



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Marcele Fontenelle Bastos

**EFEITOS DO CONDROITIM SULFATO FUCOSILADO NA
MALÁRIA**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Marcele Fontenelle Bastos
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B297e

Bastos, Marcele Fontenelle
Efeitos do condroitim sulfato fucosilado na malária /
Marcele Fontenelle Bastos. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Condroitim sulfato fucosilado. 2. Malária. 3.
Aderência celular. 4. *Plasmodium*. I. Costa, Fabio
Trindade Maranhão, 1972-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effects of fucosylated chondroitin sulfate in malaria.

Palavras-chave em inglês: Fucosylated chondroitin sulfate; Malaria; Cellular adherence; *Plasmodium*.

Área de concentração: Imunologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Fabio Trindade Maranhão Costa, Claudio Romero Farias Marinho, Alessandro dos Santos Farias.

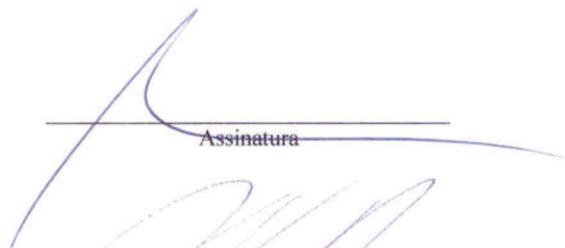
Data da defesa: 04/03/2011.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 04 de março de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa (Orientador)



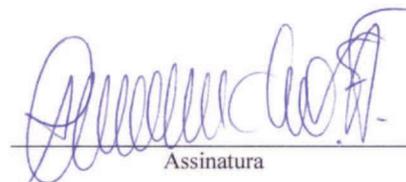
Assinatura

Prof. Dr. Claudio Romero Farias Marinho



Assinatura

Dr. Alessandro dos Santos Farias



Assinatura

Profa. Dra. Sabrina Epiphonio

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada "Efeitos do condroitim sulfato fucosilado na malária".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UNICAMP), sob Protocolo(s) nº 1807-1.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Marcele Fontenelle Bastos
Aluna: Marcelle Fontenelle Bastos

Prof. Dr. Fabio T. M. Costa
Dep. Genética, Evolução e Biogênese
Instituto de Biologia, UNICAMP

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

**Trabalho realizado com apoio da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa pela oportunidade oferecida, pela confiança em mim depositada e pela orientação prestada.

Ao professor Dr. Cláudio Marinho pela participação na banca examinadora.

Ao Dr. Alessandro Farias pela participação na qualificação, pré-banca e na banca examinadora e pelas sugestões dadas.

Aos Professores Dr. Cláudio Werneck e Dra. Cristina Vicente, pelo apoio, colaboração e auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Dr. Paulo Mourão pelo fornecimento do condroitim sulfato fucosilado, sem o qual o projeto não teria sido realizado.

Ao Professor Dr. Mauro Pavão pelas sugestões e pela colaboração no desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Ronei Mamoni pelo grande auxílio na realização da citometria de fluxo.

A Lourdes, Secretária da Pós Graduação da Genética, por tirar minhas dúvidas e auxiliar no que foi preciso.

As companheiras de laboratório: Carol, Juliana, Stefanie, Yara, Bruna, Wanessa e Laura pelas risadas, pelas conversas e pelo apoio durante o desenvolvimento dessa dissertação. Em especial a Carol, Juliana, Stefanie e Yara pela amizade, pela força nas horas difíceis, pelos ensinamentos e pelo auxílio na realização dos experimentos. Muito obrigada!

As minhas amigas de República e todos meus amigos de Campinas, pela amizade, pela compreensão, pelos momentos de diversão e alegria em todos esses anos

e por se tornarem minha família em Campinas. Em especial, ao Edson e a Cris por me agüentarem na hora do desespero e por estarem sempre presentes nas horas boas e ruins, e a Paula e Matheus que mesmo distantes são fundamentais.

As minhas amigas de Salvador por mostrarem que verdadeiras amizades podem suportar grandes distâncias.

Ao Rafa pelo amor, pela paciência, pela atenção, pela compreensão e por ter me proporcionado tantos momentos de alegria.

Aos meus tios, primos e ao meu padrinho pela confiança no meu potencial e pela ajuda quando necessário.

A minha irmã, Jamile, por ser também uma grande amiga, e por ser tão essencial na minha vida.

Aos meus pais por serem meu porto seguro, pelo amor, pela compreensão, pelo apoio nas minhas decisões e pela confiança em mim depositada.

Ao CNPq e a FAPESP pela bolsa fornecida nesses dois anos de trabalho.

A Unicamp por me proporcionar tantos momentos de alegria e por possibilitar o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A Deus por permitir que tudo isso fosse possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT	Terapias Combinadas à base de Artemisininas
CD36	<i>Cluster</i> de Diferenciação 36
CHO	Células de Ovário de Hamster Chinês
CR1	Receptor de Complemento tipo 1
CRFucCS	Condroitim Sulfato Fucosilado Carboxi-reduzido
CSA	Condroitina-Sulfato-A
DeFucCS	Condroitim Sulfato Fucosilado Defucosilado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
ECGS	Suplemento para Crescimento de Células Endoteliais
FucCS	Condroitim Sulfato Fucosilado
HA	Ácido Hialurônico
HepG2	Células de Hepatoma Humano
HLEC	Células Endoteliais de Pulmão Humano
HS	Heparam Sulfato
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular-1
MC	Malária Cerebral
MCE	Malária Cerebral Experimental
MG	Malária Gestacional
MSP-1	Proteína 1 da Superfície do Merozoíta
OMS	Organização Mundial de Saúde
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PfEMP-1	Proteína 1 da Membrana do Eritrócito Infectado por <i>Plasmodium falciparum</i>

Pf-EIs	Eritrócitos Infectados por <i>Plasmodium falciparum</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SP	Sulfadoxina-Pirimetamina
SVS	Secretaria de Vigilância e Saúde
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
WHO	World Health Organization

RESUMO

O seqüestro de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* (Pf-Els) na microvasculatura de vários órgãos envolve uma seqüência de eventos que acredita-se contribuir para a patogênese da malária grave. Apesar do tratamento com drogas antimaláricas serem eficazes, mortalidade significativa ainda é vista nos casos graves da doença, particularmente no prazo de 24 horas da admissão hospitalar. Acredita-se que o uso de terapias anti-adesivas nesse período poderia minimizar as complicações causadas pelo *P. falciparum*. Nesse sentido, polissacarídeos sulfatados, como a heparina e a condroitina-sulfato-A (CSA), têm mostrado capacidade em inibir a citoaderência de Pf-Els a receptores endoteliais. A heparina foi usada no passado no tratamento da malária grave, mas deixou de ser recomendada, devido à ocorrência de sérios efeitos colaterais, como hemorragias. Além disso, esses compostos são derivados de mamíferos, o que aumenta o risco de contaminação por agentes patogênicos. De fato, embora muitos compostos tenham sido testados, nenhum demonstrou evidência inequívoca de melhora nos testes clínicos para prevenção e tratamento da malária grave. O condroitim sulfato fucosilado (FucCS) é um polissacarídeo altamente sulfatado extraído do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea*, composto por uma base estrutural de condroitim sulfato de mamífero, e substituído na posição 3 dos resíduos de ácido β -D-glucurônico com cadeias de fucose sulfatadas. Nesse estudo, mostramos que o FucCS apresenta baixa toxicidade, e é um potente inibidor da citoaderência parasitária em células endoteliais de pulmão humano (HLEC) e da reinvasão de eritrócitos por merozoítos de *P. falciparum*. Em ambos os casos, a inibição ocorre de maneira dose dependente, e o composto mostrou ser eficiente na inibição de diferentes fenótipos parasitários. A remoção das cadeias de fucose sulfatadas do FucCS praticamente aboliu o efeito inibitório, sugerindo um papel

central desempenhado por essas cadeias na ocorrência do processo inibitório. O composto também mostrou ser capaz de reverter a citoadesão parasitária em sistema que mimetiza o fluxo sanguíneo. Além disso, o tratamento com o FucCS (1 mg/kg/animal/dia) demonstrou retardar a morte de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), modelo experimental de malária cerebral. Assim, sugerimos o FucCS como um candidato promissor a terapia adjuvante no tratamento da malária grave e na prevenção ao agravamento da doença.

ABSTRACT

Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes (Pf-ElS) in the microvasculature of several organs involves a sequence of events that contributes to the pathogenesis of severe malaria. Despite treatment with effective antimalarial drugs, significant mortality is still observed in severe cases of disease, particularly within 24 hours of hospital admission. It is believed that the use of anti-adhesive therapies in this period could reduce complications caused by *P. falciparum*. Accordingly, sulfated polysaccharides such as heparin and chondroitin sulfate A (CSA) have shown ability to inhibit the cytoadherence of Pf-ElS to endothelial receptors. Although heparin was used in the past as treatment for severe malaria, its use was discontinued due to the occurrence of serious side effects such as bleeding. Moreover, given that these compounds are obtained from mammals, potential risk of contamination has to be considered. In fact, although many compounds have been tested, none demonstrated unequivocal evidence of improvement in clinical trials for prevention and treatment of severe malaria. The fucosylated chondroitin sulfate (FucCS) is a highly sulfated polysaccharide extracted from sea cucumber *Ludwigothurea grisea*, composed of a chondroitin sulfate backbone substituted at the 3-position of the β -D-glucuronic acid residues with sulfated fucose branches. In this study, we show that FucCS presents low toxicity and is a potent inhibitor of parasite cytoadherence in human lung endothelial cells (HLEC) and reinvasion of erythrocytes by *P. falciparum* merozoites. In both cases, inhibition occurs in a concentration-dependent manner, and the compound showed to be effective in inhibiting different parasite phenotypes. Removal of the sulfated fucose branches on the FucCS practically abolished the inhibitory effect, suggesting a central role played by these branches in the occurrence of the inhibitory process. The compound also showed ability to

reverse parasite cytoadhesion under flow conditions. Furthermore, treatment with FucCS at 1 mg/kg/animal/day improved survival of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), an experimental model for cerebral malaria. Thus, we suggest FucCS as a promising candidate for adjunct therapy in the treatment of severe malaria and in prevention of severe malaria outcomes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	Pág.1
Aspectos Gerais.....	Pág.3
Problemática.....	Pág.7
Citoaderência parasitária e malária grave.....	Pág.10
Polissacarídeos sulfatados.....	Pág.15
Condroitim sulfato fucosilado.....	Pág.16
OBJETIVOS.....	Pág.21
Objetivo geral.....	Pág.23
Objetivos específicos.....	Pág.23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	Pág.25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	Pág.37
CONCLUSÕES.....	Pág.61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Pág.65
ANEXO.....	Pág.85

INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais

A malária é a doença parasitária mais importante do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), metade da população mundial – 3.3 bilhões de pessoas vivendo em 109 países- encontra-se em áreas de risco de infecção malárica (**Figura 1**), especialmente populações pobres das regiões tropicais e subtropicais (<http://www.rollbackmalaria.org/keyfacts.html>). Estima-se 300-500 milhões de casos de malária todos os anos, principalmente na região africana (85% dos casos), e mais de 1 milhão de mortes (http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/malaria/en/), sobretudo de crianças menores de cinco anos, mulheres grávidas e adultos não-imunes (Casares *et al.*, 2010).

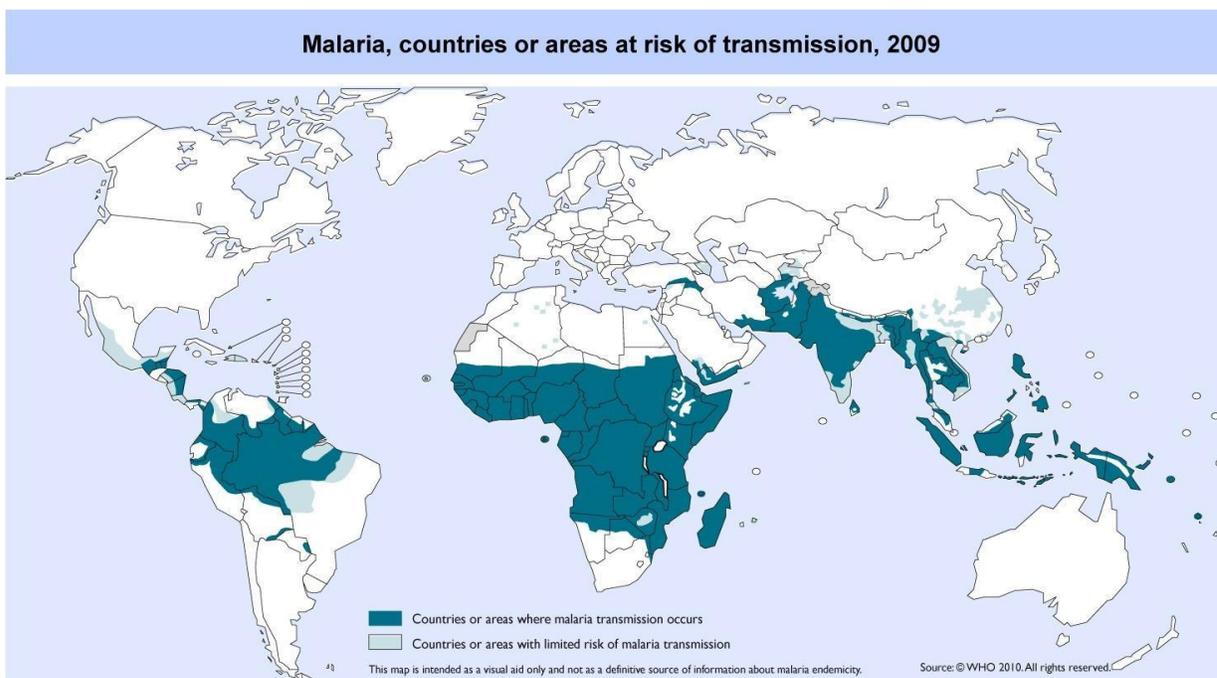


Figura 1: Distribuição global da malária, 2009. Fonte: World Health Organization (WHO), 2010. (http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITH_RiskMap.JPG)

No Brasil ocorrem em média 500 mil casos de malária por ano (SVS- 2008), o que significa mais da metade de todos os casos das Américas (WHO- World Malaria Report, 2009). Em 2009, foram registrados aproximadamente 306 mil casos, principalmente nos estados do Amazonas, Rondônia e Pará (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_conf_malaria_seg_mes_not_bra_gr_e_ufs_09.pdf). A transmissão da doença concentra-se na região da Amazônia legal (99,8% dos casos) (SVS- 2008), sendo a maioria das infecções causadas pelo *Plasmodium vivax* (cerca de 85%) e aproximadamente 15% pelo *P. falciparum* (WHO- World Malaria Report, 2009) (**Figura 2**).

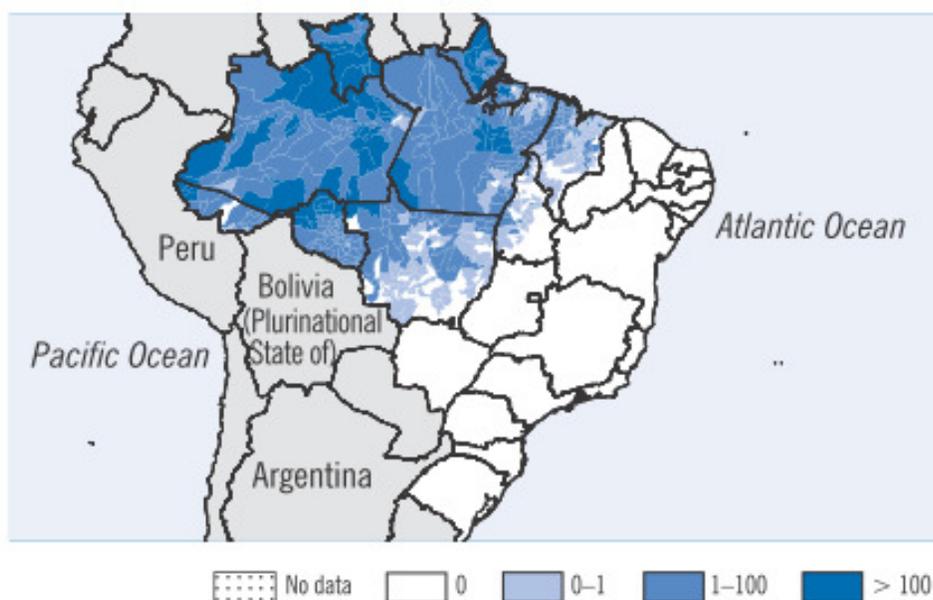


Figura 2: Incidência da malária no Brasil (número de casos reportados em 1000).
Fonte: WHO- World Malaria Report, 2009: (http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_bra_en.pdf)

A malária humana é causada por quatro espécies do protozoário do gênero *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Porém, nos últimos anos, foram relatadas infecções naturais em

humanos causadas pelo *Plasmodium knowlesi*, considerado anteriormente um parasita exclusivo de macacos (Singh *et al.*, 2004). Dentre essas espécies, o *P. falciparum* é o mais virulento, e é responsável pela maioria das mortes causadas pela doença (revisto por Greenwood *et al.*, 2008), uma vez que sua infecção está associada às formas graves da malária, tais como: malária cerebral (MC) e malária gestacional (MG) (Costa *et al.*, 2006).

As espécies de *Plasmodium* apresentam um ciclo de vida complexo (**Figura 3**) com uma fase sexuada ocorrendo no hospedeiro invertebrado (vetor) e uma fase assexuada ocorrendo no hospedeiro vertebrado. Esta última é constituída de um ciclo pré-eritrocítico, assintomático, que ocorre nas células hepáticas, e um ciclo eritrocítico, que se desenvolve nos eritrócitos e é responsável pelos sintomas da doença. Os sintomas mais característicos são febre, dor de cabeça, calafrios e sudorese, mas tonturas, dores abdominais, náuseas, diarreia e vômitos também podem estar presentes (Trampuz *et al.*, 2003).

O ciclo de vida se inicia com a picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles sp.*, que inocula formas esporozoítas no hospedeiro vertebrado. Essas formas móveis do parasita circulam rapidamente no sangue antes de invadir os hepatócitos, onde se desenvolvem em esquizontes contendo milhares de merozoítos. Estudos recentes têm mostrado, que a maioria dos esporozoítos são retidos na pele por minutos ou horas antes de atingir o fluxo sanguíneo e invadir os hepatócitos (Amino *et al.*, 2007), e alguns deles migram ativa ou passivamente para os linfonodos regionais (Amino *et al.*, 2006). Depois de 6 a 15 dias, os merozoítos são então liberados do fígado, inicialmente em vesículas (merossomos) e posteriormente atingem a corrente sanguínea (Thiberge *et al.*, 2007), onde rapidamente invadem os eritrócitos e iniciam o ciclo eritrocítico. Nas infecções

causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, as formas hepáticas podem permanecer latentes na forma de hipnozoítas no fígado formando esquizontes semanas ou meses mais tarde.

Com o início do ciclo eritrocítico, os merozoítos se multiplicam e amadurecem dentro dos eritrócitos num período de 36 a 72 horas passando pelos estágios de anel e trofozoíto, até formar esquizontes maduros pelo processo de esquizogonia. Os eritrócitos infectados sofrem então ruptura, liberando merozoítos na corrente sanguínea que rapidamente invadem novos eritrócitos, repetindo o ciclo assexuado.

Alguns merozoítos diferenciam-se em formas sexuais masculinas e femininas (gametócitos), que são ingeridas pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. A fusão dos gametas forma o zigoto, que se desenvolve em um oocineto. Este penetra na parede do intestino do inseto, formando um oocisto entre o epitélio intestinal e a lâmina basal. Então, muitos esporozoítos são formados assexuadamente dentro do oocisto, e são liberados ao amadurecer. Esses esporozoítos migram para a glândula salivar do mosquito, onde podem ser transmitidos para o hospedeiro intermediário durante o repasto sanguíneo dando continuidade ao ciclo.

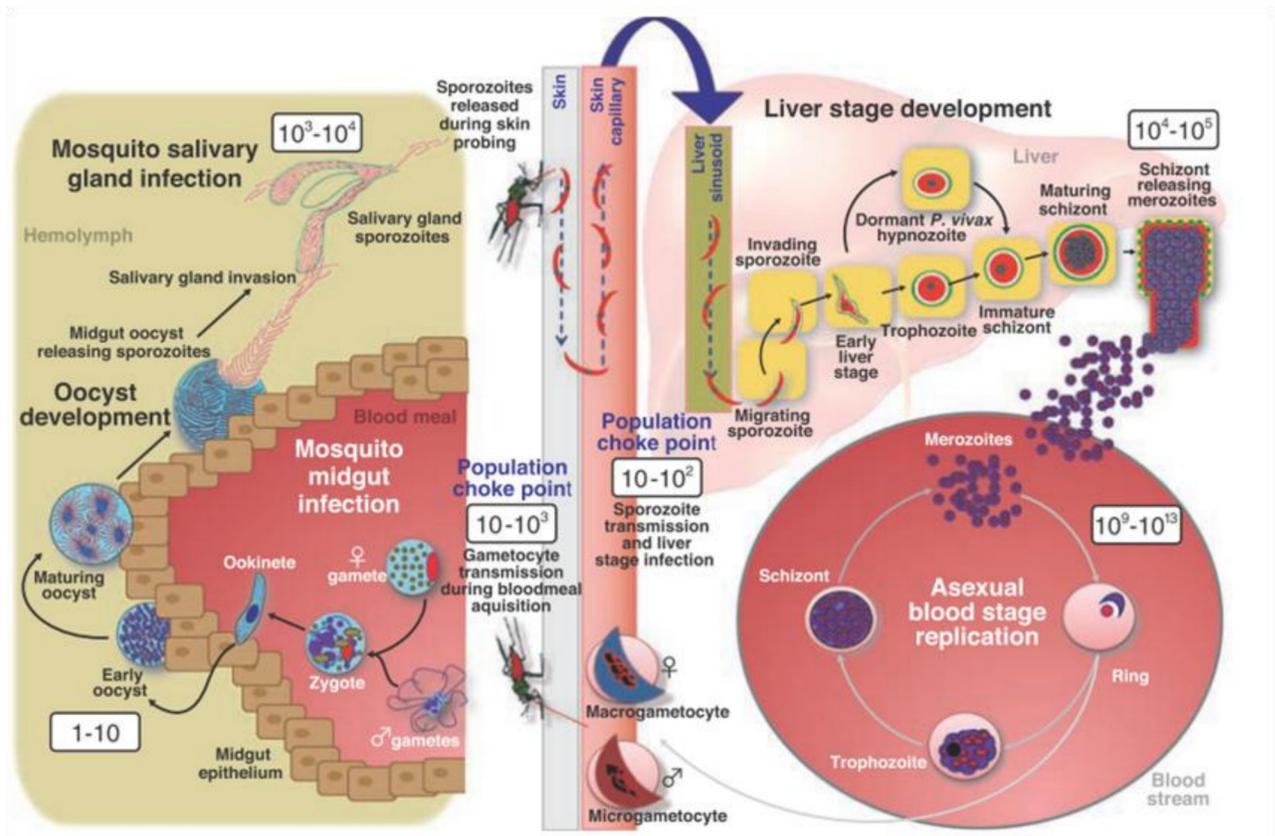


Figura 3: Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. Fonte: Kappe *et al.*, 2010.

Problemática

Seis décadas atrás, a esperança de erradicação da malária estava aumentada devido ao descobrimento e implementação da cloroquina no tratamento antimalárico. O uso desta droga altamente eficaz, de ação rápida e barata, juntamente com o potente inseticida DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), rapidamente demonstrou sucesso em reduzir substancialmente a incidência da malária em muitas áreas do mundo, e particularmente na região subtropical (Eastman & Fidock, 2009). Contudo, muitas dificuldades para o controle da doença foram surgindo, como a falta de financiamentos, a emergência e disseminação da resistência à cloroquina pelo *Plasmodium* e a resistência do mosquito

Anopheles ao DDT (Eastman & Fidock, 2009). Dessa maneira, tem sido observado a ressurgência global da malária, inclusive em áreas onde a doença havia sido eliminada (revisto por Greenwood *et al.*, 2008).

Recentemente, o desenvolvimento da resistência parasitária a certos antimaláricos tem representado a maior barreira para o controle bem sucedido da doença nas áreas endêmicas (revisto por Kokwaro, 2009). Resistência a quase todos os antimaláricos comumente utilizados, principalmente à cloroquina e à sulfadoxina-pirimetamina (SP), mas também à amodiaquina, à mefloquina e ao quinino, tem sido observada para *P. falciparum* (WHO, 2006) em grande parte da África e sudeste da Ásia (Vestergaard *et al.*, 2007; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Atualmente, a OMS recomenda que o diagnóstico seja realizado antes do início do tratamento para prevenir a resistência, sendo indicado o uso de terapias combinadas à base de artemisininas (ACT) em infecções por *P. falciparum* (WHO- World Malaria Report, 2009). Dessa maneira, apesar de a OMS recomendar o uso de artemisininas, a resistência a esse antimalárico tem sido induzida *in vitro*, e em modelos murinos, e vem sendo observada em ensaios clínicos na fronteira do Camboja com a Tailândia (Noedl *et al.*, 2008; Dondorp *et al.*, 2009). Sendo assim, a luta pelo controle da malária é ainda um desafio e, por isso, o desenvolvimento de novas drogas e de vacinas eficientes contra a doença é extremamente necessário.

Nesse sentido, o processo de invasão de eritrócitos por merozoítos tem sido alvo de vacinas e de moléculas que podem ser usadas terapêuticamente. De fato, a invasão é essencial para a sobrevivência parasitária no hospedeiro humano, e envolve múltiplas interações receptor-ligante numa série coordenada de eventos que leva a entrada do parasita no eritrócito (Boyle *et al.*, 2010).

Por fim, no caso de pacientes com malária grave, a OMS recomenda o tratamento com antimaláricos, como o quinino e artemisininas combinados com outros antimaláricos

para prevenir a resistência (WHO- World Malaria Report, 2009). Todavia, estas drogas necessitam de até 24 horas para eliminar o parasita, e 85% das mortes de pacientes hospitalizados com malária ocorrem no período de 24 horas imediatamente após a internação (Marsh *et al.*, 1995). Sendo assim, novos tratamentos para malária grave são necessários, uma vez que, 15% a 20% dos pacientes nesse estado, hospitalizados e tratados com antimaláricos apropriados, vêm a óbito (Woodrow *et al.*, 2004, WHO, 2000). Nesse sentido, o uso de terapias adjuvantes nesse período poderia reduzir o risco de morte e de seqüelas neurocognitivas, particularmente em pacientes com malária cerebral (Mishra & Newton, 2009).

Alguns compostos vêm sendo testados como adjuvantes no tratamento da malária grave, como corticosteróides de ação anti-inflamatória, desferrioxamina (quelante de ferro), glicosaminoglicanos (heparina, curdlan sulfato), levamisole, e peptídeos recombinantes, que interferem na citoaderência, entre outros (revisto por Mishra & Newton, 2009; e revisto por Rowe *et al.*, 2009). No entanto, nenhum desses compostos mostrou evidência inequívoca de melhora dos pacientes nos testes clínicos e conseqüentemente, nenhum deles pôde ser recomendado como parte da estratégia de tratamento até o presente momento (Mishra & Newton, 2009).

Tendo em vista a elucidação dos mecanismos moleculares da citoaderência, acredita-se que terapias anti-adesivas possam agir como terapêutica alternativa e/ou complementar para a malária grave (Yipp *et al.*, 2003). Assim, o uso de terapias anti-adesivas poderia não apenas reverter o seqüestro parasitário, mas também prevenir o agravamento da doença, minimizando as complicações causadas pelo *P. falciparum* (Land *et al.*, 1995). Interessante, estudo recente mostrou, que Pf-EIs são capazes de manter a capacidade citoadesiva *in vitro* por pelo menos 24 horas após a morte dos parasitas por antimaláricos (Hughes *et al.*, 2010). Acredita-se que essa habilidade poderia

contribuir para patologia da doença (Hughes *et al.*, 2010), o que reforça ainda mais a possibilidade de uso de agentes anti-adesivos.

Citoaderência Parasitária e Malária Grave

Dentre as espécies de *Plasmodium* que infectam o homem, sabe-se que o *P. falciparum* é o mais virulento. Desse modo, acredita-se que sua patogenicidade seja resultado do seu potencial em gerar elevada carga parasitária e da capacidade em aderir ao endotélio capilar e pós-capilar, processo conhecido como citoaderência (Luse & Miller, 1971; MacPherson *et al.*, 1985). A citoaderência refere-se a um grupo de mecanismos no qual os eritrócitos infectados por formas maduras de *P. falciparum* se ligam a receptores expressos na superfície de diferentes células do hospedeiro. Dentre esses mecanismos destacam-se: o seqüestro parasitário, que corresponde à retirada das formas maduras do parasita da circulação periférica para a microvasculatura, onde aderem às células endoteliais; a formação de rosetas, que é a adesão de eritrócitos infectados a outros não infectados; e a autoaglutinação, que corresponde à adesão entre eritrócitos infectados, podendo esta ser mediada por plaquetas (Handunetti *et al.*, 1992; Ho & White, 1999). Plaquetas também podem aumentar a citoaderência agindo como pontes entre células endoteliais e eritrócitos infectados por *P. falciparum* (Pf-EIs) (Schofield & Grau, 2005) **(Figura 4)**.

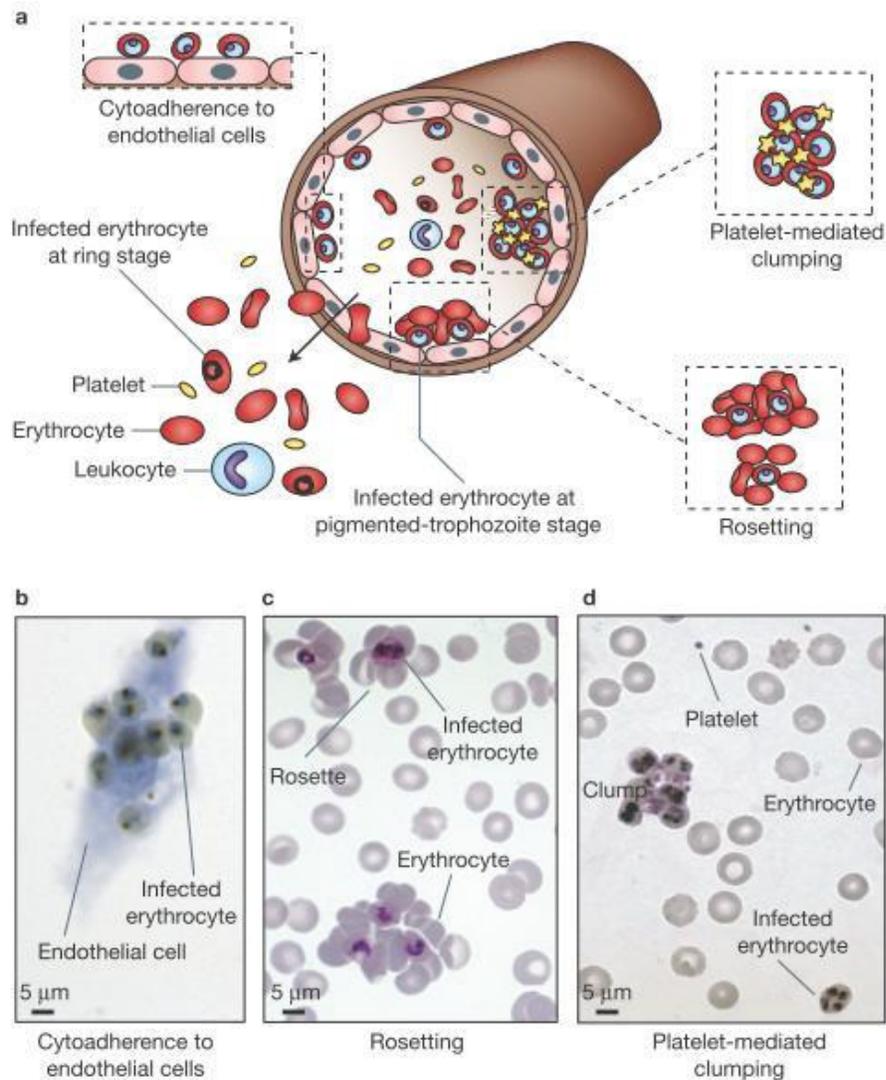


Figura 4: Adesão de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* (PF-EIs) a células humanas. Fonte: Rowe *et al.*, 2009.

Apesar de na malária humana a citoadesão ser descrita como característica única de *P. falciparum*, recentemente foi demonstrada a capacidade de citoaderência de *P. vivax in vitro*, (Carvalho *et al.*, 2010), mas a relação com os aspectos patogênicos da doença permanecem por ser elucidados. Desse modo, uma importante diferença entre o *P. falciparum* e os outros plasmódios humanos é a maneira como esse parasita modifica a membrana do eritrócito infectado. Em infecções por *P. falciparum* é possível observar o

aparecimento de protruções elétron-densas, *knobs*, na superfície dos eritrócitos infectados por formas maduras do parasita (trofozoítos e esquizontes) (revisto por Miller *et al.*, 2002). Os *knobs* já foram descritos como sendo os locais onde os Pf-Elis se ligam às células do hospedeiro (revisto por Sharma, 1991). Eles são formados por proteínas codificadas pelo parasita, que são exportadas para superfície do eritrócito infectado (Ho & White, 1999), tais como a PfEMP-1 (do Inglês, *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1). Essa proteína altamente variável é codificada pela família dos genes *var* (Baruch, *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1995). Existem aproximadamente 60 genes *var* por genoma do parasita, que codificam 60 variantes diferentes de PfEMP-1 (Kyes *et al.*, 2007). Contudo, apenas uma variante antigênica é expressa na superfície dos Pf-Elis de cada vez. Dessa maneira, a variação na expressão dos genes *var* permite ao parasita modificar as propriedades funcionais e antigênicas dos eritrócitos infectados, permitindo assim a evasão do sistema imune e a alteração de suas capacidades citoadesivas (Kyes *et al.*, 2007; revisto por Rowe *et al.*, 2009). De fato, a PfEMP-1 parece ser o principal ligante dos Pf-Elis mediando uma série de interações adesivas a diversos receptores endoteliais, incluindo CD36 (Cluster of Differentiation 36; Ockenhouse *et al.*, 1989), ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1; Berendt *et al.*, 1989), CSA (Chondroitin Sulfate A; Robert *et al.*, 1995; Rogerson *et al.*, 1995), CR1 (complement receptor 1, Rowe *et al.*, 1997), e HS (heparan-sulfate; Chen *et al.*, 1998). Muitas dessas moléculas do hospedeiro, que podem agir como receptores de adesão para Pf-Elis, têm sido identificadas *in vitro* utilizando células endoteliais, no entanto o papel de cada uma delas na patogênese da malária permanece incerto (Beeson & Brown, 2002).

Acredita-se que o processo de citoadesão nos microcapilares seja benéfico para o parasita, pois impede a destruição de Pf-Elis no baço que reconhece sua perda de deformabilidade. Além disso, o seqüestro pode evitar a indução de uma resposta imune

(David *et al.*, 1983), e garantir um ambiente mais favorável à maturação parasitária (Ho & White, 1999). Nesse sentido, a adesão de Pf-Elis às células endoteliais pode ocorrer na microvasculatura de vários órgãos e tecidos, como coração, pulmão, cérebro, rins, fígado, tecido adiposo e placenta (revisto por Rowe *et al.*, 2009; Baruch, 1999). Como resultado, observa-se a obstrução microvascular (Dondorp *et al.*, 2008; Dondorp *et al.*, 2004), distúrbios metabólicos, como a acidose (Planche & Krishna, 2006) e liberação de mediadores inflamatórios (Schofield, 2007; Van der Heyde *et al.*, 2006), que podem se combinar causando manifestações clínicas graves e a morte do hospedeiro humano (revisto por Rowe *et al.*, 2009). Sendo assim, acredita-se que os fenômenos patológicos associados à malária grave sejam decorrentes do processo de citoadesão parasitária. Entre as formas graves da doença estão a malária gestacional (MG), a malária cerebral (MC), a síndrome do desconforto respiratório agudo e a anemia profunda.

A malária gestacional (MG) ocorre em mulheres grávidas vivendo em áreas holoendêmicas da doença. Entre os adultos expostos à malária, mulheres grávidas são particularmente suscetíveis à infecção, apesar da imunidade substancial antes da gravidez. Assim, tem sido observado, que o risco em desenvolver complicações clínicas graves é maior na primeira gravidez (Brabin, 1983; McGregor, 1984), uma vez que após algumas gestações muitas mulheres adquirem imunidade que pode protegê-las nas gestações subseqüentes (Beeson *et al.*, 1999; Fried *et al.*, 1998). A maior complicação da MG é a anemia materna, que por sua vez aumenta a mortalidade da gestante, e reduz o peso da criança ao nascer. Essas complicações ocorrem devido a uma combinação do retardo do crescimento intra-uterino e do parto prematuro levando a uma alta mortalidade infantil (Brabin, 1983; McGregor, 1984; Granja *et al.*, 1998). Um aspecto central na patogênese da MG é o acúmulo de Pf-Elis no espaço interviloso da placenta (revisto por Rogerson *et al.*, 2007), em muitos casos associado com infiltrados de monócitos e

macrófagos (Ordi *et al.*, 2001) e alta expressão de citocinas pró-inflamatórias (Ordi *et al.*, 1998; Rogerson *et al.*, 2003). Esse seqüestro parasitário é observado na superfície do sincitiotrofoblasto placentário, com Pf-EIs aderidas tipicamente a CSA (Beeson *et al.*, 1999; Fried & Duffy, 1996; Gysin *et al.*, 1999), um glicosaminoglicano presente na matriz extracelular. E mais recentemente, o ácido hialurônico (HA) também tem sido indicado como um possível receptor envolvido no processo de seqüestração placentária (Beeson *et al.*, 2000; Beeson *et al.*, 2001).

Já a malária cerebral (MC) é responsável pelas mais sérias complicações e pelo maior número de mortes das infecções por *P. falciparum* (Mackintosh *et al.*, 2004), sendo caracterizada por convulsões, elevada hipertensão cranial, decorrente de inchaço cerebral, disfunção da barreira hemato-encefálica e um estado comatoso, podendo levar ao óbito (Newton *et al.*, 2000). No entanto, os fenômenos responsáveis pelos aspectos patológicos da MC ainda são pouco compreendidos, levando a discussão de diferentes hipóteses que expliquem sua patogênese. Nesse sentido, a hipótese mecânica sugere, que o seqüestro de Pf-EIs no endotélio cerebral possa causar obstrução do fluxo sanguíneo. Esta, por sua vez, leva a diminuição da perfusão tecidual e da remoção de resíduos (ácido láctico) (Van der Heyde *et al.*, 2006). Além disso, acredita-se que o ICAM seja um importante receptor de citoadesão parasitária nesse local (Turner *et al.*, 1994). De fato, muitos estudos indicam que o processo de seqüestração parasitária nos microcapilares cerebrais é importante na patogênese da MC (MacPherson *et al.*, 1985; Pongponrart *et al.*, 1991; Turner, 1997), mas apesar de necessário, esse processo parece não ser suficiente para induzi-la (revisto por Combes *et al.*, 2006). Outra teoria, a imunológica, considera que a lesão cerebral pode ser explicada pela ativação excessiva das células do sistema imune, levando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que em um dado momento, saem do controle (Clark & Rocket, 1994; Grau & de Kossodo, 1994).

Nesse contexto, acredita-se que citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , desempenhem um papel fundamental na patogenia da MC, possivelmente aumentando a expressão de receptores endoteliais como ICAM-1 (Grau & De Kossodo, 1994; Beremdt *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989; Blanco *et al.*, 2009). Essas teorias não são mutuamente exclusivas. De fato, parece que a combinação da obstrução mecânica, imunopatologia e outros mecanismos como a disfunção da homeostase e complicações metabólicas (Van der Heyde *et al.*, 2006) é fundamental no desencadeamento da síndrome neurológica (revisto por Combes *et al.*, 2006).

Polissacarídeos Sulfatados

Polissacarídeos sulfatados são macromoléculas com carga negativa, que ocorrem em uma grande variedade de organismos, como algas e invertebrados marinhos até mamíferos. Essas moléculas são conhecidas por apresentarem um amplo espectro de propriedades biológicas e têm mostrado participar de importantes processos fisiológicos e patológicos (Biermann *et al.*, 2004, Caterson *et al.*, 1990).

O envolvimento de compostos sulfatados na malária tem sido evidenciado em diferentes estágios do ciclo de *P. falciparum*. Assim, a invasão de esporozoítos, por exemplo, é mediada pela ligação da proteína circunsporozoíta ao heparan sulfato (HS) presente nos hepatócitos (Frevert *et al.*, 1993). Além disso, a invasão de hepatócitos por esporozoítos pode ser inibida pelo fucoïdan, heparina e dextran sulfato (Pancake *et al.*, 1992).

Polissacarídeos sulfatados têm demonstrado, também, ter papel na formação de rosetas (Chen *et al.*, 1998) e no seqüestro parasitário (Andrews *et al.*, 2005). Isso é particularmente evidente na malária gestacional (Andrews *et al.*, 2005), uma vez que, estudos têm mostrado o envolvimento do glicosaminogligano CSA como receptor de

citoadesão de *P. falciparum* (Robert *et al.*, 1995; Rogerson & Brown, 1997) mediando o seqüestro de Pf-Els na placenta humana (Fried & Duffy, 1996). No mais, esses estudos revelaram que a citoadesão *in vitro* e *in vivo* de Pf-Els pode ser inibida na presença de CSA solúvel (Robert *et al.*, 1995, Pouvelle *et al.*, 1997).

Diferentes estudos evidenciaram que rosetas podem ser rompidas por glicoconjugados sulfatados como a heparina, o fucoidan e o dextran sulfato (Carlson *et al.*, 1992; Rogerson *et al.*, 1994; Rowe *et al.*, 1994). Esses compostos também foram capazes de inibir a reinvasão de eritrócitos pelos merozoítos de *P. falciparum* e bloquear a citoadesão de Pf-Els a vários receptores endoteliais (Rowe *et al.*, 1994, Xiao *et al.*, 1996, Vogt, *et al.*, 2006).

Apesar dessas descobertas, o uso destas drogas é evitado, tendo em vista os fortes efeitos anticoagulantes e/ou alta toxicidade apresentada por elas (Rowe *et al.*, 1994; Vogt *et al.*, 2006; Kyriacou *et al.*, 2007). Interessante, a heparina foi o único glicoconjugado sulfatado usado no passado no tratamento da malária grave humana (Munir *et al.*, 1980 ; Rampengan, 1991), porém, seu uso foi desencorajado devido a ocorrência de sérios efeitos colaterais, como hemorragia intracranial (WHO, 1986)

Existe agora maior interesse em terapias preparadas de fontes não derivadas de mamíferos, evitando assim o risco de contaminação com agentes patogênicos. Dessa maneira, novos polissacarídeos com potenciais propriedades clínicas proporcionam uma alternativa atrativa para drogas como a heparina (Mourão *et al.*, 1998) e a CSA, que são de origem bovina ou porcina.

Condrotim Sulfato Fucosilado

Durante os últimos anos, vários polissacarídeos sulfatados de tecidos conectivos de diferentes invertebrados têm sido estudados. O principal objetivo desses estudos é

comparar esses polissacarídeos com glicosaminoglicanos bem conhecidos, que ocorrem em tecidos de vertebrados e relacionar suas estruturas com propriedades físico-químicas e biológicas (Vieira *et al.*, 1991). Em estudo de Vieira & Mourão (1988), polissacarídeos sulfatados foram isolados da parede de pepino-do-mar, dentre eles o condroitim sulfato fucosilado (FucCs).

O FucCs é um polissacarídeo altamente sulfatado extraído do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea*. Este composto apresenta uma base estrutural de condroitim sulfato de mamífero: $[4\text{-}\beta\text{-D-GalA-1}\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-GalNAc}]_n$, sendo formado por unidades alternadas de ácido $\beta\text{-D-glucurônico}$ e N-acetil- $\beta\text{-D-galactosamina}$, mas substituído na posição 3 dos resíduos de ácido $\beta\text{-D-glucurônico}$ por cadeias de 2-4-dissulfato $\alpha\text{-fucopiranosose}$ (Vieira & Mourão, 1988; Mourão *et al.*, 1996) (**Figura 5**).

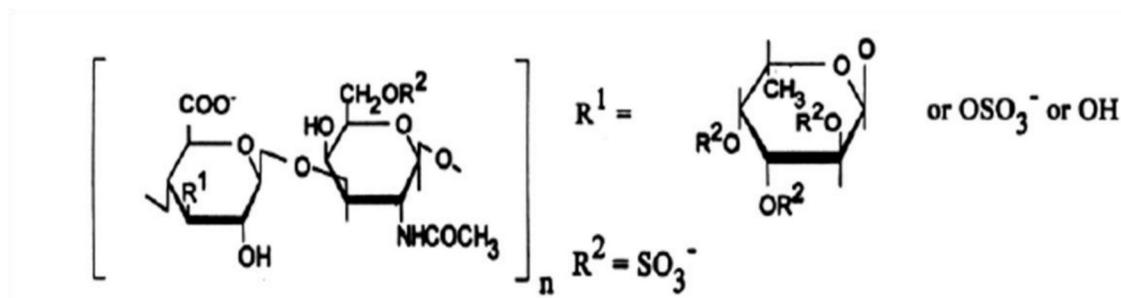


Figura 5: Estrutura molecular do FucCS. Fonte: Pacheco *et al.*, 2000.

Esse polissacarídeo é componente da matriz extracelular, e tem semelhança fisiológica com proteoglicanos presentes nos tecidos conectivos de vertebrados (Mourão & Pereira, 1999). Além disso, apresenta analogia em estrutura com glicosaminoglicanos de mamíferos e fucanas sulfatadas de alga marrom (Mourão *et al.*, 2001).

Diversos estudos têm atribuído ao FucCS diferentes atividades biológicas, como ação anticoagulante (Mourão *et al.*, 1996), antitrombótica (Pacheco *et al.*, 2000) e anti-inflamatória (Borsig *et al.*, 2007). Dessa maneira, estudo de Mourão *et al.* (1996) mostrou

que esse composto apresenta potente ação anticoagulante devido principalmente a sua capacidade em potencializar a inibição de trombina pelo cofator II da heparina e pela antitrombina. Além disso, atua também como uma droga antitrombótica efetiva em modelo experimental de trombose venosa e arterial, quando administrado por via intravenosa (Pacheco *et al.*, 2000) ou por via oral em ratos (Fonseca & Mourão, 2006).

Medidas da atividade anticoagulante desse polímero quimicamente modificado (defucosilado e carboxi-reduzido) mostraram que a alta atividade anticoagulante do polissacarídeo de pepino-do-mar, pode estar relacionada principalmente com a presença das cadeias de fucose sulfatada ligadas ao condroitim sulfato (Mourão *et al.*, 1996). Isso porque a remoção dessas cadeias reduz a capacidade anticoagulante e antitrombótica do composto, ao mesmo nível do condroitim sulfato de mamífero. Em contraste, a atividade se mantém após a carboxi-redução dos resíduos de ácido glucurônico (Zancan *et al.*, 2004).

Além desses efeitos, Borsig *et al.* (2007), demonstrou que o FucCS é um potente inibidor de interações mediadas por P- e L-selectina, sendo capaz de inibir adesão de células tumorais com maior potência do que a heparina, sem exibir efeito hemorrágico significativo e em doses inferiores ao requerido para causar efeito anticoagulante. Além disso, foi mostrado que a presença das cadeias de fucose sulfatadas é fundamental para a atividade inibitória do composto. Assim, o FucCS é capaz de bloquear metástase tumoral e reduzir o processo inflamatório diminuindo o recrutamento de neutrófilos sem os indesejáveis efeitos colaterais causados pela heparina (Borsig *et al.*, 2007).

É importante salientar, que esse polissacarídeo apresenta importantes características atrativas para sua utilização em diferentes terapias. Uma vez que não necessita de modificações químicas e fracionamentos após sua purificação, ocorre em altas concentrações num invertebrado abundante (Glauser *et al.*, 2008), é absorvido após

administração oral (Fonseca & Mourão, 2006), apresenta menor efeito anticoagulante e antitrombótico do que a heparina (Mourão *et al.*, 1996 ; Mourão *et al.*, 2001) e seu derivado carboxi-reduzido não causa hemorragia (Zancan *et al.*, 2004). No mais, seu efeito anti-inflamatório ocorre em concentrações inferiores as necessárias para ativar seu efeito anticoagulante, sem exibir efeito hemorrágico significativo (Borsig *et al.*, 2007).

Outro aspecto importante para se levar em conta ao propor a utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos derivados de mamíferos é o risco de contaminação com patógenos, por exemplo, a contaminação por príons causada pelo uso de heparina bovina. Assim, não sendo o FucCS derivado de mamíferos evita-se o risco de contaminação por agentes patogênicos (Borsig *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Tendo em vista a ação de diversos polissacarídeos sulfatados na citoaderência e na reinvasão parasitária e a necessidade de novos tratamentos para malária grave, buscamos avaliar os efeitos *in vitro* do condroitim sulfato fucosilado (FucCS) no desenvolvimento e no processo de adesão parasitária e avaliar *in vivo* seu papel na Malária Cerebral Experimental (MCE).

Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do FucCS em cultura de células de hepatoma humano (HepG2) e em hemácias sadias.
- Avaliar a capacidade do FucCS nativo e quimicamente modificado em inibir a adesão de Pf-EIs a receptores endoteliais em condição estática.
- Avaliar a capacidade do FucCS em dessequestrar Pf-EIs de receptores endoteliais em sistema de fluxo.
- Avaliar o efeito do FucCS no desenvolvimento parasitário.
- Avaliar o efeito do FucCS na mortalidade e na parasitemia de animais infectados com *P. berghei* ANKA (PbA).

MATERIAIS E MÉTODOS

Condroitim Sulfato Fucosilado (FucCS) nativo e quimicamente modificado

O FucCS nativo foi extraído do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea*, coletado fresco da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. A extração por digestão com papaína e purificação foram realizadas como anteriormente descrito por Mourão *et al.* (1996). Para a obtenção do FucCS defucosilado (DeFucCS) as cadeias de fucose foram removidas por hidrólise ácida branda. Nesse procedimento, o FucCS (50 mg) foi dissolvido em 1 ml de H_2SO_4 150 mM, mantido a $100^\circ C$ por 30 min, e o pH da solução foi ajustado para 7.0 com 0,3 mL de NaOH (Mourão *et al.*, 1996). Ainda, para a obtenção do FucCS carboxi-reduzido (CRFucCS), os grupos carboxil do ácido hexurônico do polissacarídeo foram reduzidos por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida- $NaBH_4$, como descrito anteriormente por Taylor *et al.* (1976) (Figura 6).

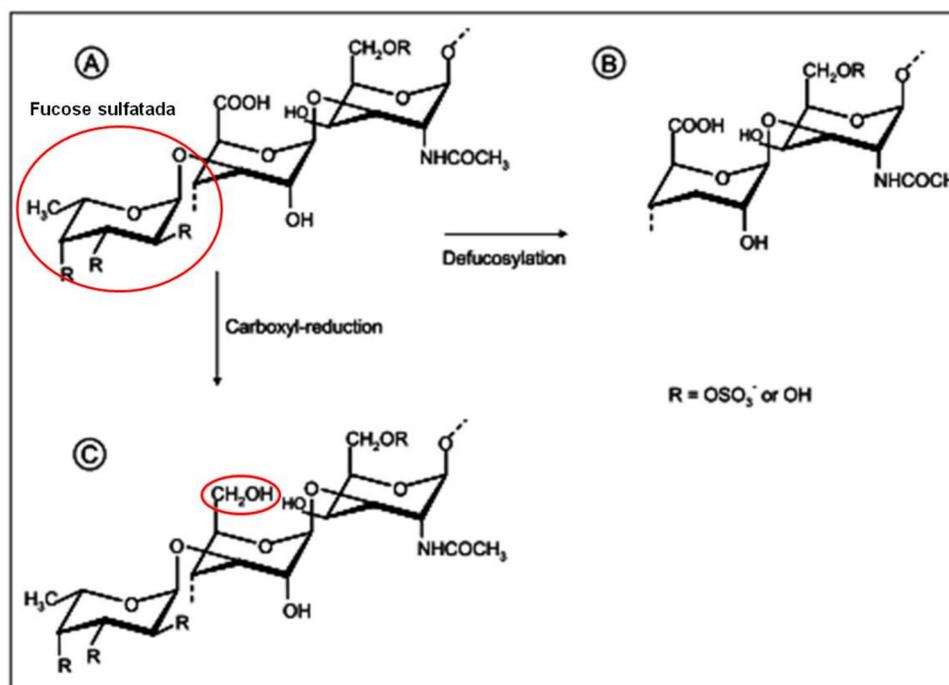


Figura 6. Estrutura molecular do FucCS nativo (A), FucCS defucosilado (B) e carboxi-reduzido (C). Fonte: Adaptado de Glauser *et al.*, 2008.

Cultura de células

No ensaio de citotoxicidade *in vitro* foram utilizadas células de hepatoma humano (HepG2), cultivadas em meio DME suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Nos outros ensaios *in vitro* foram utilizadas células endoteliais do pulmão humano (HLEC), cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 30 µg/mL de fator de crescimento de células endoteliais (ECGS) e 10% de SFB. Foram também usadas células de ovário de hamster (CHO), cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas em incubadora com pressão constante de 5% de CO₂ a 37°C.

Soluções utilizadas:

- Meio de cultura- HepG2: DME (Nutricell), enriquecido com 10% de SFB (Nutricell).
- Meio de cultura- HLEC: DMEM-F12 (Nutricell), enriquecido com ECGS (Sigma, E0760) 30 µg/mL e 10% de SFB (Nutricell).
- Meio de cultura- CHO: RPMI 1640 (Sigma, R4130), enriquecido com 10% de SFB (Nutricell).
- Meio de congelamento- HepG2: 90% SFB (Nutricell) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, R4540)
- Meio de congelamento- HLEC: DMEN-F12, 40% de SFB (Nutricell) e 8% de DMSO (Sigma, R4540)
- Meio de congelamento- CHO: RPMI 1640 (Sigma, R4130), 10% de SFB (Nutricell) e 10% de DMSO (Sigma, R4540)

Ensaio de citotoxicidade em células HepG2

A citotoxicidade do FucCS em células de hepatoma humano (HepG2) foi avaliada através do ensaio de MTT (Mosmann, 1983). Em uma placa de 96 poços foram incubadas durante 48 horas 1×10^4 células/poço juntamente com a solução de FucCS nas concentrações 10000, 1000, 100 ou 10 $\mu\text{g/ml}$. Em seguida, 5 mg/ml de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; Sigma, M5655) foi acrescentado aos poços e incubou-se por mais 4 horas. A placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 50 μl de isopropanol (JK Baker). Por fim, a leitura da absorbância foi medida a 590nm (A_{590}) em um leitor de ELISA e a inibição da proliferação foi estimada de acordo com a seguinte fórmula:

$$I = (1 - \text{média } A_{590} \text{ do grupo experimental} / \text{média } A_{590} \text{ do grupo controle}) \times 100\%.$$

Ensaio de citotoxicidade em hemácias sadias

A citotoxicidade do FucCS em hemácias sadias foi avaliada em uma placa de 96 poços, na qual acrescentou-se 50 μl de FucCS por poço em diferentes concentrações (10000, 1000 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e 50 μl de eritrócitos humanos sorotipo O⁺ sadios (hematócrito 2%). Ao grupo controle acrescentou-se 50 μl de eritrócitos sadios e 50 μl de solução salina. Após 48 horas de incubação a quantidade de eritrócitos presentes foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer e a toxicidade dos compostos foi estimada comparando-se o número de eritrócitos presentes no grupo tratado e no grupo controle (não tratado).

Cultura de formas sanguíneas de *P. falciparum*

Nos nossos ensaios utilizamos parasitas *P. falciparum* FCR3, selecionados para adesão exclusiva (monofenotípicos) a CSA, ICAM ou CD36, sendo a seleção feita por *panning*. Os parasitas foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma, R4130) completo, suplementado com 10% de plasma humano através do método de *candle jar* (Trager & Jansen, 1976). O hematócrito final foi ajustado a 4% com eritrócitos saudáveis O⁺ fornecidos pelo Hemocentro da UNICAMP. A parasitemia foi monitorada diariamente por meio de esfregaços sanguíneos.

Soluções utilizadas:

- Meio de cultura: Meio RPMI 1640 (Sigma, R4130), contendo 1% L-Glutamina (Sigma, G3126), 2 g/l de glicose Anidra P.A. (Lafan), 5 mg/l de hipoxantina (Sigma, H9636-1G), antibiótico gentamicina 40 mg/ml (Schering-Plough).

O pH foi ajustado para 7,2 com bicarbonato de sódio (Sigma, S5761) e o meio filtrado em membrana de 0,22 µm no fluxo laminar. Adicionou-se então 10% de plasma humano (Hemocamp-Hemocentro/Unicamp). O plasma foi previamente inativado em banho-maria a 56°C por 40 minutos.

- Meio de congelamento (Glycerolyte): 45% de glicerina (Synth, G1-005), KCl 5mM (J. T. Backer, 3040-01) e 31 g/l de sódio lactato líquido (Sigma, L4263).
- Soluções para descongelamento: NaCl 12%, pH 6,0 e NaCl a 1,6%, pH 5,5.

Sincronização de *P. falciparum*

Para alguns ensaios *in vitro*, os parasitas foram sincronizados em Sorbitol como descrito em Schlichtherle *et al.* (2000). Resumidamente, o *pellet* de eritrócitos infectados com a parasitemia maior que 5%, sendo a maioria das formas no estágio de anel, foi ressuspendido em uma solução 5% de Sorbitol (J.T.Baker). Após 5 minutos em temperatura ambiente, o *pellet* foi lavado duas vezes em meio completo e a cultura foi retomada. A sincronização foi repetida pelo menos uma vez para assegurar a sincronização do parasita.

Enriquecimento de estágios trofozoítas da cultura de *P. falciparum*

O enriquecimento das formas maduras foi realizado utilizando-se 2.4 volumes de Voluven™ (Frenesius) em relação ao volume do *pellet* de hemácias, e 1.4 volumes de meio RPMI 10% plasma. A solução foi deixada em um tubo na posição vertical, a 37°C durante 1 hora. Após este período, a fase superior do gradiente, contendo as formas maduras, foi removida e lavada com meio RPMI sem plasma.

Panning

Esta técnica foi baseada no protocolo de Scherf *et al.* (1998) e tem como objetivo a seleção monofenotípica do parasita (**Figura 7**). Células CHO, capazes de expressar apenas um receptor (ICAM ou CD36), ou células HLEC, que além de outros receptores é capaz de expressar CSA, foram crescidas até a confluência em garrafas de 75 cm². Eritrócitos infectados com *P. falciparum* FCR3 foram enriquecidos por passagem no Voluven™, ressuspendidos em meio RPMI pH 6,8 (meio de adesão) e transferidos para a

garrafa contendo as células. Após incubação por 1 hora a 37°C, o excesso de parasitas não aderidos foi removido por meio de lavagens com meio RPMI pH 6,8. Em seguida, foi adicionado meio RPMI pH 7,2 para liberar apenas Pf-Els ligantes a ICAM ou CD36 das células CHO-ICAM e CHO-CD36 respectivamente; ou adicionado meio RPMI pH 6,8 contendo CSA solúvel na concentração de 1 mg/mL para dessequestrar apenas Pf-Els ligantes a CSA das células HLEC. Após incubação de 30 minutos, os parasitas, não mais aderidos, foram retirados da garrafa e colocados imediatamente em cultura. Este processo foi repetido por 5 vezes para aumentar a eficiência da seleção de parasitas com o fenótipo desejado.

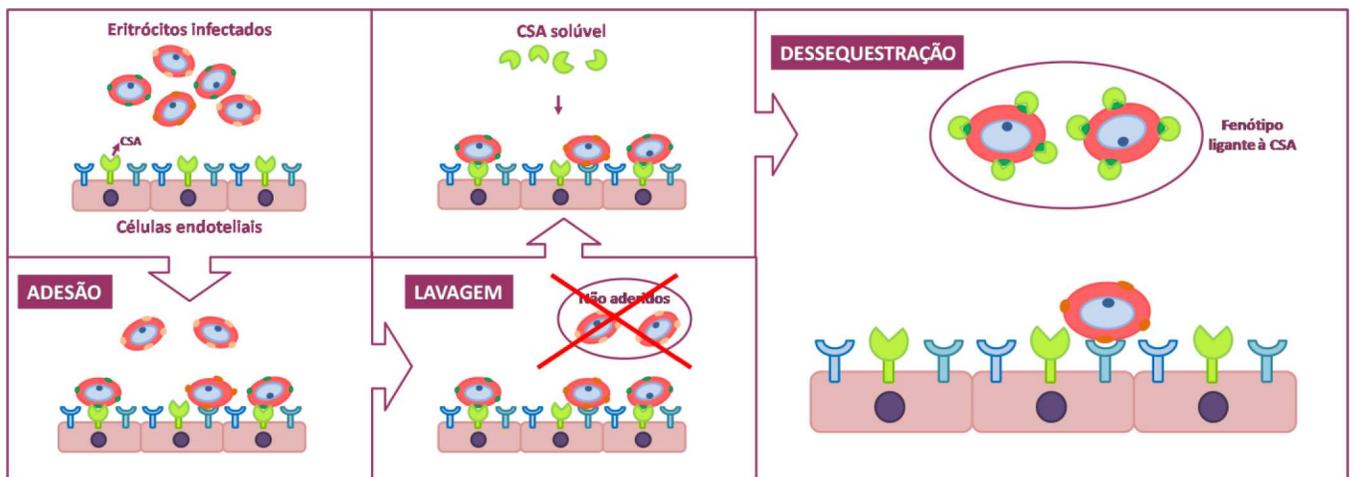


Figura 7. Esquema da seleção de Pf-Els monofenotípicos (*Panning*)

Ensaio de inibição da citoaderência de Pf-Els em células endoteliais HLEC

Em condições estáticas:

Cerca de 5×10^4 células endoteliais do pulmão humano (HLEC) foram cultivadas por 48 horas, até atingirem confluência total, em lâminas para cultivo de células de oito poços com $0,69 \text{ cm}^2$ cada (*Culture Slides*, Becton & Dickinson). Parasitas *P. falciparum*

selecionados por *panning* para adesão a CSA, ICAM, ou CD36 (FCR3^{CSA}, FCR3^{CD36} ou FCR3^{ICAM}) enriquecidos por passagem no Voluven™ foram utilizados, sendo os Pf-Els ressuspensos em meio RPMI pH 6,8. A suspensão de Pf-Els foi então adicionada a cada poço (5x10⁴ El/poço) na presença de diferentes concentrações de FucCS ou Heparina (Calbiochem; 1000, 100, 10 e 1 µg/mL); 100 µg/mL de CSA (Sigma), 5 µg/mL de IgG1 anti-CD36 (Santa Cruz, FA6-152), ou meio RPMI (controle), e deixada aderir a 37°C durante 1 hora. A suspensão de FCR3^{CSA} também foi adicionada a células previamente tratadas com 100 µl de condroitinase-ABC (Sigma), 0.5 U/mL por 2 hora de incubação. Para analisar o efeito do FucCS após sofrer modificações químicas, a suspensão de *P. falciparum* FCR3^{CSA}, FCR3^{CD36} ou FCR3^{ICAM} foi adicionada a cada poço (5x10⁴ Pf-Els/poço) na presença de FucCS (100 µg/mL), FucCS defucosilado (DeFucCS, 100 µg/mL), FucCS carboxi-reduzido (CRFucCS, 100 µg/mL), ou meio RPMI (controle) e deixada aderir a 37°C durante 1 hora. Após este período, Pf-Els não aderidos foram removidos por meio de extensivas lavagens com meio RPMI pH 6.8. Em seguida, as lâminas foram coradas com o *kit Panótico Rápido* (Laborclin) e contados com o auxílio do microscópio, e a adesão foi expressa como a média ± desvio padrão do número de eritrócitos por mm² observados em quatro poços. (Costa *et al*, 2003; Pouvelle *et al.*, 2003).

Em condições de fluxo:

Cerca de 5X10⁵ células HLEC foram cultivadas por 48 horas, até atingirem confluência total, em lâminas para cultivo de células de um poço com cerca de 8,6 cm² cada (*Culture Slides*, Becton & Dickinson). Com o intuito de verificar a capacidade do FucCS em dessequestrar Pf-Els em condições similares àquelas do fluxo sanguíneo, realizamos ensaios de fluxo como descrito por Costa *et al.* (2003) e Pouvelle *et al.* (2003).

O ensaio de adesão foi realizado como na condição estática, porém, o volume determinado pelo poço único da lâmina permitia a incubação de 3 mL de meio com 5×10^5 Pf-EIs, proporcionalmente à nova área de superfície. Após 1 hora de incubação a 37°C, as lâminas foram adaptadas em uma câmara (Sistema Immunetics, E.U.A.) que permitia um fluxo de meio de adesão (RPMI pH 6,8) como controle, ou um fluxo com FucCS (100 µg/mL), com pressão controlada, correspondendo a um *shear stress* de 0,09 e 0,36 Pascal (Pa), por 10 e 5 minutos, respectivamente. Em seguida, os Pf-EIs que restaram aderidos foram contados, filmados e fotografados em 25 campos aleatoriamente selecionados com a ajuda de uma câmera digital 5.0 megapixels (Motic, Moticam 2500).

Ensaio de inibição do desenvolvimento parasitário

Ensaio de 48 horas:

Para avaliar a capacidade do FucCS em inibir o crescimento parasitário utilizamos cultura não sincrônica de parasitas *P. falciparum* FCR3. A parasitemia e hematócrito foram ajustados para 4%. Os parasitas foram incubados em placas de 96 poços com diferentes concentrações de FucCS, CSA ou Heparina (1000, 100, 10 e 1 µg/mL); FucCS defucosilado ou carboxi-reduzido (100 µg/mL), ou meio RPMI (controle), a 37°C por 48 horas (tempo necessário para ocorrer todo o ciclo eritrocítico). Em seguida, foram feitos esfregaços de cada poço e as lâminas foram coradas com o *kit Panótico Rápido* (Laborclin), sendo a porcentagem de parasitemia determinada após contagem em microscópio óptico.

Ensaio de 24 horas: anel → trofozoíto

Para saber em que fase do ciclo eritrocítico o FucCS estava atuando, utilizamos cultura sincrônica de parasitas *P. falciparum* FCR3 no estágio de anel jovem. A cultura foi

sincronizada utilizando sorbitol. O ensaio foi realizado como descrito acima, sendo as Pf-Els incubadas com os diferentes polissacarídeos sulfatados por 24-30 horas, tempo necessário para o parasita passar do estágio de anel para o de trofozoíto maduro.

Ensaio de 24 horas: trofozoíto → anel (ensaio de inibição da reinvasão de merozoítos)

Os ensaios foram realizados como descrito por Vogt *et al.* (2006). Foram utilizadas culturas de parasitas *P. falciparum* FCR3^{CSA}, FCR3^{ICAM}, ou FCR3^{ICAM} enriquecidos em estágio de trofozoíto maduro por passagem no Voluven™. A parasitemia e hematócrito foram ajustados para 4%. Os parasitas foram incubados em placas de 96 poços com diferentes concentrações de FucCS, CSA ou Heparina (1000, 100, 10 e 1 µg/mL); FucCS defucosilado ou carboxi-reduzido (100 µg/mL), ou meio RPMI (controle), a 37°C por 24-30 horas. Em seguida, foram feitos esfregaços de cada poço e as lâminas foram coradas com o kit *Panótico Rápido* (Laborclin), sendo a porcentagem de parasitemia determinada após contagem em microscópio óptico.

Ensaio *in vivo*

Para os ensaios *in vivo* utilizamos camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 (7 a 10 semanas), provenientes do Centro de Bioterismo-UNICAMP (CEMIB), que foram mantidos em condições *Germ Free* em nossa rack ventilada da Alesco™. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (protocolo nº1807-1).

A fim de avaliar o efeito do FucCS na mortalidade e na parasitemia de modelo experimental de malária cerebral, grupos de 8-10 animais foram infectados intraperitonealmente (i.p.) com 10⁶ eritrócitos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), linhagem capaz de induzir malária cerebral. As formas sanguíneas do parasita

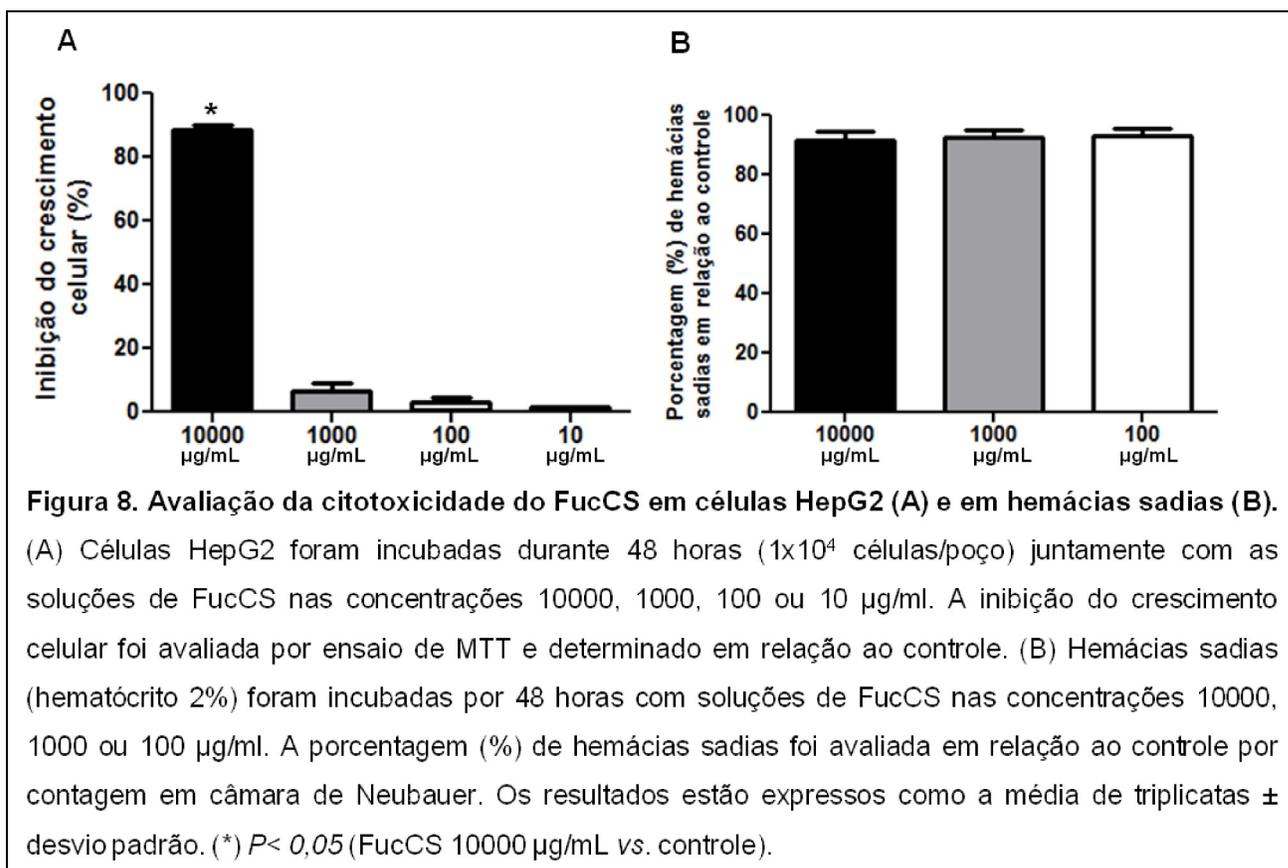
foram coletadas de animais doadores (C57BL/6) previamente infectados com 100 μ L de *pellet* de hemácias infectadas mantidas em criotubo a -80°C ; de acordo com o protocolo descrito por Engwerda *et al.* (2005). Os sinais neurológicos de malária cerebral (CM) foram monitorados diariamente, sendo que a incidência de CM foi calculada através da porcentagem de camundongos que desenvolveram esses sinais. Os animais foram tratados com 1 mg/kg de FucCS intravenoso (i.v.) pela cauda, diariamente (dias 3-6 pós-infecção), e o controle com solução salina, sendo a parasitemia determinada diariamente por meio de esfregaços de sangue obtidos da cauda dos animais a partir do 4° dia pós-infecção até a morte do animal ou até fase crônica da doença. Os esfregaços foram fixados e corados com auxílio do kit Panótico Rápido (Laborclin™) e a porcentagem de parasitemia foi determinada como sendo o número de eritrócitos infectados em 1000 eritrócitos.

Análise estatística

A significância estatística da adesão parasitária nas diferentes condições, dos ensaios de inibição do desenvolvimento parasitário e dos testes de citotoxicidade foi determinada através de testes não paramétricos *U* Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Já para análise da significância dos ensaios de determinação da expressão de moléculas de adesão foi aplicado o Teste *t* student. A curva de sobrevivência foi analisada pelo teste de Log-Rank. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa BioEstat versão 5.0 (CNPq, Brasil). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de determinar as doses de FucCS a serem utilizadas nos ensaios *in vitro*, a citotoxicidade de diferentes concentrações do composto foi avaliada. Para isso, foi realizado ensaio de MTT utilizando-se células HepG2 (**Figura 8A**) e ensaio com eritrócitos saudáveis, para observar a capacidade do composto em causar hemólise destas células (**Figura 8B**). Como pode ser visto na **Figura 8A**, apenas a maior dose de FucCS (10000 µg/mL) apresentou atividade citotóxica significativa ($P < 0,05$) em HepG2 inibindo 88,71% do crescimento celular. Nas outras doses (1000, 100 e 10 µg/mL), essa atividade citotóxica não foi evidenciada. Além disso, não foi observada diminuição significativa ($P > 0,05$) na quantidade de eritrócitos saudáveis em relação ao controle, quando submetidos à incubação com diferentes concentrações de FucCS (10000, 1000 e 100 µg/mL), demonstrando que o composto não foi tóxico para essas células (**Figura 8B**). Sendo assim, a maior dose utilizada nos ensaios foi de 1000 µg/mL.



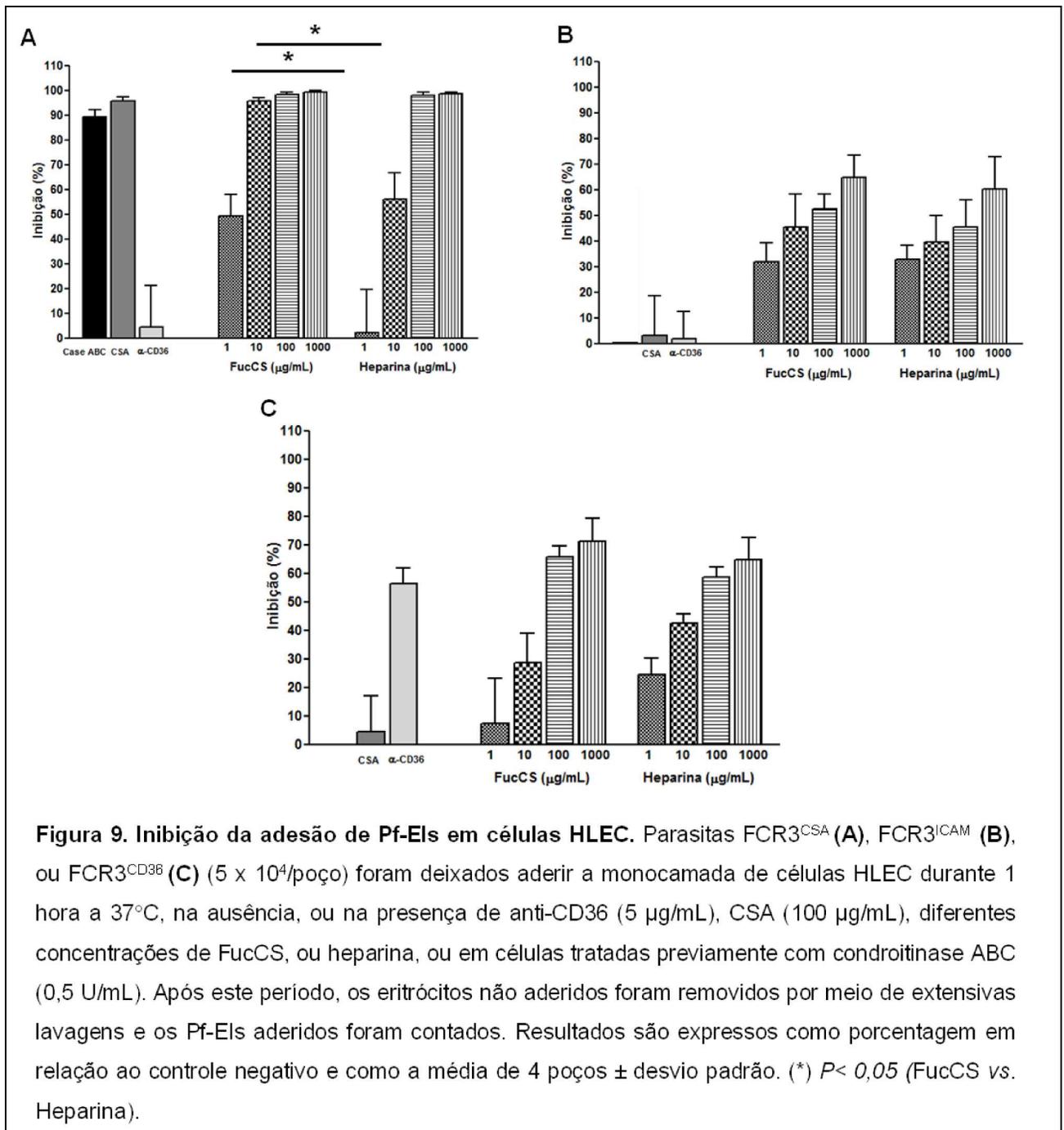
Drogas antimaláricas são a base do tratamento das infecções por *P. falciparum*. Contudo, estas drogas necessitam de 12-18 horas para destruir o parasita (Newton & Krishna, 1998) o que pode ser tarde para salvar a vida de muitos pacientes. Isso é particularmente verdade para pacientes em coma e para aqueles que desenvolvem as formas graves da doença antes dos agentes antimaláricos tornarem-se eficazes (Yipp *et al.*, 2003). Sabe-se que o processo de citoadesão de eritrócitos infectados no endotélio vascular de vários órgãos, particularmente no cérebro e na placenta, é primordial na patogênese da malária grave (revisito por Mackintosh *et al.*, 2004). Sendo assim, uma possível terapia que poderia parar a cadeia de eventos patofisiológicos da doença é o bloqueio e a reversão do seqüestro parasitário. Com base no descrito acima, e sabendo-se que diversos polissacarídeos sulfatados agem inibindo a adesão de Pf-Elis a células endoteliais (Xiao *et al.*, 1996, Vogt *et al.*, 2006), analisamos o efeito do FucCS na inibição da adesão de Pf-Elis a células endoteliais HLEC (**Figura 9**). A importância dessas células no estudo da citoaderência parasitária já foi anteriormente descrita, e está principalmente relacionada à expressão de importantes receptores de adesão de Pf-Elis como, CD36, ICAM e CSA na superfície dessas células (Robert *et al.*, 1995; Muanza *et al.*, 1996).

Desse modo, para realização dos ensaios de inibição da citoadesão parasitária cepas de *P. falciparum* FCR3, monofenotípicas (*paneadas*) para adesão a CSA (FCR3^{CSA}), CD36 (FCR3^{CD36}) ou ICAM-1 (FCR3^{ICAM}) foram deixados aderir a monocamada de células HLEC durante 1 hora a 37°C, na ausência, ou na presença de anti-CD36, CSA solúvel e diferentes concentrações de FucCS ou heparina, ou em células tratadas previamente com condroitinase ABC. O anti-CD36, a CSA solúvel, e a condroitinase ABC foram utilizados como controle da seleção monofenotípica dos parasitas (**Figura 9**). Já que o anti-CD36 inibe a adesão de parasitas selecionados para aderir ao receptor CD36, a CSA solúvel inibe completamente a adesão de parasitas

selecionados para aderir a CSA (Andrews *et al.*, 2005), e a condroitinase ABC é capaz de clivar CSA, condroitin-6-sulfato e dermatan-sulfato (Yamagata *et al.*, 1968).

Conforme mostrado na **Figura 9**, o FucCS demonstrou possuir um potente efeito inibitório na adesão de parasitas *P. falciparum* monofenotípicos a células HLEC, quando comparados ao controle, atingindo na maior dose (1000 µg/mL) uma inibição de 100% (**Figura 9A**), 64,63% (**Figura 9B**) e 71,18% (**Figura 9C**), respectivamente para parasitas FCR3^{CSA}, FCR3^{ICAM} e FCR3^{CD36}. Essa inibição ocorre de maneira dose dependente e, de maneira geral, demonstrou ser bastante abrangente, já que parasitas com diferentes fenótipos exibiram efeitos inibitórios semelhantes (**Figura 9B e C**). Contudo, o FucCS mostrou ser significativamente ($P < 0,05$) mais eficiente na inibição da citoaderência de parasitas FCR3^{CSA} em todas as doses (**Figura 9A**), quando comparado aos outros fenótipos parasitários (**Figura 9B e C**), atingindo aproximadamente 100% de inibição nas três maiores doses (10, 100, 1000 µg/mL) (**Figura 9A**). Em geral, efeito semelhante ao do FucCS foi observado para a heparina, que foi utilizada como controle positivo, por ter sua ação na citoaderência parasitária descrita anteriormente. De fato, foi demonstrado que a heparina é capaz de inibir e reverter a citoaderência e a formação de rosetas *in vitro* (Rowe *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998; Carlson & Wahlgren, 1992; Carlson *et al.*, 1993; Barragan *et al.*, 1999; Vogt *et al.*, 2003). Além disso, Vogt *et al.* (2003) mostrou que a heparina é capaz de inibir a adesão de uma cepa de *P. falciparum* FCR3 a células HLEC. Nesse contexto, assim como o FucCS, a heparina também demonstrou ser mais eficaz na inibição da adesão de parasitas FCR3^{CSA}, porém o FucCS demonstrou ser significativamente ($P < 0,05$) mais eficiente nas doses mais baixas, atingindo respectivamente uma inibição de 49,4% e 95,7% para as doses de 1 e 10 µg/mL, e a heparina, 0,07% (1 µg/mL) e 56% (10 µg/mL) (**Figura 9A e Figura 10**). Em relação aos parasitas FCR3^{ICAM} e FCR3^{CD36}, o FucCS também foi bastante eficiente, possibilitando

uma inibição máxima de 64,63% (**Figura 9B**) e 71,18% (**Figura 9C**) respectivamente, sendo a ação da heparina bastante similar em ambos os casos. No mais, a heparina já foi utilizada no passado no tratamento da malária grave com algum sucesso, mas devido a sérios sangramentos e morte de algumas crianças tratadas com o composto, seu uso não é mais recomendado (WHO, 1986).



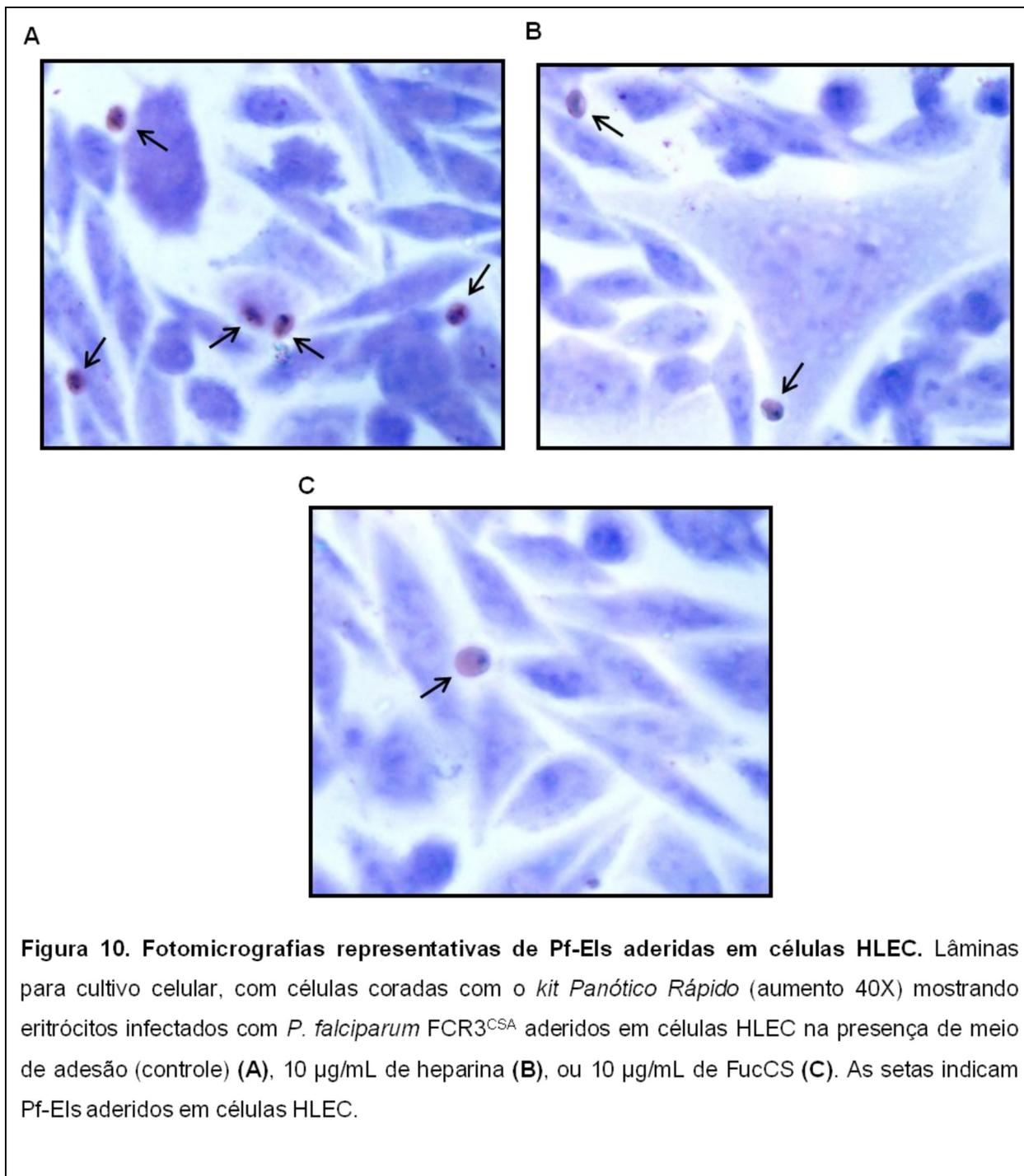


Figura 10. Fotomicrografias representativas de Pf-Elis aderidas em células HLEC. Lâminas para cultivo celular, com células coradas com o kit *Panótico Rápido* (aumento 40X) mostrando eritrócitos infectados com *P. falciparum* FCR3^{CSA} aderidos em células HLEC na presença de meio de adesão (controle) (A), 10 µg/mL de heparina (B), ou 10 µg/mL de FucCS (C). As setas indicam Pf-Elis aderidos em células HLEC.

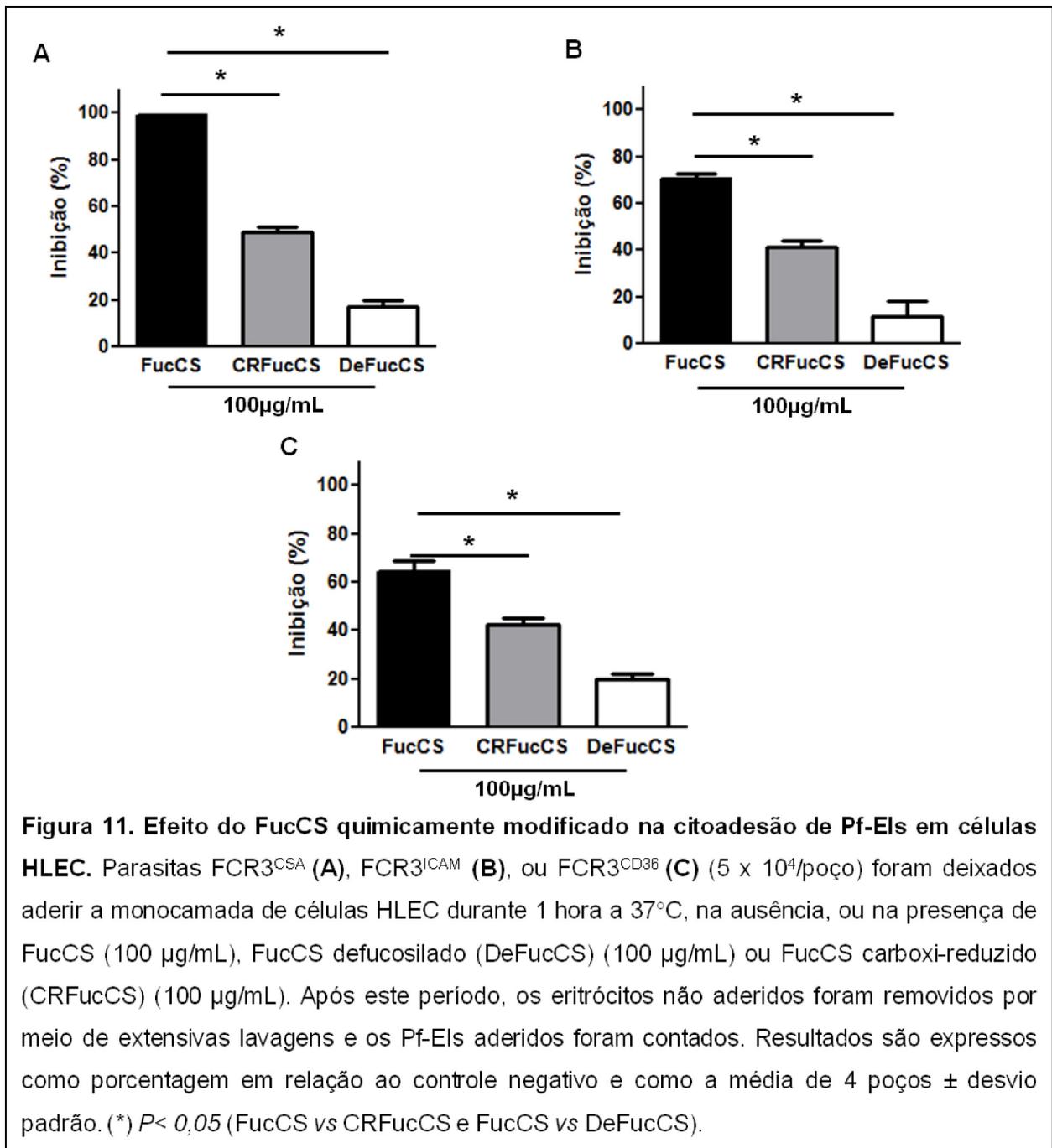
Dois compostos quimicamente modificados derivados do FucCS também foram estudados com o objetivo de investigar se modificações no composto nativo poderiam alterar sua ação inibitória: o FucCS defucosilado (DeFucCS), que foi obtido da retirada da

maioria das cadeias de fucose sulfatadas presentes no composto, e o FucCS carboxi-reduzido (CRFucCS), resultado da redução do grupo carboxila do ácido glucurônico. Um diagrama da estrutura do FucCS e seus derivados é mostrado na **Figura 6**. Analisamos então, o efeito do FucCS quimicamente modificado na inibição da adesão de Pf-Elis em células endoteliais HLEC. Para isso, utilizamos parasitas *P. falciparum* FCR3^{CSA}, FCR3^{ICAM} e FCR3^{CD36} que foram deixados aderir a monocamada de células HLEC na presença ou ausência de 100 µg/mL de DeFucCS, CRFucCS, ou FucCS nativo. Como pode ser visto na **Figura 11**, o CRFucCS e o DeFucCS apresentaram porcentagem de inibição da citoadesão parasitária significativamente menor ($P < 0,05$) que o FucCS nativo para todos os fenótipos parasitários. No entanto, o CRFucCS foi mais eficiente do que o DeFucCS no processo inibitório, atingindo uma inibição ainda elevada de 49,1% (**Figura 11A**), 41,6% (**Figura 11B**) e 42,1% (**Figura 11C**) respectivamente para os parasitas FCR3^{CSA}, FCR3^{ICAM} e FCR3^{CD36}. Já o DeFucCS apresentou uma inibição de apenas 16,9% (**Figura 11A**), 11,7% (**Figura 11B**) e 19,7% (**Figura 11C**) respectivamente para os parasitas FCR3^{CSA}, FCR3^{ICAM} e FCR3^{CD36}.

Diante do exposto, fica claro que a presença das cadeias de fucose sulfatadas do composto nativo é fundamental para a ocorrência do processo inibitório. De fato, já foi demonstrado que a retirada das cadeias de fucose sulfatadas praticamente abole a capacidade anticoagulante e antitrombótica do composto. No entanto, a atividade é mantida no FucCS carboxi-reduzido (Zancan *et al.*, 2004). Além disso, a presença dessas cadeias é fundamental para manutenção da atividade inibitória do composto nas interações mediadas por P- e L-selectina (Borsig *et al.*, 2007). Sendo assim, essas cadeias parecem ter papel chave na manutenção das atividades biológicas do FucCS.

Apesar da importância das cadeias de fucose sulfatadas, o mecanismo envolvido na inibição da citoadesão de *P. falciparum* pelo FucCS não é conhecido. Tem sido

descrito na literatura, que glicoconjugados com mais cargas negativas (dextran sulfato, heparina) são mais eficientes em inibir a citoadesão. Além disso, é sugerido que esses compostos hajam possivelmente aumentando a força repulsiva entre células ou interferindo nas interações receptor-ligante (Xiao *et al.*, 1996). De fato, o FucCS é um composto altamente sulfatado, negativamente carregado, e seu efeito inibitório pôde ser observado para Pf-EIs selecionados para aderir em diferentes receptores endoteliais. Assim, é possível, que esse efeito seja resultado de interações eletrostáticas em vez de uma consequência direta na estrutura dos receptores de citoaderência. No entanto, mais estudos para entender os mecanismos envolvidos se fazem necessários.



Com base no conhecimento atual, qualquer intervenção terapêutica capaz de reverter a adesão de Pf-Elis tem o potencial de atenuar a obstrução microvascular e poderia ser testada como um complemento aos medicamentos antimaláricos utilizados

em pacientes com malária grave (Rowe *et al.*, 2009). Assim, observada a capacidade do FucCS em inibir a citoadesão parasitária em condições estáticas, buscamos verificar se a mesma adesão seria ou não mantida em sistema que mimetiza o fluxo sanguíneo, ao qual o parasita é submetido no hospedeiro. Para isso, parasitas FCR3^{CSA} ou FCR3^{ICAM} foram colocados para aderir em monocamada de células HLEC por 1 hora e foram posteriormente submetidos ao sistema de fluxo, sob diferentes condições de pressão e na presença, ou não, de 100 µg/mL de FucCS. Um *shear stress* em torno de 0.08 Pascal já é considerado fisiológico, e pode ser observado nas vênulas pós-capilares (Kroll *et al.*, 1996). Desse modo, é possível observar na **Figura 12A**, que o FucCS foi capaz de dessequestrar significativamente ($P<0,05$) e de maneira bastante acentuada os parasitas FCR3^{CSA} aderidos a monocamada de células endoteliais em relação ao controle, mantendo uma adesão de apenas 10,6% e de 4,1%, respectivamente, nos *shear stress* de 0.09 e 0.36 Pa partindo de uma adesão inicial de 100% no *shear stress* de 0.00 Pa. Já o controle (meio RPMI pH 6.8) manteve uma adesão de 94,6% e 93,2% respectivamente nos *shear stress* de 0.09 e 0.36 Pa. Avaliando a capacidade do FucCS em dessequestrar parasitas FCR3^{ICAM} observamos que a redução da porcentagem de Pf-Elis aderidos foi mais discreta do que a descrita acima (**Figura 12B**). Nesse caso, o FucCS foi capaz de dessequestrar significativamente ($P<0,05$) os parasitas no *shear stress* de 0.36 Pa com 53,3% deles permanecendo aderidos em relação a 78,8% do controle.

Esses resultados são bastante promissores, pois acredita-se que terapias que são capazes de reverter esse processo seriam mais eficazes no tratamento de pacientes graves (Rowe *et al.*, 2009). Importante, o FucCS foi capaz de bloquear e reverter a citoadesão parasitária, o que o torna um forte candidato a atuar como terapia anti-adesiva. Nesse sentido, diante dos dados apresentados, fica evidente que a ação do FucCS no fenótipo parasitário de adesão a CSA foi mais eficaz que para os outros

fenótipos testados, tanto na inibição da citoadesão estática quanto na dessequestração em sistema de fluxo. Estudos já mostraram que a maior prevalência desse fenótipo de adesão a CSA entre os Pf-Elis seqüestrados na placenta sugere que esses parasitas sejam os principais responsáveis pela ocorrência da malária gestacional (Rogerson *et al.*, 1995; Chaiyaroj *et al.*, 1996; Beeson *et al.*, 1999; Rogerson *et al.*, 1999). De fato, o uso da CSA solúvel como terapia adjuvante na malária gestacional já foi considerado, pois já foi descrita a capacidade desse composto em inibir e reverter a seqüestração de Pf-Elis^{CSA} *in vivo* e *in vitro* (Pouvelle *et al.*, 1997). Assim, o exposto abre perspectiva para o uso do FucCS no tratamento e prevenção dessa forma grave da doença. No entanto, sua ação demonstra ser mais abrangente e abre possibilidade também, do uso desse composto no tratamento das outras formas graves da malária, como a malária cerebral, já que este demonstrou inibir ainda em grande proporção a citoadesão dos outros fenótipos parasitários e reverter a adesão de parasitas FCR3^{ICAM}.

Interessante, estudo recente mostrou *in vitro*, que parasitas não viáveis, independentemente do tratamento, retêm a capacidade de adesão por pelo menos 24 horas, como resultado da degradação lenta da PfEMP-1 na superfície dos Pf-Elis (Hughes *et al.*, 2010). Acredita-se que essa habilidade poderia contribuir para patologia da doença após o tratamento com antimaláricos e poderia em parte, explicar a alta taxa de mortalidade nas primeiras 24 horas após a internação. Nesse sentido, sugere-se que esse fenômeno poderia ser alvo de terapias adjuvantes capazes de prevenir ou preferencialmente reverter a citoadesão (Hughes *et al.*, 2010). Assim, o exposto reforça ainda mais a possibilidade de uso do FucCS como terapia adjuvante para malária grave, tendo em vista sua habilidade em prevenir e reverter a citoadesão parasitária.

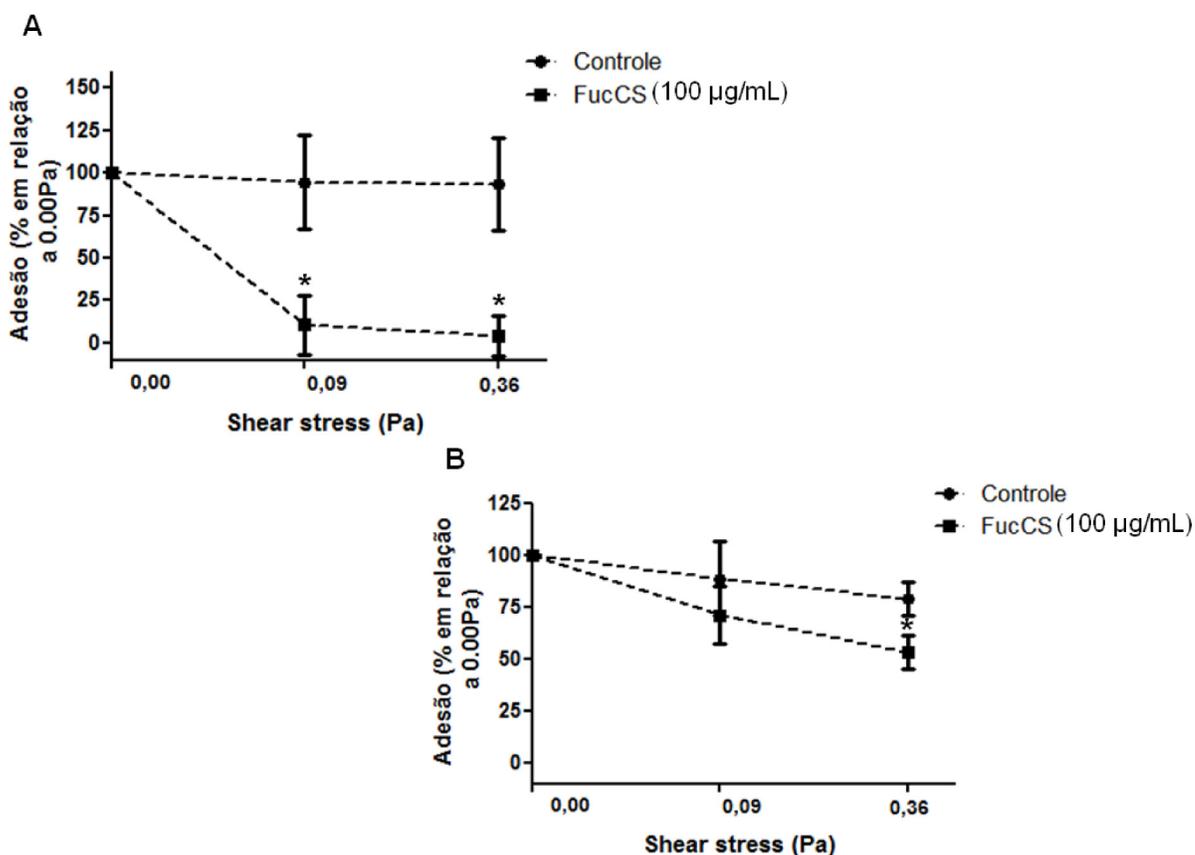
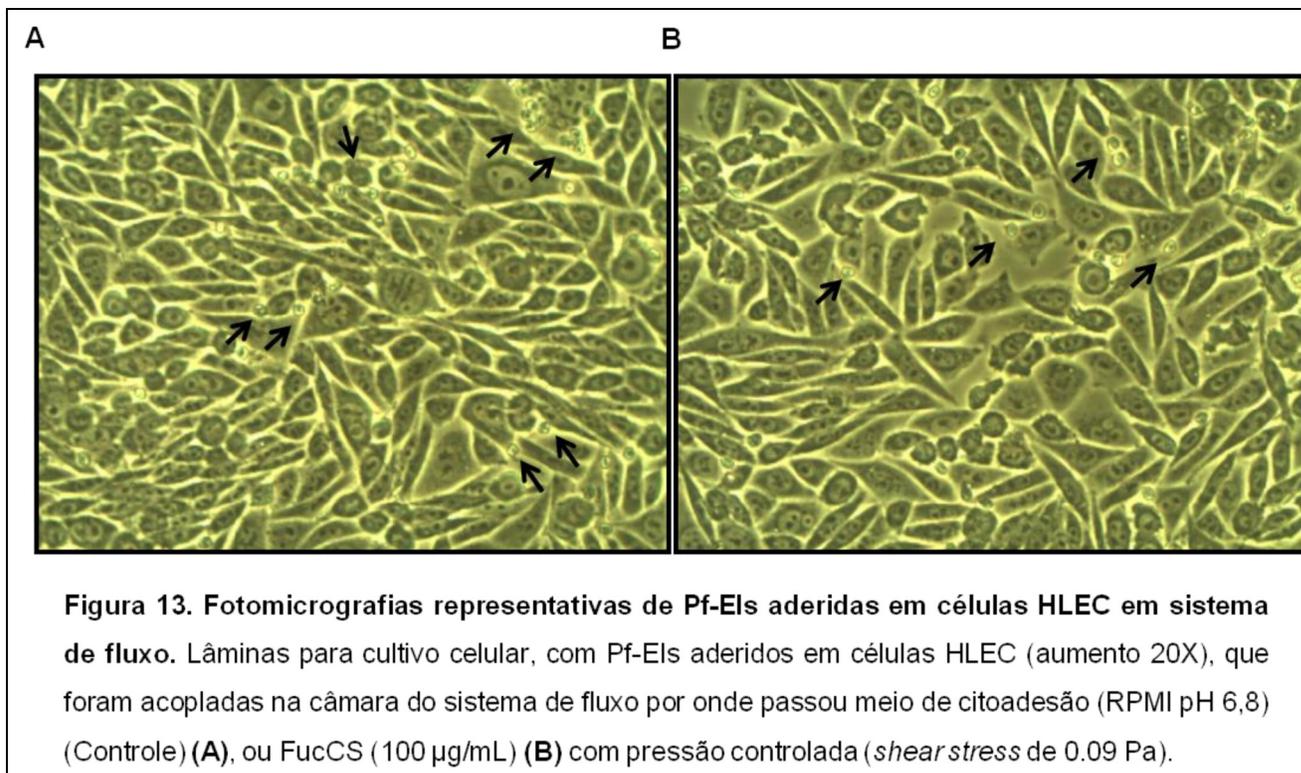


Figura 12. Efeito do FucCS na dessequestração de Pf-Elis em células HLEC em sistema de fluxo. Parasitas FCR3^{CSA} (A) ou FCR3^{ICAM} (B) (5×10^5) foram colocados para aderir em células HLEC por 1 hora a 37°C (*shear stress* 0.00). As lâminas foram então acopladas na câmara do sistema de fluxo por onde passou meio de citoadesão (RPMI pH 6,8) (Controle), ou FucCS (100 µg/mL) com pressão controlada (*shear stress* de 0.09 e 0.36 Pascal). Pf-Elis que restaram aderidos foram contados em 25 campos selecionados aleatoriamente e os resultados foram expressos como uma porcentagem em relação à adesão na pressão zero (*shear stress* 0.00). (*) $P < 0,05$ (FucCS vs Controle).



Estudos têm mostrado, que a heparina e outros polissacarídeos sulfatados, como o pentosan polissulfato, dextran sulfato, curdlan sulfato, e fucoidan, podem inibir o crescimento de estágios sangüíneos de *P. falciparum in vitro* (Butcher *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1998; Havlik *et al.*, 1994). Sendo assim, investigamos a ação do FucCS na inibição do desenvolvimento parasitário. Para isso, formas sanguíneas de *P. falciparum* FCR3 foram incubadas com concentrações crescentes de FucCS, Heparina ou CSA; DeFucCS ou CRFucCS, ou meio RPMI (controle), por aproximadamente 48 horas, tempo necessário para o parasita passar por todo o ciclo eritrocítico. Como mostrado na **Figura 14**, o FucCS e a heparina exibiram um efeito inibitório bastante acentuado, com inibição do desenvolvimento parasitário próximo a 100% nas duas maiores doses (100 e 1000 µg/mL). Já a CSA mostrou não ser eficiente em inibir esse processo, exceto na maior dose (1000 µg/mL), na qual atingiu uma inibição

de 89,3%. Analisando o efeito do FucCS modificado, observamos que apesar do CRFucCS apresentar uma inibição significativamente menor ($P < 0,05$) que o FucCS nativo (100 $\mu\text{g/mL}$), essa diferença não foi muita expressiva. Na realidade, o CRFucCS foi bastante eficiente em inibir o desenvolvimento parasitário, atingindo uma inibição de 72,4%. Em contraste, o DeFucCS apresentou efeito inibitório bastante reduzido com inibição de apenas 9,1%, evidenciando a necessidade da presença das cadeias de fucose sulfatadas para ocorrência do processo inibitório.

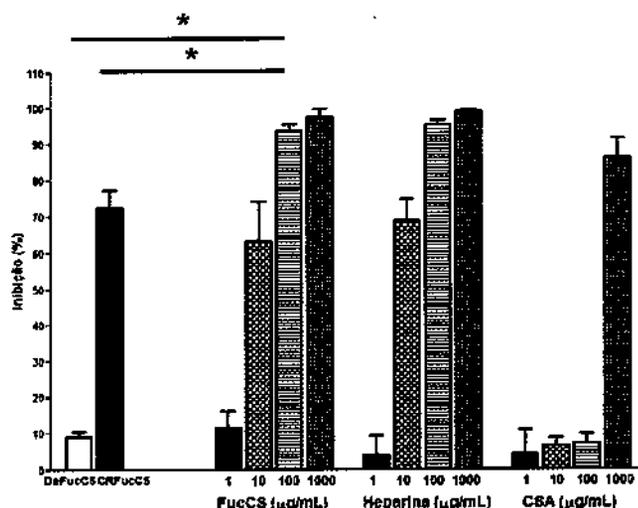
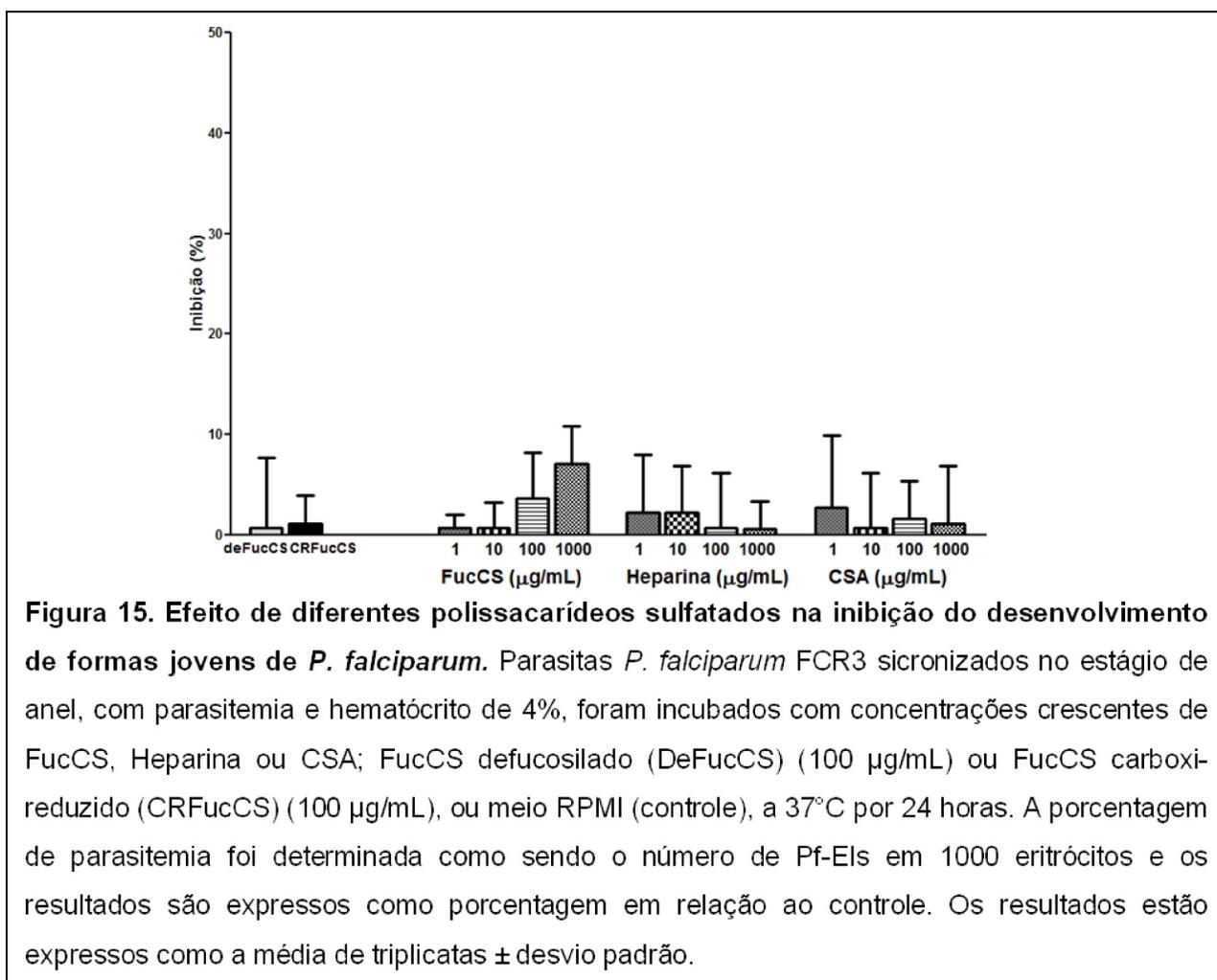


Figura 14. Efeito de diferentes polissacarídeos sulfatados na inibição do desenvolvimento parasitário. Parasitas *P. falciparum* FCR3, com parasitemia e hematócrito de 4%, foram incubados com concentrações crescentes de FucCS, Heparina ou CSA; FucCS defucosilado (DeFucCS) (100 $\mu\text{g/mL}$) ou FucCS carboxi-reduzido (CRFucCS) (100 $\mu\text{g/mL}$), ou meio RPMI (controle), a 37°C por 48 horas. A porcentagem de parasitemia foi determinada como sendo o número de Pf-Els em 1000 eritrócitos e os resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média de triplicatas \pm desvio padrão. (*) $P < 0,05$ (FucCS vs. DeFucCS e FucCS vs. CRFucCS).

Com base nesses resultados, resolvemos investigar se o FucCS estaria atuando numa fase específica do ciclo eritrocítico. Então, inicialmente, incubamos cultura sincrônica de *P. falciparum* FCR3 no estágio de anel jovem com os compostos citados

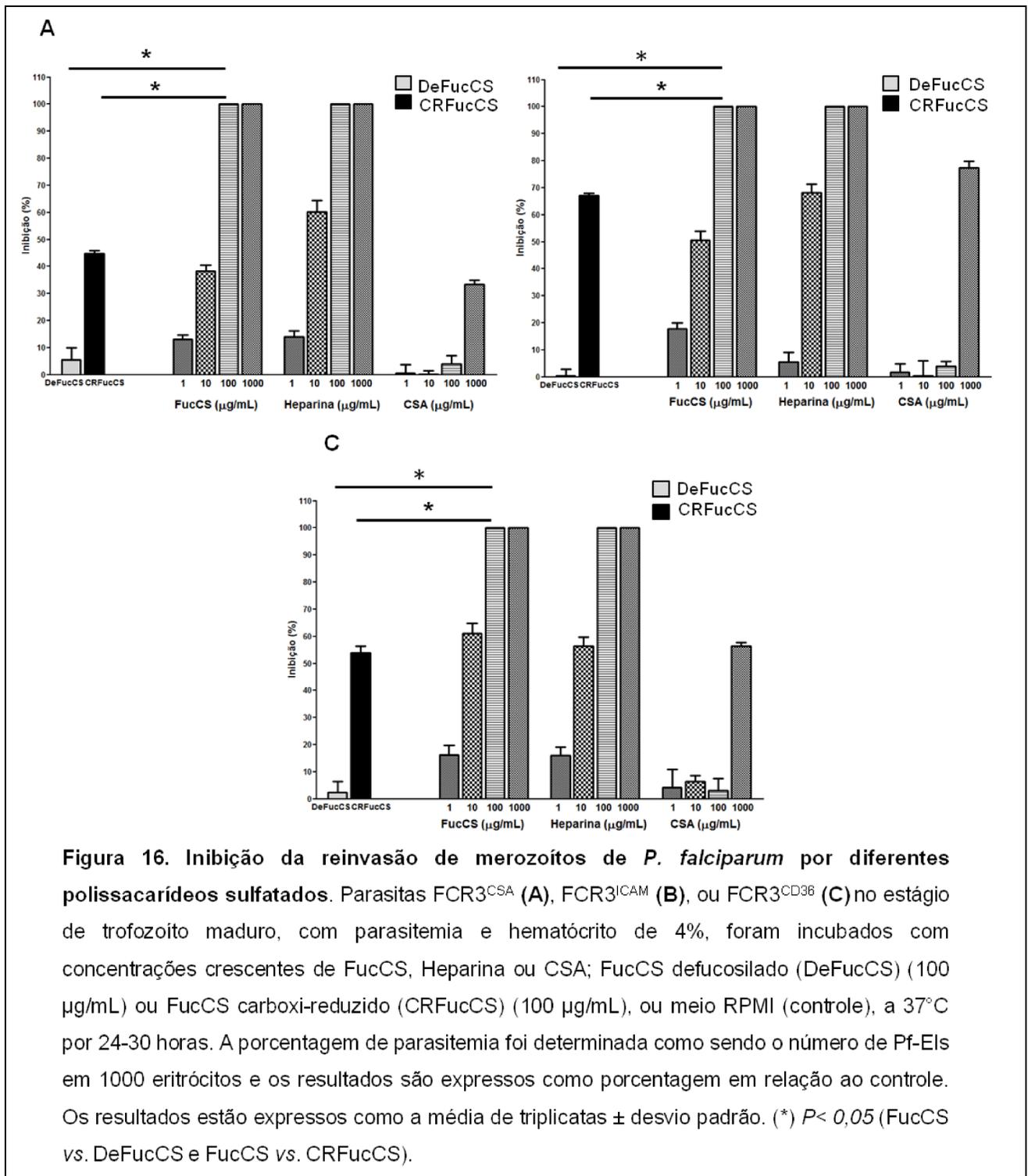
acima, por 24 horas, ou seja, até o parasita atingir o estágio de trofozoito maduro. Como é possível observar na **Figura 15**, nenhum dos compostos foi capaz de inibir significativamente ($P>0,05$) o desenvolvimento parasitário, sugerindo que a ação estaria ocorrendo na fase seguinte do ciclo eritrocítico. Resultado similar já foi descrito na literatura, mostrando que glicosaminoglicanos, como dextran sulfato, heparina, ácido hialurônico e CSA não possuem efeito significativo na inibição do crescimento parasitário na fase de anel jovem a trofozoito maduro (Xiao *et al.*, 1996).



Então, para confirmar a hipótese sugerida, realizamos ensaio similar ao descrito acima, mas utilizando parasitas concentrados na forma de trofozoito maduro, incubados por 24 horas com os compostos, para haver rompimento do esquizonte, liberação dos

merozoítos e reinvasão dos eritrócitos. Assim, avaliamos a capacidade do FucCS em inibir a reinvasão de merozoítos de parasitas *P. falciparum* FCR3^{CSA}, FCR3^{ICAM}, ou FCR3^{CD36} *in vitro*, que foram incubados na forma madura por 24 horas com concentrações crescentes de FucCS, Heparina ou CSA; DeFucCS ou CRFucCS (100 µg/mL), ou meio RPMI (controle). Como pode ser visto na **Figura 16**, os resultados foram bastante similares ao observado no ensaio de inibição do desenvolvimento parasitário de 48 horas (**Figura 14**), confirmando que a ação dos compostos estava restrita a esta fase do ciclo. Nos ensaios de reinvasão, o FucCS e a heparina exibiram efeito dose dependente na inibição da invasão de merozoítos de *P. falciparum* FCR3^{CSA}, FCR3^{ICAM}, e FCR3^{CD36}. Além disso, o efeito desses compostos foi bastante similar e eficiente, atingindo 100% de inibição nas doses mais elevadas (100, 1000 µg/mL) para todos os fenótipos testados (**Figura 16**). De fato, o efeito da heparina e de outros polissacarídeos sulfatados na inibição da reinvasão já foi demonstrado (Kulane *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 1996). Kulane *et al.* (1992) mostrou que a invasão de eritrócitos pelos merozoítos de diferentes cepas de *P. falciparum* é totalmente inibida quando utilizada altas concentração de heparina (≥100 µg/mL), confirmando nossos resultados. Em contraste, a CSA não demonstrou ter efeito inibitório significativo ($P>0,05$) na reinvasão dos merozoítos, com exceção da maior dose (1000 µg/mL) em que a inibição chegou a 33% no ensaio com FCR3^{CSA} (**Figura 16A**), 61% no ensaio com FCR3^{ICAM}, (**Figura 16B**), e 56% quando realizado com FCR3^{CD36} (**Figura 16C**), possivelmente devido ao excesso do composto no meio. Esses resultados corroboram com os dados encontrados na literatura, os quais demonstram que a CSA não possui efeito inibitório significativo na reinvasão principalmente nas doses mais baixas, exibindo efeito mais expressivo (41% de inibição) apenas na maior dose (1000 µg/mL) (Xiao *et al.*, 1996; Vogt *et al.*, 2006).

Analisando o efeito do FucCS quimicamente modificado na reinvasão, pudemos observar que o CRFucCS apesar de inibir a reinvasão de merozoítos de maneira significativamente menor ($P < 0,05$) que o FucCS, ainda mantém uma inibição elevada, sendo esta 44% para o FCR3^{CSA} (**Figura 16A**), 66% para parasitas FCR3^{ICAM} (**Figura 16B**), e 53% para parasitas FCR3^{CD36} (**Figura 16C**). Em contraste, o DeFucCS, em todos os casos, não foi capaz de inibir essa reinvasão de maneira eficiente, exibindo valores de inibição bastante reduzidos (8,9% de inibição para o FCR3^{CSA}, 0,3% de inibição para o FCR3^{ICAM}, e 2,4% de inibição para o FCR3^{CD36}) (**Figura 16**). Assim, embora o mecanismo envolvido na inibição da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* pelo FucCS não esteja claro, esses resultados evidenciam mais uma vez, que assim como na inibição da citoaderência parasitária, a presença das cadeias extra de fucose sulfatadas é essencial para que o processo inibitório ocorra. Além disso, a ação do FucCS parece ser bastante abrangente, pois o efeito inibitório foi similar para os diferentes fenótipos testados. Assim, mais estudos são necessários para entendermos os mecanismos envolvidos, determinando, por exemplo, se o FucCS bloqueia o processo de reinvasão interagindo com proteínas do eritrócito ou com moléculas presentes na superfície dos merozoítos. Alguns estudos têm tentado explicar os mecanismos envolvidos na inibição da reinvasão por alguns polissacarídeos sulfatados. Clark *et al.* (1997) mostrou que apenas os polissacarídeos densamente sulfatados (heparina, dextran sulfato e fucoidan) eram efetivos em inibir a reinvasão, e sugeriu que essa inibição não fosse resultado apenas de interações iônicas não específicas, mas sim de uma conformação particular de ânions presentes nos compostos. Já Boyle *et al.* (2010) têm demonstrado que o nível e o padrão de sulfatação são cruciais para a atividade inibitória da heparina e de compostos similares. Além disso, identificou a MSP1-42, proteína do merozoíto envolvida na invasão, como um provável alvo das moléculas inibitórias (Boyle *et al.*, 2010).



Por fim, com base na ação anti-adesiva e antimalárica observada, e nas atividades anti-inflamatórias descritas para o FucCS, avaliamos se esse composto teria efeito na

mortalidade e na parasitemia de modelo experimental de malária cerebral (MCE). Para isso, camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com 10^6 eritrócitos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), linhagem capaz de induzir malária cerebral. Os animais infectados foram tratados com dose única de FucCS (1 mg/kg) i.v. pela cauda, diariamente (dias 3-6 pós-infecção), ou com solução salina (controle). Os resultados obtidos a partir da observação da mortalidade revelaram uma melhora significativa ($P < 0,05$) na sobrevivência dos animais tratados, evidenciando um retardo na morte destes animais, quando comparados aos não tratados (**Figura 17**). No entanto, não foi observada diferença estatística significativa ($P > 0,05$) na parasitemia dos animais tratados quando comparados com os animais controle (**Figura 18**). É difícil afirmar ao certo quais mecanismos estariam atuando para melhora desses animais. Mas além das ações na citoadesão e na reinvasão parasitária *in vitro* observadas nesse estudo, já foi descrito que o FucCS é capaz de reduzir o processo inflamatório diminuindo o recrutamento de neutrófilos (Borsig *et al.*, 2007). Nesse sentido, na MCE observa-se um ambiente pró-inflamatório com acúmulo de leucócitos e plaquetas nas vênulas e capilares do cérebro (White *et al.*, 2010). Desse modo, esses resultados abrem perspectiva para o aprofundamento dos estudos *in vivo*, na tentativa de entender os mecanismos de ação envolvidos e de testar novos protocolos de tratamento.

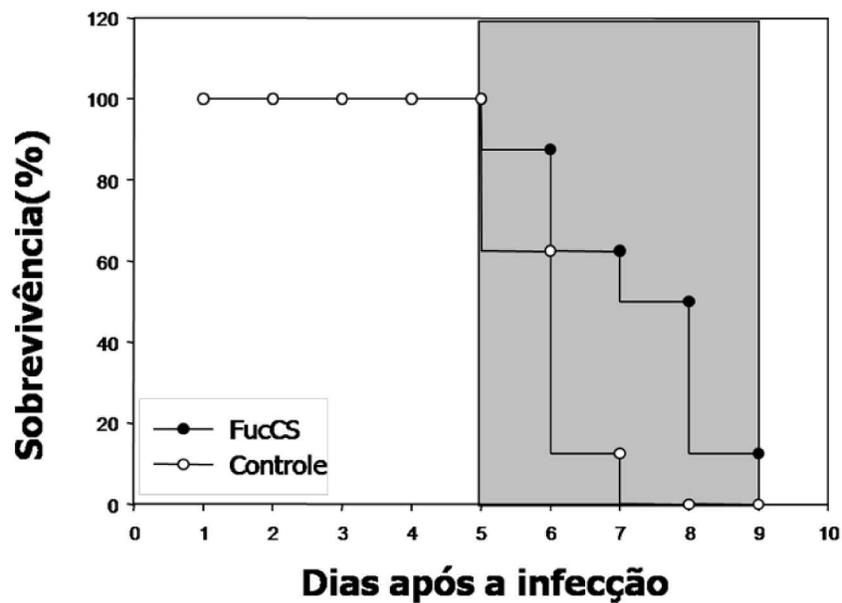


Figura 17. Efeito do FucCS na malária cerebral experimental. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 (n=8 para cada grupo) infectados com 10^6 eritrócitos infectados de *P. berghei* ANKA (PbA) e tratados diariamente (dia 3-6 pós-infecção) com injeção intravenosa (i.v.) de 1 mg/Kg de FucCS ou com solução salina (controle). (*) $P < 0,05$ (grupo FucCS vs controle). (■) Período de manifestação dos sintomas neurológicos da MC.

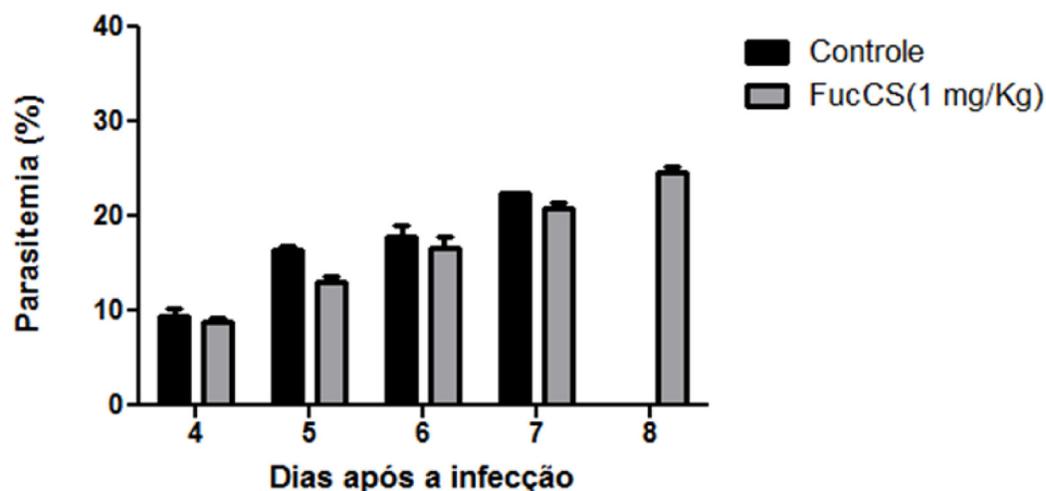


Figura 18. Efeito do FucCS na parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA (PbA). Porcentagem de parasitemia de camundongos C57BL/6 (n=8 para cada grupo) infectados com 10^6 eritrócitos infectados de PbA e tratados diariamente (dia 3-6 pós-infecção) com injeção intravenosa (i.v.) de 1 mg/Kg de FucCS ou com solução salina (controle).

Diante dos resultados obtidos, é importante ressaltar, que o potente efeito inibitório do FucCS no processo de citoadesão parasitária e na reinvasão de merozoítos de *P. falciparum*, sua capacidade em reverter a citoaderência parasitária, e sua ação na malária cerebral murina estão evidenciados em muitas vantagens exibidas pela FucCS em relação a outros compostos que vêm sendo testados. Dentre elas destaca-se o fato deste composto não necessitar de fracionamento e/ou modificações químicas após sua purificação (Glauser *et al.*, 2008), não ser derivado de mamíferos (Pacheco *et al.*, 2000), como a heparina e a CSA, evitando assim o risco de contaminação por agentes patogênicos, ocorrer em altas concentrações num invertebrado abundante (Glauser *et al.*, 2008), apresentar menor efeito anticoagulante e antitrombótico do que a heparina (Mourão *et al.*, 1996 ; Mourão *et al.*, 2001), e agir *in vitro* e *in vivo* em concentrações inferiores as necessárias para ativar seu efeito anticoagulante.

Coletivamente, estes achados abrem perspectivas para o uso do FucCS como terapia adjuvante no tratamento da malária grave e na prevenção ao agravamento da doença.

CONCLUSÕES

- O FucCS não apresenta toxicidade aos eritrócitos sadios.
- O composto apresenta baixa toxicidade as células HepG2.
- O FucCS apresenta um potente efeito inibitório na citoadesão de *P. falciparum* monofenotípicos (FCR3^{CSA}, FCR3^{ICAM}, FCR3^{ICAM}) a células endoteliais HLEC.
- O FucCS é capaz de dessequestrar *P. falciparum* FCR3^{CSA} e FCR3^{ICAM} aderidos a células endoteliais HLEC em sistema de fluxo.
- O composto apresenta potente efeito inibitório na reinvasão de *P. falciparum* monofenotípicos.
- A presença das cadeias de fucose sulfatadas é fundamental para a ocorrência do processo inibitório.
- O FucCS é capaz de retardar a morte dos animais tratados e infectados com PbA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, CELLI S, SHORTE S, FRISCHKNECHT F, MÉNARD R. 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 12 (2): 220-4.
- AMINO R, THIBERGE S, BLAZQUEZ S, BALDACCI P, RENAUD O, SHORTE S, MÉNARD R. 2007. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc.* 2(7):1705-12.
- ANDREWS KT, KLATT N, ADAMS Y, MISCHNICK P, SCHWARTZ-ALBIEZ R. 2005. Inhibition of chondroitin-4-sulfate-specific adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by sulfated polysaccharides. *Infect Immun.* 73(7):4288-94.
- BARRAGAN A, SPILLMANN D, WAHLGREN M, CARLSON J. 1999. *Plasmodium falciparum*: molecular background of strain specific rosette disruption by glycosaminoglycans and sulfated glycoconjugates. *Exp Parasitol.* 91: 133-43.
- BARUCH DI, PASLOSKE BL, SINGH HB, BI X, MA XC, FELDMAN M, TARASCHI TF, HOWARD RJ. 1995. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell.* 82: 77-87.
- BARUCH DI. 1999. Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillieres Best Pract. Res Clin Haematol.* 12: 747-61.
- BEESON JG, BROWN GV, MOLYNEUX ME, MHANGO C, DZINJALAMALA F, ROGERSON SJ. 1999. *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J Infect Dis* 180: 464-72.

- BEESON JG, ROGERSON SJ, COOKE BM, REEDER JC, CHAI W, LAWSON AM, MOLYNEUX ME, BROWN GV. 2000. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat. Med.* 6: 86-90.
- BEESON JG, REEDER JC, ROGERSON SJ, BROWN GV. 2001. Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. *Trends Parasitol.* 17: 331-7.
- BEESON JG, BROWN GV. 2002. Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell Mol Life Sci.* 59(2): 258-71.
- BERENDT AR, SIMMONS DL, TANSEY J, NEWBOLD CI, MARSH K. 1989. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 7;341(6237): 57-9.
- BIERMANN CH, MARKS JA, VILELA-SILVA AC, CASTRO MO, MOURÃO PAS. 2004. Carbohydrate-based species recognition in sea urchin fertilization: another avenue for speciation? *Evol Dev.* 6: 353-61.
- BLANCO YC, FARIAS AS, GOELNITZ U, LOPES SC, ARRAIS-SILVA WW, CARVALHO BO, AMINO R, WUNDERLICH G, SANTOS LM, GIORGIO S, COSTA FT. 2009. Hyperbaric oxygen prevents early death caused by experimental cerebral malaria. *PLoS One.* 3(9):e3126.
- BORSIG L, WANG L, CAVALCANTE MCM, CARDILO-REIS L, FERREIRA PL, MOURÃO PAS, ESKO JD, AND PAVÃO MSG. 2007. Selectin Blocking Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan from Sea Cucumber: Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *J Biol Chem.* 282(20): 14984-91.

- BOYLE MJ, WILSON DW, RICHARDS JS, RIGLAR DT, TETTEH KK, CONWAY DJ, RALPH SA, BAUM J, BEESON JG. 2010. Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10;107(32): 14378-83.
- BRABIN BJ, 1983. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull. WHO*. 61: 1005-16.
- BUTCHER GA, PARISH CR, COWDEN WB. 1988. Inhibition of growth in vitro of *Plasmodium falciparum* by complex polysaccharides. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 82(4): 558-9.
- CARLSON J, WAHLGREN M. 1992. *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *J Exp Med*. 176: 1311-7.
- CARLSON J, EKRE H, HELMBY H, GYSIN J, GREENWOOD B M, AND WAHLGREN M. 1992. Disrupture of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes by standard heparin and heparin devoid of anticoagulant activity. *Am J Trop Med Hyg*. 46: 595-602.
- CARLSON J, NASH GB, GABUTTI V, ALPERS MP, WAHLGREN M. 1993. Natural protection against malaria due to impaired rosette formation. *Blood*. 84: 3909-14.
- CARVALHO BO, LOPES SC, NOGUEIRA PA, ORLANDI PP, BARGIERI DY, BLANCO YC, MAMONI R, LEITE JA, RODRIGUES MM, SOARES IS, OLIVEIRA TR, WUNDERLICH G, LACERDA MV, DEL PORTILLO HA, ARAÚJO MO, RUSSELL B, SUWANARUSK R, SNOUNOU G, RÉNIA L, COSTA FT. 2010. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 202(4): 638-47.

- CASARES S, BRUMEANU TD, RICHIE TL. The RTS,S malaria vaccine. 2010. *Vaccine*. 28(31): 4880-94.
- CATERSON B, MAHMOODIAN F, SORREL JM, HARDINGHAM TE, BAYLISS MT, CARNEY SL, RATCLIFFE A, MUIR H. 1990. Modulation of native chondroitin sulfate structures in tissue development and disease. *J Cell Sci*. 97: 411-7
- CHAIYAROJ SC, ANGKASEKWINAI P, BURANAKITI A, LOOAREESUWAN S, ROGERSON SJ, BROWN GV. 1996. Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand: evidence for chondroitin sulfate as a cytoadherence receptor. *Am J Trop Med Hyg*. 55: 76-80.
- CHEN Q, BARRAGAN A, FERNANDEZ V, SUNDSTROM A, SCHLICHOTHERLE M, SAHLEN A, CARLSON J, DATTA S, AND WAHLGREN M. 1998. Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J. Exp. Med*. 187: 15-23.
- CLARK DL, SU S, DAVIDSON EA. 1997. Saccharide anions as inhibitors of the malaria parasite. *Glycoconj J*. 14(4): 473-9.
- COMBES V, COLTEL N, FAILLE D, WASSMER SC., GRAU GE, 2006. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain-barrier. *Int J Parasitol*. 36: 541-6.
- COSTA FT, FUSAÏ T, PARZY D, STERKERS Y, TORRENTINO M, DOUKI JB, TRAORÉ B, PETRES S, SCHERF A, GYSIN J. 2003. Immunization with recombinant duffy binding-like-gamma3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies

against placental chondroitin sulfate A-binding *Plasmodium falciparum* parasites. *Infect Dis.* 188: 153-64.

COSTA FTM, NOGUEIRA PA, GYSIN J. 2006. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the infected placenta: a two-way pathway. *Braz J. Med Biol. Res* 39: 1525-36.

DAVID PH, HOMMEL M, MILLER LH, UDEINYA IJ, OLIGINO LD. 1983. Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sc. USA.* 80: 5075-9.

DONDORP AM, PONGPONRATN E, WHITE NJ. 2004. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Tropica.* 89: 309-17.

DONDORP AM, INCE C, CHARUNWATTHANA P, HANSON J, VAN KUIJEN A, FAIZ MA, RAHMAN MR, HASAN M, BIN YUNUS E, GHOSE A, RUANGVEERAYUT R, LIMMATHUROTSAKUL D, MATHURA K, WHITE NJ, DAY NP. 2008. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *J Infect Dis.* 197: 79-84.

DONDORP AM, NOSTEN F, YI P, DAS D, PHYO AP, TARNING J, LWIN KM, ARIEY F, HANPITHAKPONG W, LEE SJ, RINGWALD P, SILAMUT K, IMWONG M, CHOTIVANICH K, LIM P, HERDMAN T, AN SS, YEUNG S, SINGHASIVANON P, DAY NP, LINDEGARDH N, SOCHEAT D, WHITE NJ. 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 361(5): 455-67.

- EASTMAN RT, FIDOCK DA. 2009. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol.* 7(12): 864-74.
- ENGWERDA C, BELNOUE E, GRUNER AC, RENIA L. 2005. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 297: 103-43.
- EVANS SG, MORRISON D, KANEKO Y, HAVLIK I. 1998. The effect of curdlan sulphate on development in vitro of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92(1): 87-9.
- FONSECA RJC, MOURÃO PAS. 2006. Fucosylated chondroitin sulfate as a new antithrombotic agent. *Thromb Haemost.* 96: 822-9.
- FREVERT U, SINNIS P, CERAMI C, SHREFFLER W, TAKACS B, NUSSENZWEIG V. 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparin sulphate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med.* 177: 1287-98.
- FRIED M, DUFFY PE. 1996. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science.* 272: 1502-14.
- FRIED M, NOSTEN F, BROCKMAN A, BRABIN BJ, DUFFY PE. 1998. Maternal antibodies block malaria. *Nature* 395: 851-2.
- GLAUSER BF, PEREIRA MS, MONTEIRO RQ, MOURÃO PAS. 2008. Serpin-independent anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate. *Thromb Haemost.* 100: 420-8.

- GRANJA AC, MACHUNGO F, GOMES A, BERGSTROM S, BRABIN B. 1998. Malaria-related maternal mortality in urban Mozambique. *Ann Trop Med Parasitol.* 92: 257-63.
- GRAU GE & DE KOSSODO S. 1994. Cerebral malaria: mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol Today.* 10: 408-9.
- GREENWOOD BM, FIDOCK DA, KYLE DE, KAPPE SH, ALONSO PL, COLLINS FH, DUFFY PE. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest.* 118(4): 1266-76.
- GYSIN J, POUVELLE B, FIEVET N, SCHERF A, LEPOLARD C. 1999. Ex vivo desequestration of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes from human placenta by chondroitin sulfate A. *Infect Immun.* 67: 6596-602.
- HANDUNETTI SM, HASLER TH, HOWARD RJ. 1992. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes do not adhere well to C32 melanoma cells or CD36 unless rosettes with uninfected erythrocytes are first disrupted. *Infect Immun.* 60: 928-32.
- HAVLIK I, ROVELLI S, KANEKO Y. 1994. The effect of curdlan sulphate on in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88(6): 686-7.
- HO M, WHITE NJ. 1999. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol.* 276: C1231-42.
- HUGHES KR, BIAGINI GA, CRAIG AG. 2010. Continued cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells after antimalarial treatment. *Mol Biochem Parasitol.* 169(2): 71-8.

- KAPPE SH, VAUGHAN AM, BODDEY JA, COWMAN AF. 2010. That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda. *Science*. 328(5980): 862-6.
- KROLL MH, HELLUMS JD, MCINTIRE LV, SCHAFER AI, MOAKE JL. 1996. Platelets and shear stress. *Blood*. 88(5):1525-41.
- KOKWARO G. 2009. Ongoing challenges in the management of malaria. *Malar J*. 12(8): Suppl 1:2.
- KULANE A, EKRE H, PERLMANN P, ROMBO L, WAHLGREN M. 1992. Effect of different fractions of heparin on *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells in vitro. *Am J Trop Med Hyg*. 46(5): 589-94.
- KYES SA, KRAEMER SM, SMITH JD. 2007. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryot Cell*. 6(9):1511-20.
- KYRIACOU HM, STEEN KE, RAZA A, ARMAN M, WARIMWE G, BULL PC, HAVLIK I, ROWE JA. 2007. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* rosette formation by Curdlan sulfate. *Antimicrob Agents Chemother*. 51(4):1321-6.
- LAND KM, SHERMAN IW, GYSIN J, CRANDALL IW. 1995. Anti-adhesive antibodies and peptides as potential therapeutics for *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitol Today*. 11: 19-23.
- LUSE SA, MILLER LH. 1971. *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg*. 20: 655-60.

- MCGREGOR IA. 1984. Epidemiology, malaria and pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 33: 517-25.
- MACKINTOSH L, BEESON JG, MARSH K. 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitol.* 20: 597-603.
- MACPHERSON GG, WARRELL MJ, WHITE NJ, LOOAREESUWAN S, WARRELL DA. 1985. Human cerebral malaria: a quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol.* 119: 385-401.
- MALARIA/SVS/MS: Malária em "Doenças de A a Z". 2009 (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_casos_conf_malaria_seg_mes_not_bra_gr_e_ufs_09.pdf). Acesso em: 05 de fevereiro de 2011.
- MARSH K, FORSTER D, WARUIRU C, MWANGI I, WINSTANLEY M, MARSH V, NEWTON C, WINSTANLEY P, WARN P, PESHU N, PASVOL G, SNOW R. 1995. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med.* 332(21): 1399-404.
- MILLER KL, SILVERMAN PH, KULLGREN B, MAHLMANN LT. 1989. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun* 57: 1542-6.
- MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415(6872): 673-9.
- MISHRA SK, NEWTON CR. 2009. Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. *Nat Rev Neurol.* 5(4): 189-98.

- MOSMANN T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2): 55-63.
- MOURÃO PAS, PEREIRA MS, PAVÃO MSG, MULLOY B, TOLLEFSEN DM, MOWINCKEL MC, ABILDGAARD U. 1996. Structure and Anticoagulant Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate from Echinoderm. *J Biol Chem*. 271: 23973-84.
- MOURÃO PAS, GUIMARÃES MAM, MULLOY B, THOMAS S, GRAY E. 1998. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *Br J Haematol*. 101: 647-52.
- MOURÃO PAS, PEREIRA MS. 1999. Searching for alternatives to heparin. *Trends Cardiovasc Med*. 9: 225-32.
- MOURÃO PAS, BOISSON-VIDAL C, TAPON-BRETAUDIÈRE J, DROUET B, BROS A, FISCHER A. 2001. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *Thromb Res*. 102: 167-76.
- MUANZA K, GAY F, BEHR C, SCHERF A. 1996. Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadherence. *Res Immunol*. 147(3): 149-63.
- MUNIR M, TJANDRA H, RAMPENGAN TH, MUSTADJAB I, WULUR FH. 1980. Heparin in treatment of cerebral malaria. *Paediatr Indones*. 20: 47-50.
- NEWTON CRJC, KRISHNA S. 1998. Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther*. 79:

1-53.

NEWTON CRJC, HIEN TT, WHITE N. 2000. Neurological aspects of tropical disease: Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 69: 433-41.

NOEDL H, SE Y, SCHAECHER K, SMITH BL, SOCHEAT D, FUKUDA MM. 2008. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med*. 359: 2619-20.

OCKENHOUSE CF, TANDON NN, MAGOWAN C, JAMIESON GA, CHULAY JD. 1989. Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. *Science*. 243(4897): 1469-71.

ORDI J, ISMAIL MR, VENTURA PJ, KAHIGWA E, HIRT R, CARDESA A, ALONSO PL, MENENDEZ C. 1998. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malarial infection. *Am J Surg Pathol*. 22: 1006-11.

ORDI J, MENENDEZ C, ISMAIL MR, VENTURA PJ, PALACIN A, KAHIGWA E, FERRER B, CARDESA A, ALONSO PL. 2001. Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. *J Infect Dis*. 183: 1100-7.

PACHECO RG, VICENTE CP, ZANCAN P, MOURÃO PAS. 2000. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 11: 563-73.

PANCAKE SJ, HOLT GD, MELLOUK S, HOFFMAN SL. 1992. Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J Cell Biol*. 117(6): 1351-7.

- PLANCHE T, KRISHNA S. 2006. Severe malaria: metabolic complications. *Curr Mol Med* 6: 141-53.
- PONGPONRATN E, RIGANTI M, PUNPOOWONG B, AIKAWA M. 1991. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 168-175.
- POUVELLE B, MEYER P, ROBERT C, BARDEL L, GYSIN J. 1997. Chondroitin-4-sulfate impairs in vitro and in vivo cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Med.* 3(8): 508-18.
- POUVELLE B, TRAORE B, NOGUEIRA PA, PRADINES B, LEPOLARD C, GYSIN J. 2003. Modeling of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion in microvascular conditions: chondroitin-4-sulfate binding, a competitive phenotype. *J Infect Dis.* 187: 292-302.
- RAMPENGAN TH. 1991. Cerebral malaria in children. Comparative study between heparin, dexamethasone and placebo. *Paediatr Indones.* 31: 59-66.
- ROBERT C, POUVELLE B, MEYER P, MUANZA K, FUJIOKA H, AIKAWA M, SCHERF A, GYSIN J. 1995. Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Res Immunol.* 146: 383-93.
- ROGERSON SJ, REEDER JC, AL-YAMAN F, BROWN GV. 1994. Sulfated glycoconjugates as disrupters of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes. *Am J Trop Med Hyg.* 51: 198-203.

ROGERSON SJ, CHAIYAROJ SC, NG K, REEDER JC, BROWN GV. 1995. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Exp Med.* 182(1): 15-20.

ROGERSON SJ, BROWN GV. 1997. Chondroitin sulfate A as an adherence receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitol Today.* 13: 70-5.

ROGERSON SJ, TEMBENU R, DOBANO C, PLITT S, TAYLOR TE, MOLYNEUX ME. 1999. Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 61: 467-72.

ROGERSON SJ, POLLINA E, GETACHEW A, TADESSE E, LEMA VM, MOLYNEUX ME. 2003. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg.* 68: 115-9.

ROGERSON SJ, HVIID L, DUFFY PE, LEKE RF, TAYLOR DW. 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis.* 7(2): 105-17.

ROLL BACK MALARIA. Key malaria facts: (<http://www.rollbackmalaria.org/keyfacts.html>). Acesso em: 05 de dezembro de 2010.

ROWE A, BERENDT AR, MARSH K, NEWBOLD CI. 1994. *Plasmodium falciparum*: a family of sulphated glycoconjugates disrupts erythrocyte rosettes. *Exp Parasitol.* 79: 506-16.

ROWE A, OBEIRO J, NEWBOLD CI, MARSH K. 1995. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun.* 63: 2323-6.

- ROWE JA, MOULDS JM, NEWBOLD CI, MILLER LH. 1997. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*. 388: 292-5.
- ROWE JA, CLAESSENS A, CORRIGAN RA, ARMAN M. 2009. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*. 26(11): e16.
- SCHERF A, HERNANDEZ-RIVAS R, BUFFET P, BOTTIUS E, BENATAR C, POUVELLE B, GYSIN J, LANZER M. 1998. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J*. 17(18): 5418-26.
- SCHLICHTERLE S, GANDJOUR A, NEUGEBAUER A, RÜSSMANN W, LAUTERBACH KW. 2000. The cost-effectiveness of screening strategies for amblyopia: a preliminary report. *Strabismus*. 8(4): 291-5.
- SCHOFIELD L, GRAU GE. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 5: 722-35.
- SCHOFIELD, L. 2007. Intravascular infiltrates and organ-specific inflammation in malaria pathogenesis. *Immunol Cell Biol*. 85:130-7.
- SINGH B, KIM SUNG L, MATUSOP A, RADHAKRISHNAN A, SHAMSUL SS, COX-SINGH J, THOMAS A, CONWAY DJ. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 363(9414): 1017-24.
- SHARMA YD. 1991. Knobs, knob proteins and cytoadherence in falciparum malaria. *Int J Biochem*. 23(9): 775-89.

SU XZ, HEATWOLE VM, WERTHEIMER SP, GUINET F, HERRFELDT JA, PETERSON DS, RAVETCH JA, WELLEMS TE. 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*. 82: 89-100.

SVS: Secretaria de Vigilância e Saúde. Situação Epidemiológica no Brasil, 2008: (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf). Acessado em 05 de dezembro de 2010.

TAYLOR RL, SHIVELY JE, CONRAD HE. 1976. Stoichiometric reduction of uronic acid carboxyl groups in polysaccharides. *Methods Carbohydr Chem*. 7: 149-51.

THIBERGE S, BLAZQUEZ S, BALDACCI P, RENAUD O, SHORTE S, MÉNARD R, AMINO R. 2007. In vivo imaging of malaria parasites in the murine liver. *Nat Protoc*. 2(7):1811-8.

TRAGER W, JENSEN JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 193: 673-5.

TRAMPUZ A, JEREB M, MUZLOVIC I, PRABHU RM. 2003. Clinical review: severe malaria. *Critical Care* 7: 315-23.

TURNER GDH, MORRISON H, JONES M, DAVIS TME, LOOAREESUWAN S, BULEY ID, GATTER KC, NEWBOLD CI, PUKRITAYAKAMEE S, NAGACHINTA B 1994. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol*. 145: 1057-69.

TURNER G. 1997. Cerebral malaria. *Brain Pathol*. 7: 569-82.

- VAN DER HEYDE HC, NOLAN J, COMBES V, GRAMAGLIA I, GRAU GE. 2006. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.* 22: 503-8
- VESTERGAARD LS, RINGWALD PL. 2007. Responding to the challenge of antimalarial drug resistance by routine monitoring to update national malaria treatment policies. *Am J Trop Med Hyg.* 77: 153-9.
- VIEIRA RP, MOURÃO PAS. 1988. Occurrence of a Unique Fucose-branched Chondroitin Sulfate in the Body Wall of a Sea Cucumber. *J Bio Chem.* 263: 18176-83.
- VIEIRA RP, MULLOY B, MOURÃO PAS. 1991. Structure of a Fucose-branched Chondroitin Sulfate from Sea Cucumber. *J Biol Chem.* 266: 13530-6.
- VOGT AM, BARRAGAN A, CHEN Q, KIRONDE F, SPILLMANN D, WAHLGREN M. 2003. Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes via the DBL1alpha domain of PfEMP1. *Blood.* 101(6): 2405-11.
- VOGT AM, PETTERSSON F, MOLL K, JONSSON C, NORMARK J, RIBACKE U, EGWANG TG, EKRE HP, SPILLMANN D, CHEN Q, WAHLGREN M. 2006. Release of sequestered malaria parasites upon injection of a glycosaminoglycan. *PLoS Pathog.* 2(9): e100.
- XIAO L, YANG C, PATTERSON PS, UDHAYAKUMAR V, LAL AA. 1996. Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes. *Infect Immun.* 64(4): 1373-8.

- WHITE NJ, TURNER GDH, MEDANA IM, DONDORP AM, DAY NPJ. 2010. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol.* 26(1):11-5.
- WHO: World Health Organization Malaria Action Programme. 1986. Severe and complicated malaria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 80 (suppl): 3-50.
- WHO: Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. 2000. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94 Suppl 1: S1-90.
- WHO: Guidelines for the Treatment of Malaria 2006 (<http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>). Acesso em: 21 de novembro de 2010.
- WHO: (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG). Acesso em: 05 de dezembro de 2010.
- WHO: World Malaria Report 2009: (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901eng.pdf>). Acesso em: 05 de dezembro de 2010.
- WHO: World Malaria Report 2009: (http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_bra_en.pdf). Acesso em: 05 de dezembro de 2010.
- WHO: (http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/malaria/en/). Acesso em: 05 de dezembro de 2010.
- WONGSRICHANALAI C, PICKARD AL, WERNSDORFER WH, MESHNICK SR. 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2: 209-18.
- WOODROW CJ, HAYNES RK, KRISHNA. 2004. Artemisinins. *Postgrad Med J.* 81: 71-8.

- YAMAGATA T, SAITO H, HABUCHI O, SUZUKI S. 1968. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J. Biol. Chem.* 243: 1523.
- YIPP BG, BARUCH DI, BRADY C, MURRAY AG, LOOAREESUWAN S, KUBES P, HO M. 2003. Recombinant PfEMP1 peptide inhibits and reverses cytoadherence of clinical *Plasmodium falciparum* isolates in vivo. *Blood.* 101(1): 331-7.
- ZANCAN P, MOURÃO PAS. 2004. Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 15: 45-54.

ANEXO



Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

1.2 Qualificação:

1.3 CNPJ/CPF: 46068425/0001-33

1.4 Endereço Completo:

1.5 CEP: 13083-970

1.6 Telefone: 19 3521-5015

1.7 Fax: 19 3521-5210

1.8 E-mail: patentes@inova.unicamp.br

continua em folha anexa

2. Natureza:

Invenção

Modelo de Utilidade

Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

"COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO CONDROITIN SULFATO FUCOSILADO (FUCCS) PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA CEREBRAL E GESTACIONAL E SEU USO".

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N°

Data de Depósito:

5. Prioridade:

interna

unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: FABIO TRINDADE MARANHÃO COSTA

6.2 Qualificação: BRAS,SOLT,PROF.UNIVERSITÁRIO

6.3 CPF: 573.444.341-72

6.4 Endereço completo: R. VISCONDE DE PIRAJÁ, 358, BAIRRO SAN CONRADO, EM CAMPINAS - SP

6.5 CEP: 13104-186

6.6 Telefone: 19 3521-6594

6.7 Fax:

6.8 E-Mail: costafm@unicamp.br

continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: FERNANDA LAVRAS COSTALLAT SILVADO

9.2 CNPJ/CPF: 295.166.068-57

9.3 API/OAB: 210.899

9.4 Endereço completo: Procuradoria Geral da UNICAMP - Cidade Universitária "Zeferino Vaz"

9.5 CEP: 13083-970

9.6 Telefone: 19 3521-4771

9.7 Fax: 19 3289-4245

9.8 E-Mail: proc-geral@pg.unicamp.br

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.

Listagem de seqüências em formato impresso: fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	12 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	1 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	4 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar)				fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 20 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Campinas, SP, em 22.06.2010

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Fernanda Lavras Costallat Silvado
Procuradora de Universidade Subchefe
Metrícula nº 28.574-2
OAB/SP nº 210.899

1 Continuação dos dados do interessado:

1.1 Qualificação: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP, pessoa jurídica de direito público, autarquia estadual devidamente inscrita no CNPJ sob nº 46.068.425/0001-33 e isenta de inscrição estadual.

1.4 Endereço completo: Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Distrito de Barão Geraldo, em Campinas – SP – CEP 13083-970

6. Dados dos outros 06 inventores:

6.1 Nome: **MARCELE FONTENELLE BASTOS**

6.2 Qualificação: brasileira, solteira, bióloga

6.3 CPF nº 025.372.235-78

6.4 Endereço completo: Rua Condessa do Pinhal, 440,
Bairro Cidade Universitária I, em Campinas - SP

6.5 CEP: 13083-280

6.6 Telefone: (19) 3521.6288

6.7 FAX:

6.8 E-Mail: celefontenelle@gmail.com

6.1 Nome: **CLÁUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK**

6.2 Qualificação: brasileiro, casado, nutricionista

6.3 CPF nº 918.687.937-53

6.4 Endereço completo: Rua Iracema Salani Palazzo, 229, Parque
das Universidades, em Campinas - SP

6.5 CEP: 13086-000

6.6 Telefone: (19) 3521.6713

6.7 FAX: (19) 3521.6129

6.8 E-Mail: cwerneck@unicamp.br

6.1 Nome: **CRISTINA PONTES VICENTE**

6.2 Qualificação: brasileira, casada, bióloga

6.3 CPF nº 803.888.257-15

6.4 Endereço completo: Rua Charles Darwin, s/n, Bloco N,
1º andar, Distrito de Barão Geraldo, em Campinas - SP

6.5 CEP: 13083-863

6.6 Telefone: (19) 3521.6106

6.7 FAX:

6.8 E-Mail: cvicente@unicamp.br

6.1 Nome: **PAULO ANTONIO DE SOUZA MOURÃO**

6.2 Qualificação: brasileiro, solteiro, professor universitário

6.3 CPF nº 539.846.338-15

6.4 Endereço completo: Rua João Afonso, 60, Casa 18,
Bairro Humaitá, no Rio de Janeiro - RJ

6.5 CEP: 22261-040

6.6 Telefone: (21) 2266.7601

6.7 FAX: (21) 2562.2090

6.8 E-Mail: pmourao@hucff.ufrj.br

6.1 Nome: **MAURO SÉRGIO GONÇALVES PAVÃO**

6.2 Qualificação: brasileiro, casado, professor associado

6.3 CPF nº 793.866.527-49

6.4 Endereço completo: Rua Voluntários da Pátria, 98,
apto. 301, Bairro do Botafogo, no Rio de Janeiro - RJ

6.5 CEP: 22270-010

6.6 Telefone: (21) 2537.3256

6.7 FAX: (21) 2562.2093

6.8 E-Mail: mpavao@hucff.ufrj.br

6.1 Nome: **YARA CAROLLO BLANCO**

6.2 Qualificação: brasileira, casada, bióloga

6.3 CPF nº 222.473.228-75

6.4 Endereço completo: Rua Sempre Viva, 394, Jd. Nielsen
Ville, em Americana - SP

6.5 CEP: 13467-240

6.6 Telefone: (19) 3521.6288

6.7 FAX:

6.8 E-Mail: blancoyc@unicamp.br

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO CONDROITIN SULFATO FUCOSILADO (FucCS) PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA CEREBRAL E GESTACIONAL E SEU USO”.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere ao uso do condroitin sulfato fucosilado (FucCS) extraída do pepino do mar *Ludwigothurea grisea*, na inibição da citoaderência de *Plasmodium falciparum* a receptores endoteliais, processo importante na patogênese da malária grave, e no bloqueio a atividade inflamatória associada à doença.

Nesse sentido, esse composto é indicado para uso na área da saúde humana,
10 para elaboração de medicamentos com aplicação como terapia complementar e/ou prevenindo as formas graves da malária (malária cerebral e gestacional)

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A malária apresenta elevados índices de mortalidade e morbidade. Estima-se
15 que 200-300 milhões de infecções ocorram por ano (de Souza e col., *Parasitology* 23:1-18 (2009)), sendo a maioria referente a infecções por *Plasmodium falciparum*; as quais podem evoluir para as formas graves da doença; tais como; malária gestacional (MG) e malária cerebral (MC). Anualmente ocorrem cerca 1,5 a 2,7 milhões de mortes, sendo que 80% delas na África subsaariana, acometendo principalmente crianças e
20 mulheres grávidas (Hay e col. *Lancet. Infec. Dis* 4:327-336. (2004)). Nos últimos anos, além do aparecimento de novas áreas de transmissão, o número de casos de malária e a mortalidade associada vêm aumentando nos países endêmicos, devido à falta de uma vacina eficiente e ao aumento da resistência de parasitas e dos mosquitos vetores, respectivamente, às drogas e aos inseticidas convencionalmente utilizados
25 (Moorthy e col., *Lancet.* 363:150-156 (2004)).

Atualmente, pacientes com malária cerebral são tratados com antimaláricos, como o quinino e artemisininas combinados com outros antimaláricos para prevenir a resistência. Apesar disso, esta condição está associada a uma mortalidade de 15-20%, e uma porção substancial de indivíduos com MC desenvolve seqüelas
30 neurocognitivas (revisado por Mishra & Newton, *Nat. Rev. Neurol.* 5(4):189-98 (2009)). Tendo em vista o fato de que as drogas antimaláricas freqüentemente demoram pelo menos 12-18h para matar os parasitas, a administração de terapias complementares nesse intervalo de tempo deve reduzir o risco de mortalidade e de seqüelas nos

pacientes (revisado por Mishra & Newton, *Nat. Rev. Neurol.* 5(4):189-98 (2009)). Muitos agentes têm sido testados, mas nenhum demonstrou evidência inequívoca de melhora nos testes clínicos. Conseqüentemente, nenhum deles pôde ser recomendado como parte da estratégia de tratamento até o presente. Pode-se citar

5 diversos desses agentes como corticosteróides de ação antiinflamatória, desferrioxamina (quelante de ferro), glicosaminoglicanos (heparina, condroitin sulfato), levamisole, peptídeos recombinantes, que interferem na citoaderência, albumina, entre outros (revisado por Mishra & Newton, *Nat. Rev. Neurol.* 5(4):189-98 (2009)).

O processo de citoadesão de eritrócitos infectados (EI) no endotélio vascular

10 de vários órgãos é alvo de diversos estudos, particularmente no cérebro e na placenta, e apresenta importante papel na patogênese da malária grave (revisado por Mackintosh e col., *Trends in Parasitology.* 20: 597-603 (2004)). Sabe-se que esta adesão ocorre devido à capacidade dos EI de se ligarem a diferentes receptores expressos na superfície das células endoteliais como CD36, VCAM-1, CSA e ICAM-1,

15 sendo que os dois últimos parecem ser os principais receptores envolvidos na patogênese da malária gestacional e cerebral respectivamente, e se ligarem a outras EI e a hemácias sadias formando rosetas. (revisado por Mackintosh e col., *Trends in Parasitology.* 20: 597-603 (2004)).

Diante da importância da citoaderência na patogênese da malária grave,

20 acredita-se que o uso de terapias anti-adesivas poderia não apenas reverter a seqüestração parasitária, mais também prevenir o agravamento da doença, minimizando as complicações causadas pelo *P. falciparum* (Land e col., *Parasitology Today* 11: 19-23 (1995)). Sendo assim, a busca por agentes anti-adesivos é contínua, e envolve em muitos casos, o uso de polissacarídeos sulfatados, que são

25 macromoléculas conhecidas por apresentarem um amplo espectro de importantes propriedades biológicas, e estão espalhados na natureza, ocorrendo em uma grande variedade de organismos, de algas e invertebrados marinhos até mamíferos (Biermann e col. *Evol. Dev.* 6: 353-61 (2004), Caterson e col. *J. Cell Sci.* 97:411-7 (1990)).

A partir dessa perspectiva, estudos mostraram que a heparina é capaz de inibir

30 a citoadesão parasitária e a reinvasão de eritrócitos pelos merozoítos, além de contribuir para o rompimento de rosetas (Vogt e col., *PLoS Pathog.* 2(9):e100 (2006)). Nesse sentido, a heparina foi utilizada no passado no tratamento da malária grave com algum sucesso nos resultados (Smitskamp & Wolthuis, *Br. Med. J.*

27;1(5751):714-6 (1971)), porém seu uso foi desencorajado, tendo em vista a ocorrência de sérios efeitos colaterais, como forte hemorragia (WHO, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94(Suppl. 1): S1-S90. (2000)). Assim, sabendo-se que a heparina foi o único glicoconjugado sulfatado usado clinicamente na malária grave (Munir e col., *Paediatr. Indones.* 20(1-2):47-50. (1980)), estudo recente mostrou que novos glicosaminoglicanos (dGAGs) gerados da despolimerização da heparina, apresentam, assim como esta, efeito na adesão parasitária, porém com menor atividade anticoagulante (Vogt e col., *PLoS Pathog.* 2(9):e100 (2006)). Além disso, o uso de heparina fracionada, com menor ação anticoagulante do que a normal, apresenta efeito na inibição da invasão de merozoítos e na formação de rosetas (Birgitta e col., US 5472953 (1995)). Apesar desses efeitos, esses compostos necessitam de modificações química e/ou fracionamento, e sendo derivado de mamíferos, o risco de contaminação por agentes patogênicos ainda é um problema, o que não ocorre com o composto descrito na presente invenção.

Ainda nesse contexto, outros glicoconjugados sulfatados têm demonstrado inibir a invasão de eritrócitos por merozoítos e interferir na adesão e na formação de rosetas (Butcher e col., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82(4):558-9 (1988); Rowe e col., *Exp. Parasitol.* 79:506-516 (1994), Xiao e col., *Infect Immun.* 64(4):1373-8 (1996)). Dentre eles, pode-se citar o heparan sulfato, fucoidan e dextran sulfato, que apesar desses efeitos, apresentam forte ação anticoagulante e/ou alta toxicidade (Rowe e col., *Exp. Parasitol.* 79:506-516 (1994); Vogt e col., *PLoS Pathog.* 2(9):e100 (2006); Kyriacou e col., *Antimicrob. Agents chemothe.* 51, 4: 1321-1326 (2007)). Outro glicoconjugado, o curdlan sulfato, tem demonstrado efeitos semelhantes, porém com menor efeito anticoagulante (Kyriacou e col., *Antimicrob. Agents chemothe.* 51,4: 1321-1326 (2007)).

Assim, diante da ação desses compostos e da necessidade de novos tratamentos para malária grave, abrem-se perspectivas para o aprofundamento do estudo dos compostos citados, e para o estudo de outros compostos sulfatados com potencial para atuar de maneira eficaz e segura como terapia complementar no tratamento da malária grave.

O Condroitín sulfato fucosilado (FucCs), um polissacarídeo altamente sulfatado, extraído de pepino do mar, *Ludwigothurea grisea*, apresenta uma base estrutural de condroitín sulfato de mamífero: $[4-\beta\text{-D-GalA-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-GalNAc}]_n$, mas substituído na posição 3 dos resíduos de ácido $\beta\text{-D-glucurônico}$ com cadeias de 2-4-dissulfato α -

fucopirranose (Vieira & Mourão, *J Biol Chem* 263: 18176-83 (1988), Mourão e col., *J Biol Chem* 271: 23973-84 (1996)). O FucCS apresenta analogia em estrutura com glicosaminoglicanos de mamíferos, e tem demonstrado possuir diferentes atividades biológicas, como ação anticoagulante, devido a sua habilidade de potencializar a inibição da trombina e do fator Xa pela antitrombina e pelo cofator II da heparina, atribuída principalmente as cadeia de fucose sulfatada ligadas a condroitin sulfato (Mourão e col., *J Biol Chem* 271: 23973-84 (1996); Mourão., PIBr 9603405-0 (1998)). Este apresenta também, ação antitrombótica, atuando como uma droga antitrombótica efetiva em modelo experimental de trombose venosa e arterial quando administrada por via intravenosa em ratos (Pacheco e col., *Blood Coagulation Fibrinolysis*. 11(6):563-73 (2006); Mourão., PIBr 9603405-0 (1998)). Assim, esse composto tem demonstrado possuir muitas vantagens em relação aos anticoagulantes conhecidos, como a heparina, pois não necessita de modificações químicas, não é derivado de mamíferos, evitando o risco de contaminação por agentes patogênicos, ocorre em altas concentrações num invertebrado abundante (Glauser e col., *Thromb Haemost.* 100(3):420-8 (2008)), e apresenta menor risco de causar hemorragias (Borsig e col., *J. Biol. Chemst* 282: 20- 14984–14991 (2007)).

Além desses efeitos, estudo com camundongos demonstrou que o FucCS é capaz de inibir adesão de células tumorais a P- e L-selectina com maior potência do que a heparina, sem exibir efeito hemorrágico significativo e em doses inferiores ao requerido para causar efeito anticoagulante. Assim, o FucCS é capaz de bloquear metástase tumoral e reduzir o processo inflamatório diminuindo o recrutamento de neutrófilos sem os indesejáveis efeitos colaterais causados pela heparina (Borsig e col., *J. Biol. Chemst* 282: 20- 14984–14991 (2007)).

Também, o uso de frações e extratos de pepino do mar vem sendo testados para diferentes tratamentos. Dentre estes, pode-se citar o uso de frações de várias porções de pepino-do-mar e de diferentes espécies na inibição da angiogênese e vascularização (Collin., US 5985330 (1999)), e também na inibição do complemento, que pode ser aplicado no estudo e tratamento de doenças inflamatórias (Collin., US 5989592 (1999)). Além disso, o uso de extratos variados de pepino do mar e de chá-verde com diferentes princípios ativos têm sido testados no tratamento ou prevenção de doenças cardiovasculares (Tilson e Collin., WO 053184 (2006)). Assim, esses inventos apresentam aplicações diferenciadas da presente invenção, que é indicada para uso no tratamento e prevenção da malária grave e, diferente destas, utiliza um

composto isolado da parede do pepino do mar e não frações e extratos com diferentes compostos ativos.

Dessa maneira, diante de todo estado da técnica a presente invenção traz vantajosamente uma proposta de uso de um composto químico denominado condroitin sulfato fucosilado no tratamento e prevenção da malária grave, que diferente de outros compostos que vêm sendo testados, não necessita de modificações químicas e fracionamentos após sua purificação, não é derivado de mamíferos, evitando o risco de contaminação por agentes patogênicos, ocorre em altas concentrações em um invertebrado abundante, apresenta menor risco de causar hemorragias, e age em concentrações inferiores as necessárias para ativar seu efeito anticoagulante.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao uso do composto químico condroitin sulfato fucosilado (FucCS) extraído do pepino do mar *Ludwigothurea grisea*, como principal componente para elaboração de medicamentos com aplicação como terapia complementar e/ou prevenindo as formas graves da malária (malária cerebral e gestacional), atuando na inibição do processo de citoadesão parasitária em receptores endoteliais e no processo inflamatório associado a doença. Mais precisamente, a presente invenção está baseada nas propriedades anti-adesivas descritas para diversos glicoconjugados sulfatados, principalmente contra *P. falciparum*, e nas propriedades antiinflamatórias do FucCS.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do condroitin sulfato fucosilado (FucCS) de pepino-do-mar. O composto é formado por unidades dissacarídicas repetitivas alternadas de ácido- β -D-glucurônico e de N-acetil- β -D-galactosamina. Alguns resíduos de ácido- β -D-glucurônico apresentam cadeias de 2-4-dissulfato α -fucopiranosose na posição 3, ou são 3-O-sulfatados (R1). A maioria das N-acetil- β -D-galactosamina são sulfatadas na posição 6 (R2).

Figura 2: Efeito do FucCS na malária cerebral experimental: Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 (n=8 para cada grupo) infectados com 10^6 EI de *P. berghei* ANKA (PbA) e tratados diariamente (dia 3-6 pós-infecção) com injeção intravenosa (i.v.) de 1 mg/Kg de FucCS ou com solução salina (controle). $P < 0,050$ (Log-rank test, grupo FucCS vs controle).

Figura 3: Inibição da adesão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* monofenotipo (PfeI^{CSA}) em células HLEC. PfeI^{CSA}, (5×10^4 /poço) foram deixados aderir a monocamada de células HLEC durante 1h a 37 °C, na ausência, ou na presença de anti-CD36 (5µg/mL), condroitinase ABC (0,5U/mL), CSA (100µg/mL), ou diferentes concentrações de FucCS ou heparina. Após este período, os eritrócitos não aderidos foram removidos por meio de extensivas lavagens e os EI aderidos foram contados. Resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle negativo e como a média de 4 poços \pm desvio padrão. (*) $P < 0,05$ (ANOVA 1 critério: grupo FucCS vs. Heparina).

Figura 4: Inibição da adesão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* monofenotípico (PfeI^{ICAM}) em células HLEC. PfeI^{ICAM}, (5×10^4 /poço) foram deixados aderir a monocamada de células HLEC durante 1h a 37 °C, na ausência, ou na presença de anti-CD36 (5µg/mL), condroitinase ABC, CSA (100µg/mL), ou diferentes concentrações de FucCS ou heparina. Após este período, os eritrócitos não aderidos foram removidos por meio de extensivas lavagens e os EI aderidos foram contados. Resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle negativo e como a média de 4 poços \pm desvio padrão.

Figura 5: Inibição da adesão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* monofenotípico (PfeI^{CD36}) em células HLEC. PfeI^{CD36}, (5×10^4 /poço) foram deixados aderir a monocamada de células HLEC durante 1h a 37 °C, na ausência, ou na presença de anti-CD36 (5µg/mL), condroitinase ABC, CSA (100µg/mL), ou diferentes concentrações de FucCS ou heparina. Após este período, os eritrócitos não aderidos foram removidos por meio de extensivas lavagens e os EI aderidos foram contados. Resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle negativo e como a média de 4 poços \pm desvio padrão.

Figura 6: Inibição da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* monofenotípico (PfeI^{CSA}) por diferentes GAGs. PfeI^{CSA} no estágio de trofozoito maduro, com parasitemia e hematócrito de 4%, foram incubados com concentrações crescentes de FucCS, Heparina ou CSA; FucCS defucosilada (100µg/mL) ou decarboxilada (100µg/mL), ou meio RPMI (controle), a 37°C por 24-30h. A porcentagem de parasitemia foi determinada como sendo o número de EI em 1.000 eritrócitos e os resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle. (*) P< 0,05 (ANOVA 1 critério : FucCS vs. deFucCS e FucCS vs. CRFucCS).

Figura 7: Inibição da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* monofenotípico (PfeI^{ICAM}) por diferentes GAGs. PfeI^{ICAM} no estágio de trofozoito maduro, com parasitemia e hematócrito de 4%, foram incubados com concentrações crescentes de FucCS, Heparina ou CSA; FucCS defucosilada (100µg/mL) ou decarboxilada (100µg/mL), ou meio RPMI (controle), a 37°C por 24-30h. A porcentagem de parasitemia foi determinada como sendo o número de EI em 1.000 eritrócitos e os resultados são expressos como porcentagem em relação ao controle. (*) P< 0,05 (ANOVA 1 critério : FucCS vs. deFucCS e FucCS vs. CRFucCS).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção trata-se do uso do composto químico condroitin sulfato fucosilado (FucCS) extraído do pepino do mar *Ludwigothurea grisea*, como principal componente para elaboração de medicamentos com aplicação na área da saúde humana, como terapia complementar e/ou prevenindo as formas graves da malária (malária cerebral e gestacional), atuando na inibição do processo de citoadesão parasitária em receptores endoteliais e no processo inflamatório associado a doença.

Condroitin Sulfato Fucosilado (FucCS) nativo e quimicamente modificado

O FucCS nativo foi extraído do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea*, coletado fresco da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. A extração, preparação, purificação e caracterização deste polissacarídeo nativo, defucosilado e decarboxilado, são processos conhecidos do estado da técnica e foram realizados como anteriormente descrito por Mourão *et al.* (1996).

O FucCS é um polissacarídeo altamente sulfatado (Figura 1) e apresenta uma base estrutural de condroitin sulfato de mamífero: $[4\text{-}\beta\text{-D-GalA-1}\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-GalNAc}]_n$, mas substituído na posição 3 dos resíduos de ácido β -D-glucurônico com cadeias de fucose sulfatada, 3-O-sulfatado, ou um grupo OH. Essas cadeias de fucose são fundamentais para importantes efeitos biológicos do FucCS, como sua ação antitrombótica e anticoagulante, e também seu efeito anti-inflamatório *in vitro*, sendo assim um grande diferencial desse composto.

Células e Parasitas utilizados nos ensaios *in vitro*:

Nos ensaios *in vitro* foram utilizadas células endoteliais do pulmão humano (HLEC), cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 30 $\mu\text{g/mL}$ fator de crescimento de células endoteliais (ECGS) e 10% de soro fetal bovino. Foram também utilizadas células de ovário de hamster (CHO), cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em incubadora com pressão constante de 5% de CO_2 e 37°C.

Nesses ensaios utilizamos parasitas *P. falciparum* FCR3, selecionados para adesão exclusiva (monofenotípicos) à condroitin sulfato A (CSA), ICAM e CD36, sendo a seleção feita por *panning*. Os parasitas foram cultivados em meio RPMI completo (RPMI – Sigma, USA), suplementado com 10% de plasma humano através do método de *candle jar* (Trager & Jansen, 1976). O hematócrito final foi ajustado a 4% com eritrócitos sadios O^+ fornecidos pelo Hemocentro da UNICAMP. A parasitemia foi monitorada diariamente por meio de esfregaços.

Enriquecimento de estágios trofozoítas da cultura de *P. falciparum* (*in vitro*).

O enriquecimento das formas maduras foi realizado utilizando-se 2.4 volumes de Voluven™ (Frenesius) em relação ao volume do pellet de hemácias, e 1.4 volumes de meio RPMI 10% plasma. A solução foi deixada em um tubo na posição vertical, a 37°C durante 1 h. Após este período, a fase superior do gradiente, contendo as formas maduras, foi removida e lavada com meio RPMI sem plasma.

30

Seleção monofenotípica do parasita através de Panning

A técnica de Panning foi baseada no protocolo de Pouvelle *et al.* (1997) e objetivou a seleção monofenotípica do parasita. Células endoteliais CHO capazes de expressar apenas um receptor (ICAM, CD36) ou células HLEC, capazes de expressar principalmente o receptor CSA, foram crescidas até a confluência em garrafas de 75 cm³. Eritrócitos infectados com *P. falciparum* FCR3 foram enriquecidos por passagem no Voluven™, ressuspensos em meio RPMI pH 6,8 (meio de adesão) e transferidos para a garrafa contendo as células. Após incubação por 1 h a 37°C, o excesso de parasitas não aderidos foi removido por meio de lavagens com meio RPMI pH 6,8. Em seguida, foi adicionado meio RPMI pH 7,2 para liberar apenas Els ligantes a ICAM ou CD36 das células CHO-ICAM e CHO-CD36 respectivamente; ou adicionado meio RPMI pH 6,8 contendo CSA livre na concentração de 1 mg/mL para liberar apenas Els ligantes a CSA das células HLEC. Após incubação de 30 minutos, os parasitas, não mais aderidos, foram retirados da garrafa e colocados imediatamente em cultura. Este processo foi repetido por 5 vezes para aumentar a eficiência da seleção de parasitas com o fenótipo desejado.

Os exemplos mostrados a seguir não têm a intenção de limitar o escopo da invenção, mas apenas de mostrar uma das formas de concretização dentre várias possíveis.

Exemplo 1: Ação anti-adesiva do FucCS

Sabendo-se que nenhum dos compostos testados tem sido recomendado como parte da estratégia de tratamento da malária grave, a ação anti-adesiva do FucCS foi testada em relação a heparina, composto usado no passado para o tratamento da doença. Nesse sentido, células endoteliais do pulmão humano (HLEC) foram cultivadas por 48 horas, até atingirem confluência total, em lâminas para cultivo de células de oito poços com 0,69 cm² cada (*Culture Slides*, Becton & Dickinson). Parasitas *P. falciparum* FCR3^{CSA}, FCR3^{CD36} ou FCR3^{ICAM} enriquecidos por passagem no Voluven™ foram utilizados, sendo os EI ressuspensos em meio RPMI pH 6,8. A suspensão de EI foi então adicionada a cada poço (5x10⁴ EI/poço) na presença de diferentes concentrações de FucCS ou Heparina (1000, 100, 10 e 1 µg/mL); CSA (100µg/mL), anti-CD36 (5µg/mL), condroitinase ABC (0,5U/mL) ou meio RPMI (controle), e deixada aderir a 37°C durante 1 hora. Após este período, Els não aderidos foram removidos por meio de extensivas lavagens em meio RPMI pH 6,8 em condições estáticas. Em seguida, as lâminas foram coradas com o kit *Panótico Rápido*

(Laborclin) e contados com o auxílio do microscópio, e a adesão foi expressa como a média \pm desvio padrão do número de eritrócitos por mm^2 observados em 4 poços. (Costa *et al.*, 2003; Pouvelle *et al.*, 2003).

Dessa maneira, o FucCS demonstrou, assim como a heparina, possuir um potente efeito inibidor da adesão de parasitas *P. falciparum* monofenotípicos, quando comparados ao controle (Figuras 3, 4 e 5), principalmente nas doses mais altas (1000, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), onde a inibição da adesão chegou a atingir 100% (Figura 3). De maneira geral, a inibição parece ser não específica, e ocorre de maneira dose dependente. Contudo, o FucCS mostrou ser mais eficiente na inibição da citoaderência de parasitas FCR3^{CSA} em todas as doses (Figura 3), quando comparado aos outros fenótipos do parasita (Figuras 4 e 5). A heparina também demonstrou ser mais eficaz para esse fenótipo, porém o FucCS parece ser melhor nas doses mais baixas (10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 3).

15 Exemplo 2: Ensaio de inibição de reinvasão de merozoítos *in vitro*

Tendo em vista a ação de glicosaminoglicanos sulfatos na inibição da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* (Rowe *et al.*, 1994, Xiao *et al.*, 1996, Vogt, *et al.*, 2006), avaliamos a capacidade do FucCS em inibir a reinvasão de merozoítos de parasitas *P. falciparum* FCR3^{CSA} ou FCR3^{ICAM}. Para isso, foram utilizadas culturas de parasitas *P. falciparum* FCR3^{CSA} ou FCR3^{ICAM} concentradas no estágio de trofozoíto maduro com parasitemia e hematócrito de 4%. Os parasitas foram incubados em placas de 96 poços com diferentes concentrações de FucCS, CSA ou Heparina (1000, 100, 10 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); FucCS defucosilado ou decarboxilado (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ou meio RPMI (controle), a 37°C por 24-30h. Em seguida, foram feitos esfregaços de cada poço e as lâminas foram coradas com o kit *Panótico Rápido* (Laborclin), sendo a porcentagem de parasitemia determinada após contagem em microscópio óptico. Como pode ser visto nas Figuras 6 e 7, o FucCS e a heparina exibem efeito dose dependente na inibição da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* FCR3^{CSA} e FCR3^{ICAM}, além disso, o efeito desses compostos é bastante similar e eficiente, atingindo 100% de inibição nas doses mais elevadas (100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figuras 6 e 7). Em contraste, a CSA não demonstrou ter efeito inibitório significativo ($P>0,05$) na reinvasão dos merozoítos, com exceção da maior dose (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em que a inibição chegou a 33% no ensaio com FCR3^{CSA} (Figura 6) e 61% quando realizado com FCR3^{ICAM} (Figura 7), possivelmente devido ao excesso do composto no meio. É interessante observar que a CRFucCS

apesar de inibir a reinvasão de merozoítos de maneira significativamente menor ($P < 0,05$) que a FucCS, ainda mantém uma inibição elevada, sendo esta 66% para parasitas FCR3^{ICAM} (Figura 7) e 44% para o FCR3^{CSA} (Figura 6). Em contraste, o deFucCS, em ambos os casos, não é capaz de inibir essa reinvasão de maneira eficiente, exibindo valores de inibição bem baixos (0,3% de inibição para o FCR3^{ICAM} e 8,9% de inibição para o FCR3^{CSA}) (Figuras 6 e 7).

Assim, embora o mecanismo envolvido na inibição da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* pelo FucCS não esteja claro, esses resultados evidenciam que a presença da cadeia extra de fucose sulfatada é essencial para que o processo inibitório ocorra. De fato, o processo de inibição da citoadesão parasitária e da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* parece não ser específico do fenótipo adesivo parasitário, pois o efeito inibitório pode ser observado para Els *paneados* em diferentes receptores endoteliais. É possível, que esse efeito seja resultado de interações eletrostáticas em vez de uma consequência direta na estrutura dos receptores de citoaderência.

Exemplo 3: Efeito protetor do FucCS na mortalidade *in vivo*

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 (7 a 10 semanas), provenientes do Centro de Bioterismo-UNICAMP (CEMIB), que foram mantidos em condições *Germ Free* em nossa rack ventilada da AlescoTM. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNICAMP (protocolo nº1807-1).

A avaliação do efeito protetor do FucCS na mortalidade foi realizada no modelo experimental de malária cerebral, onde grupos de 8-10 animais (C57BL/6) foram infectados intraperiotenealmente (i.p.) com 10⁶ eritrócitos infectados (EI) com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), linhagem capaz de induzir malária cerebral. Os sinais neurológicos de malária cerebral (CM) foram monitorados diariamente, sendo que a incidência de CM foi calculada através da porcentagem de camundongos que desenvolveram esses sinais. Os animais infectados foram tratados com dose única de FucCS intravenoso (i.v) pela cauda, diariamente (dias 3-6 pós-infecção), e o controle com solução salina, sendo a parasitemia determinada diariamente por meio de esfregaços de sangue obtidos da cauda dos animais a partir do 4º dia pós-infecção até a morte do animal ou até fase crônica da doença. Os esfregaços foram fixados e corados, e a porcentagem de parasitemia foi determinada como sendo o número de EI

em 1.000 eritrócitos. Os resultados obtidos a partir da observação da mortalidade revelaram uma melhora significativa na sobrevivência dos animais tratados, evidenciando um retardo na morte destes animais, quando comparados aos não tratados (Figura 2).

5 Por fim, não foram observados efeitos citotóxicos em hemácias humanas infectadas incubadas com FucCS e as doses de FucCS testadas *in vivo* e *in vitro* são bem inferiores as necessárias para ativar seu efeito anticoagulante, o que reduz o risco de ocorrência de efeitos colaterais como hemorragias causadas pela heparina.

10 Assim, diante do exposto acima, é importante ressaltar, que o potente efeito inibitório do FucCS no processo de citoadesão parasitária e sua ação na malária cerebral murina estão evidenciados no fato deste composto não necessitar de fracionamento e/ou modificações químicas após sua purificação, não ser derivado de mamíferos, evitando o risco de contaminação por agentes patogênicos, ocorrer em altas concentrações num invertebrado abundante, apresentar menor risco de causar
15 hemorragias, agir em concentrações inferiores as necessárias para ativar seu efeito anticoagulante e ainda, não exibir efeitos citotóxicos em hemácias infectadas *in vitro*.

A invenção aqui descrita não está limitada a essa concretização e, aqueles com habilidade na técnica irão perceber que, qualquer característica particular nela introduzida, deve ser entendida apenas como algo que foi descrito para facilitar a
20 compreensão e não podem ser realizadas sem se afastar do conceito inventivo descrito. As características limitantes do objeto da presente invenção estão relacionadas às reivindicações que fazem parte do presente relatório.

25

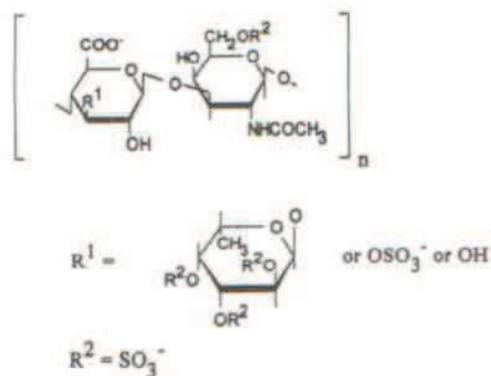
30

REIVINDICAÇÕES

1. Uso do composto químico condroitin sulfato fucosilado **caracterizado por** ser o principal componente na elaboração de medicamentos com aplicação na terapia complementar e/ou prevenindo as formas graves da malária.

2. Composição farmacêutica **caraterizada por** compreender condroitin sulfato fucosilado e um veículo farmacêuticamente aceitável.

3. Composição medicamentosa para tratamento complementar e/ou na prevenção das formas graves da malária **caracterizado por** compreender a seguinte estrutura molecular:



onde R1 pode ser uma cadeia de fucose sulfatada, 3-O-sulfatado, ou um grupo OH e R2 corresponde a sulfatação na posição 6 da N-acetil- β -D-galactosamina.

4. Composição farmacêutica **caracterizado por** compreender condroitin sulfato fucosilado e ser utilizada na elaboração de medicamentos com aplicação na terapia complementar e/ou prevenindo as formas graves da malária.

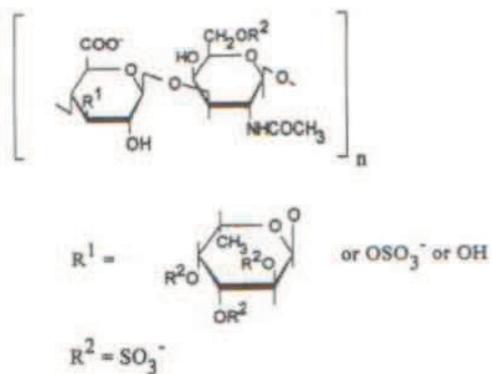


Figura 1

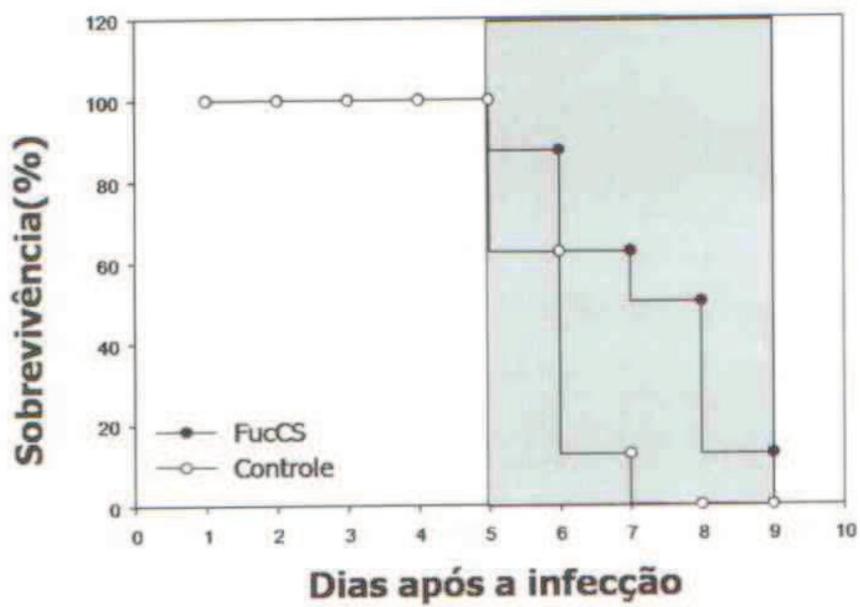


Figura 2

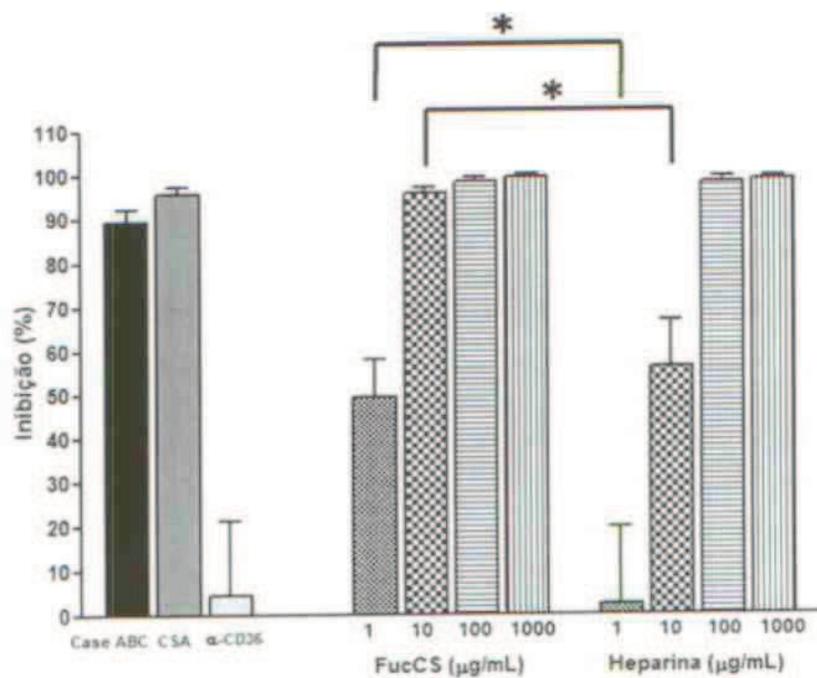


Figura 3

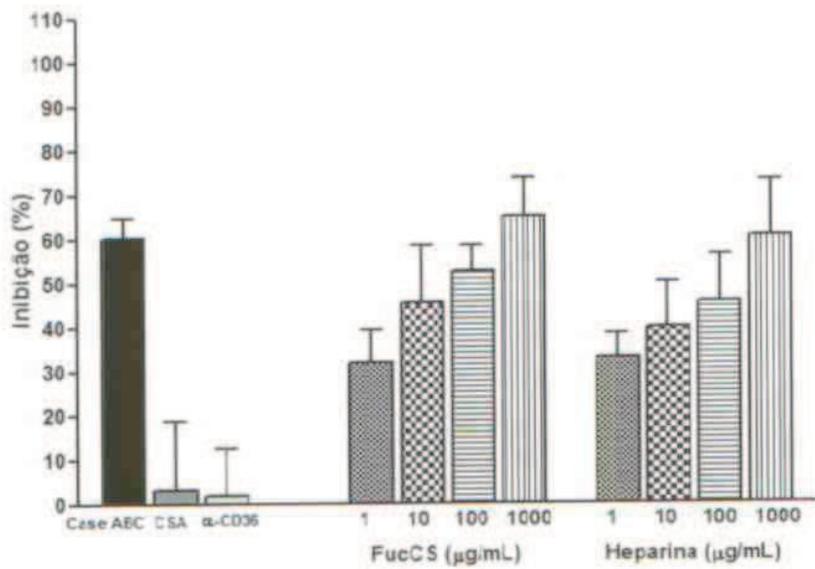


Figura 4

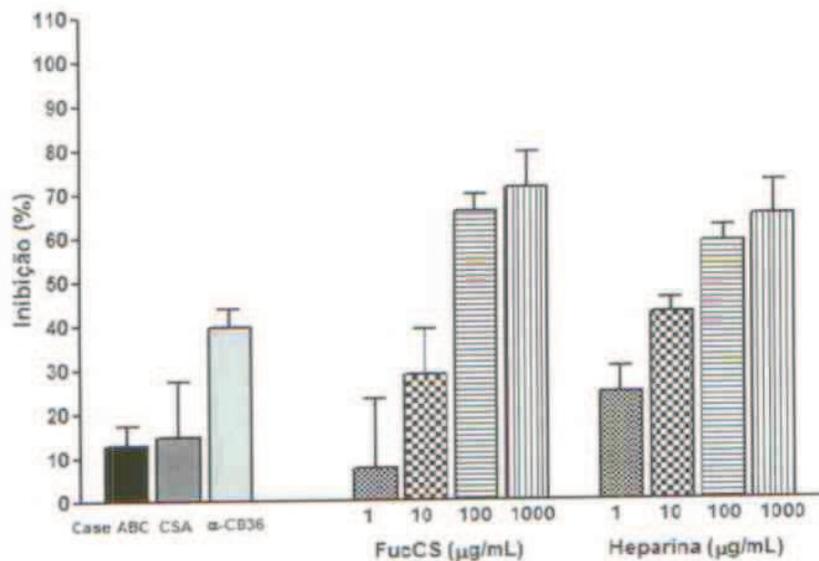


Figura 5

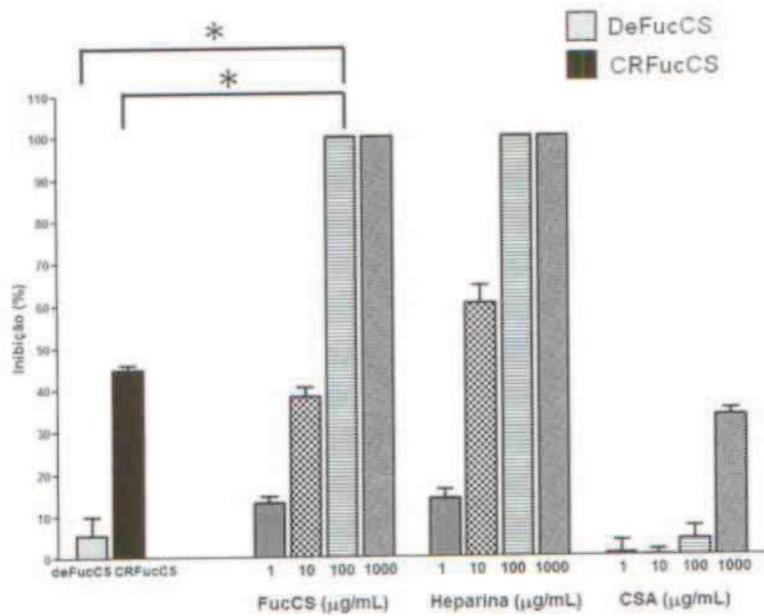


Figura 6

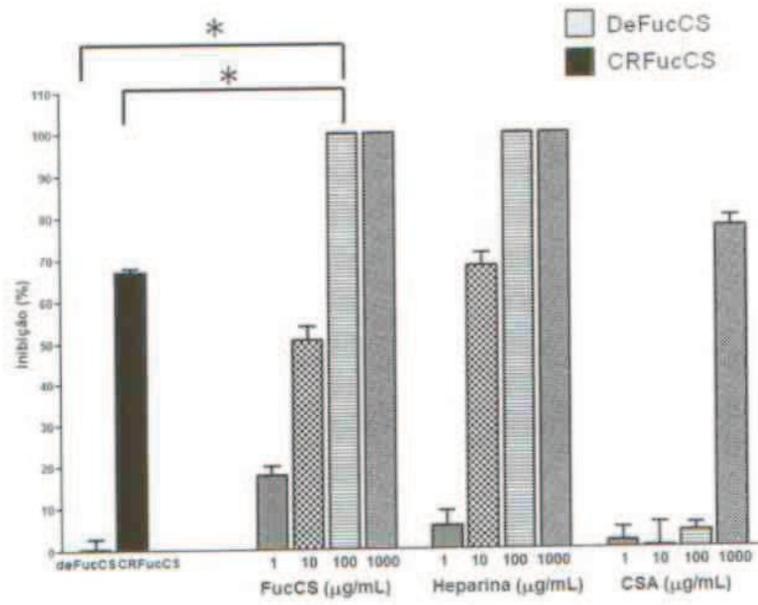


Figura 7

RESUMO

"COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO CONDROITIN SULFATO FUCOSILADO (FucCS) PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA CEREBRAL E GESTACIONAL E SEU USO."

5 A presente invenção se refere ao uso do composto químico condroitin sulfato fucosilado (FucCS) extraído do pepino do mar *Ludwigothurea grisea*, como principal componente para elaboração de medicamentos com aplicação como terapia complementar e/ou prevenindo as formas graves da malária (malária cerebral e gestacional), atuando na inibição do processo de citoadesão parasitária em receptores
10 endoteliais e no processo inflamatório associado a doença. Mais precisamente, a presente invenção está baseada nas propriedades anti-adesivas descritas para diversos glicoconjugados sulfatados, principalmente contra *P. falciparum*, e nas propriedades antiinflamatórias do FucCS.

15