klimmeck, D Loeffler, L Velten, H Uckelmann, S Wurzer, AM Prendergast, A Schnell, K Hexel, R Santarella-Mellwig, S Blaszkiewicz, A Kuck, H Geiger, MD Milsom, LM Steinmetz, T Schroeder, A Trumpp, J Krijgsveld, and MA Essers. Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell Stem Cell* 2015.17:422-34.
- Hagau N, A Slavcovici, DN Gongnanau, S Oltean, DS Dirzu, ES Brezoszki, M Maxim, C Ciuce, M Mlesnite, RL Gavrus, C Laslo, R Hagau, M Petrescu, and DM Studnicska. Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Crit Care* 2010.14:R203.
- Hancock WW, R Buelow, MH Sayegh, and LA Turka. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 1998.4:1392-6.

- Hanisch BR, P Bangirana, RO Opoka, GS Park, and CC John. Thrombocytopenia May Mediate Disease Severity in Plasmodium falciparum Malaria Through Reduced Transforming Growth Factor Beta-1 Regulation of Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines. *Pediatr Infect Dis J* 2015.34:783-8.
- Hansen DS, MC D'Ombrian, and L Schofield. The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. *Curr Opin Immunol* 2007.19:416-23.
- Hayashi S, R Takamiya, T Yamaguchi, K Matsumoto, SJ Tojo, T Tamatani, M Kitajima, N Makino, Y Ishimura, and M Suematsu. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999.85:663-71.
- Haydoura S, O Mazboudi, K Charafeddine, I Bouakl, TA Baban, AT Taher, and SS Kanj. Transfusion-related Plasmodium ovale malaria complicated by acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a non-endemic country. *Parasitol Int* 2010.60:114-6.
- He M, M Nitti, S Piras, AL Furfaro, N Traverso, MA Pronzato, and GE Mann. Heme oxygenase-1-derived bilirubin protects endothelial cells against high glucose-induced damage. *Free Radic Biol Med* 2015.89:91-8.
- Hiekkanen T, K Skogberg, and V Pettila. Evolution of plasma proinflammatory cytokines in malaria-related ARDS treated with corticosteroids. *Intensive Care Med* 2001.27:1823-4.
- Hira S, T Tomita, T Matsui, K Igarashi, and M Ikeda-Saito. Bach1, a heme-dependent transcription factor, reveals presence of multiple heme binding sites with distinct coordination structure. *IUBMB Life* 2007.59:542-51.
- Hottz ED, JF Lopes, C Freitas, R Valls-de-Souza, MF Oliveira, MT Bozza, AT Da Poian, AS Weyrich, GA Zimmerman, FA Bozza, and PT Bozza. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* 2013.122:3405-14.
- Hottz ED, IM Medeiros-de-Moraes, A Vieira-de-Abreu, EF de Assis, R Vals-de-Souza, HC Castro-Faria-Neto, AS Weyrich, GA Zimmerman, FA Bozza, and PT Bozza. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol* 2014.193:1864-72.
- Howell WH, and DD Donahue. The production of blood platelets in the lungs. *J. Exp. Medical* 1937.65:177-203.

- Hughes KR, GA Biagini, and AG Craig. Continued cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells after antimalarial treatment. *Mol Biochem Parasitol* 2010.169:71-8.
- Hunt NH, and GE Grau. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 2003.24:491-9.
- Huo Y, A Schober, SB Forlow, DF Smith, MC Hyman, S Jung, DR Littman, C Weber, and K Ley. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 2003.9:61-7.
- Ikezawa H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull* 2002.25:409-17.
- Iraqi M, J Perdomo, F Yan, PY Choi, and BH Chong. Immune thrombocytopenia: antiplatelet autoantibodies inhibit proplatelet formation by megakaryocytes and impair platelet production in vitro. *Haematologica* 2015.100:623-32.
- Ishikawa K, D Sugawara, J Goto, Y Watanabe, K Kawamura, M Shiomi, H Itabe, and Y Maruyama. Heme oxygenase-1 inhibits atherogenesis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 2001.104:1831-6.
- Ishikawa M, S Numazawa, and T Yoshida. Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1. *Free Radic Biol Med* 2005.38:1344-52.
- Italiano JE, Jr. Unraveling mechanisms that control platelet production. *Semin Thromb Hemost* 2013.39:15-24.
- Italiano JE, Jr., P Lecine, RA Shivdasani, and JH Hartwig. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999.147:1299-312.
- Jaff MS, D McKenna, and SR McCann. Platelet phagocytosis: a probable mechanism of thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Pathol* 1985.38:1318-9.
- Janes JH, CP Wang, E Levin-Edens, I Vigan-Womas, M Guillotte, M Melcher, O Mercereau-Puijalon, and JD Smith. Investigating the host binding signature on the *Plasmodium falciparum* PfEMP1 protein family. *PLoS Pathog* 2011.7:e1002032.
- Jeney V, S Ramos, ML Bergman, I Bechmann, J Tischer, A Ferreira, V Oliveira-Marques, CJ Janse, S Rebelo, S Cardoso, and MP Soares. Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide. *Cell Rep* 2014.8:126-36.
- Jenne CN, and P Kubes. Platelets in inflammation and infection. *Platelets* 2015.26:286-92.
- Jin RB, PF Zhu, ZG Wang, DW Liu, and JH Zhou. Changes of pulmonary intercellular adhesion molecule-1 and CD11b/CD18 in peripheral polymorphonuclear neutrophils and their significance at the early stage of burns. *Chin J Traumatol* 2003.6:156-9.



- Jordan HE. The origin and significance of the megakaryocytes of the lung. *Anat. Rec.* 1940.77:99-101.
- Junt T, H Schulze, Z Chen, S Massberg, T Goerge, A Krueger, DD Wagner, T Graf, JE Italiano, Jr., RA Shivdasani, and UH von Andrian. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007.317:1767-70.
- Kalantari P, RB DeOliveira, J Chan, Y Corbett, V Rathinam, A Stutz, E Latz, RT Gazzinelli, DT Golenbock, and KA Fitzgerald. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep* 2014.6:196-210.
- Kaneider NC, A Kaser, H Tilg, G Ricevuti, and CJ Wiedermann. CD40 ligand-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells by activated platelets. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003.16:225-31.
- Kasirer-Friede A, ML Kahn, and SJ Shattil. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev* 2007.218:247-64.
- Kasper B, E Brandt, S Brandau, and F Petersen. Platelet factor 4 (CXC chemokine ligand 4) differentially regulates respiratory burst, survival, and cytokine expression of human monocytes by using distinct signaling pathways. *J Immunol* 2007.179:2584-91.
- Kawakami K, J Kadota, K Iida, T Fujii, R Shirai, Y Matsubara, and S Kohno. Phenotypic characterization of T cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood of patients with diffuse panbronchiolitis; the importance of cytotoxic T cells. *Clin Exp Immunol* 1997.107:410-6.
- Kawashima A, Y Oda, A Yachie, S Koizumi, and I Nakanishi. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* 2002.33:125-30.
- Ke B, XD Shen, R Buelow, J Melinek, F Amersi, F Gao, T Ritter, HD Volk, RW Busuttill, and JW Kupiec-Weglinski. Heme oxygenase-1 gene transfer prevents CD95/FasL-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Transplant Proc* 2002.34:1465-6.
- Kelton JG, J Keystone, J Moore, G Denomme, E Tozman, M Glynn, PB Neame, J Gauldie, and J Jensen. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. *J Clin Invest* 1983.71:832-6.
- Klotz C, and U Frevert. Plasmodium yoelii sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. *Int J Parasitol* 2008.38:1639-50.
- Kordes M, K Matuschewski, and JC Hafalla. Caspase-1 activation of interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-18 is dispensable for induction of experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 2011.79:3633-41.

- Kosaka J, H Morimatsu, T Takahashi, H Shimizu, S Kawanishi, E Omori, Y Endo, N Tamaki, M Morita, and K Morita. Effects of biliverdin administration on acute lung injury induced by hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *PLoS One* 2013.8:e63606.
- Krishnegowda G, AM Hajjar, J Zhu, EJ Douglass, S Uematsu, S Akira, AS Woods, and DC Gowda. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 2005.280:8606-16.
- Kumar S, NM Gowda, X Wu, RN Gowda, and DC Gowda. CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells. *Parasite Immunol* 2012.34:372-82.
- Kumar S, M Melzer, P Dodds, J Watson, and R Ord. *P. vivax* malaria complicated by shock and ARDS. *Scand J Infect Dis* 2007.39:255-6.
- Kunicki TJ. Platelet glycoprotein antigens and immune receptors. *Prog Clin Biol Res* 1988.283:87-123.
- Kurtzhals JA, V Adabayeri, BQ Goka, BD Akanmori, JO Oliver-Commey, FK Nkrumah, C Behr, and L Hviid. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 1998.351:1768-72.
- Lacerda-Queiroz N, OC Lima, CM Carneiro, MC Vilela, AL Teixeira, A Teixeira-Carvalho, MS Araujo, OA Martins-Filho, EM Braga, and J Carvalho-Tavares. *Plasmodium berghei* NK65 induces cerebral leukocyte recruitment in vivo: an intravital microscopic study. *Acta Trop* 2011.120:31-9.
- Lacerda-Queiroz N, DH Rodrigues, MC Vilela, MA Rachid, FM Soriani, LP Sousa, RD Campos, VF Quesniaux, MM Teixeira, and AL Teixeira. Platelet-activating factor receptor is essential for the development of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* 2012.180:246-55.
- Lacerda MV, SC Fragoso, MG Alecrim, MA Alexandre, BM Magalhaes, AM Siqueira, LC Ferreira, JR Araujo, MP Mourao, M Ferrer, P Castillo, L Martin-Jaular, C Fernandez-Becerra, H Del Portillo, J Ordi, PL Alonso, and Q Bassat. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of *Plasmodium vivax* Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? *Clin Infect Dis* 2012a.55:e67-74.
- Lacerda MV, MP Mourao, MA Alexandre, AM Siqueira, BM Magalhaes, FE Martinez-Espinosa, FS Filho, P Brasil, AM Ventura, MS Tada, VS Couto, AR Silva, RS Silva, and MG Alecrim. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium*

- vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J* 2012b.11:12.
- Lacerda MV, MP Mourao, HC Coelho, and JB Santos. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011.106 Suppl 1:52-63.
- LaCrue AN, M Scheel, K Kennedy, N Kumar, and DE Kyle. Effects of artesunate on parasite recrudescence and dormancy in the rodent malaria model *Plasmodium vinckei*. *PLoS One* 2011.6:e26689.
- Lam A, N Vetal, S Matalon, and S Aggarwal. Role of heme in bromine-induced lung injury. *Ann N Y Acad Sci* 2016.1374:105-10.
- Lamb TJ, DE Brown, AJ Potocnik, and J Langhorne. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* 2006.8:1-22.
- Langhorne J, FM Ndungu, AM Sponaas, and K Marsh. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 2008.9:725-32.
- Lee DS, CS Yoon, YT Jung, JH Yoon, YC Kim, and H Oh. Marine-Derived Secondary Metabolite, Griseusrazin A, Suppresses Inflammation through Heme Oxygenase-1 Induction in Activated RAW264.7 Macrophages. *J Nat Prod* 2016a.79:1105-11.
- Lee JW, JW Park, NR Shin, SY Park, OK Kwon, HA Park, Y Lim, HW Ryu, HJ Yuk, JH Kim, SR Oh, and KS Ahn. *Picrasma quassiodes* (D. Don) Benn. attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury. *Int J Mol Med* 2016b.38:834-44.
- Lee SJ, HK Kang, DK Song, WS Eum, J Park, SY Choi, and HY Kwon. Transduction of PEP-1-heme oxygenase-1 into insulin-producing INS-1 cells protects them against cytokine-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2015.461:549-54.
- Lehr HA, AS Weyrich, RK Saetzler, A Jurek, KE Arfors, GA Zimmerman, SM Prescott, and TM McIntyre. Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking. *J Clin Invest* 1997.99:2358-64.
- Levine RF, A Eldor, PK Shoff, S Kirwin, D Tenza, and EM Cramer. Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol* 1993.51:233-46.
- Li C, E Seixas, and J Langhorne. Rodent malarial: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. *Med Microbiol Immunol* 2001.189:115-26.
- Li C, and R Stocker. Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. *Redox Rep* 2009.14:95-101.
- Li J, S Pattaradilokrat, F Zhu, H Jiang, S Liu, L Hong, Y Fu, L Koo, W Xu, W Pan, JM Carlton, O Kaneko, R Carter, JC Wootton, and XZ Su. Linkage maps from multiple

- genetic crosses and loci linked to growth-related virulent phenotype in *Plasmodium yoelii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011.108:E374-82.
- Li L, RF Hamilton, Jr., and A Holian. Protection against ozone-induced pulmonary inflammation and cell death by endotoxin pretreatment in mice: role of HO-1. *Inhal Toxicol* 2000.12:1225-38.
- Li X, and J David Clark. Chronic morphine exposure and the expression of heme oxygenase type 2. *Brain Res Mol Brain Res* 2000.75:179-84.
- Li XL, J Cao, L Fan, Q Wang, L Ye, CP Cui, YZ Wang, L Liu, B Li, RJ Wu, FC Zhou, and JH Zhang. Genetic polymorphisms of HO-1 and COX-1 are associated with aspirin resistance defined by light transmittance aggregation in Chinese Han patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2013.19:513-21.
- Lin Q, S Weis, G Yang, YH Weng, R Helston, K Rish, A Smith, J Bordner, T Polte, F Gaunitz, and PA Dennerly. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem* 2007.282:20621-33.
- Linares M, P Marin-Garcia, G Martinez-Chacon, S Perez-Benavente, A Puyet, A Diez, and JM Bautista. Glutathione peroxidase contributes with heme oxygenase-1 to redox balance in mouse brain during the course of cerebral malaria. *Biochim Biophys Acta* 2013.1832:2009-18.
- Lindemann S, B Kramer, P Seizer, and M Gawaz. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2007.5 Suppl 1:203-11.
- Lindner SE, JL Miller, and SH Kappe. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cell Microbiol* 2011.14:316-24.
- Lindner SE, JL Miller, and SH Kappe. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. *Cell Microbiol* 2012.14:316-24.
- Liu N, X Wang, WK McCoubrey, and MD Maines. Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. *Gene* 2000.241:175-83.
- Liu X, Y Cui, M Li, H Xu, J Zuo, F Fang, and Y Chang. Cobalt protoporphyrin induces HO-1 expression mediated partially by FOXO1 and reduces mitochondria-derived reactive oxygen species production. *PLoS One* 2013.8:e80521.
- Liu YJ, SH Lu, and ZC Han. Signal transduction of chemokine platelet factor 4 in human erythroleukemia cells. *Int J Hematol* 2002.75:401-6.

- Loboda A, A Jazwa, A Grochot-Przeczek, AJ Rutkowski, J Cisowski, A Agarwal, A Jozkowicz, and J Dulak. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2008.10:1767-812.
- Lomar AV, JE Vidal, FP Lomar, CV Barbas, GJ de Matos, and M Boulos. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 2005.9:425-30.
- Long MW, N Williams, and TP McDonald. Immature megakaryocytes in the mouse: in vitro relationship to megakaryocyte progenitor cells and mature megakaryocytes. *J Cell Physiol* 1982.112:339-44.
- Looney MR, JX Nguyen, Y Hu, JA Van Ziffle, CA Lowell, and MA Matthay. Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2009.119:3450-61.
- Lopes-Pires ME, AC Naime, NJ Almeida Cardelli, DJ Anjos, E Antunes, and S Marcondes. PKC and AKT Modulate cGMP/PKG Signaling Pathway on Platelet Aggregation in Experimental Sepsis. *PLoS One* 2015.10:e0137901.
- Lorant DE, RP McEver, TM McIntyre, KL Moore, SM Prescott, and GA Zimmerman. Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces. *J Clin Invest* 1995.96:171-82.
- Lovegrove FE, SA Gharib, L Pena-Castillo, SN Patel, JT Ruzinski, TR Hughes, WC Liles, and KC Kain. Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathog* 2008.4:e1000068.
- Lozano F, M Leal, E Lissen, J Munoz, A Bautista, and C Regordan. [*P. falciparum* and *P. malariae* malaria complicated by pulmonary edema with disseminated intravascular coagulation]. *Presse Med* 1983.12:3004-5.
- Luo J, MS Weaver, B Cao, JE Dennis, B Van Biber, MA Laflamme, and MD Allen. Cobalt protoporphyrin pretreatment protects human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury in vitro and increases graft size and vascularization in vivo. *Stem Cells Transl Med* 2014.3:734-44.
- Luz NF, BB Andrade, DF Feijo, T Araujo-Santos, GQ Carvalho, D Andrade, DR Abanades, EV Melo, AM Silva, CI Brodskyn, M Barral-Netto, A Barral, RP Soares, RP Almeida, MT Bozza, and VM Borges. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. *J Immunol* 2012.188:4460-7.
- Lyke KE, R Burges, Y Cissoko, L Sangare, M Dao, I Diarra, A Kone, R Harley, CV Plowe, OK Doumbo, and MB Szein. Serum levels of the proinflammatory cytokines

- interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* 2004.72:5630-7.
- Machlus KR, and JE Italiano, Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 2013.201:785-96.
- Machlus KR, KE Johnson, R Kulenthirarajan, JA Forward, MD Tippy, TS Soussou, SH El-Husayni, SK Wu, S Wang, RS Watnick, JE Italiano, Jr., and EM Battinelli. CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation. *Blood* 2016.127:921-6.
- MacPherson GG, MJ Warrell, NJ White, S Looareesuwan, and DA Warrell. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 1985.119:385-401.
- Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997.37:517-54.
- Maines MD. The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000.46:573-85.
- Maines MD, GM Trakshel, and RK Kutty. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986.261:411-9.
- Mandal RV, EJ Mark, and RL Kradin. Megakaryocytes and platelet homeostasis in diffuse alveolar damage. *Exp Mol Pathol* 2007.83:327-31.
- Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res* 2010.108:247-52.
- Marsh K, and RW Snow. Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997.352:1385-94.
- Martinson J, J Bae, HG Klingemann, and Y Tam. Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous ex vivo differentiated DC. *Cytotherapy* 2004.6:487-97.
- Matuschewski K. Murine infection models for vaccine development: the malaria example. *Hum Vaccin Immunother* 2013.9:450-6.
- Matute-Bello G, G Downey, BB Moore, SD Groshong, MA Matthay, AS Slutsky, and WM Kuebler. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011.44:725-38.

- McCoubrey WK, Jr., TJ Huang, and MD Maines. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997.247:725-32.
- McMorran BJ, VM Marshall, C de Graaf, KE Drysdale, M Shabbar, GK Smyth, JE Corbin, WS Alexander, and SJ Foote. Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* 2009.323:797-800.
- Menard R, V Heussler, M Yuda, and V Nussenzweig. Plasmodium pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends Parasitol* 2008.24:564-9.
- Meyer KC, JE Klatte, HV Dinh, MJ Harries, K Reithmayer, W Meyer, R Sinclair, and R Paus. Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. *Br J Dermatol* 2008.159:1077-85.
- Michelson AD, MR Barnard, LA Krueger, CR Valeri, and MI Furman. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 2001.104:1533-7.
- Miller LH, DI Baruch, K Marsh, and OK Doumbo. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002.415:673-9.
- Mishra M, and JF Ndisang. A critical and comprehensive insight on heme oxygenase and related products including carbon monoxide, bilirubin, biliverdin and ferritin in type-1 and type-2 diabetes. *Curr Pharm Des* 2014.20:1370-91.
- Mo M, HC Lee, M Kotaka, M Niang, X Gao, JK Iyer, J Lescar, and P Preiser. The C-terminal segment of the cysteine-rich interdomain of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 determines CD36 binding and elicits antibodies that inhibit adhesion of parasite-infected erythrocytes. *Infect Immun* 2008.76:1837-47.
- Mohan A, SK Sharma, and S Bollineni. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *J Vector Borne Dis* 2008.45:179-93.
- Monteiro AP, CS Pinheiro, T Luna-Gomes, LR Alves, CM Maya-Monteiro, BN Porto, C Barja-Fidalgo, CF Benjamim, M Peters-Golden, C Bandeira-Melo, MT Bozza, and C Canetti. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. *J Immunol* 2011.186:6562-7.
- Montellano PR. The mechanism of heme oxygenase. *Curr Opin Chem Biol* 2000.4:221-7.
- Moraes JA, P Barcellos-de-Souza, G Rodrigues, V Nascimento-Silva, SV Silva, J Assreuy, MA Arruda, and C Barja-Fidalgo. Heme modulates smooth muscle cell proliferation and migration via NADPH oxidase: a counter-regulatory role for heme oxygenase system. *Atherosclerosis* 2012.224:394-400.

- Morgenstern E, K Neumann, and H Patscheke. The exocytosis of human blood platelets. A fast freezing and freeze-substitution analysis. *Eur J Cell Biol* 1987.43:273-82.
- Morita Y, A Iseki, S Okamura, S Suzuki, H Nakauchi, and H Ema. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol* 2011.39:351-359 e3.
- Mueller AK, J Behrends, K Hagens, J Mahlo, UE Schaible, and BE Schneider. Natural transmission of *Plasmodium berghei* exacerbates chronic tuberculosis in an experimental co-infection model. *PLoS One* 2012.7:e48110.
- Muhlestein JB. Effect of antiplatelet therapy on inflammatory markers in atherothrombotic patients. *Thromb Haemost* 2010.103:71-82.
- Munoz-Sanchez J, and ME Chanez-Cardenas. A review on hemoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxid Med Cell Longev* 2014.2014:604981.
- Nacer A, A Movila, K Baer, SA Mikolajczak, SH Kappe, and U Frevert. Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog* 2012.8:e1002982.
- Naik RS, OH Branch, AS Woods, M Vijaykumar, DJ Perkins, BL Nahlen, AA Lal, RJ Cotter, CE Costello, CF Ockenhouse, EA Davidson, and DC Gowda. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* 2000.192:1563-76.
- Nakazawa S. *Plasmodium berghei* NK65: studies on the effect of treatment duration and inoculum size on recrudescence. *Exp Parasitol* 2005.111:59-63.
- Nath KA, JJ Haggard, AJ Croatt, JP Grande, KD Poss, and J Alam. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol* 2000.156:1527-35.
- Niikura M, S Inoue, and F Kobayashi. Role of interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *J Biomed Biotechnol* 2011.2011:383962.
- Niikura M, S Kamiya, K Kita, and F Kobayashi. Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. *J Immunol* 2008.180:6877-84.
- Nkambule BB, G Davison, and H Ipp. The value of flow cytometry in the measurement of platelet activation and aggregation in human immunodeficiency virus infection. *Platelets* 2015.26:250-7.



- Noisakran S, N Onlamoon, HM Hsiao, KB Clark, F Villinger, AA Ansari, and GC Perng. Infection of bone marrow cells by dengue virus in vivo. *Exp Hematol* 2012a.40:250-259 e4.
- Noisakran S, N Onlamoon, K Pattanapanyasat, HM Hsiao, P Songprakhon, N Angkasekwinai, K Chokephaibulkit, F Villinger, AA Ansari, and GC Perng. Role of CD61+ cells in thrombocytopenia of dengue patients. *Int J Hematol* 2012b.96:600-10.
- Nuhn P, T Mitkus, GO Ceyhan, BM Kunzli, F Bergmann, L Fischer, N Giese, H Friess, and PO Berberat. Heme oxygenase 1-generated carbon monoxide and biliverdin attenuate the course of experimental necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2013.42:265-71.
- Oakley MS, V Majam, B Mahajan, N Gerald, V Anantharaman, JM Ward, LJ Faucette, TF McCutchan, H Zheng, M Terabe, JA Berzofsky, L Aravind, and S Kumar. Pathogenic roles of CD14, galectin-3, and OX40 during experimental cerebral malaria in mice. *PLoS One* 2009.4:e6793.
- Ochiel DO, GA Awandare, CC Keller, JB Hittner, PG Kremsner, JB Weinberg, and DJ Perkins. Differential regulation of beta-chemokines in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2005.73:4190-7.
- Ogawa K, J Sun, S Taketani, O Nakajima, C Nishitani, S Sassa, N Hayashi, M Yamamoto, S Shibahara, H Fujita, and K Igarashi. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* 2001.20:2835-43.
- Ogonda LA, AS Orago, MF Otieno, C Adhiambo, W Otieno, and JA Stoute. The levels of CD16/Fc gamma receptor IIIA on CD14+ CD16+ monocytes are higher in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infect Immun* 2010.78:2173-81.
- Olsson A, J Alfredsson, E Hakansson, R Svedjeholm, J Berglund, and S Berg. Protamine reduces whole blood platelet aggregation after cardiopulmonary bypass. *Scand Cardiovasc J* 2016.50:58-63.
- OMS OMS-. chapter 7 Impact of malaria control. [www.who.int/entity/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/WMR2011\\_chapter7.pdf](http://www.who.int/entity/malaria/world_malaria_report_2011/WMR2011_chapter7.pdf) 2011.
- OMS OMS-. Malaria. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1> 2016.
- OMS OMS. Guidelines for the treatment of malaria. 2010.second edition:1-194.

- Otterbein LE, FH Bach, J Alam, M Soares, H Tao Lu, M Wysk, RJ Davis, RA Flavell, and AM Choi. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000.6:422-8.
- Otterbein LE, R Foresti, and R Motterlini. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Heart: The Balancing Act Between Danger Signaling and Pro-Survival. *Circ Res* 2016.118:1940-59.
- Otterbein LE, JK Kolls, LL Mantell, JL Cook, J Alam, and AM Choi. Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury. *J Clin Invest* 1999a.103:1047-54.
- Otterbein LE, LL Mantell, and AM Choi. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999b.276:L688-94.
- Pabla R, AS Weyrich, DA Dixon, PF Bray, TM McIntyre, SM Prescott, and GA Zimmerman. Integrin-dependent control of translation: engagement of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 regulates synthesis of proteins in activated human platelets. *J Cell Biol* 1999.144:175-84.
- Pabon A, J Carmona, LC Burgos, and S Blair. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *Clin Biochem* 2003.36:71-8.
- Pain A, DJ Ferguson, O Kai, BC Urban, B Lowe, K Marsh, and DJ Roberts. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001.98:1805-10.
- Paiva CN, DF Feijo, FF Dutra, VC Carneiro, GB Freitas, LS Alves, J Mesquita, GB Fortes, RT Figueiredo, HS Souza, MR Fantappie, J Lannes-Vieira, and MT Bozza. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest* 2012.122:2531-42.
- Pamplona A, A Ferreira, J Balla, V Jeney, G Balla, S Epiphonio, A Chora, CD Rodrigues, IP Gregoire, M Cunha-Rodrigues, S Portugal, MP Soares, and MM Mota. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* 2007.13:703-10.
- Panasiuk A. [Autoimmune thrombocytopenia in recurrent polietiological malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*)]. *Wiad Parazytol* 2001.47:85-9.
- Patko Z, A Csaszar, G Acsady, I Ory, E Takacs, and J Furesz. Elevation of monocyte-platelet aggregates is an early marker of type 2 diabetes. *Interv Med Appl Sci* 2012.4:181-5.
- Pederson NT. The pulmonary vessels as a filter for circulating megakaryocytes in rats *Scand. F. Haematol.* 1974.13:225-31.

- Peng L, L Mundada, JM Stomel, JJ Liu, J Sun, SF Yet, and WP Fay. Induction of heme oxygenase-1 expression inhibits platelet-dependent thrombosis. *Antioxid Redox Signal* 2004.6:729-35.
- Perdomo J, F Yan, and BH Chong. A megakaryocyte with no platelets: anti-platelet antibodies, apoptosis, and platelet production. *Platelets* 2013.24:98-106.
- Pereira ML, LS Ortolan, MK Sercundes, D Debone, O Murillo, FA Lima, CR Marinho, and S Epiphanio. Association of Heme Oxygenase 1 with Lung Protection in Malaria-Associated ALI/ARDS. *Mediators Inflamm* 2016.2016:4158698.
- Peyron F, B Polack, D Lamotte, L Kolodie, and P Ambroise-Thomas. Plasmodium falciparum growth inhibition by human platelets in vitro. *Parasitology* 1989.99 Pt 3:317-22.
- Pham CG, C Bubici, F Zazzeroni, S Papa, J Jones, K Alvarez, S Jayawardena, E De Smaele, R Cong, C Beaumont, FM Torti, SV Torti, and G Franzoso. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 2004.119:529-42.
- Piguet PF, CD Kan, and C Vesin. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis* 2002.7:91-8.
- Piguet PF, and C Vesin. Modulation of platelet caspases and life-span by anti-platelet antibodies in mice. *Eur J Haematol* 2002.68:253-61.
- Piotrowski J, T Jedrzejewski, and W Kozak. Heme oxygenase-1 induction by cobalt protoporphyrin enhances fever and inhibits pyrogenic tolerance to lipopolysaccharide. *J Therm Biol* 2014.45:69-74.
- Porto BN, LS Alves, PL Fernandez, TP Dutra, RT Figueiredo, AV Graca-Souza, and MT Bozza. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem* 2007.282:24430-6.
- Price L, T Planche, C Rayner, and S Krishna. Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007.101:655-9.
- Puneet P, S Mochhala, and M Bhatia. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005.288:L3-15.
- Rahman K, GM Lowe, and S Smith. Aged Garlic Extract Inhibits Human Platelet Aggregation by Altering Intracellular Signaling and Platelet Shape Change. *J Nutr* 2016.146:410S-415S.

- Rajput R, H Singh, S Singh, Meena, and UC Tiwari. Pulmonary manifestations in malaria. *J Indian Med Assoc* 2000.98:612-4.
- Randall LM, and CR Engwerda. TNF family members and malaria: old observations, new insights and future directions. *Exp Parasitol* 2010.126:326-31.
- Raza A, MS Khan, NK Ghanchi, A Raheem, and MA Beg. Tumour necrosis factor, interleukin-6 and interleukin-10 are possibly involved in *Plasmodium vivax*-associated thrombocytopaenia in southern Pakistani population. *Malar J* 2014.13:323.
- Reis PA, CM Comim, F Hermani, B Silva, T Barichello, AC Portella, FC Gomes, IM Sab, VS Frutuoso, MF Oliveira, PT Bozza, FA Bozza, F Dal-Pizzol, GA Zimmerman, J Quevedo, and HC Castro-Faria-Neto. 2010. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *In PLoS Pathog.* Vol. 6. e1000963.
- Reis PA, V Estado, TI da Silva, JC d'Avila, LD Siqueira, EF Assis, PT Bozza, FA Bozza, EV Tibirica, GA Zimmerman, and HC Castro-Faria-Neto. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog* 2012.8:e1003099.
- Reiss LK, U Uhlig, and S Uhlig. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. *Eur J Cell Biol* 2012.91:590-601.
- Rey L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008.4<sup>o</sup>:833.
- Richardson JL, RA Shivdasani, C Boers, JH Hartwig, and JE Italiano, Jr. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 2005.106:4066-75.
- Rinder HM, JL Tracey, CS Rinder, D Leitenberg, and BR Smith. Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-selectin-mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost* 1994.72:750-6.
- Roport C, BS Franklin, and RT Gazzinelli. Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria. *Semin Immunopathol* 2008.30:41-51.
- Rossaint J, and A Zarbock. Platelets in Leukocyte Recruitment and Function. *Cardiovasc Res* 2015.
- Rovira-Vallbona E, G Moncunill, Q Bassat, R Aguilar, S Machevo, L Puyol, L Quinto, C Menendez, CE Chitnis, PL Alonso, C Dobano, and A Mayor. Low antibodies against *Plasmodium falciparum* and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children: a case-control study. *Malar J* 2012.11:181.

- Rucker M, T Schafer, F Roesken, WJ Spitzer, M Bauer, and MD Menger. Reduction of inflammatory response in composite flap transfer by local stress conditioning-induced heat-shock protein 32. *Surgery* 2001.129:292-301.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002.8:1227-34.
- Ryg-Cornejo V, CQ Nie, NJ Bernard, RJ Lundie, KJ Evans, BS Crabb, L Schofield, and DS Hansen. NK cells and conventional dendritic cells engage in reciprocal activation for the induction of inflammatory responses during *Plasmodium berghei* ANKA infection. *Immunobiology* 2012.
- Ryter SW, J Alam, and AM Choi. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006.86:583-650.
- Saba HI, SR Saba, G Morelli, and RC Hartmann. Endotoxin-mediated inhibition of human platelet aggregation. *Thromb Res* 1984.34:19-33.
- Sambo MR, MJ Trovoadá, C Benchimol, V Quinhentos, L Goncalves, R Velosa, MI Marques, N Sepulveda, TG Clark, S Mustafa, O Wagner, A Coutinho, and C Penha-Goncalves. Transforming growth factor beta 2 and heme oxygenase 1 genes are risk factors for the cerebral malaria syndrome in Angolan children. *PLoS One* 2010.5:e11141.
- Sarady-Andrews JK, F Liu, D Gallo, A Nakao, M Overhaus, R Ollinger, AM Choi, and LE Otterbein. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005.289:L1131-7.
- Sarkar S, K Saha, and CS Das. Three cases of ARDS: An emerging complication of *Plasmodium vivax* malaria. *Lung India* 2010.27:154-7.
- Sato K, J Balla, L Otterbein, RN Smith, S Brouard, Y Lin, E Csizmadia, J Sevigny, SC Robson, G Vercellotti, AM Choi, FH Bach, and MP Soares. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 2001.166:4185-94.
- Saúde Md. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM. 2003.
- Saúde Md. Manual de diagnóstico laboratorial de malária 2009.2a. edição:116.
- Sayed D, NF Amin, and GM Galal. Monocyte-platelet aggregates and platelet micro-particles in patients with post-hepatic liver cirrhosis. *Thromb Res* 2010.125:e228-33.
- Schofield L. Intravascular infiltrates and organ-specific inflammation in malaria pathogenesis. *Immunol Cell Biol* 2007.85:130-7.
- Schofield L, and GE Grau. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2005.5:722-35.

- Schofield L, and F Hackett. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993.177:145-53.
- Schofield L, and I Mueller. Clinical immunity to malaria. *Curr Mol Med* 2006.6:205-21.
- Schofield L, S Novakovic, P Gerold, RT Schwarz, MJ McConville, and SD Tachado. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol* 1996.156:1886-96.
- Schwarzer E, F Turrini, D Ulliers, G Giribaldi, H Ginsburg, and P Arese. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* 1992.176:1033-41.
- Schwartz H, S Koster, WH Kahr, N Michetti, BF Kraemer, DA Weitz, RC Blaylock, LW Kraiss, A Greinacher, GA Zimmerman, and AS Weyrich. Anucleate platelets generate progeny. *Blood* 2010.115:3801-9.
- Scorza T, S Magez, L Brys, and P De Baetselier. Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. *Parasite Immunol* 1999.21:545-54.
- Secor D, S Swarbreck, CG Ellis, MD Sharpe, and K Tyml. Ascorbate reduces mouse platelet aggregation and surface P-selectin expression in an ex vivo model of sepsis. *Microcirculation* 2013.20:502-10.
- Sedlak TW, M Saleh, DS Higginson, BD Paul, KR Juluri, and SH Snyder. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009.106:5171-6.
- Seixas E, R Gozzelino, A Chora, A Ferreira, G Silva, R Larsen, S Rebelo, C Penido, NR Smith, A Coutinho, and MP Soares. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009.106:15837-42.
- Seka-Seka J, Y Brouh, AC Yapo-Crezoit, and NH Atseye. The role of serum immunoglobulin E in the pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in Ivorian children. *Scand J Immunol* 2004.59:228-30.
- Semple JW, and J Freedman. Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci* 2010.67:499-511.
- Sharron M, CE Hoptay, AA Wiles, LM Garvin, M Geha, AS Benton, K Nagaraju, and RJ Freishtat. Platelets induce apoptosis during sepsis in a contact-dependent manner that is inhibited by GPIIb/IIIa blockade. *PLoS One* 2012.7:e41549.
- Shattil SJ, C Kim, and MH Ginsberg. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010.11:288-300.

- Sherry BA, G Alava, KJ Tracey, J Martiney, A Cerami, and AF Slater. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo. *J Inflamm* 1995.45:85-96.
- Shin JS, S Ryu, DS Jang, YW Cho, EK Chung, and KT Lee. Amomum tsao-ko fruit extract suppresses lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase by inducing heme oxygenase-1 in macrophages and in septic mice. *Int J Exp Pathol* 2015.96:395-405.
- Shio MT, SC Eisenbarth, M Savaria, AF Vinet, MJ Bellemare, KW Harder, FS Sutterwala, DS Bohle, A Descoteaux, RA Flavell, and M Olivier. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog* 2009.5:e1000559.
- Singh B, L Kim Sung, A Matusop, A Radhakrishnan, SS Shamsul, J Cox-Singh, A Thomas, and DJ Conway. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet* 2004.363:1017-24.
- Singh MV, DC Davidson, M Kiebal, and SB Maggirwar. Detection of circulating platelet-monocyte complexes in persons infected with human immunodeficiency virus type-1. *J Virol Methods* 2012.181:170-6.
- Siow RC, H Sato, and GE Mann. Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res* 1999.41:385-94.
- SIVEP SdIdVE. Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia. Ministério da Saúde 2011.
- Skorokhod OA, M Alessio, B Mordmuller, P Arese, and E Schwarzer. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol* 2004.173:4066-74.
- Soares MP, Y Lin, J Anrather, E Csizmadia, K Takigami, K Sato, ST Grey, RB Colvin, AM Choi, KD Poss, and FH Bach. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 1998.4:1073-7.
- Soares MP, MP Seldon, IP Gregoire, T Vassilevskaia, PO Berberat, J Yu, TY Tsui, and FH Bach. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol* 2004.172:3553-63.
- Srivastava K, IA Cockburn, A Swaim, LE Thompson, A Tripathi, CA Fletcher, EM Shirk, H Sun, MA Kowalska, K Fox-Talbot, D Sullivan, F Zavala, and CN Morrell. Platelet

- factor 4 mediates inflammation in experimental cerebral malaria. *Cell Host Microbe* 2008.4:179-87.
- Stanisic DI, J Cutts, E Eriksson, FJ Fowkes, A Rosanas-Urgell, P Siba, M Laman, TM Davis, L Manning, I Mueller, and L Schofield.  $\gamma$  T cells and CD14<sup>+</sup> monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria. *J Infect Dis* 2014.210:295-305.
- Steinmuller M, M Srivastava, WA Kuziel, JW Christman, W Seeger, T Welte, J Lohmeyer, and UA Maus. Endotoxin induced peritonitis elicits monocyte immigration into the lung: implications on alveolar space inflammatory responsiveness. *Respir Res* 2006.7:30.
- Stevenson MM, and EM Riley. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004.4:169-80.
- Stocker R, and MA Perrella. Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation* 2006.114:2178-89.
- Stocker R, Y Yamamoto, AF McDonagh, AN Glazer, and BN Ames. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987.235:1043-6.
- Stuart LM, N Paquette, and L Boyer. Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens. *Nat Rev Immunol* 2013.13:199-206.
- Sturm A, R Amino, C van de Sand, T Regen, S Retzlaff, A Rennenberg, A Krueger, JM Pollok, R Menard, and VT Heussler. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006.313:1287-90.
- Sumida S. The expression of adhesion molecules, including CD11a and CD11b, on the human T lymphocyte surface membrane in patients with bronchial asthma. *Kurume Med J* 1995.42:21-32.
- Sun G, WL Chang, J Li, SM Berney, D Kimpel, and HC van der Heyde. Inhibition of platelet adherence to brain microvasculature protects against severe *Plasmodium berghei* malaria. *Infect Immun* 2003.71:6553-61.
- Sun J, H Hoshino, K Takaku, O Nakajima, A Muto, H Suzuki, S Tashiro, S Takahashi, S Shibahara, J Alam, MM Taketo, M Yamamoto, and K Igarashi. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 2002.21:5216-24.
- SUS PdS. Situação Epidemiológica Dados. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica-dados> 2016.
- Svensson L, IM Frick, and O Shannon. Group G streptococci mediate fibrinogen-dependent platelet aggregation leading to transient entrapment in platelet aggregates. *Microbiology* 2016.162:117-26.



- Tachado SD, P Gerold, MJ McConville, T Baldwin, D Quilici, RT Schwarz, and L Schofield. 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* 1996.156:1897-1907.
- Tachibana M, K Watanabe, Y Yamasaki, H Suzuki, and M Watarai. Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by Brucella abortus infection in pregnant mice. *Microb Pathog* 2008.45:105-9.
- Takeuchi O, and S Akira. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010.140:805-20.
- Tamion F, V Richard, G Bonmarchand, J Leroy, JP Lebreton, and C Thuillez. Induction of heme-oxygenase-1 prevents the systemic responses to hemorrhagic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2001.164:1933-8.
- Tamura T, T Kondo, K Ogawa, K Fukunaga, and N Ohkohchi. Protective effect of heme oxygenase-1 on hepatic ischemia-reperfusion injury through inhibition of platelet adhesion to the sinusoids. *J Gastroenterol Hepatol* 2013.28:700-6.
- Tan LK, S Yacoub, S Scott, S Bhagani, and M Jacobs. Acute lung injury and other serious complications of Plasmodium vivax malaria. *Lancet Infect Dis* 2008.8:449-54.
- Taylor-Robinson AW. Regulation of immunity to Plasmodium: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design. *Exp Parasitol* 2010.126:406-14.
- Taylor WR, V Canon, and NJ White. Pulmonary manifestations of malaria : recognition and management. *Treat Respir Med* 2006.5:419-28.
- Taylor WR, J Hanson, GD Turner, NJ White, and AM Dondorp. Respiratory manifestations of malaria. *Chest* 2012.142:492-505.
- Taylor WR, and NJ White. Malaria and the lung. *Clin Chest Med* 2002.23:457-68.
- Teixeira C, and R Gomes. Experimental models in vaccine research: malaria and leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2013.46:109-16.
- Terry MJ, PJ Linley, and T Kohchi. Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans* 2002.30:604-9.
- Thiery JP, and M Bessis. [Genesis of blood platelets from the megakaryocytes in living cells]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956.242:290-2.
- Thon JN, and JE Italiano. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol* 2012.3-22.

- Thon JN, H Macleod, AJ Begonja, J Zhu, KC Lee, A Mogilner, JH Hartwig, and JE Italiano, Jr. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun* 2012.3:852.
- Thon JN, A Montalvo, S Patel-Hett, MT Devine, JL Richardson, A Ehrlicher, MK Larson, K Hoffmeister, JH Hartwig, and JE Italiano, Jr. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol* 2010.191:861-74.
- Thumwood CM, NH Hunt, IA Clark, and WB Cowden. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology* 1988.96 ( Pt 3):579-89.
- Tohidnezhad M, CJ Wruck, A Slowik, N Kweider, R Beckmann, A Bayer, A Houben, LO Brandenburg, D Varoga, TT Sonmez, M Stoffel, H Jahr, S Lippross, and T Pufe. Role of platelet-released growth factors in detoxification of reactive oxygen species in osteoblasts. *Bone* 2014.65:9-17.
- Tomar LR, S Giri, NK Baudh, and R Jhamb. Complicated malaria: a rare presentation of *Plasmodium ovale*. *Trop Doct* 2015.45:140-2.
- Torres JR, H Perez, MM Postigo, and JR Silva. Acute non-cardiogenic lung injury in benign tertian malaria. *Lancet* 1997.350:31-2.
- Tullius SG, M Nieminen-Kelha, U Bachmann, A Reutzel-Selke, S Jonas, J Pratschke, WO Bechstein, P Reinke, R Buelow, P Neuhaus, and H Volk. Induction of heme-oxygenase-1 prevents ischemia/reperfusion injury and improves long-term graft outcome in rat renal allografts. *Transplant Proc* 2001.33:1286-7.
- Urban BC, and DJ Roberts. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Curr Opin Immunol* 2002.14:458-65.
- Vachharajani TJ, J Work, AC Issekutz, and DN Granger. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000.278:H1613-7.
- Van den Steen PE, K Deroost, J Deckers, E Van Herck, S Struyf, and G Opdenakker. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends Parasitol* 2013.
- Van den Steen PE, N Geurts, K Deroost, I Van Aelst, S Verhenne, H Heremans, J Van Damme, and G Opdenakker. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2010.181:957-68.
- van der Heyde HC, I Gramaglia, G Sun, and C Woods. Platelet depletion by anti-CD41 (alphaIIb) mAb injection early but not late in the course of disease protects against

- Plasmodium berghei* pathogenesis by altering the levels of pathogenic cytokines. *Blood* 2005.105:1956-63.
- van der Heyde HC, J Nolan, V Combes, I Gramaglia, and GE Grau. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol* 2006.22:503-8.
- van Dooren GG, AT Kennedy, and GI McFadden. The use and abuse of heme in apicomplexan parasites. *Antioxid Redox Signal* 2012.17:634-56.
- van Es N, A Sturk, S Middeldorp, and R Nieuwland. Effects of cancer on platelets. *Semin Oncol* 2014.41:311-8.
- van Gils JM, JJ Zwaginga, and PL Hordijk. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 2009.85:195-204.
- van Zoelen MA, MI Verstege, C Draing, R de Beer, C van't Veer, S Florquin, P Bresser, JS van der Zee, AA te Velde, S von Aulock, and T van der Poll. Endogenous MCP-1 promotes lung inflammation induced by LPS and LTA. *Mol Immunol* 2011.48:1468-76.
- Veloso TR, A Chaouch, T Roger, M Giddey, J Vouillamoz, P Majcherczyk, YA Que, V Rousson, P Moreillon, and JM Entenza. Use of a human-like low-grade bacteremia model of experimental endocarditis to study the role of *Staphylococcus aureus* adhesins and platelet aggregation in early endocarditis. *Infect Immun* 2013.81:697-703.
- Verma G, VK Dua, DD Agarwal, and PK Atul. Anti-malarial activity of *Holarrhena antidysenterica* and *Viola canescens*, plants traditionally used against malaria in the Garhwal region of north-west Himalaya. *Malar J* 2011.10:20.
- Vieira-de-Abreu A, RA Campbell, AS Weyrich, and GA Zimmerman. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol* 2012.34:5-30.
- Vigan-Womas I, M Guillotte, A Juillerat, A Hessel, B Raynal, P England, JH Cohen, O Bertrand, T Peyrard, GA Bentley, A Lewit-Bentley, and O Mercereau-Puijalon. Structural basis for the ABO blood-group dependence of *Plasmodium falciparum* rosetting. *PLoS Pathog* 2012.8:e1002781.
- Vijaykumar M, RS Naik, and DC Gowda. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *J Biol Chem* 2001.276:6909-12.

- Vile GF, S Basu-Modak, C Waltner, and RM Tyrrell. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994.91:2607-10.
- von Hundelshausen P, F Petersen, and E Brandt. Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost* 2007.97:704-13.
- von Mach MA, T Hansen, W Ehrental, O Sauer, and LS Weilemann. [Fulminant pulmonary edema in falciparum malaria [corrected]]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003.128:874-6.
- Voza T, JL Miller, SH Kappe, and P Sinnis. Extrahepatic exoerythrocytic forms of rodent malaria parasites at the site of inoculation: clearance after immunization, susceptibility to primaquine, and contribution to blood-stage infection. *Infect Immun* 2012.80:2158-64.
- Vukomanovic D, MN Rahman, MD Maines, TR Ozolins, WA Szarek, Z Jia, and K Nakatsu. Cysteine-independent activation/inhibition of heme oxygenase-2. *Med Gas Res* 2016.6:10-13.
- Wagener FA, JL da Silva, T Farley, T de Witte, A Kappas, and NG Abraham. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 1999.291:416-23.
- Wagener FA, A Eggert, OC Boerman, WJ Oyen, A Verhofstad, NG Abraham, G Adema, Y van Kooyk, T de Witte, and CG Figdor. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 2001.98:1802-11.
- Wagener FA, HD Volk, D Willis, NG Abraham, MP Soares, GJ Adema, and CG Figdor. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 2003.55:551-71.
- Wang C, Y Zhang, L Han, L Guo, H Zhong, and J Wang. Hemin ameliorates influenza pneumonia by attenuating lung injury and regulating the immune response. *Int J Antimicrob Agents* 2017.49:45-52.
- Wang HB, JT Wang, L Zhang, ZH Geng, WL Xu, T Xu, Y Huo, X Zhu, EF Plow, M Chen, and JG Geng. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol* 2007.8:882-92.
- Ware LB, and MA Matthay. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001.163:1376-83.
- Wassmer SC, V Combes, and GE Grau. Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion. *Ann N Y Acad Sci* 2003.992:30-8.

- Wassmer SC, C Lepolard, B Traore, B Pouvelle, J Gysin, and GE Grau. Platelets reorient Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. *J Infect Dis* 2004.189:180-9.
- Wassmer SC, CA Moxon, T Taylor, GE Grau, ME Molyneux, and AG Craig. Vascular endothelial cells cultured from patients with cerebral or uncomplicated malaria exhibit differential reactivity to TNF. *Cell Microbiol* 2011.13:198-209.
- Wassmer SC, T Taylor, CA MacLennan, M Kanjala, M Mukaka, ME Molyneux, and GE Grau. Platelet-induced clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria-possible modulation in vivo by thrombocytopenia. *J Infect Dis* 2008.197:72-8.
- Wegiel B, CJ Hauser, and LE Otterbein. Heme as a danger molecule in pathogen recognition. *Free Radic Biol Med* 2015.89:651-61.
- Wencel-Drake JD, EF Plow, TJ Kunicki, VL Woods, DM Keller, and MH Ginsberg. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 1986.124:324-34.
- Weyrich AS, and GA Zimmerman. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 2004.25:489-95.
- Weyrich AS, and GA Zimmerman. Platelets in lung biology. *Annu Rev Physiol* 2013.75:569-91.
- White JG. Platelet glycosomes. *Platelets* 1999.10:242-6.
- White JG. Electron dense chains and clusters in human platelets. *Platelets* 2002.13:317-25.
- White JG. Golgi complexes in hypogranular platelet syndromes. *Platelets* 2005.16:51-60.
- White JG, and CC Clawson. Effects of small latex particle uptake on the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study. *Diagn Histopathol* 1982.5:3-10.
- White JG, and G Escolar. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol* 1991.56:233-42.
- White JG, and G Escolar. Current concepts of platelet membrane response to surface activation. *Platelets* 1993.4:175-89.
- White JG, NS Key, RA King, and GM Vercellotti. The White platelet syndrome: a new autosomal dominant platelet disorder. *Platelets* 2004.15:173-84.
- White JG, and M Krumwiede. Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 1987.69:1196-203.

- White JG, MD Krumwiede, DJ Cocking-Johnson, and G Escolar. Dynamic redistribution of glycoprotein Ib/IX on surface-activated platelets. A second look. *Am J Pathol* 1995a.147:1057-67.
- White JG, MD Krumwiede, DK Johnson, and G Escolar. Redistribution of GPIb/IX and GPIIb/IIIa during spreading of discoid platelets. *Br J Haematol* 1995b.90:633-44.
- William T, J Menon, G Rajahram, L Chan, G Ma, S Donaldson, S Khoo, C Frederick, J Jelip, NM Anstey, and TW Yeo. Severe Plasmodium knowlesi malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. *Emerg Infect Dis* 2011.17:1248-55.
- Willis D, AR Moore, R Frederick, and DA Willoughby. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 1996.2:87-90.
- Woods VL, Jr., LE Wolff, and DM Keller. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986.261:15242-51.
- Woolbright BL, and H Jaeschke. Heme oxygenase-1 and platelets in hepatic ischemia reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2013.28:756-7.
- Wu X, NM Gowda, and DC Gowda. Phagosomal Acidification Prevents Macrophage Inflammatory Cytokine Production to Malaria, and Dendritic Cells Are the Major Source at the Early Stages of Infection: IMPLICATION FOR MALARIA PROTECTIVE IMMUNITY DEVELOPMENT. *J Biol Chem* 2015.290:23135-47.
- Wu Y, T Szeszak, M Stins, and AG Craig. Amplification of P. falciparum Cytoadherence through induction of a pro-adhesive state in host endothelium. *PLoS One* 2011.6:e24784.
- Xiao da W, M Yang, J Yang, KL Hon, and FT Fok. Lung damage may induce thrombocytopenia. *Platelets* 2006.17:347-9.
- Yachie A, Y Niida, T Wada, N Igarashi, H Kaneda, T Toma, K Ohta, Y Kasahara, and S Koizumi. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999.103:129-35.
- Yamaguchi S, T Kubota, T Yamagishi, K Okamoto, T Izumi, M Takada, S Kanou, M Suzuki, J Tsuchiya, and T Naruse. Severe thrombocytopenia suggesting immunological mechanisms in two cases of vivax malaria. *Am J Hematol* 1997.56:183-6.
- Yamaguchi T, Y Miyata, K Hayamizu, J Hashizume, T Matsumoto, H Tashiro, and H Ohdan. Preventive effect of G-CSF on acute lung injury via alveolar macrophage regulation. *J Surg Res* 2012.

- Yamashita K, R Ollinger, J McDaid, H Sakahama, H Wang, S Tyagi, E Csizmadia, NR Smith, MP Soares, and FH Bach. Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *FASEB J* 2006.20:776-8.
- Yang L, L Wang, CH Zhao, XJ Zhu, Y Hou, P Jun, and M Hou. Contributions of TRAIL-mediated megakaryocyte apoptosis to impaired megakaryocyte and platelet production in immune thrombocytopenia. *Blood* 2010.116:4307-16.
- Yeh CC, SJ Kao, CC Lin, SD Wang, CJ Liu, and ST Kao. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sci* 2007.80:1821-31.
- Yeh JJ, S Tsai, DC Wu, JY Wu, TC Liu, and A Chen. P-selectin-dependent platelet aggregation and apoptosis may explain the decrease in platelet count during *Helicobacter pylori* infection. *Blood* 2010.115:4247-53.
- Yet SF, MD Layne, X Liu, YH Chen, B Ith, NE Sibinga, and MA Perrella. Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling. *FASEB J* 2003.17:1759-61.
- Yoshimoto T, Y Takahama, CR Wang, T Yoneto, S Waki, and H Nariuchi. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection. *J Immunol* 1998.160:5500-5.
- Yu Z, Y Wang, J Zhang, L Li, X Wu, R Ma, M Han, G Xu, W Wen, and H Li. Expression of heme oxygenase-1 in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps: modulation by cytokines. *Int Forum Allergy Rhinol* 2015.5:734-40.
- Zarbock A, H Muller, Y Kuwano, and K Ley. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J Leukoc Biol* 2009.86:1119-24.
- Zarbock A, K Singbartl, and K Ley. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest* 2006.116:3211-9.
- Zenke-Kawasaki Y, Y Dohi, Y Katoh, T Ikura, M Ikura, T Asahara, F Tokunaga, K Iwai, and K Igarashi. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol Cell Biol* 2007.27:6962-71.
- Zhao L, Y Ohtaki, K Yamaguchi, M Matsushita, T Fujita, T Yokochi, H Takada, and Y Endo. LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. *Blood* 2002.100:3233-9.
- Zheng Y, M Toborek, and B Hennig. Epigallocatechin gallate-mediated protection against tumor necrosis factor-alpha-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression is heme oxygenase-1 dependent. *Metabolism* 2010.59:1528-35.

Zimmerman GA. LAD syndromes: FERMT3 kindles the signal. *Blood* 2009.113:4485-6.

Zucker-Franklin D, and CS Philipp. Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol* 2000.157:69-74.