

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
(FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE FISIOPATOLOGIA

Stefani Aparecida Minchio Rodrigues

**Regulação da Septina 9 na síndrome do desconforto respiratório
agudo associado à malária**

**São Paulo
2024**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
(FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE FISIOPATOLOGIA

Stefani Aparecida Minchio Rodrigues

**Regulação da Septina 9 na síndrome do desconforto respiratório
agudo associado à malária**

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do título de mestre pela
Universidade de São Paulo na área de Fisiopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Epiphanyo

São Paulo
2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R685r Rodrigues, Stefani Aparecida Minchio
Regulação da Septina 9 na síndrome do desconforto respiratório agudo associado a malária / Stefani Aparecida Minchio Rodrigues. - São Paulo, 2024.
88 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Epiphânio, Sabrina

1. Malária. 2. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. 3. Septina 9. I. T. II.
Epiphânio, Sabrina, orientador.

Stefani Aparecida Minchio Rodrigues

Regulação da Septina 9 na síndrome do desconforto respiratório agudo associado à malária. Dissertação para obtenção do título de mestre pela Universidade de São Paulo na área de Fisiopatologia.

Comissão Julgadora

Prof^a. Dr^a Sabrina Epiphanyo Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Madalena Minchio, por ter me apoiado a vir para São Paulo, para fazer o Mestrado e por toda ajuda que sempre tem me dado para que eu possa correr atrás dos meus estudos e de aquilo que quero conquistar. Agradeço ao meu irmão, Giovani Minchio Alves (em memória) e ao meu pai, Agenor Rodrigues (em memória) por todo o apoio em vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Vinicius Santana Nunes por ter me dado a oportunidade de adentrar este mundo da pesquisa e por todo o incentivo para que eu viesse para São Paulo a fim de crescer e me aperfeiçoar.

Agradeço ainda a minha casa de axé Terreiro de Umbanda Vó Rita das Almas (T.U.V.R.A.), a minha espiritualidade, e a minha Mãe de Santo, Mãe Bruna (Bruna Alves) que, ao final do mestrado me deram forças e apoio para finalizá-lo da melhor forma possível.

Agradeço também aos amigos da pós-graduação, por toda ajuda que me deram, pelo acolhimento em seus laboratórios, pelos cafés da tarde, a nossa válvula de escape da pós, e por todos os almoços e jantares nos bandejões da USP. Agradeço ainda a minha psicóloga, Vanussa Paiva, por toda paciência e orientação.

Agradeço ainda à todos do laboratório de Imunopatologia Celular e Molecular da Malária, onde realizei meu mestrado, e do Laboratório de Imunoparasitologia Experimental (ICB II), sendo este segundo coordenado pelo Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi ainda realizado com o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) – (2022/08582-8).

RODRIGUES, S.A.M. **Regulação da Septina 9 na síndrome do desconforto respiratório associado à malária.** 2024. 94p. Monografia do Exame de Qualificação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) — Área de Fisiopatologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

RESUMO

A malária é um problema mundial de saúde, com 249 milhões de casos de infecção, ocasionando 608 mil mortes no ano de 2022. Causada pelo gênero *Plasmodium*, são cinco principais espécies causadoras da malária no ser humano, o *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* sendo os dois últimos responsáveis pelo maior número de casos clínicos e mortes ao redor do mundo, transmitida pelo mosquito fêmea do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Sabe-se ainda que eritrócitos infectados por *Plasmodium berghei* ANKA causam alteração no citoesqueleto de actina, consequentemente levando a hiperpermeabilidade da barreira endotelial. Em experimentos *in vitro*, a imunofluorescência, foi observada alteração do citoesqueleto de actina em células estimuladas com eritrócitos parasitados por *PbA* (EP), em contrapartida, aquelas não estimuladas (NE) e estimuladas com eritrócitos não parasitados por *PbA* (EnP), não mostraram alterações no mesmo. Nos experimentos *in vivo*, ao observar dados coletados, sendo estes respiratórios (penh e frequência respiratória) e parasitemia coletados no 7º DPI, foi observado um mesmo padrão entre o experimento 1 e o experimento 2. Os animais infectados com 10^6 de eritrócitos infectados, foram alocados em dois grupos, sendo eles hiperparasitemia (HP) ou síndrome do desconforto respiratório agudo-associado a malária (SDRA/SDRA-MA) e comparados àqueles não infectados (NI). Os animais NI, não apresentam parasitemia, em contrapartida, os animais SDRA, tem maior parasitemia que os HP, visto que estes têm aumento em sua parasitemia após o 12º DPI, e assim seguem aumentando gradativamente até levar os animais a óbito. O penh tem o mesmo padrão que a parasitemia, os NI com penh mais baixa que os HPs e os SDRA, sendo dentre estes, o grupo SDRA o mais elevado. A frequência respiratória, por sua vez se apresenta mais elevada no grupo NI, sendo o grupo SDRA menor que o HP, um achado tido como normal, visto que os pulmões de animais com SDRA sofrem maior dano que os HPs. Apesar de não apresentar um valor significativo, as imagens de gel SDS-PAGE (WB) mostram maior concentração da Septina 9 nos animais com SDRA em comparação com os HPs e com os NIs. O mesmo é observado na qRT-PCR, mesmo sem significância estatística, o valor mostrado nos gráficos tem maior concentração nos SDRA. Assim, a Septina 9 está presente nas CEPP, e, mesmo sem significância estatística, da mesma forma que está presente nas amostras de tecido pulmonar utilizadas no WB e qT-PCR. É hipotetizado ainda que esta proteína pode ser ativada e assim sofrer alteração em sua localização intracelular.

Palavras-chave: Septina 9; SEPT9; Malária; ARDS; endotélio.

RODRIGUES, S.A.M. **The role of Septin 9 in regulating vascular permeability in malarial respiratory distress syndrome.** 2024. 94p. Monografia do Exame de Qualificação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) — Área de Fisiopatologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

ABSTRACT

Malaria is a global health problem, with 249 million cases of infection, causing 608 thousand deaths in the year 2022. Caused by the genus *Plasmodium*, there are five main species that cause malaria in humans, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*, the last two being responsible for the largest number of clinical cases and deaths around the world, transmitted by the female mosquito of the genus *Anopheles* during blood meal. It is also known that erythrocytes infected by *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) cause changes in the actin cytoskeleton, consequently leading to hyperpermeability of the endothelial barrier. In in vitro experiments, immunofluorescence, changes in the actin cytoskeleton were observed in cells stimulated with erythrocytes parasitized by PbA (EP), in contrast, those not stimulated (NE) and stimulated with erythrocytes not parasitized by PbA (EnP), did not show changes the same. In the in vivo experiments, when observing collected data, these being respiratory (penh and respiratory frequency) and parasitemia collected on the 7th DPI, the same pattern was observed between experiment 1 and experiment 2. Animals infected with 10^6 infected erythrocytes were allocated into two groups, namely hyperparasitemia (HP) or malaria-associated acute respiratory distress syndrome (ARDS/ARDS-MA) and compared to those not infected (NI). NI animals do not present parasitemia, on the other hand, ARDS animals have greater parasitemia than HP animals, as the latter have an increase in their parasitemia after the 12th DPI, and thus continue to gradually increase until the animals die. the same pattern as parasitemia, NI with lower penh than HPs and ARDS, among these, the ARDS group being the highest. The respiratory rate, in turn, is higher in the NI group, with the ARDS group being lower than the HP, a finding considered normal, given that the lungs of animals with ARDS suffer greater damage than the HPs. Despite not showing a significant value, SDS-PAGE (WB) gel images show a higher concentration of Septin 9 in animals with ARDS compared to HPs and NIs. The same is observed in qRT-PCR, even without statistical significance, the value shown in the graphs has a higher concentration in ARDS. Thus, Septin 9 is present in CEPP, and, even without statistical significance, in the same way that it is present in lung tissue samples used in WB and qT-PCR. It is also hypothesized that this protein can be activated and thus undergo changes in its intracellular location.

Keywords: Septin 9; SEPT9; Malaria; ARDS; endothelium.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Ciclo da Malária no mosquito e no ser humano	16
Figura 2.	Aspecto macroscópico da cavidade torácica de um camundongo DBA/2 não infectado	18
Figura 3.	Eritrócito parasitado com <i>P. berghei</i> ANKA (EP-PbA) causa alterações morfológicas no citoesqueleto de actina de células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2	19
Figura 4.	Representação do endotélio pulmonar	21
Figura 5.	Componentes do citoesqueleto	21
Figura 6.	Polimerização e despolimerização dos filamentos de actina	22
Figura 7.	Imunofluorescência do citoesqueleto de actina e núcleo celular ...	23
Figura 8.	Formação e maturação de adesão focal (FA)	28
Figura 9.	Componentes do citoesqueleto de actina em células migratórias	30
Figura 10.	Localização das septinas durante o ciclo celular	31
Figura 11.	Estrutura e subgrupos das septinas	35
Figura 12.	Imunomarcação com anticorpo pan-Sept9 a fibras de estresse de actina	39
Figura 13.	Filamentos de Septinas	41
Figura 14.	Hemofilamentos de septinas	41
Figura 15.	Modelo esquemático de complexos de septinas em hexâmeros e octâmeros	44
Figura 16.	Eritrócitos parasitados com <i>P. berghei</i> ANKA promovem a ativação de RhoA em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	46
Figura 17.	Eritrócitos parasitados por <i>P. berghei</i> ANKA induzem as alterações morfológicas e reorganização espacial de FAK fosforilada em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	47
Figura 18.	A quantificação relativa das proteínas pulmonares em camundongos DBA/2 que desenvolveram SDRAs associadas à malária, em comparação com o controle não infectado que	

<p>demostrou diferentes perfis de enriquecimento no 7^o dpi e no 9^o dpi</p>	48
Figura 19. Fluxograma dos materiais e métodos	51
Figura 20. Desenho experimental do modelo murino utilizado para estudo da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associado a Malária utilizado para os experimentos <i>exp1</i> e <i>exp2</i>	54
Figura 21. Câmaras plestimográficas (BUXCO Research Systems) utilizadas para mensurar o padrão respiratório	55
Figura 22. Fórmula para calcular Penh	55
Figura 23. Monocamada de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2	58
Figura 24. Curvas ROC geradas no programa <i>MedCalc</i> , fornecendo os valores de <i>cut off</i> dos dados coletados	62
Figura 25. Gráficos dos dados obtidos do modelo experimental para estudo da ARDS (parasitemia, penh e frequência respiratória) após analisados pelo programa <i>Graph Pad Prism 9</i> . Dados agregados e referentes aos experimentos <i>in vivo</i> 1 e 2	64
Figura 26. <i>Western Blot</i> de proteína extraída de tecido pulmonar de animais não infectados (NI) e animais infectados que desenvolveram a ARDS (ARDS) ou a hiperparasitemia (HP)	65
Figura 27. qRT-PCR de cDNA extraídos de tecido pulmonar de animais NI, HP e ARDS, eutanasiados no 7 DPI	65
Figura 28. Imunofluorescência de CEPP NE, para caracterização de CEPP a partir da utilização de anticorpos para a expressão de seus principais antígenos	67
Figura 29. Imunofluorescência de CEPP NE	68
Figura 30. Imunofluorescência de CEPP estimuladas por eritrócitos parasitados por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	69
Figura 31. Imunofluorescência de CEPP estimuladas por eritrócitos não parasitados por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	70
Figura 32. Imunofluorescência de CEPP	71

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Septinas em diferentes organismos	32
Tabela 2 Informações de agrupamento das septinas em metazoários	36
Tabela 3 Perfil de expressão de septinas e as doenças relacionadas	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	Proteína Ativadora-1
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
DBA/2	Linhagem de camundongo (RRID:IMSR_JAX:000671)
DPI	Dias pós infecção
FA	<i>Focal Adhesion</i>
F-actina	Actina filamentosa
FAK	Quinase de adesão focal (do inglês, <i>Focal Adhesion Kinase</i>)
EC	Células endoteliais
GAPs	<i>GTPase-activating proteins</i>
GDP	Guanosina Difostato
GDI	<i>Guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>
GEFs	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GTP	Guanosina Trifostato
HIF-1α	Fator induzível por hipóxia-1 α
HP	Hiperparasitemia
INF-γ	Interferon gama
MA-ARDS	<i>Malaria Associated Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
MA-SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Associado à Malária
MEC	Matriz Extracelular
miRISC	Complexo de silenciamento induzido por miRNA
miRNAs	Micro RNA
MKL1	Leucemia megacarioblástica-1
MPO	Mieloperoxidase
MRTF	Fator miocardina de transcrição
NETs	Armadilha extracelular de neutrófilos (do inglês, <i>neutrophil extracellular traps</i>)

NF-κB	Fator nuclear-Kb
NI	Não Infectado
NS	<i>Non Stimulated</i>
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PbA-iRBCs	Eritrócitos infectados com <i>P. berghei</i> ANKA
PMLECs	Células endoteliais pulmonares primárias
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ
pre-miRNAs	Pre-miRNAs - miRNA precursor
pri-miRNA	Pri-miRNA - Transcritos primários dos miRNAs
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA_m	RNA mensageiro
ROCK	<i>Rho-associated coiled coil kinase</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SRF	Fator de resposta sérica
TA	Temperatura Ambiente
VASP	<i>Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Malária	15
1.2 Modelo murino experimental para SDRA	16
1.3 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)	19
1.4 Endotélio e Citoesqueleto	20
1.5 Actina	22
1.6 Rho GTPases	24
1.7 RhoA	26
1.8 Adesão Focal (FA) e Quinase de Adesão Focal (FAK)	27
1.9 Fibras de tensão ou estresse e sua interação com a membrana plasmática	29
1.10 Septinas	31
1.11 Formação de filamentos de septina por via de sinalização das Rho GTPases	42
1.12 Co-localização da actina e septina	43
1.13 Septina 9	43
2. JUSTIFICATIVA	46
3. OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo Geral	50
3.2 Objetivos Específicos	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Animais e infecção	52
4.2 Aspectos éticos	52
4.3 Modelo experimental <i>in vivo</i>	53
4.4 Medida da capacidade respiratória	55
4.5 Parasitemia	55
4.6 <i>Western Blot</i>	56

4.7	Cultivo de células endoteliais pulmonares primárias (CEPP)	57
4.8	Caracterização das células endoteliais pulmonares primárias (CEPP) .	58
4.9	Purificação de eritrócitos	58
4.10	Imunofluorescência de células endoteliais pulmonares primárias (CEPP)	59
4.11	Extração de RNA	60
4.12	cDNA	60
4.13	qRT-PCR	60
4.14	Estatística	61
5.	RESULTADOS	62
5.1	Modelo Experimental para a SDRA	62
5.1.1	Análise da expressão de Septina 9	64
5.1.2	qRT-PCR	55
5.2	Cultivo de Células Endoteliais Pulmonares Primárias (CEPP)	66
5.2.1	Imunofluorescência	66
6.	DISCUSSÃO	72
7.	CONCLUSÃO	76
8.	REFERÊNCIAS	77
9.	MATERIAL SUPLEMENTAR	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

Em 2021, foi estimada a ocorrência de 249 milhões casos de infecção por malária e 608 mil de mortes (WHO, 2023). No Brasil, especialmente na região amazônica, foram notificados 153.270 casos (BRASIL, 2020). A malária é causada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, dentre os quais cinco espécies principais deste causam a doença no ser humano, sendo eles o *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* sendo os dois últimos responsáveis pelo maior número de casos clínicos e mortes ao redor do mundo e pela evolução da malária para sua forma grave (GITTA; KILIAN, 2019).

Sua transmissão ocorre através do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado durante o repasto sanguíneo, após picar um humano infectado que é o hospedeiro intermediário (NEVES *et al.* 2016). Durante o repasto sanguíneo, são inoculados esporozoítos pelo vetor, que migram pela corrente circulatória até chegarem nos hepatócitos onde se desenvolvem. Diferenciam-se em trofozoítos pré-eritrocíticos e se multiplicam por reprodução assexuada, originando assim os esquizontes teciduais. Essas formas extra-eritrocíticas nos hepatócitos se rompem e liberam os merozoítos que invadem os eritrócitos (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011; JOSLING; LLINAS, 2015). Nos eritrócitos estes se multiplicam, rompem os eritrócitos e novos merozoítos invadem outros eritrócitos. Ainda são originados os gametócitos, que mosquito vetor, multiplicam-se por reprodução sexuada. Os gametócitos transformam-se em macrogametas (gametócito femininos) e em microgametas (gametócitos masculinos) que após a fecundação formam o ovo ou zigoto. Na camada epitelial do intestino médio do mosquito, estes passam a ser chamado de oocistos, em seguida eclodem e liberam esporozoítos que são disseminados pelo corpo do vetor onde se alojam no ducto salivar até serem injetados no humano, o hospedeiro vertebrado (**Figura 1**) (ASHLEY *et al.*, 2018)

A febre é a primeira e mais comum manifestação clínica a todos os tipos de malária, inicialmente irregular e com o tempo torna-se regular. Outras manifestações são, anorexia, cansaço, tontura, dor de cabeça, dor lombar e sacroilíaca, mialgia, náuseas e vômitos (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012; ASHLEY *et al.*, 2018). Na malária grave há envolvimento dos sistemas nervoso, podendo ocorrer a malária

cerebral, respiratório, podendo causar a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), levando a falência respiratória, alterações renais e hepáticas, levando a distúrbios graves e do sistema hematopoiético, acarretando a anemia severa (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012).

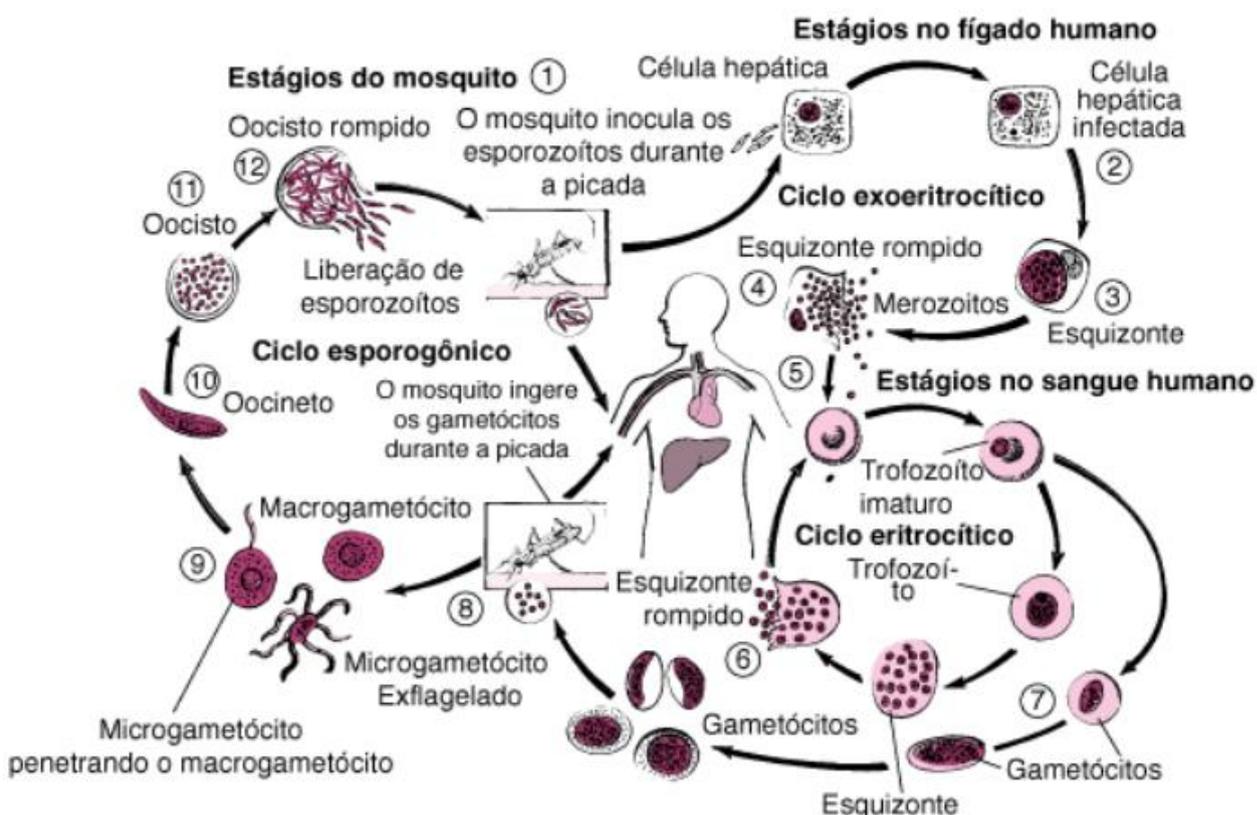


Figura 1 – Ciclo da Malária no mosquito e no ser humano. **Fonte:** Adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention: Malaria Lifecycle. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html#:~:text=The%20malaria%20parasite%20life%20cycle,which%20rupture%20and%20release%20merozoites%20.>>. Acesso em: 4 jul. 2023 e Prova VUNESP. Disponível em: < VUNESP - 2020 - EsFCEx - Oficial - Magistério de Biologia >. Acesso em: 20 fev 2024.

1.2 Modelo murino experimental para a SDRA

No modelo para o estudo da SDRA, cerca de 30 a 60% dos camundongos da linhagem DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) apresentam dispnéia, obstrução das vias aéreas e hipoxemia. Além disso, estes animais vão ao óbito entre 7 e 12 dias de infecção. Os achados anatomopatológicos e histopatológicos evidenciaram a presença de efusão pleural e aumento da permeabilidade vascular pulmonar, realçado pelo edema e pelas hemorragias pulmonares graves, que culminam na morte dos camundongos por insuficiência respiratória (EPIPHANIO *et al.* 2010) (**Figura 2B**).

O modelo composto por camundongos da linhagem DBA/2J infectados por PbA foi definido após investigação da causa de morte de diferentes linhagens de camundongos infectadas com PbA, sendo elas C57BL/6, BALB/c e o DBA/2, todos infectados com PbA (EIPHANIO *et al.*, 2010).

Todos os camundongos C57BL/6 infectados com PbA, foram a óbito entre o 6^o e o 9^o DPI devido a complicações neurológicas consistindo em hemi ou paraplegia, desvio da cabeça, tendência a rolar sob estimulação, ataxia e convulsões, caracterizando um modelo experimental para malária cerebral (MC) (SCHOFIELD e GRAU, 2005). Em contrapartida, os camundongos BALB/c são muito menos suscetíveis ao desenvolvimento da MC quando infectados com PbA, nenhum animal foi a óbito em decorrência do desenvolvimento de MC. Entretanto, estes foram a óbito após 15^o de infecção, com hiperparasitemia (mais de 50% de eritrócitos infectados) com ausência de sintomas neurológicos (BAPTISTA *et al.*, 2010; EIPHANIO *et al.*, 2010).

Diferentemente do C57BL/6 e do BALB/c, os camundongos da linhagem DBA/2 infectados com PbA mostraram um padrão de sobrevivência diferente dos outros dois modelos supracitados (HAQUE *et al.*, 2001). Neste, os animais vão a óbito entre o 7^o e o 20^o DPI, entretanto, neste modelo, dois padrões de óbito são encontrados (EIPHANIO *et al.*, 2010). Um padrão é atribuído aos animais que vão a óbito a partir do 12^o DPI, apresentando sinais de anemia severa, consistente com altos níveis de parasitemia (mais de 50% de eritrócitos infectados), similar ao padrão encontrado no modelo utilizando a linhagem BALB/c (EIPHANIO *et al.*, 2010; OLATUNDE *et al.*, 2022). Quando comparado ao modelo utilizando a linhagem C57BL/6, os animais que foram a óbito entre o 7^o e o 12^o DPI, não demonstraram achados que indicassem o desenvolvimento de MC (EIPHANIO *et al.*, 2010).

Os camundongos DBA/2, que foram a óbito entre o 7^o e o 12^o DPI, apresentaram dispneia antes do óbito, obstrução de vias aéreas, como determinado pelo aumento da pausa respiratória (Penh), apresentaram ainda uma frequência respiratória (FR) baixa, e ainda se mostraram hipoxêmicos quando comparados com um controle não infectado e com os animais que foram a óbito por HP (EIPHANIO *et al.*, 2010). Em observações *post-mortem*, foi ainda observado efusão pleural em 100% dos animais que foram a óbito entre o 7^o e 12^o DPI, contendo célula

inflamatórias como neutrófilos, linfócitos, monócitos e macrófagos (EIPHANIO *et al.*, 2010).

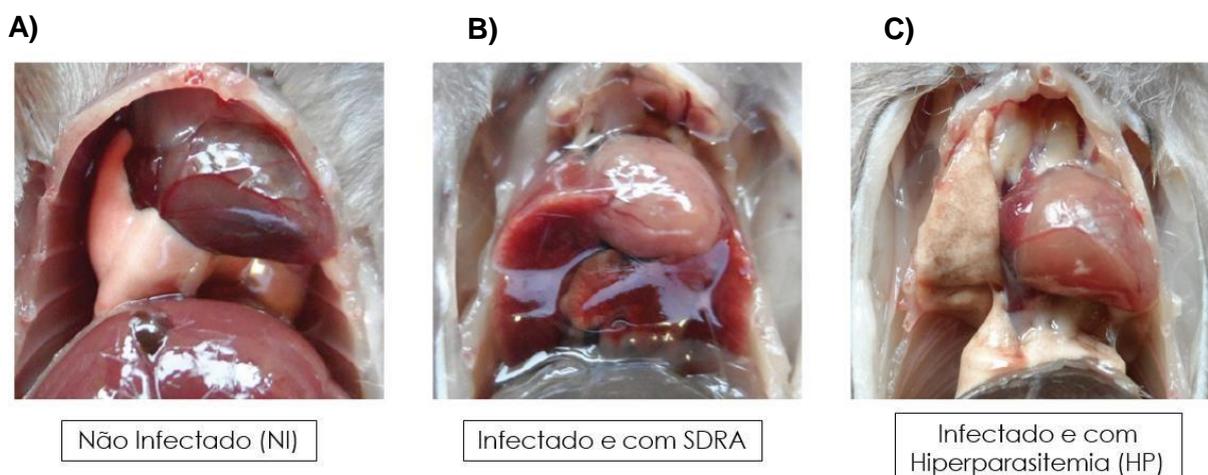


Figura 2 — Aspecto macroscópico da cavidade torácica de um camundongo DBA/2 não infectado (A), um camundongo infectado com *P. berghei* ANKA que morreu de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) mostrando hidrotórax e pulmões hemorrágicos (B) e um camundongo que morreu com hiperparasitemia (HP) mostrando pulmões pálidos e acinzentados e sem derrame pleural (C). **Fonte:** ORTOLAN *et al.*, 2014.

Com interesse nos mecanismos do desenvolvimento da síndrome pulmonar associada à malária e, valendo-se do modelo acima descrito, nosso laboratório estudou diversos aspectos da patogênese da doença. Entre eles, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que atuou como um importante mediador envolvido no aumento da permeabilidade vascular. Foi observado que o desenvolvimento da MA-SDRA está correlacionado aos elevados níveis de VEGF circulante e, o bloqueio desse fator leva à proteção da lesão pulmonar (EIPHANIO *et al.*, 2010). Além disso, foi observado ainda que, os camundongos que desenvolveram a MA-SDRA apresentaram níveis séricos mais elevados de INF-gama e, que o infiltrado inflamatório pulmonar nos DBA/2 era rico em neutrófilos. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e mieloperoxidase (MPO) liberadas pelos neutrófilos, induziram a formação de armadilha extracelular de neutrófilos (NETs), levando a aumento da inflamação, dano ao tecido e morte celular (SERCUNDES *et al.*, 2016).

Outros estudos comprovaram que o contato de eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA com as células endoteliais pulmonares primárias de DBA/2 geraram alterações na conformação dos microfilamentos de actina (Figura 3). e aumento da permeabilidade vascular (DEBONE 2017; NGUEE *et al.*, 2022). As alterações e os

danos endoteliais causam o aumento permeabilidade vascular pulmonar e são mecanismos-chave na patogênese da SDRA (HOLTER *et al.*, 1986; JABAUDON *et al.*, 2016), a qual há interesse em aprofundar os conhecimentos destes processos.

A)

B)

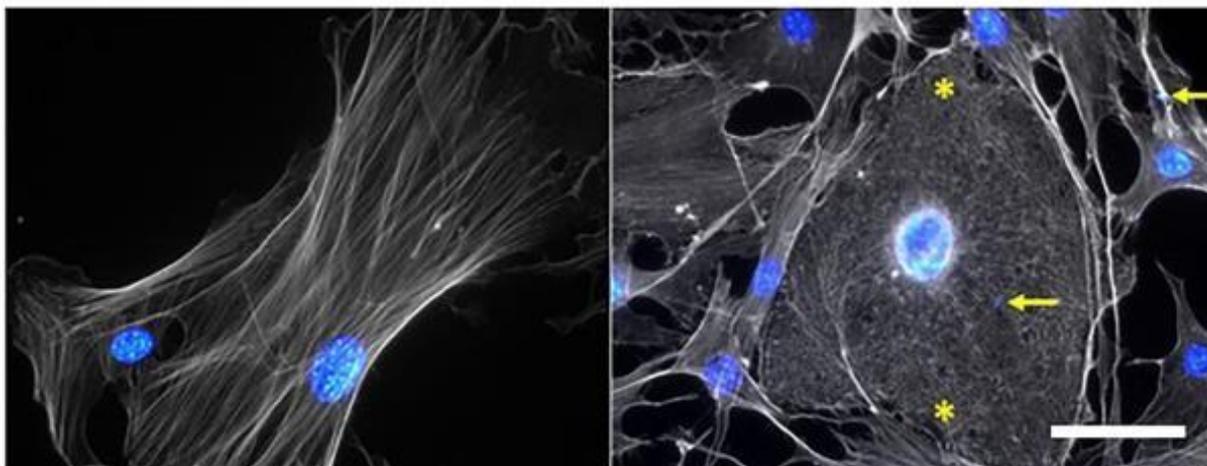


Figura 3 — Eritrócito parasitado com *P. berghei* ANKA (EP-PbA) causa alterações morfológicas no citoesqueleto de actina de células endoteliais pulmonares de camundongos DBA/2. A) Células não estimuladas apresentando microfilamentos de actina alongados; B) EP-PbA aderidos causando encurtamento e emaranhamento dos filamentos, indicados por asteriscos. A actina e os núcleos celulares foram corados com Texas Red Phalloidin, Hoechst 1:1000, respectivamente. Setas amarelas: núcleo dos EP-PbA; Barra de escala: 50 μ m. **Fonte:** NGUEE *et al.*, 2022.

1.3 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), foi descrita inicialmente em 1967, com apresentações clínicas, tanto em adultos quanto em crianças, como hipoxemia aguda, edema pulmonar não cardiogênico, complacência pulmonar (aumento da rigidez pulmonar), aumento do trabalho respiratório e necessidade de ventilação por pressão positiva associada com desordens clínicas severas, as quais incluem trauma, pneumonia, sepse e aspiração (ASHBAUGH, *et al.*, 1967). Os critérios para a classificação da SDRA foram atualizados em 2012, pelo que ficou conhecido como definição de Berlim, classificando a SDRA em leve, moderada e severa (RANIERI *et al.*, 2012).

A SDRA se desenvolve comumente durante pneumonia (por bactéria e vírus, e ainda, porém menos comum, por fungos), sepse não pulmonar (MATTHAY *et al.*, 2019), sendo a frequência de suas desordens clínicas associadas a SDRA dependentes da localização geográfica, do sistema de saúde disponível e se este é

rico ou pobre em recursos (MATTHAY *et al.*, 2019).

Um pulmão saudável é estruturado para realizar a troca gasosa, onde leva o oxigênio a corrente sanguínea através dos alvéolos, e leva o dióxido de carbono para os alvéolos para que este seja retirado do corpo através da respiração (MATTHAY *et al.*, 2019).

O endotélio é uma barreira fluida e seletiva que permite o tráfico de moléculas entre a corrente sanguínea e o pulmão (NABHAN *et al.*, 2018), assim como epitélio alveolar que é formado por pneumócitos do tipo I e por pneumócitos do tipo II (MATTHAY, 2014).

A SDRA é um processo inflamatório agudo, onde ocorre a destruição dos pneumócitos alveolares tipo I e a substituição destes pelo pneumócitos alveolares tipo II, que secretam surfactante (MATTHAY *et al.*, 2019). Esta destruição ocorre devido ao processo inflamatório agudo que está em andamento, o qual além do aumento da permeabilidade, permitindo a entrada não seletiva de fluidos, proteínas, eritrócitos e ainda neutrófilos, levando a liberação de fatores pró inflamatórios (MATTHAY *et al.*, 2012; BACHOFEN e WEIBEL, 1982; FEIN *et al.*, 1979). Deposições eosinofílicas, formam a chamada membrana hialina, a qual forma uma barreira, impedindo a troca entre os alvéolos e os capilares sanguíneos (KATZENSTEIN *et al.*, 1976; MENDEZ *et al.*, 2005; CARDINAL-FERNANDEZ *et al.*, 2017).

1.4 Endotélio e Citoesqueleto

A monocamada de células endoteliais (EC) que recobre os vasos sanguíneos forma uma barreira celular semipermeável entre o interior do vaso sanguíneo e o tecido intersticial. Atua aprimoramento das trocas gasosas, nos mecanismos de coagulação e de neovascularização, na resposta imune e no controle da permeabilidade vascular. (VOELKEL; ROUNDS, 2009; GIANNOTTA, TRANI; DEJANA, 2013).

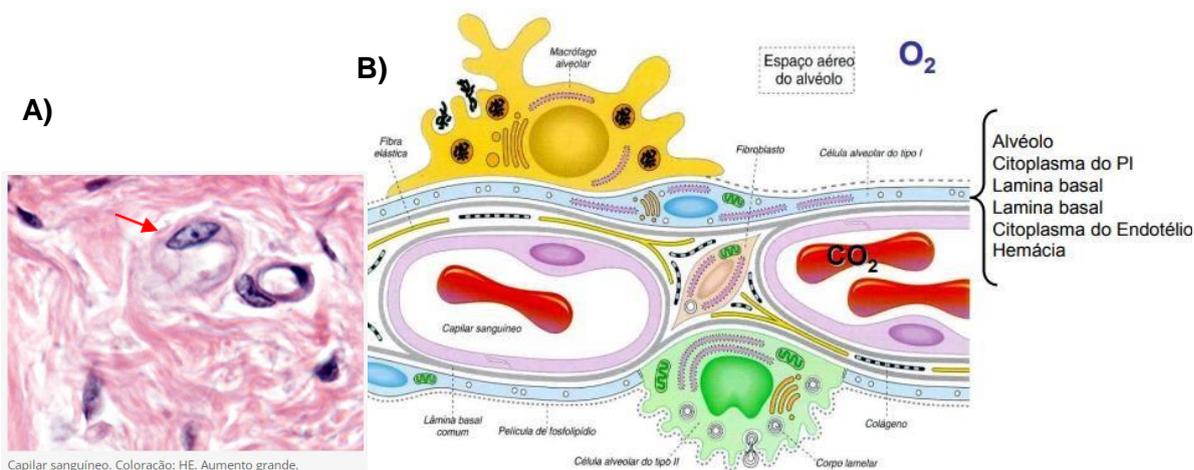


Figura 4 — Representação do endotélio pulmonar. A) Microscopia endotélio, por coloração em Hematoxilina e Eosina. Seta vermelha: vaso sanguíneo, formado por uma monocamada e por uma única célula endotelial; B) Esquema do endotélio pulmonar, mostrando macrófago alveolar, células alveolares do tipo I e II, fibroblastos, além dos vasos sanguíneos. **Fonte:** A) HISTOLOGIA: Histologia Interativa. Histologia Online. MOL - Microscopia On Line. Disponível em: <<https://mol.icb.usp.br/>> B) Endotélio Pulmonar. Disponível em: <https://professor.ufrgs.br/simonemarcuzzo/files/sistema_respiratorio_0.pdf>

Os microfilamentos de actina, os microtúbulos e os filamentos intermediários são os componentes do citoesqueleto (Figura 5). A actina tem papel essencial no controle da permeabilidade das células endoteliais e, interagem com os microtúbulos (DUDEK; GARCIA, 2001), atuando também na regulação do processo inflamatório e na manutenção do endotélio pulmonar (MEHTA; MALIK 2006; LUCAS *et al.* 2009).

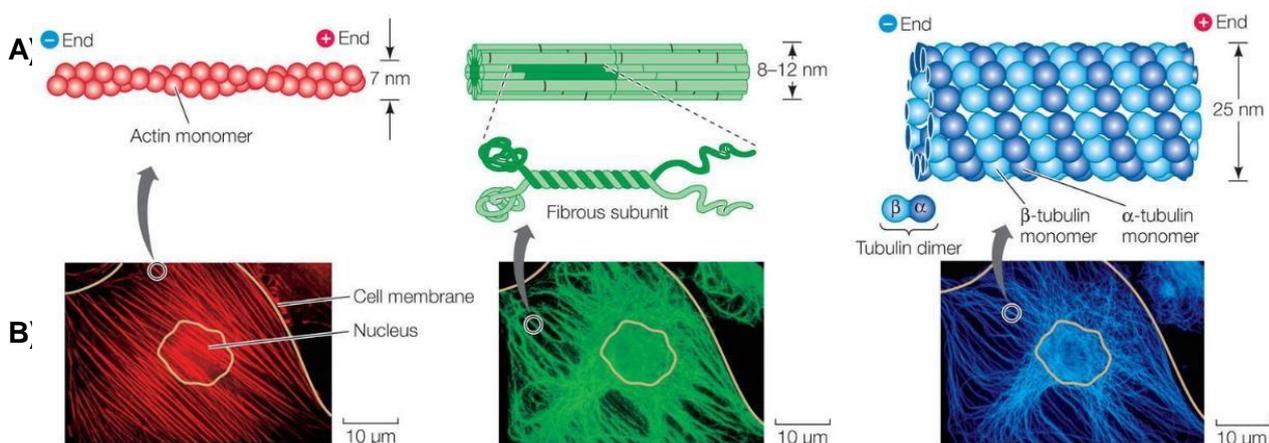


Figura 5 — Componentes do citoesqueleto. A) Esquema dos elementos do citoesqueleto; B) Imagem por imunofluorescência da organização dos elementos do citoesqueleto. Em verde, os microtúbulos, em azul os filamentos intermediários e em vermelho os filamentos de actina. **Fonte:** Courtesy of Vic Small, Austrian Academy of Sciences, Salzburg, Austria. Disponível em: <https://www.macmillanhigher.edu/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/asset/img_ch4/c04_fig10.html>. Acesso em: 22 ago. 2022.

1.5 Actina

A actina, um dos elementos do citoesqueleto, é uma junção de seus próprios filamentos, com anexos e proteínas regulatórias. É a primeira maquinaria de geração de força na célula, que produz forças de impulso (protrusivas) por meio da polimerização coordenada de múltiplos filamentos de actina, impulsionando a extensão da membrana plasmática na borda da célula, no sentido em que está se movimentando (POLLARD, 2016). Mecanismos semelhantes impulsionam a propulsão de organelas envoltas por membranas e promovem a aposição das membranas durante a formação das junções célula-célula (CHHABRA; HIGGS, 2007).

Outro tipo de força gerada, é a força de tração (contráteis) por meio do deslizamento de filamentos de actina ao longo de filamentos bipolares de miosina II (SVITKINA, 2018). As forças contráteis produzidas por motores de miosina puxam os filamentos de actina que se retraem dando movimento às células migratórias, um mecanismo análogo a contração muscular (HUXLEY; HANSON, 1954; HUXLEY; NIEDERGERKE, 1954). Um mecanismo contrátil semelhante separa as células-filhas durante a citocinese, reforça sítios de adesão entre células ou entre uma célula a matriz extracelular, mantém e altera o formato da célula, e define as propriedades mecânicas da célula (WAGNER; GLOTZER, 2016).

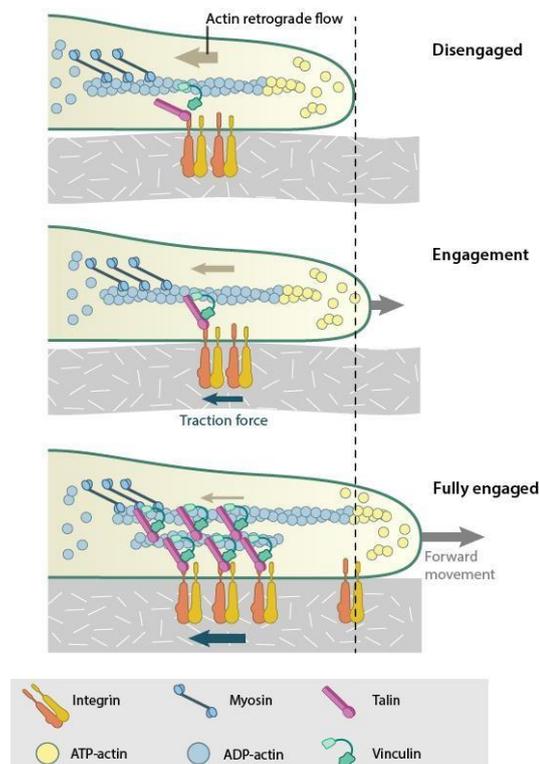


Figura 6 – Polimerização e despolimerização dos filamentos de actina. **Fonte:** How do focal adhesions

act as molecular clutches in lamellipodia? Disponível em: <<https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-are-lamellipodia-and-lamella/how-do-focal-adhesions-act-as-molecular-clutches-in-lamellipodia/>>. Acesso em: 2 jul. 2023.

Os dois tipos de forças supracitados são particularmente importantes para a migração da célula, mas também definem e podem alterar sua forma e as propriedades mecânicas da superfície celular, atuam impulsionando a motilidade intracelular e a morfogênese das organelas da membrana e permitem que as células formem adesões umas com as outras e com a matriz extracelular (SVITKINA, 2018).

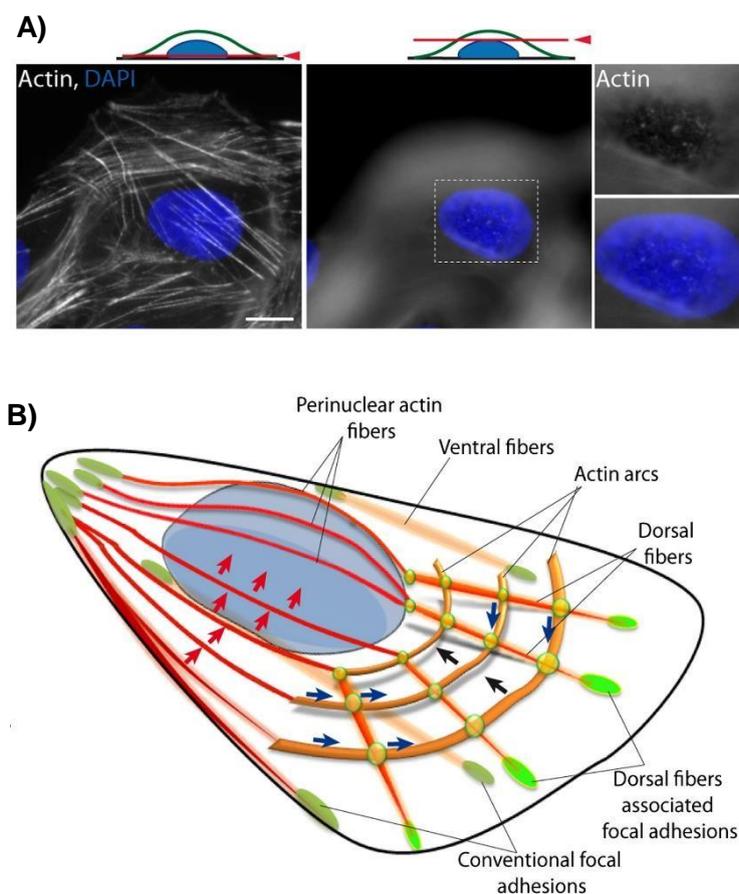


Figura 7 — Imunofluorescência do citoesqueleto de actina e núcleo celular. A) Imagens obtidas por imunofluorescência, em branco: filamentos de actina, em azul: núcleo celular. B) ?. **Fonte:** MANINOVÁ; VOMASTEK, 2016. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.13836>>. Acesso em: 11 out. 2022.

Como originalmente estabelecido para os músculos esqueléticos, o citoesqueleto de actina gera forças de tração através deslizamento mútuo de filamentos de actina e miosina, sendo este mecanismo de contração em células musculares aplicável também a células não musculares (HUXLEY; HANSON 1954; HUXLEY; NIEDERGERKE, 1954; WEBER; FRANZINI-ARMSTRONG, 2002).

Muitos filamentos de actina celular giram constantemente para remodelar estruturas de acordo com a necessidade de mudança. As proteínas reguladoras controlam todos os aspectos da dinâmica do filamento de actina no tempo e no espaço, como nucleação, alongamento e desmontagem do filamento de actina (POLLARD, 2016). Nas células, as proteínas de ligação à actina montam a maioria dos filamentos de actina em redes e feixes adaptados a tarefas específicas. Proteínas acessórias adicionais permitem que os filamentos de actina atuem em associação com células membranas (SVITKINA, 2018).

A polimerização da actina pelo complexo Arp2/3 está envolvida na formação de várias junções célula-célula, como as junções aderentes em células epiteliais, sinapses em neurônios (KIM *et al.*, 2013), células imunes (BILLADEAU; BURKHARDT, 2006) e junções de pré-fusão em mioblastos (SENS *et al.*, 2010).

Sendo assim, o citoesqueleto, de uma forma geral, é regulado por proteínas da família das Rho GTPases.

1.6 Rho GTPases

As Rho GTPases, pertencem à família das Ras que se ligam ao GTP proteínas de 20–30 kDa, estando incluso nesta família, pelo menos 20 membros. Em eucariotos superiores são ainda subdivididas em seis grupos, sendo estes a subfamília Rho (RhoA, RhoB, RhoC); subfamília Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG); subfamília CDC42 (CDC42, Wrch1, TC10, Chp, TCL); subfamília Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3); subfamília Rho BTB (RhoBTB1, RhoBTB2, RhoBTB3) e a subfamília Miro (Miro1, Miro2) (ETIENNE-MANNEVILLE *et al.*, 2002; JAFFE; HALL, 2005).

A família Rho de GTPases são os principais reguladores do citoesqueleto e desempenham papéis importantes na organização e na manutenção de contato célula-célula, na migração celular, na reorganização do citoesqueleto de actina, na morfologia celular, na invasão de células tumorais, regulação transcricional e na citocinese (ETIENNE-MANNEVILLE *et al.*, 2002; JAFFE; HALL, 2002). Uma vez que as Rho GTPases são necessárias para a funcionabilidade de caderinas e integrinas, sua atividade deve ser regulada para fazer a transição entre a adesão célula-célula e migração celular (COLLINS; NELSON, 2015). As Rho alternam entre uma forma ativa ligada a Guanosina Trifosfato (GTP) e uma forma inativa ligada ao Guanosina

Difosfato (GDP), sendo a sua atividade e a sua localização intracelular reguladas principalmente por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) (WANG; ZHENG, 2007; ZHOU; ZHENG, 2013), e, por sua vez controlando a formação das proteínas de adesão focal (FAs) (RIDLEY; HALL, 1992).

A regulação dinâmica da atividade Rho e da formação da adesão focal também é crítica para a migração celular. A Rho diminui a esta migração, tanto ativado quanto inativado (TAKAISHI *et al.*, 1993; ALLEN *et al.*, 1997; NOBES; HALL, 1999). Os principais membros desta família são Cdc42, Rac e RhoA são reguladores dinâmicos do citoesqueleto e controlam processos celulares por hidrólise da GTP. Dentre as diversas funções, as RhoA GTPases contribuem para o desenvolvimento de organelas, diferenciação e proliferação celular e apoptose (VOELKEL AND ROUNDS 2009; LIU, GU, AND WANG 2014). As citocinas inflamatórias também influenciam a ativação de Rho, sendo de extrema relevância para a resposta secundária à lesão, onde os mediadores inflamatórios causam o aumento da lesão e de morte celular (MCKERRACHER *et al.*, 2012). Sabe-se também que a desorganização da rede de actina leva ao aumento da permeabilidade das células endoteliais, pela via de sinalização Rho-GTPase, que desencadeia o remodelamento desta rede de actina e, conseqüentemente, leva a hiperpermeabilidade da barreira endotelial (ALIEVA *et al.* 2013; LI; MRUK; CHENG 2015).

Alterações na sinalização das Rho GTPases contribuem para transformações malignas, anormalidades neurológicas e doenças imunológicas. A maior parte das Rho GTPases alternam entre uma forma ativa, com uma conformação de ligação GTP, e entre uma forma inativa com uma conformação de ligação GDP, ciclo este regulado por três tipos de proteínas (RIDLEY, 2011). Os três tipos de proteínas que regulam a alteração entre as formas GTP e GDP, são o *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEFs), atuando na catalização e troca do estado de GDP para GTP, através da ativação da GTPase; *GTPase-activating proteins* (GAPs), entretanto, atua no aumento da hidrólise intrínseca de GTPase, levando a inativação desta; e por fim, os *Guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs), que atuam sequestrando a forma de ligação GDP de algumas GTPases no citosol, prevenindo que estas localizem a membrana ou que sejam ativadas pelas GEFs (ROSSMAN *et al.*, 2005; YE, 2020). Estas são ainda rapidamente ativadas por diversos receptores de superfície celular, como

integrinas, caderinas, citocinas receptoras, receptores tirosino quinases e receptores acoplados à proteína G (YE, 2020).

A sinalização das GTPases é controlada por outros mecanismos, que incluem PTMs, sendo nas Rho GTPases a fosforilação, a ubiquitinação regulam a atividade das Rho GTPases e a sumoilação moduladora dos níveis de proteínas das Rho GTPases. Um outro regulador é a alteração lipídica, que é crucial para a determinação da localização subcelular das Rho GTPases, em compartimentos específicos da membrana, sendo este regular responsável direto por alterações lipídicas que ocorrem pós-traducionalmente, especificamente por interações com as RhoGEFs, levando assim, a redução das vias de sinalização. Já a sua regulação pode se dar a nível de expressão gênica ou pós transcricionais, sendo os microRNAs, que em combinação a alteração de GTP-GDP e interações com outras proteínas, controlam a atividade das Rho GTPase (YE, 2020).

1.7 RhoA

A ativação da proteína RhoA, está associada à troca de GDP por GTP e à translocação da RhoA ativa ligada a GTP (TEIXEIRA; WEBB, 2007). A RhoA GTPase desempenha uma variedade de funções que incluem, a regulação de proteínas do citoesqueleto, morfologia e migração, em conjunto com atividades de proliferação e transcrição em células e, ainda ativam a alfa hélice quinase associada a Rho (do inglês *Rho-associated coiled coil kinase* (ROCK)) I e II (KIM *et al.*, 2018).

É evidenciado ainda que, a RhoA regula a formação dos filamentos de actina através da via ROCK/LIM quinases1/2 (LIMKs1/2)/p-cofilina/F-actina e mDia/profilina/F-actina com interação actina-miosina através da fosforilação da quinase da miosina de cadeia leve e da fosfatase das miosinas de cadeia leve (JAFFE; HALL, 2005). A desregulação de Rho GTPases de uma forma geral, está intimamente ligada a várias doenças, estando incluído vários tipos de cânceres. A RhoA em particular, está envolvida na carcinogênese, quando superexpressa, silenciada ou quando sua atividade é regulada diferencialmente.

A superexpressão da Rho A por sua vez, ocorre transcricionalmente, já a regulação diferencial da atividade Rho ocorre através de modificações pós-

traducionais. A expressão do nível de RhoA é regulada a nível transcricional e por vários microRNAs (miRNAs), e, assim levando a alteração da transcrição de múltiplos genes-alvo envolvidos em vários processos fisiológicos, particularmente aqueles relevantes para a carcinogênese (KIM *et al.*, 2018).

Existem dois mecanismos da RhoA GTPase que atuam regulando vários processos de fatores transcricionais, sendo eles, a actina filamentosa (F-actina) dependente e a F-actina independente de um ("interruptor de actina"). Os principais fatores transcricionais regulados pela RhoA são o fator nuclear- κ B (NF- κ B), a proteína ativadora-1 (AP-1), o coativador do fator de resposta sérica (SRF), fator MAL/miocardina de transcrição relacionado (MRTF) à leucemia megacarioblástica-1 (MKL1) (MRTF/MKL1), o receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ PPAR γ , β -catenina e fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α) (KIM *et al.*, 2018).

1.8 Adesão Focal (FA) e Quinase de Adesão Focal (FAK)

As extremidades das fibras de estresse, local onde se encontram as adesões focais, fazem contato com a matriz extracelular por meio da membrana plasmática. Essa ligação transmembranar envolve membros da família das integrinas de receptores de adesão transmembrana (HU; LUO 2013). As integrinas ligam-se diretamente à matriz extracelular fora da célula e utilizam um conjunto de proteínas adaptadoras para ligar os filamentos de actina dentro da célula (WEHRLE-HALLER, 2012).

A quinase de adesão focal (FAK, do inglês *Focal Adhesion Kinase*), é uma tirosina quinase citoplasmática que se encontra colocalizada com outras integrinas e proteínas, como talina, α -actinina, vinculina, zixina, paxilina nas FAs (**Figura 8**), a qual tem sua atividade controlada pela adesão celular (SCHALLER; PARSONS, 1994; SCHLAEPFER *et al.*, 1999).

Acredita-se que as adesões focais funcionam como conexões entre o citoesqueleto e a MEC (Matriz Extracelular) que conferem integridade, bem como sendo organelas de sinalização permitindo então que as células possam sentir seu ambiente e o que acontecem a seu redor por meio de integrinas de ligação com a finalidade de adaptação da célula à condição do ambiente externo (REN *et al.*, 2000;

WEHRLE-HALLER 2012).

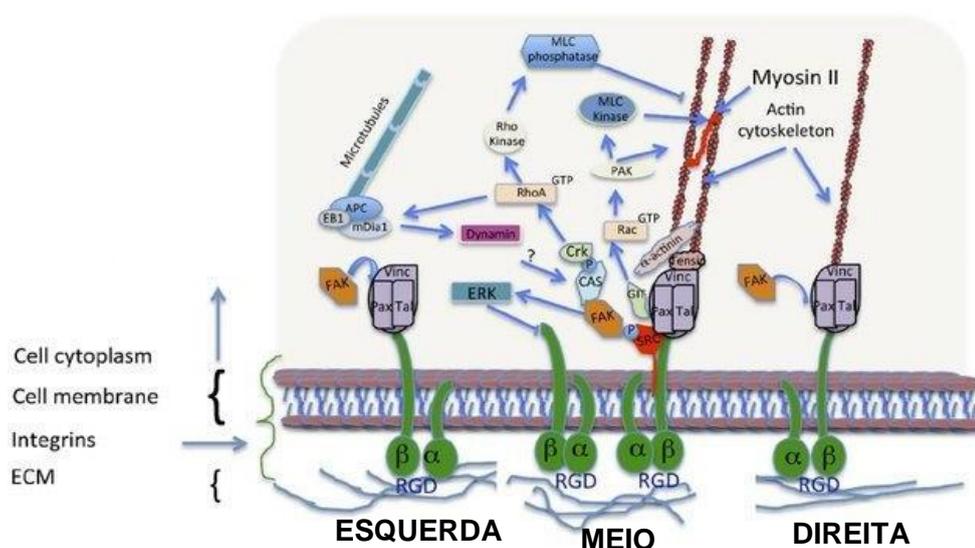


Figura 8 — Formação e maturação de adesão focal (FA). As aderências imaturas, formadas após a ligação da integrina (à direita), estão conectadas ao citoesqueleto de actina através de um complexo proteico envolvendo proteínas de ligação como α -actinina, vinculina (Vinc) e talina (Tal). Adaptadores de sinalização, FAK e paxilina (Pax), são recrutados para esses complexos focais (meio). A formação de FA ativa Rac, promovendo assim a polimerização da actina e inibindo o acoplamento da miosina II no lamelipódio. Esses processos são necessários para a montagem e desmontagem de diferentes aderências durante o movimento celular. A ativação de RhoA é necessária para a formação de FA e agrupamento de actina devido ao aumento da atividade da miosina II. Após a desmontagem do FA, a dinamina está envolvida na internalização das integrinas e no direcionamento dos microtúbulos. **Fonte:** TSIMBOURI, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26193326/>>. Acesso em 9 jul. 2023.

Filamentos de actina nas proximidades de uma adesão focal são uniformemente orientados com suas extremidades em direção a membrana plasmática, neste caso a borda da célula (SANGER; SANGER, 1980). Essas extremidades não têm limites e podem incorporar subunidades de actina, provavelmente devido à atividade de VASP (do inglês *Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*) que é altamente enriquecida em adesões focais, e está envolvida no remodelamento do citoesqueleto de actina (KWIATKOWSKI *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2014; SVITKINA, 2018).

O alongamento que ocorre nas adesões focais pode ajudar a manter a conexão de filamentos de actina com membrana plasmática através de forças de tração que são exercidas pela miosina II. As regiões que contêm as fibras de estresse conectadas com as adesões focais são ricas em α -actinina, mas raramente contêm a miosina II (SANGER; SANGER, 1980).

A depleção de FAK, em camundongos, causa hiperativação de RhoA, levando ao rompimento das junções aderentes e, como consequência, ocorre a disfunção da barreira endotelial pulmonar (SCHMIDT *et al.*, 2013). Taoufiq e colaboradores, em 2008, demonstraram que a adesão de eritrócitos infectados com *P. falciparum* em células endoteliais pulmonares humanas promovem a ativação da sinalização de Rho-GTPase (TOUAFIQ *et al.*, 2008).

A expressão tanto reduzida quanto aumentada de FAK, está ainda ligada com a quantidade de FAs presente nas células e com a migração. Quanto menor a expressão de FAK, maior a quantidade de FAs e, conseqüentemente, a redução da migração celular; em contrapartida, quanto maior a expressão FAK, maior é a migração celular (ILIC *et al.*, 1995; SIEG *et al.*, 1999). Tal evento ocorre pelo fato de que a Rho induz a formação de FAs e a ativação de FAK (KUMAGAI *et al.*, 1993). A FAK por sua vez induz a uma desregulação de Rho, que controla a estabilidade de FAs. Ainda, a FAK é necessária para inibição de Rho e promove o turnover de FA e adesão celular (REN *et al.*, 2000). Estas modificações podem levar a alterações da adesão de células endoteliais, ocasionando uma hiperpermeabilidade, como demonstrado por Taoufiq e colaboradores (2008).

As junções aderentes são o principal tipo de adesão célula-célula dependente do citoesqueleto de actina. Estas interações célula-célula nas junções aderentes são mediadas principalmente por membros da família das caderinas de receptores de adesão e estabilizados pelo citoesqueleto de actina (YONEMURA *et al.* 1995).

1.9 Fibras de tensão ou estresse e sua interação com a membrana plasmática

Na década de 1930, estudos revelaram, por meio de microscopia de contraste de fase, as chamadas “fibras de estresse” em células cultivadas ou linhas de fase escura ligeiramente curvas que abrangem a célula e parecem estar sob tensão (**Figura 9**) (BUCKLEY; PORTER, 1967). Análises posteriores mostraram que as fibras de estresse são constituídas de feixes mistos de actina e filamentos bipolares de fibras não musculares de miosina II, as quais se contraem ou exercem uma tensão isométrica, onde há uma contração, porém, sem gerar qualquer tipo de movimento (BURRIDGE; WITTCHEN, 2013).

A organização estrutural das fibras de estresse em células não musculares,

mostra uma leve semelhança com os sarcômeros musculares estriados, visto que a miosina II não muscular se ordena ao longo das fibras de estresse (WEBER; GROESCHEL-STEWART, 1974). Outra diferença entre as células não musculares e os sarcômeros é a organização dos filamentos de actina nas fibras de estresse, os quais têm comprimentos definidos, polaridades estritamente alternadas, interagindo somente com um conjunto de filamentos de miosina II, os quais são ricos em tropomiosina (HUXLEY, 1957; LAZARIDES, 1976).

A ocorrência de alongamento nas adesões focais pode ajudar a manter a conexão de filamentos de actina com membrana plasmática na presença de forças de tração exercidas pela miosina II (VICENTE-MANZANARES *et al.*, 2009). Regiões de fibras de estresse associados com adesões focais são enriquecidos em α -actinina mas, raramente contêm miosina II. Além disso, aderências focais contêm um grande número de proteínas sinalizadoras, que transmitem informações sobre a rigidez e a química da superfície subjacente da célula, para que esta possa se adaptar seu comportamento às condições externas (WEHRLE-HALLER, 2012).

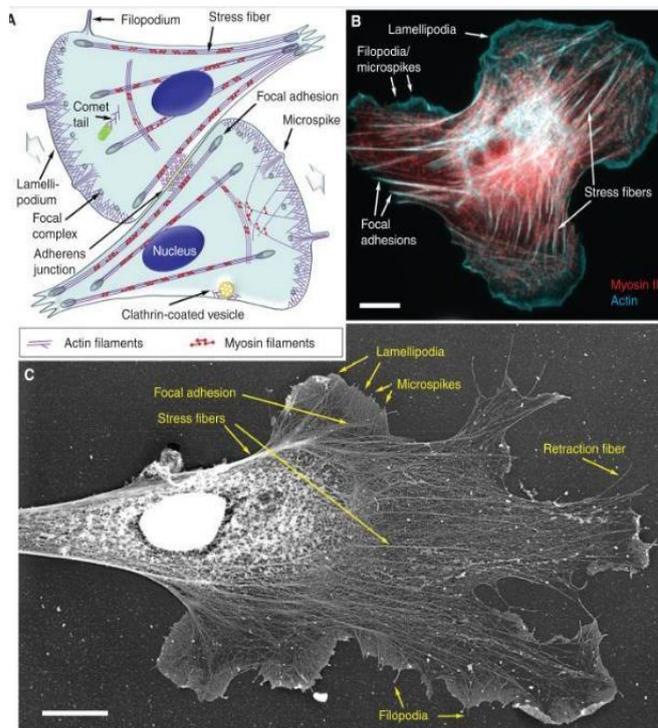


Figura 9 — Componentes do citoesqueleto de actina em células migratórias. A) Ilustração dos componentes do citoesqueleto de actina em células representantes parecidas com fibroblastos. A direção da migração celular é indicada pela seta larga e cinza; B) Micrografia de fibroblasto de embrião de rato por fluorescência mostrando os filamentos de actina (ciano) e miosina II (vermelho); C) Micrografia eletrônica do citoesqueleto de um *Xenopus laevis* preparado por sombreamento de platina após extração de detergente e secagem em ponto crítico. Componentes individuais do citoesqueleto

de actina são marcados em todos os painéis. Barras de escala: 10 nm. **Fonte:** SVITKINA, 2018. Disponível em: < <https://cshperspectives.cshlp.org/content/10/1/a018267.full.pdf>>. Acesso em: 5 out. 2022.

1.10 Septinas

Em 1971, o pesquisador Hartwell, foi o responsável por identificar pela primeira vez as septinas, que foram descobertas ao realizar-se uma análise genética em variantes da levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, e nestas, foi identificado um fenótipo que tornava impossível o término de seu ciclo celular, denominadas de mutantes CDC (do inglês, *Cell Division Cycle*) (HARTWELL, *et al.*, 1970; HARTWELL *et al.*, 1974). Em estudos conduzidos pelo próprio Hartwell e seus colaboradores evidenciaram que mutações em qualquer dos genes CDC3, CDC10, CDC11 e CDC12, originavam células multinucleadas, com ausência filamentos no septo, os quais são necessários para a separação da célula mãe e filha (BYERS *et al.*, 1976).

Mais tarde, os produtos genéticos foram observados por microscopia de fluorescência, com uma estrutura em firma de filamentos medindo 10 nm, localizada entre as células mãe e filha, os quais promovem a sua separação (**Figura 10**) (HAARER; PRINGLE, 1987; HYONG *et al.*, 1991; FIELD, 1996; GLADFELTER *et al.*, 2001; WEIRICH *et al.*, 2008). Desta forma, esta nova família de proteínas foi nomeada de septinas, devido ao seu papel no septo da célula durante a divisão celular (LONGTINE *et al.*, 1996).

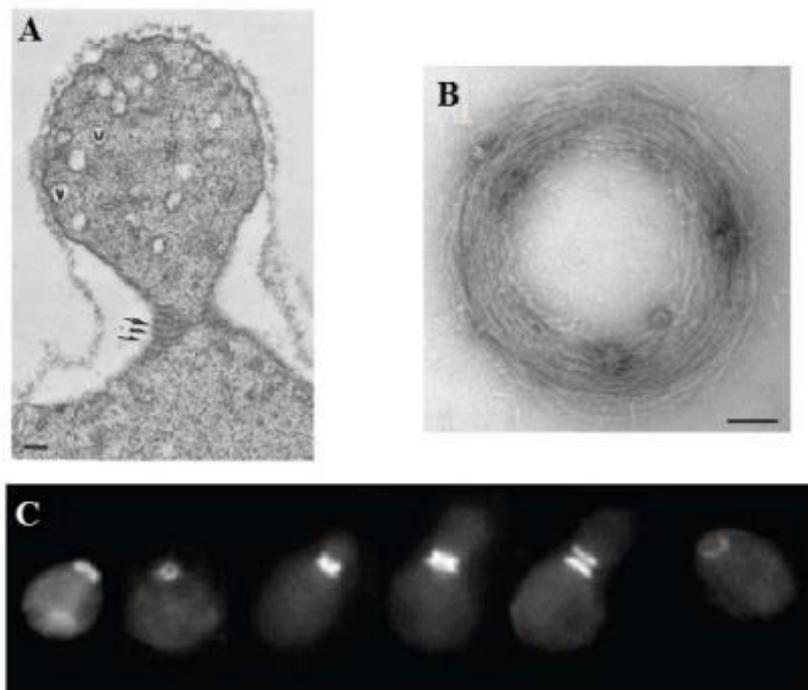


Figura 10 — Localização das septinas durante o ciclo celular. A) Microscopia eletrônica de transmissão de septinas no estágio final do processo de divisão celular de *Saccharomyces cerevisiae*; setas: localização do anel no septo. Barra de 0,1 μ m (Marques, 2010; adaptada de Byers e Goetsch, 1976); B) Complexo em forma de anel contendo septinas 2, 6, 7 de septinas humanas. Escala: 100 nm (adaptada de KINOSHITA *et al.*, 2002); C) Microscopia de fluorescência de septinas durante a citocinese de *Saccharomyces cerevisiae*. **Fonte:** DA SILVA, 2016. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-11102016-133148/publico/SabrinaMatosdeOliveiradaSilvarevisada.pdf>>.

As septinas são uma família de proteínas ligadoras de GTP, identificadas como quarto componente do citoesqueleto, interagindo com microtúbulos, microfilamentos, membrana e ligadas a um amplo espectro de funções celulares (MOSTOWY; COSSART, 2012). Encontram-se altamente conservadas podendo ser encontradas em fungos e em animais (SIDHAYE *et al.* 2011; NEUBAUER; ZIEGER, 2017).

Dentre as múltiplas funções que possuem, estão envolvidas em processos celulares como a citocinese, formação da difusão de barreiras, mudanças estruturais pela alteração da dinâmica da actina, tráfico de vesículas, exocitose, migração celular, regulação da sinalização de vias, angiogênese, autofagia de bactérias, motilidade celular, proliferação celular e regulação de microtúbulos (SIDHAYE *et al.* 2011; ZENG *et al.*, 2019).

A quantidade de genes codificantes das septinas, é variável de espécie para espécie, desde 1 em algas, como nas *Chlamydomonas* (NISHIHAMA *et al.*, 2011) a 13, como acontece com os seres humanos (Tabela 1) (ESTEY *et al.*, 2011). Esta variabilidade na quantidade de septinas codificadas, pode estar relacionado com a variabilidade funcional da espécie, como ocorre nos seres humanos (HALL *et al.*, 2005).

Organismo	Nº de Septinas	Nome
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	SEP1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7	Cdc10; Cdc3; Cdc11; Cdc12; Shs1; Spr3; Spr28
<i>Schizosacchromyces pombe</i>	7	Spn1; Spn2; Spn3; Spn4; Spn5; Spn6; Spn7
<i>Candida albicans</i>	7	Cdc3; Cdc10; Cdc11; Cdc12; Shs7; Spr3; Spr28
<i>Eremothecium gossypii</i>	7	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6; Hyp7

<i>Aspergillus nidulans</i>	5	ASPA; ASPB; ASPC; ASPD; ASPE
<i>Neurospora crassa</i>	6	Hyp1; Hyp2; Hyp3; Hyp4; Hyp5; Hyp6
<i>Caenorhabditis elegans</i>	2	UNC-51; UNC-59
<i>Drosophila melanogaster</i>	5	SEP1; SEP2; SEP3; SEP4; <i>Pnut</i>
<i>Xenopus laevis</i>	2	Hyp1; SEPT2
Mamíferos	13	SEPT1; SEPT2; SEPT3; SEPT4; SEPT5; SEPT6; SEPT7; SEPT8; SEPT9; SEPT10; SEPT11; SEPT12; SEPT14

Tabela 1 — Septinas em diferentes organismos. **Fonte:** Adaptado de DA SILVA, 2016. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-11102016-133148/publico/SabrinaMatosdeOliveiradaSilvarevisada.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2023.

As septinas são proteínas pertencentes a superclasse de GTPase das P-loop NTPases, as quais se encontram inclusas quinases, miosina e as proteínas Ras, compartilhando, dentro do domínio de ligação GTP (domínio G), pelo menos 5 motivos conservados, identificados como G1 — G5 (LEIPE *et al.*, 2002). No caso das septinas, estas possuem os domínios G1, G3 e G4 conservados, como mostrado na **figura 11A** (FIELD; KELLOGG, 1999).

O C-terminal do domínio GTPase é uma região que contém 54 aminoácidos e está conservada em muitas septinas (VALADARES *et al.*, 2017). A região C-terminal tem seu tamanho variável entre as diversas septinas existentes e formam estruturas conhecidas como *coiled-coils* (**Figura 11 A**) que têm participação nas interações septina-septina. Esta região é similar entre os mamíferos, apresentando uma leucina a cada 7 (LEONARDO *et al.*, 2021).

As septinas são classificadas em quatro subgrupos, sendo as 13 septinas dos seres humanos codificadas por 13 genes (NEUBAUER; ZIEGER, 2017), de SEPT1-12 e SEPT14. A Septina 13 é considerada um pseudogene chamado de SEPT7P2 (KINOSHITA 2003a; CS, JP, and Y 2008). Ainda, as septinas são divididas nos

subgrupos chamados SEPT2, SEPT3, SEPT6 e SEPT7, com base na homologia de sua sequência e sua estrutura de domínio (**Figura 11 B**) (MOSTOWY; COSSART 2012; NEUBAUER; ZIEGER 2017). As septinas alocadas no subgrupo SEPT2 são as SEPT1, 2, 4 e 5, que contêm dois domínios em forma de alfa hélice. O subgrupo SEPT3 estão as SEPT3, 9, e 12 que não contêm nenhum domínio em forma de alfa hélice. Já o subgrupo SEPT6 aloca as SEPT6, 8, 10,11 e 14, que contêm um domínio em forma de alfa hélice assim como o subgrupo SETP7 que aloca somente a SEPT7 que também contêm somente um domínio alfa hélice (MACARA *et al.*, 2002; C. A and M 2003) (**Figura 11 B**).

Os RNAs das septinas contêm múltiplos sítios de iniciação da tradução e são emendados alternativamente para produzir um número ainda maior de proteínas de septinas, algumas das quais são específicas de tecido (HALL *et al.*, 2005). As análises de sua similaridade de sequência de aminoácidos indicam que as septinas de mamíferos contêm domínios polibásicos e de ligação ao GTP altamente conservados permitindo a sua classificação em quatro grupos (SEPT2, SEPT3, SEPT6 e SEPT7) (KARTMANN; ROTH, 2001; KINOSHITA, 2003). Portanto, podemos dizer que as septinas são proteínas ligadoras de GTP.

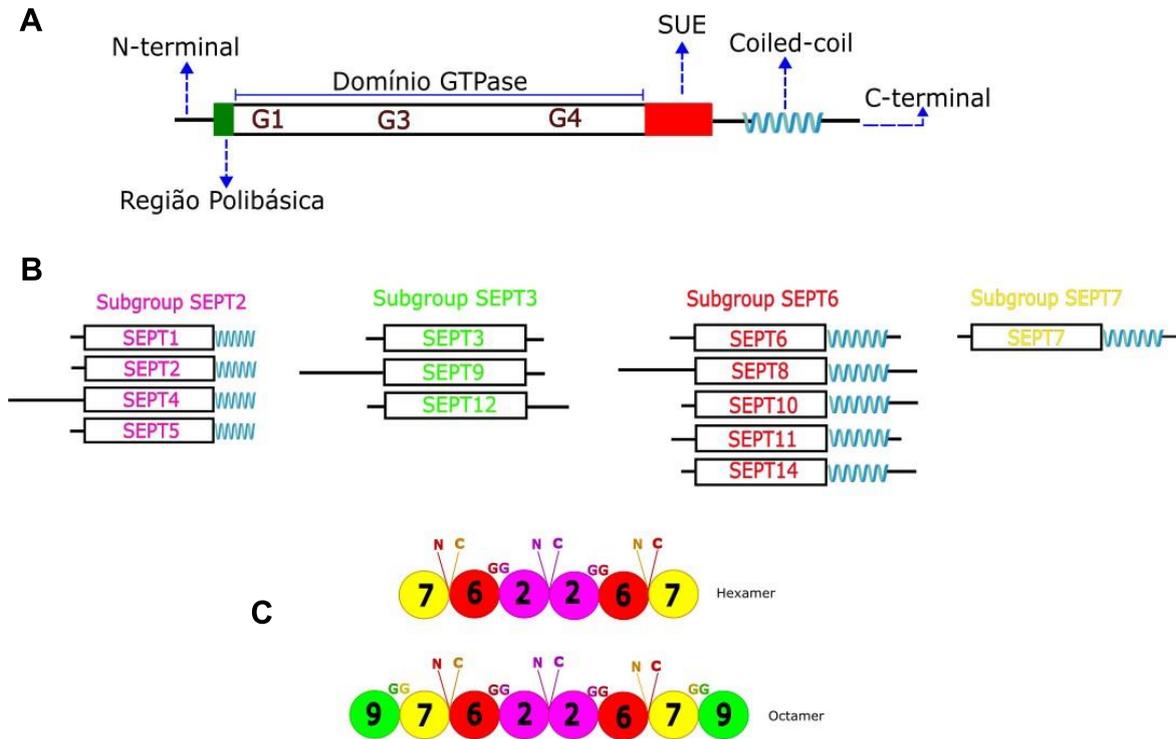


Figura 11 — Estrutura e subgrupos das septinas. A) Estrutura esquemática da septina mostrando o domínio de ligação a GTP conservado, uma região polibásica de ligação a fosfoinosita (PBR), uma septina domínio único (SUD ou SUE), domínios coiled-coil e sequência de N- e C-terminal, uma sequência de aminoácido que variam de um grupo de septina para outro; B) Esquema de como as septinas se dividem em subgrupos e as diferenças entre as septinas. **Fonte:** DA SILVA, 2016. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-11102016-133148/publico/SabrinaMatosdeOliveiradaSilvarevisada.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2023

Em camundongos, foi observado que a deleção dos genes da septina resulta em anormalidades fisiológicas, como a desregulação de secreção plaquetária em camundongos deficientes para a Sept5 (DENT *et al.*, 2002). Defeitos morfogênicos como deformidades e espermatozoides imóveis foram detectados em camundongos que não tem a Sept4 (IHARA *et al.*, 2005; KISSEL *et al.*, 2005). Em alguns casos foi observado ainda que o desenvolvimento embrionário é fatalmente prejudicado, em camundongos nocautes para Sept9. Sabe-se também que o genoma de camundongo (*Mus musculus*) codifica 13 septinas (Tabela 2) (KINOSHITA *et al.*, 2003; VERSELE; THORNER *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2007).

Organismos	Grupo SEPT2	Grupo SEPT7	Grupo SEPT6	Grupo SEPT2
<i>Homo sapiens</i>	SEPT2-Hs; SEPT4-Hs; SEPT5-Hs; SEPT1-Hs	SEPT7-Hs; SEPT13-Hs	SEPT6-Hs; SEPT8-Hs; SEPT10-Hs; SEPT11-Hs; SEPT14-Hs	SEPT3-Hs; SEPT9-Hs; SEPT12-Hs
<i>Mus musculus</i>	SEPT2-Mn; SEPT4-Mn; SEPT5-Mn; SEPT1-Mn	SEPT7-Mn	SEPT6-Mn; SEPT8-Mn; SEPT10-Mn; SEPT11-Mn; SEPT14-Mn	SEPT3-Mn; SEPT9-Mn; SEPT12-Mn
<i>Gallus gallus</i>	gi:50752104-Gg; gi:57525156-Gg; gi:71897193-Gg	gi:60302768-Gg	gi:71895629-Gg; gi:118090250-Gg; gi:118097603-Gg; gi:118084362-Gg	gi:118082695-Gg; gi:71897123-Gg
<i>Xenopus laevis</i>	gi:52354788-XI; gi:1115598420-XI	gi:49256249-XI	gi:504118014-XI; gi:51703480-XI; gi:47683059-XI; gi:68534806-XI	gi:71679814-XI; gi:34784614-XI
<i>Danio rario</i>	gi:115313325-Dr; gi:45709377-Dr; gi:125836845-Dr; gi:82658250-Dr; gi:57524587-Dr; gi:41152396-Dr	gi:115313325-Dr; gi:45709377-Dr; gi:125836845-Dr; gi:82658250-Dr; gi:57524587-Dr; gi:41152396-Dr	gi:47086783-Dr; gi:32822794-Dr; gi:134133316-Dr; gi:62955083-Dr	gi:66773110-Dr; gi:62122803-Dr; gi:125812510-Dr

<i>Cioma intestinalis</i>	gi:19842895 6-Ci	gi:19843654 9-Ci	gi:19843276 5-Ci	gi:19841720 1-Ci
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	gi:11595149 9-Sp	gi:11572018 7-Sp	gi:11577037 0-Sp	gi:11571538 7-Sp
<i>Drosophila melanogaster</i>	Sep1-Dm Sep4-Dm	Pnut-Dm	Sep2-Dm; Sep5-Dm	
<i>Caenorhabditis elegans</i>		Unc-61	Unc-59	

Tabela 2 – Informações de agrupamento das septinas em metazoários. **Fonte:** Adaptado de CAO, L. *et al.*, 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-009-0087-2>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

Em humanos, evidências crescentes ligaram anormalidades na expressão de septinas ao câncer e a uma variedade de outras doenças, resumidamente descritas na tabela 3 (HALL; RUSSELL, 2004). Atualmente, a septina 9 metilada é considerada um biomarcador para câncer colorretal (SONG; LI, 2015).

Septina humana	Perfil de expressão	Doenças
SEPT1	Cérebro, linfócitos e outros	Alzheimer, leucemia e linfoma
SEPT2	Cérebro, linfócitos e outros	Alzheimer, fígado e renal, síndrome de Von Hippel-Lindal e infecções de <i>Listeria</i>
SEPT3	Específica de cérebro	Cancer de cérebro e doença de alzheimer
SEPT4	Cérebro, testículo e olhos	Doença de alzheimer, cânceres de pele, urogenital e de colo; leucemia e infertilidade masculina
SEPT5	Cérebro, olhos e plaquetas	Leucemia, mal de Parkinson, esquizofrenia e câncer pancreático
SEPT6	Expressa ubiquamente	Esquizofrenia, leucemia e

		hepatite C
SEPT7	Cérebro e testículo	Cânceres do Sistema nervoso e infertilidade masculina
SEPT8	Cérebro, retina e outros	Degeneração da retina
SEPT9	Expressa ubiquamente	Amiotrofia neurológica hereditária, leucemia, cânceres de mama, ovário, colorretal, cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin e infecções de <i>Shigella</i> e <i>Listeria</i>
SEPT10	Expressa ubiquamente	-
SEPT11	Expressa ubiquamente	Esquizofrenia, desordem bipolar, leucemia e infecções de <i>Shigella</i> e <i>Listeria</i>
SEPT12	Linfócitos e testículos	Infertilidade masculina
SEPT14	Expressa ubiquamente	Câncer nos testículos

Tabela 3 – Perfil de expressão de septinas e as doenças relacionadas. Fonte: DA SILVA, 2016. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-11102016-133148/publico/SabrinaMatosdeOliveiradaSilvarevisada.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2023

As septinas de mamíferos localizam-se não apenas na membrana plasmática, mas também no citoplasma, com os microtúbulos e citoesqueletos de actina (Figura 12). Estudos sugerem que as septinas de mamíferos funcionam na organização do citoesqueleto, atuando como andaimes para proteínas de ligação ao citoesqueleto., (SPILIOTS; GLADFELTER, 2012).

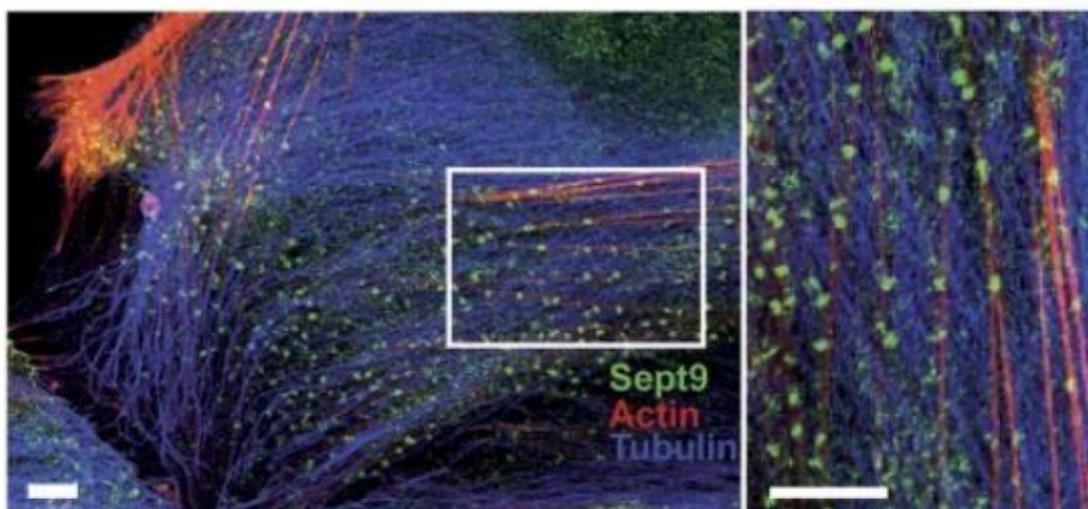


Figura 12 — Imunomarcação com anticorpo pan-Sept9 nas fibras de estresse de actina. Marcação em célula HUVEC (*Human Umbilical Vein Endotelial Cell*). As barras brancas correspondem a 10 μm . **Fonte:** Verdier-Pinard *et al.*, 2017. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/srep44976>>. Acesso em: 2 set. 2022

Conjuntos citoplasmáticos de isoformas de septina frequentemente se encontram co-localizadas com filamentos de actina e microtúbulos, exceto a isoforma 5 (SISSON *et al.*, 2000; VERDIER-PINARD *et al.*, 2017). Filamentos de septinas foram também relatados *in vivo* com a actina (KINOSHITA *et al.*, 1997, KINOSHITA *et al.*, 2002, ITO *et al.*, 2005) e também com a tubulina (KINOSHITA, 2006; SPILIOTIS *et al.*, 2005; FINGER *et al.*, 2003; KREMER *et al.*, 2005). O primeiro indício da interação de septinas com os microtúbulos, ocorreu em septinas Pnut, Spet1 e Sept2 de drosófilas, *in vitro*, onde foi observada sua ligação com os microtúbulos (SISSON *et al.*, 2000).

As septinas de leveduras e mamíferos associam-se a membranas biológicas através da região polibásica conservada no terminal N do domínio de ligação ao GTP (SPILIOTIS; GLADFELTER, 2012). Estas moléculas se associam às membranas das células, à actina e aos microtúbulos, estando envolvidas em processos que ocorrem no córtex celular, necessitando de organização e alteração espacial, como o processo de citocinese (SPILIOTIS; NELSON, 2005), ciclo celular, formação de barreiras de difusão, alinhamento de fuso (HUANG *et al.*, 2006), excitose (KUSCH *et al.*, 2002), além de determinar e manter a polaridade da célula (FATY *et al.*, 2002; SPILIOTIS; NELSON, 2009). As septinas também estão envolvidas em tumores de mama (KALIKIN *et al.*, 2000; MONTAGNA *et al.*, 2003), ovário (SCOTT *et al.*, 2006), cérebro (SAKAI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004) entre outros (OSAKA *et al.*, 1999; SORENSEN *et al.*, 2000; RUSSELL; HALL, 2005; CERVEIRA *et al.*, 2006; ROESELER *et al.*, 2009)

e ainda estão associadas a neuropatologias (CALTAGARONE et al., 1998; TODA et al., 2000; KIM et al., 2004; SIMANTOV; PENG, 2004).

A expressão irregular das septinas está relacionada à doença de Parkinson e Alzheimer (HALL et al., 2008). Diversas evidências sugerem o envolvimento das septinas em doenças infecciosas, em virtude do processo de locomoção dos patógenos intracelulares e invasores, o qual é dependente da interação agente infeccioso e citoesqueleto celular (GRUENHEID; FINLAY, 2003; SIBLEY, 2004). Em mamíferos e *in vivo*, as septinas podem ainda ser encontradas em conjunto, formando complexos homo e hetero-oligoméricos compostos por diferentes membros de um mesmo subgrupo, contudo, informações sobre as agregações de filamentos ou como estes são regulados ainda é muito escassa (KINOSHITA, 2003; KOH-ICHI et al., 2004; HUANG et al., 2006). Associações heterotípicas das septinas são documentadas entre diferentes espécies, compostas por três ou quatro diferentes polipeptídios que se associam para formar filamentos (NEUFELD; RUBIN, 1994; LONGTINE et al., 1998; JOBERTY et al., 2001; MARTINEZ et al., 2004; LOW; MACARA, 2006).

O C-terminal é descrito por alguns autores em duas regiões distintas, sendo uma delas um elemento característico de septinas (Septin-Unique Element, SUE) e outra região em *coiled-coil*. Diferente das demais septinas existentes as SEPT3, SEPT9 e SEPT12 não possuem o domínio *coiled-coil* (VALADARES et al., 2017). Investigações estruturais dos filamentos de septinas têm mostrado que o SUE faz parte do domínio GTPase.

As septinas formam complexos lineares hetero-oligoméricos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em forma de bastões associando-se umas às outras (**Figuras 13A e B**). Esta interação ocorre de ponta a ponta formando longos polímeros, que assim dão origem a filamentos extremamente ordenados, compreendidos em diversos processos biológicos (MARQUES, 2010). Apesar de relatada a formação de filamentos fisiológicos partindo de uma única septina (MENDOZA et al., 2002; HUANG et al., 2006), parte significativa dos filamentos são hetero-oligoméricos, sendo estes formados por duas ou mais diferentes septinas (DA SILVA, 2016).

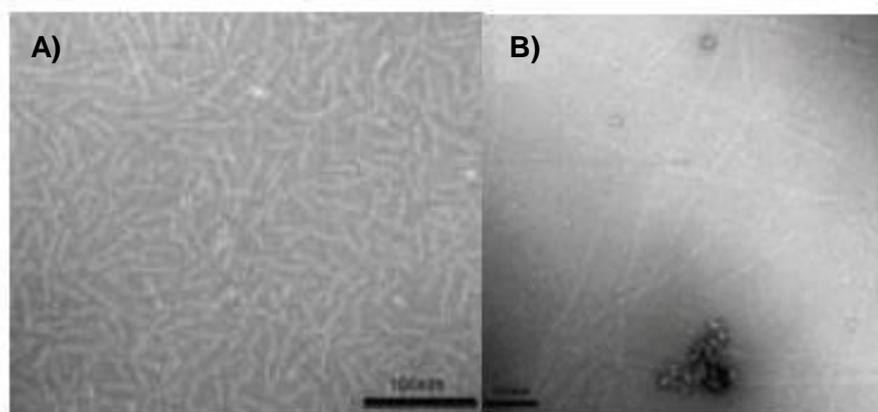


Figura 13 — Filamentos de Septinas. A e B) Formação de filamentos em *S. Cerevisiae*, mostrando os bastões hetero-oligoméricos altamente ordenados. Imagem de alta ampliação mostrando em detalhes bastões e o alinhamento entre eles. **Fonte:** DA SILVA, 2016. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-11102016-133148/publico/SabrinaMatosdeOliveiradaSilvarevisada.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2023

Apesar da existência de evidências sobre a formação homofilamentos de septinas (**Figura 14**), ainda não está elucidada qual a sua função, e se este processo é fisiológico ou patológico (DA SILVA, 2016). Foram observados homofilamentos tanto de SEPT2 quanto de SEPT4 humanas, tanto na presença da conformação GDP quanto GTP (HUANG *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2007). Referente aos homofilamentos formados pela SEPT4, os autores dizem se tratar de homofilamentos do tipo amiloide, relacionados a doenças degenerativas como mal de Parkinson e Alzheimer, em virtude de sua presença e identificação no cérebro de pacientes com Alzheimer (HALL *et al.*, 2008).

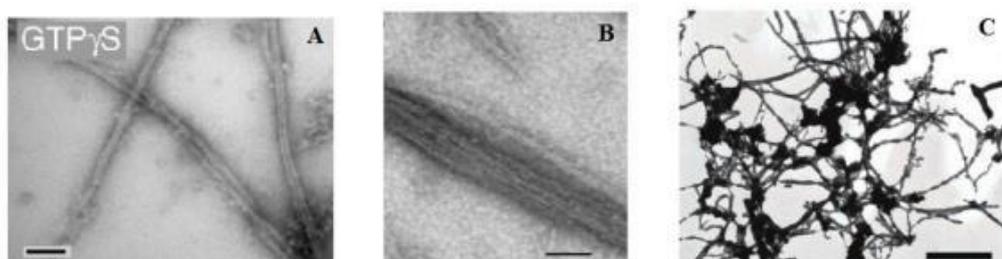


Figura 14 — Homofilamentos de septinas. A) Sept2 de *Xenopus laevis* na presença de GTP γ S; B) SEPT2 humana na presença de GTP; C) SEPT4 humana na presença de GTP. Barra: 100 nm. **Fonte:** DA SILVA, 2016. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-11102016-133148/publico/SabrinaMatosdeOliveiradaSilvarevisada.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2023

A primeira e única estrutura de um complexo de septina descrita até o momento, foi determinada em 2007 por Sirajuddin e colaboradores, através de cristalografia, a uma resolução de 4 Å (FARKASOVSKY *et al.*, 2005), consistindo em um complexo formado pelas septinas humanas SEPT2, SEPT6 e SEPT7, co-expressa

em *E.coli*, o qual tornou possível a dedução da ordem em que as septinas se encontravam distribuídas ao longo do filamento. Foi observada a formação de um hexâmetro com uma distribuição básica das subunidades supracitadas, que se organizam em: SEPT7-SEPT6-SEPT2- SEPT2-SEPT6-SEPT7 (**Figura 15**), a partir desta descoberta, este complexo que é considerado apolar, é então utilizado como modelo para o estudo da formação de filamentos pelas septinas (DA SILVA, 2016).

O complexo 2, 6 e 7 das septinas tem predileção em interagir com proteínas de grupos distintos para a formação dos heterofilamentos. Em 2003, Kinoshita, evidenciou a viabilidade outras combinações de septinas para a formação de um heterofilamento desde que nessas três posições ocupadas pela SEPT2, SEPT6 e SEPT7 as substituições se ocorrem apenas por septinas pertencentes a um mesmo grupo. Tomando como exemplo a septina 2, é esperado que esta seja substituída pelas septinas 1, 4 ou 5, visto que todas pertencem ao grupo III. Já considerando a septina 6, esta seria substituída pelas septinas, 8, 10, 11 e 14. Quanto a septina 7, é considerada uma septina chave, pelo fato de ser insubstituível, de acordo com a regra de substituição e, que esta é a única em seu grupo. Contudo, não se sabe como este complexo funciona para as septinas do Grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12), e como estas fazem parte do mesmo. No decorrer dos anos, foram revelados outros complexos de septinas, porém sem riqueza de detalhes e com informações estruturais de baixa resolução (KINOSHITA, 2003).

As septinas estão ainda relacionadas às enfermidades, como demonstrado resumidamente na tabela 3 (KINOSHITA *et al.*, 1998; KEIICHI *et al.*, 2002; MARGUTTI *et al.*, 2005; CERVEIRA *et al.*, 2006; CRAVEN *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2006a; PETERSON; PETTY, 2010). Na maioria dos casos reportados, a associação de septinas com neoplasias estão relacionadas com alterações no padrão de expressão dessas proteínas (YU *et al.*, 2000; BURROWS *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004).

111 Formação de filamentos de septina por via de sinalização das Rho GTPases

Estudos ainda vinculam a sinalização de Rho à regulação da formação dos filamentos de septina, na qual a expressão de Rho constitutivamente ativa interrompe a organização dos filamentos de SEPT9_v3 α (SEPT9b). ITO e colaboradores, em

2005, identificaram a Rhotekin, uma efetora da Rho, controlando a montagem dos filamentos de septina, encontrados co-localizados com os filamentos de actina (ITO *et al.*, 2005). Além disso, a Rhotekin acompanha SEPT9_v3 α durante a montagem e desmontagem dos filamentos de actina, em resposta à ativação das proteínas G acopladas a receptores e sinalização Rho. Ao contrário da Rhotekin, que não se liga diretamente para SEPT9_v3 α , um RhoGEF associado à septina (SA-RhoGEF) demonstrou ser um parceiro de ligação SEPT9_v3 α direto, cuja superexpressão leva à interrupção de polímeros SEPT9_v3 α (NAGATA; INAGAKI, 2005).

1.12 Co-localização da actina e septina

Em diversos tipos celulares, os filamentos de actina encontram-se co-localizados a polímeros de septina e ambos formam redes que são estruturalmente interdependentes. A despolimerização da actina resulta na perda das suas fibras e a depleção de septina, que por sua vez, leva à perda dos filamentos de actina. A interdependência funcional das septinas e da actina tem sido difícil de analisar. (VERDIER-PINARD, 2017). Kinoshita e colaboradores descobriram que a reconstituição do conjunto de septinas filamentosas requer feixes de F-actina e anilina, uma proteína de agregação de actina que liga as septinas à actina (KINOSHITA *et al.* 2002).

A anilina é sequestrada principalmente para o núcleo durante a interfase, Rhotekin e/ou SA-RhoGEF poderiam estar envolvidos na montagem dos feixes de actina, mas o mecanismo exato é desconhecido (ITO *et al.*, 2005). Por outro lado, a ligação de SEPT9_v3 α a SA-RhoGEF, um ativador de Rho, inibe a ativação desta, implica na regulação da montagem da actina (NAGATA; INAGAKI, 2005).

1.13 Septina 9

Estudos sugerem a SEPT9 como uma componente do complexo SEPT2-SEPT6-SEPT7, o qual forma octâmeros, apesar da sua posição dentro deste complexo ainda ser desconhecida. É sugerido por alguns autores que a SEPT9 ocupa a posição terminal de um complexo octamérico, organizado em SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2- SEPT6-SEPT7-SEPT9 (**Figura 15B**) (KIM *et al.*, 2011; SANDROCK *et al.*, 2011; SELLIN *et al.*, 2011).

Dentre todas as septinas conhecidas, até o momento a SEPT9 está relacionada com um maior número de doenças. Expressa ubiquamente em todos os tecidos, sendo esta a sua diferença da SEPT3, pertencente ao mesmo grupo, e específica de tecido de cérebro (HALL *et al.*, 2005b). Apesar de seu extenso N-terminal, ela se encontra alocada no Grupo I (SEPT3, SEPT9 e SEPT12) devido à inexistência da região *coiled-coil* (CAO *et al.*, 2009). Filamentos de septinas formam octâmeros com a incorporação da SEPT9 na formação hexamérica, interagindo com a SEPT7 por meio da interface G (**Figura 15B**). Porém, a importância da SEPT9 não está definida, devido à ausência da definição de sua estrutura de hetero complexo (KIM *et al.*, 2011; SELLIN *et al.*, 2011).

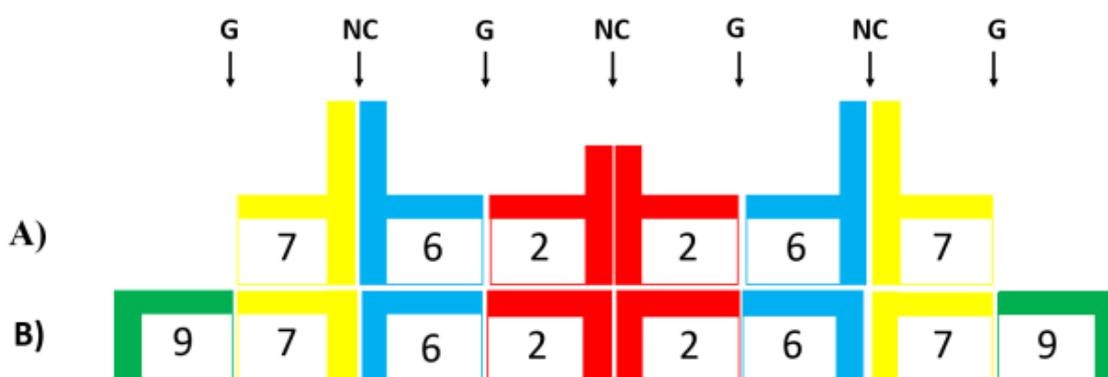


Figura 15 — Modelo esquemático de complexos de septinas em hexâmeros e octâmeros. A) Heterocomplexo 2/6/7; B) Complexo canônico com a adição de SEPT9 na extremidade. **Fonte:** DA SILVA, 2016. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-11102016-133148/publico/SabrinaMatosdeOliveiradaSilvarevisada.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2023

Existem estudos mostrando que a SEPT9 pode contribuir para a formação de complexo de septinas triméricas (DA SILVA, 2016). A SEPT9 pode substituir a SEPT2, formando então um trímero de SEPT9-SEPT6-SEPT7 (SANDROCK *et al.*, 2011). Ainda sobre a interação entre as septinas, Nakahira e colaboradores, em 2010, em experimento *in vivo*, identificaram 96 clones, mostrando interação entre SEPT9 e SEPT6, fortalecendo os estudos anteriores (DA SILVA, 2016; SANDROCK *et al.*, 2011). Outro fato sobre esta hipótese é a falta do C-terminal em SEPT9, o qual é reduzido em SEPT2 quando comparado a outras septinas (NAKAHIRA *et al.*, 2010; DA SILVA, 2016). A existência desses complexos foge à regra de Kinoshita, 2003, a qual estabelece que somente as septinas pertencentes ao mesmo grupo podem se substituir, como no caso da SEPT2 que pertence ao grupo SEPT3 e, teoricamente, só poderia ser substituída por SEPT1, SEPT4 e SEPT5.

A SEPT9 é a septina que possui maior quantidade de isoformas, apresentando um *locus* genômico muito complexo, observado através de sequenciamento, e evidenciado pela capacidade de gerar até 47 transcritos, sendo 34 desses codificantes de proteínas (MCILHATTON *et al.*, 2001). Esses múltiplos transcritos, codificam 7 isoformas (SEPT9_v1 - SPET9_v7), contendo as mesmas estruturas de uma septina comum, ou seja, N- e C-terminal e domínio GTPase, variando principalmente no domínio N-terminal (KALIKIN *et al.*, 2000; SCOTT *et al.*, 2005; BURROWS *et al.*, 2003). Porém, não está biologicamente explícita a razão biológica desses diversos transcritos (MONTAGNA *et al.*, 2003). Contudo, estudos da expressão gênica da SEP9 mostram diferenças da expressão das isoformas, podendo ser um indicativo de funções distintas em células diferentes (CONNOLLY *et al.*, 2014).

Apesar dos avanços no campo de pesquisas envolvendo as septinas, o mecanismo exato pelo qual SEPT9 está diretamente ligada uma variedade de funções celulares e, envolvida em inúmeras enfermidades, ainda é desconhecido (DA SILVA, 2016).

As informações acima descritas sobre a septina 9 são voltadas para as septinas em humanos, exceto a parte das funções, a qual não foram encontradas informações que as diferenciam entre o camundongo e o ser humano. No presente trabalho, a septina 9 é representada pela sigla SEPT9 quando refere-se a proteína e, *SEPT9* para o gene no ser humano. Já para os camundongos, de forma geral, a sigla utilizada para a nomeação da septina 9 é a Sept9 para a proteína e *Sept9* para o gene (HALL *et al.*, 2008). Quando a informação for genérica, será adotada a sigla para humanos (SEPT9).

Outra diferença a ser considerada é a localização da SEPT9, que no ser humano seu gene está localizado no cromossomo 17, e de uma forma mais precisa localiza-se 17q25.3 (KALIKIN *et al.*, 2000; RUSSELL *et al.*, 2000). O cromossomo 17 é ortólogo do cromossomo 11, presente em camundongos, onde está localizado o gene da septina 9 (*Sept9*) (MONTAGNA *et al.*, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Em resultados anteriores, foi demonstrado que eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA (EP-PbA) induzem aumento da permeabilidade vascular em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 (CEPP-DBA/2) (ORTOLAN *et al.*, 2019). Foi também observado que os EP-PbA induziram a ativação de RhoA, quando comparadas com as células endoteliais não estimuladas e com aquelas estimuladas com eritrócitos não parasitados (EnP), uma vez que o sinal de ativação desta Rho-GTPase foi cerca de duas vezes maior nas CEPP-DBA/2 expostas a EP-PbA (**Figura 16A**). Porém, não foi observada alteração na expressão proteica de Rho-GTPases totais (dados não mostrados), apesar de ocorrer aumento significativo na razão RhoA/Cdc42, sugerindo ativação de RhoA e inativação de Cdc42 (**Figuras 16B e 16C**).

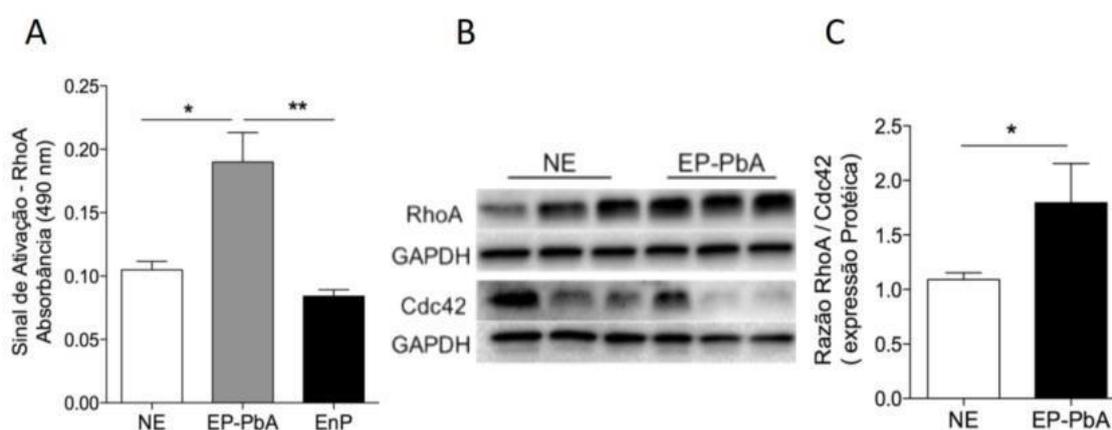


Figura 16 – Eritrócitos parasitados com *P. berghei* ANKA promovem a ativação de RhoA em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. A) Ativação de RhoA mensurada por G-LISA™ (Cytoskeleto - Cat. #BK124-S); B) Expressão proteica de RhoA, Cdc42 e GAPDH de seis amostras, realizada por Western Blot e revelada por quimioluminescência; C) Quantificação relativa de RhoA/Cdc42 das amostras de (B). EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas. **Fonte:** Debone, 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9142/tde-18102017144835/publico/Daniela_Debone_ME_Corrigida.pdf>. Acesso em: 4 set. 2021.

Neste modelo, foi ainda demonstrado que os EP-PbA promoveram redução de FAK fosforilada nas CEPP-DBA/2, evidenciado pela fraca marcação e menor concentração, especialmente no perímetro celular. Por outro lado, as células não estimuladas apresentaram maior quantidade de FAK fosforilada, distribuídas regularmente pelo citoplasma, porém mais intensamente na região periférica (**Figura 17**).

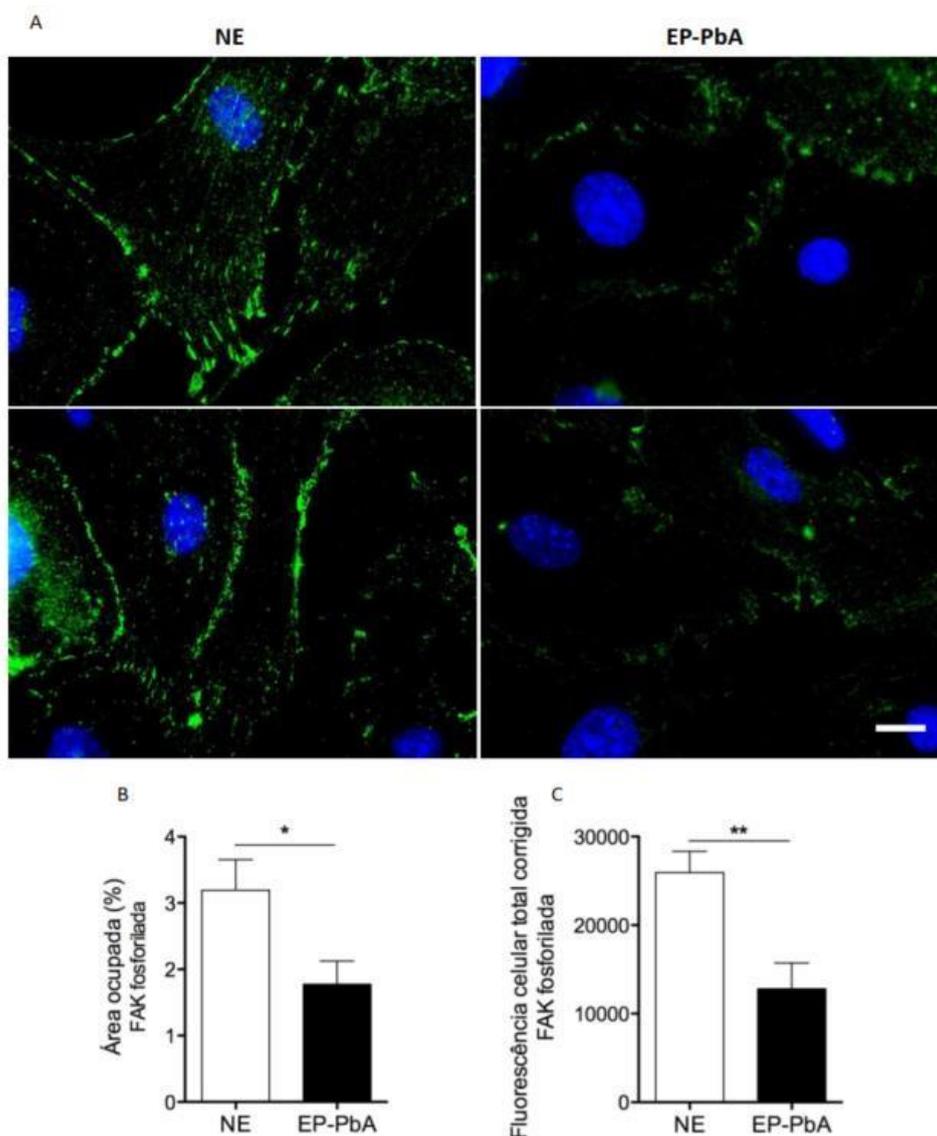


Figura 17 – Eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA induzem as alterações morfológicas e reorganização espacial de FAK fosforilada em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2. A) Imunofluorescência para FAK realizada com o anticorpo primário policlonal rabbit anti-FAK-phospho-Tyr576/Tyr577 [1:100]; B e C) Quantificação da área ocupada e fluorescência corrigida analisada pelo ImageJ. Núcleos celulares marcados, em azul, com Hoechst [1:1000]. EP-PbA: eritrócitos parasitados com esquizontes de *P. berghei* ANKA; NE: não estimuladas; FAK: quinase de adesão focal; Barra de escala: 15 μ m. **Fonte:** Debone, 2017. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9142/tde-18102017-144835/publico/Daniela_Debone_ME_Corrigida.pdf. Acesso em: 4 set. 2021.

Em resultados anteriores, foi demonstrado também que eritrócitos parasitados por *P. berghei* ANKA induzem a fosforilação da cadeia leve da miosina, alteração da actina e de microtubulos em células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2 (DEBONE, 2017). Por meio de análise proteômica em larga escala, dados recentes revelaram a regulação de 187 e 209 de proteínas em tecido pulmonar de camundongos DBA/2 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA ao 7^o e 9^o DPI, comparados com animais não infectados, respectivamente (dados não

publicados). Trinta e duas proteínas foram detectadas somente no grupo que desenvolveu SDRa, sendo 5 somente no 7^o DPI, entre elas de Septina 9 (**Figura 18A**).

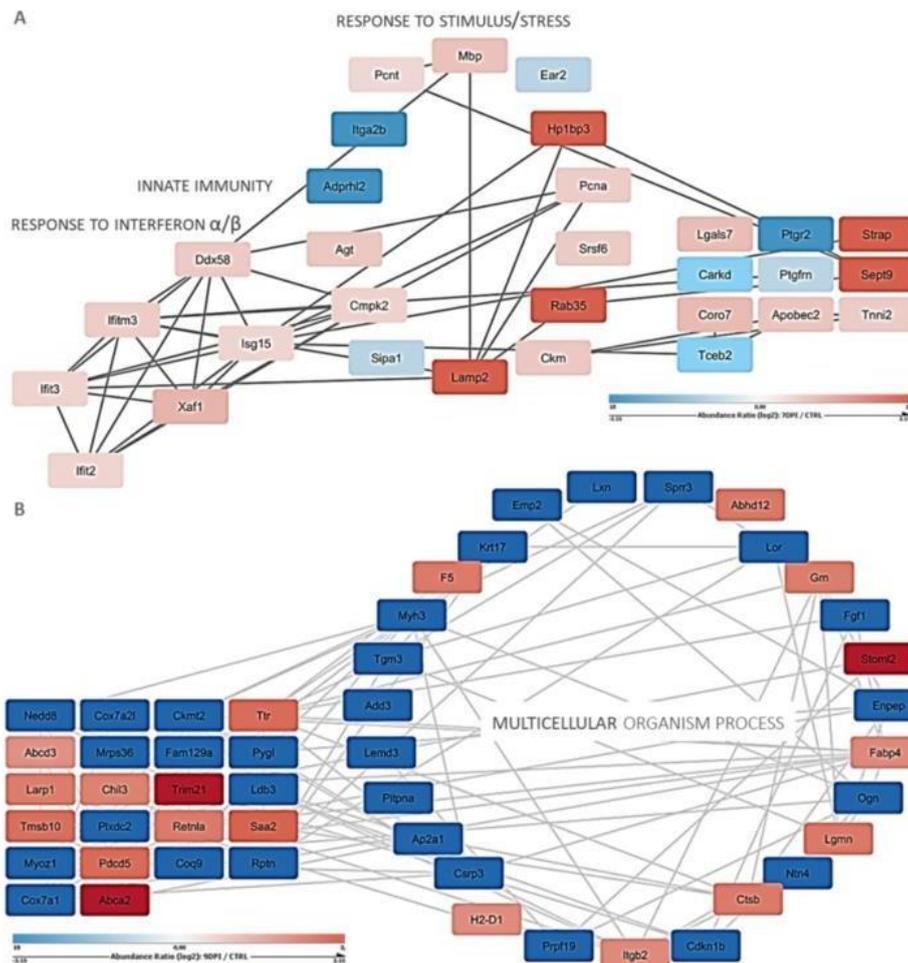


Figura 18 – A quantificação relativa das proteínas pulmonares em camundongos DBA/2 que desenvolveram SDRa associada à malária, em comparação com o controle não infectado que demonstrou diferentes perfis de enriquecimento no 7^o dpi e no 9^o dpi. A) Proteínas reguladas apenas no 7^o dias pós-infecção (dpi) em comparação com os controles foram enriquecidas para resposta ao estímulo/estresse e imunidade inata, principalmente resposta ao interferon α/β ; B) Proteínas reguladas apenas no 9^o dpi em comparação com os controles foram enriquecidas para o processo de organismo multicelular. **Fonte:** Lívia Rosa Fernandes; Giuseppe Palmisano (Resultados não publicados).

Foi demonstrado que a septina 9 promove rearranjos do citoesqueleto e turnover de adesões focais ao direcionar a sinalização Rho/ROCK e FAK *in vitro* em câncer de mama. Como acima demonstrado, resultados anteriores apontaram o aumento da permeabilidade vascular quando eritrócitos infectados entram em contato com células endoteliais, especialmente via ativação de RhoA e alteração da FAK (DEBONE, 2017) corroboraram com o apresentado por Zang-Edou e colaboradores, 2010, que demonstraram que a adesão de eritrócitos infectados com *P. falciparum* ativa diretamente a via de sinalização RhoA/ROCK. Portanto, hipotetizamos que a septina 9 possa ser uma molécula chave na contração do citoesqueleto, e consequentemente,

na patogênese da SRDA associado à malária.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

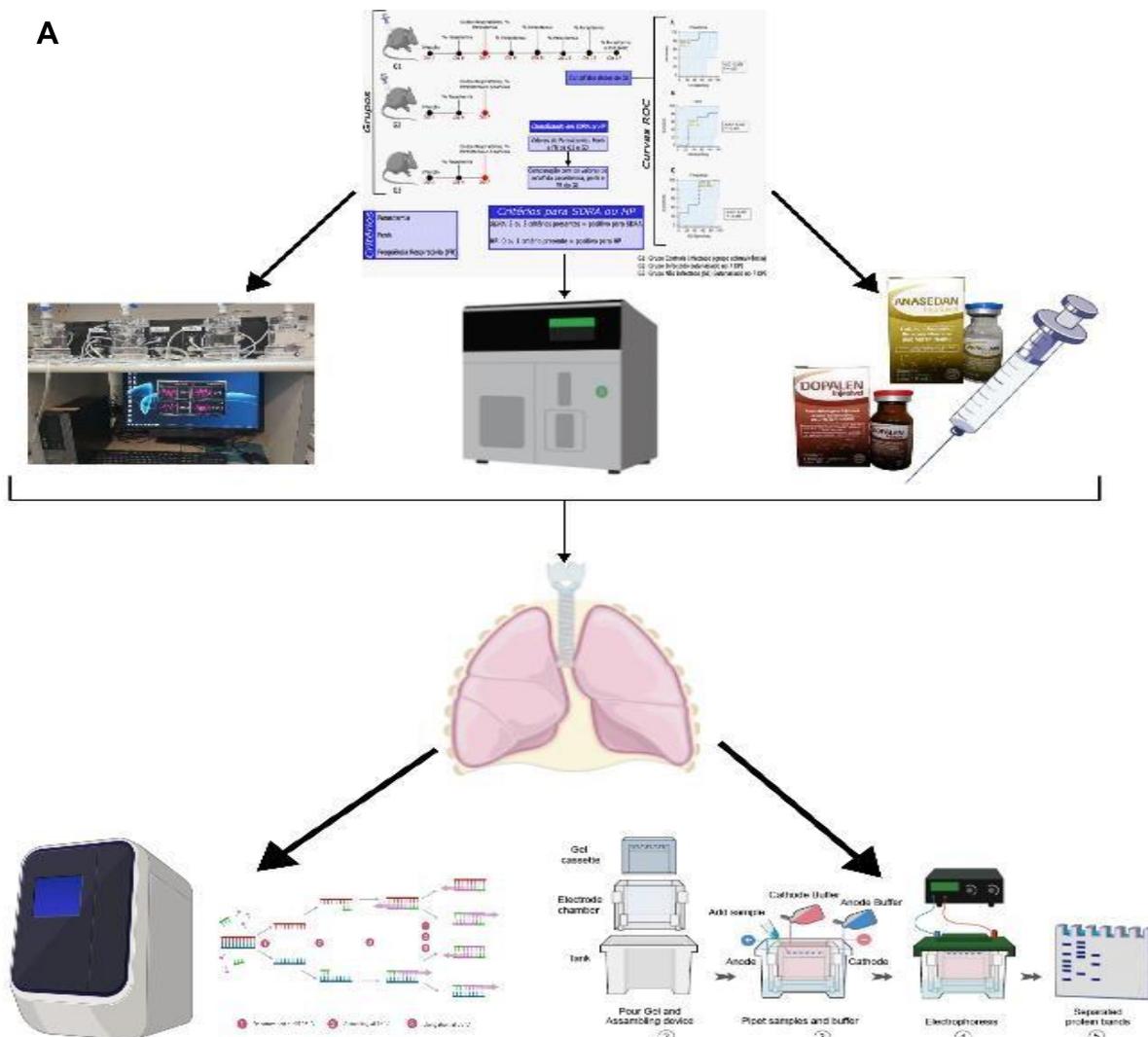
Estudar a regulação da septina 9 *in vitro* e *in vivo* em modelo experimental de síndrome do desconforto respiratório aguda associado à malária.

3.2 Objetivos Específicos

- I) Analisar a expressão da septina 9 nas células endoteliais pulmonares camundongos em contato com eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei*;
- II) Avaliar a expressão da septina 9 no tecido pulmonar de animais que desenvolveram SDRA e comparar com os que não desenvolveram e não infectados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A



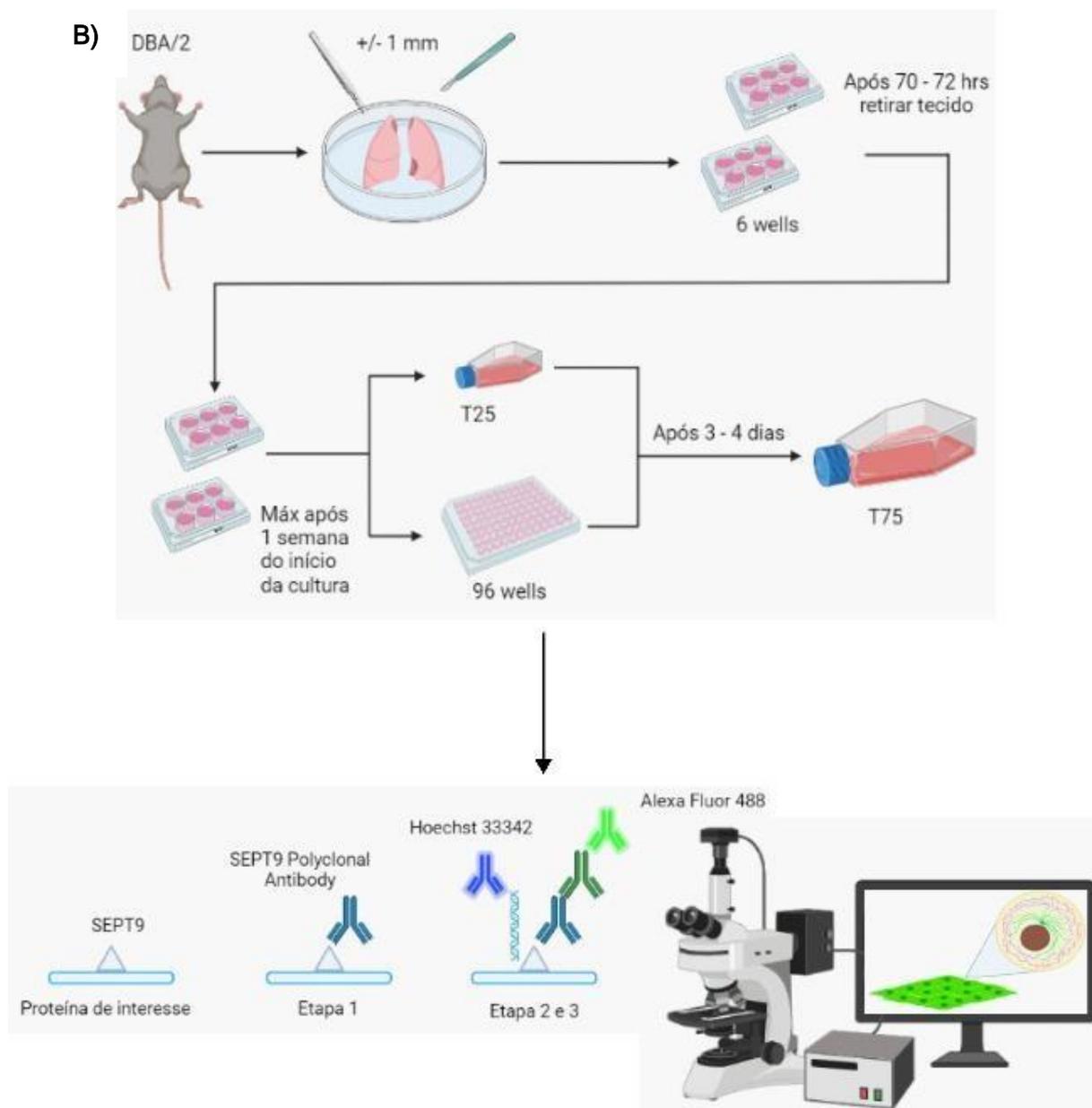


Figura 19 – Fluxograma dos materiais e métodos. A) refere-se ao objetivo específico I; B) refere-se ao objetivo específico II.

4.1 Animais e infecção

Foram utilizados camundongos DBA/2 machos com idade entre 6 e 8 semanas, infectados por via intraperitoneal com 1×10^6 de *Plasmodium berghei*ANKA.

4.2 Aspectos éticos

O presente projeto trata de um estudo experimental analítico comparativo, com estrita conformidade com os princípios e diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação do Comitê de Ética em Usode

Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), Brasil (protocolo número: CEUA / FCF / 639), aprovado em 04 de março de 2022.

4.3 Modelo experimental *in vivo*

O modelo experimental murino (**Figura 20**) consiste em 3 grupos de camundongos DBA/2, onde um grupo não é infectado e os outros 2 são infectados com 1×10^6 de *Plasmodium berghei* ANKA por via intraperitoneal. O grupo não infectado é o grupo controle não infetado (CTRL NI), que é eutanasiado no 7º dia pós infecção (DPI) juntamente com um grupo infectado; outro grupo infectado é mantido vivo até o 17º dia pós infecção. Nos dias 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 17 pós infecção, é mensurada a % da parasitemia de todos os animais por meio da citometria de fluxo (*FacsCalibur*), utilizando o marcador de ácido nucleico DRAQ5 (abcam – ab108410). Ainda, no 7º DPI todos animais têm seu padrão respiratório mensurado por meio de câmaras plestimográficas (*FinePointe Whole Body Plethismography 4-Site System BUXCO Research Systems*). São avaliados os seguintes parâmetros: a frequência respiratória (FR) e o aumento da pausa respiratória (*Penh*). Os animais do grupo controle não infectados e o grupo infectado que foram eutanasiados no 7 DPI tiveram sangue e tecido pulmonar coletados, sendo o pulmão destinado a western blot, imunofluorescência, análise histopatológica e qRT-PCR.

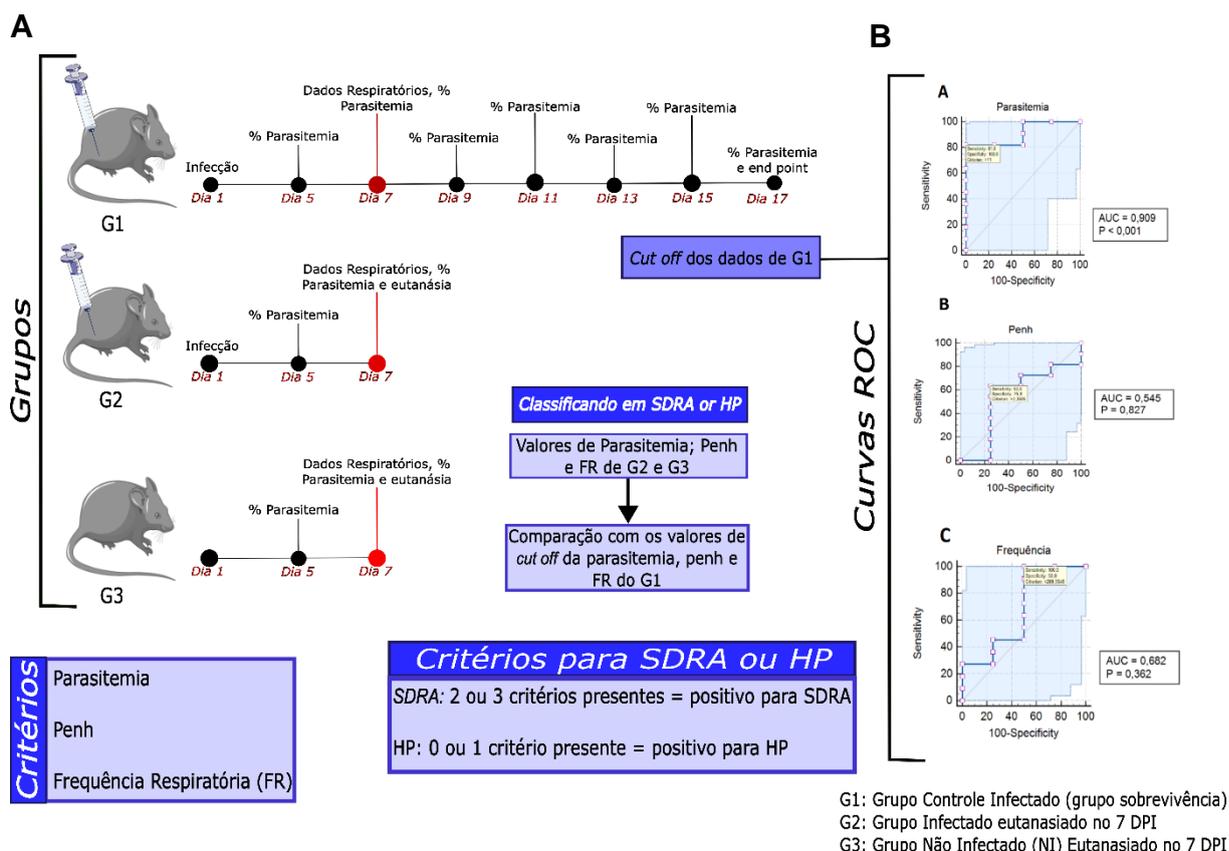


Figura 20 — Desenho experimental do modelo murino utilizado para estudo da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associado a Malária utilizado para os experimentos *exp1* e *exp2*. A) Grupos: G1 — Grupo Controle Infectado (grupo sobrevivência); G2 — Grupo Infectado Eutanasiado no 7 DPI; G3 — Grupo Controle não infectado eutanasiado no 7 DPI. B) Curvas ROC geradas a partir dos valores de dados respiratórios (penh, frequência respiratória) e de parasitemia no 7 DPI, do G1; C) Classificação dos camundongos do G2 em SDRA ou HP, utilizando os valores de *cut off* do G1 como parâmetro; D) critérios utilizados para a classificação em SDRA ou HP.

Os dados referentes a parasitemia, frequência respiratória e Penh do grupo eutanasiado no 7^o DPI foram comparados com o *cut off* do grupo sobrevivência, visto que neste grupo os animais que vão a óbito, sabe-se a exata causa da morte: hiperparasitemia ou síndrome do desconforto respiratório agudo. O *cut off* é obtido a partir de curvas ROC (Curva Característica de Operação do Receptor, ou, do inglês, *Receiver Operating Characteristic Curve*) geradas no software MedCalc (*Free Trial*) a fim de estabelecer um valor de corte de cada parâmetro (*cut off*), bem como a sensibilidade e a especificidade de cada parâmetro analisado do grupo de sobrevivência, para posteriormente os animais serem classificados como SDRA ou HP. Após estabelecidos os valores, o grupo eutanasiado no 7^o DPI foi classificado como SDRA ou HP a partir destes. A partir daí seguiu-se para o GraphPad Prism 9 (*Free Trial*), onde foram feitas as análises destes animais, já classificados em SDRA ou HP.

4.4 Medida da capacidade respiratória

A capacidade respiratória foi medida por meio de câmaras plestimográficas (*Fine Pointe Whole Body Plethysmography 4-Site System BUXCO Research Systems*) (**Figura 21**). O animal permanece dentro da câmara por 10 minutos, sem restrição de movimentos, onde foram analisados os parâmetros Penh (do inglês, *enhanced pause*) e frequência respiratória.



Figura 21 – Câmaras plestimográficas (BUXCO Research Systems) utilizadas para mensurar o padrão respiratório.

O Penh é calculado a partir de uma fórmula (**Figura 22**) que utiliza, pico inspiratório e expiratório, tempo médio para cada ciclo respiratório e tempo para atingir 65% de volume nos pulmões (LOMASK *et al.*, 2006). A frequência respiratória reflete o tempo de ciclos inspiratórios e expiratórios medido em respirações por minuto.

$$Penh = \frac{PEF}{PIF} \times \left(\frac{Te}{Rt} - 1 \right)$$

Figura 22 — Fórmula para calcular Penh. **Fonte:** LOMASK *et al.*, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0940299306000194?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 mai. 2023.

4.5 Parasitemia

A parasitemia dos animais foi obtida através de citometria de fluxo (BD FACSCalibur), utilizando o marcador ácido nucleico DRAQ5 (DRAQ5 abcam - ab108410). São diluídos 0,06 µl/amostra do DRAQ5 em 300 µl/amostra do tampão para citometria de fluxo (PBS 1x, SBF 1%, Azida Sódica 0,05%) em tubo específico para o citômetro. Foi coletada uma gota de sangue dos animais infectados e de pelo

menos 3 animais não infectados, por punção da veia da cauda do animal. O sangue foi homogeneizado com a mistura de DRAQ5+tampão. Primeiro foi realizada a leitura dos animais não infectados e, em seguida, foi realizada a leitura dos animais infectados. Por fim, o valor obtido dos animais não infectados foi descontado do valor obtido dos animais infectados. Este último passo deve ser realizado pois o DRAQ5 marca ácido nucleico, sendo assim, o valor dos animais não infectados são os leucócitos presentes no sangue que devem ser descontados dos animais infectados, obtendo-se somente o valor da parasitemia, que ocorre devido a marcação do ácido nucleico do *Plasmodium*.

4.6 Western Blot

As amostras utilizadas para o *Western Blot* (WB) foram de pulmões de camundongos DBA/2 com 7 dias pós-infecção (DPI), sendo camundongos com SDRA ou HP, classificados de acordo com o modelo preditivo, previamente publicado (ORTOLAN *et al.*, 2014) e controle não infectado (NI). Foram utilizadas células endoteliais pulmonares primárias, foram estimuladas com EP-PbA, EnPe ainda foram obtidas células sem estímulo, utilizadas como controle. As amostras foram extraídas utilizando Ripa Buffer (PierceTM RIPA Buffer

— Thermo Scientific XB339404) com inibidor de protease (SIGMAFAST# Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free — SIGMA-ALDRICH SLBS9493), a uma proporção de 100 µL de protease do estoque de 10X para 10 mL de RipaBuffer. Foram utilizados 1 mL para extrair as amostras, onde estas foram cortadas em pedaços pequenos e depois homogeneizadas em Turrax aumentando a velocidade aos poucos até que tudo esteja homogêneo. O homogenato foi centrifugado 2 vezes, sendo a 1ª a 2.000 rpm, a 4°C por 5 minutos e a 2ª a 12.000 rpm, 4° C por 20 minutos, transferindo o sobrenadante de cada centrifugação para outro tubo. Foi realizada a quantificação utilizando o BCA kit (PierceTM BCA Protein Assay Kit — ThermoScientific SG251388), de acordo com as instruções do fabricante.

Destas amostras, foram utilizados 20 µg de proteína total extraída de tecido pulmonar. A eletroforese das proteínas ocorreu gel SDS-PGE com 8 % poliacrilamida. O gel foi transferido para uma membrana de PVDF em cuba de transferência (BioRad). O bloqueio da membrana foi feito com 7 % de leite (leite em pó Molico) em

TBST por 1 hora, RT. O anticorpo primário SEPT9 Polyclonal Antibody (Invitrogen PAS-100077) foi incubado *overnight*, 4 °C, a 1:2000, o anticorpo secundário Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technologies #7074), foi incubado por 1 h, temperatura ambiente, 1:20.000. Foi utilizado como controle endógeno o GAPDH (Monoclonal Anti-GAPDH Peroxidase Clone GAPDH-71.1 — SIGMA-ALDRICH-IS02), 1: 10000 por 1 hora, a temperatura ambiente. A membrana foi incubada com ECL (GE Healthcare 9794763) por 5 minutos, temperatura ambiente, a uma quantidade de 100 µL/cm² da membrana. Membranas foram plastificadas com vitafilm e leitura foi realizada no ImageQuant LAS 4000. Entre cada passo foram realizadas 4 lavagens por 5 minutos cada com TBST em agitador. Além das lavagens, todas as incubações foram realizadas em agitador.

4.7 Cultivo de células endoteliais pulmonares primárias (CEPP)

As células endoteliais pulmonares primárias foram extraídas de tecido pulmonar proveniente de camundongo DBA/2 não infectado e com idade entre 6 e 8 semanas. O camundongo foi eutanasiado e então removido todo o seu sangue por via intracardiaca. Os pulmões foram removidos e lavados 2x em placa de petri estéril com PBS 1x estéril. Dentro de um fluxo laminar, os pulmões foram cortados em pedaços de cerca de 1 mm e distribuídos em placa de 6 poços formando um “caracol”, os tecidos ficaram por 5 minutos em temperatura ambiente, dentro do fluxo, para aderirem a placa. Foi adicionado 1 mL de meio D-MEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco by Life Technologies 1124811) com 10 % de antibiótico (Anti-Anti (100x) – Antibiotic Antimycotic Gibco by Life Technologies 1842939) e 10 % de soro bovino fetal (SBF) (FBS, Quantified—Fetal Bovine Serum – Gibco-210540K). Após 72h os tecidos foram removidos, foi retirado também 50% do meio de cada poço da placa e acrescentado 50% de novo meio. O meio foi trocado a cada 2 a 3 dias. A passagem das células foi feita quando elas formaram uma monocamada (**Figura 23**). Foram realizadas no máximo 5 passagens de cultivo e, então, as células foram utilizadas em experimentos.

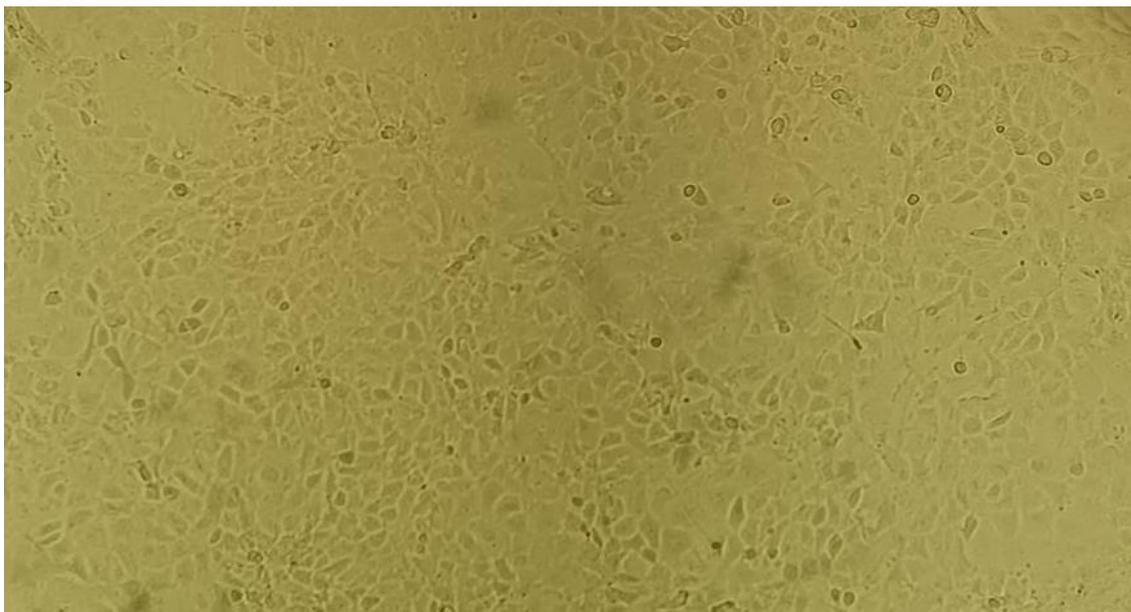


Figura 23 – Monocamada de células endoteliais pulmonares primárias de camundongos DBA/2.

4.8 Caracterização das células endoteliais pulmonares primárias (CEPP)

Durante o processo de explante das células primárias, enquanto os tecidos ainda estão na placa para que as células migrem deste para o meio de cultivo (D-MEM/F12) pode haver também a migração de fibroblastos, os quais não são possíveis identificar somente através do microscópio. Sendo assim, foi realizado imunofluorescência para a marcação dos principais antígenos expressos pelas células endoteliais, estando inclusos o eNOS (ABCAM – ab87750), CD31 (ABCAM – ab28364), CD62 (ABCAM – ab18981) e Ve-caderina (ABCAM – ab33168) (Alexa Fluor 488 – verde) e o núcleo destas (Hoechst 33342 - azul).

4.9 Purificação de Eritrócitos

A fim de se obter uma população de com 95% de eritrócitos infectado com *Plasmodium berghei* ANKA, um camundongo DBA/2 foi infectado com 1×10^6 de *Plasmodium berghei* ANKA. A partir do 5 DPI, a parasitemia deste animal foi acompanhada, sendo mensurada a cada 2 dias, porém o animal foi observado todos os dias a afim de se observar se este estava em sofrimento devido a infecção. Ao chegar a cerca de 15 a 20% de parasitemia, este animal foi eutanasiado e seu sangue coletado por via intracardíaca, o sangue foi então colocado em garrafa com meio RPMI (RPMI-1640 Medium With L-Glutamine, without sodim bicarbonate, powder, suitable for cell culture - SIGMA-ALDRICH- R6504), sem antibiótico e com

25% de SBF (FBS, Quantified—Fetal Bovine Serum – Gibco-210540K). A garrafa foi preenchida com uma mistura de gases (85% de N₂; 10% de O₂ e 5% de CO₂-WHITE MARTINS), sua tampa foi totalmente fechada e esta foi então colocada dentro de uma estufa a 37 °C com CO₂ a 5% durante 16 a 18 horas. No dia seguinte, os eritrócitos da garrafa foram então passados em uma coluna magnética (Coluna Magnética “MACS® Separation Columns (25 CS columns), Miltenyi Biotec”), que retém os eritrócitos infectados devido a hemozoína, que contém as propriedades magnéticas. Posteriormente, foi realizada a coleta dos eritrócitos infectados retirando a coluna magnética do ímã e passando meio RPMI. Estes eritrócitos foram centrifugados a 1.200 rpm, 10 minutos a 4 °C, foi descartado o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 2 ml de meio RPMI. Posteriormente, este foi centrifugado novamente a 1.200 rpm, 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 2 ml de meio RPMI. Os eritrócitos foram contados em câmara de Neubauer e ressuspensionados para 25 eritrócitos infectados por célula endotelial que, em seguida, foi estimulada.

4.10 Imunofluorescência de células endoteliais pulmonares primárias (CEPP)

Foram colocadas lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços, em seguida os poços com as lamínulas foram tratados com 400 µl de gelatina 0,2% (Gelatine From Bovine Skin — Sigma), após 5 minutos, foi removido o excesso, após 20 minutos (tempo de secagem da gelatina). Foram plaqueadas 4×10^4 células endoteliais pulmonares primárias e meio foi trocado a cada 2 a 3 dias até formarem uma monocamada (**Figura 23**). As células foram estimuladas com EP-PbA e eritrócitos não parasitados (EnP) a uma quantidade de 25 eritrócitos por célula, por 1 hora. Após esse estímulo, o meio foi removido com os EP-PbA não aderidos e EnP, as células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com formaldeído 3,7% por 10 minutos a temperatura ambiente (TA) e permeabilizadas com acetona PA (Merck, Supelco — 200-662-2) por 5 minutos a -20°C. Posteriormente, foi realizado o bloqueio com 3% de BSA por 1 hora a TA. As lamínulas foram removidas dos poços e as células foram incubadas com o anticorpo primário para Sept9 (SEPT9 Polyclonal Antibody - Invitrogen PAS- 100077) a 1:250, 1 hora a TA, lavadas com PBS 1x e incubadas com o anticorpo secundário (Alexa Fluor

488 - Life Technologies 1480470) por 1 hora a TA. Posteriormente, nova lavagem foi realizada, as células foram incubadas com o reagente Texas Re Phalloidin por 1 hora a TA, lavadas e então incubadas com Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific — 62249), marcador de ácido nucleico, por 5 minutos a TA. As lamínulas foram montadas com meio de montagem Fluoromount (Aqueous Mounting Medium — Sigma Aldrich) com uma gota em cada lamínula e seladas com esmalte transparente ao redor de toda a lamínula e observadas e fotografadas com microscópio Zeiss Imager M2.

4.11 Extração de RNA de tecido pulmonar e das células endoteliais pulmonares (CEPP)

As amostras utilizadas para a quantificação da expressão gênica da sept9 foram de pulmões de camundongos DBA/2 com 7 dias pós-infecção (DPI), sendo que vieram a óbito por SDRA ou HP, classificados de acordo com o modelo preditivo, previamente publicado (ORTOLAN *et al.*, 2014) e controles não infectado (CTRL NI). Já as células endoteliais pulmonares primárias, foram estimuladas com EP-PbA, EnP e ainda foram obtidas células sem estímulo, utilizadas como controle.

A extração de RNA das amostras foi realizada com TRIzol™ Reagent (Invitrogen – 15596026 e 15596018) e, seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

4.12 cDNA

O RNA extraído do tecido pulmonar foi quantificado e avaliada a sua qualidade e, posteriormente, foi utilizado 1 µg de RNA para se fazer a transcrição em cDNA utilizando o kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ROCHE — 04896866001), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.13 qRT-PCR

A partir do cDNA produzido, foi utilizado 1 µl deste, e 1 µl dos primers para Septina 9 (Forward e Reverse) (Invitrogen Custom Primers — 4331182), e 1 µl dos primers para o controle endógeno β-Actina e Sybr Green (Power SYBR® GreenPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific — 4367659), seguindo as instruções do

fabricante tanto para uso do SYBR Green quanto para ressuspensão e uso dos primers.

Septina 9: Forward- 5' GGC TTC GGA GAC CAC ATC AAC A 3'; Reverse- 5' GAA GTA GAG GCA GCA GTG GAC A 3'.

Actina: Forward- 5' GGG AAG GTG ATT CTG GTG AA 3'; Reverse- 5'-GTC GTG GGT CTG GAA TGA GT 3'.

Após realizada a qRT-PCR e obtido os valores de $\Delta\Delta C_t$, tanto para o controle endógeno β -actina quanto para o gene alvo Septina 9, foram realizadas as análises estatísticas através do GraphPad Prism9 (Free Trial).

4.14 Estatística

Os dados coletados durante a realização do modelo experimental para estudo da SDRA, foram posteriormente analisados nos programas *MedCalc* e *Graph Pad Prism 9.2.5* com intervalo de confiança de 95%. Após o teste de normalidade foram utilizados os testes de ANOVA e Kruskal Wallis para análise de variância a partir de 3 grupos e teste T e Mann Whitney para comparações entre dois grupos.

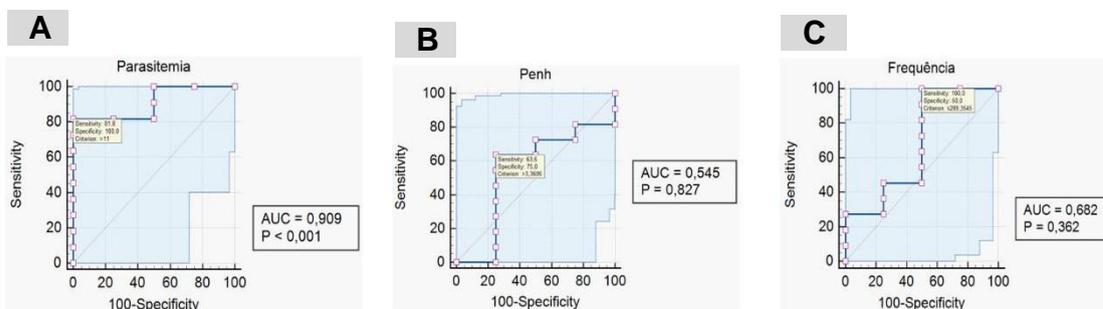
5 RESULTADOS

5.1 Modelo experimental para SDRA

Foram realizados dois experimentos *in vivo* utilizando animais DBA/2 infectados por *Plasmodium berghei* ANKA, composto por um grupo controle infectado que é mantido vivo até o 17º DPI, grupo infectado eutanasiado no 7º DPI e o grupo controle não infectado (**Figura 20**). No 7º DPI foram coletados os dados obtidos por meio da pletismografia de corpo inteiro, pelas análises da frequência respiratória (FR), do Penh (LOMASK *et al.*, 2006), além da parasitemia. Os resultados foram analisados pelo programa *MedCalc*, o qual gerou curvas ROC (**Figura 24**).

Os valores dos *cutoff* dos parâmetros analisados (FR, Penh e parasitemia) do grupo G1, estes foram comparados aos do G2, a fim de classificá-los como animais infectados com SDRA ou animais infectados com HP. Para um animal ser classificado como SDRA deverá apresentar 2 ou 3 parâmetros igual ou superiores (Penh e parasitemia) aos valores de *cutoff*, ou inferiores, no caso da FR.

Curva ROC de dados do G1 Exp 1



Curva ROC de dados do G1 Exp 2

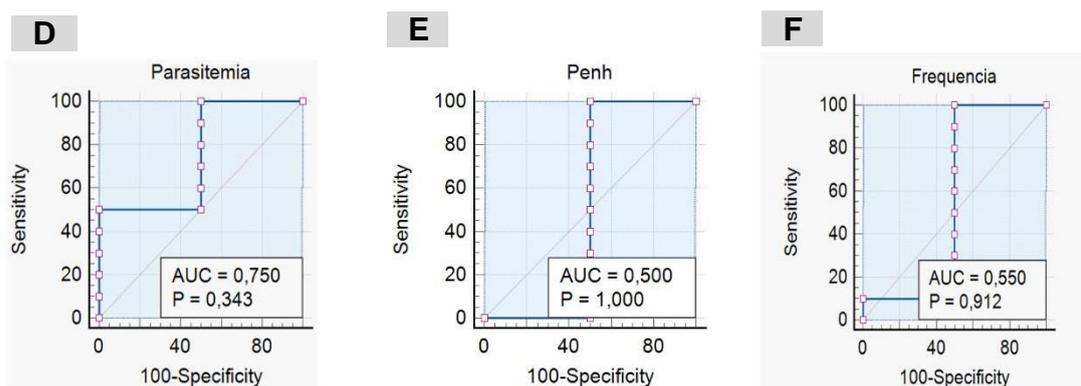
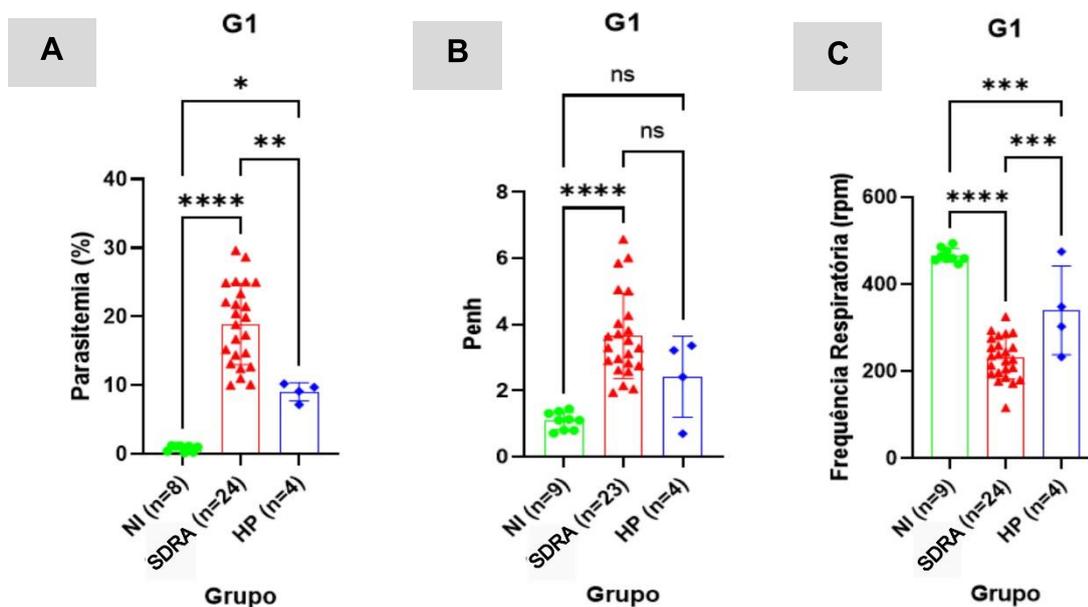


Figura 24 — Curvas ROC geradas no programa *MedCalc*, fornecendo os valores de *cut off* dos dados coletados. Os gráficos A, B e C referem-se ao experimento *in vivo* 1, e as letras D, E e F, referem-se ao experimento *in vivo* 2.

Posteriormente, os grupos foram analisados com auxílio do software *Graph Pad Prism* 9, já classificados como SDRA ou HP (**Figura 25**).

Ao analisar estes resultados, observa-se que o padrão dos gráficos se mantém entre os 2 grupos, no quais a parasitemia é maior no grupo infectado (SDRA e HP). O Penh, mostra-se aumentado no grupo infectado e, principalmente no grupo SDRA, sendo um parâmetro esperado, considerando que estes animais estão com danos nos pulmões (LOMASK et al., 2006). Em contrapartida, a frequência respiratória do grupo infectado, principalmente aqueles que desenvolveram a SDRA, se mostra significativa baixa ao se comparar com os animais NI e os HP, tendo vista que os animais HP têm danos bem menores nos alvéolos pulmonares quando comparados com os SDRA (ORTOLAN et al., 2014, DEBONE, 2017).

G1 - Controle Infectado (sobrevivência): Exp 1 + Exp 2



G2 - Eutanásia 7 DPI: Exp 1 + Exp 2

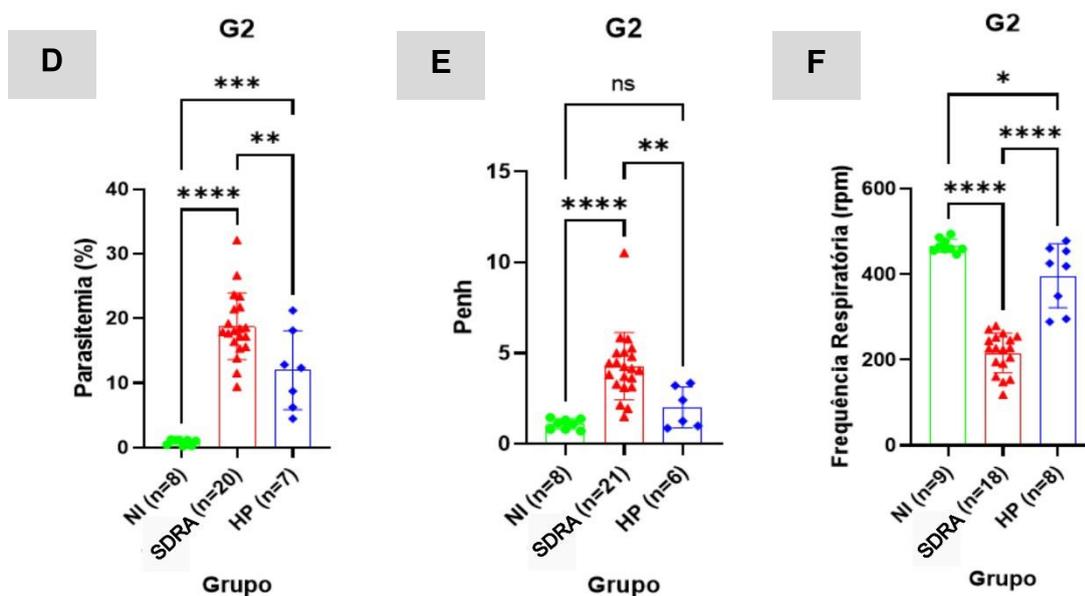


Figura 25 — Gráficos dos dados obtidos (parasitemia, penh e frequência respiratória) do modelo experimental para estudo da SDR associada à malária, após análise pelo programa *Graph PadPrism* 9. Dados agregados e referentes aos experimentos *in vivo* 1 e 2. A, B e C) referem-se ao grupo 1, D, E e F) referem-se ao grupo 2. Foi aplicado o teste de ANOVA para análise de variância entre os grupos, utilizando IC 95%. (*) 0,05; (**) 0,005; (***) 0,0005; (****) <0,0001.

5.1.1 Análise da expressão da septina 9

Para analisar a expressão da proteína SEPT9 e quantificá-la, foi realizado o *Western Blot* da proteína extraída de tecido pulmonar de camundongos DBA/2 com

NI, SDRA e HP. Os três grupos foram comparados por análise de densitometria, realizada pelo programa ImageJ, transformando as imagens das membranas do *Western Blot* em dados quantitativos, expressos em gráficos (**Figura 26**).

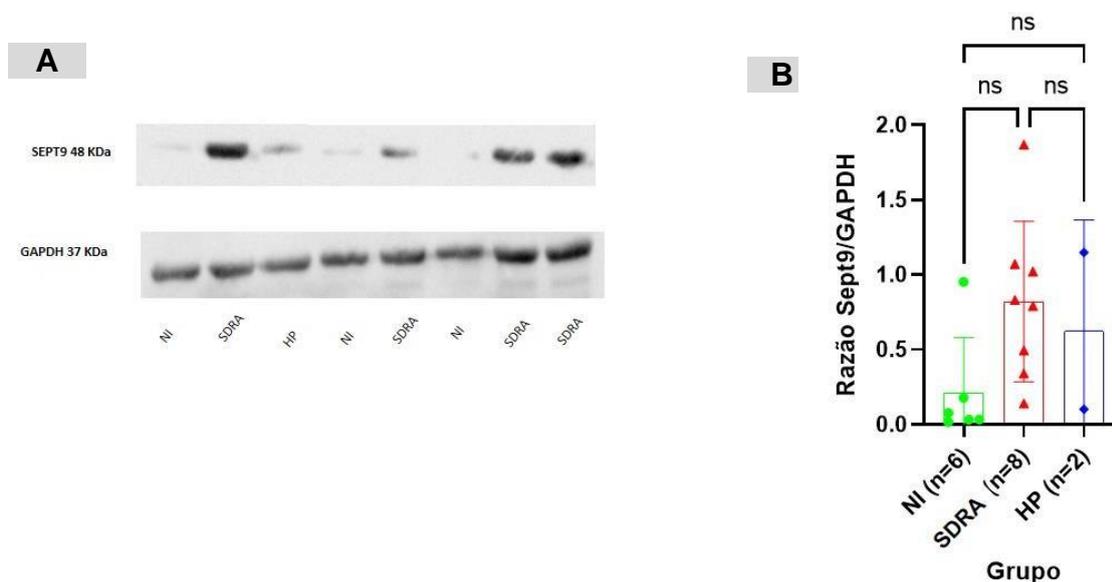


Figura 26 — Expressão da septina 9 em tecido pulmonar de animais não infectados (NI) (**n=6**) e animais infectados que desenvolveram a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (**n=8**) ou a hiperparasitemia (HP) (**n=2**). **A**) Imagem ilustrativa de membrana de PVDF, referente a expressão de Septina 9 1:2000, a 48 KDa. A imagem inferior refere-se ao controle endógeno GAPDH 1:2000, a 37 KDa. **B**) Gráfico referente a razão da quantificação da septina 9 em NI, SDRA e HP. Foram obtidas 2 membranas iguais, sendo realizada a normalização dos dados entre estas 2, razão pela qual o **n** no gráfico é o dobro do mostrado na imagem. Foi aplicado o teste de Kruskal Wallis para análise de variância entre os grupos, utilizando IC 95%.

5.1.2 qRT-PCR

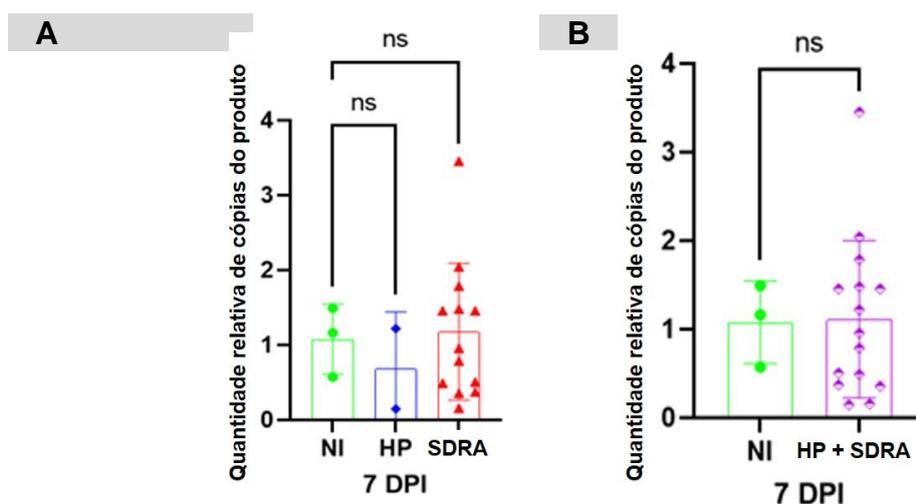


Figura 27 — Expressão gênica da septina 9 quantificados por qRT-PCR de cDNA extraídos de tecido pulmonar de animais NI (**n=3**), HP (**n=2**) e SDRA (**n=13**), eutanasiados no 7 DPI. A e B) Número relativo de cópias do produto do gene destes animais, respectivamente. B) os animais infectados e que desenvolveram HP ou SDRA foram unidos (**n=15**).

Estes resultados sugerem que o aumento da expressão gênica da Sept9 pode ter ocorrido em um *time point* anterior, pois no 7º DPI há expressão proteica. Como não houve alteração da expressão gênica da septina 9 no 7º DPI ao comparar os animais infectados SDR, HP e não infectado, hipotetizamos também que poderia ter ocorrido alterações pós traducionais através de microRNAs, logo após sua transcrição, gerando assim alterações no RNA, impedindo ou dificultando a produção da proteína que desempenhará a função no organismo.

A análise de expressão relativa do gene Sept9 sofreu danos decorrente de problemas utilizando o Primer (Septin9 Mouse Primer — Invitrogen Custom Primers-4331182. Forward 5' GGC TTC GGA GAC CAC ATC AAC A 3'; Reverse 5' GAA GTA GAG GCA GCA GTG GAC A 3') e também na extração do RNA das amostras. Identificamos problemas a nível de técnica que serão revistos e, estes experimentos serão refeitos. A utilização da proteína Septina 9 aplicado à SDR é inédito, portanto alguns problemas logísticos necessitam de correção. Esperamos que a expressão gênica das amostras classificadas como SDR, apresentem maior expressão de Sept9 em relação aos demais grupos analisados, acompanhando os resultados obtidos pelo WB.

5.2 Cultivo de células endoteliais pulmonares primárias (CEPP)

5.2.1 Imunofluorescência

Inicialmente, antes da realização dos experimentos *in vitro*, foi verificado se de fato, as células obtidas eram CEPP. Para tal, fizemos um painel com marcadores específicos para este tipo celular (eNOS, CD31, CD62 e VE-caderina), visualizados por imunofluorescência. Assim, certificamo-nos que as células eram de fato células endoteliais, sem a contaminação por fibroblastos como demonstrado na **Figura 28**.

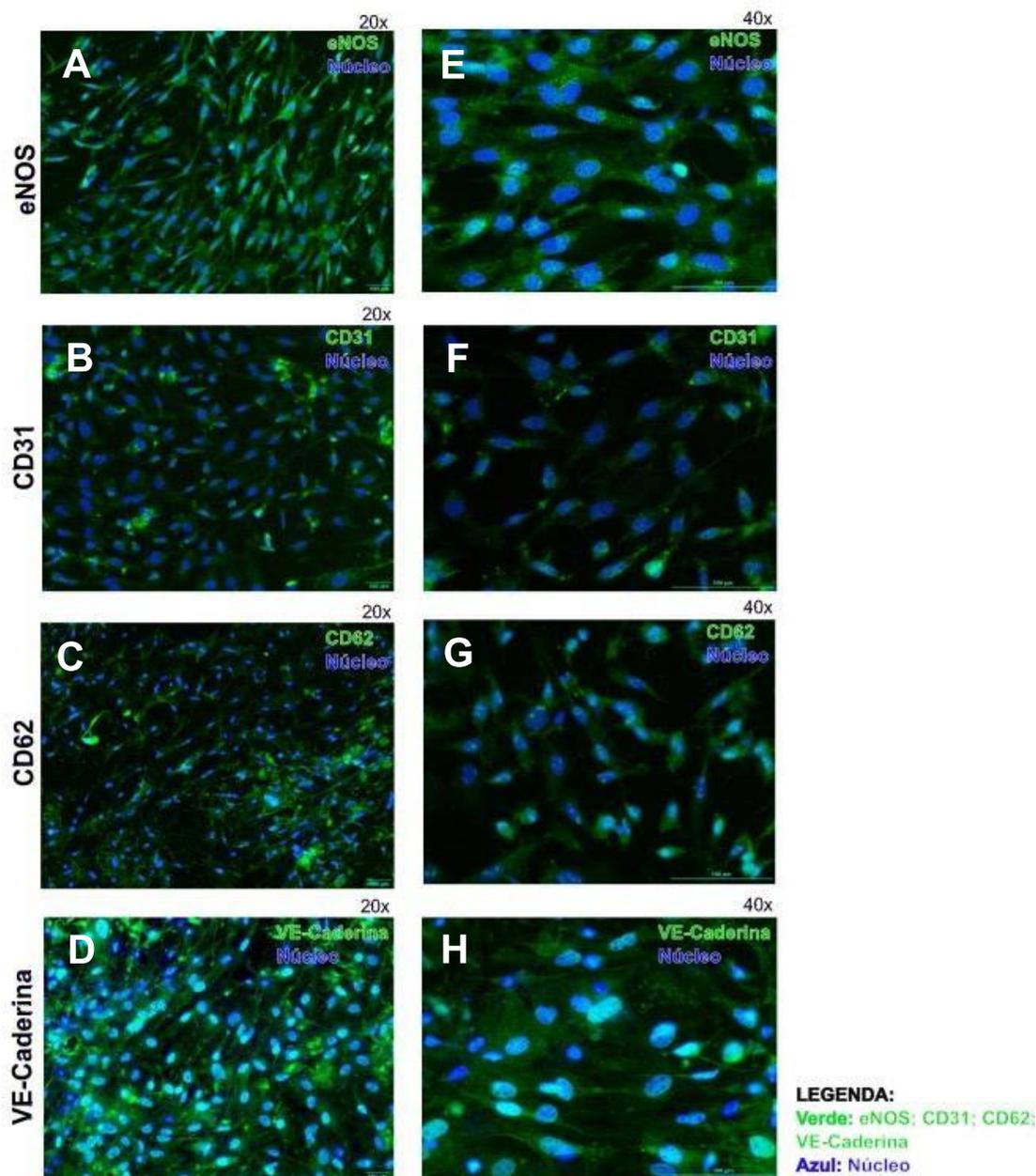
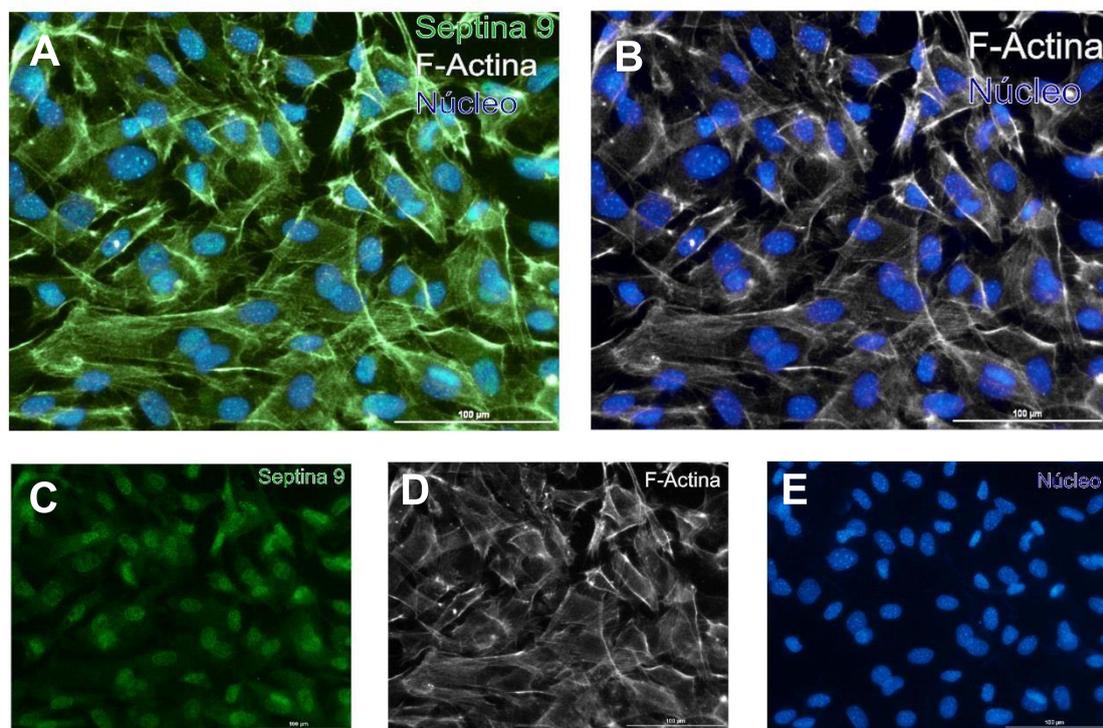


Figura 28 –Caracterização das células endoteliais pulmonares primárias (CEPP) de camundongos DBA/2. A, B, C e D) referem-se a eNOS, CD31, CD62 e VE-Caderina todos a 1:100, onde as imagens foram capturadas por objetiva de 20x. E, F, G e H) referem-se a eNOS, CD31, CD62 e VE-Caderina todos a 1:100, onde as imagens foram capturadas por objetiva de 40x. Barra de escala: 100µm. Microscópio: AXIO Imager M2 (ZEISS), câmera AxioCam HRc (LIPE's Lab 131 — ICB II). Verde: anticorpos eNOS, CD31, CD62 e VE-Caderina, marcados com Alexa Fluor 488 1:400; Azul: núcleo celular marcado com Hoechst 33342 1:1000.

Realizamos um experimento, onde células endoteliais foram estimuladas com EP, EnP ou não foram estimuladas (NE), durante 1 hora. Em seguida, foi realizada marcação da Sept9 (verde), actina (branco) e núcleo celular (azul), a fim de se obter informações tanto das alterações que ocorrem na actina, quanto como a Sept9 se altera quando não

estimulo algum e após entrar em contato com os EP, EnP (Figuras 29, 30, 31 e 32).

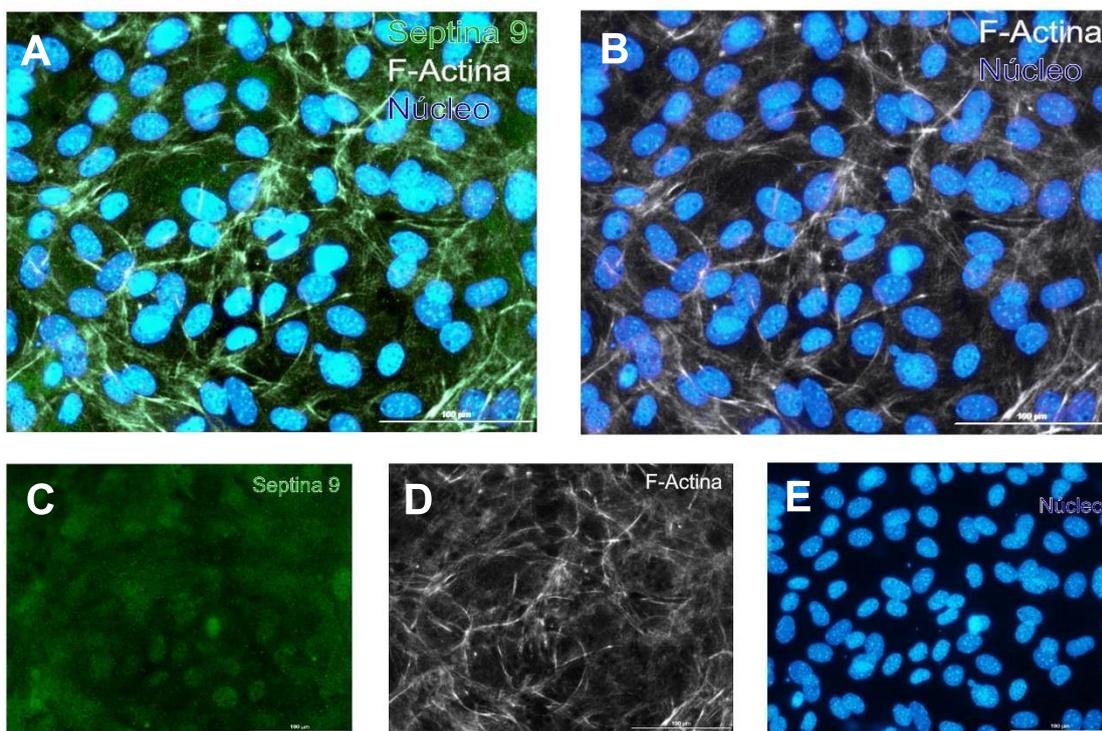
A localização da Sept9 foi observada principalmente no núcleo das células NE, e ainda na membrana plasmática, como demonstrado na figura 29.



CEPP Não Estimuladas (NE)

LEGENDA:
Verde: Septina 9
Branco: F-Actina
Azul: Núcleo

Figura 29 — Imunofluorescência de CEPP não estimuladas (NE). A, B, C, D e E) Imagens obtidas por objetiva de 40x. A) estão marcados, em verde: Septina 9 (anticorpo primário SEPT9 Polyclonal Antibody 1:250; anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:400); em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000); B) estão marcados em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000); C) em verde: Septina 9 (anticorpo primário SEPT9 Polyclonal Antibody 1:250; anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:400); D) em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); E) em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000). Barra de escala: 100µm. Microscópio: AXIO Imager M2 (ZEISS), câmera AxioCam HRc (LIPE's Lab 131 — ICB II). Análises realizadas através do ImageJ.



CEPP Estimuladas com Eritrócitos Parasitados (EP)

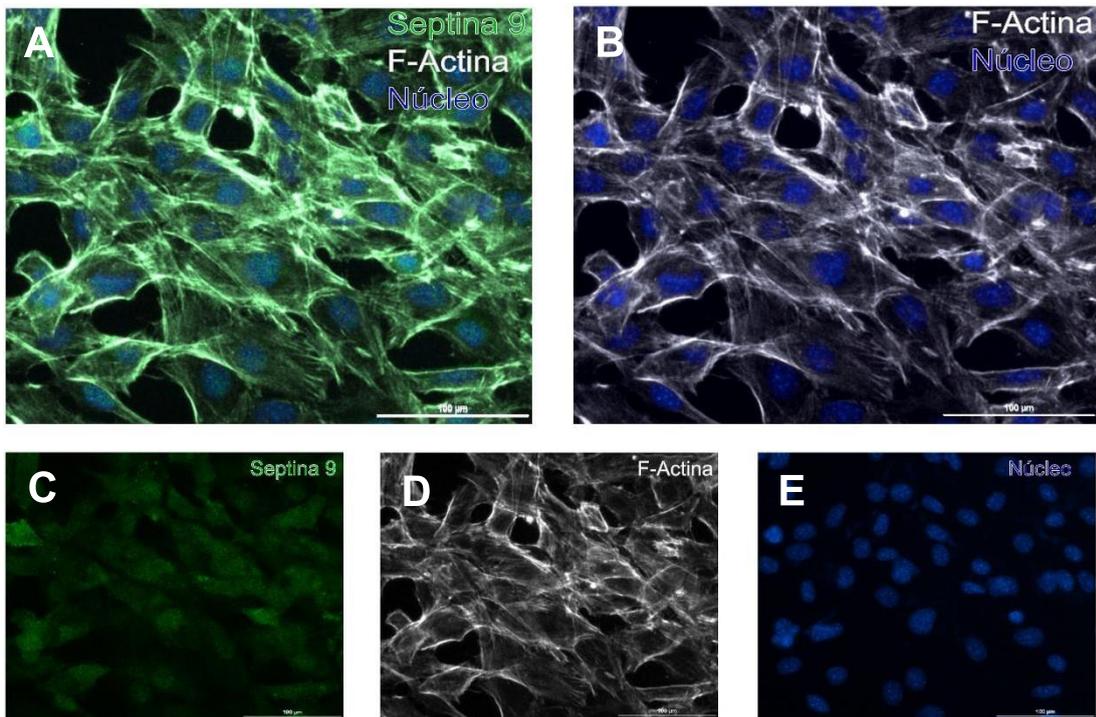
LEGENDA:

Verde: Septina 9

Branco: F-Actina

Azul: Núcleo

Figura 30 — Imunofluorescência de CEPP estimuladas por eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA (EP). A, B, C, D e E) Imagens obtidas por objetiva de 40x. A) estão marcados, em verde: Septina 9 (anticorpo primário SEPT9 Polyclonal Antibody 1:250; anticorposecundário Alexa Fluor 488 1:400); em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000); B) estão marcados em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000); C) em verde: Septina 9 (anticorpo primário SEPT9 Polyclonal Antibody 1:250; anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:400); D) em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); E) em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000). Barra de escala: 100µm. Microscópio: AXIO Imager M2 (ZEISS), câmara AxioCam HRc (LIPE's Lab 131 — ICB II). Análises realizadas através do ImageJ.



CEPP Estimuladas com Eritrócitos Não Parasitados (EnP) **LEGENDA:**
Verde: Septina 9
Branco: F-Actina
Azul: Núcleo

Figura 31 — Imunofluorescência de CEPP estimuladas por eritrócitos não parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA (EnP). A, B, C, D e E) Imagens obtidas por objetiva de 40x. A) estão marcados, em verde: Septina 9 (anticorpo primário SEPT9 Polyclonal Antibody 1:250; anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:400); em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000); B) estão marcados em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000); C) em verde: Septina 9 (anticorpo primário SEPT9 Polyclonal Antibody 1:250; anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:400); D) em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); E) em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000). Barra de escala: 100µm. Microscópio: AXIO Imager M2 (ZEISS), câmera AxioCam HRc (LIPE's Lab 131 — ICB II). Análises realizadas através do ImageJ.

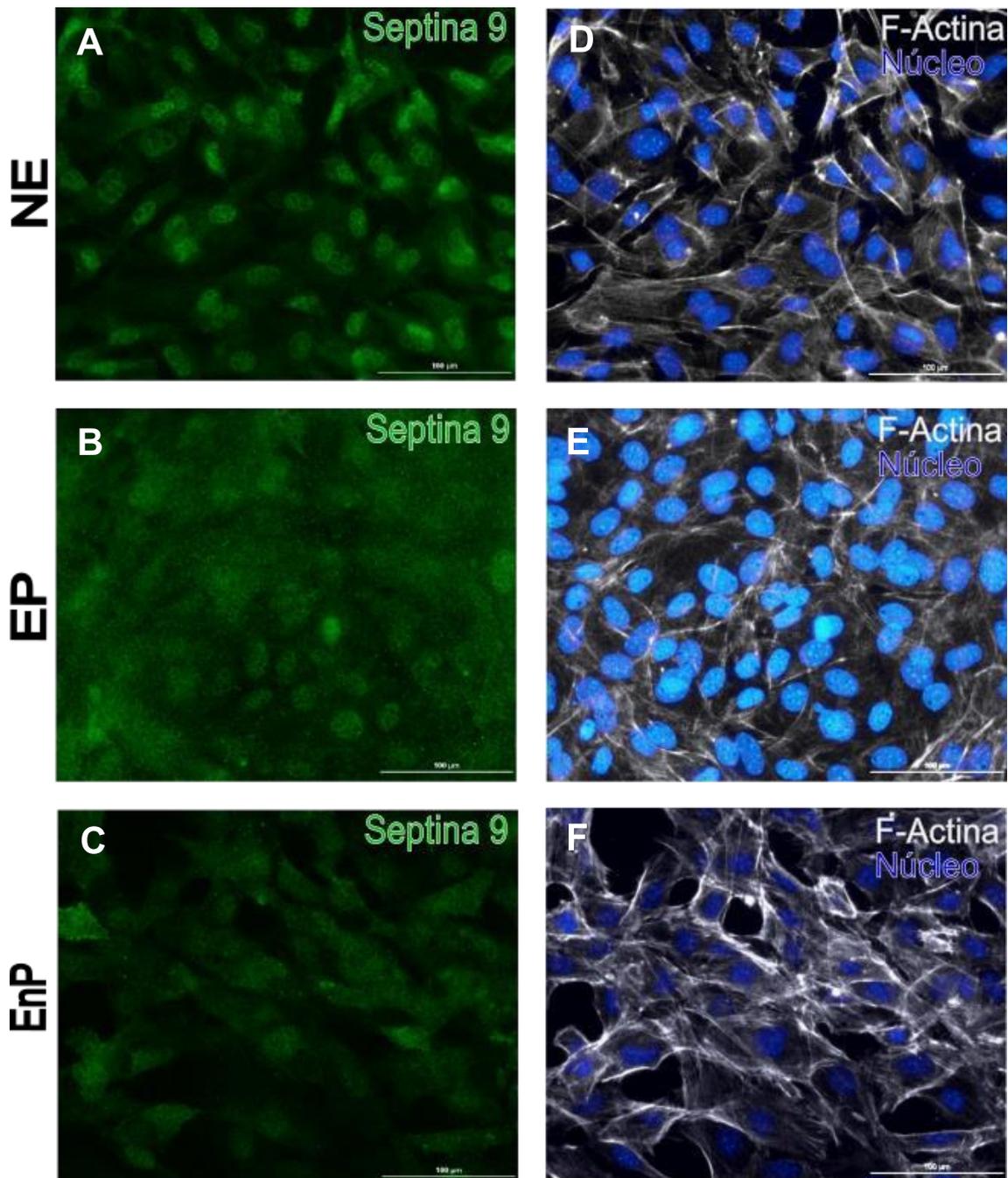


Figura 32 — Imunofluorescência de CEPP. A e D) não estimuladas; B e E) estimuladas por eritrócitos parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA. C e F) estimuladas por eritrócitos não parasitados por *Plasmodium berghei* ANKA. A, B, C, D e E) Imagens obtidas por objetiva de 40x. A, B e C) estão marcados em verde: Septina 9 (anticorpo primário SEPT9 Polyclonal Antibody 1:250; anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:400); D, E e F) em branco: Filamentos de Actina (Texas Red Phalloidin); em azul: Núcleo celular (Hoechst 33342 1:1000); Barra de escala: 100μm. Microscópio: AXIO Imager M2 (ZEISS), câmera AxioCam HRc (LIPE's Lab 131 — ICB II). Análises realizadas através do ImageJ.

6 DISCUSSÃO

Guiados pelo modelo murino experimental para estudo da SDRA descrito por EPIPHANIO *et al.*, 2010 e por ORTOLAN *et al.*, 2014, reproduzimos este a fim de obter as amostras e dados, que consistem em: parasitemia (%), frequência respiratória (rpm) e Penh, todos coletados no 7º DPI. Os animais foram alocados em SDRA ou HP, e os dados foram processados pelo software Medcalc e analisados estatisticamente pelo GraphPad Prism9.

A parasitemia é importante pois mostra o padrão da infecção no decorrer do tempo, se esta aumentou ou reduziu. Em animais infectados e que vão a óbito após o 12º DPI, este parâmetro costuma se mostrar aumentado em comparação com aqueles que vão a óbito entre o 7º e o 12º DPI, sendo comumente observado em animais que desenvolvem a hiperparasitemia (ORTOLAN *et al.*, 2014). Embora exista uma correlação entre a densidade da parasitemia e a gravidade da malária, alguns indivíduos com contagens elevadas de parasitas podem não estar gravemente doentes, enquanto outros com baixa parasitemia podem ter infecções fatais, como ocorre nos animais que evoluem para o óbito devido a SDRA-MA (WILAIRATANA *et al.*, 2013).

Já as alterações da frequência respiratória, se devem à redução da capacidade de difusão, a qual é atribuída a uma redução da troca gasosa entre a vasculatura capilar pulmonar e os alvéolos, que poderia estar relacionado ao sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação pulmonar (CUNNINGTON *et al.*, 2013). Esta alteração se dá ainda devido a danos nos alvéolos em decorrência de um processo inflamatório descontrolado acarretando no aumento da permeabilidade vascular, destruição dos pneumócitos tipo I, levando assim ao edema alveolar, em alvéolos que estão sofrendo um processo inflamatório descompensado (MATTHAY *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2007; BASTARACHE *et al.*, 2008; IKEGAMI *et al.*, 2008; ZUO *et al.*, 2008; TOLLE e

STANDIFORD, 2013; BOS e WARE, 2022). Dados que corroboram com o descrito por Ortolan e colaboradores em 2014, e com achados do presente trabalho como demonstrado na **Figura suplementar 1 e 2**.

O Penh por sua vez é um parâmetro que não possui uma unidade de medida,

sendo, normalmente, utilizado para avaliar mudanças no fluxo de ar padrão que entra e sai do pletismógrafo de fluxo de corpo inteiro enquanto um animal (DBA/2) respira (FRAZER *et al.*, 2011). O Penh tem sido utilizada para avaliar alterações na função pulmonar e como método para avaliar a reatividade das vias aéreas (FRAZER *et al.*, 2011). De forma simplificada, é o intervalo entre uma respiração completa (inspirar e expirar) e outra, estando significativamente elevada nos animais SDRA quando comparados com os animais NI e com os HPs. Entretanto não é apresentada uma diferença significativa quando realizada uma comparação entre os grupos NI e HP (**Figura 24 E**), sendo este um achado normal, sabendo-se que os pulmões de animais HPs não sofrem danos significantes como os SDRA, mantendo a função respiratória destes, que vão a óbito devido anemia severa, consequência da hiperparasitemia que leva ao sequestro dos eritrócitos e consequente anemia severa.

Ao realizar a análises destes resultados, comparando tanto os diferentes grupos quanto os diferentes desfechos (NI, SDRA e HP), é mantido um padrão dos gráficos tanto no G1 (**Figura 25 A, B e C**) quanto no G2 (**Figura 25 D, E e F**). Referente a parasitemia (**Figura 25 A e D**), os grupos infectados (SDRA e HP) apresentam aumento significativo da parasitemia quando comparados como grupo NI, dado este, que, confirma a infecção por malária (*Plasmodium berghei*ANKA).

Quanto ao Penh (do Inglês *Enhanced Pause*, ou Pausa Respiratória Aproximada) (**Figura 25 B e E**), é observado o aumento significativo principalmente quando comparado o grupo NI com o grupo SDRA, sendo este aumento ocasionado principalmente devido a SDRA (ORTOLAN *et al.*, 2014; LOMASK *et al.*, 2006). Em contrapartida, o grupo HP tem menor significância estatística do aumento de penh quando comparado com o grupo SDRA (**Figura 25 E**), ou ainda nenhuma significância estatística quando comparado ao grupo NI (**Figura 25 B e E**).

Esta menor significância ou ainda a sua ausência na comparação entre HP e SDRA, e entre HP, SDRA e NI, se deve ao fato de que os animais HPs não têm as suas paredes alveolares destruídas e o aumento do edema alveolar como ocorre na SDRA (ORTOLAN *et al.*, 2014; DEBONE, 2017; QUIRINO *et al.*, 2020)

(**Figura Suplementar 1**). Os HPs têm um espessamento da parede alveolar e a ausência de edema alveolar (**Figura Suplementar 2**) o que ainda permite a troca

gasosa, ocasionando nesta pouca, ou ausência de significância estatística no Penh (EPIPHANIO *et al.*, 2010; ORTOLAN *et al.*, 2014).

A análise da expressão proteica da Septina 9 se deu por meio de *WesternBlot*, no qual as bandas da proteína são vistas a uma altura de 48 kDa (**Figura 26 A superior**). Apesar de não haver uma diferença estatisticamente significativa, os animais com SDR, apresentam uma maior expressão da Septina 9 quando comparados com os animais NI e HP.

A Septina 9 foi encontrada super expressa somente em células cancerígenas e no sangue periférico de indivíduos com câncer (CONNOLLY *et al.*, 2011; POWRÓZEK *et al.*, 2014; MARCUS *et al.*, 2019), onde estes estudos mostraram o aumento de da metilação de Septina 9 em neoplasias.

A Septina 9 é uma proteína relacionada ao ciclo celular, sendo esta indispensável, atuando na coordenação de proteínas motoras da missão durante a citocinese (SUN *et al.*, 2020), um processo natural que ocorre nas células. É ainda onipresente nas células, entretanto é recrutada para os locais em que há presença de infecção (PIZARRO-CERDA *et al.*, 2002; COSSART *et al.*, 2003; HAMON *et al.*, 2006; MOSTOWY *et al.*, 2009). Estes dados em conjunto com a literatura podem ser uma explicação para um visível aumento da Septina 9, porém não significativamente estatístico.

Quanto a quantificação da expressão gênica da *Sept9* não apresentou diferenças entre os grupos. Entretanto, falhas técnicas foram identificadas posteriormente, o que inviabiliza estes resultados.

Eritrócitos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA causam a alteração do citoesqueleto de células endoteliais pulmonares primárias (CEPP), de forma mais específica, altera-se a actina (DEBONE, 2017; ORTOLAN *et al.*, 2019; NGUEE *etal.*, 2022). Ensaio de imunofluorescência de trabalhos publicados mostraram imagens onde a SEPT9 apresenta-se co-localizada com a actina (NAGATA *et al.*, 2005; VERDIER-PINARD *et al.*, 2017), porém, em sua grande maioria, em células cancerígenas (BI *et al.*, 2018).

Em experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, é possível

observar nas CEPP NE, a presença marcante da Sept9 no núcleo das células como demonstrado na **figura 29 C**.

Ao observar as CEPP que foram estimuladas com EP (**Figura 30 C**) e aquelas que foram estimuladas com EnP (**Figura 31 C**), é visto uma distribuição pelo citoplasma celular e ainda uma marcação nuclear (Sept9 em verde) mais fraca quando comparado com as CEPP NE. As CEPP EP e EnP, apresentam um padrão parecido de distribuição da Septina 9, entretanto, quando observado com atenção, percebe-se que o citoesqueleto de actina (**Figura 30 B**) apresenta-se desarranjado quando comparado com as CEPP EnP (**Figura 31 B**), a qual apresenta estruturas filamentosas marcadas.

Os dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, em conjunto com o que já é apresentado pela literatura, de que a Septina 9 é onipresente nas células (SUN *et al.*, 2020), pode ser recrutada para locais do organismo onde há um processo inflamatório (PIZARRO-CERDA *et al.*, 2002; COSSART *et al.*, 2003; HAMON *et al.*, 2006; MOSTOWY *et al.*, 2009), e ainda que EP levam ao desarranjo do citoesqueleto de actina (NGUEE *et al.*, 2022), podemos incluir a informação de que esta proteína pode estar ainda sofrendo um processo de ativação, através de alguma via ou ligação que ocorre durante o contato do EP com a CEPP.

Alterações citoesqueléticas da actina, podem levar a sua contração, que se dá pelo encurtamento dos filamentos de actina, acarretando no remodelamento das células e, conseqüentemente, aumentando os espaços entre elas, levando ao aumento da permeabilidade da barreira endotelial (NGUEE *et al.*, 2022). Considerando a co-localização da Septina 9 com os filamentos de actina e sendo estas identificadas como um quarto principal componente do citoesqueleto, interagindo com microtúbulos, microfilamentos, membrana e ligadas a um amplo espectro de funções celulares (MOSTOWY; COSSART, 2012), esta proteína pode apresentar um papel relevante nas alterações referentes os filamentos de actina.

7 CONCLUSÃO

Até o presente momento é possível concluir que em animais infectados por *Plasmodium berghei* ANKA, após o 7º DPI, tanto HP quanto SDRA, não há aumento estatisticamente significativo da expressão proteica da septina 9, quando comparados aos animais NI, apesar de apresentarem maior concentração, graficamente e em imagens de SDS-PAGE. Igualmente não houve diferença significativa entre os animais infectados, tanto SDRA quanto HP quando comparados com os animais NI, no experimento de qRT-PCR, a fim de analisar a expressão gênica da *Sept9*. Ao analisar a morfologia citoesquelética das CEPP estimuladas com EP, EnP e as NE, foi observada alteração nos filamentos de actina naquelas estimuladas com EP, quando comparada com aquelas NE e ainda aquelas estimuladas com EnP. Ao observar a localização da Septina 9 nestas células, foi observada que nas NE apresenta-se localizada principalmente no núcleo celular, enquanto as células estimuladas por EP, apresentam uma distribuição difusa da Septina 9 tanto no núcleo quanto no citoplasma celular. As células estimuladas por EnP, apresentam uma Septina também mais distribuída, tendo maior concentração no núcleo celular, porém uma marcação mais fraca quando comparada com as células NE e com as células estimuladas por EP. Entretanto, novos experimentos precisam ser repetidos para a confirmação destes resultados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. p. 13. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2020/dezembro/03/boletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf>.

GITTA, B.; KILIAN, N. Diagnosis of Malaria Parasites *Plasmodium spp.* in Endemic Areas: Current Strategies for an Ancient Disease. *BioEssays*, v. 42. 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/bies.201900138>.

NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M., VITOR, R. W. A. Parasitologia humana. Atheneu, 11ª ed., cap. 7., p. 146, 2016.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev*; 24: 377–410, 2011.

JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol*. Sep;13(9):573-87. doi: 10.1038/nrmicro3519. 2015. PMID: 26272409.

ASHLEY, E. A.; PYAE, P. A.; WOODROW, C. J. Malaria. *The Lancet*, 391(10130), 1608–1621. 2018. doi:10.1016/s0140-6736(18)30324-6.

BARTOLONI, A.; ZAMMARCHI, L. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. Catholic University in Rome. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375727/?report=reader#>>.

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

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5: 722–735, 2005.

BAPTISTA, F. G.; PAMPLONA, A.; PENA, A. C.; MOTA, M.M.; PIED, S.; VIGÁRIO, A. M. Accumulation of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. *Infect Immun*. 78(9):4033-9, 2010. doi: 10.1128/IAI.00079-10. Epub 2010 Jul 6. PMID: 20605973; PMCID: PMC2937458.

HAQUE, A.; ECHCHANNAOUI, H.; SEGUIN, R.; SCHWARTZMAN, J.; KASPER, L.

H.; HAQUE, S. Cerebral Malaria in Mice: Interleukin-2 Treatment Induces Accumulation of $\gamma\delta$ T Cells in the Brain and Alters Resistant Mice to Susceptible-Like Phenotype, *The American Journal of Pathology*, Volume 158, Issue 1, Pages 163-172, 2001. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63954-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63954-5).

OLATUNDE, A. .C.; CORNWALL, D. H.; ROEDEL, M.; LAMB, T. J. Mouse Models dor Unravelling Immunology of Blood Stage Malaria. *Vaccines* 2022, 10(9), 1525; 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines10091525>

SERCUNDES, M. K.; ORTOLAN, L. S.; DEBONE, D.; SOEIRO-PEREIRA, P. V.; GOMES, E.; AITKEN, E. H.; CONDINO-NETO, A.; RUSSO, M.; D' IMPÉRIO, L. M. R.; ALVAREZ, J. M.; PORTUGAL, S.; MARINHO, C. R.; EPIPHANIO, S. Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. *PLoS Pathog.* 7;12(12):e1006054, 2016. doi: 10.1371/journal.ppat.1006054.

DEBONE, D. Avaliação Do Citoesqueleto E Da Barreira Endotelial Pulmonar Na Malária Experimental. Universidade de São Paulo, 2017. Tese de mestrado.

JOSLING, G. A., LLINAS, M. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol.* 13: 573–87, 2015.

NGUEE, S. Y. T.; JÚNIOR, J. W. B. D.; EPIPHANIO, S.; RÉNIA, L.; CLASER, C. Experimental Models to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*12:899581, 2022. doi: 10.3389/fcimb.2022.899581.

HOLTER, J. F. et al., Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium. *J Clin Invest.* 78(6):1513-1522, 1986.

JABAUDON, M. et al. Net alveolar fluid clearance is associated with lung morphology phenotypes in acute respiratory distress syndrome. *Anaesthesia, critical care & pain medicine*, v. 35, n. 2, p. 81–6, abr. 2016.

ASHBAUGH, D. G.; BIGELOW, D. B.; PETTY, T. L.; LEVINE, B. E. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2, 319–323, 1967.

RANIERI, V. M. et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307, 2526–2533, 2012.

MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.* 122, 2731–2740, 2012.

NABHAN, A. N *et al.* Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells. *Science* 359, 1118-1123, 2018. DOI:10.1126/science.aam6603

BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Chest Med.* **3**, 35–56, 1982.

FEIN, A. et al. The value of edema fluid protein measurement in patients with pulmonary edema. *Am. J. Med.* **67**, 32–38, 1979.

KATZENSTEIN, A. L.; BLOOR, C. M.; LEIBOW, A. A. Diffuse alveolar damage — the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am. J. Pathol.* **85**, 209–228, 1976.

MENDEZ, J. L.; HUBMAYR, R. D. New insights into the pathology of acute respiratory failure. *Curr. Opin. Crit. Care* **11**, 29–36, 2005.

CARDINAL-FERNANDEZ, P.; LORENTE, J. A.; BALLEEN-BARRAGAN, A.; MATUTE-BELLO, G. Acute respiratory distress syndrome and diffuse alveolar damage. New insights on a complex relationship. *Ann. Am. Thorac Soc.* **14**, 844–850, 2017.

VOELKEL, N.; SHARON, R. E. D. S. The pulmonary endothelium: function in health and disease. John Wiley & Sons, 2009.

GIANNOTTA, M.; TRANI, M.; DEJANA, E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental Cell*, 26(5), 441–54. 2013.

DUDEK, STEVEN M.; JOE, G. N. G. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *Journal of Applied Physiology* 91.4:1487-1500, 2001.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability, 279–367, 2006.

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*, 77(12), 1763–72, 2009.

POLLARD, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(8), 2016. Doi: 10.1101/cshperspect.a018226.

CHHABRA, E. S.; HIGGS, H. N. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol.* 9(10):1110-21, 2009. doi: 10.1038/ncb1007-1110. PMID: 17909522.

SVITKINA, T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10(1):a018267, 2018. doi: 10.1101/cshperspect.a018267. PMID: 29295889; PMCID: PMC5749151.

HUXLEY, H.; HANSON, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature.* 22;173(4412):973-

6, 1954. doi: 10.1038/173973a0. PMID: 13165698.

HUXLEY, A. F.; NIEDERGERKE, R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*. 22;173(4412):971-3, 1954. doi: 10.1038/173971a0. PMID: 13165697.

WAGNER, E.; GLOTZER, M. Local RhoA activation induces cytokinetic furrows independent of spindle position and cell cycle stage. *J Cell Biol*, 213(6): 641-649, 2016. Doi:10.1083/jcb.201603025.

WEBER, A.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; HUGH, E. HUXLEY. birth of the filament sliding model of muscle contraction. *Trends in Cell Biology*. 12: 243-5, 2002. PMID 12062173 DOI: 10.1016/S0962-8924(02)02270-5.

KIM L. H.; RACZ, B.; WANG, H.; BURIANEK, L.; WEINBERG, R.; YASUDA, R.; WETSEL, W. C.; SODERLING, S. H. Disruption of Arp2/3 Results in Asymmetric Structural Plasticity of Dendritic Spines and Progressive Synaptic and Behavioral Abnormalities *Journal of Neuroscience*, 33 (14) 6081-6092; 2013. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0035-13>.

BILLADEAU, D. D.; BURKHARDT, J. K. Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic*. (11):1451-60, 2006. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00491.x. Epub 2006 Sep 19. PMID: 16984404; PMCID: PMC1779662.

SENS, K. L.; ZHANG, S.; JIN, P.; DUAN, R.; ZHANG, G.; LUO, L.; PARACHINI, L.; CHEN, E. H. An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *J Cell Biol*; 191(5): 1013–1027, 2010. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201006006>

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629–635, 2002. doi: 10.1038/nature01148.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev CellDev Biol*.;21:247–69, 2005.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv. Cancer Res.*; 84:57–80, 2002.

COLLINS, C.; NELSON, W. J. Running with neighbors: coordinating cell migration and cell–cell adhesion, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 36, Pages 62-70. 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.07.004>.

WANG, L.; ZHENG, Y. Cell type-specific functions of Rho GTPases revealed by gene targeting in mice. *Trends Cell Biol*. 17, 58–64, 2007.

ZHOU, X.; ZHENG, Y. Cell type-specific signaling function of RhoA GTPase: lessons from mouse gene targeting. *J Biol Chem.* 20;288(51):36179- 88, 2013. doi: 10.1074/jbc.R113.515486. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24202176; PMCID:PMC3868732

RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399, 1992.

TAKAISHI, K.; KIKUCHI, A.; KURODA, S.; KOTANI, K.; SASAKI, T.; TAKAI, Y. Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in cell motility. *Mol. Cell. Biol.* 13, 72-93, 1993.

ALLEN, W. E.; JONES, G. E.; POLLARD, J. W.; RIDLEY, A. J. Rho, Rac and cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J. Cell Sci.* 110, 707-720, 1997.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho GTPases control polarity, protrusion and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235-1244, 1999.

GU, Z.; WANG, H.; LI, L. *et al.* Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell. *Sci Rep* 4, 4469, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep04469>.

MCKERRACHER, L.; FERRARO, G. B.; FOURNIER, A. E. Chapter Six - Rho Signaling and Axon Regeneration. Ed. Jeffrey L. Goldberg, Ephraim F. Trakhtenberg, *International Review of Neurobiology*, Academic Press, v.105, p.117-140. 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398309-1.00007-X>.

ALIEVA, I. B. *et al.* The leading role of microtubules in endothelial barrier dysfunction: Disassembly of peripheral microtubules leaves behind the cytoskeletal reorganization. *J of Cell Biochem*, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.24575>.

LI, N.; MRUK, D.D.; CHENG, C. Y. Actin binding proteins in blood-testis barrier function. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*;22(3):238-47, 2015. doi: 10.1097/MED.000000000000155. PMID: 25887390; PMCID: PMC4447325.

RIDLEY, A. J. Life at the Leading Edge. Volume 145, issue 7, p1012-1022, June 24, 2011. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.010>

ROSSMAN, K.; DER, C.; SONDEK, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-180, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrm1587>.

YE, R. D. The Rho guanine nucleotide exchange factor P-Rex1 as a potential drug target for cancer metastasis and inflammatory diseases. *Pharmacological Research*,

Volume 153, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104676>.

TEIXEIRA, C. E.; WEBB, R. C. The RhoA/Rho-Kinase Signaling Pathway in Vascular Smooth Muscle Contraction: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology, Ed. Gregory Y.H. Lip, John E. Hall, Comprehensive Hypertension, Mosby, cap.16, p.167-181, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/B9780-323-03961-1>.

KIM, J-G.; ISLAM, R.; CHO, J. Y.; JEONG, H.; CAP, K-C.; PARK, Y.; HOSSAIN, A. J.; PARK, J-B. *Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway. Journal of Cellular Physiology*, 2018. doi:10.1002/jcp.26487

HU, P.; LUO, B. H. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol.*;228(2):306-12, 2013. doi: 10.1002/jcp.24154. PMID: 22767296.

WEHRLE-HALLER B. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 24(5):569-81, 2012. doi: 10.1016/j.ccb.2012.06.010. Epub 2012 Jul 19. PMID: 22819514.

SCHALLER, M. D.; PARSONS, J. T. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr. Op. Cell Biol.* 6, 705-710, 1994.

SCHLAEPFER, D. D.; HAUCK, C. R.; SIEG, D. J. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 435-478, 1999.

REN, B.; ROBERT, F.; WYRICK, J. J.; APARICIO, O.; JENNINGS, E. G.; SIMON, I.; ZEITLINGER, J.; SCHREIBER, J.; HANNETT, N.; KANIN, E.; VOLKERT, T. L.; WILSON, C. J.; BELL, S. P.; YOUNG, R. A. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science.* 22;290(5500):2306-9, 2000. doi: 10.1126/science.290.5500.2306. PMID: 11125145.

SANGER, J. M.; SANGER, J. W. Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells. *J Cell Biol.*; 86 (2): 568–575, 1980. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.86.2.568>.

KWIATKOWSKI *et al.* Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends in Cell Biology*, 386-392, 2003.

CHEN *et al.* Ena/VASP Proteins Cooperate with the WAVE Complex to Regulate the Actin Cytoskeleton. *Developmental Cell* 30, 569–584, 2014.

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. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 305:4, L291-L300, 2013.

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*, 197(7), 1062–73, 2008. doi:10.1086/528988.

ILIC, D.; FURUTA, Y; KANAZAWA, S.; TAKEDA, N.; SOBUE, K.; NAKATSUJI, N.; NOMURA, S.; FUJIMOTO, J.; OKADA, M.; YAMAMOTO, T.; AIZAWA, S. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544, 1995.

SIEG, D. J.; HAUCK, C. R.; SCHLAEPFER, D. D. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin stimulated cell migration. *J. Cell Sci.* 1999.

KUMAGAI, M. H.; TURPEN, T. H.; WEINZETTL, N.; DELLA-CIOPPA, G.; TURPEN, A.M.; DONSON, J.; HILF, M. E.; GRANTHAM, G. L.; DAWSON, W. O.; CHOW, T. P. *et al.* Rapid, high-level expression of biologically active alpha- trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(2):427-30, 1993. doi: 10.1073/pnas.90.2.427. PMID: 8421670; PMCID: PMC45675.

YONEMURA, S.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; TSUKITA, S. Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci.*;108 (Pt 1):127-42, 1995. doi: 10.1242/jcs.108.1.127. PMID: 7738090.

BUCKLEY, I. K.; PORTER, K. R. Cytoplasmic fibrils in living cultured cells. *Protoplasma* 64, 349–380, 1967. Doi:https://doi.org/10.1007/BF01666538.

BURRIDGE, K.; WITTCHEN, E. S. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol.*; 200(1):9-19, 2013. doi: 10.1083/jcb.201210090. PMID: 23295347; PMCID: PMC3542796.

WEBER, K.; GROESCHEL-STEWART, U. Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(11):4561-4, 1974. doi: 10.1073/pnas.71.11.4561. PMID: 4612524; PMCID: PMC433927.

HUXLEY, A. F. Muscle structure and theories of contraction. *Prog BiophysBiophys Chem.* 1957;7:255-318, 1957. PMID: 13485191.

LAZARIDES, E. Two general classes of cytoplasmic actin filaments in tissue culture cells: the role of trpomyosin. *J of Supermol Structure*, 1976.

VICENTE-MANZANARES, M.; MA, X.; ADELSTEIN, R. *et al.* Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 778–790, 2009. Doi: https://doi.org/10.1038/nrm2786.

HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; REID, B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast I. detection of mutants. *Proceedings of the National Academy*, v. 66, n. 2, p. 352–359, 1970.

HARTWELL, L. H.; CULOTTI, J.; PRINGLE, J. R.; REID, B. J. Genetic control of the cell division cycle in yeast: A model to account for the order of cell cycle events is deduced from the phenotypes of yeast mutants. *Science*, v. 183, n. 4120, p. 46–51, 1974.

BYERS, B.; GOETSCH, L. Highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *Journal of Cell Biology*, v. 69, n. 3, p. 717–721, 1976.

HAARER, B. K.; PRINGLE, J. R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Molecular and Cellular Biology*, v. 7, n. 10, p. 3678–3687, 1987.

HYONG, B. K.; BRIAN, K. K.; PRINGLE, J. R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: Localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *Journal of Cell Biology*, v. 112, n. 4, p. 535–544, 1991.

FIELD, C. M. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *The Journal of Cell Biology*, v. 133, n. 3, p. 605–616, 1996.

GLADFELTER, A. S.; PRINGLE, J. R.; LEW, D. J. The septin cortex at the yeast mother – bud neck. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, n. 6, p. 681–689, 2001.

WEIRICH, C. S.; ERZBERGER, J. P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 6, p. 478–489, 2008.

LONGTINE, M. S.; DEMARINI, D. J.; VALENCIK, M. L.; AL-AWAR, O. S.; FARES, H.; DE VIRGILIO, C.; PRINGLE, J. R. The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 8, n. 1, p. 106–119, 1996

MOSTOWOY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v.13, p.183-194, 2012.

SIDHAYE, V. K.; CHAU, E.; BREYESSÉ, P. N.; KING, L. S. Septin-2 Mediates Airway Epithelial Barrier Function in Physiologic and Pathologic Conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.45, p.120-126, 2011.

NEUBAUER, K.; ZIEGER, B. The Mammalian Septin Interactome. *Frontiers in Cell And Developmental Biology*. Freiburg, Germany, 2017.

ZENG, Y.; ET, A. L. SEPT9_i1 regulates human breast cancer cell motility through

cytoskeletal and RhoA/FAK signaling pathway regulation. Official journal of the Cell Death Differentiation Association, 2019.

NISHIHAMA, R.; ONISHI, M.; PRINGLE, J. R. New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biological Chemistry*, v. 392, n. 8-9, 2011.

ESTEY, M. P.; KIM, M. S.; TRIMBLE, W. S. Septins. *Current Biology*, v. 21, n. 10, p. 384–387, 2011.

LEIPE, D. D.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases¹¹ Edited by J. Thornton, *Journal of Molecular Biology*, Volume 317, Issue 1, Pages 41- 72, 2002. Doi:<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5378>.

FIELD, C. M.; KELLOGG, D. Septins: cytoskeletal polymers or signaling GTPases? *Trends Cell Biology*, v. 9, n. 10, p. 387-394, 1999.

VALADARES, N. F.; D' MUNIZ, P. H.; ULIAN, A. A. P.; GARRATT, R. C. Septin structure and filament assembly. *Biophys Rev.*;9(5):481-500, 2017. doi: [10.1007/s12551-017-0320-4](https://doi.org/10.1007/s12551-017-0320-4).

LEONARDO, D. A.; CAVINI, I. A.; SALA, F. A.; MENDONÇA, D.C.; ROSA, H. V. D.; KUMAGAI, P. S.; JR, E. C.; VALADARES, N. F.; MARQUES, I. A.; BRANDÃO-NETO, J.; MUNTE, C.E. *et al.* Orientational Ambiguity in Septin Coiled Coils and its Structural Basis, *Journal of Molecular Biology*, V. 433. 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166889>.

KINOSHITA, M. The septins. *Genome Biology*, v. 4, n. 236, p. 1-9, 2003a. MACARA, I. G.; BALDARELLI, R.; FIELD, C. M.; GLOTZER, M.; HAYASHI, Y.; HSU, S. C.; *et al.* Mammalian septins nomenclature. *Mol. Biol. Cell* 13, 4111–4113, 2002. doi: [10.1091/mbc.E02-07-0438](https://doi.org/10.1091/mbc.E02-07-0438).

CASAMAYOR, A.; SNYDER, M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Molecular Cell Biology*, v. 23, n. 8, p. 2762-2777, 2003.

KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J Cell Sci.*; 114:839–844, 2001. [PubMed: 11181167]

DENT, J.; KATO, K.; PENG, X. R.; MARTINEZ, C.; CATTANEO, M.; POUJOL, C.; NURDEN, P.; NURDEN, A.; TRIMBLE, W. S.; WARE, J. A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 99:3064–3069, 2002. [PubMed: 11880646]

IHARA, M.; KINOSHITA, A.; YAMADA, S.; TANAKA, H.; TANIGAKI, A.; KITANO, A.; GOTO, M.; OKUBO, K.; NISHIYAMA, H.; OGAWA, O. *et al.* Cortical organization by

the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. *Dev Cell.*; 8:343–352, 2005. [PubMed: 15737930]

KISSEL, H.; GEORGESCU, M-M.; LARISCH, S.; MANOVA, K.; HUNNICUTT, G. R.; STELLER, H. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice. *Dev Cell.*; 8:353–364, 2005. [PubMed: 15737931]

VERSELE, M.; THORNER, J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biology*, v. 15, n. 8, p. 414-424, 2005.

PAN, F. F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, n.103, p. 1-17, 2007.

HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol.*; 204:489–505, 2004. [PubMed: 15495264]

SONG, E. H. *et al.* Acetylation of the RhoA GEF Net1A controls its subcellular localization and activity. *J. Cell Sci.* **128**, 913–922, 2015.

SPILOTIS, E. T.; GLADFELTER, A. S. Spatial guidance of cell asymmetry: septin GTPases show the way. *Traffic* 13, 195–203, 2012. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01268.x

SISSON, J. C.; FIELD, C.; VENTURA, R.; ROYOU, A.; SULLIVAN, W. Lava lamp, a novel peripheral Golgi protein, is required for *Drosophila melanogaster* cellularization. *Journal Cell Biology*, v. 151, n. 4, p. 905-917, 2000.

VERDIER-PINARD, P.; SALAUN, D.; BOUGUENINA, H. *et al.* Septin9_i2 is downregulated in tumors, impairs cancer cell migration and alters subnuclear actin filaments. *Scientific Reports*, 7:44976. DOI:10.1038/srep44967. Marseille, França, 2017.

KINOSHITA, M.; KUMAR, S., MIZOGUCHI, A.; IDE, C.; KINOSHITA, A.; HARAGUCHI, T.; HIRAOKA, Y.; NODA, M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actinbased structures. *Genes Development*, v. 11, p. 1535-1547,1997.

KINOSHITA, M.; FIELD, C. M.; COUGHLIN, M. L.; STRAIGHT, A. F.; MITCHISON, T. J. Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell.*;3(6):791-802, 2002. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00366-0. PMID: 12479805.

KINOSHITA, M. Diversity of septin scaffolds. *Current Opinion in Cell Biology*,v.18,n. 1, p. 54-60, 2006.

SPILOTIS, E. T. *et al.* A Mitotic Septin Scaffold Required for Mammalian Chromosome Congression and Segregation. *Science***307**,1781-1785, 2005.

DOI:10.1126/science.1106823.

FINGER, F. P.; KOPIK, K. R.; WHITE, J. G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. *Developmental Biology*, v. 261, n. 1, p. 220-234, 2003.

KREMER, B.E.; HAYSTEAD, T.; MACARA, I.G. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAPP-1. *Molecular Biology of the Cell*, v. 16, n. 10, p. 4648-4659, 2005.

SPILOTIS, E. T.; NELSON, W. J. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *Journal of Cell Science*, v. 119, n.1, p. 4-10, 2005.

HUANG, Y-W.; SURKA, M. C.; REYNAUD, D.; ASCIAK, C. P.; TRIMBLE, W. S. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *FEBS Journal*, v. 273, n.14, p. 3248-3260, 2006.

KUSCH, J.; MEYER, A.; SNYDER M. P., BARRAL, Y. Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. *Genes & Development*, v. 16, n. 13, p. 1627-1639, 2002.

FATY, M.; FINK, M.; BARRAL, Y. Septins: a ring to part mother and daughter. *Current Genetics*, v. 41, n. 3, p. 123-131, 2002.

SPILOTIS, E. T.; NELSON, W. J. Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Division*, v. 4, n. 18, p. 1-14, 2009.

KALIKIN, L. M.; SIMS. H. L.; PETTY, E. M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that maps to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics*, v. 63, n.2, p. 165-172, 2000.

MONTAGNA, C.; LYU, M. S.; HUNTER, K.; LUKES, L.; LOWTHER, W.; REPERT, T. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Research*, v. 63, n. 9, p. 2179-2187, 2003.

SCOTT, M. W.; MCCLUGGAGE, G.; KENNETH, J. H.; PETER, A. H.; RUSSELL, R. E. H. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *International Journal Cancer*, v. 118, n. 5, p. 1325-1329, 2006.

SAKAI, K.; KURIMOTO, M.; TSUGU, A.; HUBBARD, S. L.; TRIMBLE, W. S.; RUTKA, J. T. Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *Journal Neurooncology*, v. 57, n. 3, p. 169-177, 2002.

KIM, D. S.; HUBBARD, S. L.; PERAUD, A.; SALHIA, B.; SAKAI, K.; RUTKA, J. R. Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumours. *Neoplasia*, v. 6, n. 2, p. 168-178, 2004.

OSAKA, M.; ROWLEY, J. D.; ZELEZNIK-LE, N. J. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with at(11;17)(q23;q25). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, v. 96, n. 11, p. 6428-6433, 1999.

SORENSEN, A. B.; LUND, A. H.; ETHELBERG, S.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; PEDERSEN, F. S. Sint1, a common integration site in SL3-3- Induced T-Cell Lymphomas, harbors a putative proto- oncogene with homology to the Septin gene family. *Journal of Virology*, v. 74, n. 5, p. 2161-2168, 2000.

CERVEIRA, N.; CORREIA, C.; BIZARRO, S.; PINTO, C.; LISBOA, S.; MARIZ, J. M.; MARQUES, M.; TEIXEIRA, M. R. SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). *Oncogene*, v. 25, n. 45, p. 6147- 6152, 2006.

ROESELER, S.; SANDROCK, K.; BARTSCH I.; ZIEGER, B. Septins, a novel group of GTP-binding proteins: relevance in hemostasis, neuropathology and oncogenesis. *Klinische Padiatrie*, v. 221, n. 3, p. 150-155, 2009.

CALTAGARONE, J.; RHODES, J.; HONER, WG.; BOWSER, R. Localization of a novel septin protein, hCDCrel-1, in neurons of human brain. *Neuroreport*, v. 9, n. 12, p. 2907-2912, 1998.

TODA, S.; KAJII, Y.; SATO, M.; NISHIKAWA, T. Reciprocal expression of infant-and adult-preferring transcripts of CDCrel-1 septin gene in the rat neocortex. *Biochemical Biophysical Research Communications*, v. 273, n. 2, p. 723-728, 2000.

SIMANTOV, R.; PENG, W. MDMA (Ecstasy) controls in concert a group of genes involved in GABA neurotransmission. *FEBS Letters*, v. 563, n. 1, p. 3-6, 2004.

HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. H.; PRINGLE, J. R. An introduction to the septins. In: *The septins*. Chichester: John Wiley, & Sons, p. 1–4, 2008.

GRUENHEID, S.; FINLAY, B. B. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, v. 422, p. 775-81, 2003.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*, v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004.

KINOSHITA, M. Assembly of Mammalian Septins, *The Journal of Biochemistry*, Volume 134, Issue 4, Pages 491–496, 2003. Doi:<https://doi.org/10.1093/jb/mvg182>

KOH-ICHI, N.; TOMIKO, A.; YOSHINORI, N.; MASAKI, I. Biochemical and cell biological analyses of a mammalian septin complex, Sept7/9b/11. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 53, p. 55895-55904, 2004.

DA SILVA, S. Estudos de aspectos estruturais importantes na montagem de filamentos de septinas. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2016. Tese de doutorado.

HUANG, Y.-W.; SURKA, M.C.; REYNAUD, D.; PACE-ASCIAK, C.; TRIMBLE,

W.S. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. *The FEBS Journal*, 273: 3248-3260, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05333.x>.

NEUFELD, T. P.; RUBIN, G. M. The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell*, v. 77, n. 3, p. 371- 379, 1994.

LONGTINE, M. S.; FARES, H.; PRINGLE, J. R. Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *Journal Cell Biology*, v. 143, n. 3, p. 719-736, 1998.

JOBERTY, G.; PERLUNGHER, R. R.; SHEFFIELD, P. J.; KINOSHITA, M.; NODA, M.; HAYSTEAD, T.; MACARA I. G. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nature Cell Biology*, v. 3, n.10, p. 861-866, 2001.

MARTINEZ, C.; SANJUAN, M. A.; DENT, J. A.; KARLSSON, I.; WARE, J. Human septin-septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol. *Biochemical Journal*, v. 382, p. 783-791, 2004.

LOW, C.; MACARA, I. G. Structural analysis of Septin 2, 6, and 7 complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 30697-30706, 2006.

VALADARES, N. F.; D' MUNIZ, P. H.; ULIAN, A. A. P.; GARRATT, R. C. Septin structure and filament assembly. *Biophysical Reviews*, 2017. doi:10.1007/s12551-017-0320-4

MARQUES, I. de A. Estudos estruturais de septinas: explorando interações entre subunidades de filamentos de septinas humanas. Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010. Tese de doutorado.

MENDOZA, M.; HYMAN, A. A.; GLOTZER, M. GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Curr Biol.* 29;12(21):1858-63, 2002. doi:10.1016/s0960-9822(02)01258-7. PMID: 12419187.

GARCIA, W.; DE ARAÚJO, A. P. U.; LARA, F.; FOGUEL, D.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R. C. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion- β) forms amyloid-like filaments in vitro. *Biochemistry*, v. 46, n. 39, p. 11101–11109, 2007.

FARKASOVSKY, M.; HERTER, P.; VOSS, B.; WITTINGHOFER, A. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. *Biol Chem.* Jul;386(7):643-56, 2005. doi: 10.1515/BC.2005.075. PMID: 16207085.

KINOSHITA, A.; KINOSHITA, M.; AKIYAMA, H.; TOMIMOTO, H.; AKIGUCHI, I.; KUMAR, S.; NODA, M.; KIMURA, J. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, v. 153, n. 5, p. 1551–1560, 1998.

KEIICHI, S.; MASANORI, K.; ATSUSHI, T.; HUBBARD, S. L.; WILLIAM S. TRIMBLE, W. S. Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 57, n. 3, p. 169–177, 2002.

MARGUTTI, P.; SORICE, M.; CONTI, F.; DELUNARDO, F.; RACANIELLO, M.; ALESSANDRI, C.; SIRACUSANO, A.; RIGANÒ, R.; PROFUMO, E.; VALESINI, G.; ORTONA, E. Screening of an endothelial cDNA library identifies the C- terminal region of Nedd5 as a novel autoantigen in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations. *Arthritis Research & Therapy*, v. 7, n. 4, p. R896, 2005.

CRAVEN, R. A.; HANRAHAN, S.; TOTTY, N.; HARNDEN, P.; STANLEY, A. J.; MAHER, E. R.; HARRIS, A. L.; TRIMBLE, W. S.; SELBY, P. J.; BANKS, R. E. Proteomic identification of a role for the von Hippel Lindau tumour suppressor in changes in the expression of mitochondrial proteins and septin 2 in renal cell carcinoma. *PROTEOMICS*, v. 6, n. 13, p. 3880–3893, 2006.

GARCIA, W.; DE ARAÚJO, A. P. U.; DE OLIVEIRA NETO, M.; BALLESTERO, M. R. M.; POLIKARPOV, I.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; GARRATT, R. C. Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. *Biochemistry*, v. 45, n. 46, p. 13918–13931, 2006.

PETERSON, E.; PETTY, E. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clinical Genetics*, v. 77, n. 6, p. 511–524, 2010.

YU, N. B.; DING, X. M.; CHEN, F.; SHEN, S. Q.; GU, X.; YU, L. The phosphorylation of SEP2 on Ser118 by casein 2 is important to hepatomacarcinoma cell proliferation. *Biochemistry, Molecular and Cell*, v. 325, n. 1-2, p. 61–67, 2000.

BURROWS, J. F.; CHANDULOY, S.; MCILHATTON, M. A.; NAGAR, H.; YEATES, K.; DONAGHY, P.; PRICE, J.; GODWIN, A. K.; JOHNSTON, P. G.; RUSSELL, S. H. Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *The Journal of Pathology*, v. 201, n. 4, p. 581–588, 2003.

ITO, H.; IWAMOTO, I.; MORISHITA, R.; NOZAWA, Y.; NARUMIYA, S.; ASANO, T.; NAGATA, K. I. Possible role of Rho/ Rhotekin signaling in mammalian septin organization. *Oncogene*. 24:7064–7072, 2005. [PubMed: 16007136]

NAGATA, K.; INAGAKI, M. Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin. *Oncogene*. 24:65–76, 2005. [PubMed: 15558029]

KIM, M. S.; FROESE, C. D.; ESTEY, M. P.; TRIMBLE, W. S. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization- dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.* 195, 815–826, 2011. doi:10.1083/jcb.201106131

SANDROCK, K.; BARTSCH, I.; BLÄSER, S.; BUSSE, A.; BUSSE, E. AND

ZIEGER, B. Characterization of human septin interactions. *Biological Chemistry*, vol. 392, no. 8-9, pp. 751-761, 2011. Doi:<https://doi.org/10.1515/BC.2011.081>

SELLIN, M. E.; SANDBLAD, L.; STENMARK, S.; GULLBERG, M.; KELLOGG, D. R. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 22, No. 17, 2011. Doi:<https://doi.org/10.1091/mbc.e11-03-0253>

HALL, P. A.; JUNG, K.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. H. Expression profiling the human septin gene family. *The Journal of Pathology*, v. 206, n. 3, p. 269–278, 2005.

CAO, L.; YU, W.; WU, Y.; YU, L. The evolution, complex structures and function of septin proteins. , 66(20), 3309–3323, 2009. doi:10.1007/s00018-009-0087-2.

NAKAHIRA, M.; MACEDO, J. N.; SERAPHIM, T. V.; CAVALCANTE, N.; SOUZA, T. A.; DAMALIO, J. C. et al. A draft of the human septin interactome. *PLoS ONE* 5:e13799, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0013799

MCILHATTON, M. A.; BURROWS, J. F.; DONAGHY, P. G.; CHANDULOY, S.; JOHNSTON, P. G.; RUSSELL, S. E. Genomic organization, complex splicing pattern and expression of a human septin gene on chromosome 17q25.3. *Oncogene* 20, 5930–5939, 2001. doi: 10.1038/sj.onc.1204752

KALIKIN, L. M.; SIMS, H. L.; PETTY, E. M. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics* 63, 165–172, 2000. doi: 10.1006/geno.1999.6077

SCOTT, M.; HYLAND, P. L.; MCGREGOR, G.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. E. H.; HALL, P. A. Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. 24(29), 4688–4700, 2005. doi:10.1038/sj.onc.1208574

CONNOLLY, D. *et al.* Septin 9 amplification and isoform-specific expression in peritumoral and tumor breast tissue. *Biol. Chem.* 395, 157–167, 2014.

RUSSELL, S. E.; MCILHATTON, M. A.; BURROWS, J. F.; DONAGHY, P. G.; CHANDULOY, S.; PETTY, E. M. et al. Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 60, 4729–4734, 2000.

ORTOLAN, L. DOS S.; SERCUNDES, M. K.; MOURA, G. C.; QUIRINO, T. DE C.; DEBONE, D.; COSTA, D. DE S. et al. Endothelial Protein C Receptor Could Contribute to Experimental Malaria- Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Immunol Res.* 2019;2019: 18 10.1155/2019/3105817

ORTOLAN LS, SERCUNDES MK, BARBOZA R, DEBONE D, MURILLO O, HAGEN

SC, RUSSO M, D' IMPÉRIO LIMA MR, ALVAREZ JM, AMAKU M, MARINHO CR, EPIPHANIO S. Predictive criteria to study the pathogenesis of malaria-associated ALI/ARDS in mice. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:872464. doi: 10.1155/2014/872464. Epub 2014 Sep 2. PMID: 25276057; PMCID: PMC4167651

LOMASK, M. Further exploration of the Penh parameter. *Exp Toxicol Pathol.* 57 Suppl 2:13-20, 2006. doi: 10.1016/j.etp.2006.02.014. Epub 2006 Apr 25. PMID: 16638630.

WILAIRATANA, P.; TANGPUKDEE, N.; KRUDSOOD, S. Definition of hyperparasitemia in severe falciparum malaria should be updated. *Asian Pac J Trop Biomed.* 3(7):586, 2013. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60119-7. PMID: 23835631; PMCID: PMC3695588.

CUNNINGTON, A. J.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. *VOLUME 29, ISSUE 12, P585-592, DECEMBER 2013.* DOI:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.004>

MATTHAY, M. A.; FOLKESSON, H. G.; CLERICI, C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev.* 82: 569- 600, 2002.

WANG, L.; BASTARACHE, J. A.; WICKERSHAM, N.; FANG, X.; MATTHAY, M. A.; WARE, L. B. Novel role of the human alveolar epithelium in regulating intra- alveolar coagulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36: 497-503, 2007.

BASTARACHE, J. A.; WANG, L.; WANG, Z.; ALBERTINE, K. H.; MATTHAY, M. A.; WARE, L. B. Intra-alveolar tissue factor pathway inhibitor is not sufficient to block tissue factor procoagulant activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294: L874-L881, 2008.

IKEGAMI, M.; FALCONE, A.; WHITSETT, J. A. STAT-3 regulates surfactant phospholipid homeostasis in normal lung and during endotoxin-mediated lung injury. *J Appl Physiol.* 104: 1753-1760, 2008.

ZUO, Y. Y.; VELDHUIZEN, R. A. W.; NEUMANN, A. W.; PETERSEN, N. O.; POSSMAYER, F. Current perspectives in pulmonary surfactant—inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim Biophys Acta.* 1778: 1947-1977, 2008.

TOLLE, L. B.; STANDIFORD, T. J. Danger-associated molecular patterns(DAMPs) in acute lung injury. *J Pathol.* 229: 145-156, 2013.

BOS, L. D. J.; WARE, L. B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *Lancet;* 400: 1145–56, 2022. Doi:[https://doi.org/10.1016/ S0140-6736\(22\)01485-4](https://doi.org/10.1016/ S0140-6736(22)01485-4).

FRAZER, D. G.; REYNOLDS, J. S.; JACKSON, M. C. Determining when enhanced pause (Penh) is sensitive to changes in specific airway resistance. *J Toxicol Environ Health A.* 74(5):287-95, 2011. doi: 10.1080/15287394.2010.514235. PMID: 21240729.

QUIRINO, T. C.; ORTOLAN, L. D. S.; SERCUNDES, M. K.; MARINHO, C. R. F.; TURATO, W. M.; EPIPHANIO, S. Lung aeration in experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome by SPECT/CT analysis. *PLoS One*. 29;15(5):e0233864, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0233864. PMID: 32470082; PMCID: PMC7259762.

CONNOLLY, D.; YANG, Z.; CASTALDI, M.; SIMMONS, N.; OKTAY, M. H.; CONIGLIO, S.; *et al.* Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 13, R76, 2011. doi: 10.1186/bcr2924

POWRÓZEK, T.; KRAWEZYK, P.; KUCHARCZYK; MILANOWSKI, T. Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA-potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report. *Med Oncol*, v.31, p.917, 2014.

MARCUS, J.; BEJERANO-SAGIE, M.; PATTERSON, N. *et al.* Septin 9 isoforms promote tumorigenesis in mammary epithelial cells by increasing migration and ECM degradation through metalloproteinase secretion at focal adhesions. *Northwell Health* 01;38(30), 2019.

SUN, N.; WEI, L.; SHI, S.; JIAO, D.; SONG, R.; MA, L.; WANG, H.; WANG, C.; WANG, Z.; YOU, Y.; LIU, S.; WANG, H. A qualitative study on the psychological experience of caregivers of COVID-19 patients. *Am J Infect Control*. 48(6):592-598, 2020. doi: 10.1016/j.ajic.2020.03.018. Epub 2020 Apr 8. PMID: 32334904; PMCID: PMC7141468.

BI, J.; WANG, R.; ZENG, X. Lipid rafts regulate the lamellipodia formation of melanoma A375 cells via actin cytoskeleton-mediated recruitment of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin. *Oncol Lett*, v.5, p.6540-6546, 2018.

HAMON, M.L.; BIERNE, H. L. N.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Micro* 4: 423–434, 2006.

COSSART, P.; PIZARRO-CERDA, J.; LECUIT, M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends in Cell Biology* 13: 23–31, 2003.

PIZARRO-CERDA, J.; JONQUIERES, R.; GOUIN, E.; VANDEKERCKHOVE, J.; GARIN, J. *et al.* Distinct protein patterns associated with *Listeria monocytogenes* InIA- or InIB phagosomes. *Cellular Microbiology* 4: 101–115, 2002.

MOSTOWY, S.; NAM, T. T.; DANCKAERT, A.; GUADAGNINI, S.; BOISSON-DUPUIS, S. *et al.* Septins Regulate Bacterial Entry into Host Cells. *PLoS ONE* 4(1): e4196, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0004196.

9 MATERIAL SUPLEMENTAR

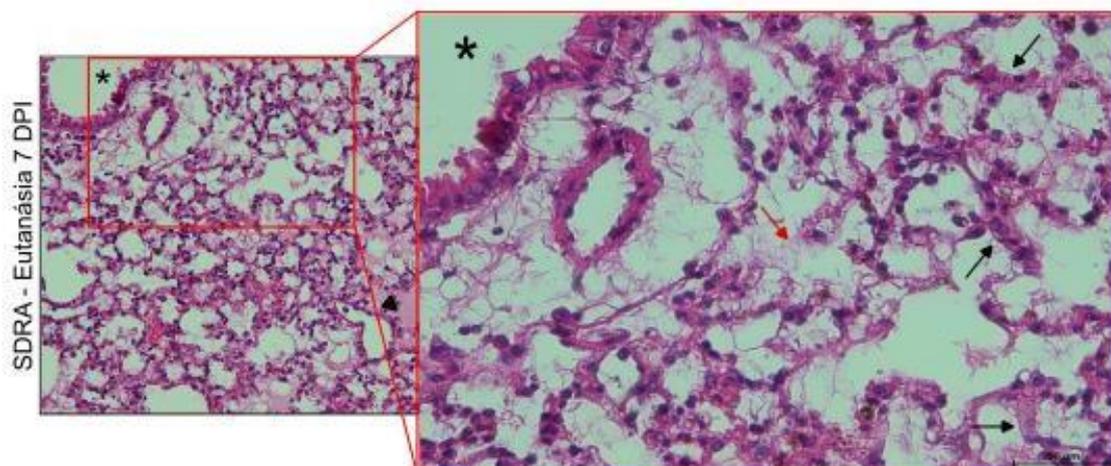


Figura Suplementar 1 — Imagem de tecido pulmonar de animal SDR eutanasiado no 7º DPI, e coloração por Hematoxilina e Eosina. * = brônquios ou brônquiolos; Ponta da seta = edema; Seta preta = parede alveolar espessa; Seta vermelha = parede alveolar destruída. Barra de escala: 100μm. Microscópio: AXIO Imager M2 (ZEISS), câmera AxioCam HRc (LIPE's Lab 131 - ICB II).

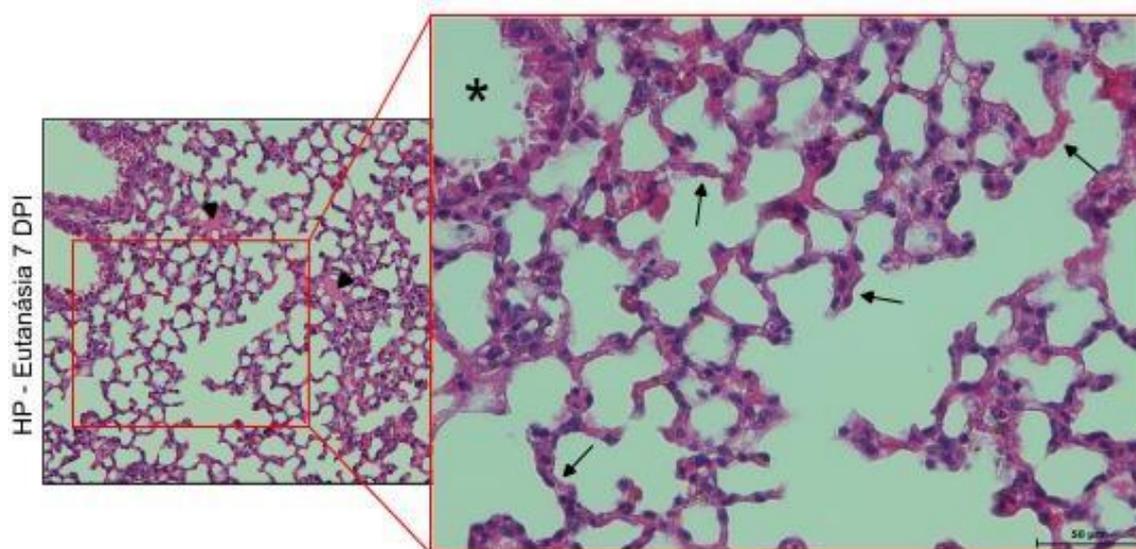


Figura Suplementar 2 – Imagem de tecido pulmonar de animal HP eutanasiado no 7º DPI, e coloração por Hematoxilina e Eosina. * = brônquios ou brônquiolos; Ponta da seta = edema; Seta preta = parede alveolar espessa. Barra de escala: 100μm. Microscópio: AXIO Imager M2(ZEISS), câmera AxioCam HRc (LIPE's Lab 131 – ICB II).