MARCELO LUÍS MONTEIRO PEREIRA

O PAPEL DA HEME OXIGENASE 1 NA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO ASSOCIADA À MALÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Epiphanio

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho

Versão corrigida. Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Bibiblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

RESUMO

PEREIRA, M. L. M. **O papel da heme oxigenase 1 na síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária.** 2016. 144 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A malária é uma doença grave causada pelo parasita do gênero *Plasmodium* e que foi responsável por cerca de 440.000 mortes em 2015. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma das principais complicações clínicas da malária. O modelo murino DBA/2 reproduz os sinais clínicos da SDRA observados em humanos, quando infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA. Foi demonstrado que a enzima heme oxigenase 1 (HO-1) previne o desenvolvimento da malária grave em camundongos. Além disso, altos níveis de HO-1 foram observados em casos de malária cerebral e em SDRA em humanos. Os nossos dados indicam que a expressão de mRNA da HO-1, bem como os seus níveis proteicos estão aumentados em camundongos que desenvolvem SDRA associada à malária (SDRA-AM). Adicionalmente, a droga indutora de HO-1 (hemina) preveniu o óbito por SDRA-AM, quando administrada antes do início do desenvolvimento da SDRA-AM. Verificou-se também uma redução na permeabilidade vascular pulmonar e nos níveis de VEGF, ambos sinais da SDRA-AM e uma melhoria dos parâmetros respiratórios em animais tratados com hemina. Assim sendo, a indução da HO-1 parece ser protetora e a sua expressão aumentada aquando do desenvolvimento da SDRA-AM pode representar um esforço por parte do hospedeiro em reverter o fenótipo desta síndrome. Sendo que a HO-1 tem um papel protetor na SDRA-AM em modelo murino, esta enzima poderá ser um alvo de novos fármacos, como forma de prevenir o desenvolvimento da SDRA-AM em humanos.

Palavras-chave: Heme-oxigenase-1. Malária. Síndrome do desconforto respiratório agudo.

ABSTRACT

PEREIRA, M. L. M. **The role of heme oxygenase 1 in malaria-associated acute respiratory distress syndrome.** 2016. 144 p. PhD thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Malaria is a serious disease, caused by the parasite of the genus Plasmodium, which was responsible to 440,000 deaths in 2015. Acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS) is one of the main clinical complications in severe malaria. The murine model DBA/2 reproduces the clinical signs of ALI/ARDS observed in humans, when infected with *Plasmodium berghei* ANKA. It was demonstrated that the enzyme heme oxygenase 1 (HO-1) prevents mice to develop severe malaria. Also, high levels of HO-1 were reported in cases of cerebral malaria and in ALI/ARDS in humans. Our data have indicated that the HO-1 mRNA and protein expression are increased in mice that develop malaria associated ALI/ARDS (MA-ALI/ARDS). Additionally, a HO-1 inducing drug (hemin) prevented mice from developing MA-ALI/ARDS, when administered before the beginning of the time window during which MA-ALI/ARDS usually develops in this model. Also, there is a decrease in the lung permeability and in lung VEGF levels, which are signs of ALI/ARDS, and an amelioration of respiratory parameters in the animals treated with hemin. Therefore, the induction of HO-1 seems to be protective and their increased expression on the onset of MA-ALI/ARDS development may represent an effort to revert the phenotype of this syndrome by the host. Being HO-1 protective against MA-ALI/ARDS in murine models, this enzyme could be a target of new drugs to prevent the development of MA-ALI/ARDS in humans.

Keywords: Heme Oxygenase-1. Malaria. Acute lung injury / acute respiratory distress syndrome.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e distribuição geográfica da malária

A malária é uma doença grave causada pelo parasita *Plasmodium* e transmitida pela picada do mosquito *Anopheles.* Estimou-se que em 2015 ocorreram cerca de 214 milhões de casos de malária, sendo que esta doença vitimou, no mesmo ano, cerca de 440 mil pessoas, a maioria das quais crianças com menos de 5 anos de idade, originárias da África subsaariana (67%). Dos cerca de 3,3 bilhões de pessoas em risco de contrair malária em 2014, 1,1 bilhões viviam em zonas de alto risco (mais do que um caso de malária reportado por cada 1000 habitantes), situadas majoritariamente na África e no sudeste Asiático **(Figura 1)** (WHO, 2014, 2015). As principais espécies causadoras de malária em humanos são *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. As duas primeiras são causadoras do maior número de casos da doença. No Brasil foram registrados cerca de 140 mil casos de malária em 2014, sendo a maioria proveniente da Amazônia Legal e causada pelas espécies *P. falciparum* (17%) e *P. vivax* (83%) (WHO, 2015) **(Figura 2)**.

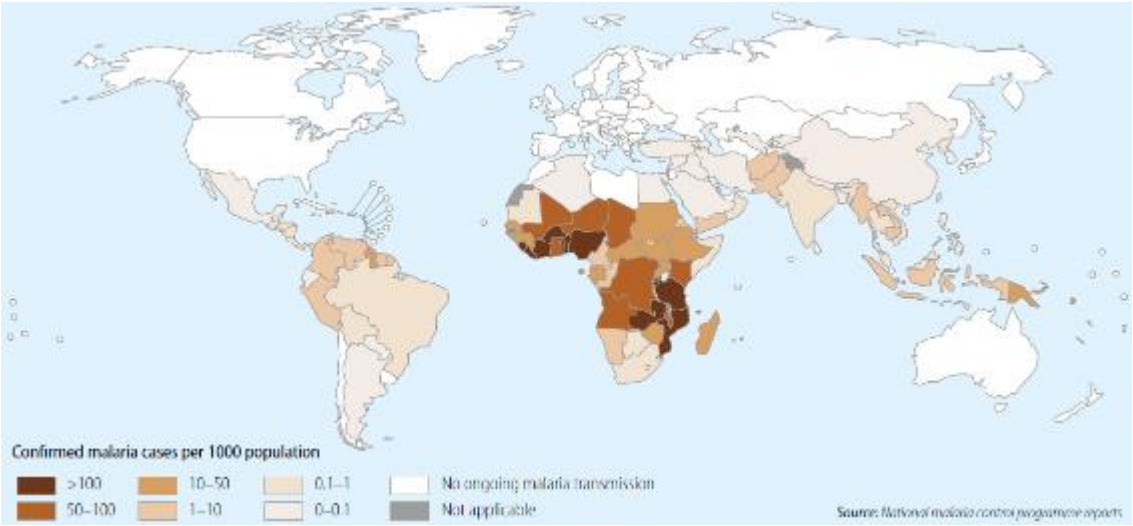

Figura 1- Países onde ocorreu a transmissão de malária em 2013 (WHO, 2014)**.**

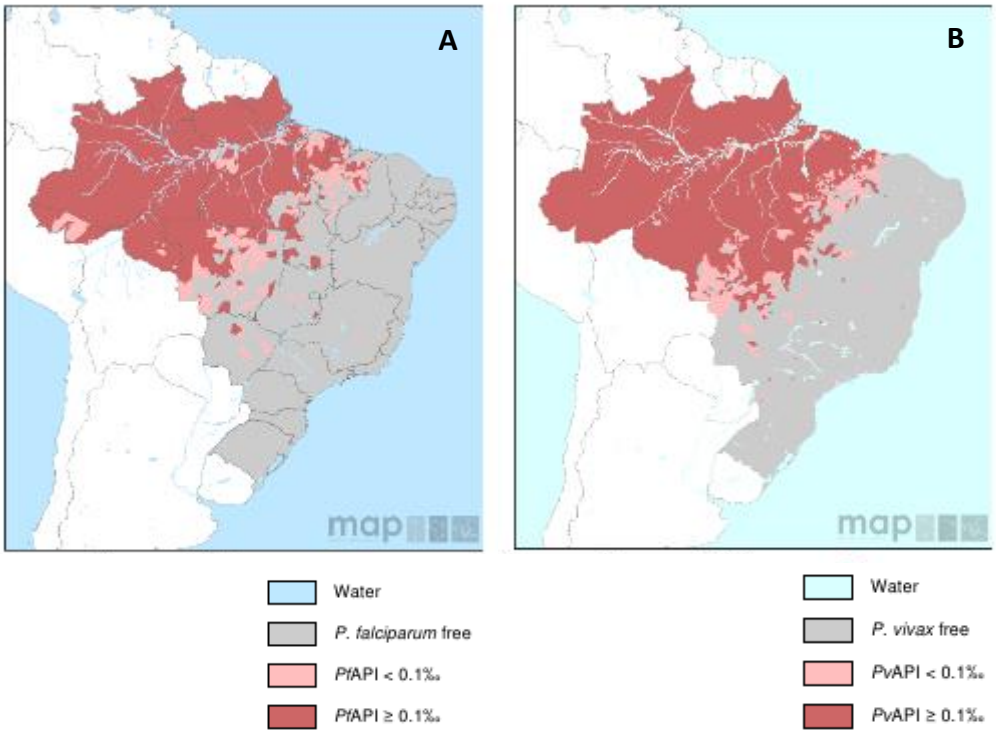

Figura 2 - Limites espaciais da transmissão de malária causada por *P. falciparum* (A) e *P. vivax* (B) no Brasil em 2010 ("Malaria Atlas Project", 2010).

1.2 O ciclo de Vida e a Doença

O ciclo de vida do *Plasmodium* começa quando um mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, possuindo esporozoítos em suas glândulas salivares pica o hospedeiro vertebrado e injeta saliva infectada para a circulação sanguínea. Uma vez no sistema circulatório os esporozoítos alcançam o fígado, onde estabelecem uma infecção primária assintomática intracelular em hepatócitos. Nos 7 a 30 dias seguintes, período entre a infecção e o aparecimento dos primeiros sintomas (7 a 15 dias para *P. falciparum* e *P. vivax* e até 30 dias para *P. malariae*), o parasita diferencia-se em milhares de merozoítos, que são liberados nos sinusóides hepáticos no interior de merossomos (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012; PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006). Os merossomos, por sua vez acumulam-se no pulmão e liberam os merozoítos na microvasculatura pulmonar (BAER *et al.*, 2007). No sangue, estes merozoítos vão, por sua vez, infectar os eritrócitos, iniciando a fase sintomática da doença. O parasita desenvolve-se no interior dos eritrócitos passando por várias fases de desenvolvimento como, anel e trofozoíto, culminando na divisão por esquizogonia com consequente ruptura dos eritrócitos e liberação de merozoítos que, por sua vez irão infectar novos eritrócitos. Além de merozoítos, o desenvolvimento intraeritrocítico pode culminar em

gametócitos (feminino e masculino). Se os gametócitos forem transmitidos a um mosquito que pique um hospedeiro infectado, a fertilização vai ocorrer no seu tubo digestivo, dando origem a um zigoto, que por sua vez se desenvolve em oocisto e em esporozoítos que vão invadir as glândulas salivares do mosquito, tornando-o passível de infectar um novo hospedeiro **(Figura 3)** (GREENWOOD *et al.*, 2008).

A malária é caracterizada por sinais e sintomas como anemia grave, febre, vômitos e fadiga. Durante a fase sintomática da doença podem ocorrer diversas complicações clínicas que no conjunto se definem como malária grave. A malária grave tem sido descrita como uma síndrome complexa que pode afetar vários órgãos e que é, em vários aspectos, semelhante à sepse. Isto torna a malária grave difícil de diagnosticar numa fase inicial, pois pode ser confundida com outras doenças febris, como a pneumonia, a sepse e as infecções do sistema nervoso central. As principais complicações clínicas que caracterizam a malária grave são a anemia aguda, a malária cerebral, a malária placentária, distúrbios renais e hepáticos e a síndrome do desconforto respiratória agudo (SDRA) (CURTIS; FINN; POLLARD, 2013).

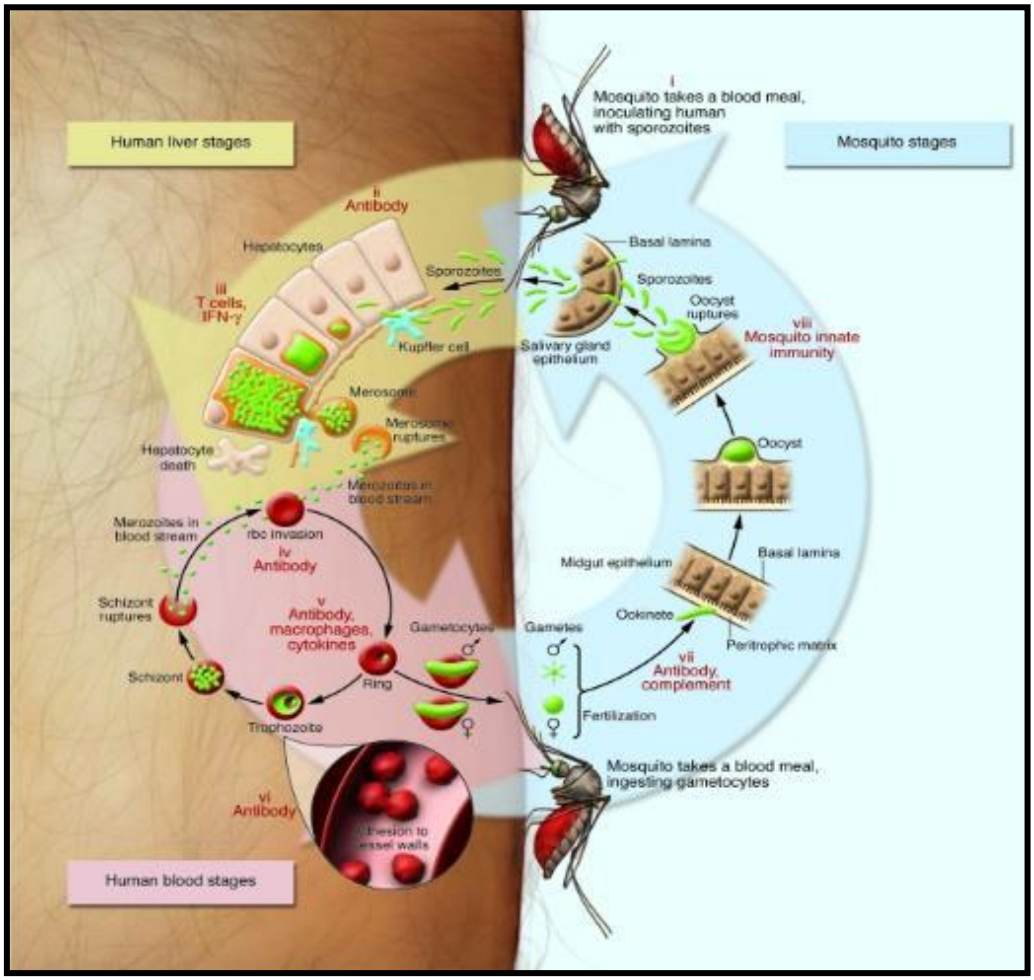

Figura 3 - Ciclo de vida do *Plasmodium* (GREENWOOD *et al.*, 2008).

1.3 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA)

A primeira descrição de SDRA foi feita em 1967 como uma síndrome que apresentava sinais de dispneia grave, taquipneia, hipoxemia, perda de complacência pulmonar e presença de infiltrado alveolar difuso, detectado por raio X torácico (ASHBAUGH *et al.*, 1967). De acordo com a definição de Berlim de 2012, a SDRA em humanos define-se em três subcategorias, dependendo do grau de hipoxemia: benigna (200 mm Hg $<PaO_2/FIO_2 \leq 300$ mmHg), moderada (100 mmHg $<PaO_2/FIO_2 \leq 200$ mmHg) e grave ($PaO_2/FIO_2 \leq 100$ mmHg). Desta forma o termo lesão pulmonar aguda (LPA) usado para designar uma forma menos grave da doença, foi abandonado, sendo unicamente usado o termo SDRA. Além disso, outros critérios foram tidos em conta na definição de SDRA, tais como: opacidades bilaterais detectadas por raio X ao tórax ou por tomografia computadorizada. O início dos sinais da SDRA ocorre em até uma semana após o estímulo que levou aos sintomas, ou após a piora ou o aparecimento de novos sinais e sintomas respiratórios; o edema não pode ser cardiogênico; a pressão expiratória final positiva deve ser igual ou superior a 5 cm H_2O para a SDRA benigna e igual ou superior a 10 cm H_2O para a SDRA grave; o volume expirado por minuto corrigido deve ser maior do que 10 L/min e/ou deve existir uma baixa complacência do sistema respiratório (menor do que 40 mL/cm H_2O) (RANIERI *et al.*, 2012).

A SDRA afeta mais adultos do que crianças, possui uma elevada taxa de mortalidade e é caracterizada por dispneia, taquipneia e hipoxemia que progride rapidamente para um quadro de insuficiência respiratória aguda caracterizado por complacência pulmonar reduzida, aumento da atividade fagocitária e aumento dos níveis de mediadores inflamatórios (MONAHAN, 2013). As causas mais comuns da SDRA em humanos são as pneumonias bacterianas ou virais. Além destas, existem outras origens frequentes, como a sepse derivada de infecções não pulmonares, a aspiração de suco gástrico e o traumatismo severo. Outras causas mais raras são a pancreatite aguda, transfusões, reações adversas a fármacos e infecções fúngicas ou parasitárias do pulmão (MATTHAY; WARE; ZIMMERMAN, 2012).
Em modelos animais existe evidência de que a lesão pulmonar aguda associada à hiperoxia leva à presença de elevados níveis de espécies reativas do oxigênio, que danificam as células endoteliais e epiteliais do pulmão, incluindo os pneumócitos do tipo I (morte celular) e causam danos na membrana basal (THIEL *et al.*, 2005; ZHANG, XUCHEN *et al.*, 2003). Além disso, pensa-se que as respostas do endotélio também são importantes na proteção contra a morte induzida por hiperoxia devido ao fato de as células endoteliais constituírem mais de 30% de todas as células pulmonares (CRAPO *et al.*, 1982). Uma das mais graves

consequências da SDRA é a falha de múltiplos órgãos. Evidências clínicas recentes especificaram que estratégias protetoras do endotélio podem prevenir a falha de múltiplos órgãos (LANGOUCHE *et al.*, 2005; ZHANG, XUCHEN *et al.*, 2006).

1.4 Malária grave

A espécie *P. falciparum* é a mais virulenta, a qual predomina na África. Por outro lado, a espécie *P. vivax* é menos virulenta e está mais amplamente distribuída pelo mundo de que *P. falciparum* (WHO, 2015). Apesar disso, ambas as espécies são responsáveis por casos de malária grave (BAIRD, 2013; LACERDA *et al.*, 2012; RAHIMI *et al.*, 2014).

Os principais eventos fisiopatológicos que ocorrem durante a infecção por malária são: a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a adesão de eritrócitos parasitados (EP) às células endoteliais de capilares e vênulas, particularmente importante em *P. falciparum*, cuja proteína Pfemp1 é responsável pela ligação a receptores do hospedeiro, como o CD36 e o ICAM-1 (BARUCH *et al.*, 1996). Ademais, a remoção de eritrócitos parasitados da corrente sanguínea pelos macrófagos esplênicos e a ruptura de eritrócitos parasitados com consequente liberação de fatores que vão ativar a resposta inflamatória, como o glicosilfosfatidilinositol, a hemozoína (pigmento malárico), o DNA e precipitados de ácido úrico derivados do parasita, que ao interagirem com receptores TLR da imunidade inata, como o TLR9 (hemozoina e DNA), conduzem a uma activação da reposta inflamatória (GALLEGO-DELGADO *et al.*, 2014; GAZZINELLI *et al.*, 2014; GUPTE, 2013). Estes eventos estão associados entre si e são responsáveis pelas principais síndromes que estão associadas à malária. Os macrófagos esplênicos e os monócitos são os principais responsáveis pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (BORGES DA SILVA *et al.*, 2015). Isto deve-se ao fato de estas células estarem expostas a um elevado número de eritrócitos infectados da corrente sanguínea e por serem responsáveis pela detecção e fagocitose desses eritrócitos (DEL PORTILLO *et al.*, 2012). Apesar disso, a anemia severa, uma das formas mais comuns de malária grave, não pode ser explicada apenas pelo fenômeno de remoção de eritrócitos parasitados pelo baço. Além disso, tem sido proposto o efeito supressor da eritropoiese pelas citocinas pró-inflamatórias (GAZZINELLI *et al.*, 2014). Para além dos macrófagos e dos monócitos, as células T CD4+, as células T gama-delta e as células NK são também responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, o IFN-γ e o TNF-α, numa fase precoce da infecção por plasmódio em humanos. Dentre estas células, os monócitos CD14+ destacam-se pela produção de TNF e quimiocinas, enquanto nas células T CD4+ predomina a expressão de IL-10. O envolvimento de mediadores inflamatórios, como IL-6, MIP-1α, MIP-

1β e MCP-2 e da citocina anti-inflamatória IL-10, está associado a uma maior probabilidade de ocorrência de malária grave em humanos (STANISIC *et al.*, 2014).

A adesão de eritrócitos parasitados ao endotélio é um fenômeno importante no desenvolvimento de formas graves da malária, como a malária cerebral (IDRO *et al.*, 2010) e a malária placentária (COSTA *et al.*, 2006; UMBERS; AITKEN; ROGERSON, 2011). Em relação à SDRA associada à malária, existem ainda poucos estudos sobre a possível importância deste fenômeno, tanto *in vivo* (CORBETT *et al.*, 1989) como *in vitro* (CARVALHO *et al.*, 2010; MUANZA *et al.*, 1996). Receptores do hospedeiro, como ICAM-1 (CARVALHO *et al.*, 2010) e CD36 (BARNWELL *et al.*, 1989; BARUCH *et al.*, 1996, 1997; CHEN, Q *et al.*, 2000; OQUENDO *et al.*, 1989) estão envolvidos na adesão ao endotélio de EP leucócitos e plaquetas (KIRCHGATTER; DEL PORTILLO, 2005; SHERMAN; EDA; WINOGRAD, 2003; WASSMER; COMBES; GRAU, 2003).

A participação de diversas células do sistema imunitário e de células endoteliais em diversos órgãos no aparecimento dos primeiros sinais de malária reforça a hipótese de envolvimento de múltiplos fatores do hospedeiro para o desenvolvimento das síndromes de malária severa como a SDRA e a malária cerebral.

1.5 Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) associada à malária

Os mecanismos fundamentais da fase inicial e da propagação da SDRA não estão ainda bem definidos, no entanto, sabe-se que a entrada de fluido intravascular nos pulmões, resultante do aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos alveolares, é o mecanismo fisiopatológico chave da SDRA associada à malária (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008). Neste aumento da permeabilidade estão, possivelmente, envolvidos múltiplos fatores como a injúria do endotélio causada pela adesão de EP, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF-α, a interleucina 1 (IL-1) ou as interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8), e ainda, a obstrução endovascular associada à acumulação de eritrócitos com reduzida deformabilidade, EP e leucócitos (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008) **(Figura 4)**. Esta síndrome pode estar também associada a outros fatores como a insuficiência cardíaca ou a taquipneia associada à malária cerebral (GOOD *et al.*, 2005). Entretanto, tem sido demonstrado que a gênese da SDRA associada à malária é multifatorial e que as hipóteses de adesão ao endotélio, inflamação e hemostasia, envolvidas na patogênese da malária severa,

especialmente da malária cerebral (VAN DER HEYDE *et al.*, 2006), sejam também relevantes no desenvolvimento da SDRA associada à malária.

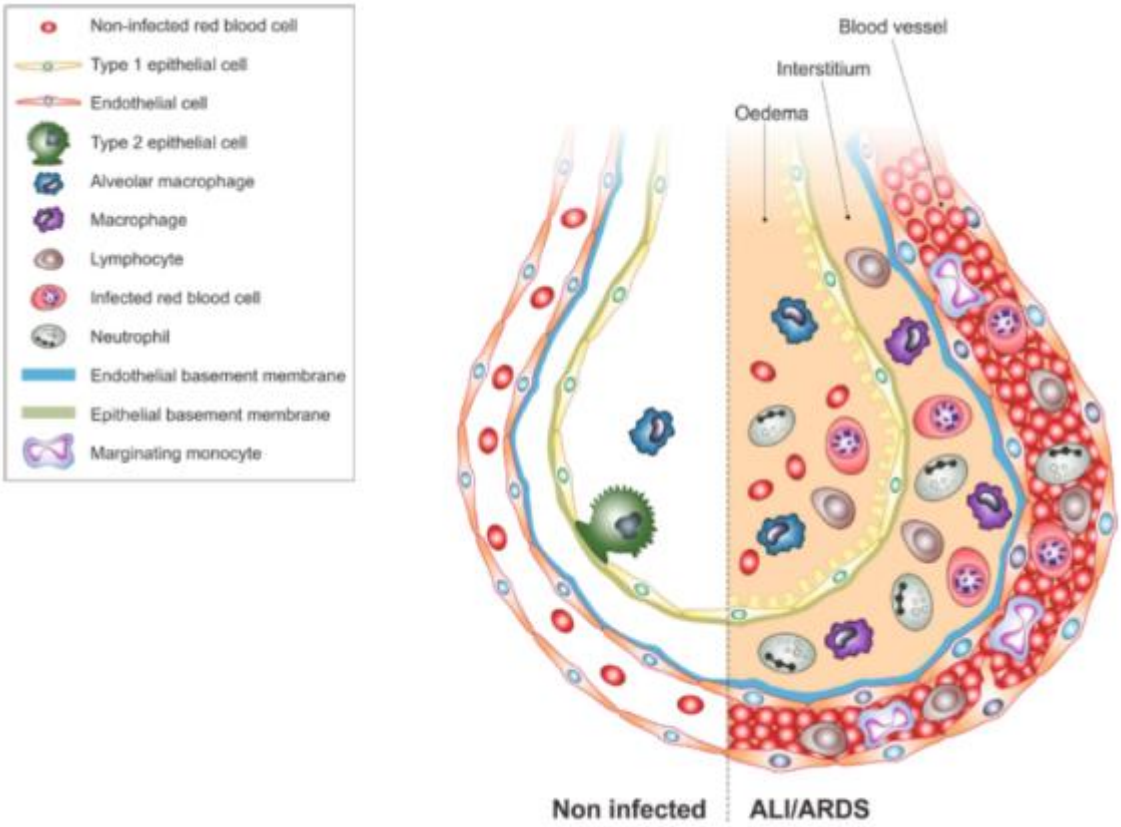

Figura 4 – Componentes celulares envolvidos na SDRA associada à malária (AITKEN *et al*., 2014).

A SDRA já foi diagnosticada em pacientes sofrendo malária causada por todas as espécies responsáveis por esta doença nos humanos, incluindo *Plasmodium knowlesi* (SINGH; DANESHVAR, 2013), no entanto, é mais comum em *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* (MOHAN; SHARMA; BOLLINENI, 2008; PRICE *et al.*, 2007).

Modelos murinos são uma importante ponte entre o paciente de uma zona endêmica e o laboratório de pesquisa. Hipóteses emergentes de estudos humanos podem ser facilmente testadas em modelos animais e fornecem valiosas informações sobre a patogenia das enfermidades. Nesse sentido, foram desenvolvidos diferentes modelos em roedores para o estudo da SDRA associada à malária, que demonstram aspectos semelhantes à SDRA humana (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; HEE *et al.*, 2011; LOVEGROVE *et al.*, 2008; VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Camundongos da linhagem DBA/2 quando infectados com o parasita *Plasmodium berghei* ANKA, desenvolvem SDRA (EPIPHANIO *et al.*, 2010a). Entre 30 e 60% dos camundongos desta linhagem que morrem entre os dias 7 e 12 após infeção apresentam dispneia, hipoxemia e redução da capacidade respiratória. Estudos *post-mortem*

revelaram que estes camundongos apresentavam efusão pleural, contendo células como neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos. Ademais, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) foi identificado como fundamental no aumento da permeabilidade vascular pulmonar, um marco da SDRA (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; PENA *et al.*, 2012). Em outro modelo, camundongos C57BL/6, quando infectados com o parasita *P. berghei* NK65 desenvolveram um quadro de malária grave caracterizado por infiltrado inflamatório e edema alveolar e intersticial no pulmão e formação de membranas hialinas, o que é típico da SDRA (VAN DEN STEEN *et al.*, 2010). Neste modelo, cerca de 90% dos camundongos infectados morrem com um quadro de malária grave típico de SDRA, sem desenvolver malária cerebral, o que o torna um modelo útil no estudo da SDRA associada à malária. Por último, demonstrou-se que a infecção de camundongos da linhagem C57BL/6 com o parasita *P. berghei* NK65 ^{GFP} levou a que estes desenvolvessem SDRA com uma incidência próxima de 100% (dados não publicados). Assim sendo, qualquer um destes três modelos aqui descritos é adequado para o estudo da SDRA associada à malária.

1.6 A heme oxigenase-1

O sistema heme oxigenase tem sido intensamente estudado devido às suas propriedades regulatórias tanto em processos fisiológicos, quanto patológicos. A HO-1 é uma enzima codificada pelo gene *hmox-1*, o qual é considerado um gene “protetor” devido a suas propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e anti-proliferativas em diferentes tipos celulares, incluindo as células endoteliais (SOARES *et al.*, 1998). Esta enzima participa na degradação do heme livre em quantidades equimolares de CO, ferro e biliverdina. A biliverdina é posteriormente reduzida a bilirrubina pela enzima biliverdina redutase (DULAK *et al.*, 2008) **(Figura 5)**.

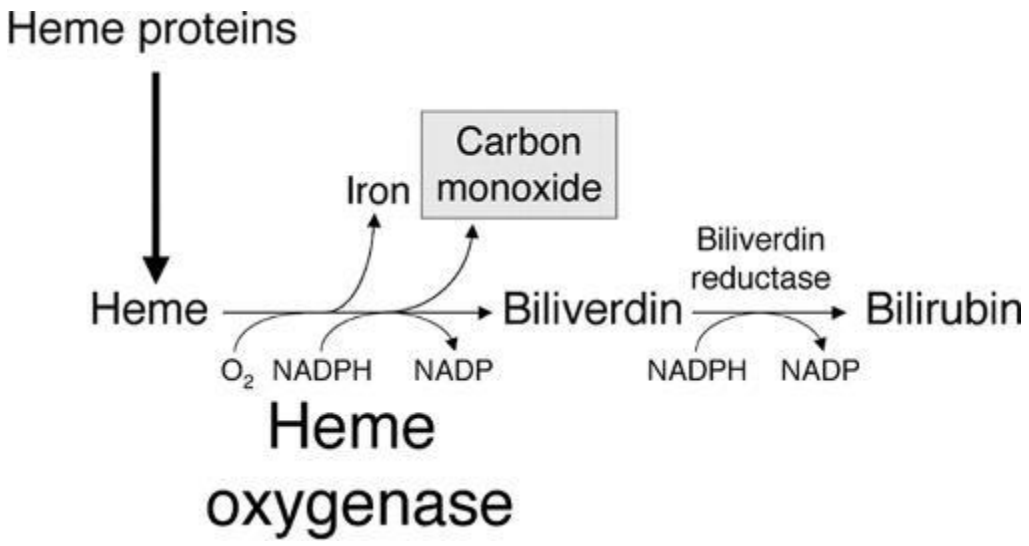

Figura 5 – **Reação enzimática da HO-1** (DULAK *et al.*, 2008).

O heme é derivado de proteínas, tais como a hemoglobina e a mioglobina. A HO-1 é expressa em todas as células em baixos níveis, mas é rapidamente induzível por estímulos variados, tais como heme livre, heme-hemopexina, radiação ultravioleta A, peróxido de hidrogênio, citocinas IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ, endotoxina, PDGF, TGF, VEGF, metais pesados, lipoproteínas oxidadas de baixa densidade, hiperoxia, óxido nítrico, doadores de óxido nítrico, dopamina e todos os estímulos que induzem uma mudança considerável no potencial redox celular (AGARWAL; BOLISETTY, 2013; HILL-KAPTURCZAK; CHANG; AGARWAL, 2002).

A heme oxigenase possui duas isoformas: HO-1, induzível e heme oxigenase-2 (HO-2), constitutiva. A atividade enzimática de ambas é idêntica. A HO-2, possivelmente, regula as funções fisiológicas normais das células, enquanto que a HO-1 é expressa em todas as células e é altamente induzível por uma variedade de estímulos (AGARWAL; BOLISETTY, 2013). Esta enzima desempenha um papel protetor na modulação da resposta tecidual à injúria em vários órgãos, incluindo o pulmão (injúria pulmonar associada à hiperoxia (ZHANG, YI *et al.*, 2013), hipertensão pulmonar (CHRISTOU *et al.*, 2000) e fibrose pulmonar (TSUBURAI *et al.*, 2002)).

Sendo assim, a HO-1 confere proteção celular através de:

- degradação do heme livre, que tem efeitos pró-oxidantes (BALLA *et al.*, 1991; TRACZ; ALAM; NATH, 2007);
- produtos da reação da HO-1 que contribuem para a resposta protetora (MOTTERLINI; OTTERBEIN, 2010; NAKAGAMI *et al.*, 1993; STOCKER *et al.*, 1987).

Em resposta ao estresse oxidativo as células alteram a sua expressão gênica de maneira a ativar genes que codificam proteínas responsáveis pela proteção contra esse estresse. O fator de transcrição Nrf2, juntamente com os seus genes alvo (envolvidos na proteção celular antioxidativa), são importantes na proteção contra espécies reativas do oxigênio (ROS), espécies reativas do nitrogênio, e dano celular. O Nrf2 está localizado no citoplasma, associado à proteína Keap1. Esta proteína é responsável pela ubiquitinação constante de Nrf2, o que leva à sua degradação no citoplasma. Em resposta ao estresse oxidativo Nrf2 é libertado de Keap1 e, posteriormente, translocado para o núcleo. No núcleo, Nrf2 forma um hetero-dímero com a proteína Maf e liga-se a elementos relacionados com antioxidantes (AREs) na região promotora de determinados genes citoprotetores, entre os quais hmox1, que codifica a proteína HO-1 (JOO CHOI; CHENG; SHIK KIM, 2014). Um composto denominado "desoxyrhapontigenin" diminuiu a produção de ROS e de peroxinitrito e induziu a HO-1 através da ativação por Nrf2 e da inibição por Keap 1. Este fármaco levou ainda a uma melhoria da inflamação pulmonar induzida por LPS (*lipopolysaccharide*) em camundongos ICR (*Inprinting Control Region*) (JOO CHOI; CHENG; SHIK KIM, 2014).

As ferramentas disponíveis para o estudo da HO-1 em diferentes doenças, são as drogas indutoras (hemina, cobalto protoporfirina IX) e inibidores químicos, como zinco protoporfirina IX. O gene da HO-1 pode ser deletado, constituindo camundongos HO-1 deficientes (HO-1 knockout). No entanto, os ensaios valendo-se de camundongos HO-1-KO apresentam os seguintes problemas: letalidade parcial da deleção de HO-1 para o desenvolvimento pré-natal; a deposição de ferro nos tecidos pode afetar os resultados dos experimentos. Porém, os inibidores químicos da HO-1 têm a desvantagem de serem inespecíficos. Num esforço de contornar estes problemas, verificou-se que a inibição específica da HO-1 pulmonar através de RNA de interferência (siRNA) permitiu estudar o efeito do silenciamento da HO-1 pós-natal em células específicas (SINER *et al.*, 2007; ZHANG, XUCHEN *et al.*, 2004; ZHANG, YI *et al.*, 2013).

1.7 O papel da heme oxigenase-1 na SDRA

Em ratos, a indução da expressão da HO-1 levou à redução da injúria pulmonar resultante da presença de LPS bacteriano no sangue (OTTERBEIN; SYLVESTER; CHOI, 1995). Também foi demonstrado que a inibição da HO-1 levou a um agravamento dos sinais

de SDRA em ratos após isquemia-reperfusão (I/R) dos membros inferiores (BOUTROS *et al.*, 2005).

Em modelos murinos, demonstrou-se que a hemina, um indutor da HO-1, inibiu o recrutamento de células inflamatórias e reduziu a ativação do inflamassoma NLRP3 na injúria pulmonar aguda induzida pela sepse (LUO *et al.*, 2014). O inflamassoma NLRP3 regula a maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18. O complexo é formado pelas proteínas NLRP3, ASC e caspase-1. Devido a um estímulo endógeno ou exógeno, o inflamassoma forma-se através da ativação da proteína NLRP3 e recrutamento de ASC e da pró-caspase-1. Isto resulta na ativação da caspase-1 e subsequente processamento das citocinas pró-IL-1β e pró-IL-18 nas suas formas ativas (ANAND; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2011; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). O inflamassoma NLRP3 pode ser ativado por vários fatores estimulantes tais como, bactérias, vírus, fungos e componentes resultantes da morte celular (ANAND; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2011). A ativação desregulada de NLRP3 está presente na SDRA associada à aspiração de LPS e as citocinas associadas ao inflamassoma, pertencentes à família de citocinas IL-1, são responsáveis pela propagação da resposta inflamatória (GRAILER *et al.*, 2014). Não menos importante, os níveis de marcadores de estresse oxidativo no tecido pulmonar, reduziram em animais com sepse tratados com hemina (LUO *et al.*, 2014).

Por fim, o *knockdown* da HO-1 pulmonar levou a um agravamento da injúria pulmonar resultante de hiperoxia, com consequente aumento da apoptose das células endoteliais pulmonares, aumento dos níveis de ROS e de proteína no lavado broncoalveolar e aumento dos níveis das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α (ZHANG, YI *et al.*, 2013). Este estudo permitiu assim determinar o papel da HO-1 no pulmão, em casos de hiperoxia, sendo possível determinar qual a contribuição da HO-1 para a patogênese desta doença em diferentes células do pulmão. No entanto, estudos como este são dispendiosos e complexos pelo que, geralmente se opta pela utilização de camundongos HO-1 *knockout* ou de inibidores químicos, como o ZnPPIX, para o estudo da HO-1.

1.8 O papel da heme oxigenase-1 na malária

Diversos estudos sustentam a hipótese de que na malária grave, a enzima HO-1 e o CO têm um papel protetor (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; PAMPLONA *et al.*, 2007; PENA *et al.*, 2012). Entretanto, níveis elevados de HO-1 nos leucócitos do sangue periférico e no plasma

foram associados à malária grave em crianças gambianas (WALTHER *et al.*, 2012). Adicionalmente a HO-1 foi também detectada em elevados níveis nos monócitos e macrófagos residentes do cérebro, pulmão e fígado de humanos com malária grave (CLARK *et al.*, 2003). Tal como em casos de hiperoxia, endotoxemia e I/R, a infeção por malária leva à liberação de espécies reativas de oxigênio e heme livre, prejudiciais para as células endoteliais do hospedeiro. Quando expostas ao heme livre, as células do hospedeiro aumentam a expressão da HO-1 (FERREIRA *et al.*, 2008).

Em camundongos da linhagem C57BL/6, tanto a indução da HO-1 com cobalto protoporfirina IX (CoPPIX), como o tratamento com monóxido de carbono (CO) suprimiram a patogênese da malária cerebral experimental, prevenindo a ruptura da barreira hematoencefálica, bem como reduzindo a neuroinflamação (PAMPLONA *et al.*, 2007). No entanto, a inibição química da HO-1 com a ZnPPIX não teve efeito na patogênese em camundongos C57BL/6. Apesar disso, neste estudo, foram utilizados camundongos HO-1-KO, cujo *background* é a linhagem Balb/c (os quais não desenvolvem malária cerebral), e foi observado o desenvolvimento de sinais similares à malária cerebral.

Recentemente, foi demonstrado em DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA que a administração exógena de CO suprime a SDRA e que altos níveis de VEGF estão associados ao desenvolvimento desta lesão (EPIPHANIO *et al.*, 2010a). Ademais, Siner e colaboradores demonstraram que o VEGF é um potente indutor da enzima HO-1 e que a indução desta enzima reduziu a injúria pulmonar aguda causada por hiperoxia em camundongos (SINER *et al.*, 2007).

Apesar de a maior parte dos estudos da HO-1 concluírem que esta enzima tem um papel protetor no desenvolvimento de diferentes doenças, como a SDRA, o papel da HO-1 na SDRA associada à malária é pouco conhecido, por isso, o objetivo principal deste estudo foi verificar a sua importância na patogênese desta síndrome em camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA.

1.9 Aumento da permeabilidade vascular pulmonar na SDRA: o papel do VEGF

O aumento da permeabilidade vascular pulmonar é um fator chave na gênese da SDRA. Este aumento de permeabilidade já foi verificado em casos de SDRA associada à sepse e de pneumonia em humanos, com consequente incapacidade de remoção do fluido

alveolar por parte do epitélio alveolar (CONSTANTIN *et al.*, 2007; HOLTER *et al.*, 1986; JABAUDON *et al.*, 2016). Em modelos murinos verificou-se que a permeabilidade vascular pulmonar está presente na ARDS induzida por LPS (KONRAD *et al.*, 2016; MENG *et al.*, 2015).

A remoção do fluido alveolar dos alvéolos pulmonares para o espaço intersticial é realizada pela atividade das bombas de sódio-potássio e pela ATPase nas células epiteliais alveolares. Durante a SDRA não só o epitélio alveolar é afetado mas também o endotélio, com a formação de espaços entre as junções das células endoteliais (GONZALES; LUCAS; VERIN, 2015). Estes espaços são formados devido a um remodelamento do citoesqueleto das células endoteliais, induzido por fatores como o VEGF (SUKRITI *et al.*, 2014). O entendimento dos mecanismos envolvendo o VEGF endotelial *in vivo* pode ter implicações terapêuticas importantes.

Apesar de amplamente distribuído em muitos órgãos, o VEGF está presente nos pulmões em elevados níveis, no entanto a sua função não é ainda bem compreendida (MEDFORD *et al.*, 2009; NG *et al.*, 2001). VEGF é uma família de glicoproteínas dimórficas que se inclui na superfamília de PDGF. Apesar de ser apenas um entre muitos fatores de crescimento, o VEGF é necessário para uma vasculogênese bem-sucedida, bem como para a manutenção da permeabilidade vascular e possui propriedades mitogênicas e de sobrevivência das células endoteliais envolvidas na angiogênese (DRAKE *et al.*, 2000; GERBER; DIXIT; FERRARA, 1998). Em culturas de células endoteliais o VEGF previne a apoptose, possivelmente através da indução de proteínas anti-apoptóticas tais como aquelas pertencentes à família Bcl-2, que estabilizam as membranas mitocondriais (GERBER; DIXIT; FERRARA, 1998). Adicionalmente mostrou-se que, num modelo *in vivo*, a proteína IL-13 tem um papel protetor durante a hiperoxia e que a proteção é em grande parte devido à sua habilidade para induzir a expressão de VEGF no parênquima pulmonar, vasos sanguíneos, vias respiratórias e macrófagos alveolares (CORNE *et al.*, 2000). Além disso, mostrou-se que, camundongos transgênicos que sobre expressam o VEGF estão protegidos da SDRA associada à hiperoxia, em parte através da indução da proteína anti-apoptótica A1, da família Bcl (HE *et al.*, 2005; WAXMAN *et al.*, 1998). No entanto, em outros estudos, como o do modelo de SDRA associada à malária, o VEGF tem um papel deletério (EPIPHANIO *et al.*, 2010b). Sendo assim o papel do VEGF na proteção contra a lesão pulmonar parece ser controverso e depende do modelo em estudo.

Os níveis de VEGF estão aumentados em camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; ORTOLAN *et al.*, 2014). Além disso, os níveis de permeabilidade endotelial pulmonar estão aumentados nos mesmos camundongos, que também apresentam edema alveolar e efusão pleural (EPIPHANIO *et al.*, 2010a; ORTOLAN *et al.*, 2014). Dado que a HO-1 reduziu a permeabilidade pulmonar em outros modelos de SDRA induzida por LPS (KONRAD *et al.*, 2016) e protegeu o modelo murinho C57BL/6 da malária cerebral (PAMPLONA *et al.*, 2007), o objetivo principal deste projeto foi verificar se HO-1 tem um papel protetor contra a SDRA associada à malária.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho levam-nos a concluir o seguinte:

- a expressão da HO-1 está aumentada ao 7º dia após a infeção em DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA que desenvolveram SDRA quando comparado com animais HP;
- o tratamento com hemina aumenta a expressão da HO-1 em camundongos DBA/2 não infectados;
- o tratamento com hemina alterou o quadro clínico pulmonar de DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, melhorando os parâmetros respiratórios e aumentando a sobrevida destes animais;
- o tratamento com hemina reduziu os níveis de VEGF e a permeabilidade vascular pulmonar em DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA.
- o tratamento com hemina mostrou ainda ser eficaz *ex vivo*, reduzindo a permeabilidade de células endoteliais de pulmão de camundongo DBA/2 incubadas com extrato de *P. berghei* ANKA, por diminuição das aberturas intercelulares (junções gap).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

AGARWAL, Anupam; BOLISETTY, Subhashini. Adaptive responses to tissue injury: role of heme oxygenase-1. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association** v. 124, p. 111–22 , 2013.

AITKEN, Elizabeth H *et al.* Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Malaria journal** v. 13, p. 230 , 2014.

ANAND, Paras K.; MALIREDDI, R. K Subbarao; KANNEGANTI, Thirumala Devi. Role of the Nlrp3 inflammasome in microbial infection. **Frontiers in Microbiology** v. 2, n. February, p. 1–6 , 2011.

ARAUJO, Ester C B *et al.* Heme oxygenase-1 activity is involved in the control of Toxoplasma gondii infection in the lung of BALB/c and C57BL/6 and in the small intestine of C57BL/6 mice. **Veterinary research** v. 44, p. 89 , 2013.

ASHBAUGH, D G *et al.* Acute respiratory distress in adults. **Lancet (London, England)** v. 2, n. 7511, p. 319–23 , 1967.

BAER, Kerstin *et al.* Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature. **PLoS pathogens** v. 3, n. 11, p. e171 , 2007.

BAIRD, J Kevin. Evidence and implications of mortality associated with acute Plasmodium vivax malaria. **Clinical microbiology reviews** v. 26, n. 1, p. 36–57 , 2013.

BALLA, G *et al.* Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology** v. 64, n. 5, p. 648–55 , 1991.

BARNWELL, J W *et al.* A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **The Journal of clinical investigation** v. 84, n. 3, p. 765–72 , 1989.

BARTOLONI, Alessandro; ZAMMARCHI, Lorenzo. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases** v. 4, n. 1, p. e2012026 , 2012.

BARUCH, D I *et al.* Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. **Blood** v. 90, n. 9, p. 3766–3775 , 1997

BARUCH, D I *et al.* Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 93, n. 8, p. 3497–502 , 1996.

BORGES DA SILVA, Henrique *et al.* Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. **Frontiers in immunology** v. 6, p. 480 , 2015.

BOUTROS, Cherif N *et al.* Pulmonary expression of inducible heme-oxygenase after ischemia/reperfusion of the lower extremities in rats. **The Journal of surgical research** v. 129, n. 2, p. 306–12 , 2005.

BRIELAND, J K *et al.* Effect of acute inflammatory lung injury on the expression of

[1] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat pulmonary alveolar macrophages. **American journal of respiratory cell and molecular biology** v. 7, n. 2, p. 134–9 , 1992.

CARVALHO, Bruna O *et al.* On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. **The Journal of infectious diseases** v. 202, n. 4, p. 638–47 , 2010.

CHEN, Q *et al.* The semiconserved head structure of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. **The Journal of experimental medicine** v. 192, n. 1, p. 1–10 , 2000.

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. 119–28 , 1995.

CHRISTOU, H *et al.* Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat. **Circulation research** v. 86, n. 12, p. 1224–9 , 2000.

CLARK, Ian a *et al.* Induction of HO-1 in tissue macrophages and monocytes in fatal falciparum malaria and sepsis. **Malaria journal** v. 2, p. 41 , 2003.

CONSTANTIN, Jean-Michel *et al.* Response to recruitment maneuver influences net alveolar fluid clearance in acute respiratory distress syndrome. **Anesthesiology** v. 106, n. 5, p. 944–51 , 2007.

CORBETT, C E *et al.* Cytoadherence in human falciparum malaria as a cause of respiratory distress. **The Journal of tropical medicine and hygiene** v. 92, n. 2, p. 112–20 , 1989

CORNE, J *et al.* IL-13 stimulates vascular endothelial cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury. **The Journal of clinical investigation** v. 106, n. 6, p. 783–91 , 2000.

COSTA, F. T M *et al.* Cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and the infected placenta: a two-way pathway. **Brazilian journal of medical and biological research** v. 39, n. 12, p. 1525–36 , 2006.

CRAPO, J D *et al.* Cell number and cell characteristics of the normal human lung. **The American review of respiratory disease** v. 126, n. 2, p. 332–7 , 1982.

CURTIS, Nigel; FINN, Adam; POLLARD, AJ. **Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX**. New York, NY: Springer New York, 2013. 241-250 p. 764 v.

DEL PORTILLO, Hernando A *et al.* The role of the spleen in malaria. **Cellular microbiology** v. 14, n. 3, p. 343–55 , 2012.

DRAKE, C J *et al.* VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. **Developmental biology** v. 224, n. 2, p. 178–88 , 2000.

DULAK, Jozef *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. **Circulation** v. 117, n. 2, p. 231–41 , 2008.

EPIPHANIO, Sabrina *et al.* VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. **PLoS pathogens** v. 6, n. 5, p. e1000916 , 2010.

FEI, Dongsheng *et al.* Heme oxygenase-1 modulates thrombomodulin and activated protein C levels to attenuate lung injury in cecal ligation and puncture-induced acute lung injury mice. **Experimental lung research** v. 38, n. 4, p. 173–82 , 2012.

FERREIRA, Ana *et al.* A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **Journal of molecular medicine** v. 86, n. 10, p. 1097–111 , 2008.

GALLEGO-DELGADO, Julio *et al.* A surprising role for uric acid: the inflammatory malaria

response. **Current rheumatology reports** v. 16, n. 2, p. 401 , 2014.

GAZZINELLI, Ricardo T *et al.* Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology** v. 14, n. 11, p. 744–757 , 2014.

GERBER, H P; DIXIT, V; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **The Journal of biological chemistry** v. 273, n. 21, p. 13313–6 , 1998.

GILL, Sean E; ROHAN, Marta; MEHTA, Sanjay. Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury in vivo. **Respiratory research** v. 16, p. 109 , 2015.

GOLDBLUM, S E *et al.* Tumor necrosis factor alpha-induced pulmonary vascular endothelial injury. **Infection and immunity** v. 57, n. 4, p. 1218–26 , 1989.

GONZALES, J N; LUCAS, R; VERIN, A D. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Mechanisms and Perspective Therapeutic Approaches. **Austin journal of vascular medicine** v. 2, n. 1 , 2015.

GOOD, Michael F *et al.* Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annual review of immunology** v. 23, n. Journal Article, p. 69–99 , 2005.

GRAILER, Jamison J *et al.* Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury. **Journal of immunology** v. 192, n. 12, p. 5974–83 , 2014.

GREENWOOD, Brian M *et al.* Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of clinical investigation** v. 118, n. 4, p. 1266–76 , 2008.

GUPTE, Suraj. **Recent Advances in Pediatrics - Special Volume 22 - Immunology, Infections and Immunization**. 1st. ed. New Delhi: JP Medical Ltd, 2013. 325 p.

HAMELMANN, E *et al.* Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. **American journal of respiratory and critical care medicine** v. 156, n. 3 Pt 1, p. 766–75 , 1997.

HE, Chuan Hua *et al.* Bcl-2-related protein A1 is an endogenous and cytokine-stimulated mediator of cytoprotection in hyperoxic acute lung injury. **The Journal of clinical investigation** v. 115, n. 4, p. 1039–48 , 2005.

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, 2011.

HILL-KAPTURCZAK, Nathalie; CHANG, Se-Ho; AGARWAL, Anupam. Heme oxygenase and the kidney. **DNA and cell biology** v. 21, n. 4, p. 307–21 , 2002.

HOLTER, J F *et al.* Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium. **The Journal of clinical investigation** v. 78, n. 6, p. 1513–22 , 1986.

HURLEY, J V. Types of pulmonary microvascular injury. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 384, p. 269–86 , 1982.

IDRO, Richard *et al.* Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. **Pediatric research** v. 68, n. 4, p. 267–74 , 2010.

JABAUDON, Matthieu *et al.* Net alveolar fluid clearance is associated with lung morphology phenotypes in acute respiratory distress syndrome. **Anaesthesia, critical care & pain medicine** , 2016.

JOO CHOI, Ran; CHENG, Mao-Sheng; SHIK KIM, Yeong. Desoxyrhapontigenin up-regulates Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression in macrophages and inflammatory lung injury. **Redox biology** v. 2, n. 1, p. 504–12 , 2014.

KIRCHGATTER, Karin; DEL PORTILLO, Hernando A. Clinical and molecular aspects of severe malaria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 77, n. 3, p. 455–75 , 2005.

KONRAD, F M *et al.* Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. **Mucosal immunology** v. 9, n. 1, p. 98–111 , 2016.

LACERDA, Marcus Vg G *et al.* Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria journal** v. 11, p. 12 , 2012.

LANG, Detlef *et al.* Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. **International immunology** v. 17, n. 2, p. 155–65 , 2005.

LANGOUCHE, Lies *et al.* Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. **The Journal of clinical investigation** v. 115, n. 8, p. 2277–86 , 2005.

LI, Huai-Dong *et al.* Exogenous interleukin-10 attenuates hyperoxia-induced acute lung injury in mice. **Experimental physiology** v. 100, n. 3, p. 331–40 , 2015.

LI, Zhuoming; WANG, Yu; VANHOUTTE, Paul M. Upregulation of heme oxygenase 1 by hemin impairs endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension** v. 58, n. 5, p. 926–34 , 2011.

LIVAK, K J; SCHMITTGEN, T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)** v. 25, n. 4, p. 402–8 , 2001.

LOMASK, Morton. Further exploration of the Penh parameter. **Experimental and toxicologic pathology** v. 57 Suppl 2, p. 13–20 , 2006.

LOVEGROVE, Fiona E *et al.* Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. **PLoS pathogens** v. 4, n. 5, p. e1000068 , 2008.

LUO, Yun-peng *et al.* Hemin inhibits NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury, involving heme oxygenase-1. **International immunopharmacology** v. 20, n. 1, p. 24–32 , 2014.

Malaria Atlas Project. Disponível em: <http://www.map.ox.ac.uk/explore/countries/BRA/>. Acesso em: 8 jan. 2015.

MATTHAY, Michael A; WARE, Lorraine B; ZIMMERMAN, Guy A. The acute respiratory distress syndrome. **The Journal of clinical investigation** v. 122, n. 8, p. 2731–40 , 2012.

MEDFORD, Andrew R L *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) isoform expression and activity in human and murine lung injury. **Respiratory research** v. 10, n. 1, p. 27 , 2009.

MENG, Fanyong *et al.* Asef mediates HGF protective effects against LPS-induced lung injury and endothelial barrier dysfunction. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology** v. 308, n. 5, p. L452-63 , 2015.

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.

MONAHAN, Laura J. Acute respiratory distress syndrome. **Current problems in pediatric and adolescent health care** v. 43, n. 10, p. 278–84 , 2013.

MOTTERLINI, Roberto; OTTERBEIN, Leo E. The therapeutic potential of carbon monoxide. **Nature reviews. Drug discovery** v. 9, n. 9, p. 728–43 , 2010.

MUANZA, K *et al.* Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadherence. **Research in immunology** v. 147, n. 3, p. 149–63 , 1996.

NAKAGAMI, T *et al.* A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. **Biochimica et biophysica acta** v. 1158, n. 2, p. 189–93 , 1993.

NAKAMICHI, Ikuo *et al.* Hemin-activated macrophages home to the pancreas and protect from acute pancreatitis via heme oxygenase-1 induction. **The Journal of clinical investigation** v. 115, n. 11, p. 3007–14 , nov. 2005.

NG, Y S *et al.* Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists** v. 220, n. 2, p. 112–21 , 2001.

OQUENDO, P *et al.* CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. **Cell** v. 58, n. 1, p. 95–101 , 1989.

ORTOLAN, Luana S *et al.* Predictive criteria to study the pathogenesis of malaria-associated ALI/ARDS in mice. **Mediators of inflammation** v. 2014, p. 872464 , 2014.

OTTERBEIN, L; SYLVESTER, S L; CHOI, A M. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. **American journal of respiratory cell and molecular biology** v. 13, n. 5, p. 595–601 , 1995.

PAMPLONA, Ana *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nature medicine** v. 13, n. 6, p. 703–10 , 2007.

PENA, Ana C. *et al.* A novel carbon monoxide-releasing molecule fully protects mice from severe malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 56, n. 3, p. 1281–1290 , 2012.

PRICE, Laura *et al.* Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium vivax malaria: case report and review of the literature. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 101, n. 7, p. 655–9 , 2007.

PRUDÊNCIO, Miguel; RODRIGUEZ, Ana; MOTA, Maria M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. **Nature reviews. Microbiology** v. 4, n. 11, p. 849–856 , 2006.

RAHIMI, Bilal Ahmad *et al.* Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malaria journal** v. 13, p. 481 , 2014.

RANIERI, V Marco *et al.* Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA : the journal of the American Medical Association** v. 307, n. 23, p. 2526–33 , 2012.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The inflammasomes. **Cell** v. 140, n. 6, p. 821–32 , 2010.

SHERMAN, Irwin W; EDA, Shigetoshi; WINOGRAD, Enrique. Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind. **Microbes and infection** v. 5, n. 10, p. 897–909 , 2003.

SHU, Jie; QIU, Guoping; ILYAS, Mohammad. *Immunohistochemistry (IHC) Image Analysis Toolbox*. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/ihc-toolbox/index.html>. Acesso

em: 8 jan. 2015.

SINER, Jonathan M *et al.* VEGF-induced heme oxygenase-1 confers cytoprotection from lethal hyperoxia in vivo. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** v. 21, n. 7, p. 1422–32 , 2007.

SINGH, Balbir; DANESHVAR, Cyrus. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. **Clinical microbiology reviews** v. 26, n. 2, p. 165–84 , 2013.

SOARES, M P *et al.* Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. **Nature medicine** v. 4, n. 9, p. 1073–7 , 1998.

SONG, Y *et al.* A low level of TNF-alpha mediates hemorrhage-induced acute lung injury via p55 TNF receptor. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology** v. 281, n. 3, p. L677-84 , 2001.

STANISIC, Danielle I *et al.* γδ T cells and CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria. **The Journal of infectious diseases** v. 210, n. 2, p. 295–305 , 2014.

STOCKER, R *et al.* Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science** v. 235, n. 4792, p. 1043–6 , 1987.

SUKRITI, Sukriti *et al.* Mechanisms regulating endothelial permeability. **Pulmonary circulation** v. 4, n. 4, p. 535–51 , 2014.

TAMION, Fabienne *et al.* Protective effects of heme-oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of interleukin-10. **The Journal of trauma** v. 61, n. 5, p. 1078–84 , 2006.

THIEL, Manfred *et al.* Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. **PLoS biology** v. 3, n. 6, p. e174 , 2005.

TRACZ, Michal J; ALAM, Jawed; NATH, Karl A. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology** v. 18, n. 2, p. 414–20 , 2007.

TSUBURAI, Takahiro *et al.* Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lung prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a Fas-Fas ligand-independent pathway. **Human gene therapy** v. 13, n. 16, p. 1945–60 , 2002.

UMBERS, Alexandra J; AITKEN, Elizabeth H; ROGERSON, Stephen J. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. **Trends in parasitology** v. 27, n. 4, p. 168–75 , 2011.

VAN DEN STEEN, Philippe E *et al.* Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 181, n. 9, p. 957–968, 2010.

VAN DER HEYDE, Henri C *et al.* A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. **Trends in parasitology** v. 22, n. 11, p. 503–8 , 2006.1471-4922 (Print)r1471-4922 (Linking).

WALTHER, Michael *et al.* HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. **PLoS pathogens** v. 8, n. 3, p. e1002579 , 2012.

WASSMER, Samuel C; COMBES, Valéry; GRAU, Georges E. Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 992, n. 1, p. 30–8 , 2003.

WAXMAN, A B *et al.* Targeted lung expression of interleukin-11 enhances murine tolerance of 100% oxygen and diminishes hyperoxia-induced DNA fragmentation. **The Journal of clinical investigation** v. 101, n. 9, p. 1970–82 , 1998.

WHO. **World Malaria Report 2014**. Geneva: World Health Organization, 2014. 242 p.

WHO. **World Malaria Report 2015**. Geneva: World Health Organization, 2015. 280 p.

WILSON, Stephen J; KEENAN, Alan K. Role of hemin in the modulation of H2O2-mediated endothelial cell injury. **Vascular pharmacology** v. 40, n. 2, p. 109–18 , fev. 2003.

YAMADA, Mitsuhiro *et al.* Interferon-gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology** v. 287, n. 5, p. L1042-7 , 2004.

YIN, Hui *et al.* Heme oxygenase-1 ameliorates LPS-induced acute lung injury correlated with downregulation of interleukin-33. **International Immunopharmacology** v. 11, n. 12, p. 2112–2117 , 2011.

ZHANG, Xuchen *et al.* Endothelial STAT3 is essential for the protective effects of HO-1 in oxidant-induced lung injury. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** v. 20, n. 12, p. 2156–8 , 2006.

ZHANG, Xuchen *et al.* Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium. **American journal of respiratory cell and molecular biology** v. 28, n. 3, p. 305–15 , 2003.

ZHANG, Xuchen *et al.* Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. **The Journal of biological chemistry** v. 279, n. 11, p. 10677–84 , 2004.

ZHANG, Yi *et al.* Lung endothelial HO-1 targeting in vivo using lentiviral miRNA regulates apoptosis and autophagy during oxidant injury. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** v. 27, n. 10, p. 4041–58 , 2013.