

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia

AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E DA BARREIRA ENDOTELIAL  
PULMONAR NA MALÁRIA EXPERIMENTAL

Daniela Debone

Dissertação para obtenção do Título de Mestre  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina Epiphânio

São Paulo  
2017

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia

AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E DA BARREIRA ENDOTELIAL  
PULMONAR NA MALÁRIA EXPERIMENTAL

Daniela Debone

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina Epiphânio

São Paulo  
2017



Daniela Debone

AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E DA BARREIRA ENDOTELIAL  
PULMONAR NA MALÁRIA EXPERIMENTAL

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina Epiphanyo  
orientadora/presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017

## AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me guiar, dar-me força e sabedoria para trilhar os meus caminhos. À toda minha família, meu alicerce. Especialmente aos meus pais, Vera e Ubirajara, por todo ensinamento e todo amor. Sempre me incentivam e me apoiam em todos os momentos da minha vida. E ao meu irmão, Henrique, por estar sempre presente na minha vida e pela amizade imensurável. Sem vocês, não teria chegado onde estou! Amo vocês!

Ao meu namorado, Marcus, por toda paciência, pelas broncas e “cutucos”, pelo companheirismo e amor. Obrigada por sempre estar ao meu lado! Amo você!

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina pela confiança, pela oportunidade e pelos ensinamentos. Agradeço todas as discussões, as conversas, os conselhos e todo apoio, que contribuíram muito para meu crescimento profissional. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Claudio Romero Farias Marinho, também orientador, por abrir as portas de seu laboratório sempre que precisei, pelas discussões, conversas e conselhos. Muito obrigada!

À Dr.<sup>a</sup> Flávia Afonso Lima, a Flavinha linda, pela imensa ajuda e contribuição em todo este trabalho! Muito obrigada pela amizade, pelos cafés da manhã, por parar tudo e me ajudar, sempre. E pelas brigas também! Obrigada por tudo!

À minha grande amiga, Erika Machado, pelo apoio técnico e pela parceria de laboratório. Agradeço por todas as conversas, almoços, cafés... por tornar aqueles dias tensos mais leves! Muito obrigada pela amizade de sempre!

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Michelle e Luana, por todo apoio e ajuda, pela parceria no laboratório, por sempre “salvarem a minha vida”, pelos momentos de estresse, pelas conversas de todo dia, pelas risadas e pela amizade! Muito obrigada!

Aos companheiros de pós-graduação: Oscar, Aramys, Marcelo, Jamille, Rodrigo, Carla, Natércia, Douglas, Ismael, Lina, Tarsila e Eric pela amizade, companheirismo e por todas as discussões científicas e não científicas! Obrigada!

À Sonia Buratto, técnica de laboratório, não só pelo auxílio técnico, mas pela amizade e por todas as conversas. Obrigada, fofinha!

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

Ao CNPq e à FAPESP pela bolsa e pelo apoio financeiro necessários para o desenvolvimento deste projeto.

***"Nothing in biology makes sense  
except in the light of evolution"***

*Theodosius Dobzhansky*

## RESUMO

Debone, D. **AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO E DA BARREIRA ENDOTELIAL PULMONAR NA MALÁRIA EXPERIMENTAL.** 2017. 105p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017

Infecções por *Plasmodium* sp. podem levar a um quadro respiratório grave, com complicações pulmonares denominadas lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA). Inflamação aguda, lesão do endotélio alveolar e do parênquima pulmonar, disfunção e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e, conseqüente, formação de edema, caracterizam esta síndrome. O modelo experimental, que utiliza o parasita murino *Plasmodium berghei* ANKA e camundongos da linhagem DBA/2, é empregado no estudo de mediadores imunológicos e fatores que propiciam o estabelecimento das lesões pulmonares associados à LPA/SDRA. Diversos estímulos podem atuar diretamente no aumento da permeabilidade endotelial por meio da desestabilização dos microtúbulos, rearranjo dos microfilamentos de actina e contração das células endoteliais, via sinalização de Rho-GTPases, causando disfunção da barreira endotelial. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações do citoesqueleto em células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2), as vias de sinalização das principais Rho-GTPases e o estresse oxidativo, causados pela presença de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA (EP-PbA). As CEPP-DBA/2 foram estimuladas com TNF, VEGF ou IFN $\gamma$ , em diferentes tempos de exposição, seguido da incubação com EP-PbA. Assim, foram realizados ensaios de imunofluorescência para análise do rearranjo de microfilamentos de actina e da desestabilização de microtúbulos. As vias de sinalização das Rho-GTPases foram avaliadas por Western blot, para as expressões proteicas de RhoA, Cdc42 e MLC. Além disso, ensaio fluorométrico foi realizado para detectar a produção de espécies reativas de oxigênio, resultantes do estímulo com eritrócitos parasitados. CEPP-DBA/2 estimuladas por EP-PbA, VEGF, TNF ou IFN $\gamma$ , em associação ou não, apresentaram alterações morfológicas nos microfilamentos de actina e aumento dos espaços interendoteliais. Imagens de imunofluorescência também mostram desestabilização de microtúbulos e desfosforilação de FAK, causadas por EP-PbA. Os ensaios de permeabilidade validam que os eritrócitos parasitados com formas maduras de *P. berghei* induziram aumento da permeabilidade microvascular nas CEPP-DBA/2. Além disso, estas células, estimuladas com EP-PbA, demonstraram elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode estar contribuindo com o desenvolvimento de estresse oxidativo e com a injúria endotelial, assim como, com o aumento da permeabilidade vascular. O mais interessante é que estas alterações endoteliais podem estar relacionadas ao aumento da razão RhoA/Cdc42, da expressão proteica de MLC fosforilada e do sinal de ativação de RhoA. Em conjunto, estes resultados mostram envolvimento dos eritrócitos parasitados com esquizontes de *Plasmodium berghei* ANKA na desorganização do citoesqueleto e na disfunção da barreira alvéolo-capilar, via RhoA/Rho-kinase, o que pode estar contribuindo com a patogênese da LPA/SDRA associada à malária.

**Palavras-chave:** LPA/SDRA, malária, citoesqueleto, RhoA/Rho-kinase, células endoteliais, permeabilidade vascular

## ABSTRACT

Debone, D. **EVALUATION OF THE CYTOSKELETON AND PULMONARY ENDOTHELIAL BARRIER IN EXPERIMENTAL MALARIA.** 2017. 105p. Dissertation (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2017

Infections by *Plasmodium* sp. can lead to a serious respiratory condition with pulmonary complications, named acute lung injury and acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS). Acute inflammation, alveolar endothelium and lung parenchyma injuries, dysfunction and increased permeability of the pulmonary alveolar-capillary barrier and consequent formation of edema characterize this syndrome. Several stimuli can directly increase endothelial permeability through actin microfilaments rearrangement, via Rho-GTPases signaling, leading to endothelial barrier dysfunction. DBA/2 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA develop ALI/ARDS similar to that observed in humans. The purpose of this research was to assess cytoskeletal changes in DBA/2 mice primary microvascular lung endothelial cells (PMLEC), verify the signaling pathways of the Rho-GTPases and analyze the oxidative stress on these cells in the presence of *P. berghei* ANKA-infected red blood cells (PbA-iRBC). PMLEC were stimulated by TNF, VEGF or IFN $\gamma$  followed by incubation with PbA-iRBC. Immunofluorescence assays were performed to analyze actin microfilaments rearrangement and microtubules destabilization. Western blot for RhoA, Cdc42 and MLC proteins were conducted to assess alterations in signaling pathways of Rho-GTPases. In addition, a fluorimetric assay was performed to detect the production of reactive oxygen species resulting from PbA-iRBC stimulus. *P. berghei* ANKA, VEGF, TNF and IFN $\gamma$  stimuli, in association or not, caused morphological disturbances in actin microfilaments of PMLEC and an increase of intercellular spaces. Moreover, immunofluorescence images showed microtubules destabilization and FAK dephosphorylation in these cells, caused by PbA-iRBC. The permeability assay showed that PbA-iRBC induced an increase of microvascular permeability in PMLEC. In addition, PMLEC stimulated by PbA-iRBC, showed elevated production of ROS, which may be contributing to oxidative stress and increasing the damage of endothelial cells, as well as an increase of vascular permeability. Interestingly, these endothelial changes may be related to the increased RhoA/Cdc42 protein expressions ratio, augmented protein expression of phosphorylated MLC and RhoA activation signal. Taken together, these data demonstrate the involvement of *P. berghei* ANKA-infected red blood cells in cytoskeleton disorganization and alveolar-capillary barrier dysfunction, through of RhoA / Rho-kinase signaling pathway, which may contribute to ALI/ARDS pathogenesis.

**Keywords:** ALI/ARDS, malaria, cytoskeleton, RhoA/Rho-kinase, endothelial cells, vascular permeability



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL: microlitro

μM: micromol

°C: grau Celsius

Ca: cálcio

BSA: albumina sérica bovina

CD36: cluster of differentiation 36

Cdc42 : cell division control protein 42

CEs: células endoteliais

CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

Cx37: conexina 37

Cx40: conexina 40

Cx43: conexina 43

DBA/2: camundongo dilute brown non-agouti

DCFH: 5(6)-Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato

DMEM: meio de cultura dulbecco's modified eagle's medium

ENP: eritrócitos não parasitados

EPs: eritrócitos parasitados

EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAK: quinase de adesão focal / *focal adhesion kinase*

g: aceleração da gravidade

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GAPs: proteínas ativadoras de GTPases

GSH: glutationa reduzida

GEFs: fatores de troca de guaninas

GDI: inibidores de dissociação de guaninas

GDP: guanosina difosfato

GTP: guanosina trifosfato

GTPases: enzimas hidrolases de GTP

h: hora

HBSS: hank's balanced salt solution

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IFNγ: interferon gama

“J-int”: junções interendoteliais

kDa: kilodalton

LPA/SDRA: lesão pulmonar aguda ou síndrome do desconforto respiratório agudo

MEC: matriz extracelular

min: minuto

mL: mililitro

MLC: cadeia leve da miosina

mM: milimol

MTs: microtúbulos

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NE: não estimulado

NAC: acetilcisteína

PBS: phosphate buffered saline

PfEMP1: proteína 1 de membrana eritrocitária do *P. falciparum*

*P. berghei*: Plasmodium berghei

*P. falciparum*: Plasmodium falciparum

Rac1: ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RhoA: ras homolog family member A

Rho-GTPases: família Rho de GTPases

RPML: meio de cultura roswell park memorial institute

ROCK: Rho-kinase

SFB: soro fetal bovino

TBHP: terc-butil hidroperóxido

TNF: fator de necrose tumoral

VCAM: molécula de adesão celular vascular

VE-caderina: caderina endotelial vascular

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema das junções aderentes (adherens junctions), oclusivas (tight junctions) e comunicantes (GAP junctions) que conectam as células endoteliais .....	22
<b>Figura 2.</b> A atividade das Rho-GTPases é controlada por fatores de troca de guaninas (GEFs), proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) e inibidores de dissociação de guaninas (GDIs).....	24
<b>Figura 3.</b> Hipótese simplificada dos mecanismos mediados pela via de sinalização de Rho-GTPases na desorganização do citoesqueleto e na ruptura da integridade da barreira endotelial .....	27
<b>Figura 4.</b> Exemplo de análise individual e manual de cada abertura das junções interendoteliais (“J-int”) das CEPP-DBA/2.....	33
<b>Figura 5.</b> Exemplo de análise e quantificação das alterações dos microtúbulos.....	34
<b>Figura 6.</b> Esquema do sistema de <i>Transwell</i> <sup>®</sup> .....	36
<b>Figura 7.</b> Ensaio de Imunofluorescência para identificação das CEPP-DBA/2 .....	41
<b>Figura 8.</b> TNF, VEGF, IFN $\gamma$ e EP-PbA não afetaram a atividade mitocondrial e a viabilidade das CEPP-DBA/2 .....	43
<b>Figura 9.</b> EP-PbA provocam alterações morfológicas do citoesqueleto das CEPP-DBA/2 .....	44
<b>Figura 10.</b> EP-PbA promovem abertura das junções interendoteliais em CEPP-DBA/2 .....	46
<b>Figura 11.</b> TNF e EP-PbA provocam alterações dos microfilamentos de actina e das junções interendoteliais das CEPP-DBA/2.....	49
<b>Figura 12.</b> Quantificação da área de abertura das junções interendoteliais “J-int” das CEPP-DBA/2, frente ao estímulo de TNF e EP-PbA .....	50
<b>Figura 13.</b> VEGF e EP-PbA induzem alterações dos microfilamentos de actina e das junções interendoteliais das CEPP-DBA/2.....	53
<b>Figura 14.</b> Quantificação da área de abertura das junções interendoteliais “J-int” das CEPP-DBA/2, frente ao estímulo de VEGF e EP-PbA .....	54
<b>Figura 15.</b> IFN $\gamma$ e EP-PbA provocam alterações dos microfilamentos de actina e das junções interendoteliais das CEPP-DBA/2.....	57
<b>Figura 16.</b> Quantificação da área de abertura das junções interendoteliais “J-int” das CEPP-DBA/2, frente ao estímulo de IFN $\gamma$ e EP-PbA .....	59
<b>Figura 17.</b> EP-PbA provocam rearranjo espacial dos microtúbulos das CEPP-DBA/2. À esquerda, células NE e à direita, células estimuladas com EP-PbA .....	61
<b>Figura 18.</b> Quantificação das alterações morfológicas e rearranjo espacial dos microtúbulos das CEPP-DBA/2, após contato com EP-PbA .....	62

<b>Figura 19.</b> EP-PbA promovem alterações morfológicas e reorganização espacial de FAK fosforilada em CEPP-DBA/2 .....	65
<b>Figura 20.</b> EP-PbA diminuem a expressão de FAK fosforilada em CEPP-DBA/2.....	66
<b>Figura 21.</b> EP-PbA provocam aumento da permeabilidade em CEPP-DBA/2 .....	68
<b>Figura 22.</b> EP-PbA não alteram a expressão de $\beta$ -actina em CEPP-DBA/2 .....	70
<b>Figura 23.</b> EP-PbA não alteram a expressão de VE-caderina em CEPP-DBA/2 .....	72
<b>Figura 24.</b> EP-PbA não alteram a expressão de RhoA em CEPP-DBA/2.....	74
<b>Figura 25.</b> EP-PbA não alteram a expressão de Cdc42 em CEPP-DBA/2 .....	75
<b>Figura 26.</b> EP-PbA alteram a razão entre as proteínas RhoA e Cdc42 em CEPP-DBA/2 .....	77
<b>Figura 27.</b> EP-PbA ativam RhoA em CEPP-DBA/2 .....	78
<b>Figura 28.</b> EP-PbA induzem a fosforilação de MLC em CEPP-DBA/2.....	79
<b>Figura 29.</b> EP-PbA promovem aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em CEPP-DBA/2 .....	82
<b>Figura 30.</b> Redução drástica da produção de espécies reativas de oxigênio das CEPP-DBA/2, após tratamento com N-acetilcisteína e Glutathiona reduzida .....	84

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Malária .....	15
1.2 O modelo murino para LPA/SDRA .....	17
1.3 O endotélio, o citoesqueleto e o papel das Rho-GTPases.....	19
1.4 Espécies reativas de oxigênio .....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1 Animais .....	28
3.2 Comitê de ética .....	28
3.3 Isolamento e sincronização de eritrócitos parasitados com esquizontes de <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (EP-PbA) .....	29
3.4 Isolamento e cultura das células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2) .....	29
3.5 Identificação das CEPP-DBA/2 .....	30
3.6 Ensaio de atividade do metabolismo mitocondrial .....	31
3.7 Histoquímica para identificação dos microfilamentos de actina .....	31
3.8 Análise morfométrica das aberturas das junções interendoteliais.....	32
3.9 Identificação dos microtúbulos por imunofluorescência .....	33
3.10 Análise morfométrica dos microtúbulos .....	34
3.11 Identificação e análise morfométrica da quinase de adesão focal por imunofluorescência .....	35
3.12 Ensaio de permeabilidade por sistema de <i>Transwell</i> <sup>®</sup> .....	36
3.13 Ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio.....	37
3.14 Análise da expressão proteica de Rho-GTPases, VE-caderina e cadeia leve da miosina fosforilada por Western blot .....	37
3.15 Análise de ativação de RhoA por <i>G-LISA</i> <sup>™</sup> .....	39
3.16 Análises estatísticas .....	39

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1 Identificação das CEPP-DBA/2 .....	39
4.2 TNF, VEGF, IFN $\gamma$ e EP-PbA não afetaram a atividade do metabolismo mitocondrial e a viabilidade das CEPP-DBA/2.....	42
4.3 EP-PbA provocam alterações no citoesqueleto das CEPP-DBA/2 .....	43
4.3.1 EP-PbA provocam alterações morfológicas nos microfilamentos de actina e aumento dos espaços interendoteliais das CEPP-DBA/2 .....	43
4.3.2 TNF, VEGF e IFN $\gamma$ provocam reorganização dos microfilamentos de actina e aumento dos espaços interendoteliais das CEPP-DBA/2, porém não mais que EP-PbA.....	47
4.3.3 EP-PbA provocam reorganização dos microtúbulos em CEPP-DBA/2.....	60
4.3.4 EP-PbA alteram a distribuição de FAK fosforilada em CEPP-DBA/2.....	64
4.4 EP-PbA provocam aumento da permeabilidade endotelial em CEPP-DBA/2 ....	67
4.5 EP-PbA não alteram a expressão proteica de VE-caderina, mas modificam razão entre RhoA e Cdc42 em CEPP-DBA/2.....	69
4.6 EP-PbA promovem a ativação de RhoA em CEPP-DBA/2 .....	78
4.7 EP-PbA incitam a produção de espécies reativas de oxigênio em CEPP-DBA/2 .....	81
5. CONCLUSÕES.....	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa parasitária. É considerada um problema de saúde pública e representa risco para as mais diversas populações, especialmente para aquelas localizadas em áreas tropicais e subtropicais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015; COWMAN et al., 2016). Estima-se que 3,2 bilhões de pessoas vivem em risco de infecção. Só em 2015, foram registrados 214 milhões de casos da doença e 438 mil óbitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

O *Plasmodium* sp., patógeno causador da malária, é um protozoário que possui complexo ciclo de vida, com diversos estágios que alternam entre a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* e hospedeiros vertebrados (COWMAN et al., 2016).

Após repasto sanguíneo, o mosquito introduz esporozoítos na derme do hospedeiro. Uma vez na corrente sanguínea, estes alcançam rapidamente o fígado, onde atravessam hepatócitos e células de *kupffer* (MILLER et al., 2002; VAN DOOREN et al., 2005; COWMAN et al., 2016). Ao se estabelecer no hepatócito, os esporozoítos se dividem, por esquizogonia, dando origem a milhares de merozoítos, abrigados em vesículas, denominadas merossomas. Estas são lançadas na corrente sanguínea, rompem-se e liberam os merozoítos, que invadirão os eritrócitos do hospedeiro (MILLER et al., 2002; VAN DOOREN et al., 2005; COWMAN et al., 2016).

Dentro do eritrócito, o parasita se desenvolve, no interior de um vacúolo parasitóforo, alimentando-se de hemoglobina, sofre novamente esquizogonia, originando mais milhares de parasitas, que poderão invadir novos eritrócitos. Após algumas gerações de merozoítos, alguns podem se diferenciar em formas sexuadas, os gametócitos, que seguirão seu desenvolvimento, apenas ao serem inoculados por outro mosquito. Os sintomas da doença manifestam-se somente na fase eritrocítica, durante as sequências de esquizogonia (MILLER et al., 2002; VAN DOOREN et al., 2005; COWMAN et al., 2016).

As infecções causadas por *Plasmodium falciparum* são responsáveis pelo maior número de casos severos e fatais, nos trópicos (COWMAN et al., 2016; WASSMER; GRAU, 2016). A capacidade de citoaderência do parasita e consequente sequestro na microvasculatura do hospedeiro, podem resultar em obstrução do fluxo sanguíneo e disfunção de órgãos vitais, processos-chave para o desenvolvimento de malária severa (OBERLI et al., 2016; WASSMER; GRAU, 2016).

A virulência do *P. falciparum* é determinada por vários fatores, tais como as proteínas que estão presentes na superfície de eritrócitos parasitados (EPs) (SMITH et al.,

2013; OBERLI et al., 2016). Estas permitem a conexão dos EPs ao endotélio microvascular de diversos órgãos e tecidos, durante o curso da infecção (GILLRIE et al., 2016; OREGAN et al., 2016; WASSMER; GRAU, 2016). A proteína 1 de membrana eritrocitária do *P. falciparum* (PfEMP1) é a principal envolvida no controle da adesão dos EPs, por meio da ligação específica a diversos receptores em monocamadas de células endoteliais (SMITH et al., 2013; GILLRIE et al., 2016; OBERLI et al., 2016), tais como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão neuronal celular (NCAM), E-selectina, CD36, CD31, receptor de proteína C e sulfato de condroitina A, este último, no caso de malária placentária (SMITH et al., 2013; OBERLI et al., 2016; OREGAN et al., 2016; WASSMER; GRAU, 2016).

Esta ligação ao endotélio resulta em sequestro generalizado de EPs, o que provoca ativação endotelial, bem como respostas pró-inflamatórias e pró-coagulantes (SMITH et al., 2013; WASSMER; GRAU, 2016). Além disso, o sequestro de EPs promove o desaparecimento das formas assexuadas do parasita da circulação periférica, evitando que os mesmos sejam destruídos no baço (POUVELLE et al., 2000; MILLER et al., 2002).

As principais complicações observadas da malária grave são acidose metabólica, anemia grave, hemorragias, disfunções hepáticas e renais, malária placentária, malária cerebral e complicações pulmonares. Estas, cada vez mais observadas em pacientes infectados, podem ser denominadas como lesão pulmonar aguda ou síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; LAGASSE et al., 2016).

Nos últimos anos, foram registrados diversos casos de LPA/SDRA associada à malária, em diferentes países (TAYLOR et al., 2012; GUPTA et al., 2015; PUNSAWAD et al., 2015). Em crianças africanas hospitalizadas com malária grave causada por *P. falciparum*, a incidência de LPA/SDRA pode variar entre 7 % e 16 % (TAYLOR et al., 2012). Além disso, foram reportados que elevada porcentagem de pacientes adultos e de mulheres grávidas desenvolveram LPA/SDRA, mesmo após administração de tratamento com antimaláricos (CAHAYANI et al., 2016; LAGASSE et al., 2016).

Sabe-se também que as cinco espécies que infectam seres humanos, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, estão relacionadas ao desenvolvimento do quadro de lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; COX-SINGH et al., 2010; HAYDOURA et al., 2011; TAYLOR et al., 2012).



A LPA/SDRA é caracterizada por inflamação aguda e lesão do endotélio alveolar e do parênquima pulmonar. Além disso, observa-se disfunção e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar pulmonar e, conseqüentemente, formação de edema. A diminuição da capacidade de trocas gasosas e o aumento de mediadores inflamatórios nos pulmões resultam em insuficiência respiratória em pacientes críticos, podendo levá-los ao óbito (ANSTEY et al., 2002; GOODMAN et al., 2003; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

Embora as manifestações clínicas da LPA/SDRA tenham sido descritas há muito tempo, os mecanismos celulares e moleculares que conduzem a este quadro ainda não estão completamente esclarecidos. Além disso, a mortalidade de pacientes permanece elevada nas unidades de terapia intensiva e, ainda, não se conhece formas de diagnóstico precoce que permitam um tratamento efetivo e evite a morte de pacientes (GOOD et al., 2005; MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008).

## 1.2 O modelo murino para LPA/SDRA

Nos últimos anos, apresenta-se crescente o uso de modelos experimentais para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares da doença e testar possíveis intervenções e tratamentos para LPA/SDRA associada à malária (VAN DEN STEEN et al., 2013; AITKEN et al., 2014; SERCUNDES et al., 2016).

As espécies *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* e *P. vinckei*, que infectam roedores, são as principais utilizadas como modelos experimentais para a malária humana (LACERDA-QUEIROZ; TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2008; NIIKURA; INOUE; KOBAYASHI, 2011; DEROOST et al., 2016). Diferentes combinações entre essas espécies de *Plasmodium* sp. e linhagens de camundongos, tais como, C57Bl/6, BALB/c, CBA e DBA/2 permitem a compreensão de diversos mecanismos da patogênese da malária grave (LACERDA-QUEIROZ; TEIXEIRA; TEIXEIRA, 2008; NIIKURA; INOUE; KOBAYASHI, 2011; DEROOST et al., 2016).

Na literatura, encontra-se alguns modelos murinos que já foram propostos para estudos da LPA/SDRA associada à malária. Van den Steen e colaboradores, em 2010, propuseram um modelo experimental, com a combinação entre o parasita *P. berghei* NK65 e camundongos da linhagem C57Bl/6, que mostra o aumento do peso dos pulmões, edema pulmonar e formação de membrana hialina (VAN DEN STEEN et al., 2010). Trata-se de um modelo experimental de alto impacto, porém, seus resultados não apresentaram reprodutibilidade, quando testados por nossa equipe de laboratório.

Em 2011, foi proposto o modelo murino que leva a associação entre o parasita *P. berghei* K173 e camundongos da linhagem C57Bl/6. Neste trabalho, demonstra-se um leve quadro de comprometimento pulmonar, em que os animais apresentam edema pulmonar, congestão dos capilares com eritrócitos e presença de leucócitos nos pulmões (HEE et al., 2011).

Em 2013, foi publicado um trabalho que utiliza a combinação entre o parasita *P. berghei* ANKA e camundongos da linhagem C57Bl/6, também para estudar LPA/SDRA (SOUZA et al., 2013). Entretanto, esta associação trate-se de um modelo experimental já estabelecido, e muito bem delineado, para estudos sobre os mecanismos da patogênese da malária cerebral (FAVRE et al., 1999; CLARK et al., 2005; PATEL et al., 2008; VILLEGAS-MENDEZ et al., 2012; FREEMAN et al., 2016).

Recentemente, nosso laboratório descreveu um modelo experimental preditivo para o estudo da LPA/SDRA associada à malária que valida que, em média, 50% dos camundongos machos da linhagem DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentam hipóxia, infiltrado inflamatório, edema e membrana hialina nos pulmões, além de opacidade torácica, comprovada por exames radiográficos (EIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014).

Os achados anatomopatológicos e histopatológicos evidenciaram que a presença de efusão pleural e o aumento da permeabilidade vascular pulmonar, associados ao edema e às hemorragias alveolares graves, culminam na morte dos camundongos por insuficiência respiratória (EIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014).

Além disso, os pulmões dos camundongos que vieram ao óbito com LPA/SDRA apresentaram perfil patológico totalmente diferente, quando comparados com os pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, associação utilizada como modelo experimental para malária cerebral (EIPHANIO et al., 2010).

A utilização de modelos murinos foi fundamental na discussão de que a participação de diversos fatores, tais como neutrófilos, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), interferon gama (IFN $\gamma$ ), plaquetas, hemozoína e sequestro de EPs dependente de CD36, pode estar contribuindo com o desenvolvimento da doença (YAMADA, 2004; EIPHANIO et al., 2010; AITKEN et al., 2014). Além do envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ , para o aumento da permeabilidade vascular, o dano tecidual e o estresse oxidativo nos pulmões (LUCAS et al., 2009; VAN DEN STEEN et al., 2010).

Além disso, em 2016, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a indução da heme-oxigenase-1 (enzima com atividade anti-inflamatória e anti-apoptótica), a partir do

tratamento com hemina, em células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2) estimuladas com lisado *P. berghei* ANKA, reduz a permeabilidade vascular, indicando a ação protetora desta droga sobre os efeitos lesivos no endotélio microvascular dos pulmões, causados pelo lisado do parasita (PEREIRA et al., 2016).

### **1.3 O endotélio, o citoesqueleto e o papel das Rho-GTPases**

O endotélio pulmonar, barreira celular semipermeável entre o compartimento vascular e o interstício, é formado por uma monocamada de células endoteliais (CEs) que recobre os vasos sanguíneos. Apresenta participação crítica nos processos de coagulação e de formação de novos vasos, na ventilação e na otimização de trocas gasosas, nas respostas imunológicas e na regulação da permeabilidade vascular (STAN RADU V., ; GIANNOTTA; TRANI; DEJANA, 2013). Em condições fisiológicas equilibradas, as junções interendoteliais abrem-se dinamicamente para permitir a passagem de pequenas moléculas e células inflamatórias, pela monocamada de CEs, mantendo a vigilância imunológica e a homeostase do tecido (SUKRITI et al., 2014).

O transporte através do endotélio pode ocorrer por duas diferentes vias: através da célula endotelial (transcelular) ou entre células adjacentes, pelas junções interendoteliais (paracelular). A via transcelular, também conhecida por transcitose, é responsável pelo transporte de macromoléculas, mediado por vesículas. Já na via paracelular, a passagem de moléculas é regulada por uma interação complexa entre as proteínas juncionais e os motores actinmiosina (VANDENBROUCKE et al., 2008; SUKRITI et al., 2014).

A integridade das células endoteliais pulmonares, cuja manutenção é regulada por fatores trombóticos, inflamatórios e, principalmente, por elementos do citoesqueleto, é um requisito fundamental para a preservação da função pulmonar (STAN RADU V., ; GIANNOTTA; TRANI; DEJANA, 2013).

As células endoteliais são amplamente utilizadas como modelo experimental de várias funções celulares, tais como, migração, polarização celular e interações intercelulares. Além disso, são utilizadas para estudo das estruturas associadas ao citoesqueleto e suas interações e, principalmente, para pesquisa das disfunções endoteliais (SHAKHOV; VERIN; ALIEVA, 2014).

A cultura de CEs preserva, *in vitro*, a morfologia, a bioquímica e a fisiologia do endotélio, ou seja, reproduz muito bem propriedades e características que são observadas no organismo. Do ponto de vista funcional e morfológico, este modelo é o mais

aceito para estudos de processos fisiológicos, interações e estrutura do citoesqueleto (ALIEVA, IRINA B., 2013; SHAKHOV; VERIN; ALIEVA, 2014).

No endotélio, quando ocorre uma perturbação, a permeabilidade vascular pode ser aumentada por diversos fatores inflamatórios, tais como histamina, bradicinina, fator de ativação plaquetária, citocinas, leucócitos ativados, além de produtos de glicação e espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses mediadores induzem uma infinidade eventos de sinalização intracelular que comprometem a integridade da barreira endotelial, uma vez que modulam a expressão de proteínas juncionais e moléculas de adesão, e atuam na reorganização do citoesqueleto e do complexo de adesão focal das CEs (VANDENBROUCKE et al., 2008; BARABUTIS; VERIN; CATRAVAS, 2016).

As respostas da permeabilidade alterada se desencadeiam pela ligação de agonistas aos receptores de superfície das CEs e, conseqüente, ativação de moléculas de sinalização, tais como quinases, fosfatases e proteínas da família Rho-GTPases. Estas cascatas moleculares atuam como moduladores da integridade e contratibilidade do citoesqueleto, provocando flutuações da função de barreira endotelial (SUKRITI et al., 2014; BARABUTIS; VERIN; CATRAVAS, 2016).

O citoesqueleto é formado por três principais componentes: microfilamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos (MTs). Juntos, são capazes de resistir à deformação, de se reorganizar em resposta a forças ou estímulos externos e de manter as relações espaciais entre compartimentos celulares (BIRUKOVA et al., 2004; MCKAYED; SIMPSON, 2013; PASQUIER et al., 2015).

Portanto, trata-se de um complexo sistema que regula e controla diversas funções celulares, tais como, transporte de organelas e vesículas, manutenção da forma, motilidade, diferenciação e divisão celular. Desempenha papel fundamental na angiogênese e na permeabilidade endotelial, que é regulada pelo balanço de forças contráteis e de ancoragem impostas por estes filamentos (BIRUKOVA et al., 2004; MCKAYED; SIMPSON, 2013; PASQUIER et al., 2015).

Os microtúbulos são estruturas altamente dinâmicas compostas por heterodímeros de  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina, que normalmente irradiam do centróssomo da célula. Os MTs estão ativos em diferentes processos celulares, tais como divisão celular, transporte intracelular e distribuição espacial de organelas, atuam alternando entre fases de crescimento e encurtamento, por adição ou remoção de subunidades de tubulina (KAVALLARIS, 2010; MCKAYED; SIMPSON, 2013) .

Os filamentos intermediários (FIs) são os elementos mais diversos do citoesqueleto, possuem alta resistência mecânica, compostos por subunidades neutras de cadeias polipeptídicas de  $\alpha$ -hélice, que muitas vezes exibem distribuições e propriedades

específicas para diferentes tipos celulares ou tecidos. Em células de origem mesodérmica, como as CEs e fibroblastos, os filamentos intermediários são compostos principalmente de vimentina. Portanto, essa composição variada permite que os filamentos intermediários respondam de maneira distinta a condições de desequilíbrio ou ao estresse físico (WANG; PELLING, 2012; MCKAYED; SIMPSON, 2013).

A actina, uma das principais proteínas componentes de células musculares e do citoesqueleto, possui uma variedade de isoformas altamente conservadas cuja distribuição nos vertebrados é tecido-específica (KHAITLINA, 2001). Pode apresentar-se na forma globular monomérica (G-actina) ou na forma filamentosa polimérica (F-actina), esta, denominada como microfilamento, é formada pela polimerização e montagem da G-actina, em forma helicoidal de duas cadeias (LI; MRUK; CHENG, 2015).

Os microfilamentos de actina conferem plasticidade às células, uma vez que é capaz de reorganizar-se, assumindo uma variedade de formas de montagem, empacotando-se, ramificando-se e, assim, fornecendo força e estrutura para motilidade e organização intracelular (KHAITLINA, 2001; MCKAYED; SIMPSON, 2013; LI; MRUK; CHENG, 2015).

Os microfilamentos de actina, associados as várias proteínas adesivas de membrana, tais como, moléculas de caderina, são essenciais para a regulação da permeabilidade das células endoteliais. Sabe-se também, que os microtúbulos e microfilamentos de actina são conhecidos por interagirem funcionalmente durante este processo celular, uma vez que a desmontagem dos microtúbulos resulta no rearranjo da actina, alterando as fibras de tensão, provocando contração celular e aumento da permeabilidade (DUDEK; GARCIA, 2001; BIRUKOVA et al., 2004).

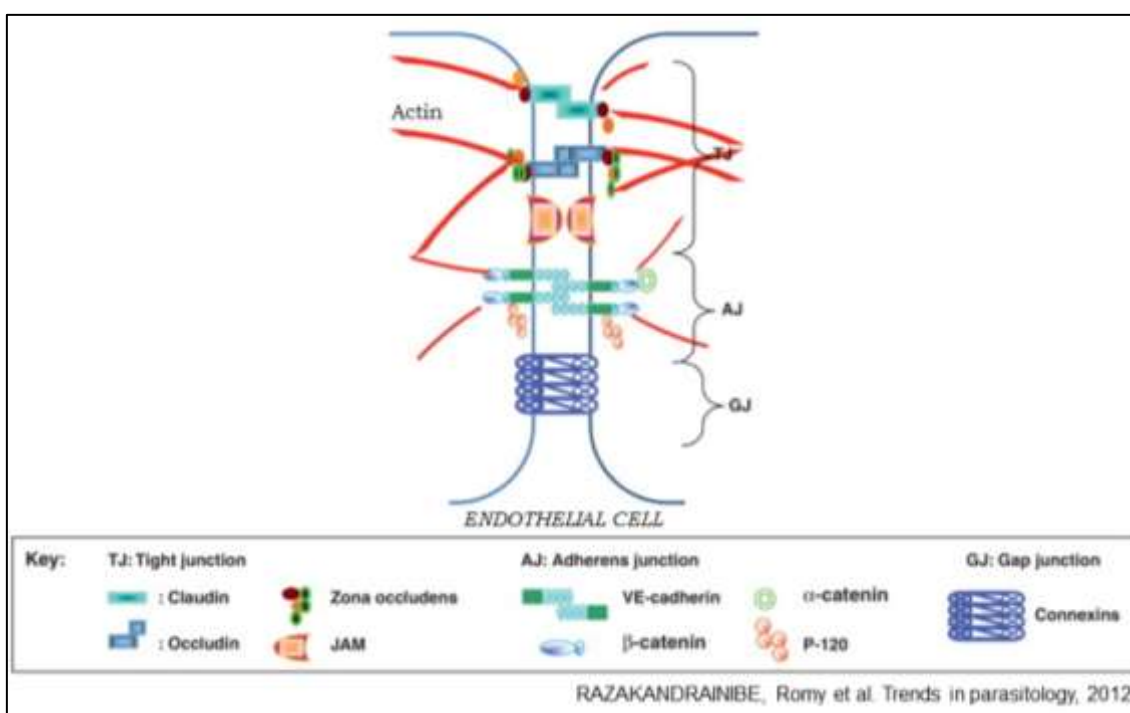
As células endoteliais são conectadas pelas junções aderentes (*adherens junctions*), oclusivas (*tight junctions*) e comunicantes (*GAP junctions*) (**Figura 1**). As junções GAP formam um canal de comunicação entre as células por aposição de conexons, em que cada conexon é formado por 6 conexinas. Estes canais, chamados de hemicanais, proporcionam um mecanismo de comunicação célula-célula, que permite passagem de sinais elétricos e troca direta de mensageiros intracelulares, tais como cálcio, nucleotídeos e diversos metabólitos, coordenando processos, como proliferação, diferenciação e sobrevivência/morte celular. Células endoteliais expressam várias conexinas, incluindo Cx37, Cx40 e Cx43 (EUGENIN et al., 2012; NIELSEN et al., 2012; O'DONNELL et al., 2014).

Em estudo com células endoteliais da microvasculatura pulmonar de coelhos, TNF e IL-8 inibiram a expressão de Cx40, reduzindo a função das junções GAP, devido

ao acúmulo de cálcio intracelular, levando ao aumento da permeabilidade vascular (ZHANG et al., 2010).

Além disso, foi validado que estímulos, tais como LPS e trombina, foram capazes de aumentar a expressão de Cx43, em células endoteliais de artéria pulmonar humana, e a modulação desta conexina pode estar influenciando a rompimento da barreira endotelial pulmonar (O'DONNELL et al., 2014).

A VE-caderina (caderina endotelial vascular), também conhecida como caderina-5, apresenta expressão elevada em células endoteliais. Específica para este tipo celular é a principal proteína estrutural das junções aderentes, onde ocorre formação de complexos, em que as proteínas da região citoplasmática, tais como  $\beta$ -catenina e plakoglobina, associam-se a proteínas ligadas a actina, tais como  $\alpha$ -catenina, vinculina,  $\alpha$ -actinina e epiplina. As junções aderentes e junções oclusivas são consideradas componentes estruturais “chave” responsáveis pela regulação da permeabilidade das células endoteliais (**Figura 1**) (ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013; DI LORENZO et al., 2013; DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014).



**Figura 1.** Esquema das junções aderentes (*adherens junctions*), oclusivas (*tight junctions*) e comunicantes (*GAP junctions*) que conectam as células endoteliais e regulam a passagem de moléculas pelo endotélio (Fonte: Razakandrainibe, Romy et al. Trends in parasitology, 2012).

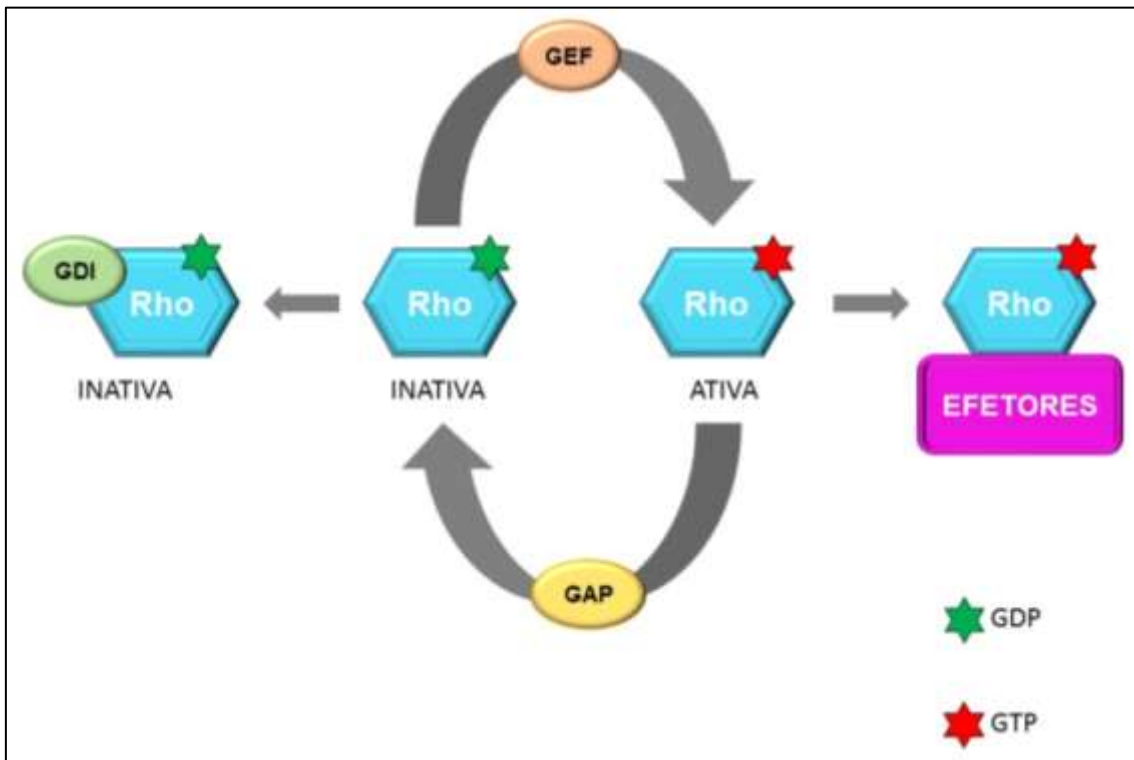
A interação estrutural entre as CEs e as proteínas da matriz extracelular (MEC) é igualmente importante para manter a função seletiva da barreira do endotélio. Estas

células estão ancoradas à MEC por meio de integrinas conectadas ao complexo de adesão focal, que consiste em múltiplas proteínas, tais como a paxilina, talina, vinculina e a quinase de adesão focal (FAK - *focal adhesion kinase*). Este complexo é vital para formação e manutenção da monocamada endotelial, além de atuar como meio de comunicação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto (BELVITCH; DUDEK, 2012; GRINNELL; HARRINGTON, 2012; ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013; SCHMIDT et al., 2013).

FAK é uma tirosina-quinase, citoplasmática e não receptora, integrante do complexo de adesão focal, localiza-se na região de contato célula-célula. Participa, portanto, de diversas funções endoteliais, tais como angiogênese, migração e adesão, atuando no remodelamento do citoesqueleto e na dinâmica das junções intercelulares. Sabe-se que a depleção de FAK, em camundongos, causa hiperativação de RhoA, proteína da família Rho-GTPases, provocando rompimento das junções aderentes e consequente disfunção da barreira endotelial pulmonar (BELVITCH; DUDEK, 2012; GRINNELL; HARRINGTON, 2012; ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013; SCHMIDT et al., 2013).

A família Rho de GTPases é composta por várias proteínas de baixo peso molecular (21-25 kDA), cujos os membros mais amplamente estudados são RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 e Cdc42. Estas proteínas são encontradas em todas as células eucarióticas, têm papel no desenvolvimento de organelas, na diferenciação e na proliferação celular, na migração celular, na apoptose, na regulação da transcrição gênica e estão envolvidas em vários aspectos dinâmicos dos microfilamentos de actina e dos microtúbulos (ALBERTS, 2008; DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014; TIAN et al., 2014).

Estas pequenas GTPases atuam como interruptores moleculares que alternam entre uma conformação ativa, ligada a guanosina trifosfato (GTP), e uma conformação inativa, ligada a guanosina difosfato (GDP). Este ciclo é regulado por três tipos de fatores citoplasmáticos: os fatores de troca de guaninas (*guanine nucleotide exchange factors* - GEFs), proteínas ativadoras de GTPases (*GTPase activating proteins* - GAPs) e os inibidores de dissociação de guaninas (*guanine nucleotide dissociation inhibitors* - GDIs). Os GEFs ativam as GTPases promovendo a liberação de GDP e a ligação ao GTP, processo que favorece a geração da forma ativa de Rho. Os GAPs convertem GTP em GDP, impedindo a interação das proteínas Rho com seus efetores. Enquanto que os GDIs ligam-se às Rho-GTPases, mantendo-as sequestradas no citoplasma, impedindo-as de serem ativadas (**Figura 2**) (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002; JAFFE; HALL, 2005; WENNERBERG; ROSSMAN; DER, 2005; GARCIA-MATA; BOULTER; BURRIDGE, 2011; RIDLEY, 2013).



**Figura 2.** A atividade das Rho-GTPases é controlada por fatores de troca de guaninas (GEFs), proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) e inibidores de dissociação de guaninas (GDIs). GEF ativa Rho-GTPases facilitando a liberação de GDP e a ligação ao GTP. GAP inativa Rho-GTPases promovendo hidrólise das moléculas de GTP, resultando na mudança rápida da forma ligada a GTP para a forma ligada a GDP. GDI liga-se à porção C-terminal das Rho-GTPases, mantendo-as no estado inativo.

Ativação excessiva ou anormal de RhoA e de seu efetor Rho-quinase (ROCK), por ação de TNF, VEGF, trombina e outros agentes, está associada ao decréscimo da função da barreira endotelial (BECKERS; VAN HINSBERGH; VAN NIEUW AMERONGEN, 2010; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010). Tanto RhoA quanto Rho B interagem com ROCK, aumentam a fosforilação da cadeia leve da miosina e promovem a polimerização da actina (DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014). Sabe-se também que RhoB regula a função da barreira endotelial durante a resposta inflamatória, por ativação de NF $\kappa$ B (RODRIGUEZ et al., 2007).

Entretanto, Rac1 e Cdc42 possuem efeito protetor sobre a barreira endotelial, quando ativadas, inibem a atividade de RhoA. A Cdc42 também está associada à restauração das junções aderentes e ao *turnover* das VE-caderinas nas células endoteliais (KOUKLIS, 2004; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010; DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014).



Cada vez mais, estudos sugerem envolvimento direto dos microtúbulos na dinâmica de controle da permeabilidade das células endoteliais. A depolimerização dos MTs causada, por exemplo, por inibidores como vinblastina e nocodazole induz forte ativação de Rho, resultando em reorganização dos microfilamentos de actina e na contração de actino-miosina (DUDEK; GARCIA, 2001). Além disso, a desmontagem dos MTs também está ligada à ativação suplementar de Rho, induzida por trombina, TNF e TGF- $\beta$ , provocando disfunção da barreira endotelial (ELIAS et al., 2012). Este cenário mostra a sinalização cruzada entre os microtúbulos e os microfilamentos de actina na regulação da permeabilidade endotelial (DUDEK; GARCIA, 2001; BIRUKOVA et al., 2004; ELIAS et al., 2012; TIAN et al., 2014).

As alterações na dinâmica de montagem e desmontagem dos MTs estão associadas ao aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC), que desencadeia alterações nos microfilamentos de actina, causando contração celular (YU et al., 2016). RhoA desempenha papel crítico na regulação da atividade da miosina fosfatase (ou fosfatase da MLC). Uma vez ativada, ligada à GTP, RhoA pode ativar o efetor Rho-kinase (ROCK), que fosforila e inibe a miosina fosfatase, resultando no aumento da fosforilação de MLC, o que induz a contração da actomiosina e enfraquecimento das junções interendoteliais, causando hiperpermeabilidade vascular (SHEN et al., 2010).

Além disso, Taoufiq e colaboradores comprovaram que a adesão de eritrócitos infectados com *P. falciparum* em células endoteliais pulmonares humanas promove a ativação da sinalização de Rho-GTPases. O estudo mostra, *in vitro*, que o contato entre as células e os eritrócitos infectados causa disfunção vascular e que o tratamento com fasudil, um potente inibidor de ROCK, recupera a integridade da barreira endotelial (TAOUFIQ et al., 2008).

#### **1.4 Espécies reativas de oxigênio**

Espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS, em inglês) são importantes constituintes da fisiologia celular, uma vez que são normalmente produzidas em resposta a diferentes estímulos endógenos e exógenos e são constantemente geradas, transformadas e consumidas durante a atividade metabólica. Sabe-se que diversos tipos celulares são capazes de produzir EROs intracelular, em níveis nanomolares (FERNANDES et al., 2006; PANIERI; SANTORO, 2015).

As células endoteliais estão constantemente expostas a uma variedade de estímulos mecânicos e bioquímicos e adaptam-se ativamente para preservar a homeostasia da função vascular. São capazes de tolerar certos níveis de EROs exógenos e sabe-se

que um aumento moderado de EROs pode favorecer a proliferação e a sobrevivência celular. Entretanto, quando a concentração de espécies reativas atinge patamares muito elevados, pode sobrecarregar a capacidade antioxidante da célula e desencadear morte celular (PANIERI; SANTORO, 2015).

Diversas condições clínicas, tais como envelhecimento, câncer, toxicidade por drogas e muitas outras, estão envolvidas com o aumento da atividade de radicais livres e com o desequilíbrio celular do balanço próxidante-antioxidante, em que oxidantes predominariam sobre antioxidantes, ocasionando potencial dano oxidativo e, conseqüentemente, injúria tecidual (FAVIER et al., 1995; AUGUSTO, 2006).

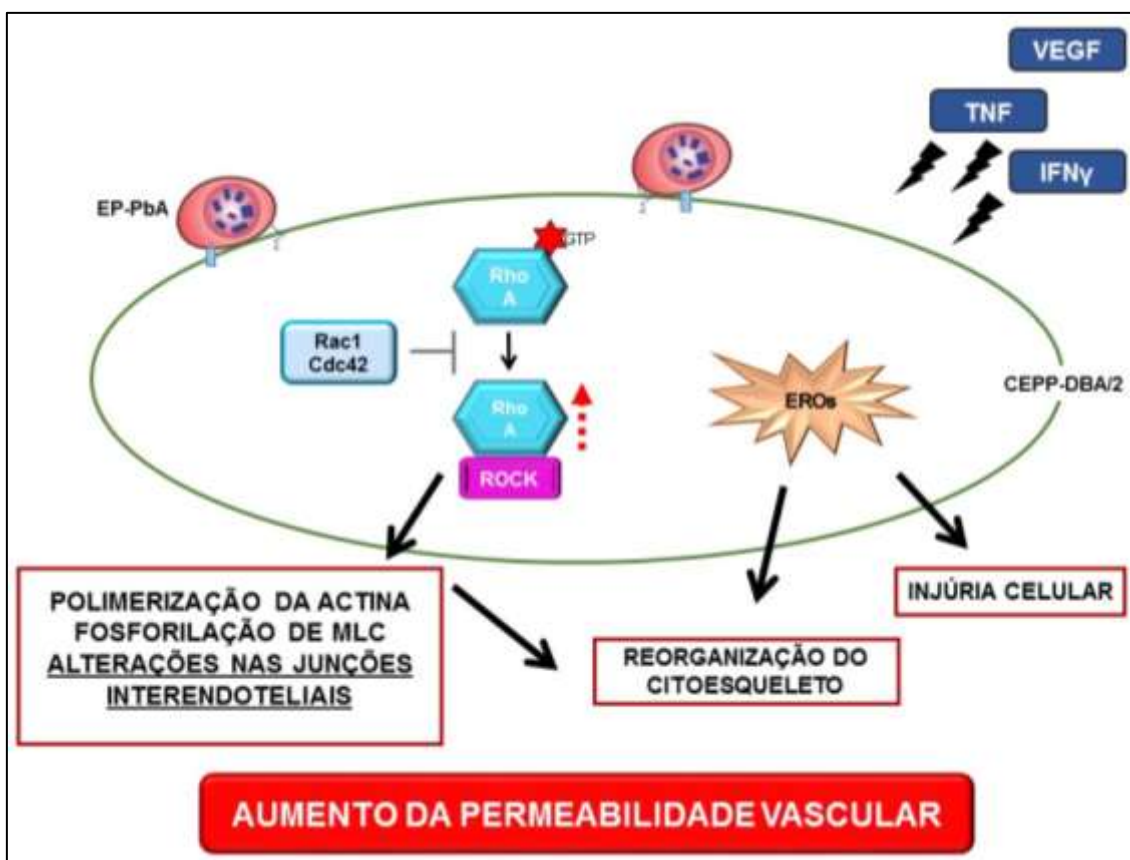
A desregulação da sinalização de EROs está frequentemente associada com a disfunção endotelial, contribuindo com a patogênese de doenças vasculares, tais como hipertensão, diabetes e aterosclerose. Além disso, a injúria endotelial, mediada por EROs, tem sido relacionada com desordens pulmonares, incluindo LPA/SDRA, hipertensão pulmonar e vasculite, envolvendo diferentes mecanismos, tais como a alteração da modulação de cálcio intracelular e da sinalização de quinases e fosfatases, resultando em remodelamento do citoesqueleto e aumentando a permeabilidade vascular (USATYUK et al., 2003; PANIERI; SANTORO, 2015).

Existe uma estreita relação entre a modulação de cálcio intracelular e o rearranjo do citoesqueleto, em diferentes linhagens celulares de mamíferos. A ruptura dos microfilamentos actina pode ativar os canais de membrana permeáveis ao cálcio e provocar aumento nas concentrações intracelulares de cálcio. Sabe-se que muitas proteínas, sensíveis ao  $Ca^{2+}$ , estão envolvidas na regulação da reorganização dos microfilamentos actina. Estas incluem a gelsolina, quando ativada por íons  $Ca^{2+}$ , participa da montagem e desmontagem dos microfilamentos de actina (LIN et al., 2015).

Os mecanismos de regulação da permeabilidade das células endoteliais envolvem diretamente interações dinâmicas e alterações estruturais dos componentes do citoesqueleto, principalmente microtúbulos e microfilamentos de actina, evidenciando o papel crítico do citoesqueleto na modulação da resposta inflamatória e na manutenção do endotélio pulmonar (MEHTA; MALIK, 2006; LUCAS et al., 2009; ELIAS et al., 2012).

Assim, diante da importância de aprofundar o conhecimento sobre os elementos determinantes da patogênese da LPA/SDRA associada à malária, este trabalho pretende analisar as alterações do citoesqueleto, a via de sinalização das principais Rho-GTPases e a produção de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais pulmonares primárias, em modelo experimental murino (**Figura 3**). A compreensão dos mecanismos patológicos da LPA/SDRA associada à malária pode fornecer subsídios para

terapêuticas futuras e para a prevenção da disfunção da barreira endotelial em enfermidades pulmonares.



**Figura 3.** Hipótese simplificada dos mecanismos mediados pela via de sinalização de Rho-GTPases na desorganização do citoesqueleto e na ruptura da integridade da barreira endotelial, devido à interação de fatores inflamatórios e de EP-PbA com as CEPP-DBA/2 (TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; IFN $\gamma$ : interferon gama; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EROs: espécies reativas de oxigênio).

## 2. OBJETIVOS

O modelo murino experimental valendo-se da combinação entre camundongos da linhagem DBA/2 e o plasmódio murino *Plasmodium berghei* ANKA, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (ORTOLAN et al., 2014), vem sendo utilizado no estudo de mediadores imunológicos relacionados à LPA/SDRA associada à malária, assim como na análise dos fatores que propiciam o estabelecimento das lesões pulmonares. Desta forma, neste sistema experimental que representa a doença humana, pretende-se estudar: as interações entre os eritrócitos parasitados com *Plasmodium berghei* ANKA e

as células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 e as consequentes alterações no citoesqueleto e na permeabilidade endotelial.

## **2.1 Objetivos específicos**

- I. As alterações do citoesqueleto de células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2), na presença de VEGF, TNF, IFN $\gamma$  e eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA (EP-PbA);
- II. Aumento da permeabilidade em monocamada de CEPP-DBA/2, causado pelo contato com EP-PbA;
- III. As vias de sinalização das principais Rho-GTPases, RhoA, Cdc42 e Rac1, além da ativação de RhoA em CEPP-DBA/2, estimuladas com EP-PbA;
- IV. Quantificação de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais primárias pulmonares murinas, causado pelo estímulo com EP-PbA.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem DBA/2, machos, adultos, com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram eutanasiados, com o uso da associação anestésica de ketamina (150 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), para a coleta dos pulmões e, também, para extração de eritrócitos parasitados e não parasitados. Os camundongos foram criados e mantidos no Biotério de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP).

### **3.2 Comitê de ética**

A licença de uso de animais deste estudo foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), registrada sob nº 051, fls. 32 do livro 03.

### **3.3 Isolamento e sincronização de eritrócitos parasitados com esquizontes de *Plasmodium berghei* ANKA (EP-PbA)**

Os eritrócitos parasitados foram obtidos a partir do sangue de camundongos infectados com o parasita *Plasmodium berghei* ANKA (entre 10 % e 20 % de parasitemia), por punção cardíaca. O sangue coletado foi adicionado em garrafa de cultura de 150 cm<sup>2</sup>, com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 30 % de soro fetal bovino (SFB) e incubado a 37° C, em atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, 85 % de N<sub>2</sub> e 10 % de O<sub>2</sub>, por 14 horas. Para obter esquizontes, formas maduras do parasita, os eritrócitos parasitados com *P. berghei* foram sincronizados, de acordo como descrito previamente (HUANG et al., 2012). Após o tempo de incubação, os eritrócitos foram separados em colunas magnéticas (MAC BEADS, Miltenyi Biotec, USA), resultando em populações celulares, com cerca de 95 %, de eritrócitos parasitados com esquizontes. A coluna utiliza as propriedades magnéticas da hemozoína para separar os eritrócitos parasitados, os quais ficam aderidos na coluna, dos eritrócitos não parasitados, que não aderem à coluna e são descartados.

A fração de EP-PbA coletada pela coluna magnética foi lavada com meio de cultura DMEM (Gibco) e centrifugada a 270 g por 8 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os EP-PbA foram ressuspensos em 3 mL de meio de cultura.

Os eritrócitos não parasitados (ENP) foram obtidos do sangue de camundongos não infectados, também por punção cardíaca. Da mesma forma, o sangue coletado foi lavado com meio de cultura e centrifugado. Após descarte do sobrenadante, os ENP foram ressuspensos em 5 mL de meio de cultura.

Para a realização dos ensaios experimentais, EP-PbA e ENP foram quantificados em câmara de Neubauer e adicionados as CEPP-DBA/2, na proporção de 25 EP-PbA ou ENP/célula.

### **3.4 Isolamento e cultura das células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2)**

As células endoteliais primárias pulmonares foram obtidas a partir de camundongos DBA/2, de acordo com o descrito em publicação prévia (CHEN; FEI; LI, 1995; PEREIRA et al., 2016). Resumidamente, após a eutanásia, o corpo do animal sofreu assepsia com álcool iodado. Em seguida, todo o sangue foi retirado dos camundongos através do corte das artérias carótidas. No interior do fluxo laminar, o tecido pulmonar

foi cortado em fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>, incubados em placas de poliestireno de 6 poços. Em cada poço, foi adicionado meio de cultura DMEM, suplementado com 20 % de SFB e antibióticos. A placa foi incubada a 37° C e 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 72 horas. Após este período, os fragmentos do tecido foram descartados e 50 % do meio de cultura foi substituído. Após 7 dias de incubação, as células foram removidas, com Tripsina 0,25 %, e a placa de cultura foi substituída por garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> ou 150 cm<sup>2</sup>, dependendo do crescimento que a cultura apresentou neste período. O processo de tripsinização, denominado de passagem, foi repetido a cada 5 ou 7 dias.

As CEPP-DBA/2 foram mantidas por 20 a 25 dias (quatro passagens) para serem utilizadas nos diferentes experimentos.

### **3.5 Identificação das CEPP-DBA/2**

Para confirmação de que as CEPP-DBA/2 eram realmente células endoteliais, ensaios de imunofluorescência foram realizados. Para isso, as células foram incubadas em placas de poliestireno de 24 poços (7x10<sup>4</sup> células/poço), aderidas em gelatina, sobre lamínulas e mantidas a 37° C e 5 % de CO<sub>2</sub>, por 72 horas, até formarem uma monocamada justaposta. Após período necessário para adesão e confluência total, as células foram lavadas com solução de PSB 1 %, pré-aquecido, fixadas com Formaldeído 3,7 % por 10 minutos, permeabilizadas com Acetona (-20° C) por 3 minutos, e bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) 1 % por 30 minutos.

As CEPP-DBA/2 foram identificadas com os seguintes anticorpos primários: anti-vWF (Santa Cruz), anti-VCAM (ABCAM), anti-ACE (ABCAM), anti-CD62E (ABCAM), anti-eNOS (ABCAM), anti-CD31 (ABCAM) e anti-VE-caderina (ABCAM), incubados por 45 minutos, em temperatura ambiente, todos na diluição 1:100; seguidos da incubação com anticorpo secundário goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Life Technologies), na diluição 1:400, por 1 hora. Os núcleos celulares foram marcados, com Hoechst (H-33342, Life Technologies) por 5 minutos, na diluição 1:1000. Todas as soluções e anticorpos foram diluídos em PBS 1 %.

As lamínulas foram colocadas sobre lâminas de microscopia de vidro, contendo o meio de montagem Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma). As imagens foram analisadas no microscópio de fluorescência AXIO Imager M2 (Zeiss), com lente objetiva de 20 X e pela câmera AxioCam HRc.

### **3.6 Ensaio de atividade do metabolismo mitocondrial**

Este ensaio foi realizado em placas de cultura de poliestireno de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço). As CEPP-DBA/2, mantidas a  $37^\circ \text{C}$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ , foram divididas em triplicatas, de acordo com cada tipo e tempo de estímulo aplicados nos diferentes ensaios deste trabalho. Após período necessário para adesão e confluência total, as células foram lavadas 2 vezes com PSB 1 %, pré-aquecido, e foram incubadas com solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, SIGMA), diluído em meio de cultura DMEM, na diluição 1:10, por 3 horas, em estufa de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, o MTT foi retirado e adicionado, em cada poço, 100  $\mu\text{l}$  de DMSO (Synth). Assim, foi feita a leitura da absorbância de cada amostra, no comprimento de onda de 570 nm, pelo leitor de placa Biotek Synergy HT e pelo Software Gen5.

### **3.7 Histoquímica para identificação dos microfilamentos de actina**

Para análise do rearranjo dos microfilamentos de actina, as CEPP-DBA/2 foram incubadas e preparadas como descrito no item 3.5.

Após período necessário para adesão e confluência total, as células foram estimuladas com TNF (50 ng/mL), VEGF (100 ng/mL) ou  $\text{IFN}\gamma$  (50 ng/mL) e divididas em grupos, de acordo com o tipo de estímulo e tempo de exposição: 6, 12, 24 horas (h) com TNF, VEGF ou  $\text{IFN}\gamma$ ; 6, 12, 24 h com TNF, VEGF ou  $\text{IFN}\gamma$ , seguido de 1 h com EP-PbA; combinação de 1 h com EP-PbA e TNF, VEGF ou  $\text{IFN}\gamma$ ; apenas 1 h com EP-PbA e apenas 1 h com ENP. Controles negativos foram realizados com as células não estimuladas (NE).

Após etapa de estímulos, as CEPP-DBA/2 passaram por lavagem, fixação e permeabilização, também como descritas no item 3.5. Assim, os microfilamentos de actina foram identificados após incubação com Texas Red Phalloidina (Life Technologies), por 20 minutos. Os núcleos celulares foram marcados, com Hoechst (H-33342, Life Technologies) por 5 minutos, na diluição 1:1000. Todas as soluções e anticorpos foram diluídos em PBS 1 %.

As lamínulas foram colocadas sobre lâminas de microscopia de vidro, contendo o meio de montagem Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma). As imagens foram capturadas pelo microscópio de fluorescência AXIO Imager M2 (Zeiss) e com a câmera AxioCam HRc.

### 3.8 Análise morfométrica das aberturas das junções interendoteliais

Os diferentes tipos de estímulo e tempos de exposição foram avaliados em triplicatas. No mínimo, foram obtidas três imagens diferentes de cada lamínula, apenas de áreas totalmente confluentes, com células justapostas. Para evitar a repetição de campos, cada lamínula foi inteiramente percorrida, em forma de “zigue-zague”, de cima para baixo.

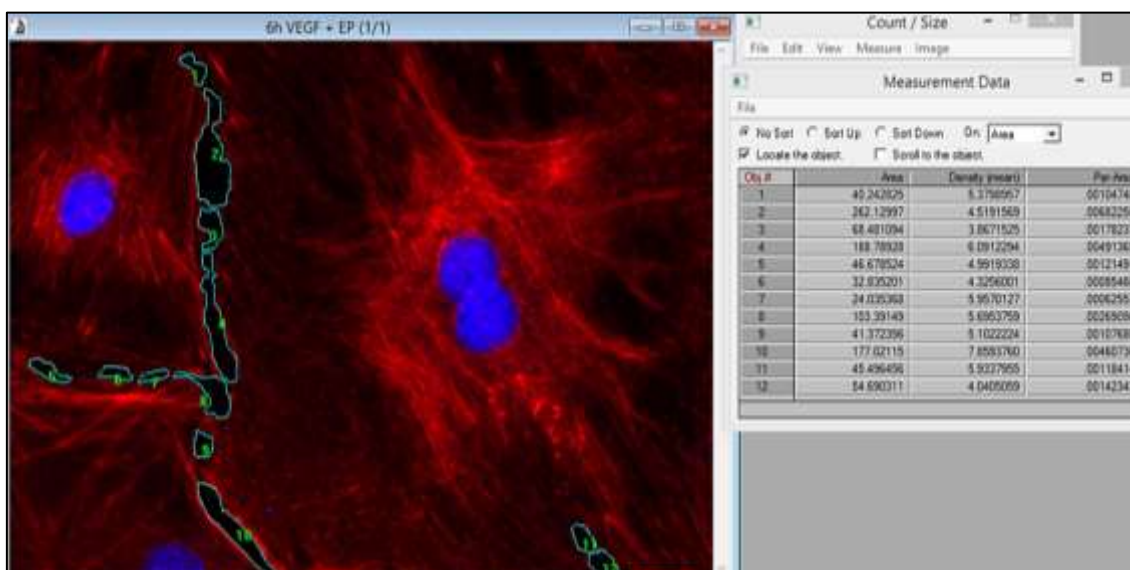
A área dos espaços intercelulares foi quantificada para verificar possíveis diferenças entre os tipos de estímulo e tempos de exposição. Para isso, foi utilizada a ferramenta Count/Size do Software Image Pro Plus (versão 4.5.0.29). Cada imagem foi analisada individualmente e as aberturas das junções interendoteliais (“J-int”) foram circulares manualmente, onde a área de cada “J-int” foi calculada.

Posteriormente, fez-se relação entre a área de cada “J-int” e a área total de cada imagem (“per-area”, denominação própria do software). Assim, a soma da per-area resultou na porcentagem total de aberturas das junções interendoteliais formadas, para cada imagem. Em seguida, foi calculada a média de per-area total de todas as imagens analisadas, de cada tipo de estímulo/tempo de exposição (**Figura 4**).

Além disso, a partir das imagens originais convertidas para 8 *bits*, foi calculada a densidade média (grau de escurecimento) de cada área circunscrita. Esta escala, que vai do nível 0 (preto) a 255 (branco), foi utilizada apenas como garantia de que não foram escolhidas nenhuma região marcada com Texas Red Phalloidina. Todas as imagens apresentavam a área total de 36.718,64  $\mu\text{m}^2$  e foram obtidas nas mesmas condições, com lente objetiva de 40 X (**Figura 4**).

Assim, a análise da diferença entre aberturas das junções interendoteliais dos diferentes estímulos foi realizada com as médias de per-areas calculadas (médias de porcentagem das “J-int”/estímulo), utilizando o software GraphPad Prism 5<sup>®</sup>.





**Figura 4.** Exemplo de análise individual e manual de cada abertura das junções interendoteliais (“J-int”) das CEPP-DBA/2. Foram calculadas as áreas de cada “J-int”, a relação entre a área de cada “J-int” e a área total de cada imagem e a densidade média. Imagem referente ao estímulo 6 h VEGF + 1 h EP-PbA (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; Barra de escala: 20  $\mu$ m).

### 3.9 Identificação dos microtúbulos por imunofluorescência

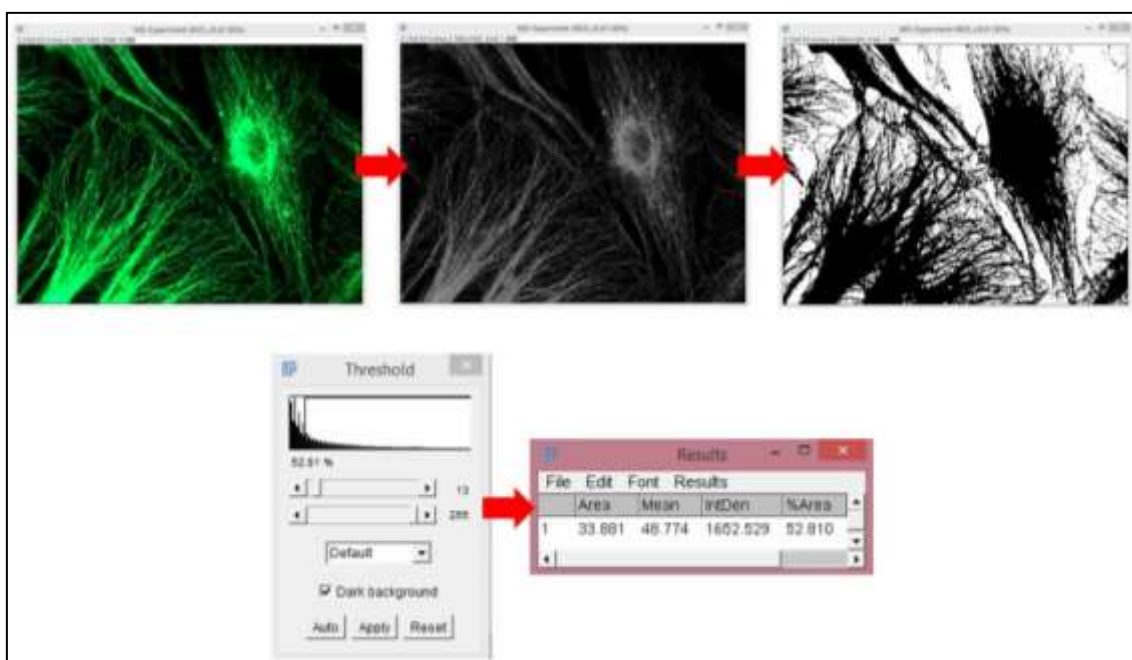
A identificação dos microtúbulos (MTs) foi realizada por ensaios de imunofluorescência. Para isso, as CEPP-DBA/2 foram incubadas e preparadas como descrito no item 3.5.

Após período necessário para adesão e confluência total, as células foram estimuladas com EP-PbA, por 1 h, na proporção de 25 EP-PbA/célula. Posteriormente, as células endoteliais foram lavadas com PBS 1 %, fixadas com paraformaldeído 1 % por 10 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 0,1 % por 15 minutos e bloqueadas com BSA 1 % por 30 minutos. Os microtúbulos foram identificados com o anticorpo primário policlonal rabbit anti- $\beta$ -tubulina (ABCAM), incubado *over-night*, a 4° C, na diluição 1:100. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo secundário goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Life Technologies), na diluição 1:400, por 1 h. Os núcleos celulares foram marcados, com Hoechst (H-33342, Life Technologies) por 5 minutos, na diluição 1:1000. Todas as soluções e anticorpos foram diluídos em PBS 1 %.

As lamínulas foram colocadas sobre lâminas de microscopia de vidro, contendo o meio de montagem Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma). As imagens foram analisadas pelo microscópio de fluorescência AXIO Imager M2 (Zeiss), com a câmera AxioCam HRc. Todas as imagens, com área total de  $5.962,13 \mu\text{m}^2$ , foram reproduzidas nas mesmas condições, com lente objetiva de 100 X.

### 3.10 Análise morfométrica dos microtúbulos

A análise e a quantificação das alterações dos microtúbulos foram avaliadas com a ferramenta "Threshold" do Software ImageJ (ImageJ/Fiji version 1.51g). A partir das imagens originais convertidas para 8 bits, foram geradas imagens binárias que representam a região marcada pelos microtúbulos. Então, foram determinadas a área total ocupada pela marcação do anticorpo  $\beta$ -tubulina, a fração da área ocupada, a média de níveis de cinza e a densidade integrada (produto da área de interesse pela média de níveis de cinza) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Exemplo de análise e quantificação das alterações dos microtúbulos. A partir de imagens binárias, que representam a região marcada pelos microtúbulos, foram determinadas a área total ocupada pela marcação do anticorpo  $\beta$ -tubulina, a fração da área ocupada, a média de níveis de cinza e a densidade integrada. Imagem referente ao grupo NE, reproduzida com lente objetiva de 100 X (NE: não estimuladas).

Assim, para cada imagem, a fluorescência celular total corrigida (FCTC) foi calculada a partir da seguinte fórmula: FCTC = densidade integrada da  $\beta$ -tubulina – (área total ocupada pela  $\beta$ -tubulina X média de níveis de cinza do *background*), como descrito na literatura (MCCLOY et al., 2014).

Além disso, a fluorescência total da marcação do anticorpo  $\beta$ -tubulina foi confirmada por ensaio fluorométrico. Para isso, as células endoteliais foram incubadas em placas pretas de poliestireno opaca de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço). E após seguir todos os passos do protocolo de identificação de microtúbulos, descritas no item 3.9, a fluorescência emitida pelo goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 foi detectada pelo laser GFP (excitação 488 nm / emissão 510 nm) e a emitida pelos núcleos celulares foi registrada pelo laser Hoechst (excitação 350 nm / emissão 461 nm). A leitura das fluorescências foi realizada pelo equipamento Spectra Max i3, da Molecular Devices.

### **3.11 Identificação e análise morfométrica da kinase de adesão focal por imunofluorescência**

A identificação da kinase de adesão focal (FAK) fosforilada foi elaborada por ensaios de imunofluorescência. Para isso, as CEPP-DBA/2 foram incubadas e preparadas como descrito no item 3.5.

Após período necessário para adesão e confluência total, as células foram estimuladas com EP-PbA, por 1 h, na proporção de 25 EP-PbA/célula. Posteriormente, as células foram lavadas, fixadas, permeabilizadas e bloqueadas com o mesmo protocolo descrito no item 3.9. Para identificação de FAK fosforilada, foi utilizado o anticorpo primário policlonal rabbit anti-FAK-phospho-Tyr576/Tyr577 (SABBIOTECH), incubado *over-night*, a 4° C, na diluição 1:100. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Life Technologies), na diluição 1:400, por 1 h. Os núcleos celulares foram marcados, com Hoechst (H-33342, Life Technologies) por 5 minutos, na diluição 1:1000. Todas as soluções e anticorpos foram diluídos em PBS 1 %.

As lamínulas foram colocadas sobre lâminas de microscopia de vidro, contendo o meio de montagem Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma). As imagens foram analisadas no microscópio de fluorescência AXIO Imager M2 (Zeiss). Todas as imagens, com área total de  $14.552 \mu\text{m}^2$ , foram reproduzidas nas mesmas condições, com lente objetiva de 63 X.

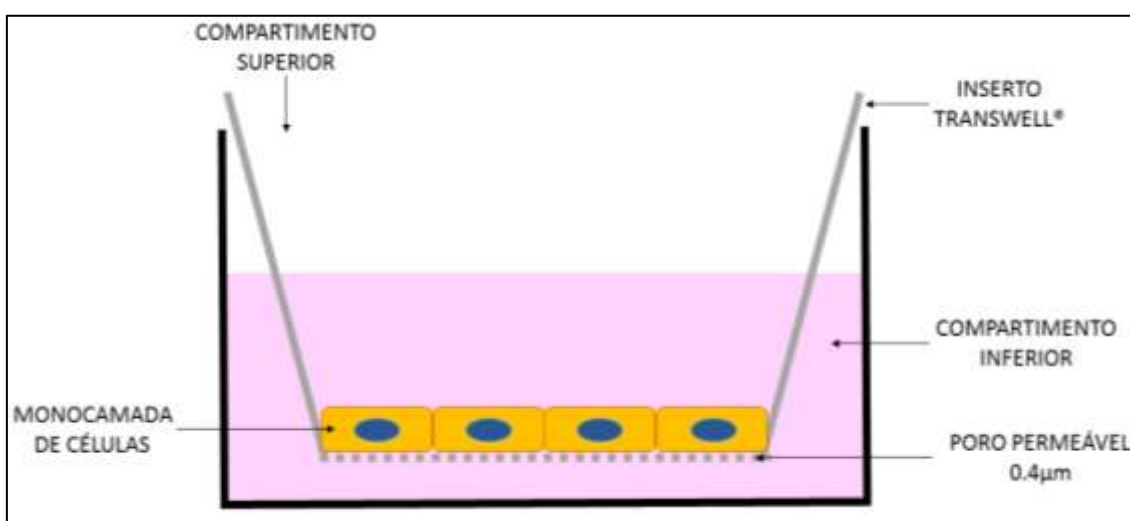
A análise e a quantificação das alterações da distribuição de FAK fosforilada foram avaliadas com a ferramenta "*Threshold*" do Software ImageJ (ImageJ/Fiji version

1.51g), como descrito no item 3.10 e demonstrado na **Figura 5**. Para cada imagem, a fluorescência celular total corrigida (FCTC) foi calculada a partir da seguinte fórmula:  $FCTC = \text{densidade integrada de FAK fosforilada} - (\text{área total ocupada por FAK fosforilada} \times \text{média de níveis de cinza do } background)$ , método também descrito no item 3.10.

### 3.12 Ensaio de permeabilidade por sistema de *Transwell*<sup>®</sup>

O aumento da permeabilidade foi analisado a partir de CEPP-DBA/2 incubadas em insertos de membranas permeáveis ( $2,2 \times 10^4$  células/inserto), com poros de  $0,4 \mu\text{m}$  (*Transwell*<sup>®</sup> Corning), pré-tratados com gelatina, acoplados em placas de poliestireno de 24 poços, mantidas em meio de cultura DMEM, mantidas a  $37^\circ\text{C}$  e 5 % de  $\text{CO}_2$  (**Figura 6**). Após 96 horas, período necessário para adesão e confluência total, como determina alguns estudos (WOODRUFF et al., 2016), as células foram estimuladas com EP-PbA ou ENP, por 1 h, na proporção de 25 EP-PbA/célula ou 25 ENP/célula.

Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por HBSS (solução transparente) e, no compartimento superior de cada inserto (em contato com as células), foram incubados 200  $\mu\text{L}$  de Azul de Evans, na concentração de 2 mg/mL, a  $37^\circ\text{C}$ . Após 30 minutos, os sobrenadantes do compartimento inferior, de cada amostra, foram coletados em triplicatas e analisados em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 650 nm (*NanoDrop 2000*, *Thermo Scientific*). Finalmente, a partir da leitura de uma curva padrão de concentrações previamente conhecidas de Azul de Evans, de 0,2 mg/mL a 0,0031 mg/mL, no mesmo comprimento de onda, calculou-se a concentração de Azul de Evans de cada amostra.



**Figura 6.** Esquema do sistema de *Transwell*<sup>®</sup>. CEPP-DBA/2 foram cultivadas sobre membrana permeável do inserto e estimuladas com EP-PbA ou ENP. A quantificação da concentração de

Azul de Evans do compartimento inferior, que atravessou a monocamada de células e os poros da membrana, foi realizada por espectrofotômetro, a 650 nm (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; ENP: eritrócitos não parasitados).

### **3.13 Ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio**

Para análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as CEPP-DBA/2 foram incubadas em placas opacas pretas de poliestireno de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço), mantidas a 37° C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após período de adesão e confluência, as células foram lavadas com solução HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e marcadas com 25 µM de 5(6)-Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-carboxy-H2DCFDA ou DCFH), marcador fluorogênico de espécies reativas, em células vivas (kit Image-IT® LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection).

Como controle, antes da marcação com DCFH, as células receberam pré-tratamento com 10 mM de glutatona (GSH) e 20 mM de acetilcisteína (NAC), por 30 minutos. Também foi feito pré-tratamento com o controle positivo com 100 µM de terc-butil hidroperóxido (TBHP), por 3 h. Em seguida, as células foram estimuladas com EP-PbA ou ENP, por 1 h, na proporção de 25 EP-PbA/célula ou 25 ENP/célula. Os núcleos celulares foram marcados com Hoechst, na diluição 1:1000. Além disso, para prevenir reações de oxidação secundárias artificiais, devido à presença de metais nas soluções e recipientes, foi adicionado 100 µM de ácido dietilentríaminopenta acético (DTPA) em todas as soluções (LAURINDO; FERNANDES; SANTOS, 2008).

A fluorescência emitida pelo DCFH foi registrada pelo laser GFP (excitação 488 nm / emissão 510 nm), enquanto que a emitida pelos núcleos celulares foi detectada pelo laser Hoechst (excitação 350 nm / emissão 461 nm). A leitura das fluorescências foi realizada pelo equipamento Spectra Max i3, da Molecular Devices.

### **3.14 Análise da expressão proteica de Rho-GTPases, VE-caderina e cadeia leve da miosina fosforilada por Western blot**

Para quantificação da expressão proteica de Rho-GTPases, VE-caderina e cadeia leve da miosina (MLC) fosforilada, as células foram cultivadas em placas de poliestireno de 24 poços (1x10<sup>5</sup> células/poço), mantidas a 37° C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Após período necessário para adesão e confluência total, as CEPP-DBA/2 foram estimuladas e divididas pelos seguintes grupos: 12 h com TNF ou VEGF; 12 h com TNF ou VEGF, seguido

de 1 h com EP-PbA; apenas 1 h com EP-PbA (proporção de 25 EP-PbA/célula); apenas 1 h com ENP (proporção de 25 EP-PbA/célula) ou NE.

Em seguida, as CEPP-DBA/2, mantidas em gelo, foram lisadas em tampão RIPA, contendo inibidor de proteases (proporção de 1:100), por 30 minutos, em agitação. O conteúdo de cada poço foi centrifugado a 16000 g, por 20 minutos. Assim, o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de Western blot (WB) ou armazenado em freezer -80° C. Após centrifugação, uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi separada para dosagem de proteína total, que determinou a utilização de 20 µg de cada amostra. Esta etapa de quantificação foi realizada com o Kit Bca Protein Assay. Como referência, foi utilizada a curva padrão de BSA (albumina de soro bovino) de 20 a 2000 µg/mL. A leitura das amostras foi feita em 562 nm, no espectrofotômetro (*NanoDrop® 2000 - Thermo Scientific*).

As amostras (20 µg de proteína total) foram fracionadas em gel de poliacrilamida de 12 % ou 15 % (porcentagem determinada pelo tamanho da proteína de interesse), em presença de SDS, sob condições redutoras e submetidas a um campo elétrico de amperagem constante de 20 mA, com voltagem em torno de 90-100 V. Após o término da corrida, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de polivinidileno (PVDF), sob uma corrente de 300 mA, por 2 h.

De acordo com o protocolo do anticorpo, as membranas foram bloqueadas em solução contendo 10 % de leite em pó (Molico) diluído em TBS-Tween ou em solução de 5 % de BSA em TBS-Tween, por 2 h.

Assim, foram realizadas as seguintes incubações: [1:500.000] de anti-β-actina (Novus Biologicals), por 2 h, seguido de [1:20.000] do secundário goat anti-mouse HRP (Merck Millipore), por 2 h; [1:1.000] de anti-Rhoa (ABCAM), *over-night*, seguido de [1:20.000] do secundário goat anti-rabbit HRP (Merck Millipore), por 2 h; [1:400] de anti-Cdc42 (ABCAM), *over-night*, seguido de [1:20.000] do goat anti-rabbit HRP, por 2 h; [1:1000] de anti-VE-caderina (ABCAM), *over-night*, seguido de [1:20.000] do goat anti-rabbit HRP, por 2 h e [1:800] de *anti-phospho-myosin light chain* (Thr18/Ser19), *over-night*, seguido de [1:20.000] do goat anti-rabbit HRP, por 2 h. Além da incubação com [1:60.000] do controle anti-GAPDH (SIGMA), *over-night*, seguido de [1:20.000] do goat anti-rabbit HRP, por 2 h. Os anticorpos foram diluídos, de acordo com especificação, em solução contendo 1 % de leite em pó diluído em TBS-Tween ou em solução de 5 % de BSA em TBS-Tween.

A detecção da proteína na membrana foi realizada a partir da revelação com o substrato quimioluminescente Clarity Western ECL (Bio-Rad). A análise dos pesos moleculares das proteínas foi realizada com o Software Image Lab (Bio-Rad) e foi utilizado

como referência o peso molecular padrão Precision Plus Protein (Bio-Rad). A quantificação das proteínas foi executada com o Software Image J (ImageJ/Fiji version 1.51g), em que foi calculada a relação entre a densidade óptica da banda da amostra e a densidade óptica da banda controle.

### **3.15 Análise de ativação de RhoA por G-LISA™**

A atividade de RhoA foi avaliada pelo kit de ativação *RhoA G-LISA™ Activation Assay kit* (Cytoskeleton Inc., Denver, CO), de acordo com as instruções do fabricante.

Para isso, as CEPP-DBA/2 foram cultivadas em placas de poliestireno de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço), mantidas a 37° C e 5 % de CO<sub>2</sub> e estimuladas com EP-PbA ou ENP, por 1 h, na proporção de 25 EP-PbA/célula ou 25 ENP/célula. E para obtenção de 1000 µg de proteína por amostra, passaram por extração e dosagem de proteínas totais, como descrito no item 4.14.

Posteriormente, os lisados de proteínas foram incubados em microplaca, contendo poços revestidos com Rhoketin, que se liga seletivamente à RhoA ativa. Após etapa de ligação, os lisados reagiram com os anticorpos primário anti-RhoA e secundário HRP-conjugado (fornecidos pelo kit) e, posteriormente, com reagente de detecção de HRP. Assim, a leitura das amostras foi realizada por espectrofotômetro, a 490 nm. As absorbâncias foram corrigidas em comparação à absorbância do tampão de lise (branco). Além disso, utilizou-se proteína constitutiva de RhoA ativa (fornecida pelo kit), como controle positivo para validar o funcionamento adequado do ensaio.

### **3.16 Análises estatísticas**

Todos os dados foram analisados pelo teste de normalidade *D'Agostino-Pearson*. Assim, variáveis não paramétricas foram comparadas utilizando o teste *Mann-Whitney* ou, para múltiplas comparações, o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*. As variáveis paramétricas foram comparadas por teste-T de *Student* ou, para múltiplas comparações, pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste *Bonferroni*. As análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 5®*.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Identificação das CEPP-DBA/2**

Na literatura, pode-se encontrar muitos estudos sobre isolamento e caracterização de células endoteliais humanas e murinas. Citometria de fluxo, imunofluorescência e ensaio de incorporação de LDL são as principais técnicas encontradas para a identificação e caracterização deste tipo celular. Utilizados em conjunto, alguns anticorpos são denominados como marcadores específicos de células endoteliais (JAFFE et al., 1973; VOYTA, 1984; CHEN; FEI; LI, 1995; GARLANDA; DEJANA, 1997; UNGER et al., 2002; LOIOLA et al., 2013).

Células endoteliais primárias geralmente apresentam produção constitutiva elevada de fator de *von Willebrand* (vWF), molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1 ou CD31) e de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (UNGER et al., 2002). Sabe-se também que a VE-caderina é uma molécula de adesão estritamente específica de células endoteliais, localizada nas junções intercelulares, de crucial importância para a manutenção e controle do contato celular (VESTWEBER, 2007).

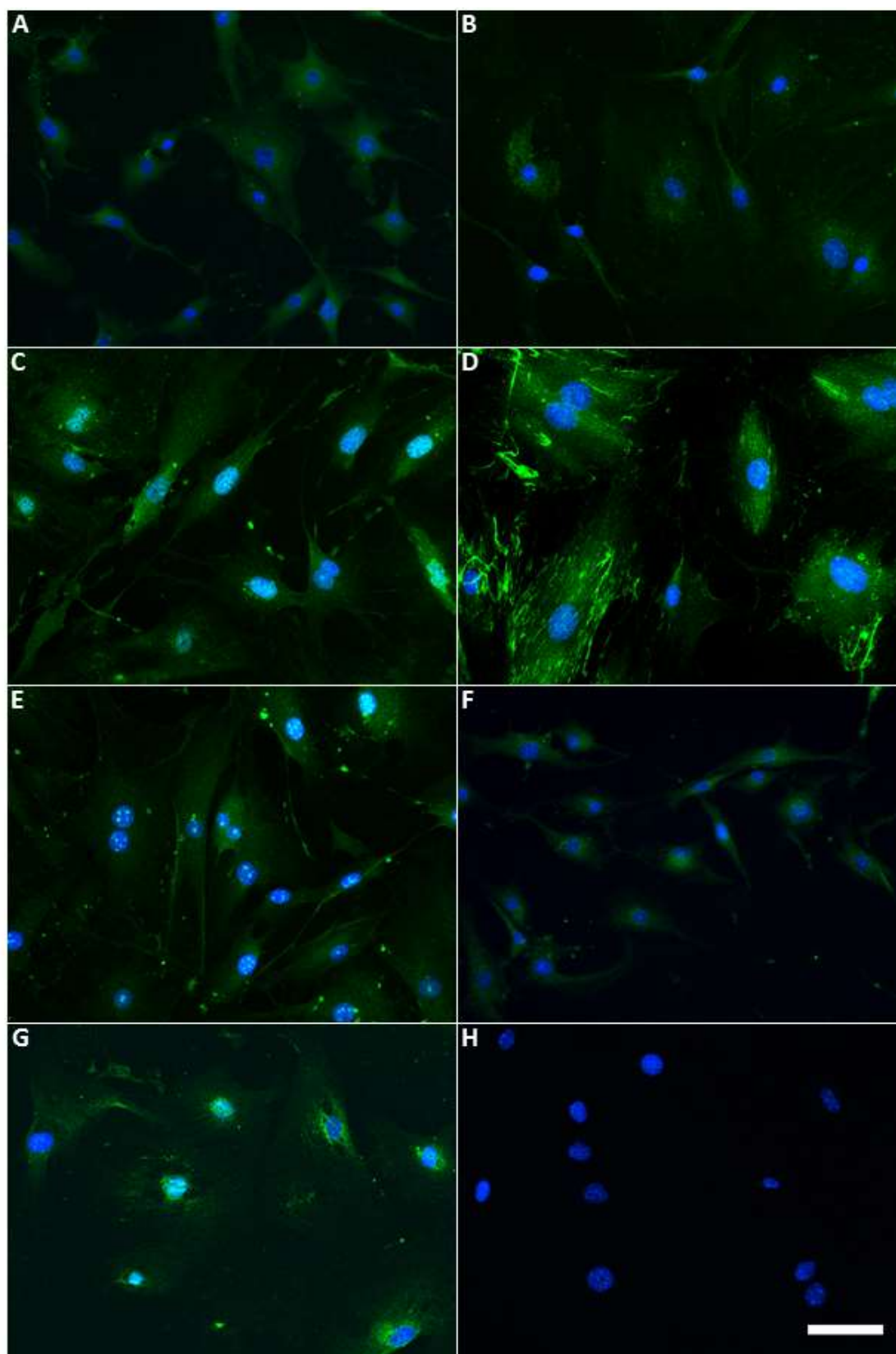
No entanto, as CEs respondem a estímulos pró-inflamatórios, por indução de outras moléculas de adesão, tais como molécula de adesão celular intercelular 1 (ICAM-1 ou CD54), molécula de adesão celular endotelial vascular (VCAM-1 ou CD106) e E-selectina (CD62E) (UNGER et al., 2002).

As CEs também são reconhecidas por expressar óxido nítrico sintase (e-NOS), molécula essencial para mediação da angiogênese, induzida por VEGF, para a produção de óxido nítrico (KROLL; WALTENBERGER, 1998). E além disso, expressam enzima conversora de angiotensina (ACE), de importante função na sinalização endotelial e remodelamento vascular (KOHLESTEDT, 2004).

Os ensaios de imunofluorescência para caracterização das CEPP-DBA/2 mostraram marcações positivas para todos os anticorpos específicos citados acima (anti-vWF, anti-VCAM, anti-ACE, anti-CD62E, anti-eNOS, anti-CD31 e anti-VE-caderina) (**Figura 7**). Este resultado indica que as células isoladas dos pulmões de camundongos DBA/2 são verdadeiramente células endoteliais e que mantêm características típicas de células endoteliais em culturas celulares.

Além disso, dados gerados, em nosso laboratório, pela doutoranda Luana dos Santos Ortolan, mostraram que as mesmas células apresentaram expressões para ICAM, VCAM, CD31, VE-caderina, CD36 e endogлина, observadas por citometria de fluxo (dados não publicados), validando também as CEPP-DBA/2 apresentarem características singulares de células endoteliais.





**Figura 7.** Ensaio de Imunofluorescência para identificação das CEPP-DBA/2. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-VWF (**A**), anti-CD31 (**B**), anti-eNOS (**C**), anti-ACE (**D**), anti-CD62E (**E**), anti-VCAM (**F**) e anti-VE-caderina (**G**), todos na concentração 1:100, seguidos do anticorpo

secundário goat anti-rabbit Alexa Fluor 488, na concentração 1:400, com seu controle negativo também representado (H). Núcleos celulares marcados, em azul, com Hoechst (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; Barra de escala: 50 µm).

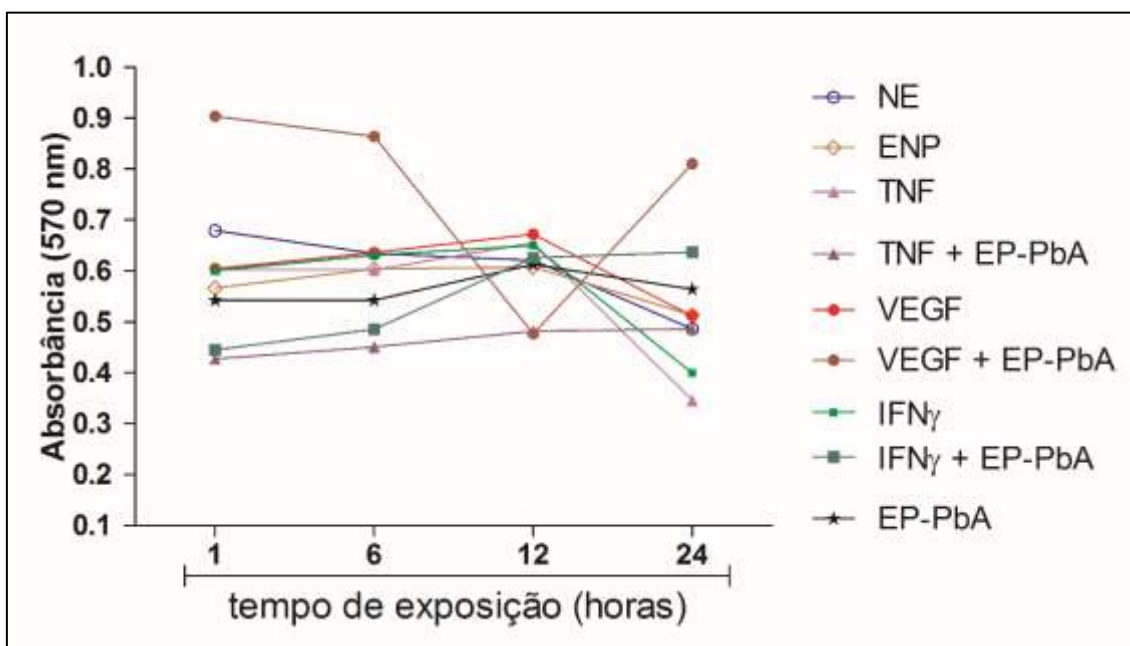
#### **4.2 TNF, VEGF, IFN $\gamma$ e EP-PbA não afetaram a atividade do metabolismo mitocondrial e a viabilidade das CEPP-DBA/2**

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular de MTT, há muito tempo utilizado, foi projetado para quantificar o crescimento, a viabilidade e a proliferação celular, em células vivas, baseado na atividade da redutase mitocondrial (RISS TL, MORAVEC RA, NILES AL, 2013). A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (sal de coloração amarela, solúvel em água) para cristais de formazan (sal de coloração arroxeadada, insolúvel em água). Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (MOSMANN, 1983; RISS TL, MORAVEC RA, NILES AL, 2013).

Os diferentes tipos de estímulo e tempos de exposição aplicados não alteraram a atividade mitocondrial das CEPP-DBA/2, portanto não as impediram de reduzir MTT a formazan, uma vez que todas as amostras apresentaram pico de absorbância máxima próximo a 570 nm (**Figura 8**).

Considerando que, quando as células morrem, ocorre a perda da capacidade de converter MTT em cristais de formazan e, portanto, de gerar cor púrpura, este processo serve como marcador específico apenas para células viáveis, uma vez que este ocorre apenas em mitocôndrias ativas (MOSMANN, 1983; RISS TL, MORAVEC RA, NILES AL, 2013). As células estimuladas e não estimuladas mantiveram a absorbância próxima ao comprimento de onda de 570 nm.

Portanto, pode-se concluir que os diferentes tipos de estímulo e tempos de exposição não afetaram significativamente a atividade mitocondrial e a viabilidade celular (**Figura 8**).



**Figura 8.** TNF, VEGF, IFN $\gamma$  e EP-PbA não afetaram a atividade mitocondrial e a viabilidade das CEPP-DBA/2. Análise realizada pelo método de comparação múltipla ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; IFN $\gamma$ : interferon gama).

### 4.3 EP-PbA provocam alterações no citoesqueleto das CEPP-DBA/2

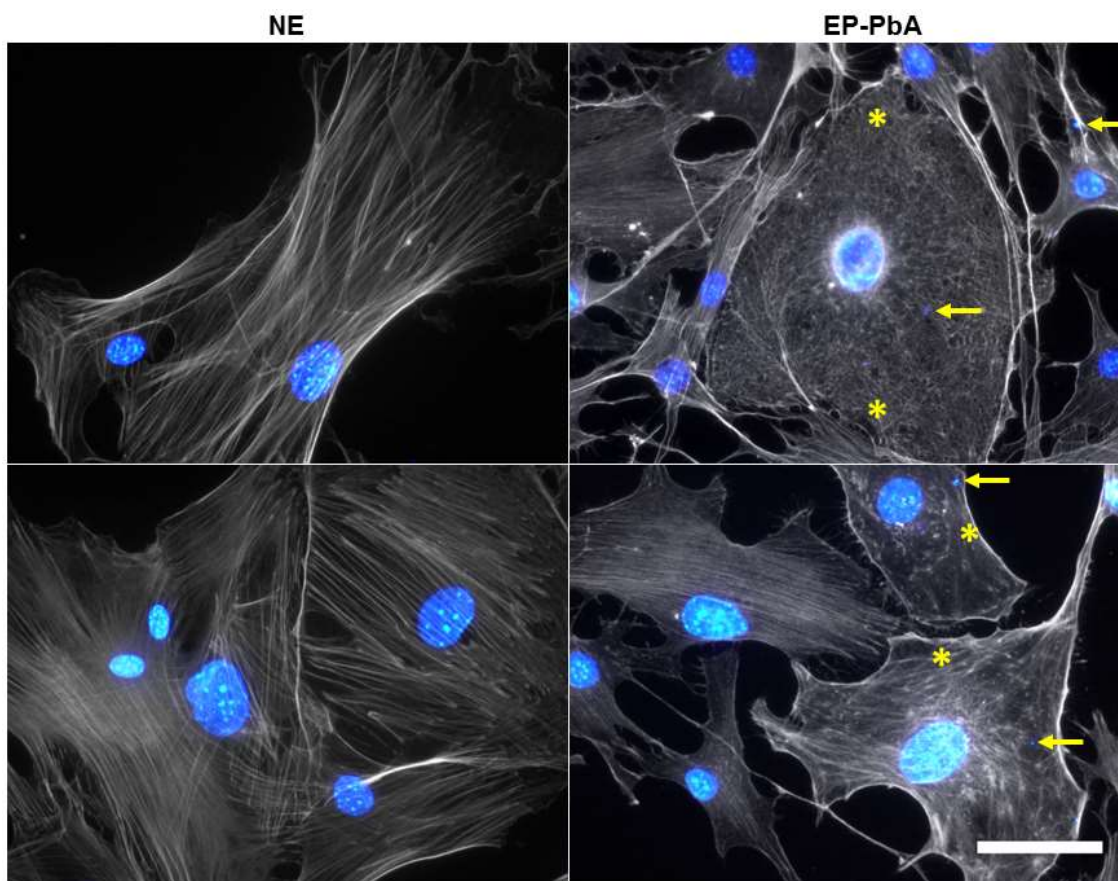
#### 4.3.1 EP-PbA provocam alterações morfológicas nos microfilamentos de actina e aumento dos espaços interendoteliais das CEPP-DBA/2

Sabe-se que na malária grave, os eritrócitos parasitados aderem ao capilar do endotélio e este sequestro está associado ao desenvolvimento de LPA/SDRA (COX-SINGH et al., 2010; ANIDI et al., 2013). Anteriormente, foi demonstrado, por Anidi e colaboradores, que camundongos C57BL/6 também infectados com *P. berghei* apresentaram aumento da permeabilidade endotelial, causada pelo sequestro de parasitas (ANIDI et al., 2013).

Os microfilamentos de actina e microtúbulos são conhecidos por interagirem funcionalmente no processo de regulação da permeabilidade endotelial, uma vez que a desmontagem dos microtúbulos resulta no rearranjo da actina, alterando as fibras de tensão, provocando contração celular e aumento da permeabilidade (DUDEK; GARCIA, 2001; BIRUKOVA et al., 2004).

À vista disso, os experimentos de imunofluorescência, descritos a seguir, tiveram como objetivo investigar possíveis alterações nos microfilamentos de actina e nas junções interendoteliais das células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2), causadas pela presença de eritrócitos parasitados com esquistossomos de *P. berghei* ANKA (EP-PbA).

Os resultados indicaram, por análise de imagens de CEPP-DBA/2 isoladas, que o contato com EP-PbA provoca alterações na conformação dos microfilamentos de actina. Observa-se que, nas células não estimuladas (NE), a actina apresenta-se como fibras longas e paralelas, atravessando longitudinalmente todo o comprimento das células. Enquanto que, as células estimuladas com EP-PbA tiveram seu citoesqueleto modificado. A actina passa a se apresentar como uma rede de filamentos curtos e entrecruzados ou, até mesmo, perde a característica de microfilamento (**Figura 9**).



**Figura 9.** EP-PbA provocam alterações morfológicas do citoesqueleto das CEPP-DBA/2. Células NE apresentaram microfilamentos de actina íntegros, enquanto que EP-PbA aderidos provocam encurtamento e emaranhamento destes filamentos, perturbações indicadas por asteriscos. A actina foi marcada com Texas Red Phalloidina [1:100] e os núcleos das células endoteliais e dos eritrócitos parasitados, marcados com Hoechst [1:1000], em azul. Setas amarelas apontam nú-

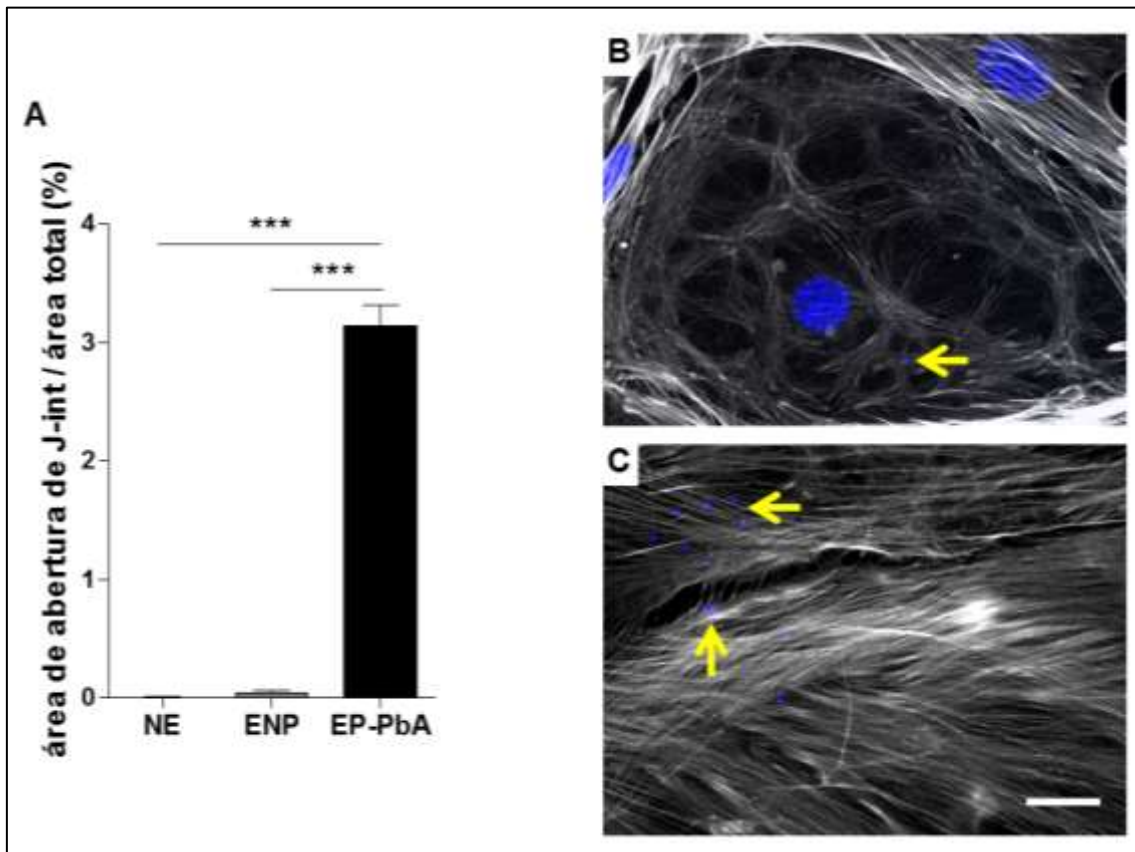
cleos de eritrócitos parasitados (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; Barra de escala: 50 µm).

Interessantemente, regiões com células 100 % confluentes, validaram que a adesão de EP-PbA rompeu a conexão intercelular, provocando aumento da abertura das junções interendoteliais (“J-int”) (**Figura 10**).

Na quantificação dos espaços intercelulares, observa-se que as CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as áreas de “J-int” das células NE e das ENP. Além disso, não houve diferença significativa entre as porcentagens das áreas de “J-int” de NE e ENP (**Figura 10A**).

Ainda, observa-se que as células estimuladas com eritrócitos parasitados podem apresentar aberturas entre junções interendoteliais cerca de 3 vezes mais elevadas, quando comparadas com as células NE e ENP, que se apresentam, de forma muito semelhante, com perturbações nas junções interendoteliais praticamente ausentes (**Figura 10A**).

Imagens obtidas em maior aumento, com lente objetiva de 63 X, registraram, com detalhes, a reorganização dos microfilamentos de actina em formato de malha de filamentos curtos e entrecruzados (**Figura 10B**). Além disso, destacam a presença de alguns EP-PbA aderidos na região periférica, próximos as junções endoteliais estressadas (**Figura 10C**).



**Figura 10.** EP-PbA promovem abertura das junções interendoteliais em CEPP-DBA/2. **(A)** A quantificação das áreas dos espaços intercelulares indicou aumento significativo da abertura entre as junções interendoteliais causado por EP-PbA. Resultado representativo de sete experimentos independentes, expressos pela média  $\pm$  erro padrão, analisados pelo método ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 16$  a  $29$  imagens/estímulo; \*\*\* para  $p < 0,001$ ). **(B)** e **(C)** Em detalhe, reorganização dos microfilamentos de actina, adesão de EP-PbA (setas amarelas) e perturbação de junções interendoteliais. A actina foi marcada com Texas Red Phalloidina [1:100]. Núcleos celulares e dos eritrócitos parasitados foram marcados, em azul, com Hoechst [1:1000] (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados; Barra de escala:  $20 \mu\text{m}$ ).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou que as mesmas células endoteliais utilizadas neste trabalho, quando estimuladas com lisado *P. berghei* ANKA, apresentaram perturbações nos microfilamentos de actina e nas junções interendoteliais (PEREIRA et al., 2016). Semelhantemente, os resultados acima apresentados revelaram as mesmas perturbações no endotélio pulmonar murino, entretanto causadas pela adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA.

Por outro lado, recentemente, um estudo sobre malária *in vitro* apresentou que a citoadesão de eritrócitos parasitados com *P. falciparum* em células endoteliais cerebrais foi acompanhada da ruptura destes eritrócitos e a liberação de materiais intraeritrocitários foi o principal fator que desencadeou as alterações e disfunção endotelial cerebral (GALLEGO-DELGADO et al., 2016). Apesar das células endoteliais cerebrais terem sido estimuladas com eritrócitos fragmentados, este trabalho exibiu perturbações e abertura nas junções interendoteliais muito semelhantes às imagens aqui apresentadas (GALLEGO-DELGADO et al., 2016). Esta similaridade entre as imagens sugere que, em nosso modelo experimental, as alterações na conexão entre as junções interendoteliais iniciam-se mais precocemente.

Além disso, nossos resultados também corroboram com o estudo *in vitro* que demonstrou que a adesão de *P. falciparum*, em células endoteliais pulmonares humanas, causou disfunção da barreira endotelial, devido à contração celular e alteração de junções intercelulares, causando aumento da permeabilidade endotelial. Este estudo também mostrou que esta disfunção, causada pela adesão de *P. falciparum*, afetou diretamente a sinalização de Rho/Rho kinase, o que também será discutido mais adiante (TAOUFIQ et al., 2008).

#### **4.3.2 TNF, VEGF e IFN $\gamma$ provocam reorganização dos microfilamentos de actina e aumento dos espaços interendoteliais das CEPP-DBA/2, porém não mais que EP-PbA**

Além do sequestro de eritrócitos parasitados, diversos fatores, tais como neutrófilos, VEGF, IFN $\gamma$  podem estar contribuindo com a patogênese da LPA/SDRA (YAMADA, 2004; EPIPHANIO et al., 2010; AITKEN et al., 2014; SERCUNDES et al., 2016). Citocinas inflamatórias envolvidas com o aumento da permeabilidade, como o TNF, contribuem com este processo pela desestabilização de junções interendoteliais (GALLEGO-DELGADO et al., 2016). Além disso, sabe-se que o TNF, VEGF e outros agentes alteram a atividade das Rho-GTPases, processo intimamente relacionado à disfunção endotelial (BECKERS; VAN HINSBERGH; VAN NIEUW AMERONGEN, 2010; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010).

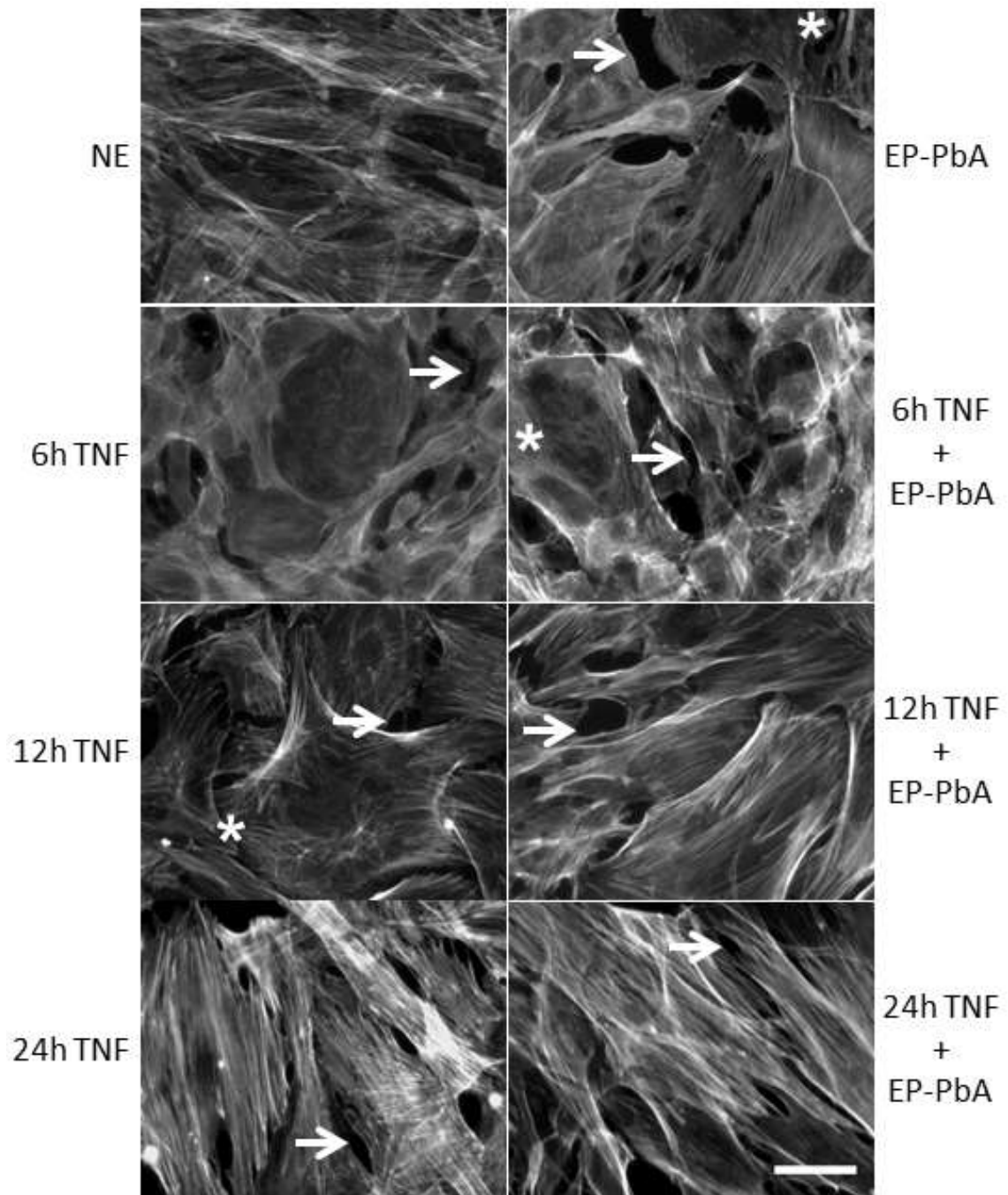
Portanto, os experimentos de imunofluorescência, descritos a seguir, tiveram como objetivo investigar possíveis alterações nos microfilamentos de actina e junções interendoteliais das células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2), na presença de VEGF, TNF, IFN $\gamma$  e eritrócitos parasitados com esquistozonites de *P. berghei* ANKA (EP-PbA).

Primeiro, foram realizados ensaios com TNF. As CEPP-DBA/2 foram estimuladas com TNF e EP-PbA e divididas em grupos, de acordo com o tipo de estímulo e tempo de exposição: 6 h, 12 h ou 24 h de TNF; 6 h, 12 h ou 24 h de TNF, seguidos de 1 h com EP-PbA; combinação de TNF e EP-PbA por 1 h; 1 h com EP-PbA; 1 h com ENP e as células NE.

Assim, foi possível observar que os estímulos foram capazes de provocar alterações no citoesqueleto das CEPP-DBA/2. Normalmente, os microfilamentos de actina são dispostos em fibras longas e paralelas, ocupando todo o comprimento celular (ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013), como pode ser observado na imagem de células não estimuladas NE (**Figura 11**). Todos os diferentes estímulos, mas principalmente EP-PbA, 12 h TNF e 6 h TNF + EP-PbA provocaram modificações na conformação dos microfilamentos de actina, que passou a se apresentar de forma irregular, como filamentos curtos e não paralelos (**asteriscos, Figura 11**).

As imagens também revelaram que os diferentes estímulos romperam a conexão intercelular, provocando aumento da abertura das junções interendoteliais (“J-int”). Observou-se notável diferença entre as células NE e os demais estímulos. As setas indicam o aumento da abertura das “J-ints”, que ocorreu em todas as imagens, com exceção de NE (**setas, Figura 11**).

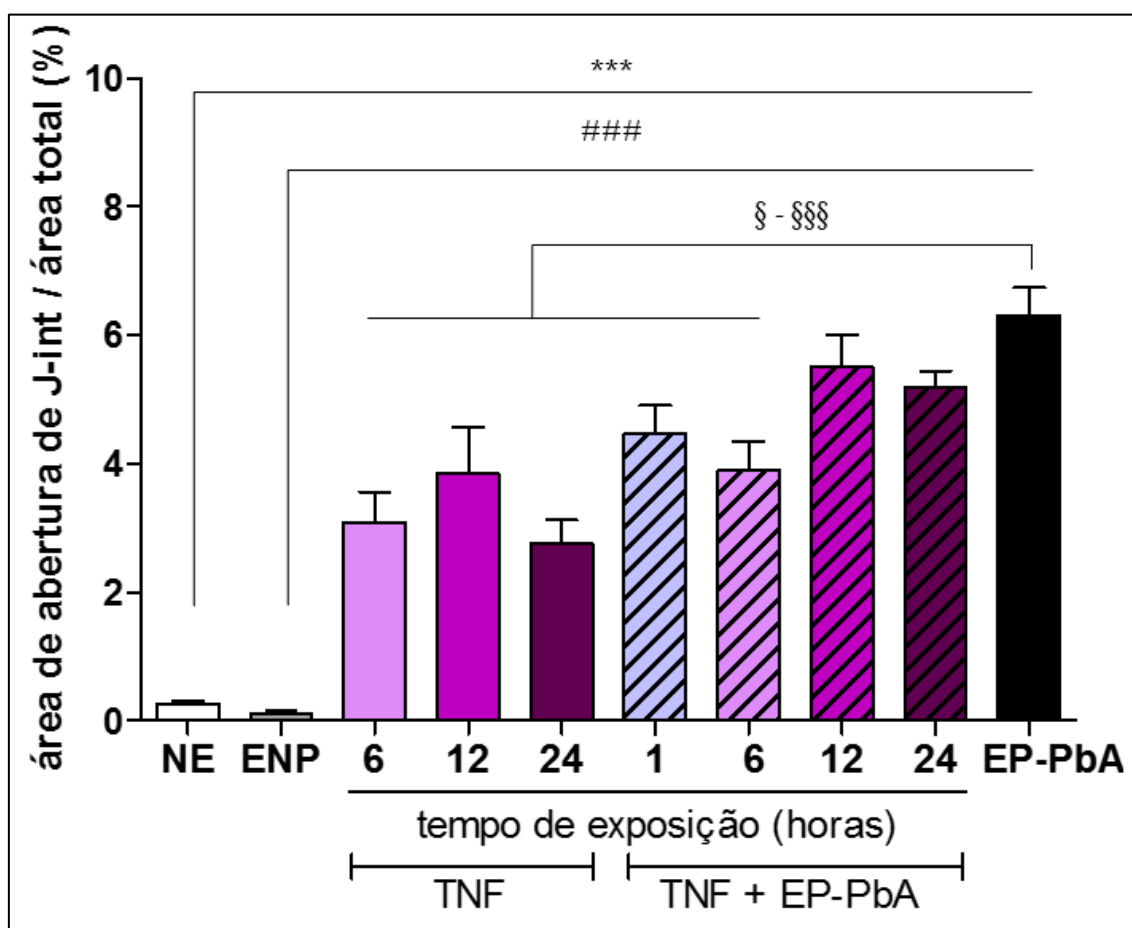




**Figura 11.** TNF e EP-PbA provocam alterações dos microfilamentos de actina e das junções interendoteliais das CEPP-DBA/2. A actina foi marcada com Texas Red Phalloidina [1:100] e visualizada por imunofluorescência. As imagens mostram o rearranjo dos microfilamentos de actina (asteriscos) e aparecimento de espaços entre as junções interendoteliais (setas) (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; TNF: fator de necrose tumoral; Barra de escala: 50  $\mu$ m).

Na quantificação dos espaços intercelulares, observa-se que os três diferentes tempos de estímulo de TNF e as 4 combinações de TNF + EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as porcentagens das áreas de “J-int” das células NE. Observa-se também que todos estes estímulos apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as porcentagens das áreas das células ENP. Entretanto, não houve diferença significativa entre as porcentagens das áreas de “J-int” de NE e ENP (**Figura 12**).

Notavelmente, as células estimuladas apenas com EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que os três tempos de estímulo de TNF e maiores que as combinações 1 h TNF + EP-PbA e 6 h TNF + EP-PbA. Entretanto, não houve diferença entre o aumento das porcentagens das áreas de “J-int” dos três diferentes tempos de estímulo de TNF e as quatro combinações de TNF + EP-PbA.



**Figura 12.** Quantificação da área de abertura das junções interendoteliais “J-int” das CEPP-DBA/2, frente ao estímulo de TNF e EP-PbA. Resultados referentes a dois experimentos agrupados expressos pela média  $\pm$  erro padrão, analisados pelo método ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 5$  a 18 imagens/estímulo; \* representa diferença em relação à NE, # em

relação à ENP e §, em relação à EP-PbA; § para  $p < 0,05$ , §§ para  $p < 0,01$ , \*\*\*, §§§, ### para  $p < 0,001$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados; TNF: fator de necrose tumoral).

Sabe-se que o TNF é um importante ativador de células endoteliais, e tem sido relacionado com o aumento da permeabilidade endotelial, por meio da contração do citoesqueleto e, conseqüente, formação de edema pulmonar (SAWANT et al., 2014).

Em estudo realizado com células endoteliais de veia umbilical humana, observou-se que o TNF, a partir de 8 horas de exposição, causa perturbações nos microfilamentos de actina e abertura nas junções interendoteliais (MCKENZIE; RIDLEY, 2007).

Semelhantemente, os resultados aqui apresentados revelaram as mesmas perturbações no endotélio pulmonar murino, entretanto, neste caso, o TNF atuou precocemente, a partir de 6 horas exposição.

Outros estudos observaram que o TNF está envolvido com a ruptura das junções aderentes, induzindo alterações nos microfilamentos de actina, agindo sobre as proteínas integrantes deste complexo de junções e, conseqüentemente, causando aumento da permeabilidade das células endoteliais (PETRACHE et al., 2001; PRASAIN; STEVENS, 2009).

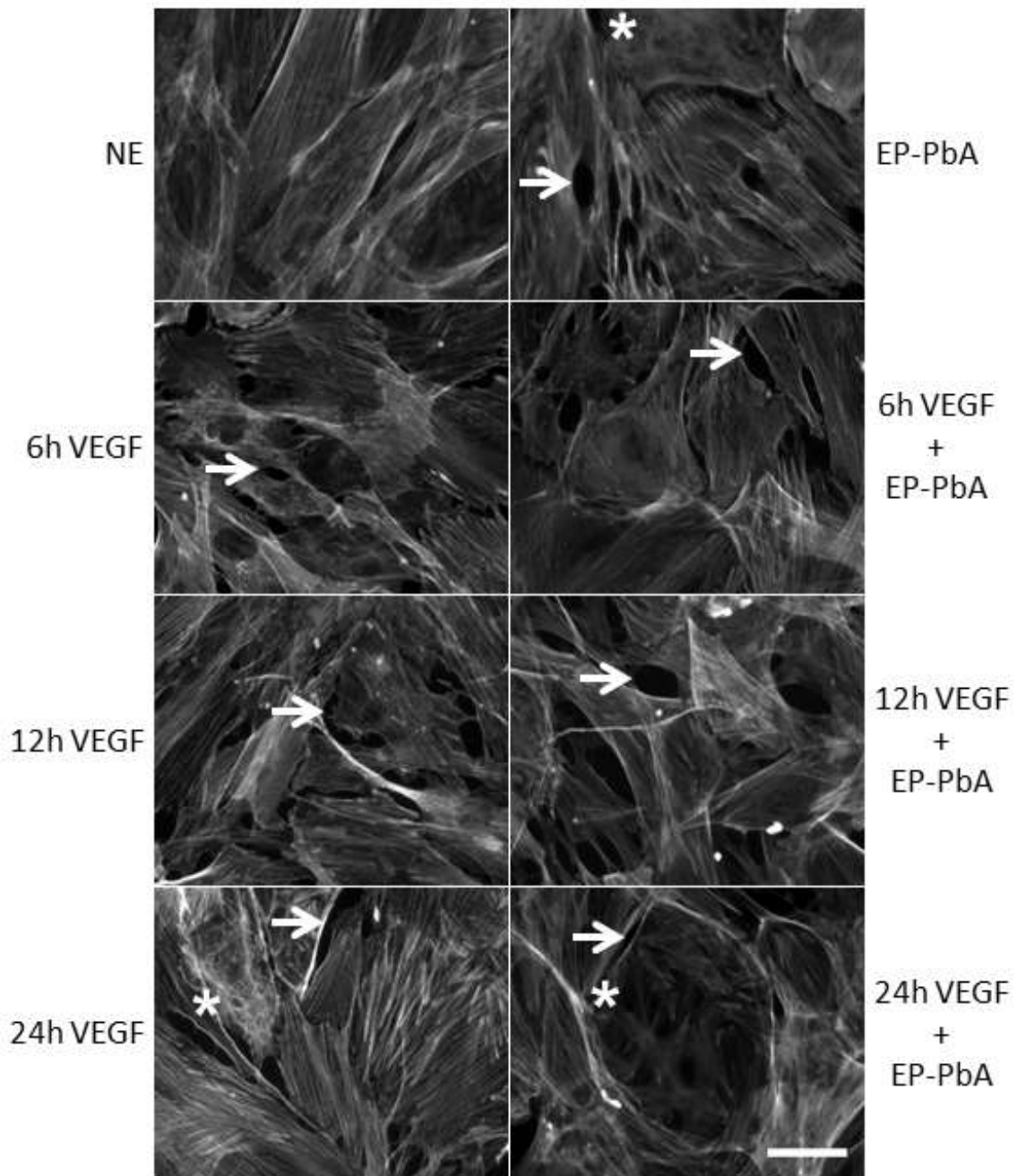
De acordo com estudos anteriores, a reorganização dos microfilamentos de actina e o aumento das áreas de abertura entre as junções interendoteliais, causadas por diferentes tempos de exposição ao TNF, sugerem desorganização estrutural dos complexos proteicos que formam as junções interendoteliais (PETRACHE et al., 2001; PRASAIN; STEVENS, 2009; SCHMIDT et al., 2013). As alterações observadas no citoesqueleto das CEPP-DBA/2 podem estar relacionadas com perturbação da atividade de proteínas, como FAK e VE-caderina, que estão ancoradas com os microfilamentos de actina e afetam diretamente a manutenção da integridade dessas junções (PETRACHE et al., 2001; PRASAIN; STEVENS, 2009; SCHMIDT et al., 2013).

Corroborando com estes estudos, nossos resultados comprovaram a participação do TNF na alteração da função endotelial, por reorganização dos microfilamentos de actina e rompimento da conexão interendotelial (**Figura 11, 12**). Entretanto, surpreendentemente, estas alterações não foram mais efetivas que as causadas apenas pelo contato com EP-PbA, indicando que, neste modelo experimental, a adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA é o principal fator causador das alterações observadas no endotélio pulmonar murino.

Posteriormente, foram realizados ensaios com VEGF, os quais foram executados da mesma maneira que os experimentos com TNF. As CEPP-DBA/2 foram divididas em grupos, de acordo com tipo de estímulo e tempo de exposição: 6 h, 12 h ou 24 h de VEGF; 6 h, 12 h ou 24 h de VEGF, seguidos de 1 h com EP-PbA; combinação de VEGF e EP-PbA por 1 h; 1 h com EP-PbA; 1 h com ENP e as células NE.

As imagens capturadas revelaram que o VEGF também foi capaz de provocar alterações nos microfilamentos de actina das CEPP-DBA/2. Todos os diferentes estímulos foram capazes de provocar modificações na conformação da actina, que se apresentou de forma irregular, como filamentos curtos e não paralelos. Esta reorganização pode ser observada principalmente nas imagens referente aos seguintes estímulos 24 h VEGF, 24 h VEGF + EP-PbA e apenas EP-PbA (**asteriscos, Figura 13**).

A análise das imagens também demonstrou que os diferentes estímulos provocaram aumento da abertura das junções interendoteliais (“J-int”). Observou-se diferenças relevantes entre as células NE e os demais estímulos. As setas indicam o aumento da abertura das “J-ints”, que ocorreu em todas as imagens, com exceção de NE (**setas, Figura 13**).

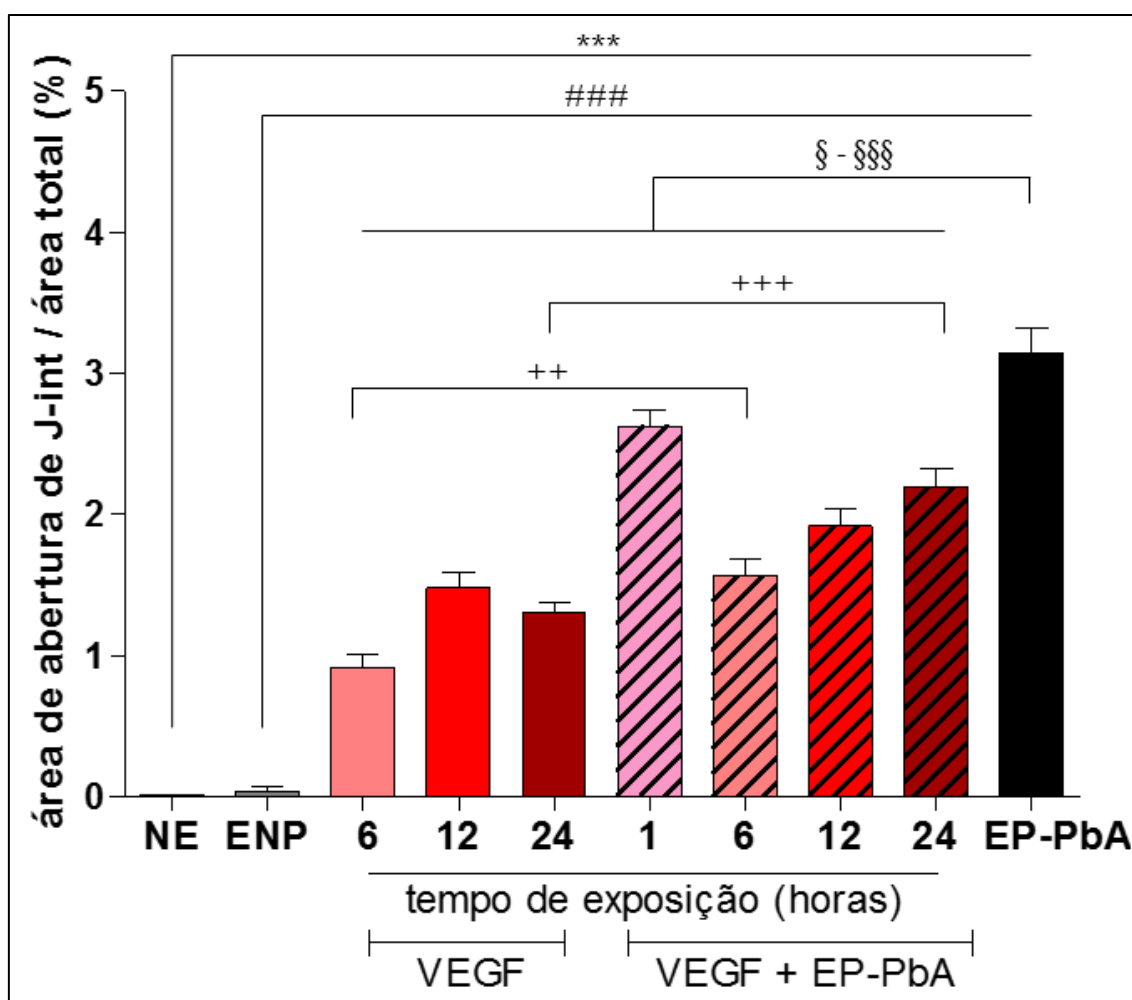


**Figura 13.** VEGF e EP-PbA induzem alterações dos microfilamentos de actina e das junções interendoteliais das CEPP-DBA/2. A actina foi marcada com Texas Red Phalloidina [1:100] e visualizada por imunofluorescência. As imagens mostram o rearranjo dos microfilamentos de actina (asteriscos) e aparecimento de espaços entre as junções interendoteliais (setas) (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; Barra de escala: 50 µm).

A partir da quantificação da área de abertura das “J-int”, foi possível observar que os três diferentes tempos de estímulo de VEGF, as quatro combinações de VEGF

+ EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as porcentagens das áreas de NE. Além disso, observa-se que todos estes estímulos também apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as porcentagens das áreas de ENP. Ainda, não houve diferença significativa entre as porcentagens das áreas de “J-int” de NE e ENP (**Figura 14**).

Diferente dos ensaios anteriores, observou-se que as células estimuladas com 6 h VEGF + EP-PbA e 24 h VEGF + EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as áreas causadas por 6 h VEGF e 24 h VEGF. Entretanto, novamente, EP-PbA provocou aumento significativo nas porcentagens das áreas de “J-int” quando comparadas com as áreas de “J-int” causadas pelos três diferentes tempos de estímulo de VEGF e pelas quatro combinações de VEGF + EP-PbA (**Figura 14**).



**Figura 14.** Quantificação da área de abertura das junções interendoteliais “J-int” das CEPP-DBA/2, frente ao estímulo de VEGF e EP-PbA. Resultado representativo de três experimentos agrupados expressos pela média  $\pm$  erro padrão, analisados pelo método ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 12$  a 29 imagens/estímulo; \* representa diferença em relação à NE;

#, em relação à ENP; §, em relação à EP-PbA e + representa diferenças entre 6 h VEGF e 6 h VEGF + EP-PbA ou entre 24 h VEGF e 24 h VEGF + EP-PbA; § para  $p < 0,05$ , ++ para  $p < 0,01$ , \*\*\*, ###, +++, §§§ para  $p < 0,001$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial).

O VEGF é um potente fator vascular que desempenha importante papel na angiogênese, em contextos fisiológicos e patológicos. Atua, principalmente, pela da ativação de kinases da família Src e da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (HIPPENSTIEL et al., 1998; DI LORENZO et al., 2013).

Estudos relataram o efeito do VEGF sobre os microfilamentos de actina e rompimento da conexão interendotelial, devido à desorganização estrutural dos complexos proteicos que formam as junções interendoteliais, em células endoteliais humanas e em modelos animais (ABEDI; ZACHARY, 1997; COHEN; CARBAJAL; SCHAEFFER, 1999; VAN NIEUW AMERONGEN, 2003). Os resultados aqui apresentados corroboram com estes dados já publicados, uma vez que também mostram que o VEGF provocou modificações espaciais dos microfilamentos de actina das CEPP-DBA/2.

Além disso, nossos resultados corroboram, singularmente, com um desses estudos, que comprovou o efeito do VEGF sobre os microfilamentos de actina e o aparecimento de “pequenos poros” entre as células endoteliais, após 6 e 24 horas (COHEN; CARBAJAL; SCHAEFFER, 1999), tempos de exposição iguais aos verificados nos ensaios descritos acima (**Figuras 13, 14**). Ainda, o estudo relaciona estas alterações e, conseqüente, aumento da permeabilidade com a reorganização de  $\beta$ -catenina, proteína integrante das junções aderentes (COHEN; CARBAJAL; SCHAEFFER, 1999), o que não foi analisado no nosso estudo.

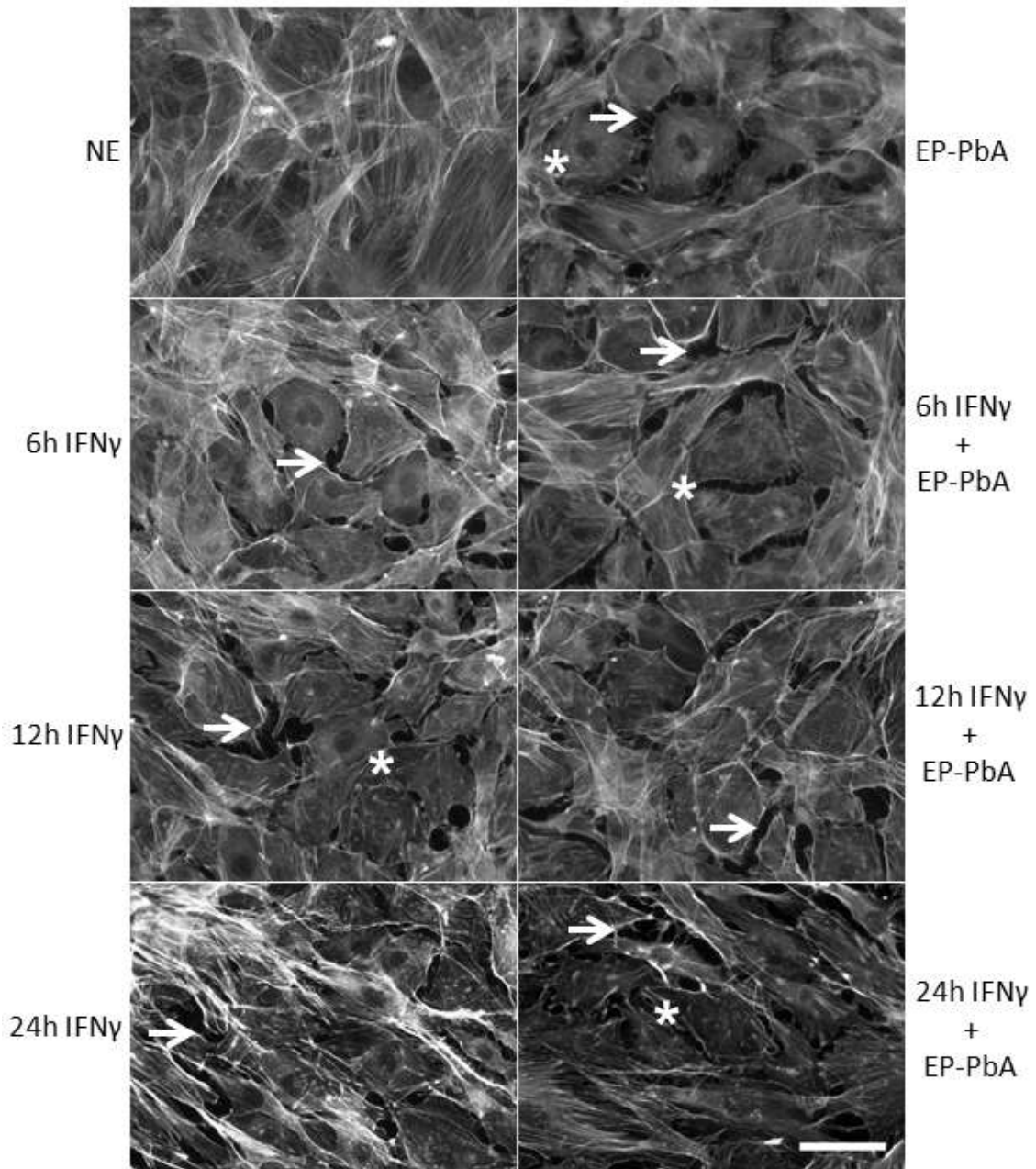
Entretanto, mais uma vez, as alterações causadas pela exposição ao VEGF não foram mais efetivas que as causadas apenas pelo contato com EP-PbA, indicando que a adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA pode ser o principal fator causador das modificações estruturais nas junções interendoteliais e das alterações observadas no endotélio pulmonar murino.

Os ensaios realizados com IFN $\gamma$  foram executados da mesma maneira que os experimentos com TNF e VEGF. As CEPP-DBA/2 foram divididas em grupos, de acordo com tipo de estímulo e tempo de exposição: 6 h, 12 h ou 24 h de IFN $\gamma$ ; 6 h, 12 h ou 24 h de IFN $\gamma$ , seguidos de 1 h com EP-PbA; combinação de IFN $\gamma$  e EP-PbA por 1 h; 1 h com EP-PbA; 1 h com ENP e as células NE.

A análise das imagens também revelou que o IFN $\gamma$  provocou alterações no citoesqueleto das células endoteliais primárias pulmonares murinas. Os diferentes tempos de estímulos causaram alterações na conformação dos microfilamentos de actina, que passou a se apresentar de forma irregular, como feixes curtos e não paralelos. Estas alterações podem ser observadas em todos os diferentes estímulos, mas claramente nas imagens referentes a 12 h IFN $\gamma$ , 6 h IFN $\gamma$  + EP-PbA, 24 h IFN $\gamma$  + EP-PbA e EP-PbA (**asterisco, Figura 15**).

As imagens também mostraram que os diferentes estímulos provocaram aumento dos espaços entre as junções interendoteliais (“J-int”). Observou-se diferença considerável entre as células NE e os demais estímulos. As setas indicam o aumento da abertura das “J-ints”, que ocorreu em todas as imagens, com exceção de NE (**setas, Figura 15**).





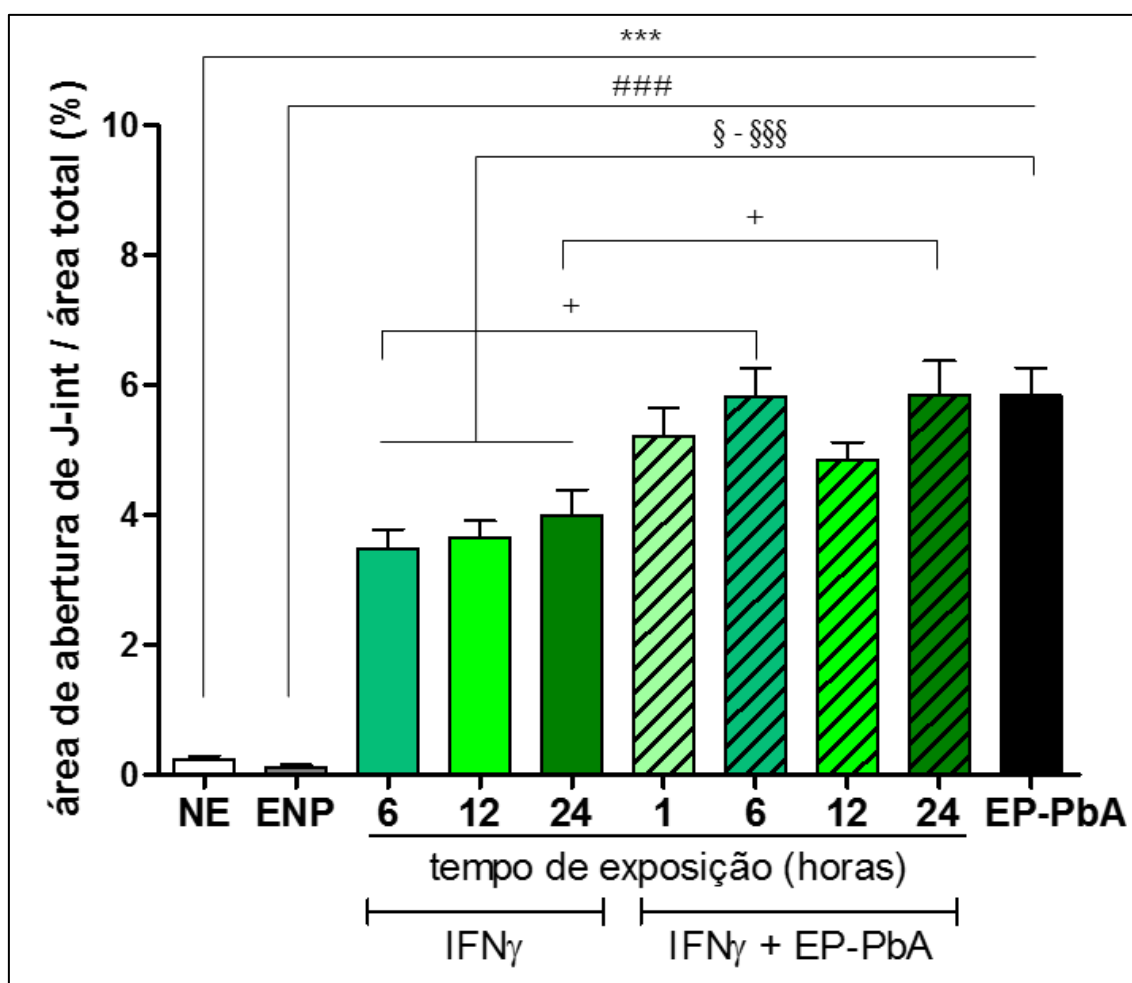
**Figura 15.** IFN $\gamma$  e EP-PbA provocam alterações dos microfilamentos de actina e das junções interendoteliais das CEPP-DBA/2. A actina foi marcada com Texas Red Phalloidina [1:100] e visualizada por imunofluorescência. As imagens mostram o rearranjo dos microfilamentos de actina (asteriscos) e aparecimento de espaços entre as junções interendoteliais (setas) (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; IFN $\gamma$ : interferon gama; Barra de escala: 50  $\mu$ m).

Da mesma forma que os ensaios anteriores, a quantificação da área de abertura das “J-int”, revelou que os três diferentes tempos de estímulo de IFN $\gamma$  e as quatro com-

combinações de IFN $\gamma$  + EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as porcentagens das áreas de NE. Além disso, observa-se que todos estes estímulos também apresentaram porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as porcentagens das áreas de ENP. Como era esperado, não houve diferença significativa entre as porcentagens das áreas de “J-int” de NE e ENP (**Figura 16**).

Em conformidade com os ensaios realizados com VEGF, células estimuladas com 6 h IFN $\gamma$  + EP-PbA apresentaram áreas de “J-int” significativamente maiores que as áreas causadas por 6 h IFN $\gamma$  e o mesmo aconteceu entre os estímulos 24 h IFN $\gamma$  + EP-PbA e 24 h IFN $\gamma$  (**Figura 16**).

Além disso, outra vez, os resultados das células estimuladas com EP-PbA se destacaram por mostrarem porcentagens das áreas de “J-int” significativamente maiores que as áreas dos três tempos de estímulo de IFN $\gamma$ . Porém, nestes ensaios, as quatro combinações de IFN $\gamma$  + EP-PbA provocaram aumento nas áreas de “J-int” tão elevadas quanto o estímulo de EP-PbA (**Figura 16**).



**Figura 16.** Quantificação da área de abertura das junções interendoteliais “J-int” das CEPP-DBA/2, frente ao estímulo de IFN $\gamma$  e EP-PbA. Resultados referentes a dois experimentos agrupados expressos pela média  $\pm$  erro padrão, analisados pelo método ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* (n = 12 a 16 imagens/estímulo; \* representa diferença em relação à NE; #, em relação à ENP; §, em relação à EP-PbA e + representa diferenças entre 6 h IFN $\gamma$  e 6 h IFN $\gamma$  + EP-PbA ou entre 24 h IFN $\gamma$  e 24 h IFN $\gamma$  + EP-PbA; + e § para p < 0,05, §§ para p < 0,01, \*\*\*, ###, §§§ para p < 0,001; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados; IFN $\gamma$ : interferon gama).

O interferon-gama (IFN $\gamma$ ) é uma citocina pró-inflamatória, secretada por células *natural killers*, células T citotóxicas e T *helpers*, que apresenta efeito em diversas doenças inflamatórias, tais como asma, arterosclerose e malária (STOLPEN et al., 1986; HUNT et al., 2014; NG et al., 2015).

Na malária grave, especialmente na malária cerebral, o IFN $\gamma$  tem importante papel no controle do número de parasitas, mas também contribui com a patogênese, pois a agregação plaquetária e de parasitas, ativa células endoteliais, induz apoptose e promove quebra da barreira hemato-encefálica (HUNT et al., 2014).

Sabe-se também que o IFN $\gamma$  atua sobre células endoteliais de veia umbilical humana, desestabilizando microfilamentos de actina e aumentando a permeabilidade vascular (STOLPEN et al., 1986; NG et al., 2015), de acordo como foi observado nos ensaios realizados com as CEPP-DBA/2. Entretanto, nossos resultados sugerem que o IFN $\gamma$  promova alterações nos microfilamentos de actina e no aumento da permeabilidade, porém sem induzir a morte celular.

Os ensaios descritos acima revelaram que o aumento dos espaços entre as junções interendoteliais ocorreu em todos os tempos de estímulos testados, no entanto houve diferença significativa entre 6 h IFN $\gamma$  e 6 h IFN $\gamma$  + EP-PbA e entre 24 h IFN $\gamma$  e 24 h IFN $\gamma$  + EP-PbA (**Figura 16**). Estes tempos de exposição foram muito próximos aos verificados no trabalho de *Chin Theng Ng* e colaboradores, no qual demonstraram ação “bifásica” do IFN $\gamma$  sobre o aumento da permeabilidade nestas células, com picos nos tempos de estímulo de 8 e 24 horas (NG et al., 2015). Nossos resultados indicam que as combinações entre IFN $\gamma$  e EP-PbA podem estar contribuindo com o mecanismo de ação do IFN $\gamma$  sobre aumento dos espaços intercelulares das CEPP-DBA/2.

Os ensaios aqui apresentados comprovaram que o IFN $\gamma$  também é capaz de alterar o citoesqueleto, rearranjar microfilamentos de actina das CEPP-DBA/2, além de

provocar modificações estruturais nas junções que mantêm as células conectadas (**Figuras 15, 16**), indicando a participação desta citocina inflamatória no aumento da permeabilidade endotelial da LPA/SDRA.

Porém, novamente, as alterações causadas pela exposição ao IFN $\gamma$  não foram mais efetivas que as causadas apenas pelo contato com EP-PbA. Entretanto, as combinações entre IFN $\gamma$  e EP-PbA foram igualmente elevadas, indicando que a adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA atua em conjunto com alguns fatores inflamatórios, induzindo estas modificações observadas no endotélio pulmonar murino.

Apesar da citoadesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA, por si só, provocar disfunção na barreira endotelial, acreditamos que fatores inflamatórios, especialmente TNF, VEGF e IFN $\gamma$ , também atuem no aumento da permeabilidade vascular, especialmente em células endoteliais que não tiveram contato prévio com o parasita, uma vez que estes fatores também alteram o citoesqueleto endotelial e, assim, contribuem com a gênese da LPA/SDRA.

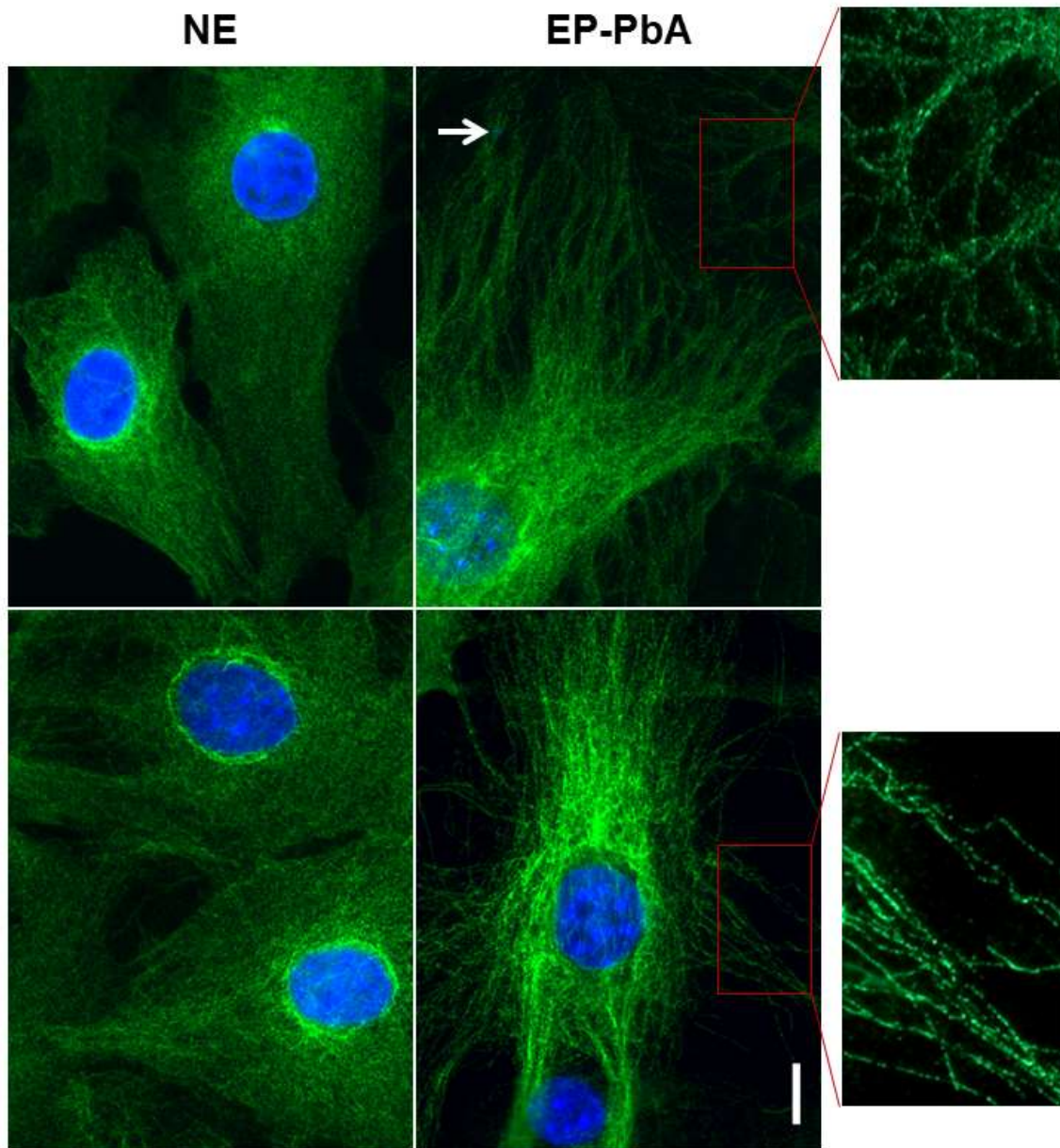
#### **4.3.3 EP-PbA provocam reorganização dos microtúbulos em CEPP-DBA/2**

Os microtúbulos (MTs), assim como as junções intercelulares e os microfilamentos de actina, são componentes chave para o funcionamento do endotélio. A disfunção da barreira endotelial, uma vez caracterizada por reorganização do citoesqueleto, envolve alterações na dinâmica de montagem e desmontagem e no rearranjo espacial dos MTs (ALIEVA et al., 2013; LI et al., 2015; YU et al., 2016).

Portanto, ensaios de imunofluorescência foram realizados para verificar se o contato com EP-PbA causaria, ou não, alterações na organização dos microtúbulos das CEPP-DBA/2.

A análise morfológica das imagens revelou que, as CEPP-DBA/2 submetidas ao estímulo de EP-PbA apresentaram claros sinais de ruptura e modificações de seus MTs (**Figura 17**).

As células que não foram estimuladas apresentaram seus microtúbulos preservados, que se distribuíram uniformemente ao longo da célula, formando uma densa rede de filamentos (**NE, à esquerda**). Em contrapartida, o contato com EP-PbA (indicado pela seta) provocou alterações na disposição dos microtúbulos, que apresentaram uma distribuição irregular, acompanhada de áreas descontínuas (rupturas) (**EP-PbA, à direita**). Em destaque, a ampliação realça o rompimento e a desorganização dos microtúbulos, localizados na região periférica das células, causadas pelo contato com EP-PbA.



**Figura 17.** EP-PbA provocam rearranjo espacial dos microtúbulos das CEPP-DBA/2. À esquerda, células NE e à direita, células estimuladas com EP-PbA. Ao lado, a ampliação realça o rompimento e a desorganização dos MTs. Os microtúbulos foram identificados com o anticorpo primário rabbit anti- $\beta$ -tubulina [1:100], seguido do secundário goat anti-rabbit AF 488 [1:400], em verde. Os núcleos das células e dos eritrócitos parasitados (seta) foram marcados, em azul, com Hoechst [1:1000] (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; Barra de escala: 10  $\mu$ m).

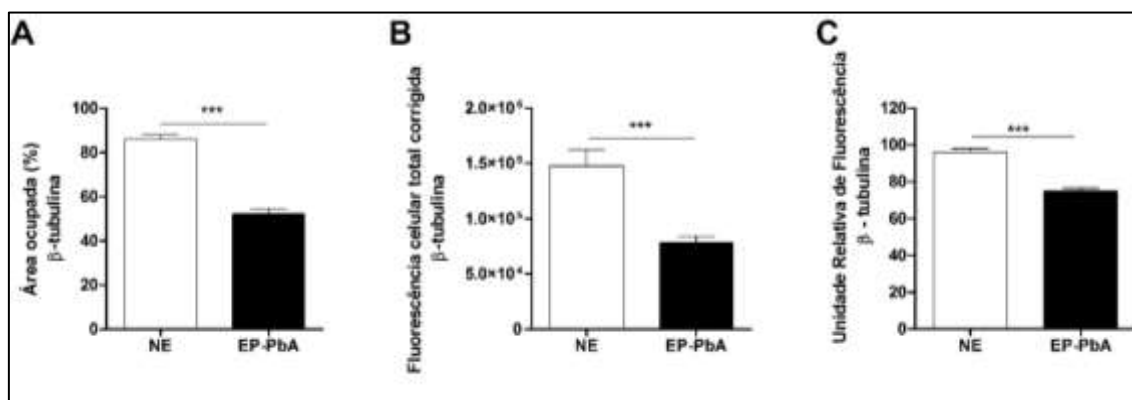
A análise quantitativa das alterações da organização espacial dos microtúbulos pode ser realizada por um conjunto de medidas, tais como intensidade de fluorescência; área total ocupada; área relativa ocupada por MTs, em diferentes compartimentos celulares e pela avaliação individual de cada microtúbulo (ALIEVA et al., 2013; LI et al., 2015).

Assim, neste trabalho, as alterações morfológicas e o rearranjo espacial dos microtúbulos foram analisados pela intensidade de fluorescência e pela área total ocupada pela rede de microtúbulos.

Na análise da área ocupada pela rede de microtúbulos, observa-se que as CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas ocupadas por MTs significativamente menores que as porcentagens das áreas de MTs das células NE (**Figura 18A**).

A intensidade de fluorescência dos microtúbulos, calculada pela fórmula  $FCTC = \text{densidade integrada da } \beta\text{-tubulina} - (\text{área total ocupada pela } \beta\text{-tubulina} \times \text{média de níveis de cinza do background})$ , revelou que as CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA apresentaram redução significativa da FCTC, em relação a das células NE (**Figura 18B**).

A diferença na intensidade de fluorescência dos MTs, observada nos experimentos descritos acima, foi validada por ensaio fluorométrico, que também demonstrou que as CEPP-DBA/2 estimuladas com eritrócitos parasitados tiveram redução significativa na fluorescência da  $\beta$ -tubulina, quando comparadas com a das células NE (**Figura 18C**).



**Figura 18.** Quantificação das alterações morfológicas e rearranjo espacial dos microtúbulos das CEPP-DBA/2, após contato com EP-PbA. **(A)** Área ocupada pela rede de MTs representada marcação de  $\beta$ -tubulina, em células NE e EP-PbA. **(B)** Fluorescência celular total corrigida calculada para a marcação de  $\beta$ -tubulina, em células NE e EP-PbA. Resultado representativo de dois experimentos independentes expressos pela média  $\pm$  erro padrão, analisados por teste T de *Student* ( $n = 10$  a  $14$  imagens/estímulo; \*\*\* para  $p < 0,001$ ). **(C)** Intensidade de fluorescência da  $\beta$ -tubulina verificada por ensaio fluorométrico (filtro GFP; excitação 488 nm / emissão 510

nm). Resultado representativo de um experimento, expresso pela média  $\pm$  erro padrão, analisado por teste T de *Student* (n = 24 poços/estímulo; \*\*\* para  $p < 0,001$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquistozóitos de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas).

Os microtúbulos também são conhecidos por regular a atividade e a localização de muitas proteínas, tais como as Rho-GTPases, envolvidas com a modulação da função de barreira endotelial (YU et al., 2016). Além disso, o rompimento e o desarranjo de MTs resultam na alteração dos microfilamentos de actina e na contração celular (YU et al., 2016).

Além disso, sabe-se que mediadores inflamatórios, tais como TNF e LPS, induzem desmontagem e reorganização do sistema de microtúbulos, podendo provocar diminuição na quantidade de MTs periféricos, processo intimamente relacionado ao aumento da permeabilidade vascular (ALIEVA et al., 2013; LI et al., 2015).

Surpreendentemente, nossos resultados demonstraram desmontagem e reorganização dos microtúbulos das CEPP-DBA/2 estimuladas apenas com EP-PbA, principalmente na região periférica das células, sugerindo que as alterações no sistema de MTs, provocadas pela adesão dos eritrócitos parasitados, também podem estar contribuindo com o aumento da permeabilidade vascular.

Acredita-se que o receptor CD36, presente nas células endoteliais vasculares do hospedeiro, é o principal agente de ligação dos eritrócitos parasitados. Elevados níveis de CD36 nos pulmões resultam em grande número de EP sequestrados, amplificando o quadro inflamatório (ANIDI et al., 2013; SERCUNDES et al., 2016). Camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* apresentaram aumento da permeabilidade endotelial causada pelo sequestro de parasitas por CD36, mediado por Fyn kinase, que foi co-localizada com os microfilamentos de actina das células endoteliais da microvasculatura pulmonar destes camundongos (ANIDI et al., 2013).

Além disso, a adesão de eritrócitos parasitados, por CD36, também está relacionada com o recrutamento de integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , em locais próximos às junções aderentes, processo que pode estar facilitando o sequestro desses eritrócitos (DAVIS et al., 2013).

Outro estudo demonstrou que a adesão de eritrócitos parasitados, por ICAM-1, em linhagem de células endoteliais cerebrais humanas, provocou alterações na conformação dos microfilamentos de actina (*cup-like structure*), processo associado ao rompimento da barreira hematoencefálica (JAMBOU et al., 2010).

Observa-se que a adesão de eritrócitos parasitados, via receptores endoteliais, tais como CD36, ICAM-1 e integrina  $\alpha 5\beta 1$ , pode conduzir a eventos de sinalização intracelular, acompanhados por alterações de microfilamentos de actina e disfunção de junções intercelulares. No entanto, interessantemente, esta é a primeira vez que se relata desmontagem e reorganização do sistema de microtúbulos causadas por eritrócitos parasitados por plasmódios.

Muitas publicações já demonstraram, claramente, o cenário de sinalização cruzada entre os microtúbulos e os microfilamentos de actina na regulação da permeabilidade endotelial (DUDEK; GARCIA, 2001; BIRUKOVA et al., 2004; SHEN et al., 2010; ELIAS et al., 2012; TIAN et al., 2014; YU et al., 2016). As alterações na dinâmica de montagem e desmontagem dos MTs, associadas ao aumento de MLC, desencadeia alterações nos microfilamentos de actina, processo mediado por ativação de RhoA/ROCK (SHEN et al., 2010; YU et al., 2016).

Corroborando com todos estes estudos, os resultados obtidos com as análises morfométricas comprovaram que a adesão de EP-PbA é capaz de alterar a organização e o rearranjo espacial tanto dos microfilamentos de actina quanto dos microtúbulos das células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 e causar aumento dos espaços entre as junções interendoteliais, indicando participação dos eritrócitos parasitados no remodelamento do citoesqueleto, disfunção e aumento da permeabilidade endotelial vascular. Além disso, nossos resultados sugerem que estas alterações podem ser estar ocorrendo, via ativação de RhoA e seu efetor ROCK.

#### **4.3.4 EP-PbA alteram a distribuição de FAK fosforilada em CEPP-DBA/2**

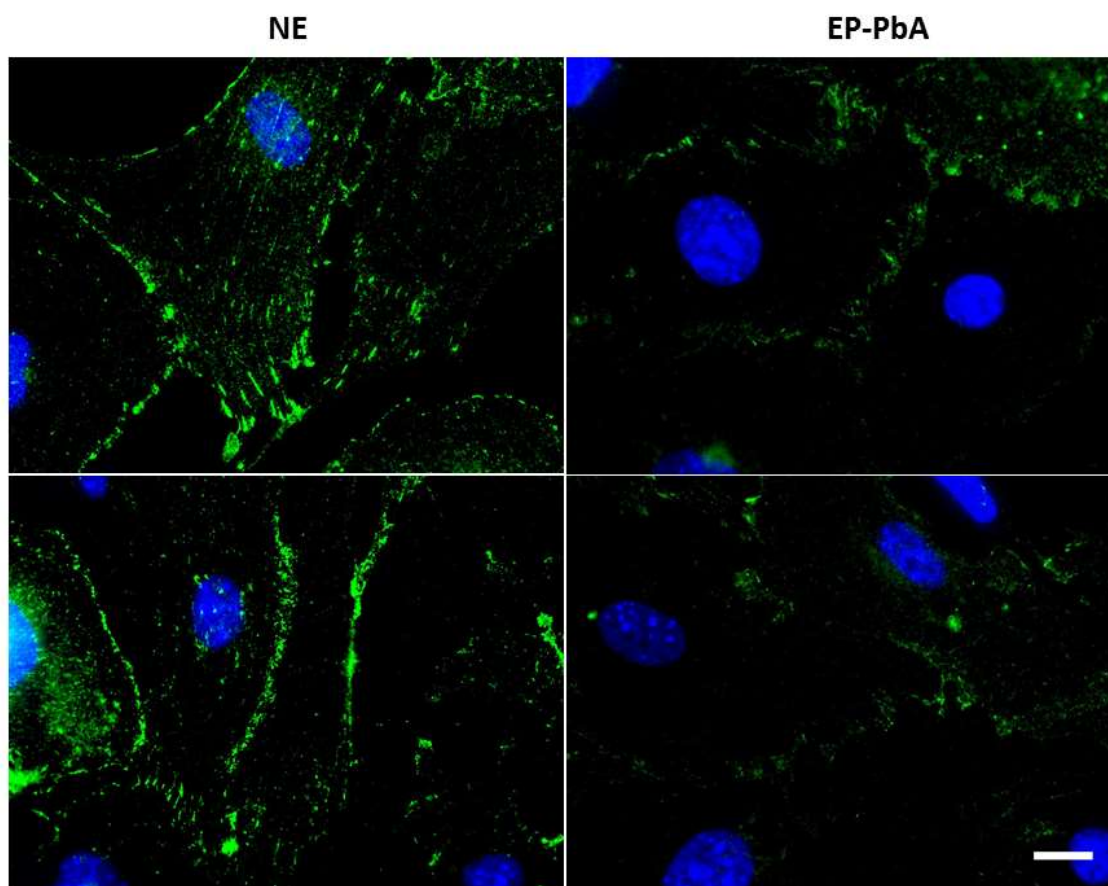
Os resultados das análises de remodelamento do citoesqueleto foram complementados com a identificação da quinase de adesão focal (FAK - focal adhesion kinase), também por ensaio de imunofluorescência.

Fak, proteína integrante do complexo de adesão focal, é uma quinase de junção que atua na comunicação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, portanto sua atividade é indispensável para a integridade e a manutenção das junções intercelulares (BELVITCH; DUDEK, 2012; GRINNELL; HARRINGTON, 2012; SCHMIDT et al., 2013).

Nossos resultados revelaram que as CEPP-DBA/2, submetidas ao estímulo de EP-PbA, apresentaram diminuição de FAK fosforilada. Observa-se um rearranjo de FAK, comprovado por fraca marcação e menor concentração, principalmente na região periférica das células (**EP-PbA, à direita**). Em contrapartida, as células que não foram estimuladas (**NE, à esquerda**) apresentaram maior quantidade de FAK fosforilada, com



distribuição regular pelo citoplasma das células, mas com forte concentração na posição periférica (**Figura 19**).

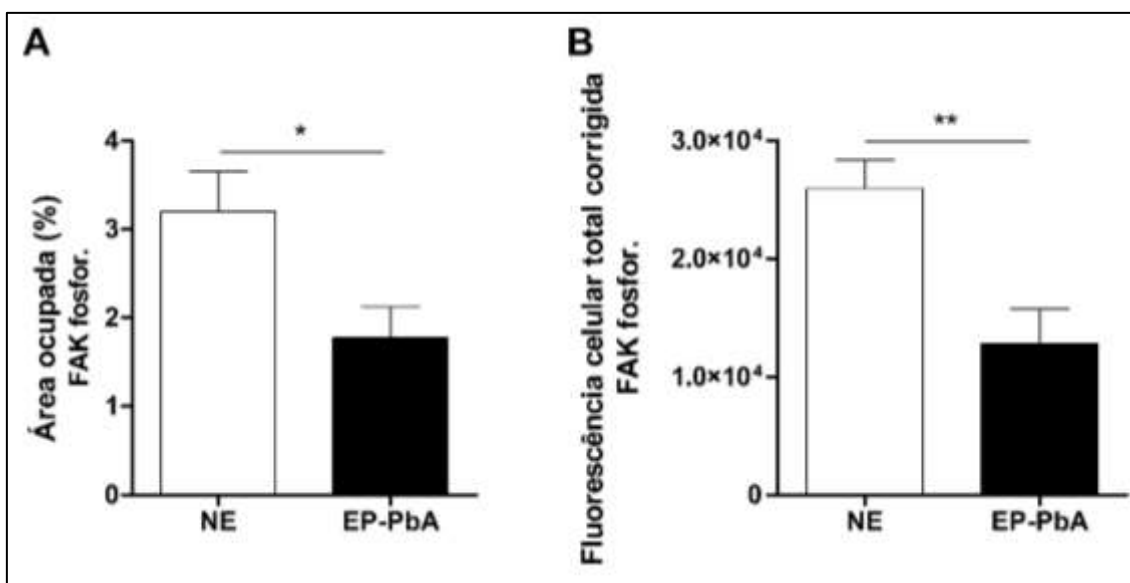


**Figura 19.** EP-PbA promovem alterações morfológicas e reorganização espacial de FAK fosforilada em CEPP-DBA/2. À esquerda, células NE e à direita, células estimuladas com EP-PbA. Marcação com o anticorpo primário policlonal rabbit anti-FAK-phospho-Tyr576/Tyr577 [1/100], seguido do secundário goat anti-rabbit AF 488 [1:400], em verde. Os núcleos celulares foram marcados, em azul, com Hoechst [1:1000] (CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; FAK: quinase de adesão focal; Barra de escala: 15  $\mu$ m).

Na análise da área ocupada por FAK fosforilada, observa-se que as CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA apresentaram porcentagens das áreas ocupadas por FAK significativamente menores que as porcentagens das áreas de FAK das células NE (**Figura 20A**).

A partir da intensidade de fluorescência de FAK fosforilada, calculada pela fórmula  $FCTC = \text{densidade integrada da FAK fosforilada} - (\text{área total ocupada pela FAK fosforilada} \times \text{média de níveis de cinza do } background)$ , foi possível determinar que as

CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA apresentaram redução significativa da FCTC, em relação a das células NE (Figura 20B).



**Figura 20.** EP-PbA diminuem a expressão de FAK fosforilada em CEPP-DBA/2. (A) Área quantificada pela fluorescência de FAK. (B) Fluorescência celular total corrigida calculada para a marcação de FAK. Resultado representativo de um experimento expresso pela média  $\pm$  erro padrão, analisados por teste T de *Student* ( $n = 6$  imagens/estímulo; \* para  $p < 0.05$  e \*\* para  $p < 0,01$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; FAK: quinase de adesão focal).

A quinase de adesão focal está envolvida em diversas funções endoteliais, atuando no remodelamento do citoesqueleto e na dinâmica das junções intercelulares (BELVITCH; DUDEK, 2012; GRINNELL; HARRINGTON, 2012). FAK localiza-se na região de contato célula-célula, quando interage com proteínas de junções intercelulares, como as das junções aderentes, para manter a função da barreira endotelial ou recuperá-la após ruptura (ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013).

Anteriormente, foi demonstrado que a depleção de FAK causa hiperativação de RhoA em camundongos, provocando rompimento das junções aderentes e consequente disfunção da barreira endotelial pulmonar (SCHMIDT et al., 2013). Nossos resultados se correlacionam com estes dados publicados, uma vez que mostraram redução significativa de FAK fosforilada na região periférica de CEPP-DBA/2 estimuladas por EP-PbA, também indicando o rompimento da conexão interendotelial. Entretanto, esta é a primeira vez que se demonstra reorganização espacial de FAK induzida por eritrócitos parasitados por plasmódios.

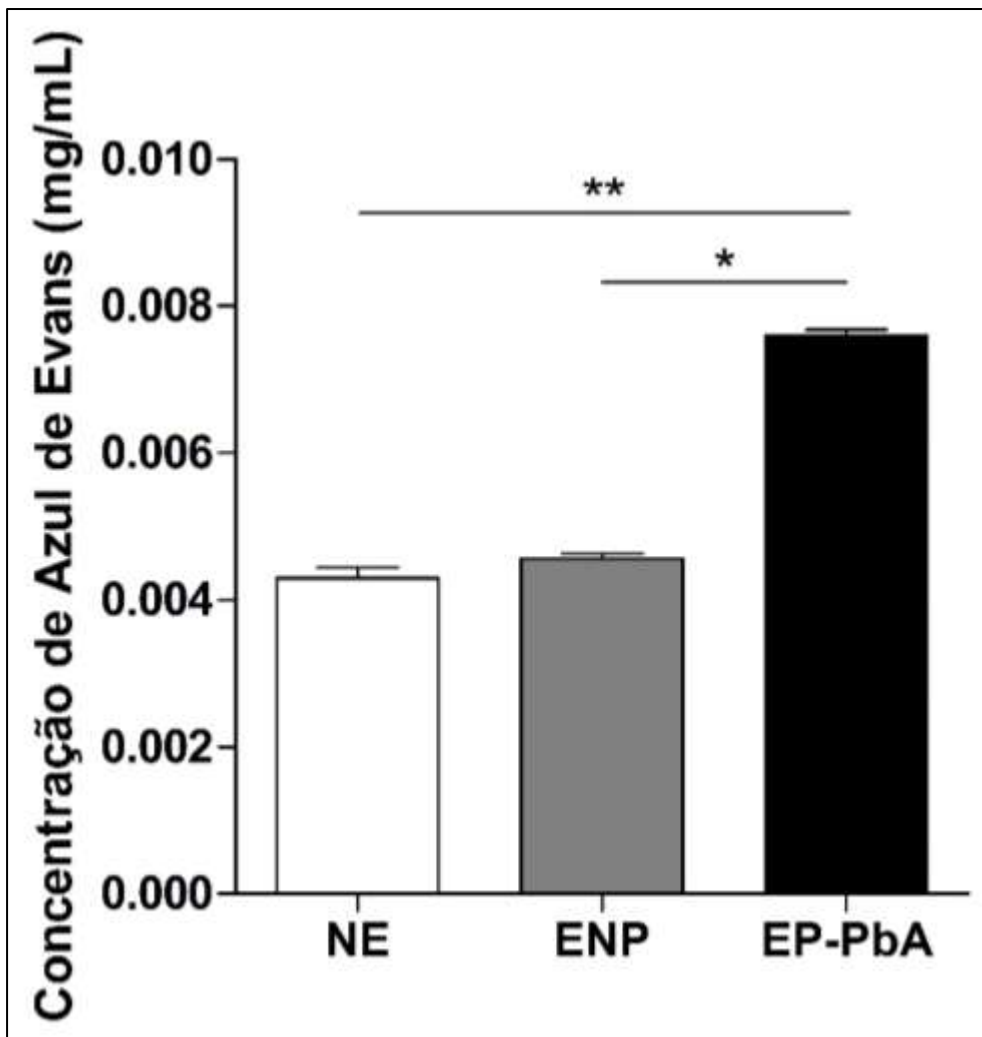
Em conjunto, as imagens e as análises morfológicas indicaram uma redução significativa de FAK fosforilada na região de contato intercelular das CEPP-DBA/2, mostrando que o contato com EP-PbA alterou a atividade de FAK, enfraquecendo, assim, as junções interendoteliais e desencadeando a disfunção da barreira endotelial. Estes resultados são mais um forte indício de influência da adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA na disfunção e aumento da permeabilidade da barreira endotelial.

#### **4.4 EP-PbA provocam aumento da permeabilidade endotelial em CEPP-DBA/2**

Nossos resultados mostraram remodelamento do citoesqueleto, aumento dos espaços entre as junções intercelulares e alteração da atividade da quinase de adesão focal, causados pela adesão eritrócitos parasitados com formas maduras do *P. berghei* ANKA, no endotélio pulmonar de camundongos DBA/2.

Assim, o aumento da permeabilidade foi validado, por análise de concentração do corante Azul de Evans (AE), com CEPP-DBA/2 aderidas em membrana permeável, em sistema de *Transwell*<sup>®</sup>.

Estes ensaios mostraram que o estímulo de EP-PbA provocou defluência elevada de AE entre as conexões celulares, através dos poros da membrana permeável. Observou-se que fluxo de AE nestas células foi, aproximadamente, duas vezes maior que o verificado em NE e ENP. A concentração de AE, que atravessou a monocamada endotelial, referente à EP-PbA foi de 0,0076 mg/mL, concentração significativamente maior que as observadas em NE (0,0042 mg/mL) e em ENP (0,0045 mg/mL) (**Figura 21**).



**Figura 21.** EP-PbA provocam aumento da permeabilidade em CEPP-DBA/2. A quantificação do Azul de Evans, que atravessou os poros da membrana permeável, foi realizada por espectrofotômetro, a 650 nm. Resultado representativo de dois experimentos independentes expressos pela média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo método de *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunns* (n = 6 amostras/estímulo; \* para  $p < 0,05$  e \*\* para  $p < 0,01$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados).

Nossos resultados corroboram com estudos anteriores, em que Taoufiq e colaboradores relataram, também por sistema de *Transwell*®, ensaios que mostraram o rompimento da monocamada de células endoteliais pulmonares humanas expostas a eritrócitos infectados com *P. falciparum* (EI-Pf). A densidade óptica de AE apresentou-se aumentada nas células estimuladas com EI-Pf, quando comparadas com as células estimuladas com eritrócitos não infectados e células não estimuladas (TAOUFIQ et al., 2008, 2011). Além disso, recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou o aumento da

permeabilidade endotelial causado pelo lisado de *P. berghei* ANKA (PEREIRA et al., 2016).

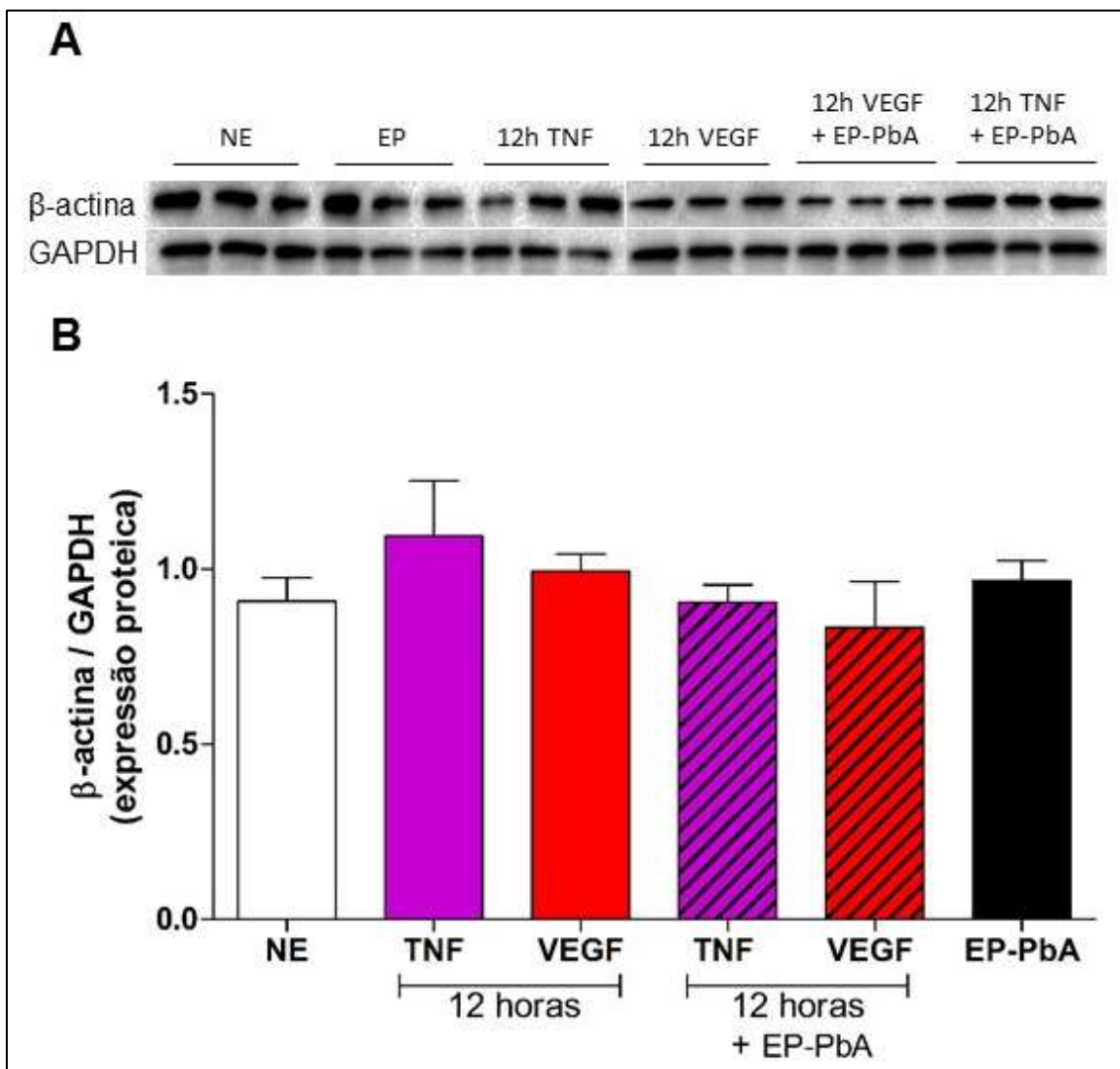
Ainda, Taoufiq e colaboradores observaram que os eritrócitos infectados com *P. falciparum*, além de induzir dano endotelial, provocaram apoptose nestas células (TAOUFIQ et al., 2008, 2011). Dados do nosso grupo de pesquisa comprovaram que EP-PbA também induziram a apoptose em CEPP-DBA/2, quando estimuladas por 24 horas (Sercundes *et al.*, dados não publicados). Entretanto, o estímulo de apenas uma hora de EP-PbA, mesmo tempo de exposição dos experimentos realizados deste trabalho, não alterou a viabilidade celular ou provocou apoptose destas células (PEREIRA et al., 2016).

Portanto, comprovamos, mais uma vez, que a adesão de formas maduras do parasita na microvasculatura pulmonar murina atua como um fator crítico para o aumento da permeabilidade vascular.

#### **4.5 EP-PbA não alteram a expressão proteica de VE-caderina, mas modificam razão entre RhoA e Cdc42 em CEPP-DBA/2**

Para verificar se as modificações do citoesqueleto das células endoteliais primárias pulmonares murinas, ocorreu via alteração da expressão proteica de Rho-GTPases, ensaios de Western blot foram realizados para avaliar as expressões RhoA e Cdc42. Também foram quantificadas as expressões da isoforma  $\beta$  da actina e da molécula de adesão VE-caderina.

Na análise de  $\beta$ -actina, os ensaios mostraram que as células NE, EP-PbA e as estimuladas com TNF e com VEGF, combinados ou não com o estímulo de EP-PbA, não apresentaram diferença significativa na expressão proteica de  $\beta$ -actina (**Figura 22**).



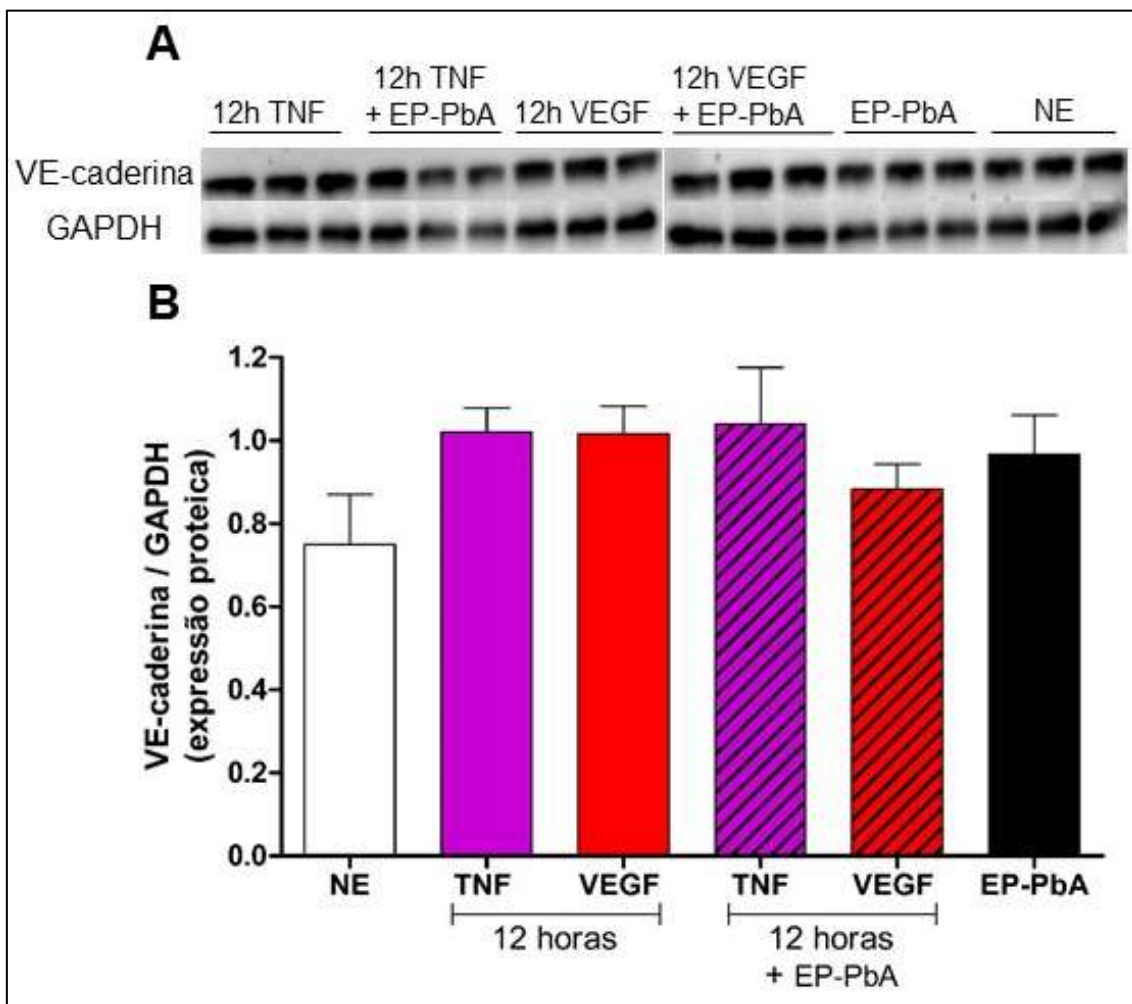
**Figura 22.** EP-PbA não alteram a expressão de  $\beta$ -actina em CEPP-DBA/2. **(A)** Expressão de  $\beta$ -actina e do controle GAPDH de cada amostra, revelada por quimioluminescência. **(B)** Quantificação de  $\beta$ -actina de CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA, TNF e VEGF, realizada por Western blot. Resultado representativo de dois experimentos independentes expressos pela média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo método de comparação múltipla ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 6$  amostras/estímulo; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

A actina ocorre, nos vertebrados, em seis isoformas diferentes. Células não musculares, como as células endoteliais, possuem  $\beta$ -actina e  $\gamma$ -actina. A  $\beta$ -actina pode estar acumulada em regiões do citoplasma em movimento, em pontas e bordas de estruturas protusivas, enquanto que a  $\gamma$ -actina é responsável pela manutenção da forma da célula e pela resistência mecânica.

O nível de expressão das diferentes isoformas pode estar alterado no envelhecimento, na embriogênese e em diversos casos de enfermidades. A  $\beta$ -actina apresenta-se super-expressada em muitas células tumorais, especialmente nas que se deslocam ativamente. Além disso, sabe-se que a redistribuição da  $\beta$ -actina e aumento do estado de polimerização dos filamentos de actina podem vir acompanhadas de alteração da expressão, indicando modificação estrutural (KHAITLINA, 2001; POPOW; NOWAK; MALICKA-BŁASZKIEWICZ, 2006).

A expressão da  $\beta$ -actina foi avaliada, uma vez que alguns estudos demonstram que o rearranjo dos microfilamentos da actina resulta da alteração da expressão das diferentes isoformas da actina (KHAITLINA, 2001; POPOW; NOWAK; MALICKA-BŁASZKIEWICZ, 2006). Os dados apresentados revelaram que a expressão proteica da  $\beta$ -actina das CEPP-DBA/2 não alterou, frente aos diferentes estímulos. Portanto, as alterações observadas, anteriormente, nas imagens de imunofluorescência, indicam que os diferentes estímulos e tempos de exposição causam apenas perturbação na conformação dos microfilamentos de actina, somente na reorganização, sem alteração estrutural deste componente do citoesqueleto.

Na análise de VE-caderina, os ensaios mostraram que as células NE, EP-PbA e as estimuladas com TNF e com VEGF, combinados ou não com o estímulo de EP-PbA, não apresentaram diferença significativa na expressão proteica de VE-caderina (**Figura 23**).



**Figura 23.** EP-PbA não alteram a expressão de VE-caderina em CEPP-DBA/2. **(A)** Expressão de VE-caderina e do controle GAPDH de cada amostra, revelada por quimioluminescência. **(B)** Quantificação de VE-caderina de CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA, TNF e VEGF, realizada por Western blot. Resultado referente a dois experimentos agrupados expressos pela média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo método ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 6$  amostras/estímulo; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Sabe-se que a VE-caderina é crucial para a integridade do contato celular endotelial e a regulação de sua atividade é essencial para o controle da permeabilidade da parede dos vasos sanguíneos (VESTWEBER, 2007). Estudos, anteriormente publicados, tiveram como objetivo desvendar os efeitos de diversos fatores que estão envolvidos com função das junções aderentes e relacionados com o aumento da permeabili-



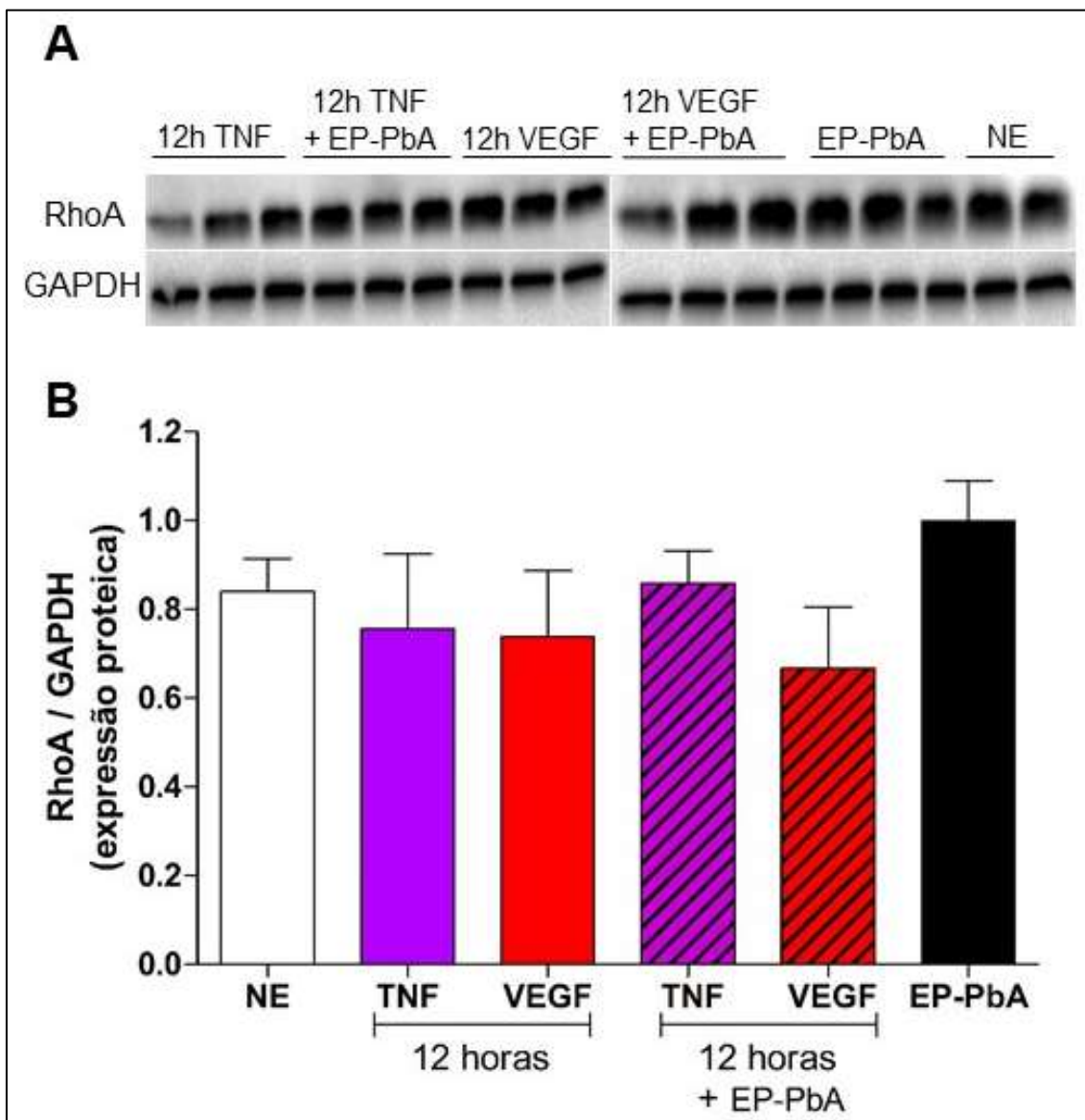
dade, tais como TNF, VEGF, histamina, bradikina e trombina. Estes estudos apresentam correlação entre a fosforilação dos resíduos tirosina da VE-caderina e a desestabilização das junções aderentes (SIDIBÉ; IMHOF, 2014).

Ainda, células endoteliais da veia umbilical humana estimuladas com VEGF apresentam forte aumento na fosforilação da tirosina da VE-caderina,  $\beta$ -catenina plakoglobina e p120. Este processo de fosforilação está associado a perda da integridade das adesões intercelulares destas células (ESSER et al., 1998). Assim como o TNF, o VEGF também pode estar envolvido com a disfunção das junções intercelulares, por remoção de VE-caderina das membranas de superfície, por um processo endocitótico (GAVARD; GUTKIND, 2006; MCKENZIE; RIDLEY, 2007).

Portanto, esperávamos constatar alterações na expressão proteica de VE-caderina, no nosso modelo experimental (**Figura 23**), o que não foi observado. Ensaios de atividade e imagens de imunofluorescência, poderiam detectar a fosforilação e remoção desta proteína nas membranas das CEPP-DBA/2. Entretanto, após inúmeras tentativas, os ensaios de imunofluorescência não resultaram em marcações de boa qualidade para analisar e quantificar as alterações de VE-caderina esperadas. Assim, foi adquirido um novo anticorpo que será testado novamente pela equipe do laboratório.

No entanto, apesar da impossibilidade de validar alterações na expressão proteica de VE-caderina, não podemos descartar a participação das junções aderentes, uma vez que nossos resultados apontaram redução significativa de FAK fosforilada na região de contato intercelular das CEPP-DBA/2, sendo este um forte indício de que os EP-PbA foram capazes de enfraquecer estas junções.

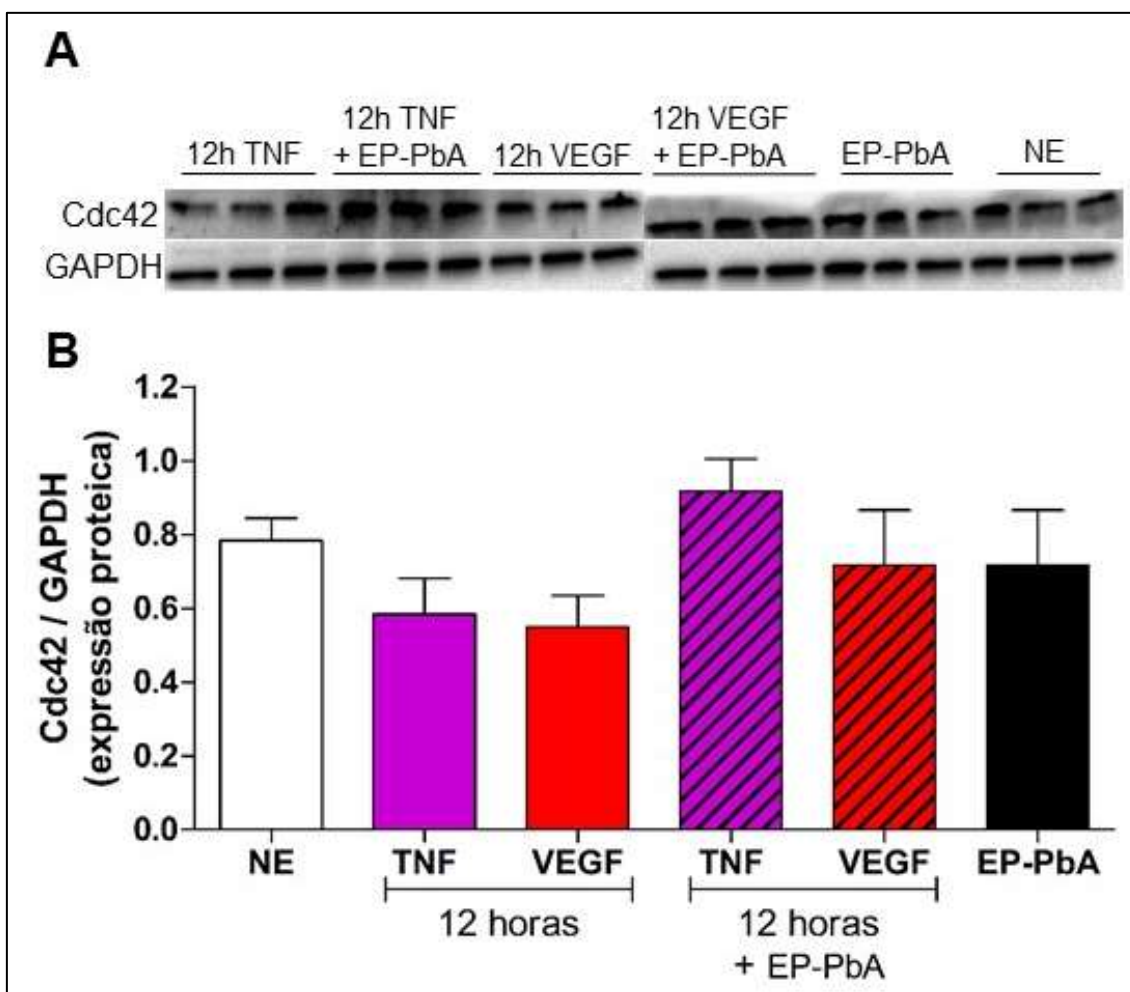
Na análise de RhoA, os ensaios também demonstraram que as células NE, EP-PbA e estimuladas com TNF e com VEGF, combinados ou não com o estímulo de EP-PbA, não apresentaram diferença significativa na expressão proteica de RhoA (**Figura 24**).



**Figura 24.** EP-PbA não alteram a expressão de RhoA em CEPP-DBA/2. **(A)** Expressão de RhoA e do controle GAPDH de cada amostra, revelada por quimioluminescência. **(B)** Quantificação de RhoA de CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA, TNF e VEGF, realizada por Western Blot. Resultado referente a dois experimentos agrupados expressos pela média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo método ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 6$  amostras/estímulo; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Da mesma forma, na análise de Cdc42, os ensaios também demonstraram que as células NE, EP-PbA e estimuladas com TNF e com VEGF, combinados ou não com

o estímulo de EP-PbA, não apresentaram diferença significativa na expressão proteica de Cdc42 (**Figura 25**).



**Figura 25.** EP-PbA não alteram a expressão de Cdc42 em CEPP-DBA/2. **(A)** Expressão de Cdc42 e do controle GAPDH de cada amostra, revelada por quimioluminescência. **(B)** Quantificação de Cdc42 de CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA, TNF e VEGF, realizada por Western Blot. Resultado referente a dois experimentos agrupados expressos pela média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo método ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 6$  amostras/estímulo; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

Como já foi discutido anteriormente, a ativação excessiva ou anormal de RhoA e de seu efetor ROCK, por ação de diferentes fatores, tais como TNF, VEGF e trombina está associada ao decréscimo da função da barreira endotelial. Neste processo, RhoA interage com ROCK, aumenta a fosforilação da cadeia leve da miosina e promove a

polimerização da actina (MCKENZIE; RIDLEY, 2007; PRASAIN; STEVENS, 2009; BECKERS; VAN HINSBERGH; VAN NIEUW AMERONGEN, 2010; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010; MARCOS-RAMIRO; GARCÍA-WEBER; MILLÁN, 2014).

Além disso, Taoufiq e colaboradores comprovaram que a adesão de eritrócitos infectados com *P. falciparum* em células endoteliais pulmonares humanas afeta diretamente a sinalização de RhoA/Rho kinase e a modulação da fosforilação da cadeia leve da miosina, causando disfunção da barreira endotelial devido à contração celular, alteração de junções intercelulares e hiperpermeabilidade endotelial (TAOUFIQ et al., 2008).

Sabe-se também que a depleção de FAK, em camundongos, causa hiperativação de RhoA, provocando rompimento das junções aderentes e, mais uma vez, causando efeitos negativos para a barreira endotelial pulmonar (BELVITCH; DUDEK, 2012; GRINNELL; HARRINGTON, 2012; ARNOLD; GOECKELER; WYSOLMERSKI, 2013; SCHMIDT et al., 2013).

Em oposição, Cdc42 possui efeito protetor sobre a barreira endotelial. Quando ativada, inibe a atividade de RhoA, processo associado à restauração das junções aderentes (KOUKLIS, 2004; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010; DULUC; WOJCIAK-STOTHARD, 2014). O Cdc42 apresenta-se ativo nas membranas das células endoteliais que estão recuperando a barreira, no entanto, é encontrado inativo, no citosol, durante a contração celular, mediada por RhoA. Além disso, também foi demonstrado que Cdc42 previne a disfunção da barreira vascular e formação de edema em pulmões de camundongos, induzido por LPS (BROMAN; MEHTA; MALIK, 2007; RAMCHANDRAN et al., 2008).

Diante desta discussão, observou-se que a análise da expressão proteica de Rho-GTPases totais, não foi suficiente para o entendimento do mecanismo de alteração das junções interendoteliais e hiperpermeabilidade endotelial. Uma vez que, a atividade dessas proteínas está diretamente envolvida com estes processos, em diferentes contextos fisiológicos e patológicos.

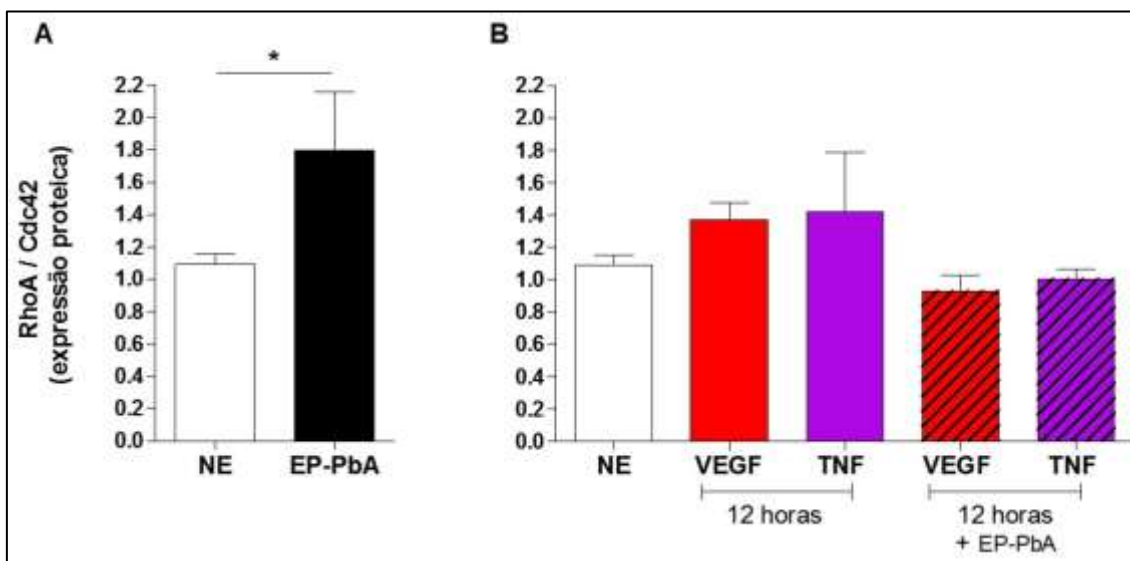
Entretanto, foi possível observar diferença considerável entre as expressões proteicas de RhoA e Cdc42, verificado pelo aumento significativo da razão RhoA/Cdc42 nas células estimuladas com EP-PbA, enquanto que nas células NE esta proporção permanece diminuída. Resultado que poderia refletir as atividades antagônicas destas proteínas, diante da presença de eritrócitos parasitados (**Figura 26A**).

Assim, esperava-se também o aumento da razão RhoA/Cdc42 em CEPP-DBA/2 estimuladas com TNF e VEGF, uma vez que estes fatores são conhecidos por alterarem a atividades das Rho-GTPases (BECKERS; VAN HINSBERGH; VAN NIEUW

AMERONGEN, 2010; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010). Porém, a análise destas amostras não resultou em diferença significativa para esta razão, em relação a das células NE (**Figura 26B**).

Considerando os resultados que demonstraram alterações na conformação dos microfilamentos de actina e nas junções interendoteliais, não se pode desprezar o envolvimento do TNF e do VEGF no processo de disfunção endotelial. Os tempos de exposição de 6 e 24 horas, que não foram testados para os ensaios de Western blot, que poderiam ter revelado as alterações esperadas nas expressões proteicas de RhoA e Cdc42.

Apesar da impossibilidade de validar alterações na razão RhoA/Cdc42, provocadas por TNF ou VEGF, o aumento causado por EP-PbA aponta a diminuição da expressão proteica de Cdc42, sugerindo que a presença de eritrócitos parasitados está causando inativação desta Rho-GTPase e ativação de RhoA. Já nas células NE, com relação RhoA/Cdc42 diminuída, a atividade de Cdc42 estaria mantendo a integridade das junções interendoteliais, mantendo RhoA inativada, prevenindo a disfunção da barreira vascular nas CEPP-DBA/2.

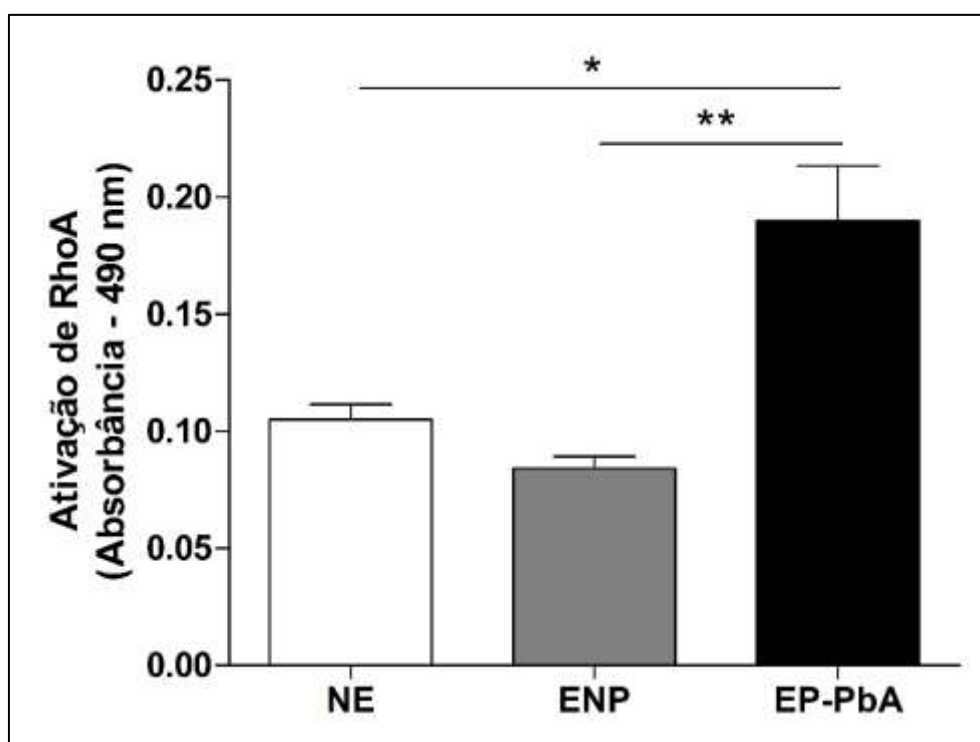


**Figura 26.** EP-PbA alteram a razão entre as proteínas RhoA e Cdc42 em CEPP-DBA/2. (A) Quantificação relativa de RhoA/Cdc42 em CEPP-DBA/2 expostas ao estímulo de EP-PbA. (B) Quantificação relativa de RhoA/Cdc42 em CEPP-DBA/2 estimuladas por TNF e VEGF. Resultado referente a dois experimentos agrupados expressos pela média  $\pm$  erro padrão e analisados pelo teste de *Mann Whitney* ( $n = 6$  amostras/estímulo; \* para  $p < 0.05$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; TNF: fator de necrose tumoral; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial).

#### 4.6 EP-PbA promovem a ativação de RhoA em CEPP-DBA/2

Apesar dos ensaios de Western blot não mostrarem alteração na expressão proteica de Rho-GTPases totais das CEPP-DBA/2, as células endoteliais estimuladas com EP-PbA apresentaram aumento significativo na razão RhoA/Cdc42, sugerindo ativação de RhoA e inativação de Cdc42. Portanto, um ensaio colorimétrico de ativação foi realizado para verificar e validar a atividade, por ação dos EP-PbA, nas CEPP-DBA/2.

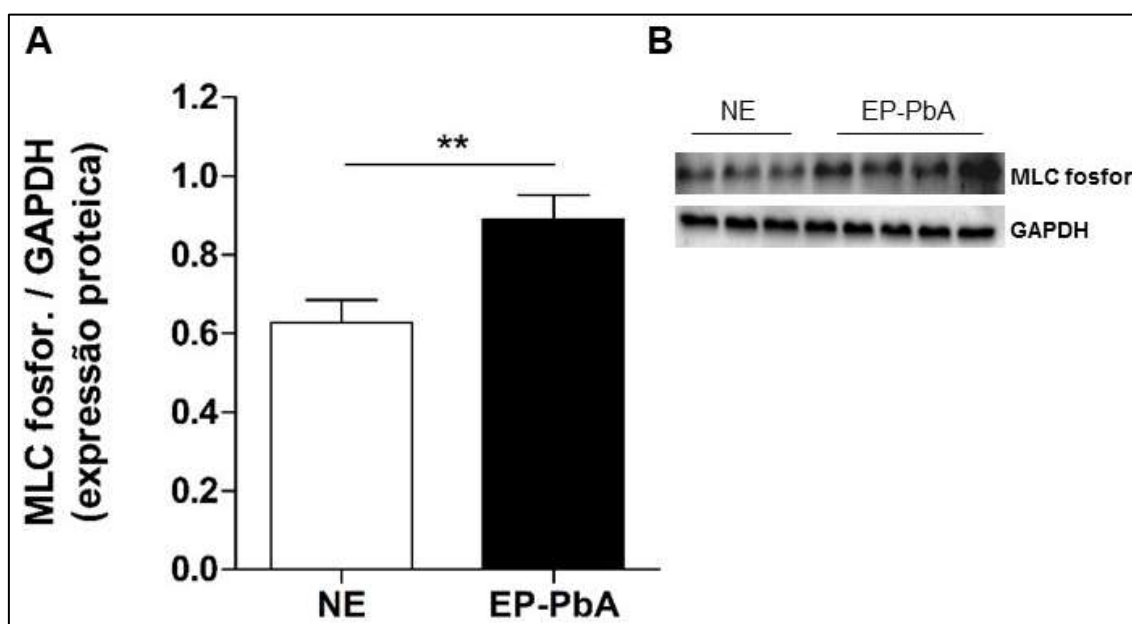
Neste ensaio, observou-se que as CEPP-DBA/2, que foram expostas ao estímulo de EP-PbA, apresentaram maior quantidade de RhoA ativa, quando comparadas com as células NE e ENP, uma vez que o sinal de ativação desta Rho-GTPase foi aproximadamente duas vezes maior nas células EP-PbA. Já entre as células NE e ENP, não houve diferença significativa na quantidade de RhoA ativa. Nestas amostras, as absorvâncias mantiveram-se reduzidas (**Figura 27**).



**Figura 27.** EP-PbA ativam RhoA em CEPP-DBA/2. Ativação de RhoA mensurada por *G-LISA*<sup>™</sup> (*Cytoskeleton - Cat. #BK124-S*). Resultado de um experimento expresso pela média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo método de comparação múltipla ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 4$  a 8 amostras/estímulo; \* para  $p < 0,05$  e \*\* para  $p < 0,01$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados).

Foi demonstrado que adesão de eritrócitos infectados com *P. falciparum* ativam diretamente a via de sinalização RhoA/ROCK (ZANG-EDOU et al., 2010). O ensaio colorimétrico, descrito acima, também apontou que a presença de eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA aumenta a produção de RhoA nas células endoteliais primárias pulmonares murinas.

Considerando que a sinalização RhoA/ROCK modula diretamente a fosforilação da cadeia leve da miosina (SHEN et al., 2010; YU et al., 2016), foram executados ensaios de Western blot para MLC fosforilada (Thr18/Ser19), os quais mostraram que as células endoteliais primárias pulmonares murinas estimuladas com eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA apresentaram aumento significativo na expressão proteica de MLC fosforilada (**Figura 28**).



**Figura 28.** EP-PbA induzem a fosforilação de MLC em CEPP-DBA/2. (A) Quantificação de MLC fosforilada (Thr18/Ser19) de CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA, realizada por Western Blot. (B) Expressão de MLC fosforilada e do controle GAPDH de cada amostra, revelada por quimioluminescência. Resultado referente a três experimentos agrupados expressos pela média  $\pm$  erro padrão e analisado por teste T de *Student* ( $n = 13$  amostras/estímulo; \*\* para  $p < 0,01$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; MLC: cadeia leve da miosina).

RhoA desempenha papel crítico na regulação da atividade da miosina fosfatase (ou fosfatase da MLC). Uma vez ativada, ligada à GTP, RhoA pode ativar o efetor Rho-quinase (ROCK), que fosforila e inibe a miosina fosfatase, resultando no aumento da fosforilação de MLC, o que induz a contração da actomiosina e enfraquecimento das junções interendoteliais, causando hiperpermeabilidade vascular (MCKENZIE; RIDLEY, 2007; TAOUFIQ et al., 2008; PRASAIN; STEVENS, 2009; BECKERS; VAN HINSBERGH; VAN NIEUW AMERONGEN, 2010; SHEN et al., 2010; SPINDLER; SCHLEGEL; WASCHKE, 2010; MARCOS-RAMIRO; GARCÍA-WEBER; MILLÁN, 2014).

Os resultados aqui apresentados corroboram com os dados acima, pois a adesão de eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA induziu a ativação de RhoA e aumentou a fosforilação da cadeia leve da miosina, além de alterar o citoesqueleto e as junções intercelulares, levando ao aumento da permeabilidade endotelial das células endoteliais primárias pulmonares murinas.

Estudos que demonstraram que a adesão de eritrócitos infectados com *P. falciparum*, em células endoteliais pulmonares humanas, ativou diretamente a via de sinalização RhoA/ROCK e levou a alterações na fosforilação de MLC e no citoesqueleto (ZANG-EDOU et al., 2010), também corroboram com os dados do nosso modelo experimental. Além disso, os autores relataram que estas alterações levaram à morte das células endoteliais (o que não foi verificado neste trabalho) e ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que será discutido mais adiante (ZANG-EDOU et al., 2010).

Em outros contextos, a via de sinalização RhoA/ROCK pode se apresentar alterada em artérias pulmonares. Em pacientes que foram diagnosticados com doença obstrutiva crônica, relatou-se disfunção endotelial pulmonar relacionada à modulação negativa da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e à modulação positiva da atividade de RhoA/ROCK (BEI et al., 2013). Sabe-se que o aumento da permeabilidade endotelial pode ser dependente de eNOS, mediadora da biodisponibilidade de óxido nítrico e da produção de superóxido, processo que também induz reorganização do citoesqueleto (WU et al., 2014).

Nossos resultados comprovam que a adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA atua no desencadeamento da disfunção da barreira endotelial, acompanhada por alteração da atividade de quinase de adesão focal e rearranjo espacial dos microfilamentos de actina e dos microtúbulos das células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2. Esta adesão leva ao desequilíbrio das atividades de Cdc42 e RhoA e a ativação exagerada de RhoA, seguida da ativação do efetor Rho-quinase e do aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina, o que induz



contração da actomiosina, enfraquecimento das junções interendoteliais e promovendo a hiperpermeabilidade vascular, fatores que certamente contribuem com a patogênese da LPA/SDRA associada à malária.

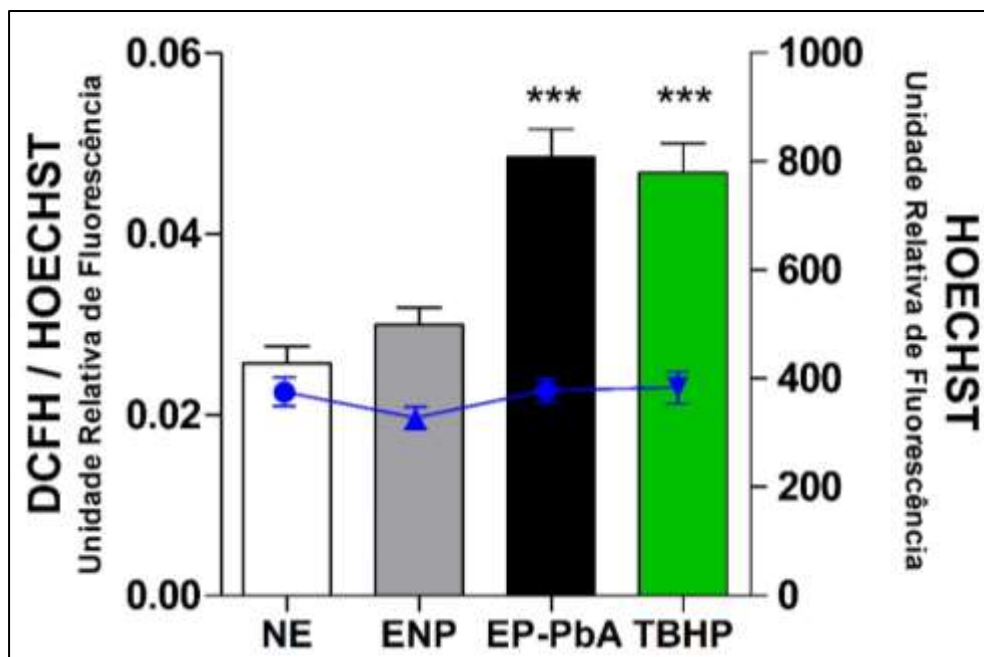
#### **4.7 EP-PbA incitam a produção de espécies reativas de oxigênio em CEPP-DBA/2**

As células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2 também foram expostas ao estímulo de EP-PbA, com o objetivo de verificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para este fim, foi utilizado o marcador fluorogênico 5(6)-Carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH) para espécies reativas, em células vivas.

Sabe-se que este não identifica diferentes espécies reativas, tais como peróxido de hidrogênio, superóxido ou óxido nítrico (JAY et al., 2015). Entretanto, o DCFH é bastante eficiente para verificar, de forma geral, se uma perturbação ou estímulo são capazes de alterar a atividade da célula, deixando o ambiente celular pró-oxidativo.

Os ensaios fluorométricos realizados mostraram que as CEPP-DBA/2 que estiveram em contato com EP-PbA apresentaram aumento significativo na fluorescência de DCFH, quando comparada com a das células NE e ENP. Além disso, o sinal de fluorescência das células EP-PbA mostrou-se tão elevado quanto o das células do controle positivo TBHP, que também se apresentou significativamente elevado em relação à NE e ENP. Esta produção exagerada de EROs pode estar resultando em alteração na sinalização redox, ativação endotelial anormal e disfunção celular. Assim, como era esperado, não houve diferença significativa entre as fluorescências de DCFH das células NE e ENP (**Figura 29, eixo Y, à esquerda**).

Além disso, estes estímulos demonstraram não provocar morte significativa das células, observada pela intensidade de HOECHST e representada pela linha azul no gráfico (**Figura 29, eixo Y, à direita**).



**Figura 29.** EP-PbA promovem aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em CEPP-DBA/2. À esquerda (**DCFH/ HOECHST**), representa a produção de EROs em CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA e TBHP. À direita (**HOECHST**), mostra a fluorescência dos núcleos, indicando que os estímulos não causaram morte celular nas CEPP-DBA/2, indicada pela linha azul. Resultado representativo de quatro experimentos independentes expressos pela média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo método de comparação múltipla ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni*, em que \*\*\* significa  $p < 0,001$  e diferença em relação à EP-PbA ou à TBHP ( $n = 12$  amostras/estímulo; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados; TBHP: terc-butil hidroperóxido).

As alterações oxidativas induzidas por eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA nas CEPP-DBA/2 incitaram a investigação sobre uma possível prevenção contra o aumento da produção de EROs com o uso de antioxidantes.

A Glutathiona (GSH), antioxidante hidrossolúvel, é um tiol intracelular constituído pelos aminoácidos ácido glutâmico, glicina e cisteína. Abundante na maioria dos sistemas celulares, está presente em altas concentrações no lavado broncoalveolar, conferindo proteção ao pulmão de lesões oxidativas induzidas por diferentes agressores, tanto endógenos quanto exógenos. A depleção de GSH está associada a diversas doenças, incluindo malária (RAHMAN et al., 1999; PERCÁRIO et al., 2012).

N-acetilcisteína (NAC), aminotiol derivado do aminoácido cisteína, é um precursor sintético de GSH. Há muitos anos, NAC tem sido utilizada como um fármaco mucolítico, é comercialmente consumida para o tratamento de diversas doenças pulmonares.

NAC é uma fonte exógena de glutathiona, que é uma das moléculas endógenas antioxidantes mais importantes presente nos tecidos (VAN ZANDWIJK, 1995; QUADROS GOMES et al., 2015).

Diante das propriedades destes antioxidantes, as CEPP-DBA/2 foram pré-tratadas com 10 mM de glutathiona reduzida (GSH) e com 20 mM NAC, acordo com artigo recentemente publicado (LIN et al., 2015), para verificar o efeitos desses antioxidantes sobre o aumento da produção de EROs, provocado pela presença de EP-PbA.

O ensaio realizado demonstrou, em primeiro lugar, o mesmo padrão de aumento na produção de EROs, observado nos experimentos anteriores. As CEPP-DBA/2 estimuladas com EP-PbA apresentaram aumento significativo na fluorescência de DCFH, quando comparada com a das células NE e ENP. Além disso, não houve diferença significativa entre as fluorescências de DCFH das células NE e ENP (**Figura 30**).

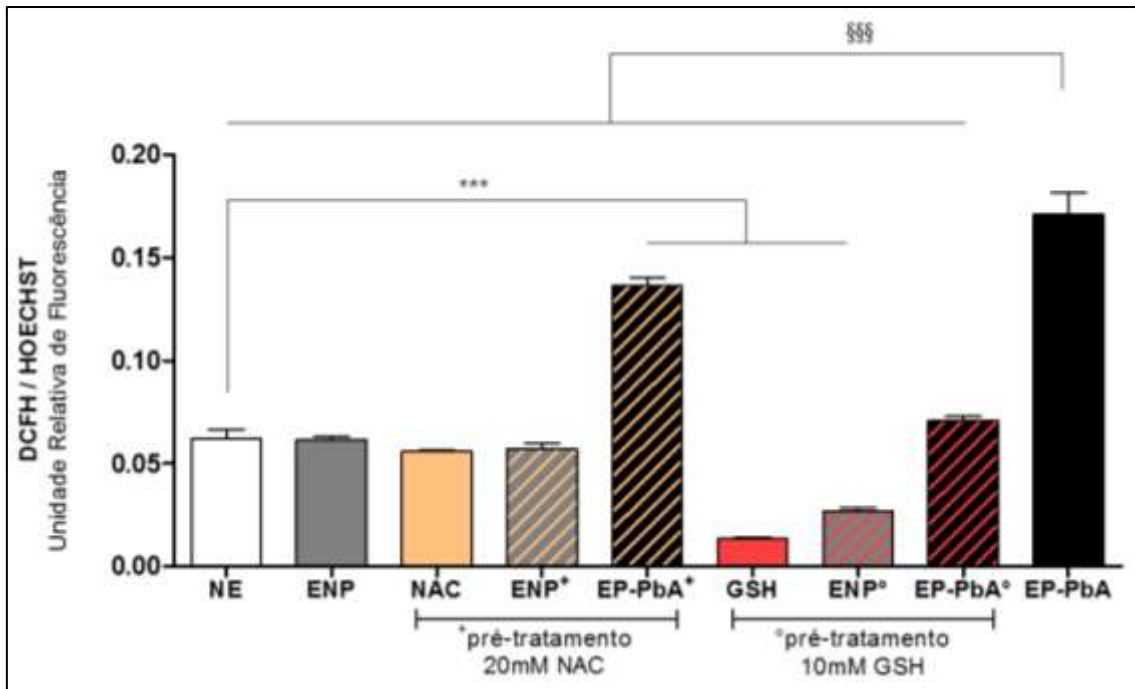
As CEPP-DBA/2 que receberam apenas N-acetilcisteína (**coluna NAC**) mantiveram a fluorescência de DCFH próxima a das células NE. O mesmo acontece entre as células que receberam NAC, seguido de eritrócitos não parasitados (**coluna ENP<sup>+</sup>**), e as células NE, sem diferenças significativas entre essas amostras.

No tratamento com GSH, a fluorescência de DCFH sofreu redução drástica, em relação a das células NE. Observou-se que as CEPP-DBA/2 que receberam apenas GSH (**coluna GSH**) e as células que receberam GSH, seguido de eritrócitos não parasitados (**coluna ENP<sup>o</sup>**) apresentaram fluorescência de DCFH significativamente reduzida em relação a das células NE (**Figura 30**).

O efeito mais importante observado, neste ensaio, foi que o pré-tratamento com os antioxidantes alterou consideravelmente a fluorescência de DCFH das células que, depois foram expostas ao estímulo de EP-PbA.

Observou-se que a fluorescência de DCFH das células que receberam NAC, seguido de eritrócitos parasitados (**coluna EP-PbA<sup>+</sup>**), apresentou-se significativamente menor em relação a das células EP-PbA. Porém, a fluorescência de EP-PbA<sup>+</sup> continuou significativamente elevada em relação NE e ENP (**Figura 30**).

Já o tratamento com glutathiona mostrou-se mais eficiente na proteção contra o aumento da produção de EROs. A fluorescência de DCFH das células que receberam GSH, seguido de eritrócitos parasitados (**coluna EP-PbA<sup>o</sup>**), apresentou-se significativamente menor em relação a das células EP-PbA. Além disso, a fluorescência de EP-PbA<sup>o</sup> mostrou-se próxima a das células NE e ENP, sem diferenças significativas entre essas amostras (**Figura 30**).



**Figura 30.** Redução drástica da produção de espécies reativas de oxigênio das CEPP-DBA/2, após tratamento com N-acetilcisteína e Glutathione reduzida, medida por fluorescência de DCFH. Resultado representativo de um experimento expresso pela média  $\pm$  erro padrão e analisado pelo método de comparação múltipla ANOVA, seguido do pós-teste de *Bonferroni* ( $n = 8$  amostras/estímulo; \*\*\* e §§§ para  $p < 0,001$ ; CEPP-DBA/2: células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2; EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; ENP: eritrócitos não parasitados; NAC: 20 mM de N-acetilcisteína; GSH: 10 mM de glutathione; ENP<sup>+</sup>: NAC, seguida de ENP; EP-PbA<sup>+</sup>: NAC, seguida de EP-PbA; ENP<sup>°</sup>: GSH, seguida de ENP; EP-PbA<sup>°</sup>: GSH, seguida de EP-PbA).

A interação hospedeiro-parasita é bastante complexa e promove mudanças constantes no delicado balanço entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, uma vez que tanto o hospedeiro quanto o parasita são capazes de produzi-las (PERCÁRIO et al., 2012).

Em geral, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, envolvidas com o desenvolvimento da malária, podem ser provenientes dos seguintes processos: (1) inflamação, iniciada no hospedeiro, em resposta à infecção; (2) catálise de metais, uma vez que eritrócitos parasitados liberam quantidades significativas de ferro livre; (3) citoadesão de eritrócitos parasitados; (4) produção de espécies reativas pelo parasita; e (5) ação de medicamentos antimaláricos (PERCÁRIO et al., 2012).

Sabe-se que o *Plasmodium* é capaz de gerar radicais livres, processo que induz alterações nos eritrócitos parasitados e nas células endoteliais, favorecendo a internalização do parasita no fígado (MEGNEKOU et al., 2015).

Os resultados aqui apresentados comprovaram que a presença de eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA amplificaram a quantidade de espécies reativas de oxigênio no ambiente da cultura de células endoteliais primárias pulmonares murinas. Este aumento de EROs pode ser proveniente das células endoteliais, uma vez que mudanças estruturais nestas células foram observadas em resposta à adesão dos eritrócitos parasitados. Entretanto, nossos resultados não excluem a possibilidade da produção de ROS seja diretamente procedente dos eritrócitos parasitados.

Sabe-se também que, em doenças vasculares, várias fontes podem estar relacionadas com o aumento da produção de espécies reativas, tais como NADPH oxidases, a cadeia respiratória das mitocôndrias, xantina oxidases e desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (THOMAS; WITTING; DRUMMOND, 2008).

Em estudo sobre LPA/SDRA, observa-se que grande quantidade de EROs é produzida por células endoteliais humanas de veia umbilical, por diversas fontes, tais como mitocôndria, NADPH / NOX2 e xantina oxidase. O aumento de superóxido e de peróxido de hidrogênio altera a atividade de integrinas, como a de FAK, causando efeito direto na adesão e na função das células endoteliais. Portanto, acredita-se que a produção de EROs está diretamente relacionada à injúria endotelial e disfunção tecidual (BEN-MAHDI et al., 2016).

Além disso, em estudo com modelo de malária cerebral, foi demonstrado expressão significativa de eNOS no cérebro, desencadeada por aumento de produção de EROs, em condições de baixa biodisponibilidade de NO. Da mesma forma, em outros contextos, um aumento concomitante da proteína de eNOS e da NADPH oxidases tem sido identificado e associado como mecanismo causador de estresse oxidativo, por desacoplamento da eNOS, que contribui com a patogênese de doenças vasculares (ONG et al., 2013).

Os ensaios realizados não revelaram especificamente qual fonte de espécie reativas foi alterada pela presença de eritrócitos parasitados. Entretanto, corroborando com estes dados já publicados, as imagens de FAK e os ensaios fluorométricos de DCFH, em conjunto, sugerem que a produção aumentada de EROs, causada pelo contato com EP-PbA, está relacionada ao rompimento da conexão interendotelial das CEPP-DBA/2 e consequente disfunção endotelial.

Entre as moléculas antioxidantes, a glutatona reduzida destaca-se na defesa do hospedeiro, como o protetor mais poderoso das células eucarióticas (DUMASWALA et al., 2001). Interessantemente, já foi observado, em pacientes infectados com *P. vivax*,

níveis reduzidos de antioxidantes no plasma, tais como GSH,  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína e ferritina (BALLA et al., 1992; DUMASWALA et al., 2001; METZGER et al., 2001; GLOSLI et al., 2002).

Sabe-se que a secreção de TNF pode induzir inbalanço oxidativo pelo aumento significativo de níveis de glutatona oxidada (GSSG), em linfócitos T esplênicos (GLOSLI et al., 2002). Este mesmo processo também já foi reportado em estudo de malária cerebral, em que camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, apresentaram depleção de GSH, juntamente com aumento nos níveis de peroxidação lipídica, mostrando alteração na sinalização redox nos cérebros desses animais, durante a malária cerebral experimental (ZANINI et al., 2012). Dados do nosso laboratório também demonstraram que EP-PbA promovem a liberação de TNF pelas células endoteliais pulmonares (dados não publicados).

Além disso, acreditamos que em nosso modelo *in vivo* (camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA), o estresse oxidativo também esteja amplificado, devido a liberação heme livre (FERREIRA et al., 2008), uma vez que já observamos hemólise de eritrócitos parasitados nestes animais.

O processo de adesão de eritrócitos parasitados aumenta a produção de EROs nas CEPP-DBA/2, como comprovado nos nossos resultados, sugerindo desequilíbrio do balanço próxidante-antioxidante celular, ativação endotelial anormal e disfunção celular, contribuindo, assim, com o aumento da permeabilidade endotelial. No entanto, com o tratamento com antioxidantes, o aumento de EROs foi revertido.

Algumas pesquisas já se dedicaram à investigação sobre o uso de antioxidantes, isolados ou combinados com antimaláricos, como estratégia terapêutica, visando o alívio do estresse oxidativo induzido pelo plasmódio e suas complicações associadas. Os antioxidantes mais frequentemente investigados, para este fim, são as vitaminas C e E, folato, desferrioxamina e N-acetilcisteína.

Há alguns anos, em um grupo de pacientes tailandeses administrou-se tratamento de NAC com artesunato (medicamento anti-malárico). Sem efeitos adversos, esta terapia resultou em uma diminuição da taxa de mortalidade associada à malária grave por *P. falciparum* (TREEPRASERTSUK et al., 2003).

Outro estudo demonstrou que a terapia com NAC e desferrioxamina, em conjunto com cloroquina (medicamento anti-malárico), foi capaz de reverter congestionamento microvascular e obstrução detectada por exames histológicos do córtex, hipocampo e cerebelo de camundongos infectados com *P. berghei* (REIS et al., 2010). Além

disso, foi demonstrado que a co-administração de NAC e artemisinina reduziu a parasitemia e aumentou a resposta imunitária contra *P. berghei* através da produção aumentada de interleucina-12 (FITRI et al., 2009).

Possivelmente, o uso de antioxidantes possa ter um efeito benéfico como terapia coadjuvante da LPA/SDRA associada a malária, considerando que NAC e GSH mostraram-se eficientes na proteção contra o aumento da produção de EROs. No entanto, futuros estudos poderão explorar esta hipótese.

Em resumo, o presente estudo evidencia que a adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA atua no desencadeamento da disfunção da barreira endotelial, acompanhada por alteração da atividade de quinase de adesão focal, rearranjo espacial dos microfilamentos de actina e dos microtúbulos de células endoteliais primárias pulmonares murinas. Além disso, o processo de citoadesão provoca aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nestas células, o que resulta em ativação endotelial anormal e dano celular.

Interessantemente, estas alterações endoteliais estão relacionadas com alterações na razão RhoA/Cdc42, com o aumento da expressão proteica de MLC fosforilada e com a ativação de RhoA que, em conjunto, comprovaram que a adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *Plasmodium berghei* ANKA na microvasculatura dos pulmões de camundongos DBA/2 está desencadeando desequilíbrio nas atividades de RhoA e Cdc42, resultando na contração da actomiosina, enfraquecimento das junções interendoteliais e hiperpermeabilidade vascular, dados que enriquecem o conhecimento sobre a patogênese da LPA/SDRA associada à malária.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nas observações das interações do plasmódio murino *Plasmodium berghei* ANKA com as células endoteliais primárias pulmonares de camundongos DBA/2, podemos concluir:

- ✓ As células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2, cultivadas e utilizadas nos diferentes ensaios deste trabalho, apresentam características específicas de células endoteliais;

- ✓ Eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA, TNF, VEGF e IFN $\gamma$ , em diferentes tempos de exposição, não afetam a atividade do metabolismo mitocondrial e a viabilidade das células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2;
- ✓ Eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA provocam disfunção e aumento da permeabilidade endotelial, devido ao rearranjo espacial dos microfilamentos de actina, dos microtúbulos e da quinase de adesão focal. Estas alterações morfológicas provocam o aumento do espaço entre as junções interendoteliais;
- ✓ TNF, VEGF, IFN $\gamma$  também reorganizam os microfilamentos de actina e promovem o aumento dos espaços interendoteliais, porém não amplificam esta resposta provocada pelos eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA;
- ✓ Eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA não alteram a expressão proteica de VE-caderina, mas modificam razão entre as proteínas RhoA e Cdc42 das células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2;
- ✓ A ativação de RhoA e o aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina indicam que a adesão de eritrócitos parasitados com esquizontes de *Plasmodium berghei* ANKA está provocando alterações na microvasculatura dos pulmões de camundongos DBA/2 pela via de sinalização RhoA/ROCK;
- ✓ O processo de adesão de eritrócitos parasitados incita a produção de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2, sugerindo ativação endotelial anormal e disfunção celular;
- ✓ O tratamento com os antioxidantes, N-acetilcisteína e glutatona, mostrou-se eficiente na proteção contra o aumento da produção de espécies reativas, o que sugere o potencial de NAC e GSH em estratégias de terapia coadjuvante para LPA/SDRA associada a malária.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, H.; ZACHARY, I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 24, p. 15442–51, 13 jun. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182576>>.



AITKEN, E. H.; NEGRI, E. M.; BARBOZA, R.; LIMA, M. R.; ÁLVAREZ, J. M.; MARINHO, C. R.; CALDINI, E. G.; EPIPHANIO, S. Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 230, 2014. Disponível em: <<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-230>>.

ALBERTS, B. Molecular Biology of the Cell. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, p. 1601, 2008.

ALIEVA, IRINA B., and A. D. V. "The functional role of the microtubule/microfilament cytoskeleton in the regulation of pulmonary vascular endothelial barrier." **Endothelial Cytoskeleton**. p. 116 - 145. 2013.

ALIEVA, I. B.; ZEMSKOV, E. A.; SMUROVA, K. M.; KAVERINA, I. N.; VERIN, A. D. The leading role of microtubules in endothelial barrier dysfunction: Disassembly of peripheral microtubules leaves behind the cytoskeletal reorganization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 10, p. 2258–2272, out. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24575>>.

ANIDI, I. U.; SERVINSKY, L. E.; RENTSENDORJ, O.; STEPHENS, R. S.; SCOTT, A. L.; PEARSE, D. B. CD36 and Fyn Kinase Mediate Malaria-Induced Lung Endothelial Barrier Dysfunction in Mice Infected with *Plasmodium berghei*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71010, 15 ago. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0071010>>.

ANSTEY, N. M.; JACUPS, S. P.; CAIN, T.; PEARSON, T.; ZIESING, P. J.; FISHER, D. a; CURRIE, B. J.; MARKS, P. J.; MAGUIRE, G. P. Pulmonary manifestations of uncomplicated falciparum and vivax malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 9, p. 1326–1334, 2002.

ARNOLD, K. M.; GOECKELER, Z. M.; WYSOLMERSKI, R. B. Loss of focal adhesion kinase enhances endothelial barrier function and increases focal adhesions. **Microcirculation**, v. 20, n. 7, p. 637–649, 2013.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.

BALLA, G.; JACOB, H. S.; BALLA, J.; ROSENBERG, M.; NATH, K.; APPLE, F.; EATON, J. W.; VERCELLOTTI, G. M. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 25, p. 18148–53, 5 set. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1517245>>.

BARABUTIS, N.; VERIN, A.; CATRAVAS, J. D. Regulation of pulmonary endothelial barrier function by kinases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 311, n. 5, p. L832–L845, 1 nov. 2016.

BECKERS, C. M. L.; VAN HINSBERGH, V. W. M.; VAN NIEUW AMERONGEN, G. P. Driving Rho GTPase activity in endothelial cells regulates barrier integrity. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 103, n. 1, p. 40–55, 2010.

BEI, Y.; DUONG-QUY, S.; HUA-HUY, T.; DAO, P.; LE-DONG, N.-N.; DINH-XUAN, A. T. Activation of RhoA/Rho-kinase pathway accounts for pulmonary endothelial dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Physiological Reports**, v. 1, n. 5, p. n/a-n/a, out. 2013. Disponível em: <<http://physreports.physiology.org/cgi/doi/10.1002/phy2.105>>.

BELVITCH, P.; DUDEK, S. M. Role of FAK in S1P-regulated endothelial permeability. **Microvascular Research**, v. 83, n. 1, p. 22–30, jan. 2012.

BEN-MAHDI, M. H.; DANG, P. M.-C.; GOUGEROT-POCIDALO, M.-A.; O'DOWD, Y.; EL-BENNA, J.; PASQUIER, C. Xanthine Oxidase-Derived ROS Display a Biphasic Effect on Endothelial Cells Adhesion and FAK Phosphorylation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9346242/>>.

BIRUKOVA, A. a; BIRUKOV, K. G.; SMUROVA, K.; ADYSHEV, D.; KAIBUCHI, K.; ALIEVA, I.; GARCIA, J. G. N.; VERIN, A. D. Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 15, p. 1879–1890, 2004.

BROMAN, M. T.; MEHTA, D.; MALIK, A. B. **Cdc42 Regulates the Restoration of Endothelial Adherens Junctions and Permeability***Trends in Cardiovascular Medicine*, 2007.

CAHAYANI, W. A.; NORAHMAWATI, E.; BUDIARTI, N.; FITRI, L. E. Increased CD11b and Hypoxia-Inducible Factors-1alpha Expressions in the Lung Tissue and Surfactant Protein-D Levels in Serum Are Related with Acute Lung Injury in Severe Malaria of C57BL/6 Mice. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 11, n. 3, p. 303–315, 2016.

CHEN, S. F.; FEI, X.; LI, S. H. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. **Microvascular research**, v. 50, n. 1, p. 119–128, 1995.

CLARK, C. J.; MACKAY, G. M.; SMYTHE, G. A.; BUSTAMANTE, S.; STONE, T. W.; PHILLIPS, R. S. Prolonged Survival of a Murine Model of Cerebral Malaria by Kynurenine Pathway Inhibition.

**Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 5249–5251, 1 ago. 2005. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.8.5249-5251.2005>>.

COHEN, A. W.; CARBAJAL, J. M.; SCHAEFFER, R. C. VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 5 Pt 2, p. H2038-49, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564161>>.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, out. 2016.

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S. B.; DIVIS, P. C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG, K. T.; ADEM, P.; ZAKI, S. R.; SINGH, B.; KRISHNA, S. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. **Malaria Journal**, v. 9, p. 10, 2010.

DAVIS, S. P.; LEE, K.; GILLRIE, M. R.; ROA, L.; AMREIN, M.; HO, M. CD36 Recruits  $\alpha 5\beta 1$  Integrin to Promote Cytoadherence of *P. falciparum*-Infected Erythrocytes. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003590, 29 ago. 2013.

DEROOST, K.; PHAM, T.-T.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. The immunological balance between host and parasite in malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 2, p. 208–257, mar. 2016.

DI LORENZO, A.; LIN, M. I.; MURATA, T.; LANDSKRONER-EIGER, S.; SCHLEICHER, M.; KOTHIYA, M.; IWAKIRI, Y.; YU, J.; HUANG, P. L.; SESSA, W. C. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 24, p. 5541–52, 2013.

DUDEK, S. M.; GARCIA, J. O. E. G. N. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. p. 1487–1500, 2001.

DULUC, L.; WOJCIAK-STOTHARD, B. Rho GTPases in the regulation of pulmonary vascular barrier function. **Cell and tissue research**, v. 355, n. 3, p. 675–85, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599334>>.

DUMASWALA, U. J.; ZHUO, L.; MAHAJAN, S.; NAIR, P. N.; SHERTZER, H. G.; DIBELLO, P.; JACOBSEN, D. W. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 280, n. 4, p. C867-73, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245604>>.

ELIAS, R. M.; CORREA-COSTA, M.; BARRETO, C. R.; SILVA, R. C.; HAYASHIDA, C. Y.; CASTOLDI, Â.; GONÇALVES, G. M.; BRAGA, T. T.; BARBOZA, R.; RIOS, F. J.; KELLER, A. C.; CENEDEZE, M. A.; HYANE, M. I.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R.; FIGUEIREDO-NETO, A. M.; REIS, M. A.; MARINHO, C. R. F.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. S. Oxidative Stress and Modification of Renal Vascular Permeability Are Associated with Acute Kidney Injury during P. berghei ANKA Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

EPIPHANIO, S.; CAMPOS, M. G.; PAMPLONA, A.; CARAPAU, D.; PENA, A. C.; ATAÍDE, R.; MONTEIRO, C. a a; FÉLIX, N.; COSTA-SILVA, A.; MARINHO, C. R. F.; DIAS, S.; MOTA, M. M. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in Mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. 1–10, 2010.

ESSER, S.; LAMPUGNANI, M. G.; CORADA, M.; DEJANA, E.; RISAU, W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. **Journal of cell science**, v. 111. p. 1853–1865, 1998.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, n. 6916, p. 629–635, 12 dez. 2002.

EUGENIN, E. A.; BASILIO, D.; SÁEZ, J. C.; ORELLANA, J. A.; RAINE, C. S.; BUKAUSKAS, F.; BENNETT, M. V. L.; BERMAN, J. W. The Role of Gap Junction Channels During Physiologic and Pathologic Conditions of the Human Central Nervous System. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 499–518, set. 2012.

FAVIER, A. E.; CADET, J.; KALYANARAMAN, B.; FONTECAVE, M.; PIERRE, J.-L. (ed.). **Analysis of free radicals in biological systems**. Basel: Birkhäuser Basel, 1995.

FAVRE, N.; DA LAPEROUSAZ, C.; RYFFEL, B.; WEISS, N. A.; IMHOF, B. A.; RUDIN, W.; LUCAS, R.; PIGUET, P. F. Role of ICAM-1 (CD54) in the development of murine cerebral malaria. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 12, p. 961–968, out. 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457999805139>>.

FERNANDES, D. C.; WOSNIAK, J.; PESCATORE, L. A.; BERTOLINE, M. A.; LIBERMAN, M.; LAURINDO, F. R. M.; SANTOS, C. X. C. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **AJP: Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C413–C422, 13 set. 2006. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00188.2006>>.

FERREIRA, A.; BALLA, J.; JENEY, V.; BALLA, G.; SOARES, M. P. A central role for free heme

in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 10, p. 1097–1111, 19 out. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00109-008-0368-5>>.

FITRI, L. E.; ROSYIDAH, H.; SARI, N. P.; ENDARTI, A. T. Effect of N-Acetyl Cysteine administration to the degree of parasitemia and plasma interleukin-12 level of mice infected with plasmodium berghei and treated with artemisinin. **Medical Journal of Indonesia**, p. 5, 1 fev. 2009. Disponível em: <<http://mji.ui.ac.id/journal/index.php/mji/article/view/332>>.

FREEMAN, B. D.; MARTINS, Y. C.; AKIDE-NDUNGE, O. B.; BRUNO, F. P.; WANG, H.; TANOWITZ, H. B.; SPRAY, D. C.; DESRUISSEAU, M. S. Endothelin-1 Mediates Brain Microvascular Dysfunction Leading to Long-Term Cognitive Impairment in a Model of Experimental Cerebral Malaria. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. e1005477, 31 mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005477>>.

GALLEGO-DELGADO, J.; BASU-ROY, U.; TY, M.; ALIQUE, M.; FERNANDEZ-ARIAS, C.; MOVILA, A.; GOMES, P.; WEINSTOCK, A.; XU, W.; EDAGHA, I.; WASSMER, S. C.; WALTHER, T.; RUIZ-ORTEGA, M.; RODRIGUEZ, A. Angiotensin receptors and  $\beta$ -catenin regulate brain endothelial integrity in malaria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 10, p. 4016–4029, 19 set. 2016. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/87306>>.

GARCIA-MATA, R.; BOULTER, E.; BURRIDGE, K. The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 493–504, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3153>>.

GARLANDA, C.; DEJANA, E. Heterogeneity of Endothelial Cells: Specific Markers. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 7, p. 1193–1202, 1 jul. 1997. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.17.7.1193>>.

GAVARD, J.; GUTKIND, J. S. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. **Nature cell biology**, v. 8, n. 11, p. 1223–1234, 2006.

GIANNOTTA, M.; TRANI, M.; DEJANA, E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. **Developmental cell**, v. 26, n. 5, p. 441–54, 16 set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24044891>>.

GILLRIE, M. R.; RENAUX, B.; RUSSELL-GOLDMAN, E.; AVRIL, M.; BRAZIER, A. J.; MIHARA, K.; DI CERA, E.; MILNER, D. A.; HOLLENBERG, M. D.; SMITH, J. D.; HO, M. Thrombin Cleavage of Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Inhibits Cytoadherence. **mBio**, v. 7,

n. 5, p. e01120-16, 2 nov. 2016.

GLOSLI, H.; TRONSTAD, K. J.; WERGEDAL, H.; MÜLLER, F.; SVARDAL, A.; AUKRUST, P.; BERGE, R. K.; PRYDZ, H. Human TNF-alpha in transgenic mice induces differential changes in redox status and glutathione-regulating enzymes. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 11, p. 1450–2, set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12205044>>.

GOOD, M. F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C. R. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 69–99, 2005.

GOODMAN, R. B.; PUGIN, J.; LEE, J. S.; MATTHAY, M. a. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 6, p. 523–535, 2003.

GRINNELL, K. L.; HARRINGTON, E. O. Interplay between FAK, PKC $\delta$ , and p190RhoGAP in the regulation of endothelial barrier function. **Microvascular Research**, v. 83, n. 1, p. 12–21, jan. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026286211000677>>.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 17, n. 3–4, p. 293–307, 2011.

GUPTA, H.; AFSAL, M. P.; SHETTY, S. M.; SATYAMOORTHY, K.; UMAKANTH, S. Plasmodium vivax infection causes acute respiratory distress syndrome: a case report. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, 29 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/6813>>.

HAYDOURA, S.; MAZBOUDI, O.; CHARAFEDDINE, K.; BOUAKL, I.; BABAN, T. a.; TAHER, A. T.; KANJ, S. S. Transfusion-related Plasmodium ovale malaria complicated by acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a non-endemic country. **Parasitology International**, v. 60, n. 1, p. 114–116, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2010.10.005>>.

HEE, L.; DINUDOM, A.; MITCHELL, A. J.; GRAU, G. E.; COOK, D. I.; HUNT, N. H.; BALL, H. J. Reduced activity of the epithelial sodium channel in malaria-induced pulmonary oedema in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 81–88, jan. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751910002870>>.

HIPPENSTIEL, S.; KRÜLL, M.; IKEMANN, a; RISAU, W.; CLAUSS, M.; SUTTORP, N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 5 Pt 1, p. L678–L684, 1998.

HUANG, M.; SATCHELL, L.; DUHADAWAY, J. B.; PRENDERGAST, G. C.; LAURY-KLEINTOP, L. D. RhoB links PDGF signaling to cell migration by coordinating activation and localization of Cdc42 and Rac. v. 112, n. 6, p. 1572–1584, 2012.

HUNT, N. H.; BALL, H. J.; HANSEN, A. M.; KHAW, L. T.; GUO, J.; BAKMIWEWA, S.; MITCHELL, A. J.; COMBES, V.; GRAU, G. E. R. Cerebral malaria: gamma-interferon redux. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 15 ago. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00113/abstract>>.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p. 247–269, 2005.

JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G.; MINICK, C. R. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. IDENTIFICATION BY MORPHOLOGIC AND IMMUNOLOGIC CRITERIA. **Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 11, p. 2745–2756, 1 nov. 1973. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/107470>>.

JAMBOU, R.; COMBES, V.; JAMBOU, M.-J.; WEKSLER, B. B.; COURAUD, P.-O.; GRAU, G. E. Plasmodium falciparum Adhesion on Human Brain Microvascular Endothelial Cells Involves Transmigration-Like Cup Formation and Induces Opening of Intercellular Junctions. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7. 29 jul. 2010.

JAY, H.; AUGUSTO, O.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; DENNERY, P. A.; KALYANARAMAN, B.; ISCHIROPOULOS, H.; MANN, G. E.; RADI, R.; ROBERTS, L. J.; VINA, J.; DAVIES, K. J. A. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, 2015.

KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 3, p. 194–204, 11 mar. 2010.

KHAITLINA, S. Y. **Functional specificity of actin isoforms** *International Review of Cytology*, 2001.

KOHLSTEDT, K. Angiotensin-Converting Enzyme Is Involved in Outside-In Signaling in Endothelial Cells. **Circulation Research**, v. 94, n. 1, p. 60–67, 9 jan. 2004. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000107195.13573.E4>>.

KOUKLIS, P. Cdc42 Regulates the Restoration of Endothelial Barrier Function. **Circulation Research**, v. 94, n. 2, p. 159–166, 6 fev. 2004.

KROLL, J.; WALTENBERGER, J. VEGF-A Induces Expression of eNOS and iNOS in Endothelial Cells via VEGF Receptor-2 (KDR). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 252, n. 3, p. 743–746, nov. 1998.

LACERDA-QUEIROZ, N.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. Imunopatogênese da malária cerebral. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. v. 44, n. n. 1, p. 13–9, 2008.

LAGASSE, H. A. D.; ANIDI, I. U.; CRAIG, J. M.; LIMJUNYAWONG, N.; POUPORE, A. K.; MITZNER, W.; SCOTT, A. L. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 5, p. 659–671, 1 maio 2016.

LAURINDO, F. R. M.; FERNANDES, D. C.; SANTOS, C. X. C. Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. **Methods in enzymology**, v. 441, p. 237–260, 2008.

LI, L.; HU, J.; HE, T.; ZHANG, Q.; YANG, X.; LAN, X.; ZHANG, D.; MEI, H.; CHEN, B.; HUANG, Y. P38/MAPK contributes to endothelial barrier dysfunction via MAP4 phosphorylation-dependent microtubule disassembly in inflammation-induced acute lung injury. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8895, 9 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep08895>>.

LI, N.; MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Actin binding proteins in blood-testis barrier function. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 22, n. 3, p. 238–47, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887390>>.

LIN, B.-H.; TSAI, M.-H.; LII, C.-K.; WANG, T.-S. IP3 and calcium signaling involved in the reorganization of the actin cytoskeleton and cell rounding induced by cigarette smoke extract in human endothelial cells. **Environmental Toxicology**, p. n/a-n/a, mar. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/tox.22133>>.

LOIOLA, R. A.; TORRES, T. C.; ABURAYA, C. M.; LANDGRAF, M. A.; LANDGRAF, R. G.; BOSCO PESQUERO, J.; FERNANDES, L. Generation and characterization of a spontaneously immortalized endothelial cell line from mice microcirculation. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 8, p. 1102–1110, 2013.

LUCAS, R.; VERIN, A. D.; BLACK, S. M.; CATRAVAS, J. D. Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. **Biochemical pharmacology**, v. 77, n. 12, p. 1763–72, 15 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428331>>.

MARCOS-RAMIRO, B.; GARCÍA-WEBER, D.; MILLÁN, J. TNF-induced endothelial barrier



disruption: beyond actin and Rho. **Thrombosis and haemostasis**, v. 112, n. 5, p. 1–15, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078148>>.

MCCLOY, R. A.; ROGERS, S.; CALDON, C. E.; LORCA, T.; CASTRO, A.; BURGESS, A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle**, v. 13, n. 9, p. 1400–1412, 6 maio 2014.

MCKAYED, K.; SIMPSON, J. Actin in Action: Imaging Approaches to Study Cytoskeleton Structure and Function. **Cells**, v. 2, n. 4, p. 715–731, 14 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4409/2/4/715/>>.

MCKENZIE, J. A. G.; RIDLEY, A. J. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF- $\alpha$ -induced changes in endothelial morphology and permeability. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 1, p. 221–228, 2007.

MEGNEKOU, R.; DJONTU, J. C.; BIGOGA, J. D.; MEDOU, F. M.; TENOU, S.; LISSOM, A. Impact of Placental Plasmodium falciparum Malaria on the Profile of Some Oxidative Stress Biomarkers in Women Living in Yaoundé, Cameroon. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134633, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26267795>>.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. **Physiology Reviews**, v. 86, p. 279–367, 2006.

METZGER, A.; MUKASA, G.; SHANKAR, A. H.; NDEEZI, G.; MELIKIAN, G.; SEMBA, R. D. Antioxidant status and acute malaria in children in Kampala, Uganda. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 2, p. 115–9, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11508384>>.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–9, 7 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832955>>.

MOHAN, A.; SHARMA, S. K.; BOLLINENI, S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, n. 3, p. 179–193, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>>.

NG, C. T.; FONG, L. Y.; SULAIMAN, M. R.; MOKLAS, M. A. M.; YONG, Y. K.; HAKIM, M. N.;

AHMAD, Z. Interferon-Gamma Increases Endothelial Permeability by Causing Activation of p38 MAP Kinase and Actin Cytoskeleton Alteration. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 7, p. 513–522, jul. 2015.

NIELSEN, M. S.; NYGAARD AXELSEN, L.; SORGEN, P. L.; VERMA, V.; DELMAR, M.; HOLSTEIN-RATHLOU, N.-H. Gap Junctions. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. 88p. 110–113.

NIKURA, M.; INOUE, S.-I.; KOBAYASHI, F. Role of Interleukin-10 in Malaria: Focusing on Coinfection with Lethal and Nonlethal Murine Malaria Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

O'DONNELL, J. J.; BIRUKOVA, A. A.; BEYER, E. C.; BIRUKOV, K. G. Gap Junction Protein Connexin 43 Exacerbates Lung Vascular Permeability. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100931, 26 jun. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0100931>>.

OBERLI, A.; ZURBRÜGG, L.; RUSCH, S.; BRAND, F.; BUTLER, M. E.; DAY, J. L.; CUTTS, E. E.; LAVSTSEN, T.; VAKONAKIS, I.; BECK, H.-P. Plasmodium falciparum Plasmodium helical interspersed subtelomeric proteins contribute to cytoadherence and anchor P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 to the host cell cytoskeleton. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 1415–1428, out. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12583>>.

ONG, P. K.; MELCHIOR, B.; MARTINS, Y. C.; HOFER, A.; ORJUELA-SÁNCHEZ, P.; CABRALES, P.; ZANINI, G. M.; FRANGOS, J. A.; CARVALHO, L. J. M. Nitric Oxide Synthase Dysfunction Contributes to Impaired Cerebroarteriolar Reactivity in Experimental Cerebral Malaria. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003444, 20 jun. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003444>>.

OREGAN, N.; GEGENBAUER, K.; OSULLIVAN, J. M.; MALEKI, S.; BROPHY, T. M.; DALTON, N.; CHION, A.; FALLON, P. G.; GRAU, G. E.; BUDDE, U.; SMITH, O. P.; CRAIG, A. G.; PRESTON, R. J. S.; O'DONNELL, J. S. A novel role for von Willebrand factor in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Blood**, v. 127, n. 9, p. 1192–1201, 3 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2015-07-654921>>.

ORTOLAN, L.; SERCUNDES, M.; DEBONE, D.; BARBOZA, R.; MURILLO, O.; HAGEN, S.; RUSSO, M.; LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M.; AMAKU, M.; MARINHO, C.; EPIPHANIO, S. Predictive Criteria To Study the Pathogenesis of Malaria-1 Associated Ali/Ards in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–30, 2014.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS signaling and redox biology in endothelial cells. **Cellular**

**and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 17, p. 3281–3303, set. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-015-1928-9>>.

PASQUIER, E.; TUSET, M.-P.; SINNAPPAN, S.; CARNELL, M.; MACMILLAN, A.; KAVALLARIS, M.  $\gamma$ -Actin plays a key role in endothelial cell motility and neovessel maintenance. **Vascular Cell**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2015. Disponível em: <<http://www.vascularcell.com/content/7/1/2>>.

PATEL, S. N.; BERGHOUT, J.; LOVEGROVE, F. E.; AYI, K.; CONROY, A.; SERGHIDES, L.; MIN-OO, G.; GOWDA, D. C.; SARMA, J. V.; RITTIRSCH, D.; WARD, P. A.; LILES, W. C.; GROS, P.; KAIN, K. C. C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 5, p. 1133–1143, 12 maio 2008. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20072248>>.

PERCÁRIO, S.; MOREIRA, D.; GOMES, B.; FERREIRA, M.; GONÇALVES, A.; LAURINDO, P.; VILHENA, T.; DOLABELA, M.; GREEN, M. Oxidative Stress in Malaria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 16346–16372, 3 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/13/12/16346/>>.

PEREIRA, M. L. M.; ORTOLAN, L. S.; SERCUNDES, M. K.; DEBONE, D.; MURILLO, O.; LIMA, F. A.; MARINHO, C. R. F.; EPIPHANIO, S. Association of Heme Oxygenase 1 with Lung Protection in Malaria-Associated ALI/ARDS. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/4158698/>>.

PETRACHE, I.; VERIN, a D.; CROW, M. T.; BIRUKOVA, a; LIU, F.; GARCIA, J. G. Differential effect of MLC kinase in TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis and barrier dysfunction. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 280, n. 6, p. L1168–L1178, 2001.

POPOW, A.; NOWAK, D.; MALICKA-BŁASZKIEWICZ, M. Actin cytoskeleton and  $\beta$ -actin expression in correlation with higher invasiveness of selected hepatoma Morris 5123 cells. In: *Journal of Physiology and Pharmacology*, SUPPL. 7. **Anais**. 2006.

POUELLE, B.; BUFFET, P. A.; LÉPOLARD, C.; SCHERF, A.; GYSIN, J. Cytoadhesion of Plasmodium falciparum ring-stage-infected erythrocytes. **Nature medicine**, v. 6, n. 11, p. 1264–8, nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11062539>>.

PRASAIN, N.; STEVENS, T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. v. 77, n. 1, p. 53–63, 2009.

PUNSAWAD, C.; VIRIYAVEJAKUL, P.; SETTHAPRAMOTE, C.; PALIPOCH, S. Enhanced

expression of Fas and FasL modulates apoptosis in the lungs of severe *P. falciparum* malaria patients with pulmonary edema. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 9, p. 10002–13, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617708>>.

QUADROS GOMES, B.; DA SILVA, L.; QUADROS GOMES, A.; MOREIRA, D.; DOLABELA, M.; SANTOS, R.; GREEN, M.; CARVALHO, E.; PERCÁRIO, S. N-acetyl cysteine and mushroom *Agaricus sylvaticus* supplementation decreased parasitaemia and pulmonary oxidative stress in a mice model of malaria. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 202, 2015. Disponível em: <<http://www.malariajournal.com/content/14/1/202>>.

RAHMAN, Q.; ABIDI, P.; AFAQ, F.; SCHIFFMANN, D.; MOSSMAN, B. T.; KAMP, D. W.; ATHAR, M. Glutathione Redox System in Oxidative Lung Injury. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, n. 6, p. 543–568, 29 jan. 1999.

RAMCHANDRAN, R.; MEHTA, D.; VOGEL, S. M.; MIRZA, M. K.; KOUKLIS, P.; MALIK, A. B. Critical role of Cdc42 in mediating endothelial barrier protection in vivo. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 295, n. 2, p. L363–L369, 2008.

REIS, P. A.; COMIM, C. M.; HERMANI, F.; SILVA, B.; BARICHELLO, T.; PORTELLA, A. C.; GOMES, F. C. A.; SAB, I. M.; FRUTUOSO, V. S.; OLIVEIRA, M. F.; BOZZA, P. T.; BOZZA, F. A.; DAL-PIZZOL, F.; ZIMMERMAN, G. A.; QUEVEDO, J.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Cognitive Dysfunction Is Sustained after Rescue Therapy in Experimental Cerebral Malaria, and Is Reduced by Additive Antioxidant Therapy. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000963, 24 jun. 2010. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000963>>.

RIDLEY, A. J. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. **Journal of Microscopy**, v. 251, n. 3, p. 242–249, set. 2013.

RISS TL, MORAVEC RA, NILES AL, et al. **Cell viability assays**. 2015

RODRIGUEZ, P. L.; SAHAY, S.; OLABISI, O. O.; WHITEHEAD, I. P. ROCK I-mediated activation of NF- $\kappa$ B by RhoB. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 11, p. 2361–2369, 2007.

SAWANT, D. a.; WILSON, R. L.; THARAKAN, B.; STAGG, H. W.; HUNTER, F. a.; CHILDS, E. W. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced microvascular endothelial cell hyperpermeability: role of intrinsic apoptotic signaling. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 971–980, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13105-014-0366-8>>.

SCHMIDT, T. T.; TAUSEEF, M.; YUE, L.; BONINI, M. G.; GOTHERT, J.; SHEN, T.-L.; GUAN, J.-L.; PREDESCU, S.; SADIKOT, R.; MEHTA, D. Conditional deletion of FAK in mice endothelium

disrupts lung vascular barrier function due to destabilization of RhoA and Rac1 activities. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 4, p. L291–L300, 15 ago. 2013. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00094.2013>>.

SERCUNDES, M. K.; ORTOLAN, L. S.; DEBONE, D.; SOEIRO-PEREIRA, P. V.; GOMES, E.; AITKEN, E. H.; NETO, A. C.; RUSSO, M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M.; PORTUGAL, S.; MARINHO, C. R. F.; EIPHANIO, S. Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. e1006054, 7 dez. 2016.

SHAKHOV, a. S.; VERIN, a. D.; ALIEVA, I. B. Reorganization of endothelial cells cytoskeleton during formation of functional monolayer in vitro. **Cell and Tissue Biology**, v. 8, n. 2, p. 138–151, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1990519X14020096>>.

SHEN, Q.; RIGOR, R. R.; PIVETTI, C. D.; WU, M. H.; YUAN, S. Y. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 2, p. 272–280, 15 jul. 2010. Disponível em: <<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/cvr/cvq144>>.

SIDIBÉ, A.; IMHOF, B. A. VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis. **Nature Immunology**, v. 15, n. 3, p. 215–217, 18 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.2825>>.

SMITH, J. D.; ROWE, J. A.; HIGGINS, M. K.; LAVSTSEN, T. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum -infected erythrocytes. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 1976–1983, dez. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12183>>.

SOUZA, M. C.; SILVA, J. D.; PÁDUA, T. A.; CAPELOZZI, V. L.; ROCCO, P. R. M.; HENRIQUES, M. das G. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 186, n. 1, p. 65–72, mar. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569904812003850>>.

SPINDLER, V.; SCHLEGEL, N.; WASCHKE, J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. **Cardiovascular Research**, v. 87, n. 2, p. 243–253, 2010.

STAN RADU V. Anatomy of the Pulmonary Endothelium. In: **The Pulmonary Endothelium**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 25–32. 2009.

STOLPEN, A. H.; GUINAN, E. C.; FIERS, W.; POBER, J. S. Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. **The American journal of pathology**, v. 123, n. 1, p. 16–24, 1986.

SUKRITI, S.; TAUSEEF, M.; YAZBECK, P.; MEHTA, D. Mechanisms regulating endothelial permeability. **Pulmonary Circulation**, v. 4, n. 4, p. 535–551, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/677356>>.

TAOUFIQ, Z.; GAY, F.; BALVANYOS, J.; CICERON, L.; TEFIT, M.; LECHAT, P.; MAZIER, D. Rho kinase inhibition in severe malaria: thwarting parasite-induced collateral damage to endothelia. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 7, p. 1062–1073, 2008.

TAOUFIQ, Z.; PINO, P.; N'DILIMABAKA, N.; ARROUSS, I.; ASSI, S.; SOUBRIER, F.; REBOLLO, A.; MAZIER, D. Atorvastatin prevents Plasmodium falciparum cytoadherence and endothelial damage. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 52, 2011. Disponível em: <<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-52>>.

TAYLOR, W. R. J.; HANSON, J.; TURNER, G. D. H.; WHITE, N. J.; DONDORP, A. M. Respiratory Manifestations of Malaria. **Chest**, v. 142, n. 2, p. 492–505, ago. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369212604644>>.

THOMAS, S. R.; WITTING, P. K.; DRUMMOND, G. R. Redox Control of Endothelial Function and Dysfunction: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 10, p. 1713–1766, out. 2008. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2008.2027>>.

TIAN, X.; TIAN, Y.; MOLDOBAEVA, N.; SARICH, N.; BIRUKOVA, A. a. Microtubule Dynamics Control HGF-Induced Lung Endothelial Barrier Enhancement. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e105912, 2014.

TREEPRASERTSUK, S.; KRUDSOOD, S.; TOSUKHOWONG, T.; MAEK-A-NANTAWAT, W.; VANNAPHAN, S.; SAENGNESWANG, T.; LOOAREESUWAN, S.; KUHN, W. F.; BRITTENHAM, G.; CARROLL, J. N-acetylcysteine in severe falciparum malaria in Thailand. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 34, n. 1, p. 37–42, mar. 2003.

UNGER, R. E.; KRUMP-KONVALINKOVA, V.; PETERS, K.; KIRKPATRICK, C. J. In Vitro Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R. **Microvascular Research**, v. 64, n. 3, p. 384–397, nov. 2002.

USATYUK, P. V.; VEPA, S.; WATKINS, T.; HE, D.; PARINANDI, N. L.; NATARAJAN, V. Redox Regulation of Reactive Oxygen Species-Induced p38 MAP Kinase Activation and Barrier

Dysfunction in Lung Microvascular Endothelial Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 6, p. 723–730, dez. 2003.

VAN DEN STEEN, P. E.; DEROST, K.; DECKERS, J.; VAN HERCK, E.; STRUYF, S.; OPDENAKKER, G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 346–358, jul. 2013.

VAN DEN STEEN, P. E.; GEURTS, N.; DEROST, K.; VAN AELST, I.; VERHENNE, S.; HEREMANS, H.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 9, p. 957–968, 2010.

VAN DOOREN, G. G.; MARTI, M.; TONKIN, C. J.; STIMMLER, L. M.; COWMAN, A. F.; MCFADDEN, G. I. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of Plasmodium falciparum. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 405–419, jul. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2005.04699.x>>.

VAN NIEUW AMERONGEN, G. P. Involvement of RhoA/Rho Kinase Signaling in VEGF-Induced Endothelial Cell Migration and Angiogenesis In Vitro. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 2, p. 211–217, 1 fev. 2003. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000054198.68894.88>>.

VAN ZANDWIJK, N. N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. **Journal of cellular biochemistry. Supplement**, v. 22, p. 24–32, 1995.

VANDENBROUCKE, E.; MEHTA, D.; MINSHALL, R.; MALIK, A. B. Regulation of Endothelial Junctional Permeability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1123, n. 1, p. 134–145, 19 mar. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1420.016>>.

VESTWEBER, D. VE-Cadherin: The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 2, p. 223–232, 15 nov. 2007.

VILLEGAS-MENDEZ, A.; GREIG, R.; SHAW, T. N.; DE SOUZA, J. B.; GWYER FINDLAY, E.; STUMHOFER, J. S.; HAFALLA, J. C. R.; BLOUNT, D. G.; HUNTER, C. A.; RILEY, E. M.; COUPER, K. N. IFN- $\gamma$ -Producing CD4<sup>+</sup> T Cells Promote Experimental Cerebral Malaria by Modulating CD8<sup>+</sup> T Cell Accumulation within the Brain. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 968–979, 15 jul. 2012.

VOYTA, J. C. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. **The Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 6, p. 2034–2040, 1 dez. 1984. Disponível em: <<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.99.6.2034>>.

WANG, J.; PELLING, A. E. An Approach to Visualize the Deformation of the Intermediate Filament Cytoskeleton in Response to Locally Applied Forces. **ISRN Cell Biology**, v. 2012, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/513546/>>.

WASSMER, S. C.; GRAU, G. E. R. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? **International Journal for Parasitology**, set. 2016.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 5, p. 843–846, 2005.

WOODRUFF, T. M.; WU, M. C.-L.; MORGAN, M.; BAIN, N. T.; JEANES, A.; LIPMAN, J.; TING, M. J.; BOYD, A. W.; TAYLOR, S. M.; COULTHARD, M. G. Epha4-Fc Treatment Reduces Ischemia/Reperfusion-Induced Intestinal Injury by Inhibiting Vascular Permeability. **SHOCK**, v. 45, n. 2, p. 184–191, fev. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 1–90, abr. 2000. Disponível em: <[http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0035-9203\(00\)90300-6](http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0035-9203(00)90300-6)>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report: 2015**. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/>>.

WU, F.; SZCZEPANIAK, W. S.; SHIVA, S.; LIU, H.; WANG, Y.; WANG, L.; WANG, Y.; KELLEY, E. E.; CHEN, A. F.; GLADWIN, M. T.; MCVERRY, B. J. Nox2-dependent glutathionylation of endothelial NOS leads to uncoupled superoxide production and endothelial barrier dysfunction in acute lung injury. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 307, n. 12, p. L987–L997, 15 dez. 2014.

YAMADA, M. Interferon- $\gamma$ : a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 5, p. L1042–L1047, 1 nov. 2004. Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00155.2004>>.

YU, J.; MA, Z.; SHETTY, S.; MA, M.; FU, J. Selective HDAC6 inhibition prevents TNF- $\alpha$ -induced lung endothelial cell barrier disruption and endotoxin-induced pulmonary edema. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 311, n. 1, p. L39–L47, 1 jul. 2016.



ZANG-EDOU, E. S.; BISVIGOU, U.; TAOUFIQ, Z.; LÉKOULOU, F.; LÉKANA-DOUKI, J. B.; TRAORÉ, Y.; MAZIER, D.; TOURÉ-NDOUO, F. S. Inhibition of Plasmodium falciparum Field Isolates-Mediated Endothelial Cell Apoptosis by Fasudil: Therapeutic Implications for Severe Malaria. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13221, 7 out. 2010. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0013221>>.

ZANINI, G. M.; MARTINS, Y. C.; CABRALES, P.; FRANGOS, J. A.; CARVALHO, L. J. M. S-nitrosoglutathione Prevents Experimental Cerebral Malaria. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 477–487, jun. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11481-012-9343-6>>.

ZHANG, J.; WANG, W.; SUN, J.; LI, Q.; LIU, J.; ZHU, H.; CHEN, T.; WANG, H.; YU, S.; SUN, G.; CHEN, W.; YI, D. Gap Junction Channel Modulates Pulmonary Vascular Permeability through Calcium in Acute Lung Injury: An Experimental Study. **Respiration**, v. 80, n. 3, p. 236–245, 2010. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000274384>>.