

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



YARA CAROLLO BLANCO

**“ANÁLISE DOS MECANISMOS PROTETORES
DESENCADEADOS PELA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA
NA MALÁRIA CEREBRAL”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>YARA CAROLLO BLANCO</u> <u>[Handwritten Signature]</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Campinas, 23 fevereiro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B598a Blanco, Yara Carollo, 1980-
Análise dos mecanismos protetores desencadeados
pela oxigenação hiperbárica na malária cerebral / Yara
Carollo Blanco. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Oxigenação hiperbárica. 2. Malária cerebral. 3.
Plasmodium. 4. Neuroproteção. I. Costa, Fabio
Trindade Maranhão, 1972-. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of protective mechanisms triggered by hyperbaric oxygenation in cerebral malaria

Palavras-chave em Inglês:

Hyperbaric oxygenation

Cerebral malaria

Plasmodium

Neuroprotection

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Doutor em Parasitologia

Banca examinadora:

Fabio Trindade Maranhão Costa [Orientador]

Claudio Chrysostomo Werneck

Selma Giorgio

Norinne Lacerda Queiroz

Karin Kirchgatter

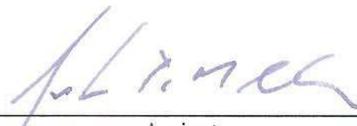
Data da defesa: 23-02-2012

Programa de Pós Graduação: Parasitologia

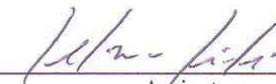
Campinas, 23. de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr . .Fabio Trindade Maranhão Costa (Orientador)


Assinatura

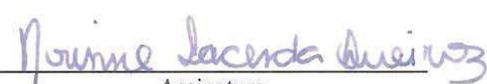
Profa. Dra. Selma Giorgio


Assinatura

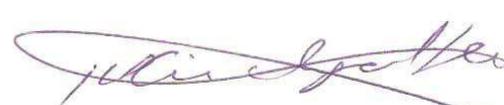
Prof. Dr .Claudio Crhysostomo Werneck


Assinatura

Profa. Dra . Norinne Lacerda Queiroz


Assinatura

Profa. Dra . Karin Kirchgatter


Assinatura

Prof. Dr . Alessandro dos Santos Farias

Assinatura

Prof. Dr Gehard Wundelinch

Assinatura

Prof. Dr. Ronei Mamoni

Assinatura

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

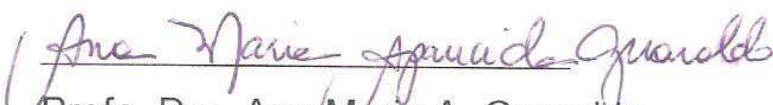
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2200-1, sobre "Efeito da HBO e de glicosaminoglicanos na microcirculação e na formação de trombo", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa / Yara Carollo Blanco, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 09 de agosto de 2010.

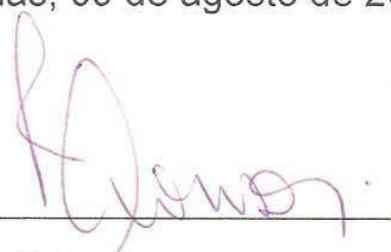
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2200-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 9, 2010.

Campinas, 09 de agosto de 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese

Ao meu marido Thiago,

*Pelo apoio, pelo amor, pelo companheirismo
Por me fazer feliz e fazer parte dos momentos
mais felizes da minha vida*

À minha filha Ana Luiza,

*Por ser a pessoa mais importante da minha vida,
Por ser parte de mim e de minha vida
Pelo amor e pela sua simples existência*

Amo vocês !!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fabio Costa pela orientação e dedicação, por acreditar no meu trabalho e permitir que ele tenha se realizado.

À professora Dr. Selma Giorgio, por permitir que este trabalho se realizasse, pelas sugestões, pelo apoio, e pela motivação.

Aos professores Dr. Claudio Marinho, Dra. Sabrina Epiphany e Dra. Rosa Elias por tornar possível parte desse trabalho.

Aos professores Dr. Claudio Werneck e Dra. Cristina Vicente por colaborarem na realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção, sugestões e correções.

À meus pais por terem me dado a vida, por seu amor, carinho e dedicação por possibilitarem tudo o que tenho e o que sou hoje.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração e felicidade que trazem à minha vida, em especial aos meus eternos e melhores amigos Leandro e Fred.

À meu irmão, meu amigo e compadre. Muito obrigada por seu apoio, por seu carinho, pela sua atenção e pela dedicação e amor à sua sobrinha/ afilhada.

As companheiras de laboratório: Carol, Juliana, Stefanie, Marcele, Bruna, Laura e Wanessa pelas discussões; pelos momentos de descontração, risadas e almoços no bandeirão. Em especial à Carol, Juliana, Stefanie e Marcele pela amizade e pelas inúmeras vezes que me ajudaram nos experimentos. Vou sentir falta desta convivência e da nossa amizade.

À Marcele por me ajudar na finalização deste trabalho e dar continuidade a ele.

À todas as pessoas que me ajudaram no desenvolvimento de minha tese, em especial ao Msc. André Vieira, a Dra. Adriana Degrossoli, ao Dr. Alessandro Farias e ao Dr. Ronei Mamoni

À todos os participantes do Seminário Laveran & Deane no ano de 2008, pelas sugestões, críticas e pelas discussões que me fizeram crescer como pesquisadora.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), à CAPES e ao Departamento de Parasitologia (IB), por possibilitarem a realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Parasitologia, pelas aulas, pelo apoio, críticas e sugestões.

RESUMO

A Malária é a principal doença parasitária do mundo, infectando 300-500 milhões de pessoas e levando ao óbito cerca de 1 milhão de indivíduos anualmente. As infecções maláricas geralmente não apresentam complicações, no entanto, infecções por *Plasmodium falciparum* podem se desenvolver em formas graves da doença, como a malária cerebral.

A malária cerebral é considerada uma síndrome multifatorial, envolvendo a citoadesão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (EIPf) através de diferentes receptores como CD36, ICAM-1, VCAM, P-selectina e E-selectina, sendo o ICAM-1 apontado como o principal receptor. Varias evidências sugerem ainda que o desbalanço da resposta imune do hospedeiro, a ativação endotelial e alterações na cascata de coagulação desempenham papel importante na patogênese da MC. Além disso, outros fatores como a presença de heme livre e NOS também tem sido apontados como essenciais para o desenvolvimento da MC

A oxigenação hiperbárica (HBO) tem sido amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos patogênicos, na prevenção de numerosas desordens neurológicas incluindo isquemia cerebral. Estudos demonstram que a exposição à HBO é capaz de reduzir o processo inflamatório e a expressão de ICAM-1, além de promover melhoras no fluxo sanguíneo, aumentando assim o fornecimento de oxigênio.

A exposição ao oxigênio hiperbárico demonstrou-se benéfico no tratamento da malária cerebral murina, sendo capaz de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ , além de promover redução na migração de linfócitos T e impedindo a quebra da barreira hemato-encefálica e consequentemente a redução dos sintomas e o aumento na sobrevivência. A exposição HBO foi capaz ainda de reduzir a expressão de ICAM-1 no cérebro de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), e em células endoteliais de pulmão humano (HLEC) e de cérebro de macacos *Saimiri* (SBEC). Além disso, o oxigênio hiperbárico promoveu o aumento da expressão de e-NOS e n-NOS no cérebro dos

camundongos infectados com PbA e a redução de heme total e oxLDL no plasma desses animais promovendo uma redução no estresse oxidativo.

Dessa maneira, os dados aqui apresentados abrem novas perspectivas no tratamento da malária cerebral, podendo à HBO ser utilizado como terapia principal ou como adjuvante de no tratamento antimalárico ou, até mesmo, associada a drogas neuroprotetoras e anti-inflamatórias já utilizadas no tratamento contra MC.

ABSTRACT

Malaria still is a major parasitic disease in the world, infecting 300-500 million people and leading to death about 1 million people annually. Usually malaria infections do not lead to complications, however some infections, mainly, by *Plasmodium falciparum* can evolve into severe forms of disease such as cerebral malaria (CM). CM is considered a multifactorial syndrome involving cytoadhesion of *P. falciparum*-infected erythrocytes (PfEI) to different host receptors such as CD36, VCAM, P-selectin and E-selectin and ICAM-1, which is considered the main receptor involved in MC.

A large body of evidences suggests that the imbalance of the host immune response, endothelial activation and changes in the coagulation cascade play an important role in the pathogenesis of CM. Moreover, of free heme, and NOS has also been identified as essential for the development of CM. The hyperbaric oxygenation (HBO) has been widely used as a microbicide and to prevent numerous neurological disorders, including cerebral ischemia. Studies demonstrate that exposure to HBO is able to reduce the expression of ICAM-1, and to improve blood flow circulation, therefore increasing the oxygen supply.

Administration of hyperbaric oxygen proved to be beneficial in the treatment of murine cerebral malaria, being able to reduce the expression of TNF- α and IFN- γ , and to promote a reduction in migration of T lymphocytes, preventing breakdown of the blood-brain barrier and, consequently, the reduction of clinical signs and increased survival. In addition, HBO was able to reduce the expression of ICAM-1 in the brain of PbA infected mice, and in the surface of pulmonary and cerebral endothelial cell lines (HLEC and SBEC respectively). Exposure to hyperbaric oxygen was also able to increased expression of eNOS and nNOS in the brains of PbA-infected mice and to promote the reduction of free heme and oxLDL in the plasma of these animals by promoting a reduction in oxidative stress.

Thus; these data presented here open new perspectives in the treatment of cerebral malaria. HBO could be used as primary treatment or as an adjuvant therapy to antimalarial treatment or, even though, associate to neuroprotective drugs and anti-inflammatory already used in treatment for MC.

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO	5
Aspectos Gerais	5
Aspectos biológicos	8
A problemática	10
Citoaderência e Malária cerebral humana	12
Malária cerebral murina	19
Oxigenação hiperbárica (HBO)	22
OBJETIVOS	27
MATERIAIS E MÉTODOS	31
Ensaio <i>In Vivo</i>	33
Camundongos e parasitas de origem murina	33
Tratamento em Condições Hiperbáricas	34
<i>Real-time PCR</i>	34
a) Remoção do cérebro para extração de RNA	34
b) Extração de RNA	34
e) Síntese de cDNA e real-time PCR	35
Análise da expressão de citocinas	35
Análise da expressão de ICAM-1	36
Citometria de fluxo para análise da população de linfócitos aderidos no cérebro	36
a) Extração de leucócitos sequestrados do cérebro (LSC)	36
b) Marcação e análise de citometria de fluxo dos LSC	37
c) Tampões e soluções utilizadas	38
Microscopia Intravital	39
Análise da expressão de iNOS, eNOS e nNOS por Western blot	40
a) Western blot	40
b) Tampões e soluções utilizados	41
Determinação do heme total	44
Determinação da LDL oxidada	44
a) Obtenção e Preparação da LDL e da oxLDL	44
b) Quantificação da oxLDL no soro	45

Ensaio <i>In vitro</i>	46
Cultivo de células endoteliais	46
a) Tampões e soluções utilizadas	48
Citometria de fluxo para determinação da expressão de moléculas de adesão	48
a) Tampões e soluções utilizados	48
Cultivo de formas sanguíneas de <i>Plasmodium falciparum</i>	48
a) Tampões e soluções utilizadas	48
Enriquecimento de estágios trofozoítas da cultura de <i>P. falciparum</i>	50
Seleção de formas sanguíneas de <i>P. falciparum</i> monofenotípicas - <i>Panning</i>	50
Ensaio de citoadesão com eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> em células endoteliais	51
a) Em condições estáticas:	51
b) Em condições de fluxo:	52
Ensaio de inibição do desenvolvimento parasitário	52
Análise estatística	53
Delineamento experimental	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES	83
Referências bibliográficas	87
Anexo I - artigos publicados relacionados à tese	109
Anexo II - Outros artigos publicados	121

INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais

Malária é a principal doença parasitária do mundo, atingindo 109 países na região subtropical e tropical (Figura 1). De acordo com a Organização Mundial de Saúde cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em área de risco e aproximadamente 300 milhões de casos são diagnosticados todos os anos. Estima-se que 1 milhão de pessoas morram anualmente, sendo 90% destas mortes apenas no continente Africano, principalmente na região subsaariana (<http://rbm.who.int/keyfacts.html>). As mulheres grávidas e crianças abaixo de 5 anos são as mais vulneráveis, representando aproximadamente 85% das mortes causadas por infecção malárica (<http://rbm.who.int/keyfacts.html>). Além disso, muitas crianças que sobrevivem à infecção desenvolvem sequelas neurológicas irreversíveis, tais como paralisia parcial ou total, perda de funções cognitivas como memória, atenção e dificuldades para falar, podendo, em casos extremos, permanecer em estado vegetativo (Holding *et al.*, 1999).

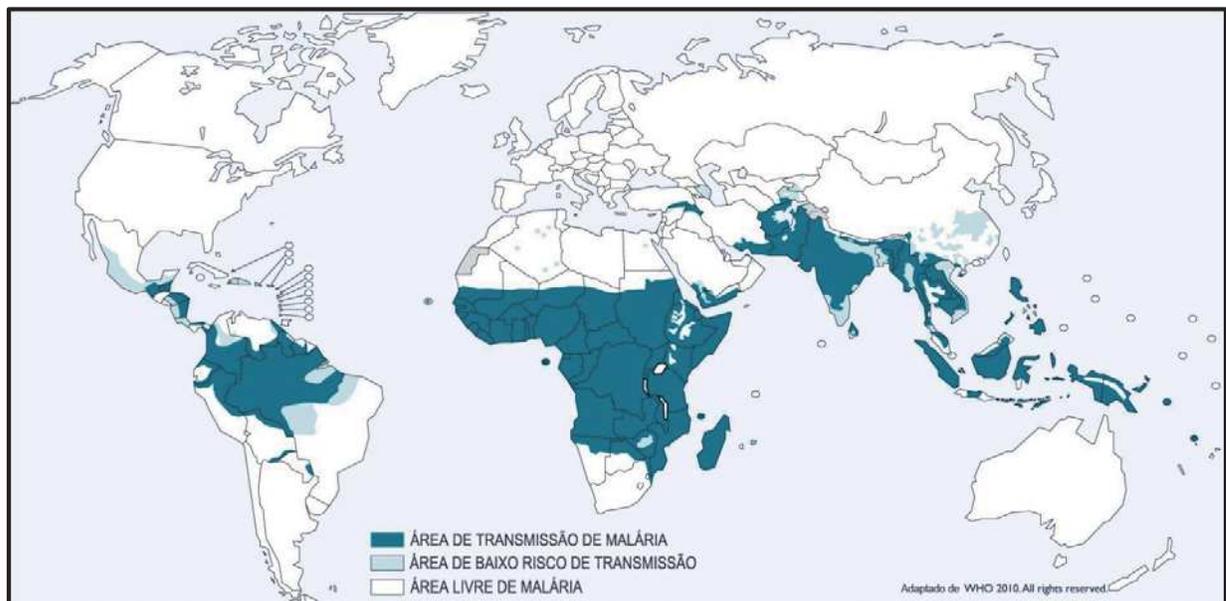


Figura 1: Distribuição global da malária 2009. (Adaptado de: <http://who.int>)

O Brasil representa 36% dos casos de malária reportados nas Américas, sendo a região da Amazônia legal a principal responsável pelo número de casos (Figura 2). Em 2010, foram diagnosticados cerca de 300 mil casos de malária, sendo que aproximadamente 97% destes se concentraram em seis estados da região amazônica: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima (<http://portal.saude.gov.br>). A maior parte dos casos de infecções maláricas diagnosticados no Brasil são por *Plasmodium vivax* (85%). No entanto, nos últimos anos, tem-se notado o crescimento do percentual de casos de malária por *Plasmodium falciparum*, fator preocupante, visto que esta espécie é a principal responsável pelos casos de malária grave e pelos óbitos (<http://portal.saude.gov.br>).

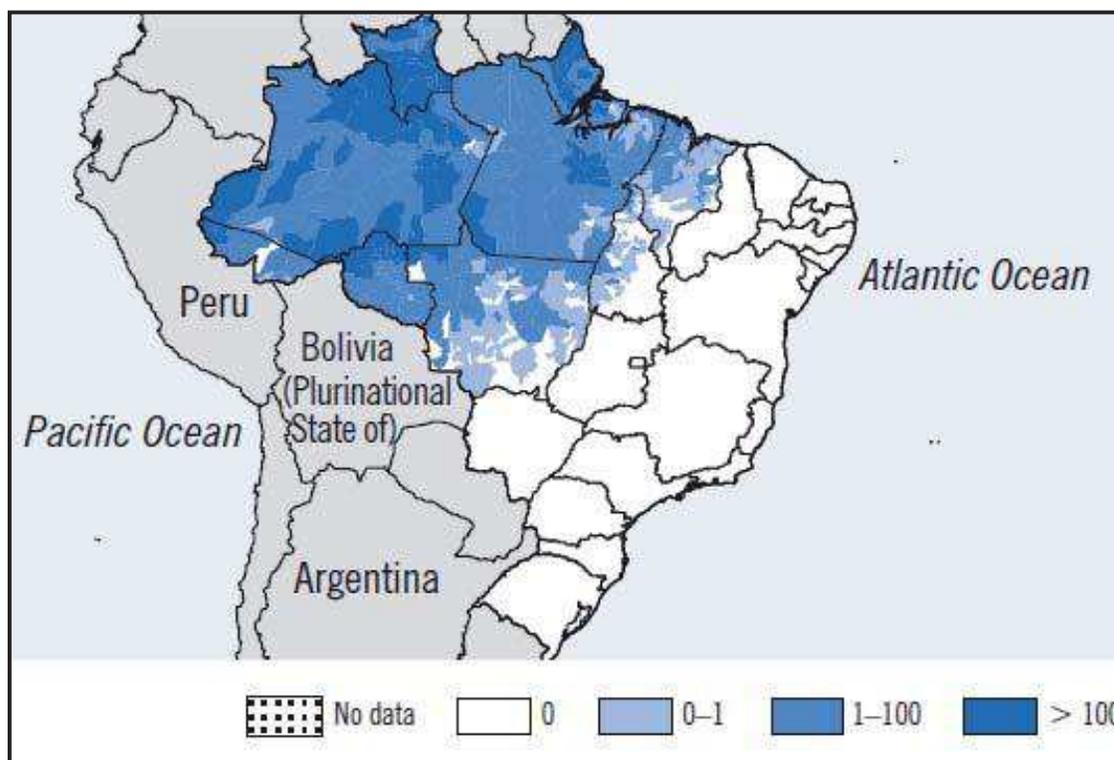


Figura. 2: Malária no Brasil. Casos notificados em 1000. (WHO, 2009)

Existem quatro espécies de *Plasmodium* capazes de infectar o homem, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Entretanto, o *P. falciparum* é a espécie mais relevante, do ponto de vista da taxa de mortalidade, uma vez que sua infecção está associada às formas graves de infecções maláricas, tais como: malária cerebral (MC) e malária gestacional (MG), decorrentes da citoadesão de eritrócitos infectados (EI) na microvasculatura cerebral ou no trofoblasto placentário, respectivamente (Costa *et al.*, 2006). No entanto, recentemente demonstrou-se que o *Plasmodium knowlesi*, espécie inicialmente considerada capaz de infectar exclusivamente primatas, também é capaz de causar infecções naturais no homem (Singh *et al.*, 2004).

Fatores ecológicos como a presença natural do vetor e fatores climáticos, possibilitam a manutenção do ciclo da malária, sendo que mudanças dos padrões de temperatura, precipitação e umidade podem interferir na abundância e desenvolvimento do mosquito. Entretanto, podemos considerar que a propagação da malária é mais que um problema ecológico, é também um problema social, devido à deterioração das condições socioeconômica nas áreas rurais e migração desordenada nas áreas endêmicas. A malária é responsável por importantes perdas econômicas, ocasionando uma redução do produto interno bruto (PIB) em até 1,3% em países com elevados níveis de transmissão. A longo prazo, essas perdas anuais agregadas resultam em substanciais diferenças de PIB entre países com e sem a malária, principalmente na África. (www.who.int- Global Malaria Action Plan, 2010).

A intensidade da transmissão depende de fatores relacionados ao parasita, o vetor, o hospedeiro humano e ao meio ambiente. Acredita-se que fatores como pré-disposição genética, idade, estado nutricional, número de picadas por mosquitos contaminados e o estado imunológico dos infectados estejam relacionados ao desenvolvimento das complicações da malária (MC e MG) (Newton *et al.*, 1998). Em áreas de transmissão elevada ou moderada, a imunidade é desenvolvida ao longo de anos de exposição. Mesmo não havendo o desenvolvimento de uma proteção completa, a imunidade adquirida pelos adultos reduz o risco

de infecção grave por malária, por esta razão, a maioria das mortes provocadas por infecções maláricas na África ocorrem em crianças. Já nas áreas de baixa transmissão, devido à baixa imunidade adquirida, todas as faixas etárias estão em risco. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>).

Aspectos biológicos

O ciclo de vida é essencialmente o mesmo em todas as espécies do gênero *Plasmodium*, apresentando uma fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado, o mosquito do gênero *Anopheles* e uma fase assexuada (esquizogonia) com a multiplicação no hospedeiro vertebrado. Esta última é composta de um ciclo pré-eritrocítico (assintomático), que ocorre nas células hepáticas, e o ciclo eritrocítico, que se desenvolve nos glóbulos vermelhos, sendo o responsável pelos sintomas, inclusive da malária grave (sintomático).

Em indivíduos não imunes com infecção por *P. falciparum* o período assintomático, desde a picada do mosquito até a invasão dos hepatócitos é em geral cerca de 7-8 dias. No entanto, este período depende da carga parasitária injetada, do grau de imunidade e nutricional do indivíduo. Os sinais clínicos da malária ocorrem devido à ruptura dos esquizontes e destruição dos eritrócitos. A maioria dos pacientes apresenta febre, dor de cabeça, calafrios e sudorese. No entanto, outros sintomas como tonturas, dores abdominais, náuseas, diarreia e vômitos também podem estar presentes (Trampuz *et al.*, 2003).

Os insetos responsáveis pela transmissão natural da malária pertencem à Ordem Diptera, sendo todos da família Culicidae e do gênero *Anopheles*. Cerca de 20 diferentes espécies de *Anopheles* são consideradas importantes em todo o mundo, no que se refere à malária (www.who.int). No Brasil as espécies mais importantes são: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *Anopheles (Nys.) albitalarsis lato senso*, *Anopheles (Nys.) aquasalis*, *Anopheles (Kertessia) cruzii*, *Anopheles (Ker.) bellator*. O *Anopheles darlingi* é

reconhecidamente a principal espécie transmissora da malária no Brasil, devido a sua ampla dispersão e ao hábito antropofílico, sendo o responsável por centenas de milhares de casos de malária anualmente, principalmente na região amazônica (<http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/malari.html>).

O ciclo do parasita (Figura 3) inicia-se no homem através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada, que inocula, juntamente com sua saliva, esporozoítos que penetram ativamente na derme e em vasos sanguíneos (Amino *et al.*, 2006). Estas formas migram para o fígado e invadem os hepatócitos, onde começam a se multiplicar assexuadamente (fase pré-eritrocítica). Novas formas do parasita livre denominadas merozoítos, são liberadas, inicialmente em vesículas (merossomos), que acabam alcançando a corrente sanguínea (Thiberge *et al.*, 2007, Sturm *et al.*, 2006). Nesta etapa do ciclo (fase eritrocítica) os merozoítos aderem e penetram ativamente nos eritrócitos, onde se desenvolvem como formas conhecidas como anéis ou trofozoítos jovens. Estas formas amadurecem e se reproduzem por esquizogonia, liberando então novos merozoítos na corrente sanguínea.

Alguns trofozoítas maduros diferenciam-se em gametócitos femininos e masculinos, que são encontrados principalmente no sangue periférico. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito ingere os gametócitos, que migram até o intestino, aonde vão se diferenciar em gametócitos femininos e masculinos. A fusão destes gametócitos resulta no zigoto, o qual passa por transformações originando o oocineto. Esta forma penetra na parede das células intestinais, onde se encista na camada epitelial do intestino, passando então a ser chamado de oocisto. O oocisto se divide assexuadamente em inúmeros esporozoítos, até que a célula hospedeira se rompa e os libere no meio extracelular. Estas formas migram até a glândula salivar, fazendo com que os parasitas sejam eliminados durante o repasto sanguíneo dando a continuidade ao ciclo.

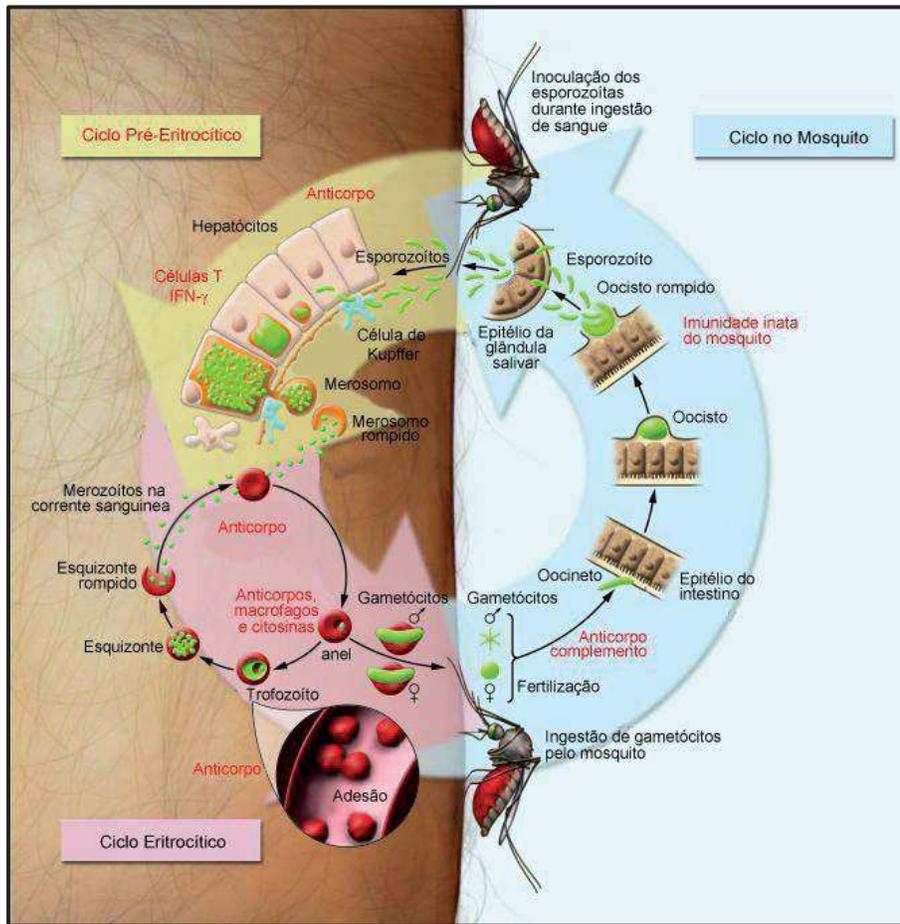


Figura 3: Ciclo da malária adaptado de Greenwood, 2008

A problemática

Durante décadas, a malária vem sendo alvo de intensas campanhas com o objetivo de erradicar a transmissão do parasita por meio de inseticidas e da quimioterapia. As estratégias de controle empregadas principalmente durante a década de 50 reduziram a distribuição global da doença, mas não foram plenamente eficazes devido a diversos fatores, como o aparecimento de resistência às drogas convencionalmente utilizadas (Wernsdorfer & Payne, 1991), a inexistência de uma vacina eficaz, assim como o aparecimento de resistência nos mosquitos vetores aos inseticidas empregados atualmente.

A alta prevalência da doença, a constante pressão ocasionada pelo uso inadequado das drogas e a rápida reprodução do parasita contribuem para o desenvolvimento da resistência (Daily, 2006), que é uma das principais razões para a morbidade e mortalidade. Além disso, a emergência da resistência, principalmente de *P. falciparum*, tem contribuído para a ressurgência global da malária nas últimas três décadas (Marsh, 1998). A redução drástica da eficácia de drogas como cloroquina, primaquina e pirimetamina contra infecções maláricas, têm sido reportada em várias áreas há algumas décadas, contribuindo para o agravamento dos sinais clínicos (Le Bras & Durand, 2003). Tendo em vista esse novo cenário, a Organização Mundial de Saúde, tem sugerido nos últimos anos uma terapia com o uso combinado de vários antimaláricos, como a associação de artesunato-mefloquina e artesunato-sulfadoxina/pirimetamina, a fim de conseguir uma dupla proteção e tentar reduzir o surgimento de cepas resistentes.

Desta maneira, o desenvolvimento de vacinas anti-maláricas pode ser uma esperança no combate à malária. Apesar da constante atividade de pesquisa, e do desenvolvimento de uma vacina já testada em humanos de diferentes áreas endêmicas na África (Menéndez *et al.*, 2011; Agnandji *et al.*, 2011), ainda não existe uma vacina capaz de proteger de maneira totalmente eficaz e duradoura contra a infecção pelo *Plasmodium* spp.. Entretanto, análises experimentais sugerem que a indução de uma imunidade protetora contra malária possa ser um objetivo alcançável, visto que imunizações com formas esporozoítas irradiadas foram capazes de induzir proteção parcial e total em camundongos (Nussenzweig *et al.*, 1967), em primatas não-humanos (Collins *et al.*, 1972) e em humanos (Rieckmann *et al.*, 1979). Além disso, indivíduos infectados continuamente pelo parasita desenvolvem gradualmente uma imunidade natural, porém de curta duração e cepa-específica (Baird *et al.*, 1991), assim como a transferência passiva do soro de pacientes “imunes” induz proteção em crianças infectadas (Sabchaeron *et al.*, 1991).

Entretanto o desenvolvimento de vacina experimental esbarra em algumas dificuldades:

(i) a grande quantidade de estágios e formas que o parasita apresenta durante seu ciclo de vida dentro de seu hospedeiro vertebrado, e conseqüentemente, os diferentes antígenos que são apresentados (Kwiatkowski & Marsh, 1997), (ii) o polimorfismo detectado em inúmeros antígenos do parasita (Winter *et al.*, 2004), fator que dificulta a busca por vacinas e (iii) na dificuldade de obtenção de grandes quantidades de parasita.

Citoaderência e Malária cerebral humana

A maioria dos casos de malária apresenta um quadro de febre relativamente simples que é geralmente controlado através de tratamento com drogas antimaláricas. No entanto uma minoria dos casos, cerca de 1%, progride para complicações (Mackintosh *et al.*, 2004).

A malária grave é um processo multifatorial envolvendo o sequestro de eritrócitos infectados (EI) por *P. falciparum* nos endotélios vasculares e a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN- γ . Acredita-se que este fenômeno ocorra através da adesão direta dos eritrócitos infectados (EI) por formas maduras *P. falciparum* que se ligam a receptores expressos na superfície das células endoteliais. Dentre esses mecanismos destacam-se: o sequestro parasitário, que pode ocorrer através da adesão do eritrócito infectado diretamente no endotélio através dos *Knobs* (locais onde os EIPf se ligam às células do hospedeiro), que são formados por proteínas codificadas pelo parasita, exportadas para superfície do eritrócito infectado (Ho & White, 1999), tais como a PfEMP-1 (do Inglês, *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1). Este fenômeno de sequestro pode ocorrer ainda entre os eritrócitos infectados (autoaglutinação) ou através da adesão dos eritrócitos infectados com os eritrócitos saudáveis (rosetas) (Handunnetti *et al.*, 1992; Ho & White, 1999). Além disso, recentemente tem-se sugerido que as plaquetas possam atuar através da expressão de CD36, como uma ponte de ligação, entre os EI e o endotélio (revisto por Costa *et*

al., 2006; Wassmer *et al.*, 2003; Combes *et al.*, 2006). A formação de rosetas entre EIs e hemácias sadias também é colaboradora da patogênese da malária grave. Sugere-se que a adesão aos receptores endoteliais impeça a destruição de EI no baço e, conseqüentemente, a indução de uma resposta imune, implicando o processo de sequestração ou citoaderência na sobrevivência parasitária (Figura 4) (David *et al.*, 1983).

Apesar de na malária humana a citoaderência ser descrita como característica única de *P. falciparum*, recentemente foi demonstrada a capacidade de citoaderência de *P. vivax ex-vivo*, (Carvalho *et al.*, 2010).

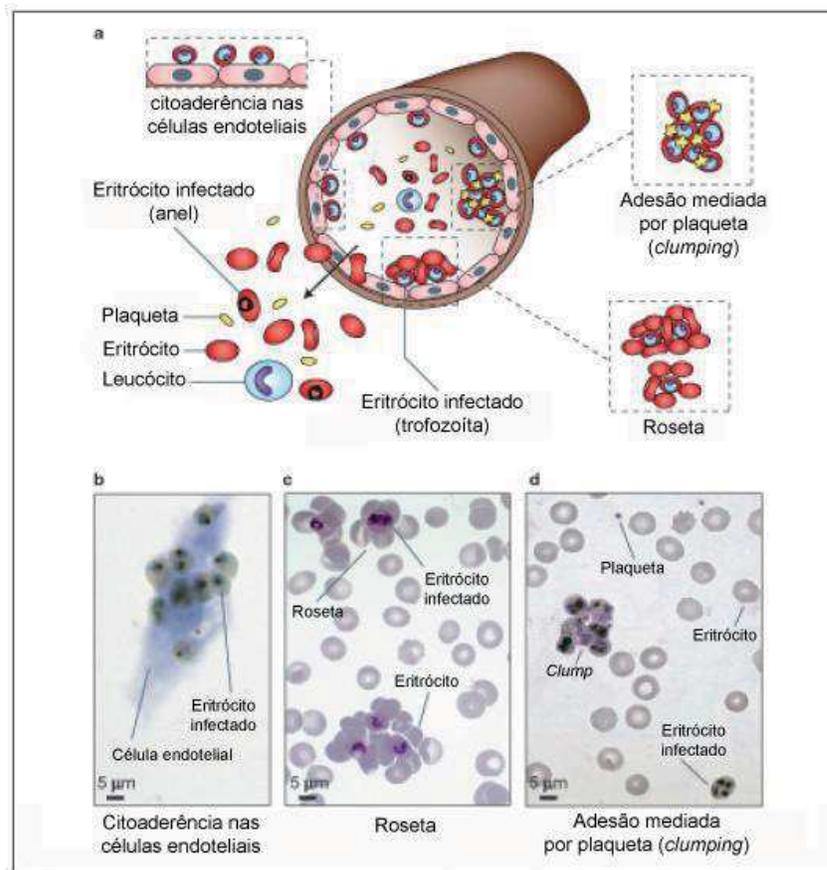


Figura 4 Mecanismos de sequestro em *Plasmodium falciparum*. Eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* (A) aderem diretamente ao endotélio através de Knobs. (B) aderem a outros EI (C) aderem a eritrócitos não infectados formando rosetas (D) aderem a plaquetas via CD36. (Adaptado de Rowe *et al.*, 2009).

Dentre as complicações da malária destacam-se os casos de anemia profunda, acidose metabólica, malária gestacional e os de malária cerebral (Mackintosh *et al.*, 2004). A malária cerebral está associada ao *P. falciparum* e é caracterizada por: convulsões, perda da consciência, ataxia (incapacidade de coordenar os movimentos dos músculos voluntários) paralisia, elevação da pressão craniana decorrente de inchaço cerebral, disfunção da barreira hemato-encefálica e coma (Newton *et al.*, 2000). Este quadro grave pode gerar inúmeras consequências graves e irreversíveis. Em crianças e adultos sobreviventes à MC pode-se notar sequelas neurológicas irreversíveis, problemas de perda das funções cognitivas (fala e dificuldades no reconhecimento de pessoas), problemas comportamentais, paralisia parcial dos membros e cegueira. Desta maneira, a malária cerebral tem sido considerada a principal responsável pelas mais sérias complicações nas infecções maláricas e pelo maior número de mortes.

Inúmeros estudos sugerem que a MC pode ser atribuída a uma combinação de danos locais ao tecido cerebral, decorrentes do bloqueio do fluxo sanguíneo e conseqüentemente uma redução no suprimento de oxigênio, o que levaria a um quadro de hipóxia e isquemia; assim como danos cerebrais mais gerais desencadeados pelo desbalanço da resposta imune do hospedeiro, principalmente devido ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Hunt *et al.*, 2006). No entanto, os fenômenos responsáveis pelos aspectos patológicos da MC ainda são pouco compreendidos.

Diversas observações apontam o processo de sequestro parasitário em microcapilares cerebrais como responsável pelos aspectos patológicos na MC. De fato, análises quantitativas foram capazes de correlacionar o sequestro de eritrócitos infectados (EI) e a ocorrência de MC em humanos (MacPherson *et al.*, 1985; Pongponratn *et al.*, 1991; Turner, 1997). Tais estudos demonstraram que pacientes com malária cerebral exibiam um nível de sequestro no cérebro significativamente maior do que nos demais órgãos, fato que não ocorria com os pacientes que

não desenvolveram MC (MacPherson *et al.*, 1985; Pongponratn *et al.*, 1991; Turner, 1997). Além disso, é possível notar, em cortes histológicos de pacientes que sucumbiram de malária cerebral, a presença de leucócitos nos microcapilares (Medana and Turner, 2006).

Estudos *in vitro* identificaram inúmeros receptores expressos na superfície de células endoteliais que são potenciais receptores de EI, tais como ICAM-1, VCAM-1, CD36, E-selectina, P-selectina, HA e CSA (Lou *et al.*, 2001; Mackintosh *et al.*, 2004). Apesar do CD-36 ser o receptor majoritário na sequestração de EIPf dos órgãos periféricos durante a infecção malárica, acredita-se que ele não esteja envolvido na adesão de EIPf no endotélio cerebral, visto que os níveis de CD36 nos tecidos cerebrais não estão aumentados (Turner *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1997). De fato, muitos estudos tem mostrado o ICAM-1 como principal responsável pela sequestração de EIPf no cérebro (Newbold *et al.*, 1997; Chakravorty & Craig, 2005), já que durante a infecção malárica este receptor esta super expressado (Turner *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1997). Além disso, estudos revelaram que EIPf é capaz de se ligar ao ICAM-1 sob condições de fluxo (Ockenhouse *et al.*, 1991; Adams, 2000).

Ensaio quantitativos mostraram que células T estão sequestradas no cérebro durante infecções maláricas, especialmente células TCD8+. Acredita-se ainda que a liberação das citocinas nas fases iniciais da infecção pode promover a ativação de TCD8+ e a migração dessas para o cérebro (Renia *et al.*, 2006). Este acúmulo de células T ocorre simultaneamente ao aparecimento dos sintomas neurológicos da malária cerebral, o que sugere fortemente a participação dessas células na patogênese da MC (Belhoue *et al.*, 2002).

Apesar da sequestração de EI parecer ser necessária, este pode não ser o único fenômeno responsável pela malária cerebral, uma vez que este fenômeno não tenha sido observado em todos os pacientes que sucumbiram à malária ocasionada pelo *P. falciparum* (Van der Heyde *et al.*, 2006). Desta maneira, outros fatores relacionados ao processo

patológico da MC são propostos, como o desbalanço na expressão de citocinas, alterações no metabolismo cerebral e disfunção da homeostase.

Acredita-se que citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , IL-6, IL-1 β e LT desempenhem um papel fundamental na patogenia da MC, possivelmente aumentando a expressão de receptores endoteliais como ICAM-1, responsável pela adesão tanto de EI quanto de leucócitos (Grau & De Kossodo, 1994; Beremdt *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989). De fato, estudos demonstraram um aumento de expressão de TNF- α e IFN- γ no plasma de pacientes com malária grave (Peyron *et al.*, 1994; De Kossodo & Grau, 1993), assim como uma redução nos níveis TGF- β e um aumento significativo de TNF- α no líquido cérebro-espinhal de crianças com MC (Esamai *et al.*, 2003).

Análises realizadas em pacientes indianos foram capazes de associar um determinado “*cluster*” de citocinas com o tipo da gravidade da malária: malária cerebral (MC); malária branda (MB) ou malária grave (MG), sendo que esta representa outras formas graves da doença exceto MC. Pacientes com MC apresentaram elevados níveis de TGF- β , TNF- α , IL-10 e IL-1 β ; enquanto pacientes com MB e MG expressavam respectivamente IL-12, IL-5 e IL-6 e IFN- γ e IL-12 (Prakash *et al.*, 2006). Entretanto, em infecções não letais com *P. vivax* grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias são detectadas, porém não se observa o desenvolvimento de malária cerebral, sugerindo que o desbalanço nas citocinas pode ser necessário, mas não suficiente para promover o aparecimento de sintomas relacionados à malária cerebral (Van der Heyde *et al.*, 2006).

Alguns autores, em trabalhos recentes, mostraram que pacientes com malária cerebral apresentam uma disfunção da homeostase, estando às plaquetas relacionadas a esse equilíbrio. Pacientes com MC exibem sangramentos prolongados e hemorragias cerebrais que confirmam problemas relacionados à coagulação e conseqüentemente na homeostase (Van der

Heyde *et al.*, 2006). Além disso, o número de plaquetas aderidas no cérebro de crianças que morreram de MC é significativamente maior do que a quantidade encontrada no cérebro de crianças, com malária, que morreram de anemia profunda ou outras causas, implicando numa possível contribuição das plaquetas na patogênese da malária cerebral (Grau *et al.*, 2003). Plaquetas podem ainda agir como células imunológicas efetoras, agindo como ponte entre a homeostase e a inflamação, provocando danos às células endoteliais, hemorragias e lesões cerebrais (Schofield & Grau, 2005; Lou *et al.*, 2001).

Estudos em animais deficientes para a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e de administração de indutores de NO demonstraram que esta molécula não possui efeito na destruição de EI, não afetando o curso da parasitemia em animais infectados (Sobolewski, 2005). No entanto, recentemente foi verificado que uma baixa biodisponibilidade de NO contribui para a indução da MC, e que esta é causada majoritariamente pela ligação do NO pela heme livre, proveniente das hemácias infectadas destruídas (Gramaglia *et al.*, 2006). Foi constatado ainda que a administração de doadores de NO é capaz de proteger significativamente animais contra a malária cerebral experimental (MCE) (Gramaglia *et al.*, 2006), e que, ao se restaurar os níveis de NO, ocorria uma diminuição do processo inflamatório, induzindo a proteções endoteliais, impedindo a destruição da barreira hemato-encefálica e, conseqüentemente, o extravasamento vascular, resultando desta maneira no reestabelecimento da proteção contra MCE (Gramaglia *et al.*, 2006).

De fato, outros autores demonstraram que o NO via eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) tem efeito endotelial reparador e anti-inflamatório (Sobolewski, 2005), e baixos níveis de nitrito e arginina estão associados ao desenvolvimento de malária cerebral em crianças (Anstey *et al.*, 1996; Lopansri *et al.*, 2003). Foi observado ainda, que a administração exógena de NO diminui a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais, diminuindo a citoaderência parasitária *in vitro* (Serirom *et al.*, 2003).

No entanto, estudos em humanos têm-se mostrado contraditórios. Análises dos níveis de NO em populações da Papua Nova Guiné, indicaram uma correlação entre NO e malária cerebral (Al Yaman *et al.*, 1996), enquanto em populações da Tanzânia houve uma correlação inversa entre NO e malária cerebral (Anstey *et al.*, 1996).

Durante a infecção malárica, inúmeros eritrócitos são rompidos, dessa maneira uma quantidade significativa de hemoglobina (Hb) $HbFe^{+2}$ é liberada na corrente sanguínea. Esta reage com espécies reativas de oxigênio (ROS) formando uma molécula instável a metahemoglobina ($HbFe^{+3}$) que rapidamente se transforma em heme livre (Wagener *et al.*, 2003). Cerca de 80% da hemoglobina é degradada pelo *Plasmodium*, sendo que durante este processo ocorre a formação de heme livre e de espécies reativas de oxigênio (Francis *et al.* 1997), os quais são tóxicos para os esquizontes eritrocíticos, no entanto o parasita transforma estas formas em cristais inertes denominados hemozoína ou pigmento malárico (Kumar, 2005).

Com a destruição de eritrócitos durante a fase sanguínea da infecção, ocorre o acúmulo de heme livre tóxico na circulação, sendo que este pode agir como catalizador da oxidação da LDL, gerando produtos tóxicos ao endotélio, tais como citocinas pro-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio ROS que podem causar alterações na permeabilidade do endotélio (Balla *et al.*, 1991; Wagener *et al.*, 2003). Estas modificações na membrana promovem alta citotoxicidade nas células endoteliais (Balla *et al.*, 1993 e Jeney *et al.*, 2002), gerando um processo pró-trombótico que pode resultar na oclusão dos vasos e de isquemia tecidual (revisto por Ferreira *et al.*, 2008). Além disso, a heme livre pode agir ainda como quimioatrativo de células polimorfonucleares, como os leucócitos, e conseqüentemente promover a adesão dessas células no endotélio (Porto *et al.*, 2007 e Graca-Souza *et al.*, 2002). Análises *in vitro* com células endoteliais, demonstraram que a heme pode aumentar a expressão moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, provavelmente através da geração de espécies reativas de oxigênio ROS mediados pela heme e sua subsequente ativação da transcrição dos

fatores NF-kB e AP-1, e da via de sinalização SP-1 (revisito por Sanjay *et al.*, 2005). Inúmeros estudos apontam a heme livre como sendo a responsável por diversos efeitos tóxicos nos rins, promovendo vasodilatação renal, aumentando o volume de urina e a excreção de sais (Rodriguez *et al.*, 2003). O acúmulo de heme também é citotóxico para células cardíacas, promovendo perda da integridade celular e afetando a liberação de enzimas citosólicas (Bhoite-Solomon *et al.*, 1993). Por fim, a heme livre promove danos no sistema nervoso central, promovendo principalmente necroses, sendo este efeito observado majoritariamente após hemorragias cerebrais (Goldstein *et al.*, 2003).

Malária cerebral murina

Apesar de relativo avanço no entendimento de aspectos imunopatológicos da MC, considerações éticas com estudos em humanos têm limitado a investigação da patogênese e de terapias contra MC. Muitos estudos são baseados em análises histopatológicas *post-mortem*, o que impossibilita o entendimento da sequência de fatores que levaram ao desenvolvimento do agravamento dos sintomas da malária, levando a um quadro de malária cerebral (De Souza *et al.*, 2010). Nos últimos anos a pesquisa utilizando técnicas não invasivas como ressonância magnética e topografia computacional, no estudo de pacientes com malária cerebral vem auxiliando significativamente os avanços no seu entendimento da MC (Penet *et al.*, 2005 e 2007). No entanto a utilização destes equipamentos fica comprometida nas áreas endêmicas, visto a deficiência na disponibilidade destes equipamentos e de profissionais capacitados nessas regiões (De Souza *et al.*, 2010).

Tendo em vista esses complicadores, o estudo em modelo experimental murino, utilizando linhagens susceptíveis de camundongos como C57BL/6 e CBA torna-se uma das alternativas no estudo da patogênese da malária cerebral. A infecção dessas linhagens com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) induz o desenvolvimento da malária cerebral murina,

acompanhada de sinais clínicos como ataxia, angustia respiratória e coma (De Souza & Riley, 2002). O modelo experimental no estudo de malária cerebral mais utilizado é, sem dúvida, o realizado com a linhagem de camundongo C57BL/6 infectado com PbA, visto ser este o modelo experimental que apresenta maior similaridade com os aspectos imunológicos e mecânicos da MC humana (Hunt & Grau, 2003).

Na malária cerebral murina (MCM) a infecção de camundongos C57BL/6 com formas sanguíneas de PbA acarreta em uma síndrome neurológica caracterizada por paralisia dos membros, desvio da cabeça, convulsões e coma; ocorrendo entre os dias 5-10 após a infecção e causando a morte de 60-100% dos animais inoculados. Os animais que não apresentam sintomas de MC até o dia 10-12 pós-infecção sucumbem posteriormente de hiper-parasitemia associada a profunda anemia (revisto por Engwerda *et al.*, 2005).

Semelhanças comportamentais e imunológicas, alterações clínicas como a quebra da barreira hemato-encefálica, destruição neuronal, hemorragia cerebral e aumento das concentrações de lactato são características comuns entre a MC em humanos e no modelo experimental (Hunt & Grau, 2003). Embora este modelo não reproduza todas as características clínicas observadas na MC humana, diversos estudos foram capazes de mostrar o acúmulo de EI de PbA e leucócitos nos capilares cerebrais (Neill & Hunt, 1992; Jennings *et al.*, 1997; Hearn *et al.*, 2000), de inflamação perivascular (Engwerda *et al.*, 2002) e de elevados níveis de expressão de TNF- α , LT (Linfotoxina) e IFN- γ (Hunt & Grau, 2003), assim como indicam a participação de células T CD8 $\alpha\beta$ no cérebro de camundongos com MC, que possivelmente, estariam envolvidas na destruição da barreira hemato-encefálica (Belnoue *et al.*, 2002; e revisto por Renia, 2006). Além disso, estudos recentes mostraram que em modelo experimental murino ocorre o acúmulo de plaquetas no sistema vascular cerebral (Wassmer *et al.*, 2003; Von Zur

Muhlen *et al.*, 2008), as quais parecem estar envolvidas diretamente no dano das células endoteliais durante o curso da infecção (Wassmer *et al.*, 2006).

Como ocorre em humanos, na malária cerebral experimental também podemos notar o aumento na expressão de ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina no endotélio vascular cerebral (revisto por Schofield & Grau, 2005). O ICAM-1 tem sido apontado como principal receptor de EI de *Plasmodium falciparum* no cérebro de pacientes infectados (Chakravorty & Craig, 2005), sendo também responsável pela adesão de leucócitos. Além disso, a baixa biodisponibilidade de NO contribui para o desenvolvimento da MC tanto em humanos quanto em modelo experimental, sendo que este quadro de MC pode ser revertido, em ambos os casos, através da administração de L-arginina ou de um doador de NO (Gramaglia *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2007).

Estudos com camundongos C57BL/6 demonstraram que ocorre um aumento na heme livre em animais infectados. No entanto animais infectados expostos ao CO apresentaram redução de heme livre no sangue, visto que o CO se liga a hemoglobina, inibindo a oxidação da mesma e impedindo a geração de heme livre (Pamplona *et al.*, 2007). Além disso, camundongos BALB/c, camundongo não susceptível a MCE, infectadas com *P. berghei* ANKA e camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* NK65, linhagem de *Plasmodium* incapaz de produzir MCE, não tiveram os níveis de heme livre aumentados (Pamplona *et al.*, 2007).

Tendo em vista todos estes aspectos, a utilização de um bom modelo experimental de MC faz-se necessário na busca de novas terapias que atuem na área de prevenção, tratamento e redução de complicações ocasionadas pelo desenvolvimento da malária cerebral.

Oxigenação hiperbárica (HBO)

A terapia de oxigenação hiperbárica é definida pela *Undersea and Hyperbaric Medical Society* (UHMS) como um tratamento no qual o paciente intermitentemente respira 100% de oxigênio pressurizado. A câmara de tratamento deve ser pressurizada com pressão maior que a de 1 atmosfera absoluta (ATA), ou seja, pressão maior que encontrada ao nível do mar.

A descoberta da terapia com oxigênio hiperbárico teve sua primeira documentação em 1662, com a construção da primeira câmara hiperbárica. A partir disso, à HBO foi testada em inúmeras condições. No entanto, após um longo período de falta de credibilidade, HBO retorna a ser utilizada a partir da segunda metade do século XX (Garcia-Covarrubias & Sanchez-Rodriguez, 2000). Só a partir dos anos 60 a câmara passou a ser amplamente utilizada para potencializar os efeitos da radioterapia, no tratamento de infecções anaeróbicas, em casos de envenenamento por monóxido de carbono (revisto por Gill & Bell, 2004), como adjuvante em cirurgias e como potencializador dos efeitos de antibióticos (Park *et al.*, 1992).

À pressão de 1 ATM (condição normobárica) as hemácias, através da hemoglobina, são responsáveis pela maior parte do transporte de oxigênio no sangue, no entanto uma porção menor de oxigênio é transportada dissolvida pelo plasma. Em condições normobáricas, durante a respiração, a tensão de oxigênio arterial é de aproximadamente 100 mmHg e a tensão de oxigênio nos tecidos é de 55 mmHg, com distribuição de 3 ml/L de oxigênio. No entanto, ao analisar a pressão de oxigênio arterial durante o tratamento com HBO (100%, 3 ATA), verificou-se o aumento da pressão de oxigênio arterial de até 2000 mmHg e da pressão de oxigênio nos tecidos de até 500 mmHg, o que permite uma distribuição de 60 ml/L de oxigênio, que seria suficiente para abastecer os tecidos mesmo na ausência do carreamento de oxigênio pela hemoglobina (Leach *et al.*, 1998). Neste sentido, à HBO eleva os níveis sistêmicos e locais do oxigênio necessário para a produção de ATP, para a síntese de proteínas, para a síntese da

matrix de colágeno que é necessária para a angiogênese e para a produção de espécies reativas, das quais o oxigênio é o substrato.

O uso da terapia hiperbárica com oxigênio é aprovada para tratamentos em humano para inúmeros casos como, queimaduras, gangrena, infecções nos ossos, abscessos intracraniais, anemia, intoxicação por monóxido de carbono, complicações ocasionadas por radiação, infecções de pele, transplante de pele e embolismo (Al-Waili *et al.*, 2005). No Brasil, o uso da HBO tem seguido as determinações da Sociedade Americana de Medicina Hiperbárica.

O uso do oxigênio medicinal pressurizado têm se expandido para outras áreas da medicina como lesões ocasionadas por radiação, isquemias e osteomielites (Gill & Bell, 2004), assim como vem sendo utilizado promissora em pesquisas com modelos animais envolvendo acidentes cerebrovasculares, meningite, lesões de medula, modelos de isquemia, modelos de re-perfusão e em choque séptico (Gill & Bell, 2004).

A oxigenação hiperbárica ($pO_2 > 760$ mmHg) tem sido amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos patogênicos (Gudewicz *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1992), visto que promove uma ação antibiótica direta em casos de infecções necrosantes de tecido causadas por bactérias e a redução na adesão de leucócitos induzindo uma ação citotóxica reduzida e conseqüentemente uma menor destruição do tecido (revisto por Gill & Bell, 2004). Além disso, o tratamento com oxigênio hiperbárico também vem sendo utilizado, desde a década de 60, como adjuvante em cirurgias e no aumento da atividade de antibióticos (Park *et al.*, 1992). Estudos demonstram ainda que as taxas de sobrevivência e recuperação no pós-operatório são mais elevadas com o uso da HBO (revisto por Clark & Moon, 1999). Estudos recentes demonstram ainda que o oxigênio hiperbárico possui atividade contra protozoários patogênicos, sendo capaz de inibir a proliferação de *Leishmania amazonensis*, pela diminuição da suscetibilidade de macrófagos infectados (Arrais-Silva *et al.*,

2005), e de reduzir o tamanho da lesão de animais infectados e expostos à HBO diariamente durante 20 dias (Arrais-Silva *et al.*, 2006).

A HBO também tem sido utilizada em casos de danos neuronais, mostrando-se capaz de reduzir edemas cerebrais (Niklas *et al.*, 2004) e a pressão intracraniana (Rogatsky *et al.*, 2005). Inúmeras análises sugerem que o efeito protetor da HBO contra a isquemia cerebral pode estar relacionado com a melhor eficiência no fornecimento de oxigênio e a diminuição do processo inflamatório, através da inibição da ativação dos leucócitos, conseqüentemente na redução do edema e da hemorragia (revisto por Zhang *et al.*, 2005). A terapia com HBO pode ainda trazer melhoras aos danos cerebrais, reduzindo as chances de isquemia e hipóxia (revisto por Al-Waili *et al.*, 2005), além de retardar os danos à barreira hemato-encefálica (BHE) (revisto por Zhang *et al.*, 2005; Veltkamp *et al.*, 2005). Sukoff & Ragatz (1982) demonstram também que a terapia com oxigênio hiperbárico pode proporcionar a diminuição da pressão intracraniana, através da diminuição do fluxo sanguíneo, proporcionando o aumento da oxigenação. Outros estudos apontam para o aumento do metabolismo cerebral e a diminuição dos níveis de lactato no fluido cérebro espinhal após tratamento com HBO, indicando que esta terapia pode aumentar o metabolismo aeróbico em pacientes com danos cerebrais (Rockswold *et al.*, 2001).

Em modelo experimental de rato, a exposição à HBO mostrou-se eficiente no tratamento de isquemia intestinal, já que reduziu o sequestro de neutrófilos e leucócitos, além de diminuir a expressão de TNF- α reduzindo assim os danos causados no pulmão (Yang *et al.*, 2001). A exposição ao oxigênio hiperbárico também foi capaz de reduzir a expressão de TNF- α e IL-10, por monócitos e macrófagos em sangue de ratos ou de humanos, mesmo quando cultivados na presença de LPS (Lahat *et al.*, 1995; Benson *et al.*, 2003). Outros estudos demonstraram ainda que a exposição ao oxigênio hiperbárico promove diminuição significativa nos níveis de TNF- α e de óxido nítrico (nitrito e nitrato) no lavado do bronco alveolar e no plasma de ratos

estimulados com LPS e expostos à HBO em comparação aos animais estimulados com LPS não expostos à HBO ou expostos apenas à 100% de oxigênio não pressurizado (Chu *et al.*, 2007). Além disso, a exposição ao oxigênio hiperbárico foi capaz de reduzir a expressão de iNOS em tecidos pulmonares de ratos estimulados com LPS (Perng *et al.*, 2004), e promover a atenuação da super expressão de iNOS por macrófagos peritoniais de camundongos (Ueno, 1999; Kurata *et al.*, 1995).

Acredita-se que o efeito da oxigenação hiperbárica no fluxo sanguíneo seja dividido em duas fases; num primeiro momento observa-se uma vaso constrição nas artérias e veias cerebrais, no entanto após repetidas seções de exposição à HBO pode-se notar o aumento do diâmetro das artérias (Demchenko *et al.*, 2000 e 2002). Esta diferença observada sugere uma ação do oxigênio hiperbárico na modulação do endotélio, principalmente na expressão de NO (Saglam *et al.*, 2008). Atochin *et al.* (2003) demonstraram, através de experimentos com animais e-NOS e n-NOS nocautes que o óxido nítrico derivado da e-NOS é responsável pela vaso constrição inicial dos vasos cerebrais, sendo que a vasodilatação posterior deve-se ao balanço entre a expressão de n-NOS e e-NOS.

Células endoteliais expostas à HBO também apresentaram aumento significativo na expressão de eNOS que pode estar relacionado à significativa diminuição do receptor de leucócitos e ICAM-1 (Buras *et al.*, 2000). No cérebro o aumento de NO é atribuído principalmente a nNOS (Salter *et al.*, 1996).

O mesmo pode ser observado em estudos com animais tratados com HBO antes e depois da isquemia, que além da diminuição da ICAM-1 também apresentaram diminuição na atividade da mieloperoxidase, um marcador de sequestro de neutrófilo (Buras *et al.*, 2000; Milkovi-lolic *et al.*, 2003) e um aumento na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Lee *et al.*, 2006; Sheikh *et al.*, 2000), fator angiogênico relacionado ao reparo tecidual. Estudos utilizando oxigênio hiperbárico em ratos com hemorragia cerebral,

demonstraram um efeito protetor no fluxo sanguíneo cerebral dos animais expostos à HBO, e consequentemente um efeito protetor contra danos neurológicos. Tais mudanças estão associadas à inibição da expressão de HIF-1 α (Fator de indução de hipóxia-1 α), fator de transcrição nuclear somente expresso em baixas tensões de oxigênio (2%) e, também a diminuição da expressão do fator pró-apoptótico BNIP-3 (Li *et al.*, 2005; Ostrowski *et al.*, 2005).

Sabe-se ainda que a exposição ao oxigênio hiperbárico induz também uma tolerância ao estresse oxidativo em linfócitos isolados de humanos, promove a redução nos danos oxidativos do DNA em células V79 (células de hamster chinês) e em culturas primárias de neurônios de medula espinhal (Routhfuss *et al.*, 2001; Routhfuss & Spelth, 2002; Li, *et al.* 2007).

Por fim, a utilização da HBO no tratamento de animais infectados com *Plasmodium berghei* (linhagem incapaz de provocar MC) foi relatada anteriormente (Rencricca *et al.*, 1981). Neste trabalho é notada uma redução da parasitemia dos animais infectados, nos dias subsequentes à exposição ao oxigênio hiperbárico. Entretanto, os efeitos da HBO não foram avaliados durante todo o desenvolvimento da parasitemia. Além disso, os demais sintomas clínicos e o mecanismo de ação do oxigênio hiperbárico não foram investigados.

OBJETIVOS

Na dissertação de mestrado por mim apresentada comprovamos que animais infectados por PbA e diariamente submetidos à HBO (100% O₂, 3 ATA, 1H) a partir do dia 0 da infecção apresentaram 50% de proteção significativa em relação ao grupo não exposto à HBO. Proteção significativa também foi observada quando os animais infectados foram submetidos à HBO (100% O₂, 3 ATA, 2H) no quarto dia pós-infecção, quando os camundongos já apresentam parasitemia patente e sinais dos sintomas de malária cerebral.

Baseados nesses resultados neuroprotetores da terapia de HBO contra MCM obtidos anteriormente por nosso grupo, novos experimentos foram conduzidos com o intuito de:

1. Verificar a atividade da câmara hiperbárica no sistema imune murino, através da quantificação de citocinas pró-e antiinflamatórias, tais como: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL1 β , e IL-6 do gene controle β -actina no macerado cerebral dos animais expostos ou não à HBO através de real-time PCR;
2. Analisar a ação da oxigenação hiperbárica na citoadesão de linfócitos T CD8+ e TCD4+ alfa-beta ou gama-delta seqüestrados no cérebro dos animais através de citometria de fluxo;
3. Avaliar a participação da HBO na adesão de leucócitos através da microscopia intravital;
4. Determinar a participação do NO no modelo protetor da HBO nos camundongos infectados com PbA, analisando a expressão de proteínas (e-NOS, i-NOS e n-NOS) no cérebro dos animais infectados expostos, ou não, à HBO;
5. Avaliar a expressão de ICAM-1 no cérebro dos animais infectados expostos, ou não, à HBO através de real-time PCR;
6. Analisar o estresse oxidativo a partir da quantificação de heme total e da LDL oxidada através de kits específicos;

7. Determinar a capacidade da HBO em reduzir os níveis de expressão ICAM-1, em células endoteliais do pulmão humano (HLEC) e do cérebro de macacos *Saimiri* (SBEC), através de citometria de fluxo;
8. Avaliar a citoaderência em condições estáticas de parasitas *P. falciparum* selecionados para ICAM-1 (Pf^{ICAM}) em células HLEC e SBEC expostas, ou não, à HBO;
9. Verificar e quantificar a capacidade de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* selecionados para ICAM (Pf) de suportar pressões de fluxo em sistema mimetizador da pressão sanguínea após adesão em HLEC e SBEC previamente expostas, ou não, à HBO;
10. Avaliar a capacidade do oxigênio hiperbárico em inibir o crescimento parasitário *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

ENSAIOS *IN VIVO*

CAMUNDONGOS E PARASITAS DE ORIGEM MURINA

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 de 7 a 10 semanas de vida provenientes do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em condições SPF (*Specific Pathogen Free*) e todos os procedimentos foram analisados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal desta instituição (CEE/UNICAMP) (protocolo nº 1366-1 e 2200-1). Os animais foram infectados intraperitonealmente (i.p.) com 10^6 eritrócitos infectados (EI) com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), linhagem capaz de induzir malária cerebral. Como controle da indução da malária cerebral por este clone parasitário, foi utilizado EI de *Plasmodium berghei* NK65 (Pb-NK65), cepa incapaz de induzir malária cerebral. As formas sanguíneas dos dois parasitas 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. A parasitemia foi determinada diariamente por meio de esfregaços de sangue obtidos da cauda dos animais a partir do quarto 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 EI em 1.000 eritrócitos.

TRATAMENTO EM CONDIÇÕES HIPERBÁRICAS

Este tratamento seguiu o protocolo descrito previamente (Blanco *et al.*, 2008). Camundongos C57BL/6 foram divididos em dois grupos de 8-10 animais. Um grupo controle, não exposto à HBO, e um grupo exposto à 100% de oxigênio medicinal (White Martins), a pressão de 3,0 atmosferas absolutas (ATA), em câmara hiperbárica animal (*Research Chamber, model HB 1300B*, Sechrist Inc. Anaheim, CA, USA), sendo a exposição à HBO realizada em seções diárias de 1 hora, entre os dias 0 e 7 pós-infecção. A câmara foi pressurizada e despressurizada pela razão de 0.5 ATA / min..

RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

a) Remoção do cérebro para extração de RNA

Animais infectados previamente com 10^6 EI de *Plasmodium berghei* ANKA foram submetidos à perfusão, ou não, com PBS 1X entre os dias 6-8 pós-infecção, período do início das manifestações clínicas da malária cerebral. Os camundongos foram anestesiados com 200 μ L, por via intraperitoneal, de solução de ketamina (12,5%) e xilazina (7,5%) diluídas em PBS (80%). Em seguida, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical para remoção do cérebro. Em seguida macerou-se o cérebro em nitrogênio líquido e o pó resultante da maceração foi adicionado em 1 ml de *Trizol*® Reagent (Invitogen) para extração de RNA.

b) Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada com *Trizol*® Reagent, conforme protocolo descrito pelo fabricante. Para cada 50 μ g de tecido foram adicionados 1ml de *Trizol*®. Após homogeneização do tecido no *Trizol*®, a amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionaram-se 200 μ l de clorofórmio e em seguida a amostra foi novamente homogeneizada

por agitação durante 15 segundos, sendo deixada a temperatura ambiente por cerca de 15 minutos, quando então se evidenciava visualmente a formação de duas fases distintas.

Após a incubação a amostra foi centrifugada por 15 min à 14000 x g (4°C) e a fase aquosa (que contém o RNA) foi transferida para um tubo limpo, adicionando-se em seguida 500µl de isopropanol e 1µl de glicogênio ou LPA. Novamente a amostra foi centrifugada por 10 min à 14000 x g (4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 ml de álcool etílico 75%. Após agitação, o material foi novamente centrifugado, o etanol foi descartado e o RNA precipitado foi ressuspenso em 20µl de água *RNAse-free* e guardado em biofreezer (-80°C) para posterior produção de cDNA.

A extração de RNA foi quantificada através de espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo) e a integridade do mesmo foi observada por meio de gel de agarose.

c) Síntese de cDNA e real-time PCR

Análise da expressão de citocinas

A partir do RNA extraído iniciou-se a síntese de cDNA através do Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™ (Applied Biosystems), utilizando-se aproximadamente 2µg do RNA total extraído conforme o protocolo do fabricante. As reações de PCR foram realizadas com auxílio da plataforma ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), com o protocolo de ciclagem sendo: um ciclo de 50°C por 2 minutos, um ciclo de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As reações foram realizadas com volume de 25µL na presença do TaqMan PCR Master Mix™ (Applied Biosystems) e de diferentes oligos (β -actina, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e sondas. Todos os oligos utilizados foram fabricados pela Applied Biosystems e os números de referência dos master mix correspondentes estão listados: Rn00667869_m1 (β -actina), Mm00443258_m1 (IFN- γ), Mm00443285_m1 (TNF- α),

Mm00434228_m1 (IL-1 β), Mm00446190_m1 (IL-6) e Mm00439616_m1 (IL-10). A expressão dos níveis de citocinas nos animais infectados com PbA estão representados como o número de cópias relativas utilizando-se o método ($2^{-\Delta Ct}$) (Overbergh *et al.*, 2003).

Análise da expressão de ICAM-1

A partir do RNA extraído iniciou-se a síntese de cDNA através do Kit RNA Mini kit-Qiagen utilizando-se aproximadamente 1 μ g do RNA total extraído conforme o protocolo do fabricante. As reações foram realizadas com volume de 25 μ L sendo que o gene alvo foi quantificado utilizando-se *Gene Expression Assays* (Mn00516023-m1) om *TaqMan* PCR Master Mix™ (Applied Biosystems). A expressão dos níveis de RNA foram calculadas utilizando a ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), e normalizada com base na expressão do gene *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase* (HPRT). A diferença na expressão dos genes foi calculada utilizando o método ($2^{-\Delta Ct}$) (Overbergh *et al.*, 2003).

CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS ADERIDOS

NO CÉREBRO

a) Extração de leucócitos sequestrados do cérebro (LSC)

Camundongos infectados com PbA expostos ou não à HBO foram anestesiados com solução de ketamina (12,5%) e xilazina (7,5%) diluídas em PBS (80%) e em seguida perfundidos intracardicamente com PBS para a remoção dos leucócitos circulantes. Após a perfusão o cérebro foi coletado e macerado com auxílio do *Cell Strainer*® (BD) em meio RPMI completo. O material macerado foi lavado com 5 ml de meio completo e repassado novamente em *Cell Strainer*®. A solução celular foi então submetida à centrifugação durante 5 minutos à 1.500 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e o *pellet* ressuspendido em 10

ml de solução digestão e deixado sob agitação intensa durante 30 min. à temperatura ambiente. A solução foi filtrada em gaze e em seguida adicionou-se 10 ml de meio RPMI completo, sendo a solução novamente centrifugada durante 30 segundos à 500 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi depositado sobre um gradiente de 30% de *Percoll*® (GE) iso-osmótico e centrifugado durante 10 minutos à 3.000 x g e sem freio, a fim de evitar a desestruturação do gradiente. O sobrenadante obtido foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em meio completo acrescido de solução ACK (para retirada de hemácias), seguido de incubação durante 30 segundos à temperatura ambiente. Após a incubação com ACK, foram adicionados 14 ml de tampão FACS e a suspensão foi centrifugada por 5 minutos à 1.500 x g. O sobrenadante foi novamente removido e o *pellet* ressuspensionado em tampão de lavagem FACS.

b) Marcação e análise de citometria de fluxo dos LSC

A solução celular foi ressuspensionada em tampão de lavagem FACS e transferidas para tubos de citometria. Em seguida foram centrifugados (1.250 rpm por 10 minutos à 4°C) e o sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi então ressuspensionado em 500 µL de tampão de lavagem. Após esse procedimento, 100 µL da suspensão de células foram distribuídos em tubos de citometria, e marcados com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos específicos: FITC/anti-CD4 (clone H129-19), FITC/anti-CD8 (clone 53-6.7), PE/anti-TCR γδ (clone GL3) e APC/anti TCR αβ (clone H57-597). Após 15 minutos de incubação à 4°C no escuro, foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem, centrifugando-se por 10 minutos a 1.250 rpm à 4°C. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas por meio de agitação e adicionando-se 500 µL de tampão de lavagem, seguido de nova centrifugação (10 minutos à 1.250 x g à 4°C). Após novo descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas, sendo adicionados 200 µL de formaldeído 2%. Após a fixação as células foram

adquiridas em citômetro de fluxo (FACSCanto/Becton & Dickson). Para cada amostra um mínimo de 10.000 eventos foram adquiridos. A análise dos resultados foi executada em programa específico Diva™

c) Tampões e soluções utilizadas

Meio completo:

- RPMI-1640 medium (Sigma cat n°R4130) com 10% de soro fetal bovino.
- Gentamicina (40mg/L).

Solução digestão:

- 40mg colagenase D (Roche -catn°11 088 785103)- 50mg em 250 ml de Hepes.
- 150mg CaCL₂ (2H₂O).
- DNase 1000U (Roche cat n°12445800)- 1,25mg em 250 ml Hepes.
- 200 mL de tampão HEPES (0,6g Hepes/100 ml PBS 1x).

Ou utilizar os produtos Sigma:

- colagenase 0,25g (Sigma cat n° C0773); DNase 1000U (Sigma cat n°D4527), para 500 mL de tampão HEPES.

Percoll:

-O Percoll 100% é composto por 9 ml de Percoll (GE cat n° 17-0891-02) e 1 ml de PBS 10X, depois filtrado em filtro de 0,22µm.

-O Percoll 30% é composto por 3 ml de Percoll 100% do filtrado de 7 ml de meio completo (homogeneizar bem a suspensão).

Tampão FACS:

- 900 ml H₂O Milliq.
- 100 ml PBS 10x.
- 10 ml de soro fetal bovino de complementado.
- 0,1g de azida sódica (NaN₃).

Solução ACK:

- 8,29g NH₄CL.
- 1g KHCO₃
- 37,2mg de Na₂ EDTA.
- qsp 1 litro de Água, pH=7,2 -7,4 (acertar o pH com HCL 1N) – filtrar em filtro 0,22µm

MICROSCOPIA INTRAVITAL

Camundongos C57BL/6 infectados com 10⁶ EI PbA foram submetidos à microscopia intravital no 5º dia pós-infecção como previamente descrito por Vilela *et al.* (2009) e Lacerda-Queiroz *et al.* (2010). Os animais foram previamente anestesiados com Ketamina (100 mg/Kg) e Xylazina (16 mg/Kg) e mantidos a 37° C com auxílio de placa aquecida acoplada ao microscópio. Em seguida deu-se início à craniotomia na região parietal utilizando-se uma mini-broca (Beltec, Brasil), onde foram removidas a dura-máter e a aracnóide, possibilitando a visualização dos vasos sanguíneos da pia-máter. Para análise do fluxo sanguíneo nos vasos cerebrais foi utilizado um microscópio (Zeiss Axio ImagerA2), com objetiva de 10X, com câmera acoplada para gravação das imagens. Após a localização dos vasos a serem estudados, inoculou-se intravenosamente 50 µl do corante rodamina 6G (Sigma, St. Louis MO) na concentração de 1 mg/ml. A rodamina é um corante fluorescente que se acumula nas mitocôndrias e possibilita a visualização dos leucócitos sob velocidade de fluxo (Batz *et al.*,

1995). As imagens adquiridas foram analisadas através do programa ImageJ software, e as células marcadas com rodamina aderidas, ou não, foram contabilizadas. Considerou-se como aderidos aqueles leucócitos que permaneceram por 30 segundos ou mais estacionados no endotélio. A contagem dos leucócitos aderidos foi expressa como células aderidas ao endotélio em 100µm de comprimento do vaso. A velocidade (pixel/ms) das células coradas com rodamina 6G foi determinada através da análise dos filmes gravados de cada condição (não infectado, infectado com *P.berghei* NK65, infectado com *P.berghei* ANKA e infectado com *P.berghei* ANKA exposto a HBO) pelo programa ImageJ software Plug-in in 3-4. Após o procedimento os animais foram sacrificados por meio de injeção de alta dosagem de anestésico (ketamina e xylazina).

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE INOS, ENOS E NNOS POR WESTERN BLOT

a) Western blot

Para a extração de proteínas totais dos cérebros armazenados, estes foram homogeneizados em tampão de extração. As amostras foram subsequentemente centrifugadas a 12.000g à 4°C por 15 min., sendo retirado o sobrenadante que contém o extrato das proteínas totais do tecido. A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Ao equivalente a 100µg de proteínas totais de cada amostra foi adicionado um volume igual de tampão de amostra Laemmli (Laemmli, 1970). Em seguida, as amostras foram mantidas por 5 minutos em banho-maria à 95°C, e então submetidas a eletroforese, com SDS, em gel de 8% de poliacrilamida. As proteínas contidas no gel foram eletrotransferidas por 90 minutos a 120 V para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) (Towbin *et al.*, 1979). Os sítios de ligações inespecíficas da membrana foram bloqueados com 20 ml de solução de 5% leite desnatado em pó, 50mM PB PH 7.4, 150mM NaCl, 0,01% Tween 20 (PBS-tween+leite) por 1 hora. A membrana foi subsequentemente incubada com anticorpo

anti-eNOS (Santa Cruz, Biotechnology Inc, USA), anti-iNOS (Santa Cruz, Biotechnology Inc, USA), ou anti-nNOS (Santa Cruz, Biotechnology Inc, USA), diluído 1:1.000 em 10 ml de tampão PBS-tween contendo 3% BSA, por 12h à 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então lavada por 5 minutos com solução PBS-tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Zymax – Zymed Laboratories) diluída 1:10.000 em 10 ml de PBS-tween + 3% de leite desnatado em pó, por 1h à temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS-tween, sendo as bandas imunorreativas detectadas por autoradiografia em um filme Kodak GBX2 utilizando-se do kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce). A densidade óptica das bandas imunorreativas foi determinada por densitometria óptica digital (Scion Image Software), sendo os valores obtidos expressos em relação às densidades ópticas das bandas de α -Tubulina empregada como controle interno.

b) Tampões e soluções utilizados

Tampão de extração de proteína

- 0,5 ml de EDTA pH 7,4 (0,01 M)
- 1 ml de Trizma base (Tris-HCl) pH 7,4 (0,1mM)
- 0,045g de Pirofosfato de sódio (10 mM)
- 0,042g de Fluoreto de Sódio (100 mM)
- 0,0189g de Ortovonadato de sódio (10mM)
- 100 μ L de Triton (1%)
- Coquetel inibidor de protease 1% (Sigma)

Tampão de transferência

- 6,05g de Trisma base
- 8,82g de Glicina
- 0,4g de Dodecil sulfato de sódio (SDS)
- 400 ml de Metanol
- q.s.p. 2.000 ml de Água Milli-Q

Dissolver o trisma base, a glicina e o SDS em aproximadamente 1.200 ml de água Milli-Q, sob agitação constante. Em seguida acrescentar o metanol e completar o volume para 2 litros com água Milli-Q.

Tampão de revelação

- 12,11g de Trisma base
- 5,84g de Cloreto de sódio (NaCl)
- 1,016g de Cloreto de magnésio (MgCl₂)
- q.s.p. 1000 ml Água Milli-Q

Dissolver todos os reagentes em aproximadamente 950 ml de água destilada, acertar o pH para 9,5 e completar o volume para 1.000 ml em balão volumétrico. Estocar em geladeira à 4°C. No momento do uso adicionar 0,016% de NBT (Nitroblue Tetrazólico) e 0,008% de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-fosfatase).

Solução Fixadora do gel

- 50% de Metanol
- 10% de Ácido acético
- 40% Água destilada

Solução corante do gel

-0,2% de Coomassie Brilhante Blue R 250

-45% de Metanol

-10% de Ácido acético

-9% de Água destilada

Solução descorante do gel

-45% de Metanol

-10% de Ácido acético

-45% de Água destilada

Tampão Trisma Salino (TBS)

-12,11g de Trisma base

-9g de Cloreto de sódio

-q.s.p. 1.000 ml de Água destilada

Ajustar o pH 7,6 e armazena em geladeira a 4°C.

Tampão de bloqueio

-5% de Leite desnatado

-95% de Tampão trisma (TBS)

Tampão de lavagem

-0,1% de Tween 20

-99,9% de Tampão trisma (TBS)

DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

HEME TOTAL

Camundongos C57BL/6 de 7-10 semanas foram infectados com 10^6 EI de PbA e expostos, ou não, à HBO (100% O₂, 3ATA, 1hora) e tiveram o sangue coletado no sexto dia pós-infecção para determinação da quantidade total de heme no plasma. Utilizou-se ensaio colorimétrico através do kit QuantiChromheme assay kit (Bioassay Systems), conforme protocolo descrito pelo fabricante e previamente descrito (Andrade *et al.*, 2010).

DETERMINAÇÃO DA LDL OXIDADA

Quantificação da oxLDL no soro

Os animais foram anestesiados com solução contendo Ketamina (12,5%) e Xilazina (7,5%) diluídas em PBS (80%) e tiveram o sangue total coletado da veia cava utilizando-se do EDTA como anticoagulante na proporção de 10% do volume total de sangue. Para obtenção do plasma, o sangue coletado foi centrifugado à 1.000 g, à 4°C, por 15 min., em seguida adicionou-se ao plasma Benzamidina (2 μ mol/l), Gentamicina (0.5%), Chloramphenicol (0.25%), Phenyl-methyl-sulfonylfluoride (0.5 μ mol/l) e Aprotinina (0.1 unit/ml).

A quantificação da LDL oxidada no soro de camundongos infectados PbA expostos, ou não, à HBO e controles não infectados, foi realizada pelo Kit oxLDL β 2GP (Cayman, USA) conforme indicado pelo fabricante e com algumas modificações.

Amostras de plasma e do padrão foram diluídos em tampão carbonato / bicarbonato, pH 9,6 e em seguida incubadas à 4°C *overnight*, em uma placa de polivinilde 96 poços (Corning) previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal anti complexo- β 2GP. Em seguida a placa foi lavada (4X) com PBS 1X e bloqueada com 3% de gelatina em temperatura ambiente por 2h, afim de reduzir a ligação de proteínas não-específicas durante o ensaio. Após o bloqueio a placa foi lavada novamente com PBS 1X (4X) e em seguida adicionou-se aos poços anticorpo

monoclonal anti-LDL oxidado. Para detectar a presença de anticorpo ligado foi adicionado peroxidase conjugada com anticorpo de cabra contra IgG de camundongo (KPL-Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland, USA) diluído em PBS 1X. Após a lavagem, 50 μ l de substrato enzimático TMB ELISA (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA - EUA) foi adicionado por poço. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ l 0,1M de H₂SO₄. Os resultados foram calculados através da utilização da curva padrão e expressos em microgramas de oxLDL.

ENSAIOS IN VITRO

CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Nos ensaios de citoadesão foram utilizadas células endoteliais do pulmão humano (HLEC) e do cérebro de macacos *Saimiri* (SBEC). Ambas as linhagens celulares foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jurg Gysin (Université de La Méditerranée, Marseille, França). As células foram cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 30 µg/ml fator de crescimento de células endoteliais (ECGS, Sigma) e 10% de soro fetal bovino e foram mantidas em incubadora com pressão constante de 5% de CO₂ e 37°C.

a) Tampões e soluções utilizadas

Meio de cultura:

- DMEM-F12 (Nutricell)
- ECGS (Sigma, E0760) 30 µg/ml.
- 10% Soro Fetal Bovino

Meio de congelamento:

- DMEN-F12,
- 40% de SFB
- 8% de DMSO (Sigma, R4540).

CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO

Células HLEC ou SBEC, tratadas ou não com LPS (1µg/ml) e submetidas ao tratamento em câmara hiperbárica (3 ATA, 2horas), foram coletadas (aproximadamente 1×10^6 células) por meio da lavagem de placas de 6 poços com o auxílio de *cell scraper* com tampão de lavagem. A suspensão de células foi transferida para tubos de citometria, centrifugada (1.250 rpm por 10 minutos à 4°C) e o sobrenadante descartado, o *pellet* de células foi então ressuspensionado em 500µL de tampão de lavagem. Após esse procedimento, 100µL da suspensão de células foram distribuídos em tubos de citometria e foram adicionados os anticorpos para marcação de superfície: anti-CD54 (ICAM-1; PE), anti-CD62E (E-Selectina; FITC) e anti-CD36 (FITC), assim como os anticorpos utilizados como controle de isotipo (todos os anticorpos BD Bioscience). Após 15 minutos de incubação à 4°C no escuro, foram adicionados 500µL de tampão de lavagem, centrifugando-se por 10 minutos a 1.250 rpm à 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensionadas (vortex), adicionando-se 500µL de tampão de lavagem, seguido de nova centrifugação (10 minutos a 1.250 rpm à 4°C). Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas, sendo adicionados 200µL de formaldeído 2%. Após a fixação as células foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACSDiva/Becton & Dickson). Para cada amostra um mínimo de 100.000 eventos foram adquiridos. A análise dos resultados foi executada em programa específico (FSC Express v.3.00.0320 – De Novo Software), sendo analisada a porcentagem de células positivas, assim como a Média de Intensidade de Fluorescência (“Mean Fluorescence Intensity” - MFI) de cada marcador.

a) Tampões e soluções utilizados

Tampão de lavagem

-PBS-BSA (0,1%)

-NaN₃ (0,2mM)

CULTIVO DE FORMAS SANGUÍNEAS DE *Plasmodium falciparum*

Nos ensaios parasitários *in vitro* foi utilizado o isolados de *Plasmodium falciparum* FCR3 (Africa-Gambia). Eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* (EIPf) foram cultivados em sangue O+ de acordo com Trager & Jensen (1976), em sistema de *Candle Jar*. Eritrócitos infectados (EI) foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma) com 10% de plasma humano e sangue humano O+ hematócrito 5%. A parasitemia foi monitorada diariamente por meio de esfregaços e a parasitemia máxima mantida em 4% de formas maduras (trofozoítas e esquizontes) e 8% de formas jovens (anel) como descrito por Lopes *et al.* (2009).

a) Tampões e 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 40mg/ml (Schering-Plough).

O pH é ajustado para 7,2 com bicarbonato de sódio (Sigma, S5761) e o meio é filtrado em membrana de 0,22µm no fluxo laminar. Adiciona-se então 10% de plasma humano

(Hemocamp-Hemocentro/Unicamp). O plasma é previamente inativado em banho-maria a 52°C por 1 hora.

Concentrado de hemácias:

O concentrado de hemácias (Hemocamp-Hemocentro/Unicamp) foi lavado com meio RPMI e estocado adicionando-se 2 volumes do meio RPMI contendo 10% de plasma (Hemocamp-Hemocentro/Unicamp).

Meio de congelamento (Glycerolyte):

- 45% de glicerina (Synth – G1-005),
- KCl 5mM (J. T. Backer 3040-01)
- 31 g/l de sódio lactato líquido (Sigma – L4263).

Soluções para descongelamento:

- NaCl 12% pH 6,0
- NaCl a 1,6% pH 5,5.

ENRIQUECIMENTO DE ESTÁGIOS TROFOZOÍTAS DA CULTURA DE *P. falciparum*

O enriquecimento das formas maduras (< 24 horas, trofozoítas e esquizontes) 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. O gradiente foi deixado em um tubo na posição vertical, à 37°C durante 1 hora. Após este período, a fase superior, contendo as formas maduras, foi removida e lavada com meio RPMI sem plasma e utilizada nos ensaios de citoadesão.

SELEÇÃO DE FORMAS SANGUÍNEAS DE *P. falciparum* MONOFENOTÍPICAS - PANNING

Esta técnica foi baseada no protocolo de Scherf *et al.* (1998) e tem como objetivo a seleção de parasita monofenotípicos. Células endoteliais CHO capazes de expressar apenas um receptor (ICAM) foram crescidas até a confluência em garrafas de 75 cm³. Eritrócitos infectados 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 1h à 37°C, o excesso de parasitas não aderidos foi removido por meio de lavagens em meio RPMI pH 6,8. Em seguida, foi adicionado meio RPMI pH 7,2 para liberar apenas EI capazes de se ligarem a ICAM. Após incubação de 30 min, 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.

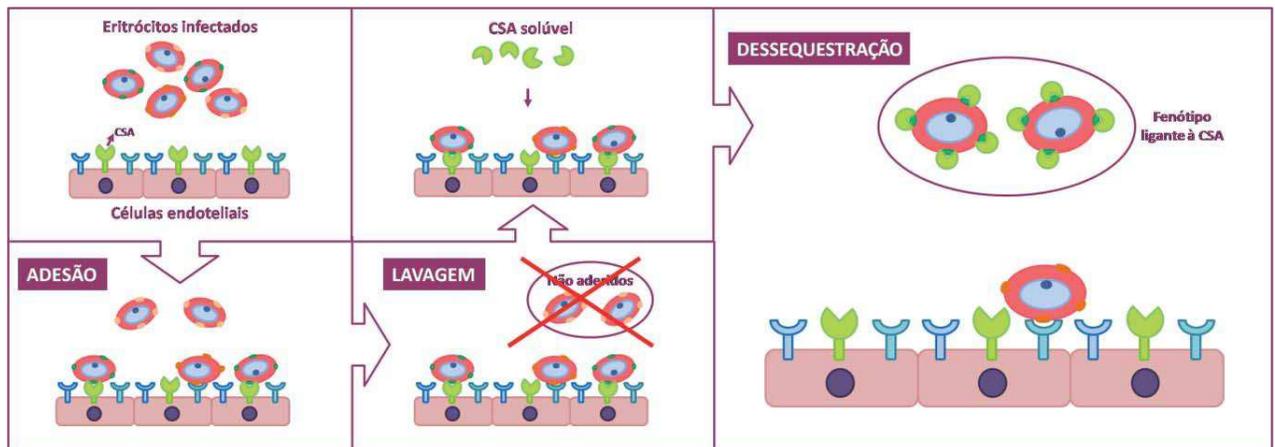


Figura 5: Esquema seleção de EIPf monofenotípicos (Panning)

ENSAIOS DE CITOADESÃO COM ERITRÓCITOS INFECTADOS COM *P. FALCIPARUM* EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

a) Em condições estáticas:

Esses ensaios foram realizados de acordo com protocolo descrito por Costa *et al.* (2003) e Pouvelle *et al.* (2003). Cerca de 5×10^4 células HLEC ou SBEC foram cultivadas em lâminas para cultivo celular de 8 poços (*Culture Slides*, Becton & Dickinson) com cerca de $0,69 \text{ cm}^2$ cada, por 2 dias até atingirem total confluência. Em seguida foram ou não estimuladas com $1 \mu\text{g/ml}$ LPS durante 4 horas sendo posteriormente expostas ou não à HBO (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist (2horas, 3ATA, $100\% \text{O}_2$)).

Os parasitas foram enriquecidos e em seguida ressuspensos em meio RPMI pH 6,8. Após a exposição das células à HBO a suspensão (1×10^6) de EI foi adicionada a cada poço e deixada a 37°C durante 1 hora. Após este período, os eritrócitos não aderidos foram removidos por meio de extensivas lavagens em meio RPMI. As lâminas foram fixadas com e coradas com o kit Panótico Rápido (Laborclin) para posterior contagem do número de EI/mm²

b) Em condições de fluxo:

Cerca de 5×10^5 células HLEC ou SBEC foram cultivadas em lâminas para cultivo celular de 1 poços (*Culture Slides*, Becton & Dickinson) com cerca de $0,86 \text{ cm}^2$, por 2 dias até atingirem total confluência. Em seguida foram ou não estimuladas com $1 \mu\text{g/ml}$ LPS durante 4 horas sendo posteriormente expostas ou não à HBO (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist (2horas, 3ATA, $100\% \text{O}_2$))

Com o intuito de verificar a capacidade adesiva de EI em condições similares àquelas do fluxo sanguíneo, e de verificar a força de interação de EI com a monocamada endotelial, após a exposição ou não à HBO (1 hora, 3 ATA) ou estimulação com LPS. Uma suspensão de EI de *P. falciparum*, FCR3^{ICAM} foi introduzida no sistema de fluxo a uma pressão de 0,05 a 1,44 Pascal (Pa). Após a completada passagem da solução de EI sobre a monocamada celular, o número de parasitas capazes de permanecer ligadas ao endotélio foi determinado como a média \pm desvio padrão de 20-30 campos, escolhidos aleatoriamente.

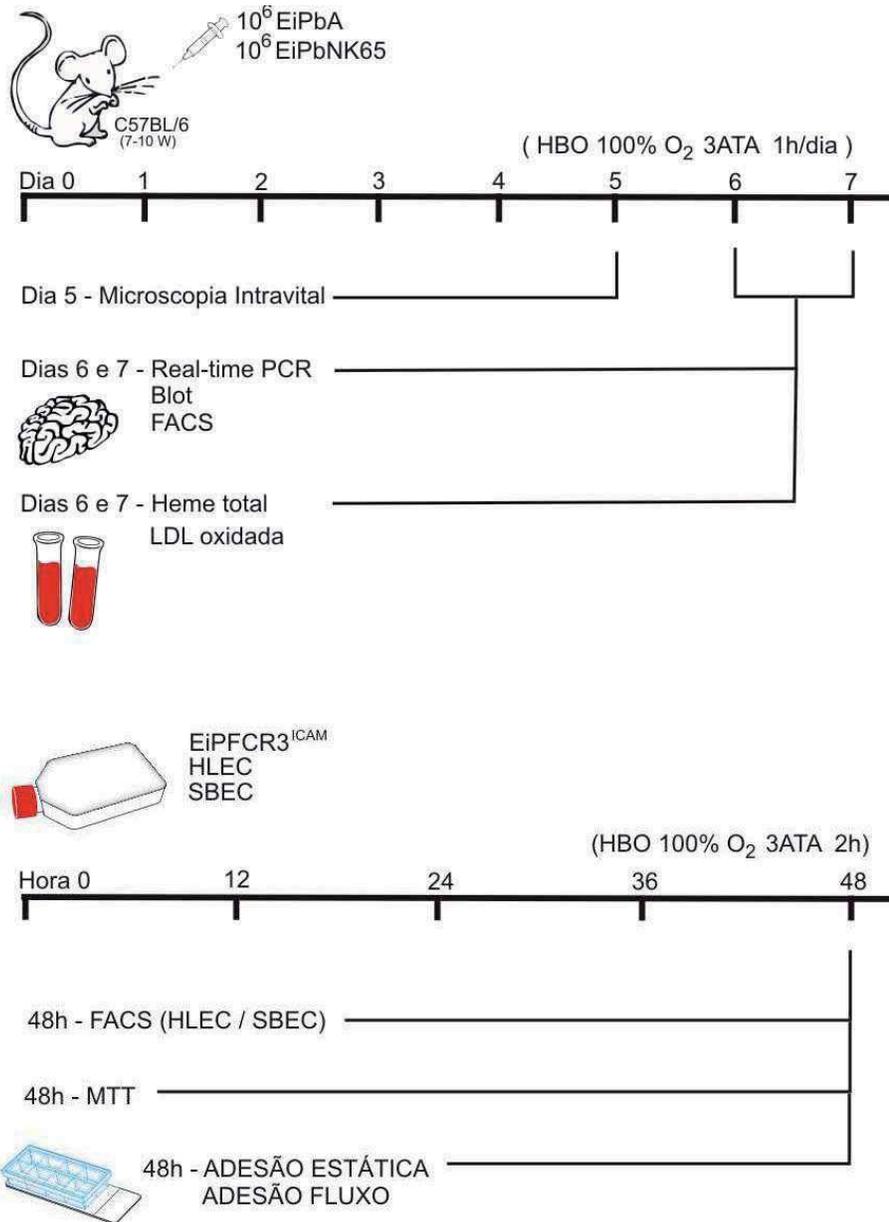
ENSAIOS DE INIBIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO PARASITÁRIO (EIP)

Para avaliar a capacidade do oxigênio hiperbárico em inibir o crescimento parasitário utilizamos cultura não sincrônica de parasitas *P. falciparum* FCR3^{ICAM}. A parasitemia e hematócrito foram ajustados para 2% e 4% respectivamente. Foram utilizadas dois métodos distintos. Os parasitas foram incubados em placas de 96 poços em quadruplicata e expostos ou não à HBO (2 horas, 3ATA, $100\% \text{O}_2$). Após 48 horas 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.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises estatísticas de significância foram realizadas por meio do teste Mann-Whitney, ANOVA um critério ou Kruskal Wallis. As diferenças entre as taxas de letalidade foram analisadas pelo teste de Log-Rank. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa BioEstat versão 3.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (FIGURA 6)



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos estudos realizados anteriormente demonstramos que a terapia com oxigenação hiperbárica foi capaz de promover um efeito protetor contra a malária cerebral murina. Pudemos observar ainda que animais infectados com PbA e tratados diariamente durante 1 hora com HBO (100% O₂, 3 ATA) do dia 0 ao dia 7 pós-inoculação, apresentaram significativa diminuição no desenvolvimento de MC e, conseqüentemente, redução significativa na taxa de mortalidade quando comparados ao grupo controle (não exposto) Além disso, pudemos observar uma redução significativa ($P < 0,05$) da parasitemia dos animais infectados pelo *P. berghei* ANKA expostos à HBO nos dias 4 e 6 após a infecção (Blanco *et al.*, 2008). É importante ressaltar que o protocolo de exposição ao oxigênio hiperbárico utilizado não teve efeitos deletérios em hemácias sadias, sendo que animais não infectados mantiveram a quantidade de hemácias inalteradas após a exposição contínua a HBO. Estes animais também não tiveram sua mortalidade alterada, indicando que o protocolo escolhido para tratamento não é tóxico aos camundongos (Blanco *et al.*, 2008).

A partir desses resultados, novos experimentos foram realizados a fim de entender como a terapia com oxigênio hiperbárico é capaz de alterar a patogênese da malária cerebral, reduzindo os sintomas e prolongando a vida dos animais infectados.

Diversos estudos indicam o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-10, TNF- α , IFN- γ) e a participação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, principalmente, como fatores essenciais para o desenvolvimento da patogênese da MC (Belnoue *et al.*, 2004). Dessa maneira, baseado na redução da adesão de leucócitos promovido pela terapia hiperbárica e pela sua ação anti-inflamatória descrita em modelos de isquemia, analisamos a expressão dos níveis de diferentes citocinas no cérebro de animais infectados tratados ou não com HBO. Para isso, grupos compostos por 5 animais cada foram expostos ou não à HBO e tiveram seus cérebros removidos, seguido da extração de RNA (Figura 7) e síntese de cDNA para ensaios de

RT-PCR em tempo real com o intuito de quantificar os níveis de expressão de diferentes citocinas.

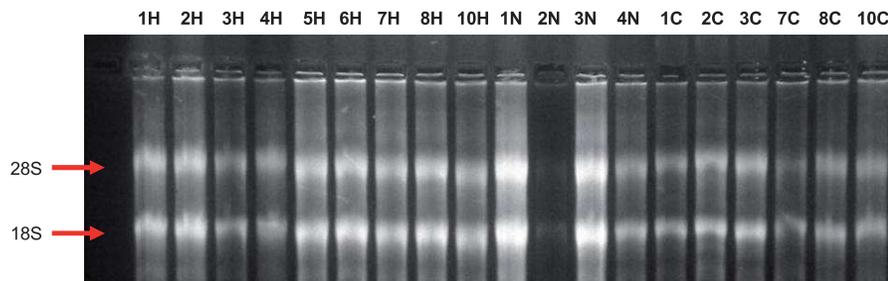


Figura 7: Produtos da extração de RNA do cérebro de animais infectados com PbA expostos ou não a HBO (100% O₂, 3 ATA, 1 hora) observado em gel de agarose 1,5% contendo 2,2M de formaldeído em tampão MOPS1X, corados com brometo de etídio. H= animais infectados e expostos à HBO (PbA HBO); N=animais não infectados (naive); C= Animais infectados e não expostos à HBO (PbA)

Como podemos notar na figura 8 houve redução significativa na expressão de IFN- γ ($P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.01$) e IL-10 ($P < 0.05$) no cérebro dos animais tratados com HBO em relação aos não tratados. A redução de IL-10 observada pode estar relacionada à redução de outras citocinas como TNF- α e IFN- γ . No entanto, não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) na expressão dos níveis de IL-1 β e IL-6. Os controles negativos utilizados para amplificação não foram capazes de gerar produtos de amplificação e todos os cDNAs foram amplificados na presença de oligonucleotídeo de β -actina (controle endógeno positivo) indicando boa qualidade dos cDNAs.

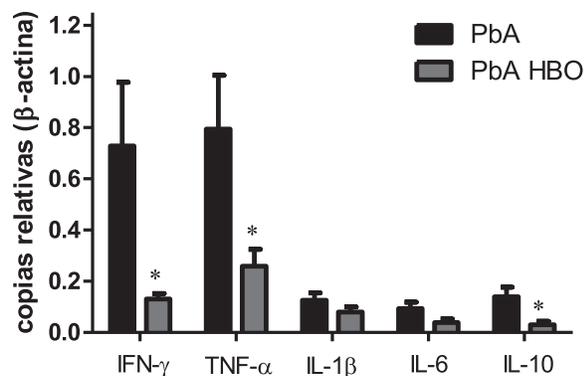


Figura 8: HBO altera a expressão dos genes das citocinas em animais infectados com PbA. Grupos de 6-7 animais camundongos infectados com 10^6 EI de *P. berghei* ANKA diariamente expostos, ou não à HBO durante 1 h a partir do dia 0 até o dia 7 (100% O₂, 3 ATA) tiveram seus cérebros coletados no dia 7 para análise dos níveis de expressão de mRNA por *real-time* PCR. Nota-se redução significativa na expressão de TNF- α , IFN- γ e IL-10, no entanto não houve diferença significativa na expressão de IL-1 β e IL-6 dos animais expostos em relação aos não expostos. Valores foram expressos como as médias das cópias específicas das citocinas em relação às cópias específicas de β -actina (*) representam $P < 0.05$; PbA HBO vs PbA (Mann-Whitney).

Diversos estudos demonstram que a patogênese da MC está relacionada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias. Análises *post-mortem* de cérebros de crianças e adultas vítimas de malária cerebral revelaram uma alta expressão de marcadores imunológicos como TNF- α e IFN- γ , IL-10 e IL-1 β , os quais normalmente não são expressos, nos macrófagos cerebrais (Medana & Turner, 2006; Hunt & Grau, 2003; Taylor *et al.*, 2004; Prakash *et al.*, 2006). Além disso, análises de plasma de pacientes com MC revelam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β e TNF- α (Peyron *et al.*, 1994; De Kossodo & Grau, 1993), o que possivelmente está relacionado ao aumento da expressão de ICAM-1, envolvido na adesão de EI e leucócitos no endotélio cerebral (Craig & Scherf, 2001; Grau & De Kossodo, 1994; Beremdt *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989). Por fim, estudos demonstraram que a neuroproteção

em malária cerebral experimental está geralmente associada à redução dos níveis de citocinas como TNF- α e IFN- β (Medana *et al.*, 1997; De Kossodo & Grau 1993; Jennings *et al.*, 1997). Tendo em vista a importância das citocinas pró-inflamatória no desenvolvimento da patogênese da MC, a redução dessas citocinas promovida pela exposição a HBO torna-se um importante ponto no combate as complicações das infecções maláricas.

A migração de células TCD8 para o cérebro tem sido apontada como um fator importante no desenvolvimento da patogênese da malária cerebral experimental, contribuindo para o aparecimento dos sintomas e quebra da barreira hemato-encefálica, levando à morte associada a MC (Belnoue *et al.*, 2002; Nitchou *et al.*, 2003; Pino *et al.*, 2005; Renia *et al.*, 2006). Por esta razão avaliamos os efeitos da HBO na adesão de linfócitos TCD4 e TCD8 no cérebro dos animais infectados. Sendo assim, animais C57BL/6 infectados com PbA tiveram o cérebro coletado no sétimo dia pós-infecção e os leucócitos aderidos foram extraídos. Análises quantitativas foram realizadas através de citometria de fluxo e demonstraram que os animais infectados e expostos à HBO tiveram redução de linfócitos T CD4 $\gamma\delta$ (1,9 vs 1,2%) e $\alpha\beta$ (7,0 vs 4,2%) (Figura 9) e uma redução mais expressiva de 2,5 vezes de TCD8 $\gamma\delta$ (7,1 vs 2,82%) e $\alpha\beta$ (43,1 vs 17,7%) em relação a animais não-expostos (Figura 9). Tais resultados indicam um efeito neuroprotetor da HBO relacionado à redução do sequestro de leucócito T CD4+ e CD8+ no cérebro de animais infectados. Estes achados corroboram com outros achados que indicam que o tratamento com oxigênio pressurizado é capaz de reduzir a expressão de citocinas como TNF- α e IFN- γ e presença de linfócitos T, assim como é capaz de reduzir a migração de células imunocompetentes e promover a melhora nos transplantes de tecido através da regulação das funções do sistema linfóide (Lahat *et al.*, 1995; Gadd *et al.*, 1990; Granowitz *et al.*, 2002; Al-Waili *et al.*, 2005).

Desta maneira, pudemos observar a ação antiinflamatória promovida pela terapia com oxigênio hiperbárico, através da redução na expressão de IFN- γ ($P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.01$) e IL-10 no cérebro dos animais expostos à HBO em relação aos não expostos. Demonstramos ainda que os animais infectados e expostos à HBO tiveram redução de linfócitos TCD4 e TCD8 em relação à animais não-expostos, sugerindo um efeito neuroprotetor da HBO relacionado à redução da sequestração de leucócitos no cérebro de animais infectados.

O bloqueio do fluxo sanguíneo cerebral, a vasoconstrição e a oclusão vascular devido a adesão de leucócitos são fenômenos comuns na patogênese da malária cerebral (Dondorp *et al.*, 2003; Van der Heyde *et al.*, 2006; Francischetti *et al.*, 2008), por esse motivo utilizamos a técnica de microscopia intravital em tempo real, a qual tem sido uma importante ferramenta para o entendimento de fenômenos órgão-específico como no caso da malária cerebral murina. Através desta técnica podemos avaliar em tecido translúcido ou naqueles não translúcidos como o cérebro, com auxílio da epifluorescência, eventos de rolamento e adesão (Ley, 2001). Desta maneira, grupos de 5 camundongos C57BL/6 não infectados, infectados com *P.berghei* NK65 ou com *P.berghei* ANKA expostos ou não à HBO (100% O₂, 3 ATA), tiveram seus leucócitos marcados com o fluorocromo rodamina 6G no dia 5 pós-infecção e observados através da microscopia intravital. Dessa maneira pudemos verificar a interação leucócito-endotélio na microvasculatura da pia-máter.

Conforme mostrado nas Figuras 10A-B, houve uma redução significativa da adesão de leucócitos no endotélio cerebral de animais infectados com *P.berghei* ANKA e expostos à oxigenação hiperbárica em comparação aos animais infectados com PbA e não expostos. Não houve diferença significativa notada entre os animais infectados com PbA e expostos à HBO e aqueles infectados com Pb NK65, que foram utilizados como controle já que esta linhagem não é capaz de induzir malária cerebral. Além disso, é possível notar através das filmagens que os animais infectados com PbA e expostos à HBO demonstram velocidade do fluxo sanguíneo

maior que aqueles infectados e não expostos à HBO.

Para análise da velocidade das células coradas com rodamina 6G um grupo de imagens de três frames seguidos foi sobreposto, sendo que a cor vermelha indica o primeiro frame, o verde o segundo e o azul o terceiro. Basicamente dois tipos de populações foram observadas, as células com alta velocidade, indicadas com o triângulo branco, e as células de baixa velocidade (células que se arrastam no endotélio) indicadas com o triângulo cinza. Podemos notar na Figura 11 que os animais infectados e não expostos a HBO exibem um maior número de células aderidas (quadrados amarelos) ao endotélio, assim como a presença de células de baixa velocidade, as quais não são vistas nos demais grupos (PbAHBO, NK65 e Não-infectado). Na Figura 11 a velocidade das células marcadas é expressa em pixel por milissegundos, sendo que os pontos vermelhos indicam a média da velocidade das células de cada grupo.

A diferença na velocidade, assim como o comportamento destas células pode ser observada na Figura 11 e visualizada/ acessada nas filmagens em tempo real nos seguintes links http://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/Costa_FTM/videos_yara/PbA.mov (Grupo de animais infectados com *P.berghei* ANKA), http://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/Costa_FTM/videos_yara/PbA%20HBO.mov (Grupo de animais infectados com *P.berghei* ANKA e expostos à HBO) (http://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/Costa_FTM/videos_yara/NK65.mov (Grupo de animais infectados com *P.berghei* NK65) e http://www2.ib.unicamp.br/branco/parasit/Costa_FTM/videos_yara/Non-infected.mov (Grupo de animais não-infectados).

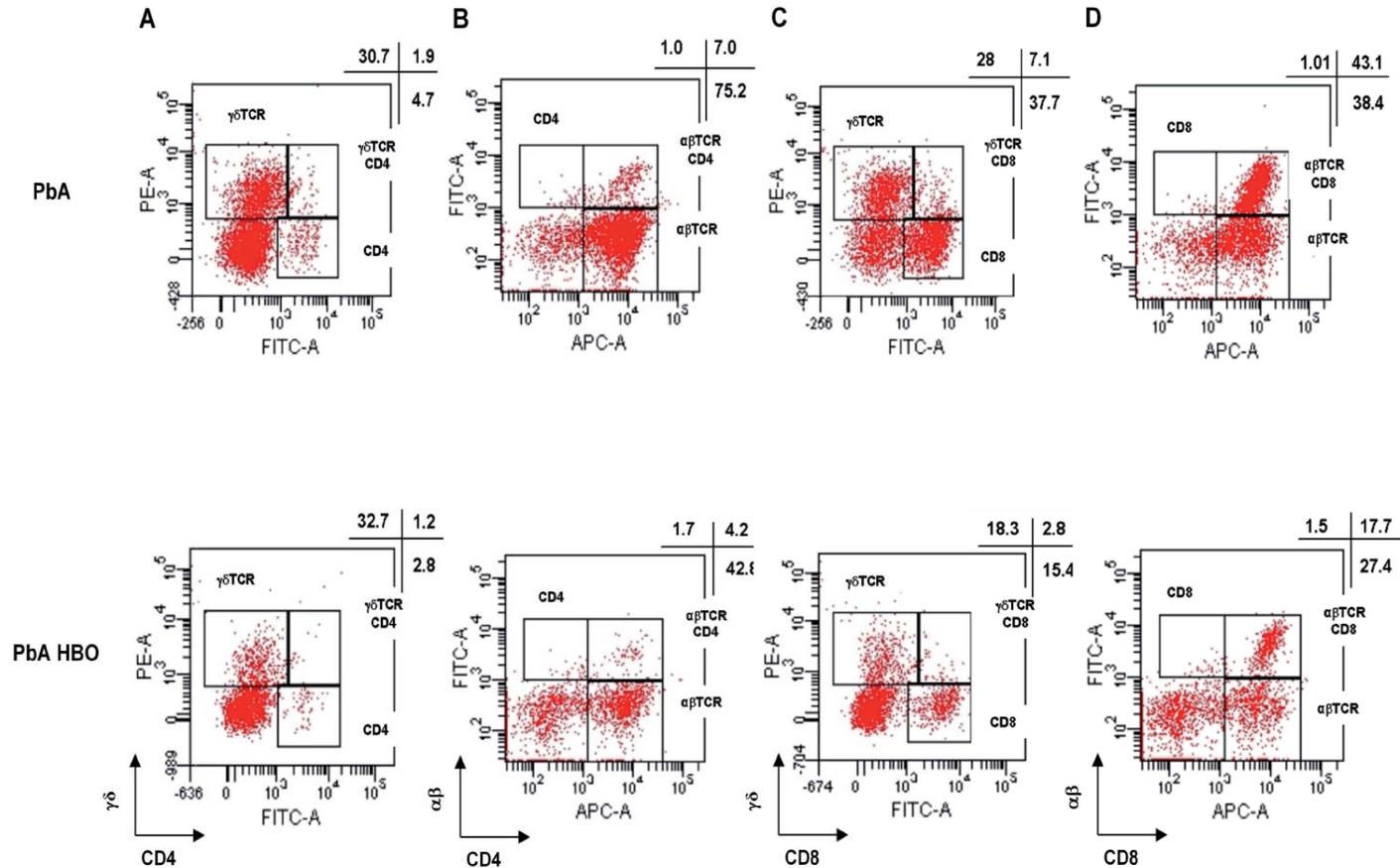


Figura 9 Redução da adesão de linfócitos TC4 e TCD8 no cérebro de animais infectados com PbA e expostos à HBO. Camundongos C57BL/6 foram infectados 10^6 EI de *P. berghei* ANKA diariamente expostos, ou não, à HBO durante 1 h a partir do dia 0 até o dia 7 (100% O₂, 3 ATA). Os animais foram perfundidos, seus cérebros foram removidos para extração dos leucócitos aderidos. Análises de citometria de fluxo indicam uma redução na porcentagem de leucócitos TCD4 $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ e TC8 $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ aderidos no endotélio cerebral. (a) $\gamma\delta$ e CD4 (B) $\alpha\beta$ e CD4 (C) $\gamma\delta$ e CD8 (D) $\alpha\beta$ e CD8

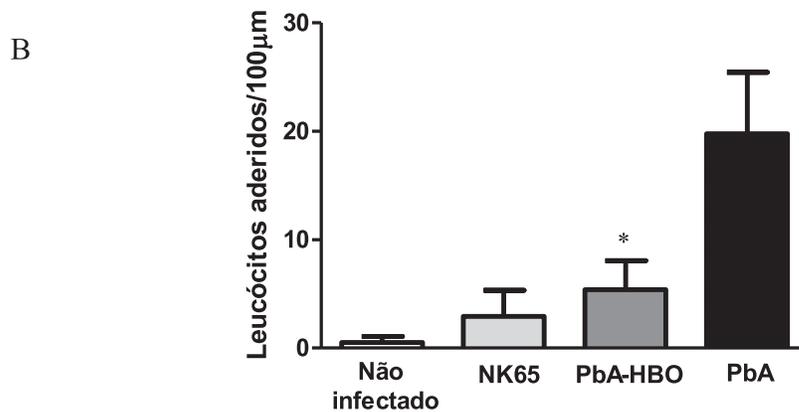
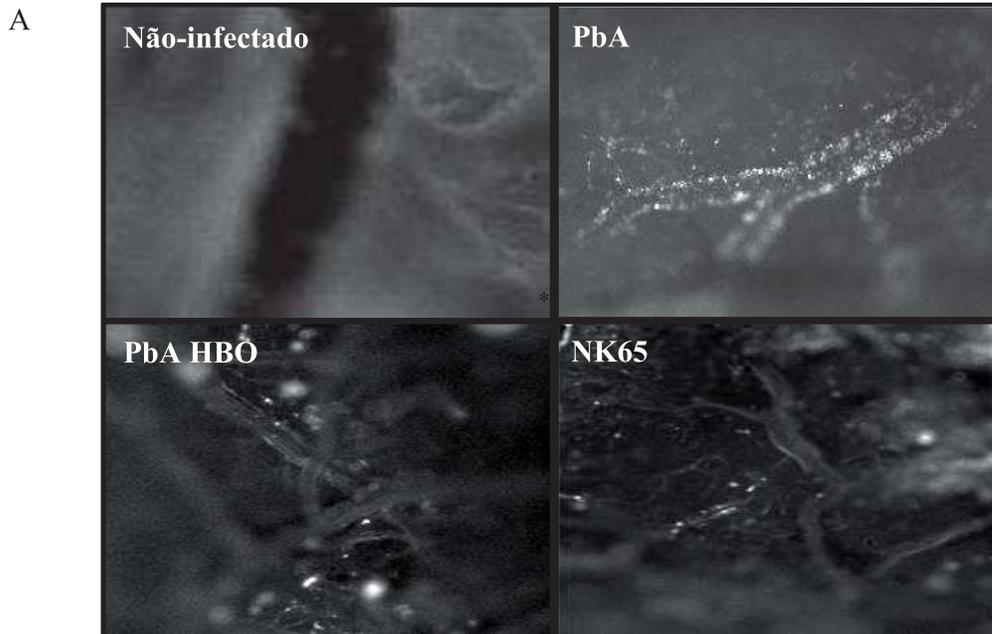


Figura 10: HBO reduz a adesão de leucócitos no endotélio cerebral de camundongos C57BL/6 infectados com PbA. Os ensaios de microscopia intravital foram realizados no dia 5 pós-infecção, com grupos (n=5) não-infectados, animais infectados com *Plasmodium berghei* NK65 (NK65) ou infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) expostos ou não à HBO (100% O₂, 3 ATA, 1 hora/dia). (A) Fotomicrografia representativa de cada grupo. (B) Adesão de leucócitos: os resultados são expressos como a média de leucócitos aderido por 100 µm de pelo menos 4 vasos (30-70µm de diâmetro) ± SEM. (*) representam $P < 0.05$; PbA HBO vs PbA (Kruskal-Wallis).

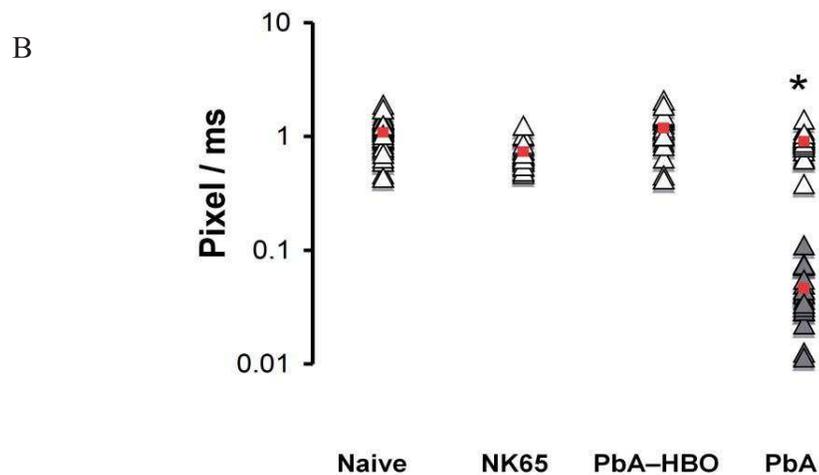
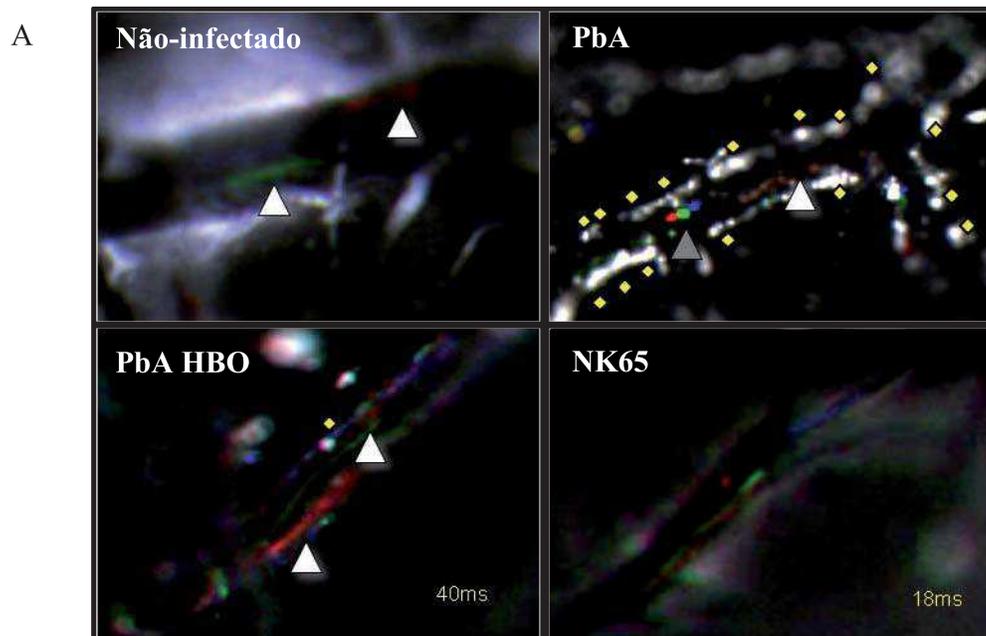


Figura 11: HBO aumenta o fluxo sanguíneo no endotélio cerebral de camundongos C57BL/6 infectados com PbA. Os ensaios de microscopia intravital foram realizados no dia 5 pós-infecção, com grupos (n=5) não-infectados, animais infectados com *Plasmodium berghei* NK65 (NK65) ou infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) expostos ou não à HBO (100% O₂, 3 ATA, 1 hora/dia). (A, B) Velocidade da microcirculação das células marcadas com rodamina 6G. (Δ) indicam células com alta velocidade, (\blacktriangle) representam as células com baixa velocidade que se arrastam pelo endotélio e os pontos vermelhos indicam a média de velocidade das células marcadas.

Diversos estudos indicam o processo de citoadesão de eritrócitos infectados (EI) na microvasculatura cerebral como responsável pelos aspectos patológicos da MC. Sabe-se que esta adesão ocorre devido a capacidades dos EI de se ligarem a diferentes receptores expressos na superfície das células endoteliais como CD36, CD62 e ICAM-1, sendo este último o principal receptor envolvido na patogênese da malária cerebral (MacPherson *et al.*, 1985; Pongponratn *et al.*, 1991; Turner, 1997; Lou *et al.*, 2001; Mackintosh *et al.*, 2004). Estudos, recentes, demonstraram ainda uma associação entre o aumento da expressão de ICAM-1 e o desenvolvimento da MC (Ochola *et al.*, 2011). Além disso, eritrócitos infectados com formas maduras de *P. vivax* (EIPv) coletadas de vários pacientes foram capazes de aderir a ICAM-1 em condições de fluxo (Carvalho *et al.*, 2010), sugerindo uma associação entre severidade da doença e o crescimento de complicações em infecções maláricas causadas por *Plasmodium vivax* reportadas recentemente (Costa *et al.*, 2011)

A partir desses achados da literatura e dos nossos resultados obtidos anteriormente de que a exposição à HBO reduz significativamente a expressão dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e que reduz a adesão de leucócitos no cérebro, analisamos se estes resultados poderiam estar relacionados com a modulação da expressão de ICAM-1 no endotélio cerebral de camundongos infectados e em cultura de células endoteliais cerebrais (SBEC) ou células endoteliais pulmonares (HLEC).

Para isso, grupos de 5 a 7 camundongos infectados com PbA expostos ou não a HBO (100% O₂, 3 ATA, 1 hora), não infectados ou infectados com PbNK65 (cepa incapaz de produzir malária cerebral), tiveram seus cérebros coletados e macerados no 6-7 dias pós –infecção, para posterior extração de RNA e síntese de cDNA para ensaios de RT-PCR em tempo real. Concomitantemente, foram realizados ensaios de análise da expressão de ICAM-1 em células endoteliais cerebrais (SBEC) e pulmonares (HLEC) submetidas ou não ao tratamento em

câmara hiperbárica (100% O₂, 3 ATA, 2horas), e tratadas ou não com LPS (1µg/ml), afim de simular ambiente pró-inflamatório.

Podemos notar na Figura 12 que houve uma redução significativa nos níveis de ICAM-1 quando comparamos os animais infectados e expostos a HBO aos animais infectados e não expostos a HBO. Podemos notar ainda que no grupo de animais infectados com PbA e expostos a HBO os níveis de expressão de ICAM-1 assemelham-se aqueles obtidos nos animais infectados com PbNK65; conseqüentemente nota-se uma diferença significativa nos níveis de expressão de ICAM-1 entre os animais infectados com PbA e infectados com PbNk65 o que demonstra o papel do ICAM-1 na patogênese da malária cerebral.

Na Figura 13, observamos que a exposição à HBO foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,05$) a expressão de ICAM-1 em células HLEC (Figura 13A), e em células SBEC (Figura 13B). É possível ainda notar que o estímulo com LPS acarretou um aumento nos níveis de ICAM-1 em ambos os tipos celulares. Nas células SBEC a redução dos níveis de ICAM-1, molécula relacionada à citoadesão leucocitária foi significativa após o estímulo com LPS (Figura 13A), enquanto que nas células HLEC podemos notar esta redução tanto nas células estimuladas com LPS quanto nas não estimuladas. (Figura. 13B).

Tais resultados corroboram com os encontrados de que a exposição à HBO induz redução nos níveis de ICAM-1 em células endoteliais da carótida bovina e do cordão umbilical humano (Buras *et al.*, 2000), e de reduzir os níveis de ICAM-1 solúvel no sangue total de humanos estimulados com LPS e expostos a HBO (Fildissis *et al.*, 2004). Desta maneira podemos sugerir que a redução dos leucócitos aderidos no endotélio cerebral de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e expostos HBO encontrado em nosso estudo esteja relacionado a esta redução na expressão de ICAM-1.

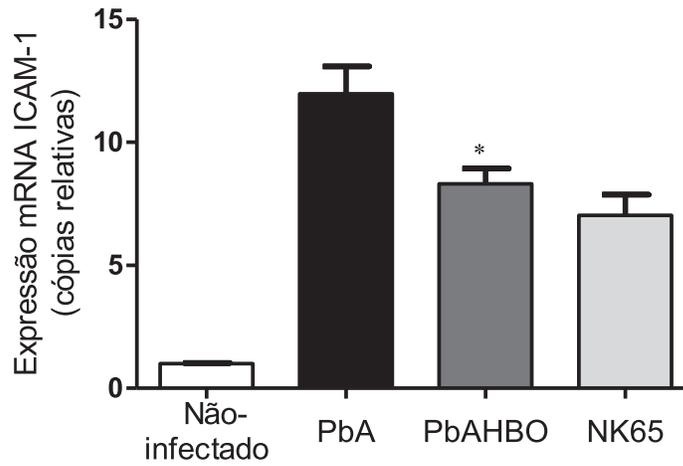


Figura 12. HBO reduz a expressão de ICAM-1 no cérebro de camundongos C56BL/6 infectados com PbA. Grupos de 5-7 animais camundongos infectados com 10^6 EI de *P. berghei* ANKA diariamente expostos, ou não à HBO durante 1 h a partir do dia 0 até o dia 7 (100% O₂, 3 ATA) tiveram seus cérebros coletados no dia 7 para análise dos níveis de expressão de mRNA ICAM-1 por real-time PCR. Como controle foram utilizados animais não-infectados e animais infectados com *P. berghei* NK65 (com parasitemia aproximada dos animais infectados com PbA). Valores foram expressos como as médias das cópias específicas do ICAM-1 em relação as cópias específicas de HPRT; média de cada grupo \pm o desvio padrão. (*) representam $P < 0.05$; PbA HBO vs PbA (Mann-Whitney)

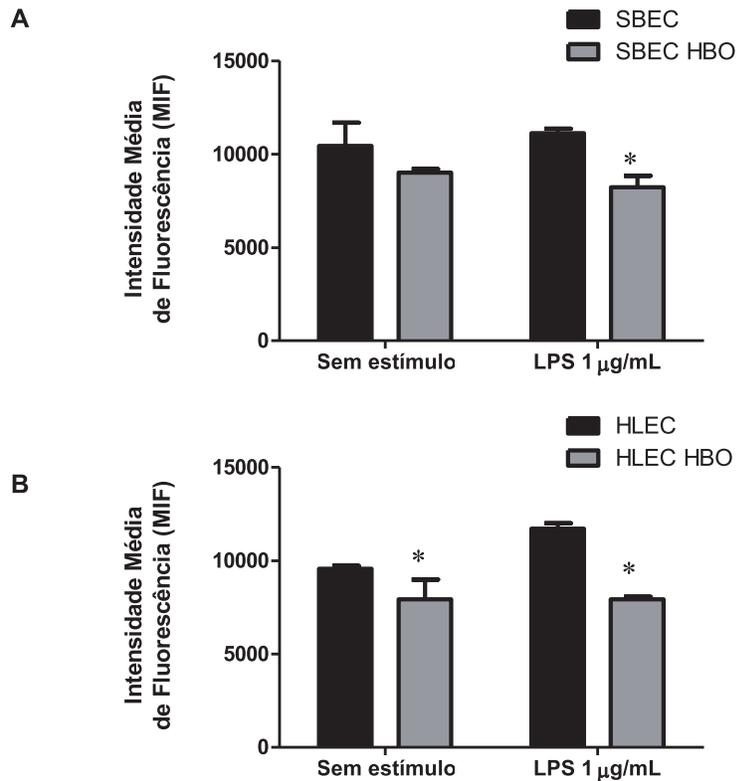


Figura 13: HBO reduz a expressão de ICAM (CD54) em células SBEC (A) e HLEC (B) estimuladas ou não com 1µg/ml de LPS e expostas à HBO (100% O₂, 1 hora, 3 ATA). Células HLEC ou SBEC estimuladas ou não com LPS foram expostas à HBO (100% O₂, 2 horas, 3 ATA) e em seguida analisadas através de citometria de fluxo para expressão de ICAM (CD54). Os resultados são expressos como a média de cada grupo ± o desvio padrão. (*) representam $P < 0.05$; HBO vs não-exposto (Mann-Whitney)

Tendo como base a redução da expressão de ICAM-1 observado tanto no macerado cerebral total de camundongos infectados com PbA como em células endoteliais humanas (HLEC e SBEC) expostas a HBO, e de que o ICAM-1 está relacionado à adesão de EIPf (MacPherson *et al.*, 1985; Pongponratn *et al.*, 1991; Turner, 1997; Lou *et al.*, 2001; Mackintosh *et al.*, 2004), ensaios de citoadesão parasitária foram realizados a fim de verificar se esta redução na expressão de ICAM-1 promovida pela exposição a HBO poderia estar relacionada também a uma redução na adesão de eritrócitos infectados, assim como notado com relação a adesão de leucócitos.

Conforme podemos observar na Figura 14 A-B e Figuras 15 e 16, após a exposição das células HLEC e SBEC à HBO e posterior ensaio de adesão de EIPf-FCR3^{ICAM} houve uma redução significativa da adesão tanto em células SBEC quanto em células HLEC, estimuladas previamente, ou não, com LPS.

Tendo demonstrado uma significativa redução na adesão EIPf-FCR3^{ICAM} em células endoteliais HLEC e SBEC, e com o intuito de avaliar se esta redução poderia também ser constatada em condições similares ao fluxo sanguíneo humano, realizamos ensaios de adesão em condições de fluxo. Nestes ensaios medimos a capacidade de EIPf-FCR3^{ICAM} de se manter ligado ao endotélio, previamente estimulado ou não com LPS, após aumento sucessivo do *Shear stress*. Podemos notar na Figura 17, que em condições de fluxo houve um descolamento de parasita mais significativo nas células que foram previamente expostas a HBO. Se observarmos a quantidade total de EIPf-FCR3^{ICAM} aderidos no início (*Shear Stress* 0,0) e no fim (*Shear Stress* 1,44), observamos uma diferença significativa na adesão total entre as células expostas à HBO e as não expostas (como exemplo 14.67 vs. 10.14 e 6.95 vs. 4.23 - para células HLEC sem estímulo de LPS). Essa diferença observada no descolamento pode ser explicada pela menor adesão inicial observada nas células expostas a HBO em relação as não-

expostas. Tais resultados sugerem que a HBO é capaz de reduzir a adesão de eritrócitos infectados via redução da expressão de ICAM no endotélio.

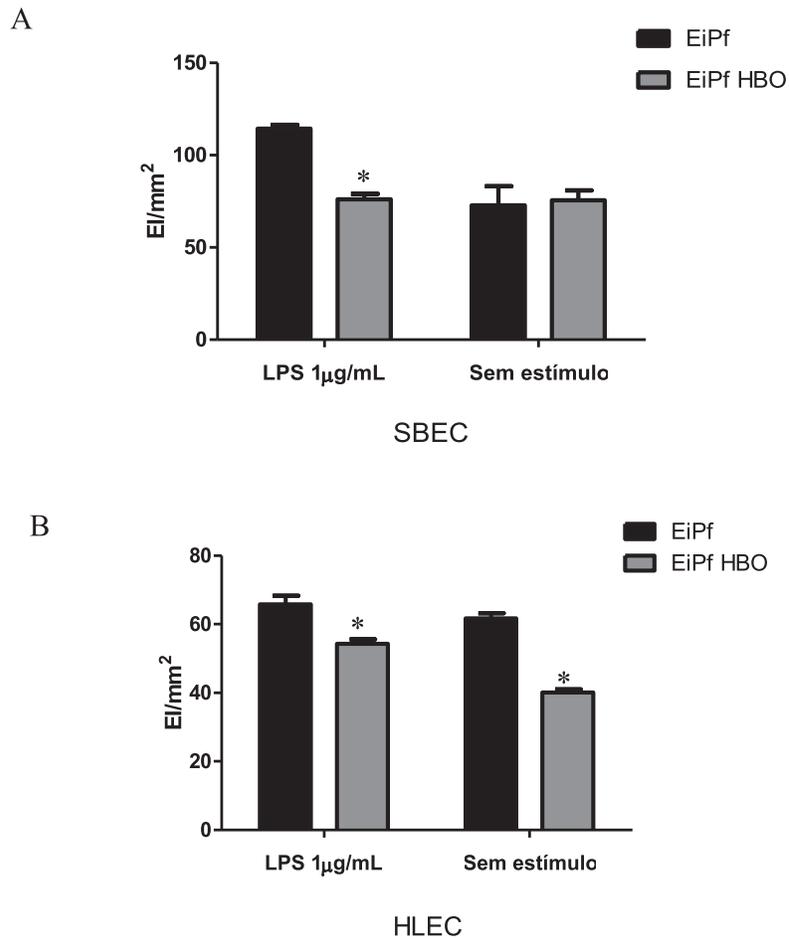


Figura 14: HBO inibe a adesão de eritrócitos infectados *P. falciparum* (EIPf FCR3^{ICAM}) em células endoteliais SBEC e HLEC. Células SBEC (A) ou HLEC (B) foram estimuladas ou não com 1 µg/mL de LPS durante 4 horas e expostas ou não à HBO (100% O₂, 1 hora, 3 ATA). Após a exposição foi realizada a adesão com 5X10⁴/poço EIPf- FCR3^{ICAM}. Os resultados são expressos como a média do número de EIPf aderidos por mm² ± o desvio padrão. (*) representa P<0,005; HBO vs. não-exposto; (Mann-Whitney).

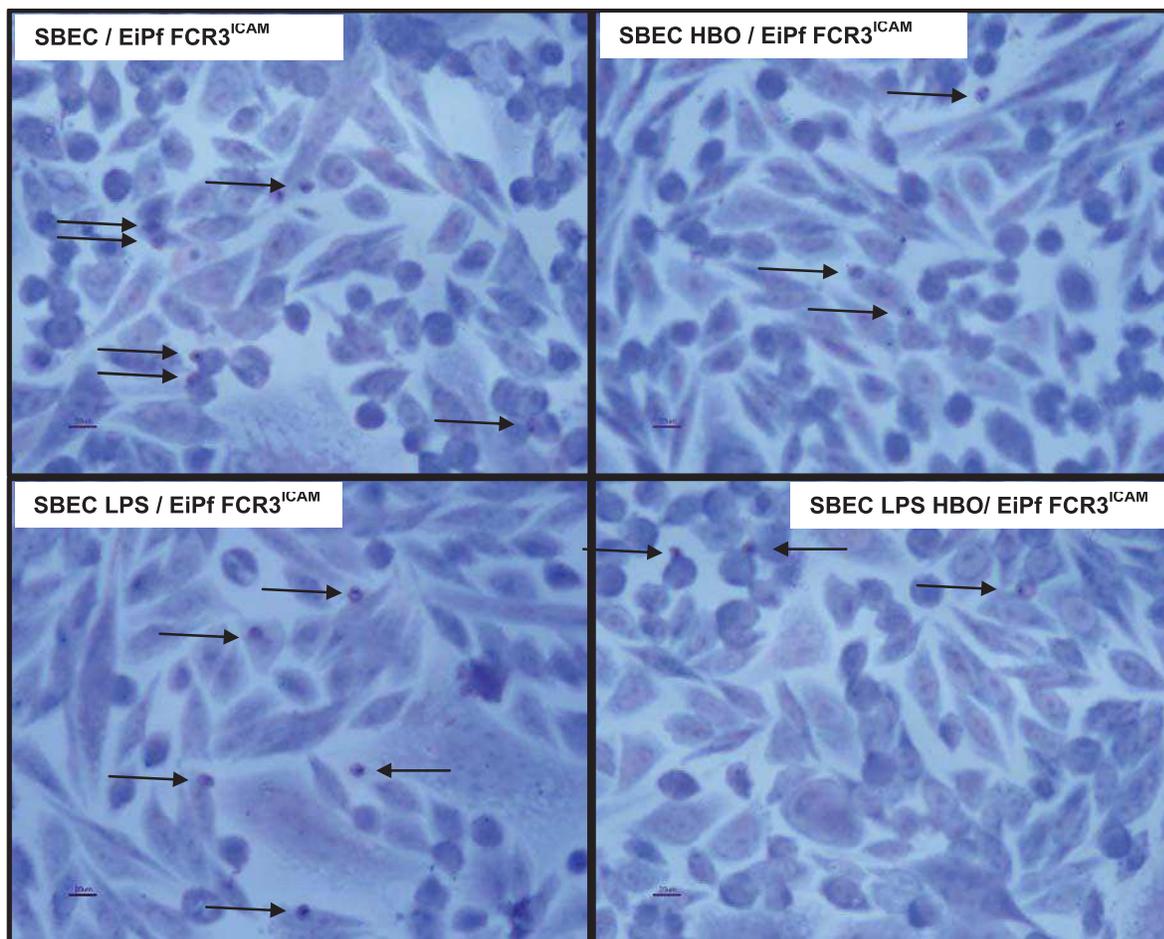


Figura 15: Fotomicrografias representativas de *P. falciparum* (EiPf- FCR3^{ICAM}) aderidas em células endoteliais SBEC. Células SBEC crescidas em lâminas para cultivo celular, estimuladas ou não com 1µg/ml LPS por 4 horas. E expostas (A) ou não à HBO (B) (100% O₂, 1 hora, 3 ATA). Adesão de 5X10⁴/poço EiPf FCR3^{ICAM}. Células coradas com o Kit Panótico rápido (Aumento 40X)

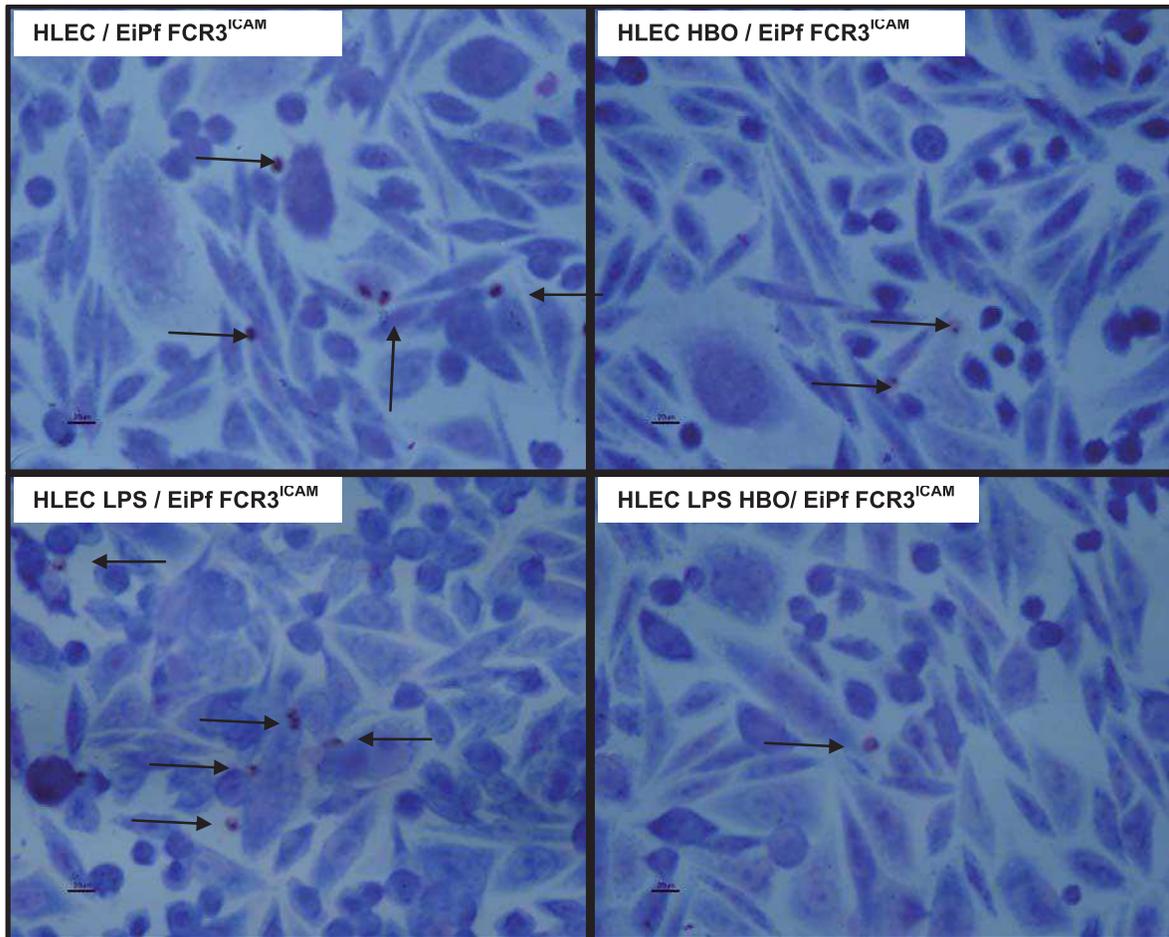
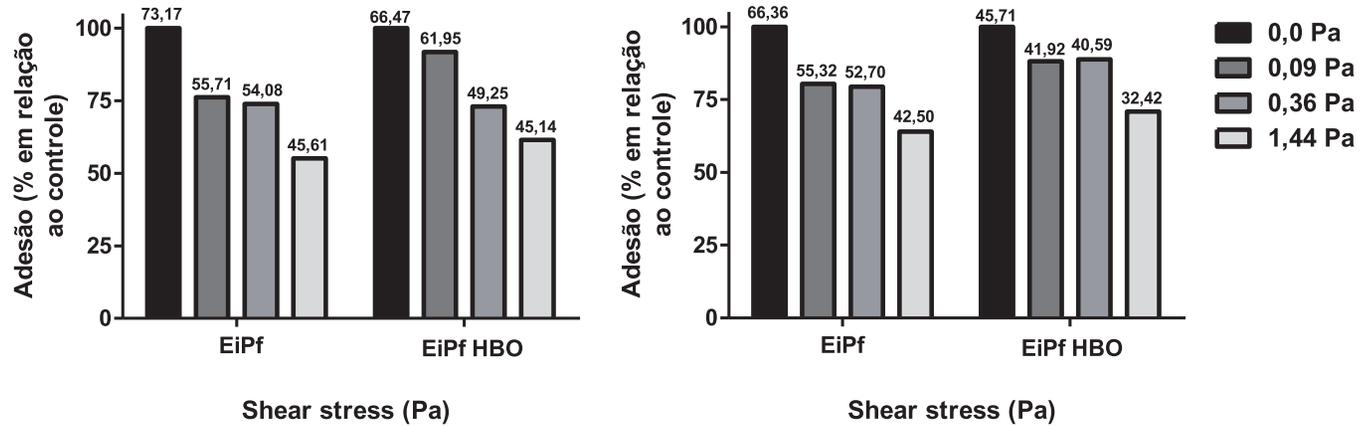


Figura 16: Fotomicrografias representativas de *P. falciparum* (EiPf FCR3^{ICAM}) aderidas em células endoteliais HLEC. Células HLEC crescidas em lâminas para cultivo celular e, estimuladas ou não com 1µg/ml LPS por 4 horas. Expostas (A) ou não à HBO (B) (100% O₂, 1 hora, 3 ATA). Adesão de 5X10⁴/poço EiPf- FCR3^{ICAM}. Células coradas com o Kit Panótico rápido (Aumento 40X)

SBEC



HLEC

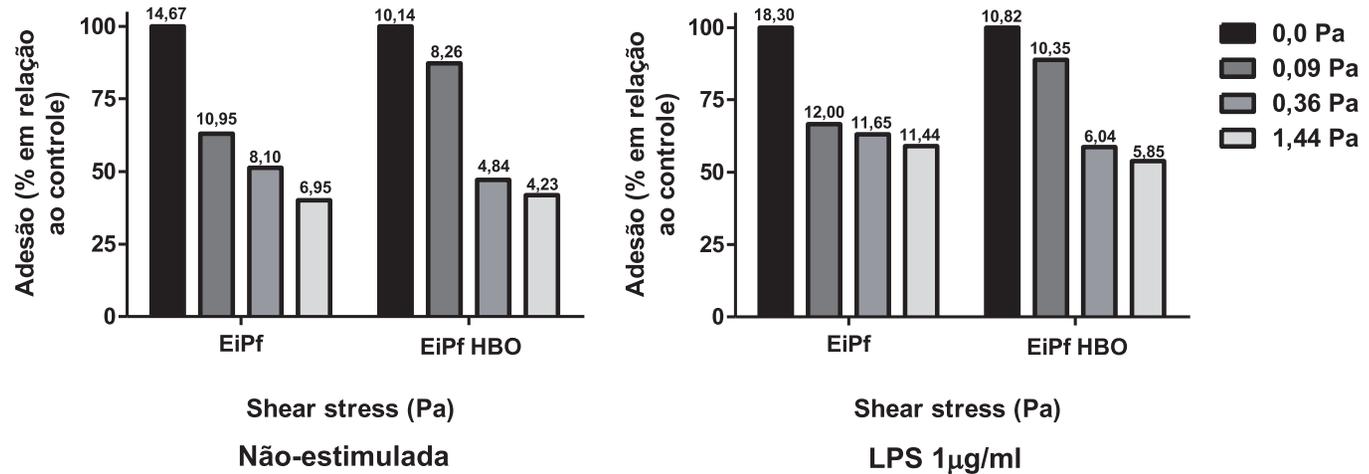


Figura17: HBO não interfere força de adesão de EIPf-FCR3^{ICAM} em condições de fluxo. Células SBEC (A) ou HLEC (B) crescidas em uma única lamina (8,6 cm²) foram estimuladas ou não com 1 µg/mL de LPS durante 4 horas e expostas ou não à HBO (100% O₂, 1 hora, 3 ATA). Em seguida 5X10⁵ EIPf FCR3^{ICAM} foram deixados para aderir sobre a monocamada por 1 hora, 37°C. Após a adesão a lâmina foi adaptada a um sistema de câmara de fluxo, e submetido a uma seqüência de pressões 0,09, 0,36 e 1,44 Pascal (Pa), para 10, 5 e 2,5 min, respectivamente. No final de cada fluxo o número de EIPf-FCR3^{ICAM} aderidos foram contados em 30 campos escolhidos aleatoriamente e as porcentagens em relação ao número de adesões iniciais, ou a média do número total dos EIPf-FCR3^{ICAM} foram determinados. Resultados são expressos em percentuais médios de adesão ou o número total de adesão de EIPf-FCR3^{ICAM}.

Recentemente foi verificado que uma baixa biodisponibilidade de NO contribui para a indução da MC, induzindo uma vasoconstrição e reduzindo ao fluxo sanguíneo (Conran *et al.*, 2009 e Cabrales *et al.* 2010). Sabe-se ainda que administração de doadores de NO é capaz de proteger significativamente animais contra a malária cerebral experimental (Gramaglia *et al.*, 2006). De fato, estudos demonstram ainda que o NO via e-NOS (óxido nítrico sintase endotelial) tem efeito reparador endotelial e antiinflamatório (Barsotti *et al.*, 2001), baixos níveis de nitrito e hipoarginemia estão associados ao desenvolvimento de malária cerebral em crianças (Anstey *et al.*, 1996; Lopansri *et al.*, 2003; Gramaglia *et al.*, 2006). No entanto, Cabrales *et al.* (2011) demonstraram que a administração de NO exógeno, não previne completamente a disfunção da microcirculação, mas que atua na prevenção da vasoconstrição de animais infectados com PbA.

Com o objetivo de analisar a capacidade da oxigenação hiperbárica (HBO) em aumentar a expressão de e-NOS, i-NOS e n-NOS, os cérebros de camundongos infectados com PbA e expostos, ou não, à HBO foram coletados no dia 7 pós-infecção, período no qual os animais infectados apresentam claramente os sinais clínicos associados à malária cerebral murina, ao passo que os expostos à HBO permanecem sem sintomas (Blanco *et al.*, 2008).

Como é mostrado na Figura 18 A-D, a análise dos resultados do *immunoblotting* e a quantificação de suas bandas reativas demonstra um aumento significativo ($P < 0,05$) na expressão de n-NOS (Figura 18 A-B) e e-NOS (Figura 18 C-D) no cérebro dos animais infectados e expostos à HBO, em comparação aos animais infectados e não expostos ou não-infectados. Não foi observada uma significativa diferença nos níveis de i-NOS entre os diferentes grupos de animais (Figura 18 E-F), fato observado em outros estudos com células endoteliais (Buras *et al.*, 2000)

O aumento específico de e-NOS acarretado pela exposição a HBO foi demonstrado em células endoteliais aórticas bovinas por Buras *et al.*, 2000; sendo que este aumento foi

relacionada principalmente a redução na expressão de ICAM-1, além disso, o aumento na expressão de NO no cérebro de camundongos foi apontado como responsável pela melhora no fluxo sanguíneo cerebral desses animais (Hagioka *et al.*, 2005). Dessa maneira podemos inferir que em nosso modelo a redução na adesão de leucócitos e a melhoria no fluxo sanguíneo observada na microscopia intravital também esteja relacionada à redução de ICAM-1 e conseqüentemente de NO. Além disso, sabe-se também que a e-NOS tem efeito reparador endotelial e antiinflamatório, e que a n-NOS é a principal isoforma produzida em resposta a hiperóxia (Sobolewski, 2005; Thom *et al.*, 2002; Hagioka *et al.*, 2005; Chavko *et al.*, 2001; Buras *et al.*, 2000), fato que também explica a proteção promovida pela exposição a HBO durante a infecção malárica por PbA, já que é possível notar nos animais infectados e expostos uma redução nos sintomas e na quebra da barreira hemato-encefálica.

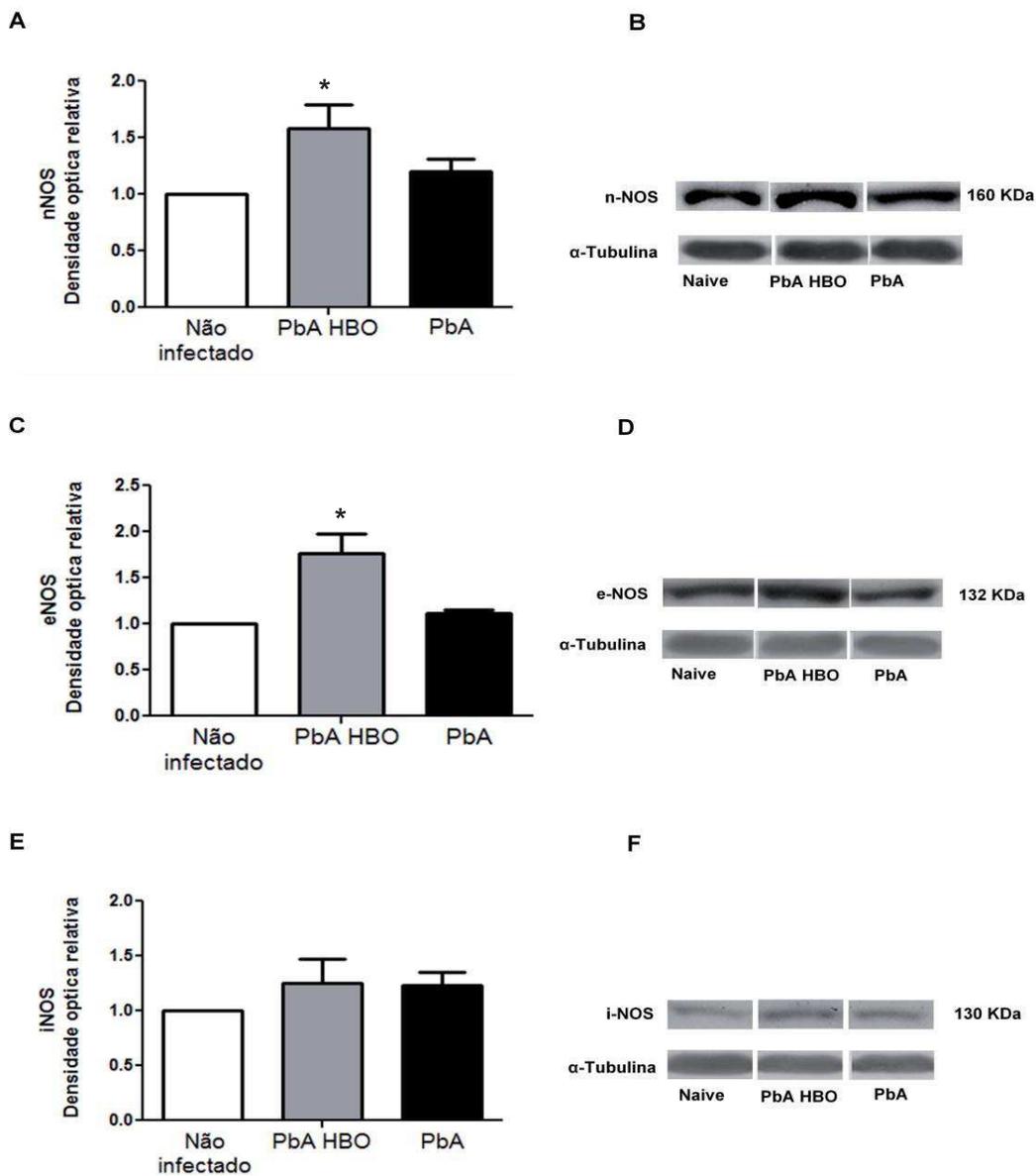


Figura 18: HBO aumenta a expressão de e-NOS e n-NOS em animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA).

Grupos de 6-7 animais camundongos infectados com 10^6 EI de *P. berghei* ANKA e diariamente expostos, ou não, à HBO durante 1 h a partir do dia 0 até o dia 7 (100% O₂, 3 ATA) tiveram seus cérebros coletados no dia 7 para análise dos níveis de expressão de e-NOS (A) e n-NOS (B) i-NOS (C) por Western blot. Figura representativa do blot é mostrada para n-NOS (B) e-NOS (D) e i-NOS (F). Os valores obtidos são expressos como média das densidades ópticas das bandas em relação à α -tubulina empregada como controle interno (*) = $P < 0,05$; exposto à HBO vs. não exposto.

O estresse oxidativo esta quase sempre relacionado à processos inflamatórios observados no cérebro (Aronowski & Zhao, 2011). Vários estudos relacionam a presença da heme livre com o aparecimento do estresse oxidativo durante o desenvolvimento da patogênese da malária cerebral, sendo utilizado como marcador de dessa doença (Kumar & Bandyopadhyay, 2005),

Dessa maneira, estudos envolvendo a heme total e a LDL oxidada (oxLDL) fizeram-se necessários. Como é mostrado na Figura 19A a exposição dos animais infectados com PbA a HBO reduz a heme total significativamente nos dias 5 e 6 pós infecção. Além disso, para nos certificarmos que a HBO (100% O₂, 3.0 ATA, 1 hora/dia) não promove o estresse oxidativo, animais não infectados foram expostos a HBO durante 7 dias consecutivos e os níveis de heme total foram analisados em relação aos animais não infectados e não expostos. Como podemos notar na Figura 19B não houve diferenças significativas entre os animais não infectados expostos ou não a HBO. Nossos resultados demonstram que a HBO não promove o aumento da heme total em animais não-infectados, mesmo após 7 dias consecutivos de exposição.

A HBO atua protegendo as células endoteliais dos efeitos citotóxicos promovido pela ação da heme livre, visto que foi capaz de reduzir os níveis de heme total no plasma dos animais infectados, reduzindo desta maneira também a probabilidade de eventos de isquemia tecidual e oclusão de vasos, visto que a heme livre gera um processo pró-trombótico (revisto por Ferreira *et al.*, 2008). A heme livre pode agir ainda como quimioatrativo de células polimorfonucleares, como os leucócitos, e aumentar a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (revisto Ferreira *et al.*, 2008 e por Sanjay *et al*, 2005). Desta maneira, a redução de heme livre promovida pela HBO pode consequentemente ser responsável pela redução da adesão tanto de leucócito quanto de eritrócitos infectados observadas neste estudo.

Foi demonstrado ainda que a liberação de heme livre contribui para um aumento do estresse oxidativo em camundongos infectados PbA, em malária causada por *P. falciparum*, sendo também relatado recentemente em complicações devido a *P. vivax* (Seixas *et al.*, 2009; Pamplona *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2010).

Lipoproteínas são o componente lipídico majoritário encontrado no plasma e por este motivo tornam-se alvo do estresse oxidativo. Por esta razão, a oxLDL tem sido amplamente utilizada como marcador de estresse oxidativo (Oliveira *et al.*, 2006). Desta maneira analisamos os soros dos animais infectados com PbA expostos ou não a HBO e NK65, afim de detectar a presença de anticorpos anti oxLDL.

Podemos notar na Figura 19C que camundongos infectados com PbA e expostos a HBO tiveram os níveis de oxLDL reduzidos significativamente quando comparados aos animais infectados e não expostos, sendo que os valores encontrados nos animais infectados e expostos a HBO são semelhantes aos encontrados nos animais não infectados. Este resultado já era esperado, visto que a HBO reduz os níveis de heme, um dos responsáveis pela oxidação da LDL. Na realidade, estudos que quantificam os níveis de LDL e HDL no plasma de indivíduos infectados com *P. falciparum*, indicam um decréscimo dos níveis de LDL e HDL nas infecções maláricas (Nilsson *et al.* 1990; Mohanty *et al.* 1992), fato observado provavelmente pelo aumento da oxidação da LDL e que corrobora com os resultados de nosso estudo. Alguns autores indicam ainda que a oxLDL pode aumentar a expressão de moléculas de adesão, principalmente de CD36, promovendo a citoaderência e possivelmente, no caso de infecções maláricas, determinando complicações na malária grave (Nathawut *et al.*, 2004). Desta maneira a redução da LDL oxidada pela exposição a HBO pode impedir o aumento das moléculas de adesão, promovendo a redução da adesão e conseqüentemente uma melhora dos sintomas.

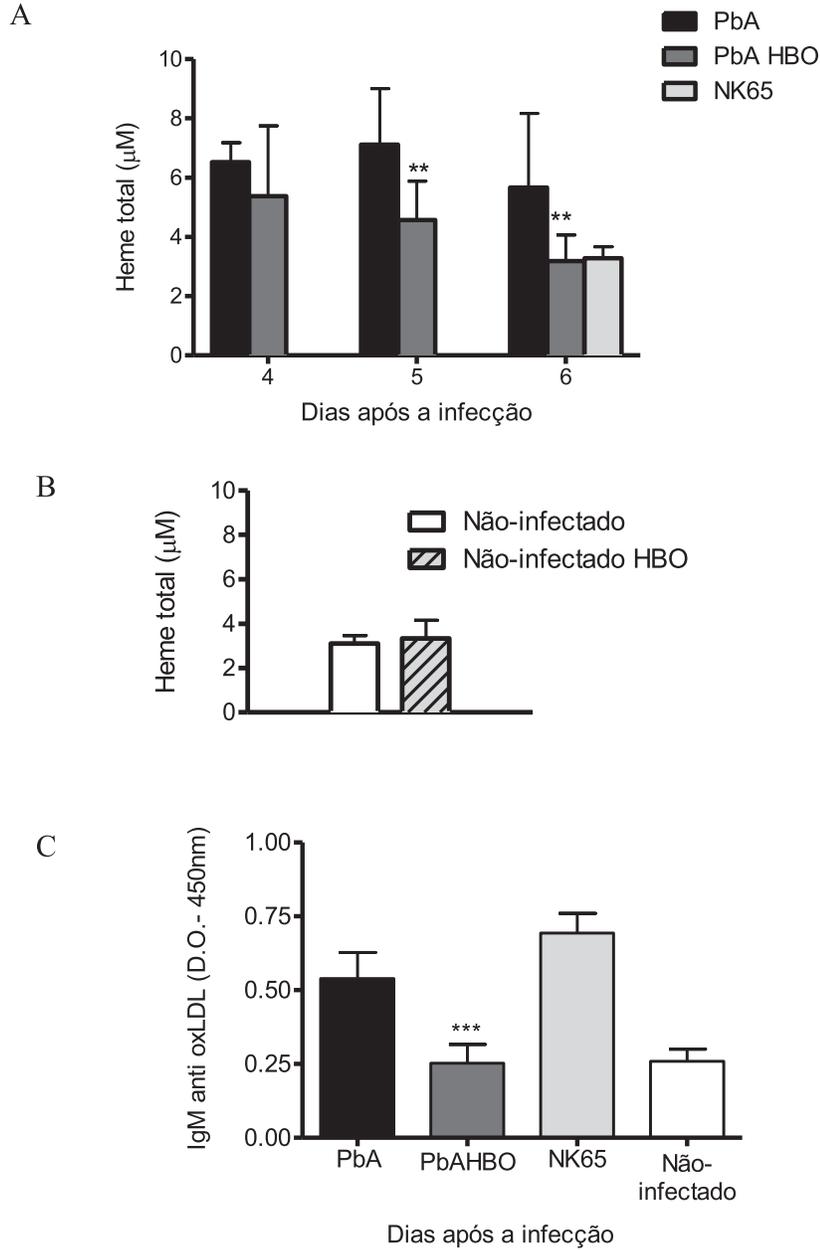


Figura 19. HBO previne o estresse oxidativo em camundongos infectados PBA, reduzindo os níveis totais de heme e ox-LDL Produtos do estresse oxidativo foram avaliados durante a manifestação de sinais clínicos ECM nos dias 4 6 pi em camundongos infectados com *P. berghei* NK65 (NK65) ou PbA expostos a HBO (PbA-HBO), ou não (PbA). Quantificação de heme total e de oxLDL foram determinadas no plasma de camundongos infectados (A) ou em animais não infectados (B) exposto, ou não, a HBO (C) Quantificação de oxLDL através de ELISA utilizando IgM anti oxLDL. Os resultados representam a média de 6-8 animais por grupo \pm SD. * P <0,05 e ** P <0,01, PBA vs PbA-HBO ou não-infectado vs não-infectado-HBO

Por fim, com intuito de verificar se a exposição à HBO agia diretamente na proliferação parasitária, EIPf-FCR3 mantidos em cultura (2% parasitemia, 4% hematócrito) foram expostos ou não à HBO (100% O₂, 2 horas, 3 ATA) e mantidos por 48 horas. Após as 48 horas ensaios foi realizada a contagem da parasitemia através de esfregaços sanguíneos (Figura 19). Avaliamos que a exposição à HBO não tem efeito citotóxico, visto que não foram notadas diferenças significativas na quantidade de hemácias infectadas, entre os parasitas expostos ou não à HBO. Além disso, também não pudemos notar diferenças significativas na quantidade de hemácias saudáveis, quando comparamos os parasitas EIPf-FCR3 expostos ou não à HBO, indicando que o tratamento com à HBO não causa hemólise. Tais resultados corroboram com os nossos achados anteriores de que a HBO não altera o desenvolvimento parasitário e consequentemente não altera sua infectividade (Blanco *et al.*, 2008) e que possivelmente a ação da HBO esteja relacionada a modulação do sistema imune do hospedeiro.

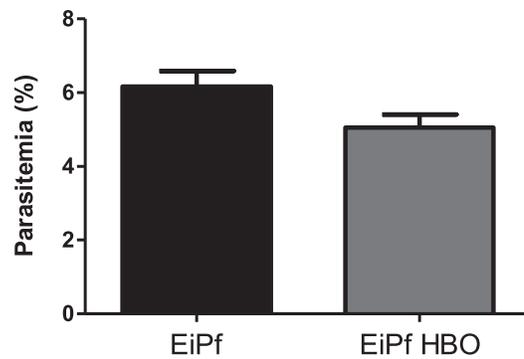


Figura 19: HBO não altera a reinvasão parasitária. (A) EIPf- FCR3^{CAM} mantidos em cultura (2% parasitemia, 4% hematocrito) foram expostos ou não à HBO (100% O₂, 2horas, 3 ATA). EIPf- FCR3^{CAM} mantidos em cultura (2% parasitemia, 4% hematocrito) foram expostos ou não à HBO (100% O₂, 2horas, 3 ATA) e após 48 horas tiveram a parasitemia avaliada por meio de esfregaço sanguíneo. Não houve diferença significativa

CONCLUSÕES

Dessa maneira, podemos inferir que o tratamento com oxigênio hiperbárico é capaz de:

- 1) Reduzir a expressão de citocinas pro--inflamatórias como TNF- α e IFN- β e de IL-10 na MCM
- 2) Reduzir a presença de linfócitos CD4+ e CD8+ no cérebro dos animais infectados com *P.berghei* ANKA.
- 3) Reduzir a adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral.
- 4) Promover o aumento da expressão de eNOS e nNOS, responsáveis pela modulação e por uma ação anti-inflamatória no endotélio e nos neurônios, em camundongos infectados com PbA
- 5) Reduzir a expressão de ICAM-1 no macerado cerebral de animais infectados com PbA,
- 6) Reduzir a heme total e a LDLoxidada no plasma de animais infectados com PbA
- 7) Reduzir a expressão de ICAM-1 em células endoteliais do pulmão humano (HLEC) e do cérebro de macacos *Saimiri* (SBEC)
- 8) Reduzir a adesão de eritrócitos infectados (EIPf) em células endoteliais do pulmão humano (HLEC) e do cérebro de macacos *Saimiri* (SBEC) em condições estáticas., porém não interfere na força de interação dos Eis com o endotélio.
- 9) A HBO não interfere no desenvolvimento parasitário.

Dessa maneira os dados aqui apresentados abrem novas perspectivas no tratamento da malária cerebral, podendo a HBO ser utilizada como terapia principal ou como adjuvante de drogas neuroprotetoras e anti-inflamatórias já utilizadas no tratamento contra MC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS S, TURNER GD, NASH GB, MICKLEM K, NEWBOLD CI, CRAIG AG. 2000. Differential binding of clonal variants of *Plasmodium falciparum* to allelic forms of intracellular adhesion molecule 1 determined by flow adhesion assay. *Infect Immun.*; 68(1):264-9.
- AGNANDJI ST, LELL B, SOULANOUDJINGAR SS, FERNANDES JF, *et al.* 2011. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med.* 17;365(20):1863-75.
- AL YAMAN FM, MOKELA D, GENTON B, ROCKETT KA, ALPERS MP, CLARK IA. 1996. Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90(3):270-3
- AL-WAILI N, BUTLER GJ, BEALE J, ABDULLAH MS, HAMILTON RWB, *et al.* 2005, Hyperbaric oxygen in treatment of patients with cerebral stroke, brain trauma, and neurological disease. *Adv Therapy* 22: 659–678.
- AMINO R., THIBERGE S., MARTIN B, CELLI S, SHORTE S., FRISCHKNECHT F, MÉNARD R., 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature.* 12: 220-224.
- ANDRADE BB, ARAÚJO-SANTOS T, LUZ NF, KHOURI R, BOZZA MT, CAMARGO LM, BARRAL A, BORGES VM, BARRAL-NETTO M. 2010. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. *J Immunol.* 185(2):1196-204.
- ANSTEY NM, WEINBERG JB, HASSANALI MY, MWAIKAMBO ED, MANYENGA D, MISUKONIS MA, ARNELLE DR, HOLLIS D, MCDONALD MI, GRANGER DL. 1996. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J. Exp. Med.* 184: 557–567

- ARONOWSKI J, ZHAO X. 2011. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. *Stroke*. 42(6):1781-6. Epub 2011 Apr 28. Review.
- ARRAIS-SILVA WW, COLLHONE MC, AYRES DC, SOUTO PCS, GIORGIO S. 2005. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitol Inter*. 54: 1-7.
- ARRAIS-SILVA WW, PINTO EF, ROSSI-BERGMANN B, GIORGIO S. 2006. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice. *Acta Trop*. 98:130-6.
- ATOCHIN, DN, DEMCHENENKO IT, ASTERN J, BOSO AE, PIANTADOSI CA, HUANG PL. 2003. Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthase to cerebrovascular responses to hyperoxia.. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23: 1219-1226.
- BAATZ H, STEINBAUER M, HARRIS AG, KROMBACH F. 1995. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of Rhodamine 6G. *Int. J. Microcirc*. 15:85-91
- BAIRD JK, JONES TR, DANUDIRGO EW, ANNIS BA, BANGS MJ, BASRI H PURNOMO, MASBAR S. 1991 Age dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J. Med. Hyg*. 45: 65-76
- BALLA G, JACOB HS, EATON JW, BELCHER JD, VERCELLOTTI GM. 1991. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial cell injury. *Arterioscler Thromb*. 11:1700-1711
- BALLA J, JACOB HS, BALLA G, NATH K, EATON JW, VERCELLOTTI GM. 1993. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9285–9289

- BARSOTTI A, DI NAPOLI P, TACCARDI AA, SPINA R, STUPPIA L, PALKA G, BARBACANE RC, DE CATERINA R, CONTI P. 2001. MK-954 (losartan potassium) exerts endothelial protective effects against reperfusion injury: evidence of an e-NOS mRNA overexpression after global ischemia. *Atherosclerosis*. Mar;155(1):53-9.
- BELNOUE E, COSTA FT, FRANKENBERG T, VIGARIO AM, VOZA T, LEROY N, RODRIGUES MM, LANDAU I, SNOUNOU G, RENIA L. 2004. Protective T cell immunity against malaria liver stage after vaccination with live sporozoites under chloroquine treatment *J Immunol*. 172: 2487-95.
- BELNOUE E, KAYIBANDA M, VIGARIO AM, DESCHEMIN JC, VAN ROOIJEN N, VIGUIER M, SNOUNOU G, RENIA L. 2002. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J. Immunol*. 169: 6369-75.
- BENSON RM, MINTER LM, OSBORNE BA, GRANOWITZ EV. 2003. Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clin Exp Immunol*. 134:57-62.
- BEREMDT AR, SIMMONS DL, TANSEY J, NEWBOLD CL, MARSH K. 1989 Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*.. *Nature* 341: 57-59.
- BHOITE-SOLOMON V, KESSLER-ICEKSON G, SHAKLAI N., 1993. Myocyte injury by hemin. In *Vitro Cell Dev. Biol. Anim*. 29A 636-642.
- BLANCO YC, FARIAS AS, GOELNITZ U, LOPES SC, ARRAIS-SILVA WW, CARVALHO BO, AMINO R, WUNDERLICH G, SANTOS LM, GIORGIO S, COSTA FT. 2008. Hyperbaric oxygen prevents early death caused by experimental cerebral malaria. *PLoS One*. 3(9):e3126.

- BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- BURAS JA., STAHL GL, SVOBODA KKH., REENSTRA, W.R. 2000. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: 292-302.
- CABRALES P, ZANINI GM, MEAYS D, FRANGOS JA. CARVALHO LJM. 2010. Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *Am. J. Pathol* 176:1306-15.
- CABRALES P, ZANINI GM, MEAYS D, FRANGOS JA. CARVALHO LJM. 2011. nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology. *J.Infect. Diseases.* 1-9
- 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.
- CHAKRAVORTY SJ, CRAIG A. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur J Cell Biol.* 2005 Jan;84(1):15-27. Review.
- CHAKRAVORTY SJ. & CRAIG A. 2005. The role of ICAM-1 in *Plasmodium falciparum* cytoadherence. *Eur. J. Cell Biol.* 84:15-27.
- CHAVKO M, XING G, KEYSER DO.2001 Increased sensitivity to seizures in repeated exposures to hyperbaric oxygen: role of NOS activation. *Brain Res* 11;900(2):227-33.

- CHU SJ, LI MH, HSU CW, TSAI SH, LIN SH, HUANG KL.2007. Influence of hyperbaric oxygen on tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 20(6):684-90.
- CHU SJ, LI MH, HSU CW, TSAI SH, LIN SH, HUANG KL.2007. Influence of hyperbaric oxygen on tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 20(6):684-90
- CLARK LA; MONN RE. 1999. Hyperbaric oxygen in the treatment of life-threatening soft-tissue infections.. *Resp. Care Clin. N. America* 5: 203-219.
- COLLINS WE, CONTACOS PG.1972. Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by X-irradiated sporozoites. *Nat New Biol.* 12;236(67):176-7.
- 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.
- CONRAN N, FRANCO-PENTEADO CF, COSTA FF. 2009. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell diseasevaso-occlusion. *Hemoglobin* 33: 1-16.
- 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. *J. Infect Dis.* 188:153-64.
- COSTA FT, LOPES SC, FERRER M, LEITE JA, MARTIN-JAULAR L, BERNABEU M, NOGUEIRA PA, MOURÃO MP, FERNANDEZ-BECERRA C, LACERDA MV, DEL PORTILLO H. 2011. On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*: raison d'être? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106 Suppl 1:79-84.
- 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*

- CRAIG A, SCHERF A., 2001. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol.* 115:129-43.
- DAILY, J.P. Antimalarial drug therapy: The role of parasite biology and drug resistance. 2006 *J. Clin. Pharmacol.* 46: 1487-1497.
- 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 Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 5075-9.
- DE KOSSODO S, GRAU GE.1993. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J Immunol* 151: 4811–4820.
- DE SOUZA JB, HAFALLA JC, RILEY EM, COUPER KN. 2010. Cerebral_malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 137(5):755-72.
- DE SOUZA JB, RILEY EM. 2002. Cerebral malaria: the contributions of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect.* 4: 291-300
- DEMCHENKO IT, BOSO AE, O'NEILL TJ, BENNETT PB, PIANTADOSI C 2000. Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J. Appl Physiol.* 88:1381-1389.
- DEMCHENKO IT, OURY TD, CRAPO JD, PIANTADOSI C 2002. Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circ Res.* 91:1031-1037.
- DONDORP AM, OMODEO-SALÈ F, CHOTIVANICH K, TARAMELLI D, WHITE NJ. 2003. Oxidative stress and rheology in severe malaria., *Redox Rep.*:8(5):292-4. Review.
- ENGWERDA C, BELNOUE E, GRUNER AC, RENIA L. 2005. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 297:103-43

- ENGWERDA CR, MYNOTT TL, SAWHNEY S, DE SOUZA JB, BICKLE QD, KAYE PM. 2002. Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J. Exp Med.* 195: 1371-77
- ESAMAI F, ERNERUDH J, JANOLS H, WELIN S, EKERFELT C, MINING S, FORSBERG P. 2003. Cerebral malaria in children: serum and cerebrospinal fluid TNF-alpha and TGF-beta levels and their relationship to clinical outcome. *J Trop Pediatr.* 49:216-23
- FERREIRA A; BALLA J.; JENEY V.;BALLA G.; SOARES M. 2008. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J.Mol Med* 86:1097-1111.
- FILDISSIS G, VENETSANOU K, MYRIANTHEFS P, KARATZAS S, ZIDIANAKIS V, BALTOPOULOS G. 2004. Whole blood pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules post-lipopolysaccharides exposure in hyperbaric conditions. *Eur Cytokine Netw.* 15(3):217-21.
- FRANCIS SE, SULLIVAN DJ JR, GOLDBERG DE. 1997. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 51:97–123
- FRANCISCHETTI IM, SEYDEL KB, MONTEIRO RQ. 2008. Blood coagulation, inflammation, and malaria., *Microcirculation.* Feb;15(2):81-107.
- FRANCISCHETTI, IMB. 2008 Does activation of the blood coagulation cascade have a role in malaria pathogenesis?. *Trends in Parasitology* 24:258-263
- GADD MA, MCCLELLAN DS, NEUMAN TS, HANSBROUGH JF 1990. Effect of hyperbaric oxygen on murine neutrophil and T-lymphocyte functions. *Crit Care Med* 18: 974–979.
- GARCÍA-COVARRUBIAS L, CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ E. 2000. Hyperbaric oxygenation therapy, basic concepts. *Gac Med Mex.* 136(1):45-56.
- GILL AL, BELL CAN 2004. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *Q.J. Med* 97:385-395.

- GOLDSTEIN L., TENG ZP., ZESERSON E., PATEL M, REGAN RF. 2003. Hmin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *J neurosci. Res.* 73:113-121
- GRACA-SOUZA AV, ARRUDA MA, DE FREITAS MS, BARJA-FIDALGO C, OLIVEIRA PL. 2002. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* 99:4160–4165
- GRAMAGLIA I, SOBOLEWSKI P, MEAYS D, CONTRERAS R, NOLAN JP, FRANGOS JA, INTAGLIETTA M, VAN DER HEYDE HC. 2006. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med.* 12: 1417-22
- GRANOWITZ EV, SKULSKY EJ, BENSON RM, WRIGHT J, GARB JL, ET AL. 2002. Exposure to increased pressure or hyperbaric oxygen suppresses interferon-gamma secretion in whole blood cultures of healthy humans. *Undersea Hyperb Med* 29: 216–225.
- GRAU GE & DE KOSSODO S. 1994. Cerebral malaria: mediators, mechanical obstruction or more? *Parasitol Today* 10: 408-9.
- GRAU, G. MACKENZIE C.D., CARR R.A, REDARD M.,PIZZOLATO G., ALLASIA C., CATALDO C., TAYLOR T.E, MOLYNEUX M.E., 2003. Platelets accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* 187:461-466.
- GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E.; KAPPE, S.H.I.; ALONSO, P.L.; COLLINS,F.H. e DUFFY, P.E. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of Clinical Investigation*, 118: 1266–1276.
- GUDEWICZ TM; MADER JT, DAVIS CP. 1987. Combined effects of hyperbaric oxygen and antifungal agents on the growth of *Candida albicans*. *Aviat. Space Environ. Med.* 58: 673-678.

- HAGIOKA S, TAKEDA Y, ZHANG S, SATO T, MORITA K. 2005 Effectes of 7-nitroindazole and N-nitro-L-argininae methyl ester on changes in cerebral blood flow and nitric oxide production preceding development of hyperbaric oxygen-induced seizures in rats. *Neurosci. Lett* 382:206-210
- 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.
- HEARN J, RAYMENT N, LANDON DN, KATZ DR, DE SOUZA JB. 2000. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature *Infect Immun.* 68:5364-76.
- HO M, WHITE NJ. 1999. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol.*
- HOLDING PA, STEVENSON J, PESHU N, MARSH K. 1999. Cognitive sequelae of severe malaria_with impaired consciousness. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93(5):529-34.
- HUNT NH, GOLENSER J., CHAN-LING T., PAREKH S., RAE C., POTTER S., MEDANA IM., MIU J., BALL HL. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J. Parasitol* 2006, 36: 569-582
- HUNT NH. & GRAU GE. 2003. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 24: 491-499.
- JENEY V, BALLA J, YACHIE A ET AL. 2002 Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100:879–887
- JENNINGS VM, ACTOR JK, LAL AA, HUNTER RL. 1997. Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infect Immun.* 65:4883-7.
- KUMAR S, BANDYOPADHYAY U. 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 157(3):175-88.

- KURATA S, YAMASHITA U, NAKAJIMA H 1995 Hyperbaric oxygenation reduces the cytostatic activity and transcription of nitric oxide synthetase gene of mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1263(1):35-8.
- KWIATKOWSKI D. AND MARSH K., 1997. Development of a malaria vaccine. *The Lancet* 350:1696-1701.
- LACERDA-QUEIROZ N, RODRIGUES DH, VILELA MC, MIRANDA AS, AMARAL DC, CAMARGOS ER, CARVALHO LJ, HOWE CL, TEIXEIRA MM, TEIXEIRA AL. 2010 Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol*. Jul;125(3):271-8.
- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.
- LAHAT N, BITTERMAN H, YANIV N, KINARTY A, BITTERMAN N. 1995. Exposure to hyperbaric oxygen induces tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) secretion from rat macrophages. *Clin Exp Immunol*. 102:655-9.
- LE BRAS J & DURAND R. 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol*. 17(2):147-53.
- LEACH RM, REES PJ, WILMSHURST P. 1998 Hyperbaric oxygen therapy. *Br Med. J.* 317:1140-3
- LEE CC, CHEN SC, TSAI SC, WANG BW, LIU YC, LEE HM, SHYU KG. 2006. Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. *J Biomed Sci*. 13:143-56.
- LEY K, *Physiology of Inflammation*. New York: Oxford University Press, 2001

- LI L, QU Y, LI J, XIONG Y, MAO M, MU D. 2007. Relationship between HIF-1alpha expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury. *Brain Res.* 14;1180:133-9
- LI Y, ZHOU C, CALVERT JW, COLOHAN AR, ZHANG JH. 2005. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol.* 191:198-210.
- LOPANSRI BK, ANSTEY NM, WEINBERG JB, STODDARD GJ, HOBBS MR, LEVESQUE MC, MWAIKAMBO ED, GRANGER DL. 2003. *Lancet* 361: 676–678
- LOPES SC, BLANCO YC, JUSTO GZ, NOGUEIRA PA, RODRIGUES FL, GOELNITZ U, WUNDERLICH G, FACCHINI G, BROCCHI M, DURAN N, COSTA FT. 2009. Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits *Plasmodium* growth in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.*;53(5):2149-52.
- LOU J, LUCAS R, GRAU G. 2001. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol. Rev.* 14: 810-820.
- MACKINTOSH, CL., BEESON, J.G., MARSH, K., 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria *Trends in Parasitology.* 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.
- MARSH, K., 1998. Malaria disaster in Africa. *Lancet.* 352:924-925.
- MEDANA I.M. & TURNER G.D., 2006. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int. J. Parasitol.* 36: 555-568.
- MEDANA IM, HUNT NH, CHAUDHRI G. 1997. *Tumor necrosis factor-alpha* expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* 150: 1473–1486.

- MENÉNDEZ C, MOORTHY VS, REED Z, BARDAJÍ A, ALONSO P, BROWN GV. 2011. Development of vaccines to prevent malaria in pregnant women: WHO MALVAC meeting report. *Expert Rev Vaccines*. 10(9):1271-80.
- MILJKOVI-LOLIC, M.; SILBERGLEIT, R.; FISKUM, G.; ROSENTHAL, RE. 2003 Neuroprotective effects of hiperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated whit reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain Res*.971: 90-94.
- MILLER KL, SILVERMAN PH, KULLGREN B, MAHLMANN LT. 1989. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria *Infect Immun* 57:1542-1546.
- MOHANTY S, MISHRA SK, DAS BS, SATPATHY SK, MOHANTY D, PATNAIK JK, BOSE TK: 1992. Altered plasma lipid pattern in falciparum malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 86:601-606.
- NEILL AL & HUNT NH. 1992. *Parasitol*. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice 105:165-75.
- NEWBOLD C, WARN P, BLACK G, BERENDT A, CRAIG A, SNOW B, MSOBO M, PESHU N, MARSH K. 1997. Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 57(4):389-98.
- NEWTON CR, KRISHNA S. 1998. Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther* 79: 1-53.
- NEWTON CRJC, HIEN T.T., WHITE N., 2000. NEUROLOGICA ASPECTS OF TROPICAL DISESE: CEREBRAL MALARIA. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 69:0433-441
- NIKLAS A., BROCK D., SCHOBER R., SCHULZ A., SCHNEIDER D. 2004. Continuous measurements of cerebral tissue oxygen pressure during hyperbaric oxygenation-HBO effects on brain edema and necrosis after severe brain trauma in rabbits. *J. Neurological Sciences*, 219: 77-82.

- NILSSON-EHLE I, NILSSON-EHLE P: 1990 Changes in plasma lipoproteins in acute malaria. *J INTERN MED* 227:151-155.
- NITCHEU J, BONDUELLE O, COMBADIÈRE C, TEFIT M, SEILHEAN D, MAZIER D, COMBADIÈRE B. 2003. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis *Immunol.* 170:2221-8.
- NUSSENZWEIG RS, VANDERBERG J, MOST H, ORTON C. 1967. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature.* 14;216(5111):160-2.
- OCHOLA LB, SIDDONDO BR, OCHOLLA H, NKYA S, KIMANI EN, WILLIAMS TN, MAKALE JO, LILJANDER A, URBAN BC, BULL PC, SZESTAK T, MARSH K, CRAIG AG. 2011. Specific receptor usage in *Plasmodium falciparum* cytoadherence is associated with disease outcome. *PLoS One.* 6(3):e14741.
- OCKENHOUSE CF, HO M, TANDON NN, VAN SEVENTER GA, SHAW S, WHITE NJ, JAMIESON GA, CHULAY JD, WEBSTER HK. 1991. Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *J Infect Dis.* 164(1):163-9.
- OLIVEIRA JA, SEVANIAN A, RODRIGUES RJ, APOLINARIO E, ABDALLA DSP 2006. Minimally modified electronegative LDL and its autoanti-bodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem* 39: 708-714.
- OSTROWSKI, RP; COLOHAN, ART; ZHANG, JH. 2005. Mechanisms of therapeutic of oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 25: 554-571.
- OVERBERGH L, GIULIETTI A, VALCKX D, DECALLONNE R, BOUILLON R, MATHIEU C. 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* 14: 33–43

- PAMPLONA A, FERREIRA A, BALLA J, JENEY V, BALLA G, EPIPHANIO S, CHORA A, RODRIGUES CD, GREGOIRE IP, CUNHA-RODRIGUES M, PORTUGAL S, SOARES MP, MOTA MM. 2007. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med.* 13(6):703-10.
- PARK M.K., MYERS R.A., MARZELLA L., 1992. Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin Infect Dis* 14: 720-740.
- PENET M.F., VIOLA A., CONFORT-GOUNY S., LE FUR Y., DUHAMEL G., KOBER F., IBARROLA D., IZQUIERDO M., COLTEL N., GHARIB B., GRAU G.E., COZZONE P.J., 2005. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci.* 25: 7352-7358
- PENET MF, KOBER F, CONFORT-GOUNY S, LE FUR Y, DALMASSO C, COLTEL N, LIPRANDI A, GULIAN JM, GRAU GE, COZZONE PJ, VIOLA A. 2007. Magnetic resonance spectroscopy reveals an impaired brain metabolic profile in mice resistant to cerebral malaria infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *J Biol Chem* 11;282(19):14505-14.
- PERNG WC, WU CP, CHU SJ, KANG BH, HUANG KL. 2004. Effect of hyperbaric oxygen on endotoxin-induced lung injury in rats. *Shock* 21(4) 370-5.
- PEYRON F., BURDIN N., RINGWALD P., VUILLEZ J.P., ROUSSET F., BANCHEREAU J., 1994. High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin Exp Immunol.* 95: 300-303.
- PINO P., TAOUFIQ Z., NITCHEU J., VOULDOUSKIS I., MAZIER D., 2005. Blood-baris barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost.* 94: 336-340.
- 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.

- PORTO BN, ALVES LS, FERNANDEZ PL et al. 2007. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem* 282:24430–24436
- POUVELLE B, TRAORÉ B, NOGUEIRA PA, PRADINES B, LÉPOLARD 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.
- PRAKASH D, FESEL C, JAIN R, CAZENAVE PA, MISHRA GC, PIED S. 2006. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis.* 194:198-207.
QJM 97(7):385-95.
- RENCRICCA N.J., COLEMAN R.M., ALTSCHULE M.D., FALETRA P.P., GRAY A.D., DESROCHERS P.E., DOYLE M.J., 1981. Quantification of hyperbaric oxygen-induced toxicity utilizing a malarial system. *Aviat Space Environ Med.* 52: 85-87.
- RENIA L, POTTER SM, MAUDUIT M, ROSA DS, KAYIBANDA M, DESCHEMIN JC, SNOUNOU G, GRUNER AC. 2006. Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int J Parasitol.* 36:547-54.
- RIECKMANN KH, BEAUDOIN RL, CASSELLS JS, SELL KW. 1979. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bull World Health Organ.*1979;57 Suppl 1:261-5.
- ROCKSWOLD SB, ROCKSWOLD GL, VARGO JM, et al. 2001 Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients. *J Neurosurg.*; 94:403-411.
- RODRIGUEZ F, KEMP RM BALAZY M, NASJLETTI A., 2003. Effects of exogenous heme on renal function: role of heme oxygenase and cyclooxygenase. *Hypertension.* 42: 680-684.

- ROGATSKY GG, KAMENIR Y, MAYEVSKY A. 2005. Effect of hyperbaric oxygenation on intracranial pressure elevation rate in rats during the early phase of severe traumatic brain injury. *Brain Res.* 1047:131-6.
- ROTHFUSS A, RADERMACHER P, SPEIT G.2000. Involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the adaptive protection of human lymphocytes after hyperbaric oxygen (HBO) treatment. *Carcinogenesis* (12):1979-85.
- ROTHFUSS A, SPEIT G. 2002 Overexpression of heme oxygenase-1 (HO-1) in V79 cells results in increased resistance to hyperbaric oxygen (HBO)-induced DNA damage. *Environ Mol Mutagen.*;40(4):258-65.
- 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.
- SABCHAREON A, BURNOUF T, OUATTARA D, ATTANATH P, BOUHAROUN-TAYOUN H, CHANTAVANICH P, FOUCAULT C, CHONGSUPHAJAISIDDHI T, DRUILHE P. 1991. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.*;45(3):297-308.
- SAGLAM M, BOZLAR U, KANTARCI F,AY H,BATTAL B, COSKUNU. 2008 effect of Hyprbaric Oxygen o flow-mediated vasodilatation. *J. Ultrasound Med.* 27:209-214.
- SALTER M.J. 1996 .Determination of the flux control coefficient of nitric oxide synthase for nitric oxide synthesis in discrete brain regions in vivo. *Theor Biol* 7;182(3):449-52.
- SANJAY K., BANDYOPADHYAY B. 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology letters* 157: 175-188.

- 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.
- SCHOFIELD L, GRAU GE. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 5: 722-35.
- SEIXAS E, GOZZELINO R, CHORA A, FERREIRA A, SILVA G, LARSEN R, REBELO S, PENIDO C, SMITH NR, COUTINHO A, SOARES MP. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 15;106(37):15837-42. Epub 2009 Aug 17.
- SERIROM S, RAHARJO WH, CHOTIVANICH K, LOAREESUWAN S, KUBES P, HO M. 2003. Anti-adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. *Am. J. Pathol.* 162: 1651–1660
- SHEIKH AY, GIBSON JJ, ROLLINS MD, HOPF HW, HUSSAIN Z, HUNT TK. 2000. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg.*;135(11):1293-7.
- 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.
- SOBOLEWSKI P, GRAMAGLIA I, FRANGOS J, INTAGLIETTA M, VAN DER HEYDE HC. 2005. Nitric oxide bioavailability in malaria. *Trends Parasitol.*;21(9):415-22.
- STURM A, AMINO R, VAN DE SAND, REGEN T., RETZLAFF S., RENNENBERG A., KRUEGER A., POLLOK J.M., MENARD R. HEUSSLE V.T. 2006. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Scienceexpress.* 1-8.

- SUKOFF MH, RAGATZ RE. 1982; Hyperbaric oxygenation for the treatment of acute cerebral edema. *Neurosurgery*. 10:29-38.
- TAYLOR TE, FU WJ, CARR RA, WHITTEN RO, MUELLER JS, ET AL. 2004. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med* 10: 143–145.
- 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.
- THOM SR, BHOPALE V, FISHER D, MANEVICH Y, HUANG PL, BUERK DG 2002. Stimulation on nitric oxide synthase in cerebral cortex due to elevates partial pressure of oxygen: An oxidative stress response. *J. Neurobiol* 51:85-100.
- THOMAS A, CONWAY DJ. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 363(9414): 1017-24.
- TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4.
- TRAGER, W. AND J. B. JENSEN. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 193:673-675.
- TRAMPUZ A, JEREB M, MUZLOVIC I, PRABHU RM. 2003. Clinical review: severe malaria.
- TURNER G. 1997. Cerebral malaria *Brain Pathol*. 7: 569-582.
- TURNER GD, MORRISON H, JONES M, DAVIS TM, LOOAREESUWAN S, BULEY ID, GATTER KC, NEWBOLD CI, PUKRITAYAKAMEE S, NAGACHINTA B, ET AL. 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(5):1057-69

- UENO S, TANABE G, KIHARA K, AOKI D, ARIKAWA K, DOGOMORI H. *et al.* 1999. Early post-operative hyperbaric oxygen therapy modifies neutrophil activation. *Hepatology* 46 (27) 1798-9
- 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(11):503-8.
- VELTKAMP R., SIEBING D.A., HEILAND S., SCHOENFFELDT-VARAS P., VELTKAMP C., SCHWANINGER M., SCHWAB S., 2005. Hyperbaric oxygen induces rapid protection against focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1037: 134-138.
- VILELA, M.C., MANSUR, D.S., LACERDA-QUEIROZ, N., RODRIGUES, D.H., LIMA, G.K., ARANTES, R.M., KROON, E.G., DA SILVA CAMPOS, M.A., TEIXEIRA, M.M., TEIXEIRA, A.L., 2009. The chemokine CCL5 is essential for leukocyte recruitment in a model of severe herpes simplex encephalitis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153,256–263.
- VON ZUR MUHLEN C, SIBSON NR, PETER K, CAMPBELL SJ, WILAINAM P, GRAU GE, BODE C, CHOUDHURY RP, ANTHONY DC. 2008. A contrast agent recognizing activated platelets reveals murine cerebral malaria pathology undetectable by conventional MRI. *J Clin Invest.*;118(3):1198-207.
- WAGENER FADTG, VOLK HD, WILLIS D, ABRAHAM NG, SORES MP, ADEMA GJ, FIDGOR CG. 2003 Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* 55: 551-571.
- WASSMER S.C., COMBES V., GRAU G.E., 2003. Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion. *Ann N Y Acad Sci.* 992: 30-38.

- WASSMER SC, COMBES V, CANDAL FJ, JUHAN-VAGUE I, GRAU GE..2006. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.*;74(1):645-53.
- WERNSDORFER W.H. & PAYNE, D. 1991. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther.* 50: 95-121.
- WINTER G, CHEN Q, WAHLGREN M 2004. Meeting report: the molecular background of severe and complicated malaria. *Mol Biochem Parasitol.*134(1):37-41
- YANG ZJ, BOSCO G, MONTANTE A, OU XI, CAMPORESI EM. 2001. Hyperbaric O2 reduces intestinal ischemia-reperfusion-induced TNF-alpha production and lung neutrophil sequestration. *Eur J Appl Physiol.*;85(1-2):96-103.
- YEO TW, LAMPAH DA, GITAWATI R, TJITRA E, KENANGALEM E, MCNEIL YR, DARCY CJ, GRANGER DL, WEINBERG JB, LOPANSRI BK, PRICE RN, DUFFULL SB, CELERMAJER DS, ANSTEY NM. 2007. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *J Exp Med.* 29;204(11):2693-704.
- ZHANG JH, LO T, MYCHASKIW G, COLOHAN A. 2005. Mechanisms of hyperbaric oxygen and neuroprotection in stroke. *Pathophysiology.*

ANEXO I
ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS A TESE

Hyperbaric Oxygen Prevents Early Death Caused by Experimental Cerebral Malaria

Yara C. Blanco^{1,2}, Alessandro S. Farias¹, Uta Goelnitz³, Stefanie C. P. Lopes^{1,2}, Wagner W. Arrais-Silva², Bruna O. Carvalho^{1,2}, Rogério Amino⁴, Gerhard Wunderlich³, Leonilda M. B. Santos¹, Selma Giorgio², Fabio T. M. Costa^{1,2*}

1 Department of Microbiology & Immunology, State University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil, **2** Department of Parasitology, UNICAMP, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, **3** Department of Parasitology – ICB, University of São Paulo – USP, São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo – UNIFESP, São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: Cerebral malaria (CM) is a syndrome characterized by neurological signs, seizures and coma. Despite the fact that CM presents similarities with cerebral stroke, few studies have focused on new supportive therapies for the disease. Hyperbaric oxygen (HBO) therapy has been successfully used in patients with numerous brain disorders such as stroke, migraine and atherosclerosis.

Methodology/Principal Findings: C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) were exposed to daily doses of HBO (100% O₂, 3.0 ATA, 1–2 h per day) in conditions well-tolerated by humans and animals, before or after parasite establishment. Cumulative survival analyses demonstrated that HBO therapy protected 50% of PbA-infected mice and delayed CM-specific neurological signs when administrated after patent parasitemia. Pressurized oxygen therapy reduced peripheral parasitemia, expression of TNF- α , IFN- γ and IL-10 mRNA levels and percentage of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes sequestered in mice brains, thus resulting in a reduction of blood-brain barrier (BBB) dysfunction and hypothermia.

Conclusions/Significance: The data presented here is the first indication that HBO treatment could be used as supportive therapy, perhaps in association with neuroprotective drugs, to prevent CM clinical outcomes, including death.

Citation: Blanco YC, Farias AS, Goelnitz U, Lopes SCP, Arrais-Silva WW, et al. (2008) Hyperbaric Oxygen Prevents Early Death Caused by Experimental Cerebral Malaria. PLoS ONE 3(9): e3126. doi:10.1371/journal.pone.0003126

Editor: Mauricio Martins Rodrigues, Federal University of São Paulo, Brazil

Received: March 22, 2007; **Accepted:** August 14, 2008; **Published:** September 4, 2008

Copyright: © 2008 Blanco et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant n° 2004/00638-6, and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). YCB, WWA, ASF and SCPL were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and UG was sponsored by a FAPESP fellowship. GW, SG and FTMC are CNPq fellows.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: costaftm@unicamp.br

Introduction

Cerebral malaria (CM) causes 1–2 million deaths annually; mainly in sub-Saharan African children aged 2–6. It is estimated that 250,000 children that do not succumb to CM will develop neurocognitive impairments per year [1] and most CM patients die before the beneficial effects of drug treatment are observed [2]; thus indicating the need to explore new supportive therapies.

CM is a multi-factorial syndrome characterized by neurological signs, seizures and coma, which can, in turn, lead to death. This syndrome can be associated with a loss of cerebrospinal fluid spaces and ischemia [3], alterations in cerebral blood flow velocity [4], a decrease in cerebral oxygen consumption in CM comatose patients [5] and an increase in the lactate levels of the cerebrospinal fluid [6] which decreases after patients recover consciousness [7]. Recent imaging and postmortem analyses have revealed the presence of Durck granulomas, blood-brain barrier (BBB) dysfunction and diffuse cerebral edema with multiple petechial hemorrhages and ischemic changes in the brain of adults with CM [8,9].

Although the CM pathogenic process is controversial and still not fully understood, evidence suggests that the host's immune system plays a major role in expressing certain cytokines, e.g. TNF- α and IFN- γ , and activating immunocompetent cells [10–15]. In fact, recent immunological analyses have shown that, unlike individuals with mild and severe non-cerebral malaria, CM patients present elevated levels of a specific cluster of cytokines, which include TGF- β , TNF- α , IL-1 β and IL-10 [16].

Hyperbaric oxygen therapy (HBO; pO₂ = 760 mmHg) has been successfully used against bacterial and fungal infections and as an adjunct therapy in surgeries [17–19]. In addition, reports have recently shown that HBO therapy transiently suppresses the inflammatory process of ischemic wounding and trauma [20,21]. Indeed, immunological analyses have revealed that HBO therapy significantly decreases the levels of TNF- α and IL-1 β secreted by monocytes and macrophage collected from rats or from human peripheral blood after stimulation with LPS [22,23]. In an experimental model for ischemia, HBO reduces immunocompetent cell sequestration and the synthesis of TNF- α [24]; probably by decreasing ICAM-1 expression levels [25]. Moreover, HBO

reduces the expression of the cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA, an enzyme involved in inflammation, and the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), a transcriptional factor associated with low oxygen concentrations [26,27]. HBO therapy has been used in patients with numerous brain disorders such as stroke, migraine and atherosclerosis, due to its capacity to decrease cerebral edema and brain infarction while maintaining BBB integrity, reducing neuronal death and improving blood flow in damaged areas of the brain [28]. Nevertheless, depending on the protocol used for treatment, HBO therapy has potential side effects associated to ear and sinus barotraumas, myopia and convulsion [29].

In an early study, HBO was observed to alter the parasitemia levels of mice infected with a non-cerebral line of *Plasmodium berghei* [30]. However, the HBO effect on the entire curve of parasitemia, on the clinical symptoms and on the mechanisms of the illness were not further investigated. Moreover, although the pathological process involved in CM displays some features in common with brain stroke, the effect of HBO on CM, to our knowledge, has never been assessed. Here we show that in conditions also suitable for human use, HBO therapy prevents CM clinical symptoms in C57BL/6 mice infected with *P. berghei* ANKA, a model widely used for experimental cerebral malaria (ECM) [31].

Methods

Mice and parasites

C57BL/6 mice (7–10 weeks old) were purchased from the University of São Paulo (São Paulo, SP, Brazil) and maintained in our specific pathogen-free animal facility. All experiments and procedures were approved by the UNICAMP Committee for Ethics in Animal Research (Protocol No. 857-1).

Two different strains of *P. berghei* were used: the cloned line of *P. berghei* ANKA (PbA) and *P. berghei* NK-65 (PbNK-65), respectively an ECM- and non-ECM-causing strain; kindly provided by Dr. Laurent Rénia (Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology and Research, Biopolis, Singapore) and Dr. Nobuko Yoshida (Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil), respectively. The blood stage forms of both parasites were stored in liquid nitrogen after *in vivo* passages in C57BL/6 mice according to the protocol described elsewhere [31]. Mice were infected intraperitoneally (i.p.) with 10^9 infected red blood cells (iRBC) and parasitemia and the neurological signs for CM were monitored daily.

Hyperbaric oxygen treatment

Groups of 8–10 PbA-infected mice were exposed daily to 100% oxygen at a pressure of 3.0 atmospheres (ATA) for 1 h per day in a hyperbaric animal research chamber (Research Chamber, model HB 1300B, Sechrist, USA) from day 0 to 10 post-infection (11-day exposure), or for 2 h from day 4–7 post-infection (4-day exposure). The chamber was pressurized and decompressed at a rate of 0.5 ATA/min as described elsewhere [32]. For the 11-day exposure protocol, mice were previously exposed to HBO for 1 h before PbA infection, whereas for the 4-day exposure protocol, PbA-infected mice were randomly selected and placed in the hyperbaric chamber. To determine the effect of 100% oxygen (hyperoxia), regardless of pressurization, PbA-infected mice were submitted to the 11-day exposure protocol, but at 1.0 ATA (normobaric) instead of 3.0 ATA. Infected mice in the control group (non-exposed) were left in an airy room. The temperature inside the hyperbaric chamber was 21°C, the same as in the room, and was measured with the aid of a high-pressure resistant thermometer (model TB-0261, Instrucamp, Brazil). For the direct HBO effect assays, normal red blood cells (nRBC) or iRBC were collected

from a naïve mouse or a PbA-infected animal on day 6 post-infection (12% parasitemia), and then diluted in an RPMI 1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Hyclone, USA). One mL of nRBC or iRBC (10^7 /mL) were plated in five replicates on a 24 well-plate and exposed to HBO (100% O₂, 3.0 ATA) in a hyperbaric chamber for up to 6 hours.

Parasitemia, temperature and red blood cell density assessment

The percentage of parasitemia was determined by counting the number of iRBC in at least 1,000 erythrocytes in Giemsa-stained blood smears. The mice's corporal temperature and the density of red blood cells (DRBC/mL $\times 10^9$) were evaluated daily, starting on day -1 post-infection (p.i.), by rectal introduction of a precision digital thermometer (model TE-300, Instrucamp, Brazil), and with the aid of a Neubauer chamber, respectively. In the *in vitro* assays, DRBC were counted from 0 hour. The percentage of RBC density relative to day -1 p.i. or to 0 hour was calculated with the following formula: [(DRBC per mL $\times 10^9$ of a determined day p.i. or hour/DRBC per mL $\times 10^9$ on day -1 p.i. or at 0 h) $\times 100$].

Measuring cytokine gene expression in the brain

The expression of several cytokine genes was evaluated by real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) in the brain of PbA-infected animals removed on day 7 p.i.. Mice brains were frozen with crushed liquid nitrogen placed in the Trizol™ reagent (Invitrogen, USA) according to the protocol described by the manufacturer. Shortly, after the addition of 1 mL of Trizol™ (Invitrogen, USA) in 40 mg of the brain powder, 0.2 mL of chloroform was added and the lysate was vigorously mixed. The sample was centrifuged at 12,000 \times g for 15 min and the aqueous phase was transferred to a new tube. The RNA was precipitated by adding 0.5 mL of isopropanol followed by a centrifugation at 12,000 \times g, then washed with 1 mL of 75% ethanol and resuspended in RNase free water. RNA was then treated with Deoxyribonuclease I (Fermentas, Canada) in order to degrade contaminating genomic DNA. The cDNA was synthesized using approximately 2 μ g of the total RNA with the aid of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) according to the protocol provided by the manufacturer. The polymerase chain reaction was performed with an ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, USA) and the reactions were carried out in 25 μ L volume and in the presence of the TaqMan PCR Master Mix™ (Applied Biosystems, USA) and different sets of oligonucleotides and probes for the amplification of the β -actin, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 genes. These corresponded (respectively) to the following reference numbers (Applied Biosystems, USA): Rn00667869_m1, Mm00443258_m1, Mm00443285_m1, Mm00434228_m1, Mm00446190_m1 and Mm00439616_m1. Expression levels of cytokine genes in PbA-infected animals were represented as a relative copy numbers by using the delta threshold cycle method ($2^{-\Delta Ct}$) [33].

Purification of brain-sequestered T cells (BST)

Adherent leukocytes were isolated from mice brains as described elsewhere [14]. Briefly, on day 7 p.i., PbA-infected mice were perfused intracardially with PBS to remove both circulating and non-adherent RBC and leukocytes. Brains were collected and crushed in an RPMI-1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA) and gentamycin. The cellular suspension was collected and centrifuged at 15,000 \times g for 5 min. The pellet was resuspended with 10 mL of an HEPES buffer (Sigma, USA) and supplemented with collagenase (Roche,

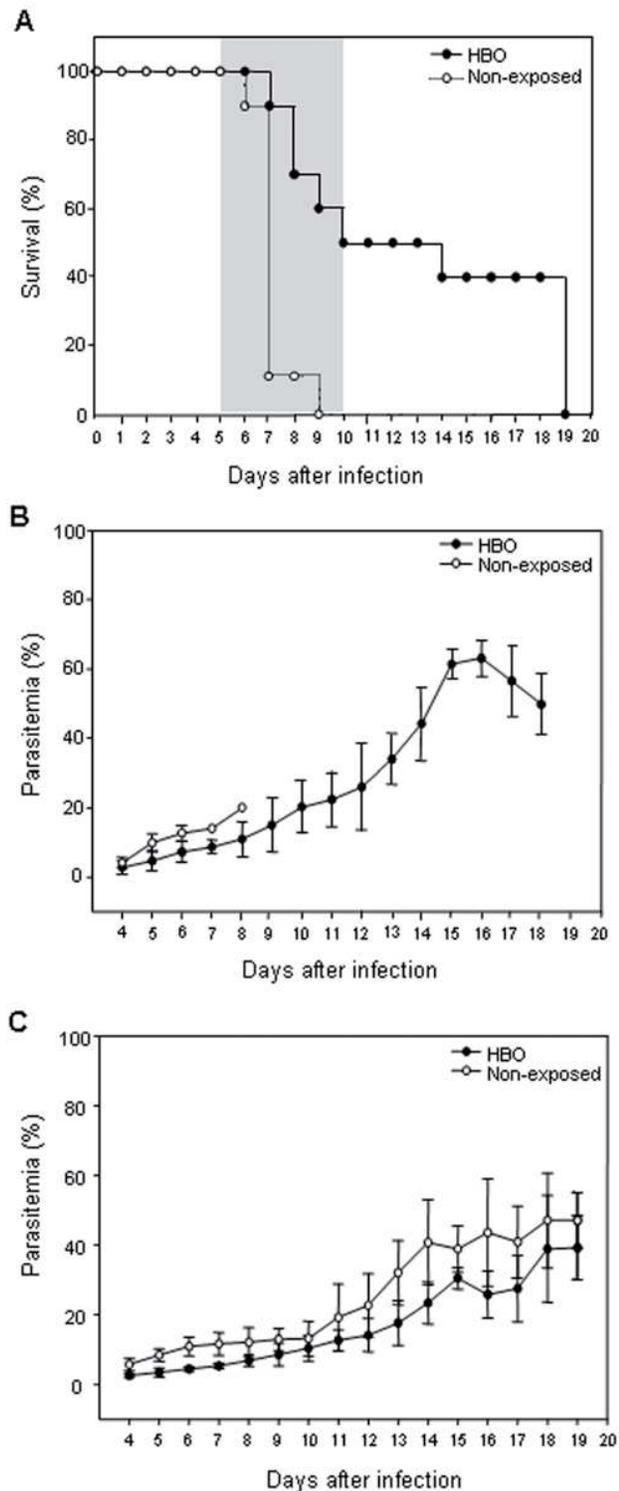


Figure 1. HBO's effect on the survival and the parasite development in *P. berghei*-infected mice. (A) Groups of 10 mice infected i.p. with 10^6 iRBC were exposed or not to HBO (100% O_2 , 3.0 ATA) for 1 h from day 0 to 10. Pressurized oxygen significantly protected mice against CM neurological symptoms ($P < 0.0005$). Neurological signs of CM appeared on days 5–10 with death occurring approximately 24 h after onset (shaded area). Parasitemia levels were assessed daily in mice infected with (B) *P. berghei* ANKA (PbA; cerebral line) or (C) *P. berghei* NK-65 (PbNK-65; non-cerebral line) regardless of

exposure to HBO. HBO significantly ($P < 0.05$) reduced the parasite burden on days 4–6 and 4–13 p.i., respectively in PbA- and PbNK-65-infected mice when compared to non-exposed animals. doi:10.1371/journal.pone.0003126.g001

USA) and DNase I (Roche, Germany). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The tissue extract was passed through sterile gauze and centrifuged at $5,000 \times g$ for 30 s to remove debris. The supernatant was deposited on a 30% PercollTM (GE Healthcare, Sweden) gradient and centrifuged at $3,000 \times g$ for 10 min. The pellet was collected and residual RBC were removed by an ACK lysis buffer. BST were resuspended in PBS containing 5% FBS and counted.

Immunolabeling and flow cytometry analysis of BST

Cells were stained with appropriate dilutions of the following fluorochrome-labeled monoclonal antibodies (mAbs): FITC/anti-CD4 (clone H129-19), FITC/anti-CD8 (clone 53-6.7), PE/anti-TCR $\gamma\delta$ (clone GL3) and APC/anti-TCR $\alpha\beta$ (clone H57-597) and then washed with PBS, fixed and analyzed by flow cytometry in a FACSCantoTM device (Becton Dickinson, USA). All these reagents were purchased from Pharmingen/Becton-Dickinson (USA). Analyses were performed after recording 10,000 events for each sample using DivaTM software. BST were identified by their size (forward light scatter) and granularity (side light scatter) as previously described [34].

Evaluating Blood-brain barrier dysfunction

Blood-brain barrier (BBB) integrity was assessed in PbA-infected mice on day 7 p.i. by i.v. injection of Evans Blue (1% in saline) in the retro-orbital plexus as previously described [35]. One hour after injection, mice brains were extracted and photographed using a digital camera (Nikon, USA). Brain staining was quantified by measuring the brightness intensity using the red channel in a delimited circular area of 12,294 pixels² with the aid of the ImageJTM software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). The brightness intensity of mice brain was inversely proportional to the levels of Evans Blue staining.

Statistical analysis

The statistical significance between control and experimental groups were determined with the Log-Rank test for the cumulative survival experiments. The Mann-Whitney U test was used to compare parasitemia levels, the drop in relative temperature, the relative RBC density, BBB integrity and parasite and cytokine gene expression among brains collected from both naïve animals and infected mice. Calculations were performed using BioEstatTM version 3.0 (CNPq, Brazil) and PrismTM version 3.02 (Graphpad, USA) software. Values were considered significant when $P < 0.05$.

Results

HBO effects on ECM associated mortality and on parasite development

To evaluate the neuroprotective effect of pressurized oxygen, two groups of 10 mice each were infected with PbA. One of these groups was submitted daily to HBO conditions (100% O_2 , 3.0 ATA, 1 hour) during 11 consecutive days. As shown in Figure 1A, 100% of PbA-infected mice not exposed to HBO exhibited CM-specific neurological signs within 5 to 8 days after infection and died of fatal cerebral malaria in the following 24 hours; most (80%) died on day 7 p.i. All animals from this group were dead by day 9 p.i. In contrast to the non-exposed animals, 50% of the

mice from the HBO group did not develop CM symptoms and survived. In the HBO group, CM neurological signs began to appear later and the mortality rate increased slowly throughout days 7–10, representing 10, 20, 10 and 10%, respectively, on days 7–10. Of note, 1 animal (10%) died on day 14 and 4 (40%) on day 19 post-infection. Cumulative survival statistical analyses clearly demonstrated that HBO therapy had a significant ($P < 0.0005$) neuroprotective effect against ECM. As expected, in the mice that did not develop CM, parasite burden progressed and mice died as a result of hyperparasitemia (Figure 1B).

As previously reported, HBO therapy inhibits the development of *Leishmania amazonensis* and of a non-cerebral line of *P. berghei* [30,32,36]. To further explore the effects of HBO, we monitored the parasitemia levels of infected mice exposed daily, or not, to HBO (11-day exposure protocol) for up to 19 days. We observed that HBO significantly ($P < 0.05$) reduced the parasite burden of PbA-infected mice on days 4, 5 and 6 p.i., when compared to non-exposed animals (Figure 1B). However, since 100% of non-exposed PbA-infected mice died, we decided to evaluate whether the reduction on parasitemia levels in HBO exposed animals could be sustained over longer periods. Mice infected with *P. berghei* NK-65, a non-cerebral strain that displays similar parasitemia levels, were submitted to pressurized oxygen sessions as in the 11-day exposure protocol (Figure 1C). As observed in PbA-infected animals submitted to pressurized oxygen, a significant ($P < 0.05$) decrease in PbNK-65 development was observed on day 4–13 p.i. Nevertheless, no correlation was found between mice that presented a reduction of parasitemia levels with protection or attenuation of the neurological symptoms (Table S1).

Because we observed that HBO had a significant effect on the parasite burden in the infections of PbA and PbNK-65, we addressed the question as to whether pressurized oxygen therapy could damage normal red blood cells (nRBC) or inhibit parasite development directly. For this purpose, normal RBC (nRBC) collected from a naïve mouse were exposed to pressurized oxygen (100% O₂, 3 ATA) during 4 or 6 hours. The relative percentage of nRBC density was not significantly altered ($P > 0.05$) after direct exposure to HBO for up to 6 hours (data not shown), demonstrating that HBO therapy was not toxic to healthy erythrocytes in these conditions. Next, to evaluate HBO's effect directly on parasite development, infected RBC (iRBC) from a PbA-infected mouse were collected and exposed to HBO (100% O₂, 3 ATA). Figure 2A shows a significant reduction ($P < 0.05$) on parasite development after 4 and 6 hours in comparison to 0 hour, regardless of exposure to pressurized oxygen. However, when we compared the reduction on parasitemia levels of iRBC left in room air or exposed to HBO, we noticed a significant ($P = 0.01$) and more pronounced reduction of the non-exposed iRBC than of the infected cells directly exposed to HBO up to 6 hours. Inhibition of parasite development was also observed after 4 hours of exposure; however, no statistical difference was found ($P > 0.05$). Then, to assess whether these iRBC were still able to induce CM neurological signs, we collected 10⁶ iRBC exposed directly to HBO or left outside the hyperbaric chamber for 6 hours and injected them in susceptible mice. As shown on Figure 2B, mice infected with iRBC directly exposed to HBO or with the cells left outside the chamber did not present significant differences ($P > 0.05$) when the survival curves were compared. Taken together, these data suggest that 6 hours of HBO exposure do not directly affect PbA-infected erythrocytes nor alter their ability to induce CM clinical symptoms.

Next, to investigate whether pressurized oxygen could have an effect when parasitemia was already patent (4%), we randomly selected half of the PbA-infected mice on day 4 p.i. and exposed

them to daily HBO sessions (100% O₂, 3.0 ATA, 2 hours per day) until day 7 (Figure 3A). As expected, non-treated mice started to display CM clinical features early on day 5 and 6 and began dying within 20–24 hours on days 5 (10%) and 6 (10%), though the majority (80%) died on day 7 p.i. All mice were dead by day 7. Notably, hyperbaric oxygen significantly delayed ($P < 0.01$) CM specific mortality by up to two days, when compared to non-exposed animals, and reduced the rate of mortality on day 7 from 80% to 40% (Figure 3A). Moreover, two HBO-exposed mice (20%) only exhibited CM neurological signs on days 8 and 9, dying within 24 hours on days 9 and 10. This shows that HBO is capable of interfering significantly with the manifestation of the CM clinical symptoms, including death, even when administered after parasite establishment. As observed in the 11-day exposure protocol, the administration of pressurized oxygen starting on day 4 p.i. (4-day-exposure) in PbA-infected mice reduced the parasitemia levels ($P < 0.01$) significantly on days 4–6 (data not shown).

To confirm that only pressurized oxygen had neuroprotective effects, PbA-infected mice were submitted to the 11-day exposure protocol, but using 1.0 ATA as the atmospheric air pressure (Figure 3B). In this assay, no significant difference ($P > 0.05$) was observed after cumulative survival analyses between infected animals exposed to HBO-1.0 ATA and the control mice. Of note, most of the non-exposed mice began to present CM symptoms and died earlier than the HBO-1.0 ATA treated animals. Although a minimal beneficial effect was observed after the administration of 100% oxygen (hyperoxia) under normobaric conditions, this was not enough to protect or even delay CM neurological symptoms, thus demonstrating that HBO's neuroprotective effect does not rely solely on the administration of 100% oxygen.

The effect of HBO on cytokine expression levels and adherent T cells in the brain

Based on the anti-inflammatory features of the HBO treatment reported in ischemic models [21,26] and since the up-regulation of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-1 β) [10–12] and the participation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [14,37] is essential for CM pathology to occur, we examined the mRNA levels of different cytokines in the brain of PbA-infected mice sacrificed on day 7 p.i. According to Figure 4, after RT-qPCR analysis the mRNA levels of IFN- γ ($P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.01$) and IL-10 ($P < 0.05$) significantly decreased in the brain of mice submitted to the 11-day exposure HBO protocol in comparison to non-exposed animals. No significant difference ($P > 0.05$) was noted in the mRNA levels of IL-1 β and IL-6. RT-negative controls did not generate a detectable amplification product. All cDNA samples resulted in a product when the β -actin set of oligonucleotides and specific probe were present. Regardless of exposure to HBO, animals that presented an increase in the expression of IFN- γ mRNA also presented elevated levels of TNF- α and IL-10.

Next, we asked whether the neuroprotective effect of the pressurized oxygen therapy could be associated to the percentage of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T lymphocytes sequestered in mice brains collected on day 7 p.i. (Figure 5). As compared with brains of non-exposed animals, HBO treatment reduced about 1.6 fold the percentage of both $\gamma\delta$ (1.9 vs. 1.2%) and $\alpha\beta$ (7.0 vs. 4.2%) CD4⁺ T cells between the pools of mice of these two groups (Figure 5A–B). However, a more pronounced decline, about 2.5 fold, was observed on the percentage of both $\gamma\delta$ (7.1 vs. 2.8%) and $\alpha\beta$ (43.1 vs. 17.7%) CD8⁺ T lymphocytes in the mice exposed to HBO in contrast to the non-exposed animals (Figure 5C–D). Taken together, our data demonstrate that HBO's neuroprotective effect is related to the reduction of the T cells sequestered in mice brains; and

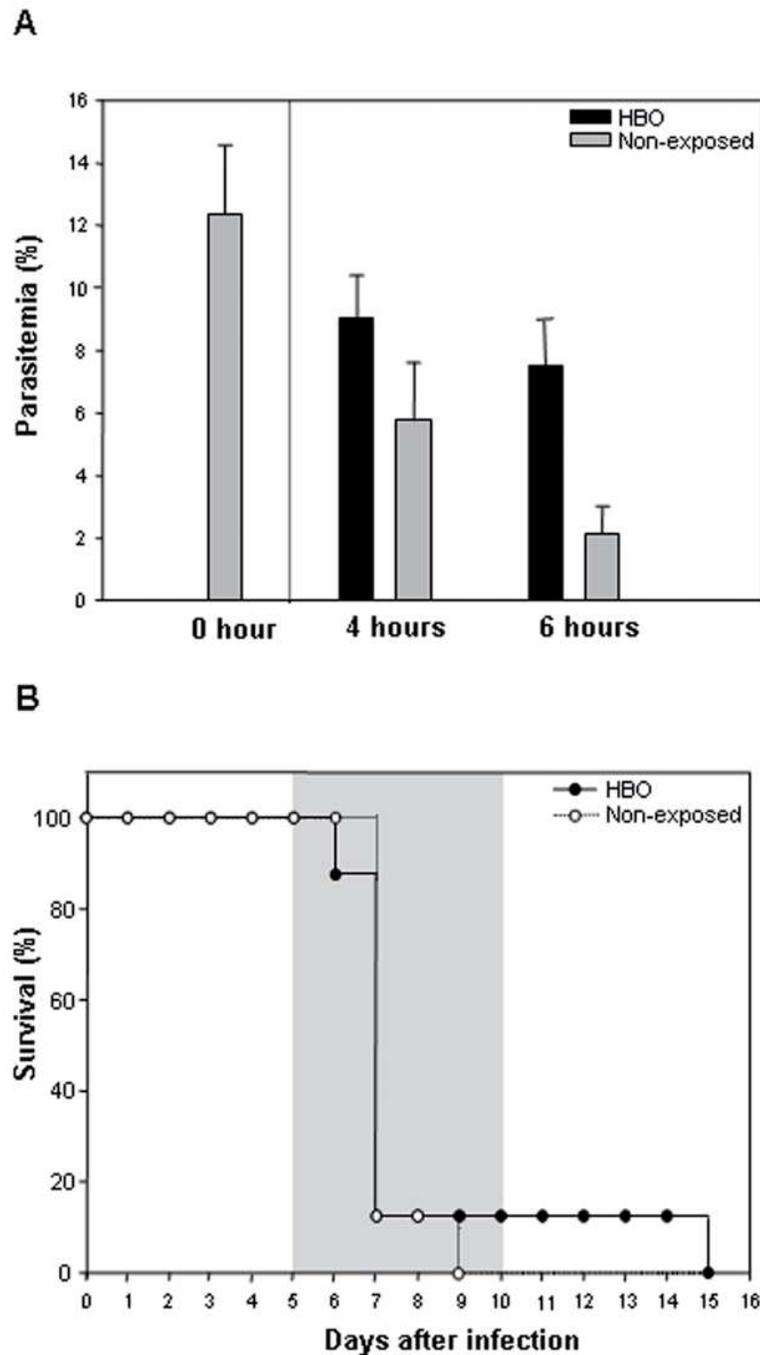


Figure 2. The direct effect of HBO therapy on RBC infected, or not, by PbA. 10^6 iRBC/mL of PbA in a 24-well-plate were directly exposed or not to HBO (100% O_2 , 3 ATA). **(A)** Parasitemia levels were evaluated four or six hours after direct iRBC exposure to pressurized oxygen conditions. The parasite burden decreased significantly ($P < 0.05$) after 4 or 6 hours in comparison to 0 hour. The reduction of parasitemia levels were more pronounced in infected cells left in normal room air than iRBC submitted directly to HBO after 4 ($P > 0.05$) or 6 hour-exposure ($P = 0.01$). Results are expressed as the mean of quadruplicates \pm standard deviation. **(B)** Mice ($n = 8$ each group) were infected with 10^9 iRBC of PbA collected after either six hours of direct exposure or no exposure to HBO. No statistical difference was noted when survival curves were compared ($P > 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0003126.g002

corroborate with existing literature, in which T lymphocytes, mainly $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells, are implicated in CM pathology [14,37] No immunolabeling was detected on T lymphocytes in the absence of mAbs (data not shown).

HBO effects on severe ECM symptoms

Severe hypothermia and dysfunction of the BBB are common features in ECM [35]. To investigate whether HBO therapy could improve poor ECM outcomes, we measured the corporal

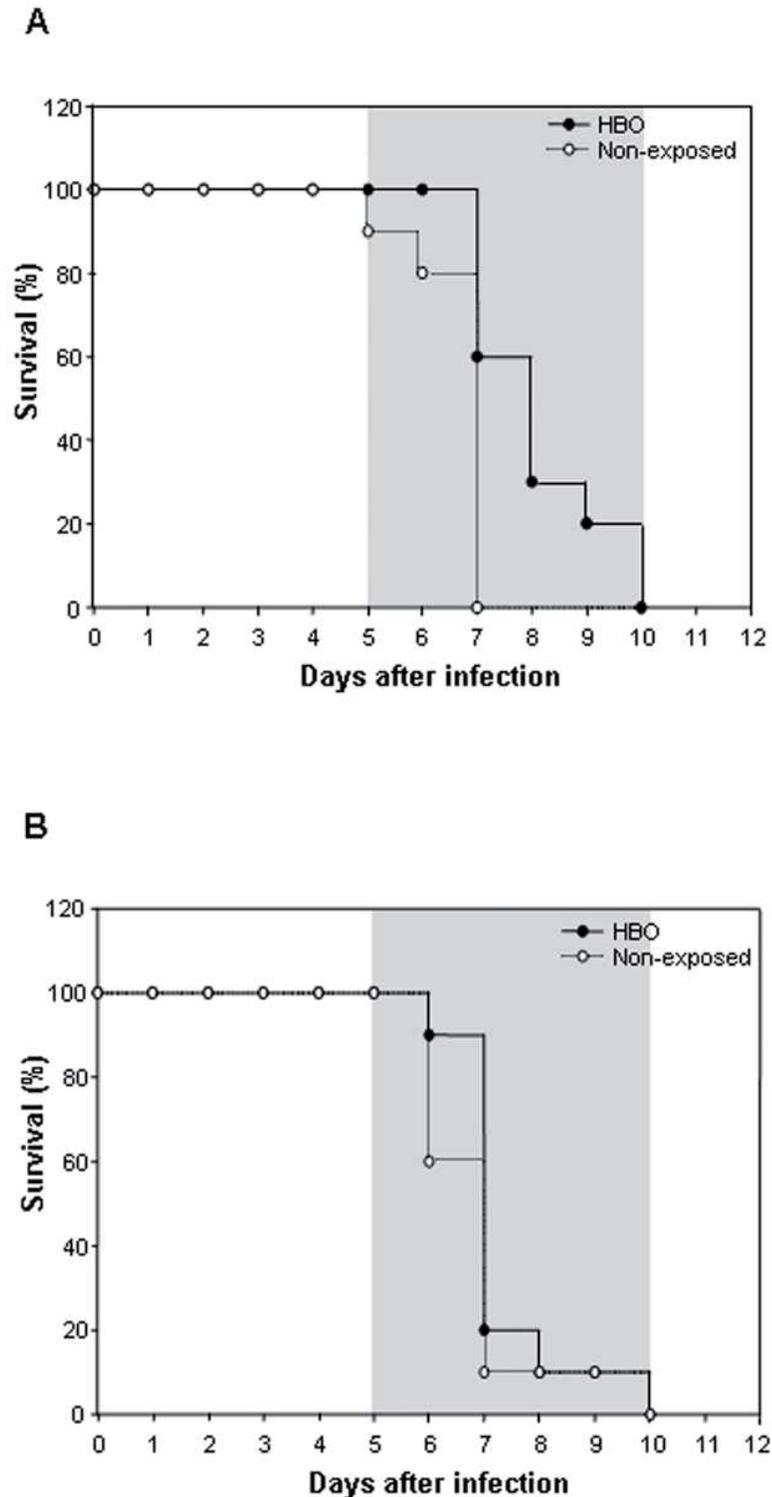


Figure 3. Evaluation of HBO's neuroprotective effect after parasite establishment and the role of pressure in mice survival. (A) Twenty mice were injected i.p. with 10^6 iRBC; on day 4 p.i. (parasitemia of 4%) 10 animals, randomly selected, were daily exposed to HBO therapy (100% O_2 , 3.0 ATA) for 2 hours from days 4–7 after parasite inoculation. The survival curves of both groups demonstrated that HBO significantly delayed mice mortality ($P < 0.01$). **(B)** Groups of 10 PbA-infected mice were exposed daily or not exposed to HBO (100% O_2 , 1 hour per day) at 1.0 ATA until all the animals died. Survival curves of the one hundred percent normobaric oxygen exposed mice and animals exposed to normal air did not differ significantly ($P > 0.05$).
doi:10.1371/journal.pone.0003126.g003

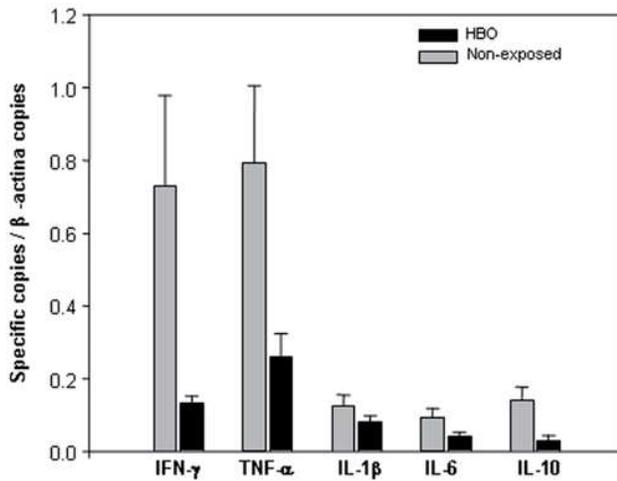


Figure 4. Cytokine gene expression is altered in the brains of PbA-infected mice exposed to HBO. Groups of 6–7 PbA-infected mice were either submitted or not to pressurized oxygen therapy (100% O₂, 3.0 ATA, 1 hour per day) and on day 7 p.i. brains were collected for real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis. HBO significantly reduced IFN- γ ($P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.01$) and IL-10 ($P < 0.05$), but did not alter IL-1 β and IL-6 mRNA expression levels in contrast to non-exposed mice. Values are expressed as the mean of specific cytokine genes copies relative to β -actin copies of six-seven mice \pm standard deviation.
doi:10.1371/journal.pone.0003126.g004

temperature of PbA-infected mice daily regardless of exposure to pressurized oxygen in the same conditions as the 11-day exposure protocol. Unlike in the case of non-exposed mice, HBO therapy significantly prevented ($P < 0.001$) hyperthermia in mice from day 6

p.i., when severe neurological signs were evident in most of the animals (data not shown). Then, by injecting Evans Blue solution, we analyzed and quantified the BBB integrity in HBO exposed and non-exposed animals and in naïve animals early on day 7 p.i. One hour after Evans Blue injection, mice brains were collected and photographed. As seen in Figure 6A, brains collected from non-exposed mice were darker than those of HBO treated animals due to a high incorporation of Evans Blue in the brain tissue as a consequence of BBB destruction [26]. As expected, we did not observe any staining in naïve mice brains. To quantify the Evans Blue staining and, in turn the BBB integrity, we measured the light intensity in naïve animals and infected mice brains submitted or not to pressurized oxygen. According to Figure 6B, HBO therapy significantly reduced ($P < 0.005$) the brain staining in treated mice. Moreover, when we compared the Evans Blue staining in naïve and PbA-infected animals that received HBO treatment, no significant difference was observed ($P > 0.05$). As expected, a statistical difference in light intensity levels was observed between naïve mice and non-exposed infected animals ($P < 0.005$). Collectively, these data clearly demonstrate that HBO prevents temperature drops and BBB dysfunction.

Discussion

In the present study, we show that HBO therapy (100% O₂, 3.0 ATA) is capable of partially protecting PbA-infected mice against CM and delaying CM-specific neurological signs (Figures 1 and 3). These observations demonstrate for the first time that pressurized oxygen therapy under hyperbaric conditions well-tolerated in humans and animals can prevent CM clinical outcomes, including death.

In an experimental rat model of brain trauma, recent studies have shown that HBO has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemia, especially when initiated within the first 6 hours [38]. HBO was thus found to reduce BBB damage, prevent

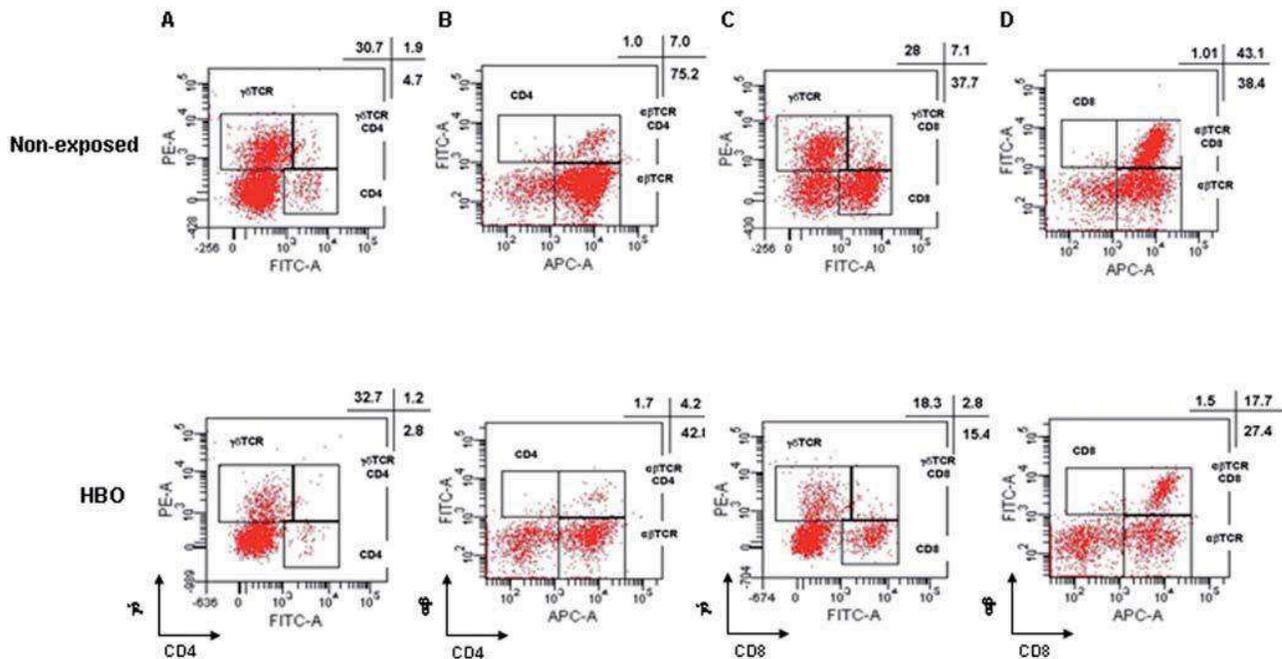


Figure 5. Reduced brain-sequestered T lymphocytes in PbA-infected mice exposed to HBO treatment. Flow cytometric analyses were done on $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ CD4⁺ and CD8⁺ T cells sequestered in mice brains (a pool of 4–5 mice per group) collected on day 7 after PbA infection between the groups regardless of exposure to HBO conditions. Pressurized oxygen therapy reduced the percentage of all cellular subsets, but mainly $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells. Representative dot blots of (A) $\gamma\delta$ and CD4, (B) $\alpha\beta$ and CD4, (C) $\gamma\delta$ and CD8, (D) $\alpha\beta$ and CD8 double staining.
doi:10.1371/journal.pone.0003126.g005

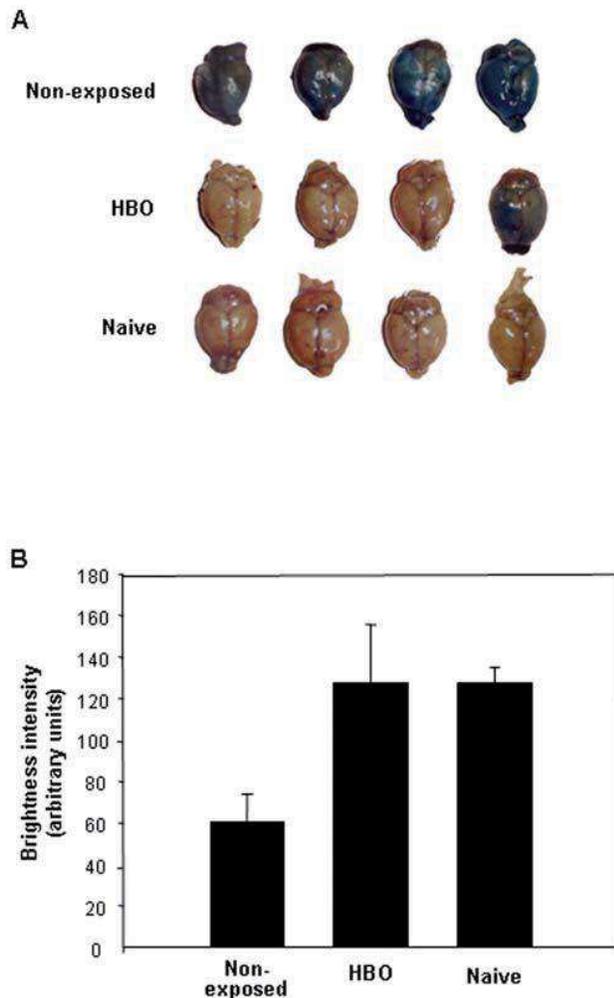


Figure 6. HBO preserves integrity of the blood-brain barrier in PbA-infected mice. Four PbA-infected mice, representative of each group ($n=8$) exposed or not to HBO treatment (100% O_2 , 3.0 ATA, 1 hour per day), received i.v. injections of 1% Evans Blue solution early on day 7 p.i. (A) One hour after Evans Blue injection, brains of naïve animals, PbA-infected mice and HBO-treated PbA-infected mice were collected and photographed ($n=4$ of each group). (B) The BBB dysfunction of naïve mice or PbA-infected animals, regardless of submission to hyperbaric conditions, was determined by brain staining quantification with the aid of the ImageJ™ software ($n=4$ of each group). HBO significantly reduced ($P<0.005$) the staining in the brains of infected-mice in comparison to non-treated animals. No statistical difference ($P>0.05$) was noticed between naïve and HBO-treated infected mice and brains collected from non-treated infected mice were significantly ($P<0.005$) darker than naïve animals. Results are expressed as the mean of brightness intensity of each delimited brain area of six mice \pm standard deviation. doi:10.1371/journal.pone.0003126.g006

apoptosis and maintain lipid oxidation levels stable [39–42]. HBO's neuroprotection was also observed in neonatal rats after the induction of the ischemic process [43]. Rabbits exposed to pressurized oxygen for 90 min during 3 consecutive days presented a significant reduction in the edema area of the brain and cerebral necrosis [44]. In addition, the preservation of BBB, the reduction in HIF-1 α levels, and decreased apoptosis and neuronal damage were observed in a rat model for subarachnoid hemorrhage after exposure to HBO [45]. In humans, exposure of

thirty-seven brain-injured patients to sixty minutes of HBO treatment every 24 hours increased the cerebral metabolic oxygen rate and reduced cerebrospinal lactate levels [46]. In another study, 10 out of 22 patients with cerebral infarction presented an amelioration of their motor function, while 7 of these patients experienced improved revascularization after pressurized oxygen sessions [47].

When comparing exposed animals with non-exposed animals, we noticed a significant reduction on the parasitemia levels of PbA-infected mice exposed to HBO (11-day exposure protocol) during infection (4–6 p.i.; Figure 1B). PbNK-65-infected mice exposed to HBO in the same conditions also presented a significant reduction of their parasite burden on day 4–13 p.i. (Figure 1C). These findings are in line with a recent study in which daily sessions of 100% pressurized oxygen at 2.5 ATA significantly reduced the size of *Leishmania amazonensis* induced lesions and the parasite development in infected mice [36]. Nevertheless, as in ECM parasites in the brain are necessary, but not sufficient, to neurological symptoms appearing [15], the lack of correlation between survival and the reduction of parasitemia levels, measured daily until the death of PbA-infected animals exposed to HBO, might be related to the fact that parasitemia levels probably do not determine the parasite load in the brain. Indeed, methods aimed at inducing protection against ECM often do not reduce parasitemia levels [48].

Also, direct exposure to HBO for up to 6 hours observed in our *in vitro* analyses was not harmful to normal or PbA-infected erythrocytes (data not shown and Figure 2), differing from previous studies where direct exposure of *L. amazonensis* promastigotes to HBO for up to 6 hours significantly decreased parasite viability [32]. However, as it is assumed that HBO increases the levels of reactive oxygen intermediates (ROI) [49], we believe that the disparity of these two protozoan parasites in terms of HBO susceptibility might be linked to differential killing mediated by reactive oxygen intermediates (ROI). In fact, it has been shown that *Leishmania* parasite killing is sensitive to ROI, whereas PbA-infected erythrocytes are resistant to killing by ROI, even at supraphysiological doses, and ROI are not essential for controlling *Plasmodium* sp. parasitemia [50–52].

We have also shown that the neuroprotective effects of daily hyperbaric sessions rely on the combination of hyperoxia and pressure at 3.0 ATA (Figure 1A), as ECM-specific mortality of PbA-infected mice submitted to 100% oxygen pressurized at 1.0 ATA did not differ significantly from the non-exposed animals (Figure 3B). In an experimental model for cerebral ischemia, HBO neuroprotection was not achieved in animals submitted to pure oxygen at only 1.0 ATA [39,40], and human stimulated monocyte-macrophages cultured in hyperoxia did not present changes in their cytokine expression levels [23]. More importantly, in a study of 12 CM comatose patients who breathed 95% oxygen, no improvement in the consciousness levels were observed in any of the individuals [7].

Brain macrophages from adults and children who died of CM had higher levels of immunological markers that are normally not upregulated [9], such as IFN- γ , IL-1 β , IL-10 and TNF- α [10,11,16] neuroprotection in ECM is often associated with the reduction of IFN- γ , and TNF- α levels [53–55]. IL-10 is higher in severe malaria patients from different regions despite the fact that CM individuals presented lower levels of IL-10 in comparison to the non-cerebral malaria group [16,56] Furthermore, CD8 $^+$ $\alpha\beta$ T cells migrating to the brain have been implicated in cytotoxicity and BBB disruption, thus contributing to ECM mortality [14,15]. Here, we showed that HBO therapy reduced IFN- γ , TNF- α and IL-10 mRNA expression levels in the brain and the percentage of

brain-sequestered CD4⁺ and CD8⁺ $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T lymphocytes (Figures 4–5). Moreover, the reduction in the IL-10 levels in PbA-infected mice exposed to HBO might be associated with the decrease in expression of IFN- γ and TNF- α . These data are in line with the fact that pressurized oxygen is able to inhibit synthesis of cytokines, such as TNF- α and IFN- γ , T lymphocyte proliferation, decrease the migration of immunocompetent cells and improve tissue transplantation by down-regulating lymphoid system functions [19,22,23,28,57,58].

Finally, when we assessed the HBO effects on cerebral outcomes, we noticed a significant reduction in hypothermia (data not shown) and in the BBB breakdown (Figure 6) in mice exposed to pressurized oxygen. This corroborates previous findings where HBO (100% O₂, 2.8–3.0 ATA) prevented BBB permeability and functionality in animals submitted to a brain injury [31,36]. Based on these observations, it is plausible to assume that HBO prevents BBB breakdown and then avoids vascular leakage by down-regulating the inflammatory immune response in ECM, but mainly, by reducing the percentage of brain-sequestered CD8⁺ T lymphocytes [10]. Therefore, we cannot rule out that other mechanisms are also involved in HBO neuroprotective effects in ECM, as HBO also inhibits ICAM-1 expression and neuronal apoptosis and upregulates the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is involved in angiogenesis in human endothelial cells [22,23,25,28,59]. Also, HBO led to an increase in the brain levels of nitric oxide (NO) [60], a molecule that contributes to protection against ECM [61].

In summary, we have presented evidence of the beneficial effects induced by HBO therapy against ECM. We also demonstrated that the administration of pressurized oxygen down-regulates IFN- γ , TNF- α and IL-10 cytokine expression and the

migration to the brain of T lymphocytes, preventing BBB breakdown and severe mice hypothermia without directly affecting iRBC viability and infectivity. Since complementary therapies such as steroids, sodium bicarbonate and heparin are deleterious in CM, and treatment with an anti-TNF- α monoclonal can worsen neurological symptoms [62]. The data presented here create promising perspectives for further investigation of additional HBO's neuroprotective mechanisms and to consider it as a new supportive therapy that could act alone or in association with conventional treatment or with recently discovered neuroprotective or anti-inflammatory molecules to improve poor CM outcomes [63,64].

Supporting Information

Table S1

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003126.s001 (0.01 MB PDF)

Acknowledgments

Many thanks to Dr. Lindsay Ann Pirrit for revising the English, to Dr. Laurent Renia for critical reading of the manuscript and to Dr. Lúcio H. Freitas-Junior for delightful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: YCB UG WWAS FTMC. Performed the experiments: YCB ASF UG SCPL BOC. Analyzed the data: YCB ASF UG SCPL WWAS RA GW LMBS SG FTMC. Contributed reagents/materials/analysis tools: RA GW LMBS SG FTMC. Wrote the paper: FTMC.

References

- Carter JA, Ross AJ, Neville BG, Obiero E, Katana K, et al. (2005) Developmental impairments following severe falciparum malaria in children. *Trop Med Int Health* 10: 3–10.
- Newton CRJC, Krishna S (1998) Severe Falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther* 79: 1–53.
- Newton CR, Peshu N, Kendall B, Kirkham FJ, Sowunmi A, et al. (1994) Brain swelling and ischaemia in Kenyans with cerebral malaria. *Arch Dis Child* 70: 281–287.
- Newton CR, Marsh K, Peshu N, Kirkham FJ (1996) Perturbations of cerebral hemodynamics in Kenyans with cerebral malaria. *Pediatr Neurol* 15: 41–49.
- 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.
- White NJ, Warrell DA, Looareesuwan S, Chanthavanich P, Phillips RE, et al. (1985) Pathophysiological and prognostic significance of cerebrospinal-fluid lactate in cerebral malaria. *Lancet* 1: 776–778.
- Warrell DA, White NJ, Veall N, Looareesuwan S, Chanthavanich P, et al. (1988) Cerebral anaerobic glycolysis and reduced cerebral oxygen transport in human cerebral malaria. *Lancet* 2: 534–538.
- Patankar TF, Karnad DR, Shetty PG, Desai AP, Prasad SR (2002) Adult cerebral malaria: prognostic importance of imaging findings and correlation with postmortem findings. *Radiology* 224: 811–816.
- Medana IM, Turner GD (2006) Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 36: 555–568.
- Hunt NH, Grau GE (2003) Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 24: 491–499.
- Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, et al. (2004) Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med* 10: 143–145.
- Rudin W, Favre N, Bordmann G, Ryyfel B (1997) Interferon- γ is essential for the development of cerebral malaria. *Eur J Immunol* 27: 810–815.
- Hermesen CC, Crommert JV, Fredix H, Sauerwein RW, Eling WM (1997) Circulating tumour necrosis factor alpha is not involved in the development of cerebral malaria in Plasmodium berghei-infected C57BL mice. *Parasite Immunol* 19: 571–577.
- Belhoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, van Rooijen N, et al. (2002) On the pathogenic role of brain-sequestered $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* 169: 6369–6375.
- Nitcheu J, Bonduelle O, Combadiere C, Tefit M, Seilhean D, et al. (2003) Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol* 170: 2221–2228.
- Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, et al. (2006) Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis* 194: 198–207.
- Gudewicz TM, Mader JT, Davis CP (1987) Combined effects of hyperbaric oxygen and antifungal agents on the growth of *Candida albicans*. *Aviat Space Environ Med* 58: 673–678.
- Park MK, Myers RA, Marzella L (1992) Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin Infect Dis* 14: 720–740.
- Kaide CG, Khandelwal S (2008) Hyperbaric oxygen: applications in infectious disease. *Emerg Med Clin North Am* 26: 571–595.
- Al-Waili NS, Butler GJ (2006) Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action. *The Scientific World Journal* 6: 425–441.
- Zhang Q, Chang Q, Cox RA, Gong X, Gould IJ (2008) Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *J Invest Dermatol* 128: 2102–2112.
- Lahat N, Bitterman H, Yaniv N, Kinarty A, Bitterman N (1995) Exposure to hyperbaric oxygen induces tumour necrosis factor- α (TNF- α) secretion from rat macrophages. *Clin Exp Immunol* 102: 655–659.
- Benson RM, Minter LM, Osborne BA, Granowitz EV (2003) Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clin Exp Immunol* 134: 57–62.
- Yang ZJ, Bosco G, Montante A, Ou XI, Camporesi EM (2001) Hyperbaric O₂ reduces intestinal ischemia-reperfusion-induced TNF- α production and lung neutrophils sequestration. *Eur J Appl Physiol* 85: 96–103.
- Buras JA, Stahl GL, Svoboda KK, Reenstra WR (2000) Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: 292–302.
- Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, Zhang JH (2002) Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. *Brain Res* 926: 165–171.
- Li Y, Zhou C, Calvert JW, Colohan AR, Zhang JH (2005) Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model. *Exp Neurol* 191: 198–210.

28. Al-Waili N, Butler GJ, Beale J, Abdullah MS, Hamilton RWB, et al. (2005) Hyperbaric oxygen in treatment of patients with cerebral stroke, brain trauma, and neurological disease. *Adv Therapy* 22: 659–678.
29. Thackham JA, McElwain DL, Long RJ (2008) The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen* 16: 321–330.
30. Rencricca NJ, Coleman RM, Altschule MD, Faletra PP, Gray AD, et al. (1981) Quantification of hyperbaric oxygen-induced toxicity utilizing a malarial system. *Aviat Space Environ Med* 52: 85–87.
31. Engwerda C, Belnoue E, Grüner AC, Renia L (2005) Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol* 297: 103–143.
32. Arrais-Silva WW, Collhorne MC, Ayres DC, de Souza Souto PC, Giorgio S (2005) Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitol Int* 54: 1–7.
33. Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* 14: 33–43.
34. Irani DN, Griffin DE (1991) Isolation of brain parenchymal lymphocytes for flow cytometric analysis. Application to acute viral encephalitis. *J Immunol Methods* 139: 223–231.
35. Piguet PF, Kan CD, Vesin C, Rochat A, Donati Y, et al. (2001) Role of CD40-CVD40L in mouse severe malaria. *Am J Pathol* 159: 733–742.
36. Arrais-Silva WW, Pinto EF, Rossi-Bergmann B, Giorgio S (2006) Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice. *Acta Trop* 98: 130–136.
37. Renia L, Potter SM, Mauduit M, Rosa DS, Kayibanda M, et al. (2006) Pathogenic T cells in cerebral malaria. *Int J Parasitol* 36: 547–554.
38. Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, Brecht S, Deuschl G (2004) Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats. *Stroke* 35: 578–583.
39. Veltkamp R, Siebing DA, Heiland S, Schoenfeldt-Varas P, Veltkamp C, et al. (2005a) Hyperbaric oxygen induces rapid protection against focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1037: 134–138.
40. Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, Heiland S, Bieber K, et al. (2005b) Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 36: 1679–1683.
41. Schabitz WR, Schade H, Heiland S, Kollmar R, Bardutzky J, et al. (2004) Neuroprotection by hyperbaric oxygenation after experimental focal cerebral ischemia monitored by MRI. *Stroke* 35: 1175–1179.
42. Yin D, Zhou C, Kusaka I, Calvert JW, Parent AD, et al. (2003) Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 855–864.
43. Calvert JW, Yin W, Patel M, Badr A, Mychaskiw G, et al. (2002) Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain Res* 951: 1–8.
44. Niklas A, Brock D, Schober R, Schulz A, Schneider D (2004) Continuous measurements of cerebral tissue oxygen pressure during hyperbaric oxygenation-HBO effects on brain edema and necrosis after severe brain trauma in rabbits. *J Neurol Sci* 219: 77–82.
45. Ostrowski RP, Colohan ART, Zhang JH (2005) Mechanisms of therapeutic of oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 554–571.
46. Rockswold SB, Rockswold GL, Vargo JM, Erickson CA, Sutton RL, et al. (2001) Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients. *J Neurosurg* 94: 403–411.
47. Kapp JP (1981) Neurological response to hyperbaric oxygen a criterion for cerebral revascularization. *Surg Neurol* 15: 43–46.
48. Jennings VM, Lal AA, Hunter RL (1998) Evidence for multiple pathologic and protective mechanisms of murine cerebral malaria. *Infect Immun* 66: 5972–5979.
49. Hink J, Jansen E (2001) Are superoxide and/or hydrogen peroxide responsible for some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy? *Med Hypotheses* 57: 764–769.
50. Reiner SL, Zheng S, Wang ZE, Stowring L, Locksley RM (1994) *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 179: 447–456.
51. Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde H (2005) *Plasmodium berghei* resists killing by reactive oxygen species. *Infect Immun* 73: 6704–6710.
52. Gillman BM, Batchelder J, Flaherty P, Weidanz WP (2004) Suppression of *Plasmodium chabaudi* parasitemia is independent of the action of reactive oxygen intermediates and/or nitric oxide. *Infect Immun* 72: 6359–6366.
53. Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G (1997) Tumor necrosis factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* 150: 1473–1486.
54. De Kossodo S, Grau GE (1993) Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J Immunol* 151: 4811–4820.
55. Jennings VM, Actor JK, Lal AA, Hunter RL (1997) Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. *Infect Immun* 65: 4883–4887.
56. Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, et al. (1999) The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis* 180: 1288–1297.
57. Gadd MA, McClellan DS, Neuman TS, Hansbrough JF (1990) Effect of hyperbaric oxygen on murine neutrophil and T-lymphocyte functions. *Crit Care Med* 18: 974–979.
58. Granowitz EV, Skulsky EJ, Benson RM, Wright J, Garb JL, et al. (2002) Exposure to increased pressure or hyperbaric oxygen suppresses interferon- γ secretion in whole blood cultures of healthy humans. *Undersea Hyperb Med* 29: 216–225.
59. Lee CC, Chen SC, Tsai SC, Wang BW, Liu YC, et al. (2006) Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. *J Biomed Sci* 13: 143–156.
60. Ohgami Y, Chung E, Shirachi DY, Quock RM (2008) The effect of hyperbaric oxygen on regional brain and spinal cord levels of nitric oxide metabolites in rat. *Brain Res Bull* 75: 668–73.
61. Gramaglia I, Sobolewski P, Meays D, Contreras R, Nolan JP, et al. (2006) Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* 12: 1417–1422.
62. Idro R, Jenkins NE, Newton CRJ (2005) Pathogenesis, clinical features, and neurological outcomes of cerebral malaria. *The Lancet* 4: 827–840.
63. Kaiser K, Texier A, Ferrandiz J, Buguet A, Meiller A, et al. (2006) Recombinant human erythropoietin prevents the death of mice during cerebral malaria. *J Infect Dis* 193: 987–995.
64. Wassmer SC, Cianciolo GJ, Combes V, Grau GE (2005) Inhibition of endothelial activation: a new way to treat cerebral malaria? *PLoS Med* 2: 245e.

ANEXO II
OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS

Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* Inhibits *Plasmodium* Growth In Vitro and In Vivo[∇]

Stefanie C. P. Lopes,^{1,2} Yara C. Blanco,^{1,2} Giselle Z. Justo,³ Paulo A. Nogueira,^{4,†}
Francisco L. S. Rodrigues,⁴ Uta Goelnitz,⁵ Gerhard Wunderlich,⁵
Gustavo Facchini,⁶ Marcelo Brocchi,¹ Nelson Duran,⁷
and Fabio T. M. Costa^{1,2,*}

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, IB, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, P.O. Box 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil¹; Departamento de Parasitologia, IB, UNICAMP, P.O. Box 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil²; Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Rua 3 de Maio 100, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil³; IPEPATRO/CEPEM, BR 364, KM 4.5, 78900-970 Porto Velho, RO, Brazil⁴; Departamento de Parasitologia, ICB-2, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brazil⁵; Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB, UNICAMP, P.O. Box 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil⁶; and Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica, IQ, UNICAMP, C.P. 6154, 13083-970 Campinas, SP, Brazil⁷

Received 27 May 2008/Returned for modification 30 August 2008/Accepted 24 February 2009

Violacein is a violet pigment extracted from the gram-negative bacterium *Chromobacterium violaceum*. It presents bactericidal, tumoricidal, trypanocidal, and antileishmanial activities. We show that micromolar concentrations efficiently killed chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* strains in vitro; inhibited parasitemia in vivo, even after parasite establishment; and protected *Plasmodium chabaudi chabaudi*-infected mice from a lethal challenge.

Violacein is a violet pigment isolated from *Chromobacterium violaceum*, a gram-negative betaproteobacterium found in the Amazon River in Brazil. It has been reported to kill bacteria (4) and induces apoptosis in various types of cancer cells (1, 5, 7, 8, 10, 11). Moderate activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* promastigotes has also been observed (3, 9). Due to the widespread presence of drug resistance in the malaria parasite, resulting in dramatically decreased efficacy of available antimalarial drugs (15), and the fact that immunoprotection achieved by the most successful malaria vaccine is only partial and short-lived (14), we evaluated the in vitro and in vivo effects of violacein on human and murine blood stage forms of *Plasmodium* parasites.

Isolation and purification of violacein, 3-[1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ilydeno]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one (Fig. 1), from *C. violaceum* (CCT3496) were performed as previously described (12). Toxicity was measured as the concentration-dependent lysis of normal erythrocytes (NE) by counting red blood cells per milliliter with the aid of a Neubauer chamber. After 48 h of exposure to various concentrations of violacein, the percent red blood cell density (RBCD) relative to that of the control (without violacein) was monitored and calculated according to the formula (RBCD per milliliter in the presence of violacein/RBCD per milliliter without violacein) × 100. As shown in Fig. 2A, a slight reduction in the RBCD percentage at violacein concentrations of

>8.0 μM was observed. Significant (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$) toxicity to NE occurred at a concentration of 14.0 μM.

Next, we performed dose-response assays to obtain the 50% inhibitory concentrations (IC₅₀s) of violacein against erythrocytes infected with chloroquine-sensitive or -resistant strains of *P. falciparum* (3D7 [16] or S20 [2], respectively) at 1% parasitemia and a 2% final hematocrit. We used [³H]hypoxanthine (Amersham Biosciences, Amersham, United Kingdom) incorporation to assess parasite growth according to a protocol described elsewhere (13). Violacein was tested in triplicate at least three times with different batches and cells, and parasite growth was compared to that in nontreated infected erythrocytes (IE), which represented 100% parasite growth. Percent parasite growth inhibition was calculated according to the formula [1 – (cpm of treated IE – cpm of NE/cpm of nontreated IE – cpm of NE)] × 100. After a 48-h incubation, violacein inhibited parasite development even at the lowest tested concentration of 0.06 μM and completely abrogated parasite viability at concentrations of >1.0 μM (Fig. 2B).

The IC₅₀ of violacein against *P. falciparum* strain 3D7 was calculated as 0.85 ± 0.11 μM. We then tested whether the effect of violacein was directed against young (rings, 0 to 24 h) or mature (trophozoites and schizonts, 24 to 48 h) blood forms by using synchronized parasites (± 6 h) obtained by repeated 5% sorbitol treatment as previously described (6). After a 24-h incubation, inhibition of the different parasite stages by violacein was measured. As shown in Fig. 2C, there was no statistically significant difference (Mann-Whitney U test, $P > 0.05$) between the inhibitory values of violacein in either parasite stage. We then asked if susceptibility or resistance to chloroquine also predicts parasite sensitivity to violacein. As shown in Fig. 2D, the violacein IC₅₀s for strains 3D7 and S20 did not differ significantly (0.85 ± 0.11 and 0.63 ± 0.13 μM, respectively; Mann-Whitney U test, $P > 0.05$).

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, IB, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, P.O. Box 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. Phone: 55 19 3788-6594. Fax: 55 19 3788-6276. E-mail: costaftm@unicamp.br.

† Present address: Centro de Pesquisa Leonidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Laboratório de Biodiversidade em Saúde, 69057-070 Manaus, AM, Brazil.

[∇] Published ahead of print on 9 March 2009.

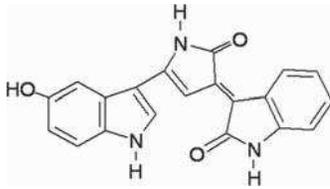


FIG. 1. Chemical structure of violacein.

We then investigated whether violacein antimalarial activity could be sustained in a mouse model, where other characteristics such as bioavailability and pharmacokinetics have to be taken in account. For the *in vivo* assays, C57BL/6 mice (7 to 10 mice per group, aged 7 to 10 weeks, and with a body weight of 20 ± 3 g) were infected with a nonlethal (AS) or a lethal (AJ) strain of *Plasmodium chabaudi chabaudi* by intraperitoneal (i.p.) injection with 10^6 IE. Parasitemia levels were determined daily by counting the IE among at least 1,000 erythrocytes in Giemsa-stained blood smears. As shown in Fig. 3A, daily ad-

ministration of violacein i.p. for 11 consecutive days (0 to 10 days postinfection [p.i.]) reduced the parasitemia of *P. chabaudi chabaudi* AS-infected mice. Thirty-nine percent inhibition was observed on day 7 p.i. (parasitemia peak), in comparison to nontreated mice (control; Table 1), even at a low dose of 0.75 mg/kg/day. Moreover, the two highest doses of violacein (3.75 and 7.5 mg/kg/day) almost completely abolished parasitemia on day 7 p.i., corresponding, respectively, to 82 and 87% inhibition of parasite development (Table 1). In addition, violacein doses of 0.75 to 7.5 mg/kg/day were able to inhibit the peak parasitemia in a dose-dependent manner (Table 1).

Since violacein did not completely abrogate parasitemia early in infection and drug pressure was removed by day 10 p.i., we monitored the parasitemia levels of *P. chabaudi chabaudi* AS-infected mice treated with the highest dose of violacein daily until day 22 p.i. Notably, on day 16 p.i., which represents the sixth day after the end of violacein treatment, parasite development was still significantly (Mann-Whitney U test, $P <$

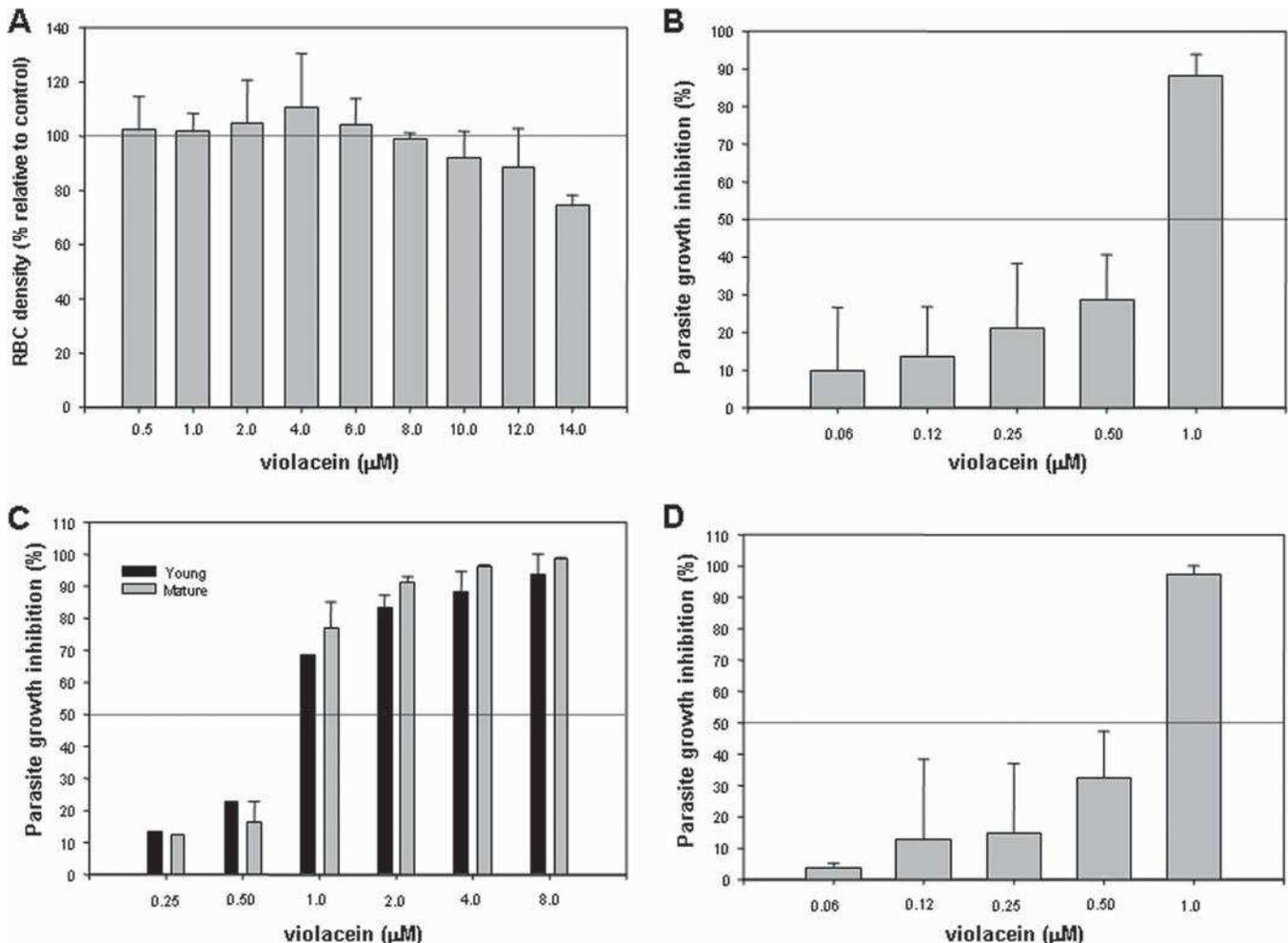


FIG. 2. Evaluation of violacein antimalarial activity against *P. falciparum*. (A) Noninfected erythrocytes (RBC) were cultivated for 48 h at 37°C in the presence of different concentrations of violacein. The RBCD was determined as a percentage of that the control (without drug). Inhibition of the growth of *P. falciparum* 3D7 IE cultivated for 48 h at 37°C with different concentrations of violacein (B) and of young or mature stages of this parasite (C) is also shown. (D) Effect of violacein against a chloroquine-resistant strain (S20) of *P. falciparum* in IE. Results are expressed as the mean of triplicate measurements \pm the standard deviation.

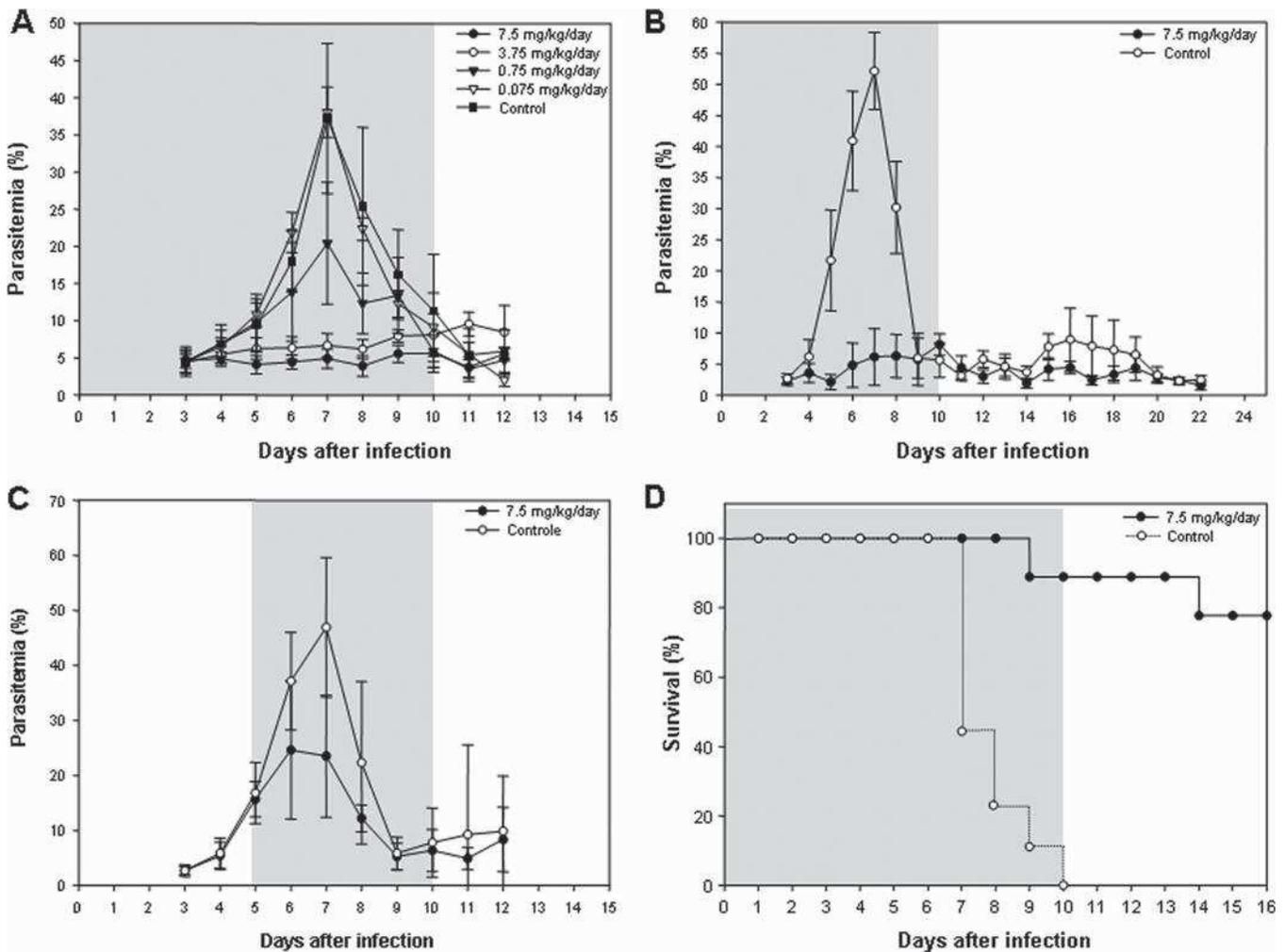


FIG. 3. Effect of violacein on mouse-derived *Plasmodium* parasites. Groups of 7 to 10 C57BL/6 mice were infected i.p. with 10^6 *P. chabaudi chabaudi* AS IE and then left untreated or treated with different doses of violacein administered i.p. for 11 consecutive days (days 0 to 10 p.i.), starting on day 0 at 1 h p.i. Parasitemia levels were determined daily until day 12 p.i. (A) or up to day 22 p.i. (B) after treatment with the highest dose (7.5 mg/kg/day). (C) Analysis of violacein antimalarial activity after parasite establishment and treatment for 6 consecutive days (days 5 to 10 p.i.) with the highest dose of violacein in *P. chabaudi chabaudi* AS-infected mice. Results are expressed as the mean of a group of mice \pm the standard deviation. (D) Analysis of the survival of groups of 10 C57BL/6 mice infected with *P. chabaudi chabaudi* AJ (lethal strain) by i.p. injection of 10^6 IE and then treated i.p. with violacein at 7.5 mg/kg/day for 11 consecutive days (days 0 to 10 p.i.). The drug administration period is indicated by shading in each graph.

0.05) inhibited (up to 59%; Fig. 3B). To verify whether violacein had an effect on parasite growth after the establishment of infection, *P. chabaudi chabaudi* AS-infected mice received violacein from day 5 (16% parasitemia) to day 10 p.i. This can

reflect the time point when malaria therapy is given to patients. As shown in Fig. 3C, violacein administration during patent parasitemia was able to reduce parasite growth significantly (Mann-Whitney U test, $P < 0.01$), by up to 50.1%, in compar-

TABLE 1. Inhibition of parasitemia in *P. chabaudi chabaudi* AS-infected mice under violacein treatment

Violacein dose (mg/kg/day)	Mean % inhibition ^a \pm SD (P value)			
	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
7.5	56.48 \pm 12.84 (<0.005)	75.40 \pm 5.17 (<0.005)	86.90 \pm 3.53 (<0.005)	84.67 \pm 5.43 (<0.05)
3.75	33.23 \pm 14.72 (NS) ^b	64.89 \pm 8.00 (<0.005)	82.12 \pm 4.33 (<0.005)	75.73 \pm 13.93 (<0.05)
0.75	3.58 \pm 33.80 (NS)	20.42 \pm 36.30 (NS)	39.25 \pm 14.15 (<0.05)	48.85 \pm 15.08 (NS)
0.075	NI ^c (ND) ^d	NI (ND)	NI (ND)	12.04 \pm 6.11 (NS)

^a The data shown are percentages of the parasitemia of nontreated mice, which was defined as 100%. Values for groups of 7 to 10 mice are shown.

^b NS, not statistically significant.

^c NI, no inhibition.

^d ND, not determined.

ison to nontreated animals on the seventh day of infection. Next, to determine the protective effect of violacein, mice were infected with the lethal AJ strain of *P. chabaudi chabaudi* and their survival rate was evaluated. As shown in Fig. 3D, 100% of the nontreated mice died by day 10 p.i., with 50% of the deaths occurring early on day 7 p.i. In contrast, animals treated with violacein at 7.5 mg/kg/day did not succumb to infection until days 9 (10%) and 14 (10%) p.i., reaching 80% survival on day 16; clearly demonstrating the significant (log rank test, $P < 0.0001$) protective effect of violacein.

This study demonstrates for the first time the antimalarial activity of violacein by showing inhibition of the growth of human- and mouse-derived *Plasmodium* parasites. Also, violacein was effective against young and mature forms of the human parasite and its activity extended to chloroquine-sensitive and -resistant strains of *P. falciparum*. Our data call for new formulations based on violacein nanoparticles to improve solubility, bioavailability, and activity and to decrease drug toxicity.

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant 2004/00638-6) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant 470587/2006-7). S.C.P.L. and Y.C.B. were supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and U.G. and G.F. were sponsored by FAPESP and CNPq fellowships, respectively. F.T.M.C., M.B., and G.W. are CNPq fellows.

We thank Hernando Del Portillo (Department of Parasitology, ICB, USP, São Paulo, SP, Brazil) and Maria Regina D'Império Lima (Department of Immunology, ICB, USP, São Paulo, SP, Brazil) for kindly providing *P. chabaudi chabaudi* strains AS and AJ, respectively, and Lindsay Ann Pirrit for revising the English. Many thanks to Carmen L. Lopes and Zeci S. Costa (in memoriam).

REFERENCES

- de Carvalho, D. D., F. T. M. Costa, N. Duran, and M. Haun. 2006. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicol. In Vitro* **20**:1514–1521.
- di Santi, S. M., M. Boulos, M. A. Vasconcelos, S. Oliveira, A. Couto, and V. E. Rosário. 1987. Characterization of *Plasmodium falciparum* strains of the State of Rondonia, Brazil, using microtests of sensitivity to antimalarials, enzyme typing and monoclonal antibodies. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **29**:142–147.
- Durán, N., V. Campos, R. Riveros, A. Joyas, M. F. Pereira, and M. Haun. 1989. Bacterial chemistry. III. Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *An. Acad. Bras. Cienc.* **61**:31–36.
- Durán, N., and C. F. Menck. 2001. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* **27**:201–222.
- Durán, N., G. Z. Justo, C. V. Ferreira, P. S. Melo, L. Cordi, and D. Martins. 2007. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **48**:127–133.
- Fernandez, V. 2004. Sorbitol-synchronization of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, p. 24. *In* I. Ljungström, H. Perlmann, M. Schlichtherle, A. Scherf, and M. Wahlgren (ed.), *Methods in malaria research*, 4th ed. MR4/ATCC, Manassas, VA.
- Ferreira, C. V., C. L. Bos, H. H. Versteeg, G. Z. Justo, N. Duran, and M. P. Peppelenbosch. 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* **104**:1459–1464.
- Kodach, L. L., C. L. Bos, N. Duran, M. P. Peppelenbosch, C. V. Ferreira, and J. C. Hardwick. 2006. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **27**:508–516.
- Leon, L. L., C. C. Miranda, A. O. De Souza, and N. Duran. 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:449–450.
- Melo, P. S., G. Z. Justo, M. B. de Azevedo, N. Duran, and M. Haun. 2003. Violacein and its β -cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology* **186**:217–225.
- Melo, P. S., S. S. Maria, B. C. Vidal, M. Haun, and N. Duran. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **36**:539–543.
- Rettori, D., and N. Durán. 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**:685–688.
- Schmidt, B. A. 2004. ^3H -hypoxanthine incorporation assay for the study of growth inhibition by drugs, p. 87–89. *In* I. Ljungström, H. Perlmann, M. Schlichtherle, A. Scherf, and M. Wahlgren (ed.), *Methods in malaria research*, 4th ed. MR4/ATCC, Manassas, VA.
- Snounou, G., A. C. Grüner, C. D. Müller-Graf, D. Mazier, and L. Rénia. 2005. The *Plasmodium* sporozoite survives RTS,S vaccination. *Trends Parasitol.* **21**:456–461.
- Talisuna, A. O., P. E. Okello, A. Erhart, M. Coosemans, and U. D'Alessandro. 2007. Intensity of malaria transmission and the spread of *Plasmodium falciparum* resistant malaria: a review of epidemiologic field evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**:170–180.
- Walliker, D., I. A. Quakyi, T. E. Wellems, T. F. McCutchan, A. Szarfman, W. T. London, L. M. Corcoran, T. R. Burkot, and R. Carter. 1987. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **236**:1661–1666.

On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes

Bruna O. Carvalho,^{1,2,a} Stefanie C. P. Lopes,^{1,a} Paulo A. Nogueira,² Patricia P. Orlandi,² Daniel Y. Bargieri,^{5,6} Yara C. Blanco,¹ Ronei Mamoni,¹ Juliana A. Leite,¹ Mauricio M. Rodrigues,^{5,6} Irene S. Soares,⁷ Tatiane R. Oliveira,⁷ Gerhard Wunderlich,⁸ Marcus V. G. Lacerda,^{3,4} Hernando A. del Portillo,¹⁰ Maria O. G. Araújo,⁹ Bruce Russell,¹¹ Rossarin Suwanarusk,¹¹ Georges Snounou,^{11,12,13,14} Laurent Rénia,¹¹ and Fabio T. M. Costa¹

¹Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, ²Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz, ³Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Gerência de Malária, and ⁴Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, ⁵Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica and ⁶Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, ⁷Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, and ⁸Departamento de Parasitologia-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, and ⁹Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ¹⁰Barcelona Center for International Health Research and Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain; ¹¹Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology, and Research, and ¹²Department of Microbiology, National University of Singapore, Singapore; ¹³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche S945 and ¹⁴Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Background. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* are responsible for most of the global burden of malaria. Although the accentuated pathogenicity of *P. falciparum* occurs because of sequestration of the mature erythrocytic forms in the microvasculature, this phenomenon has not yet been noted in *P. vivax*. The increasing number of severe manifestations of *P. vivax* infections, similar to those observed for severe falciparum malaria, suggests that key pathogenic mechanisms (eg, cytoadherence) might be shared by the 2 parasites.

Methods. Mature *P. vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) were isolated from blood samples collected from 34 infected patients. Pv-iEs enriched on Percoll gradients were used in cytoadhesion assays with human lung endothelial cells, *Saimiri* brain endothelial cells, and placental cryosections.

Results. Pv-iEs were able to cytoadhere under static and flow conditions to cells expressing endothelial receptors known to mediate the cytoadhesion of *P. falciparum*. Although Pv-iE cytoadhesion levels were 10-fold lower than those observed for *P. falciparum*-infected erythrocytes, the strength of the interaction was similar. Cytoadhesion of Pv-iEs was in part mediated by VIR proteins, encoded by *P. vivax* variant genes (*vir*), given that specific antisera inhibited the Pv-iE-endothelial cell interaction.

Conclusions. These observations prompt a modification of the current paradigms of the pathogenesis of malaria and clear the way to investigate the pathophysiology of *P. vivax* infections.

It has long been recognized that the directly attributable morbidity and mortality differ for the 2 most prevalent malarial parasite species, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. The higher multiplicative potential of *P. falciparum*-infected erythrocytes (Pf-iEs) no doubt contributes to their increased virulence. However, it is the withdrawal of mature Pf-iEs (parasites older than

24 h) from the peripheral circulation to that of the internal organs—a phenomenon known as *sequestration* [1]—that is considered to be the key pathogenic event. *P. falciparum* is characterized by almost total sequestration, such that few if any mature Pf-iE forms

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: This work received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant 04/00638-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grants—Instituto do Milênio de Desenvolvimento e Tecnologia em Vacinas, Instituto Nacional de Tecnologia em Vacinas (CNPq-FAPEMIG), and Doenças Negligenciadas (576128/2008-2). B.O.C. and J.A.L. were sponsored by FAPESP fellowships (grants 05/60569-0 and 09/52013-3). S.C.P.L. and R.M. were supported by CNPq, and Y.C.B. received a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior fellowship. M.M.R., I.S.S., G.W., and F.T.M.C. are CNPq fellows. L.R. was supported by the Agency for Science, Technology, and Research, Singapore, and G.S. was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France.

^a B.O.C. and S.C.P.L. contributed equally to this work.

Received 28 December 2009; accepted 8 March 2010; electronically published 9 July 2010.

Reprints or correspondence: Dr Fabio T. M. Costa, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), PO Box 6109, 13083-970, Campinas-SP, Brazil (costaftm@unicamp.br or fabiotmc72@gmail.com).

The Journal of Infectious Diseases 2010;202(4):638–647

© 2010 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2010/20204-0017\$15.00

DOI: 10.1086/654815

are observed in peripheral blood samples during infection. Given that mature *P. vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) are frequently observed in peripheral blood samples, it was concluded that sequestration did not occur with this parasite. As a consequence, the paradigm was formulated that sequestration of Pf-iEs in specific organs is the principal initial cause of pathology and that, when sequestration occurs in the brain or placenta, the likelihood of cerebral malaria and pregnancy-associated malaria increases. Indeed, most forms of severe malaria and nearly all mortality have been almost exclusively recorded for falciparum cases.

P. vivax, the most prevalent malarial species outside sub-Saharan Africa, imposes a substantial global public health burden [2], with recent estimates of 130–435 million infected persons per year among the 2.6 billion people at risk. Of equal importance was the observation that many types of severe malaria—long considered to be specific to *P. falciparum*—also commonly occur in *P. vivax*-infected persons. For instance, infection with *P. vivax* during pregnancy was found to be associated with a substantial reduction in birth weight [3]. Furthermore, in some areas of endemicity progression of vivax malaria to clinically severe forms, including cerebral malaria and acute respiratory distress syndrome, was found to occur as frequently as for falciparum infections, with similar levels of fatality [4–7]. This raises the possibility that pathological processes linked to cytoadhesion might also operate in *P. vivax*.

In *P. falciparum* infection, cytoadhesion of Pf-iEs to endothelial cells is mediated by interactions between members of the *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP-1) family, polymorphic proteins encoded by the *var* multigene family [8, 9], and defined host receptors on endothelial cells. Of the 10 or so receptors identified to date [10, 11], 3 have been extensively investigated: CD36, intercellular adhesion mol-

ecule 1 (ICAM-1), and chondroitin sulfate A (CSA). The last has been specifically associated with the binding of Pf-iEs to the placenta [12].

We wished to establish whether *P. vivax* parasites are able to cytoadhere under static or flow conditions to endothelial cells and placental cryosections and whether the receptors for Pf-iEs were also implicated. Furthermore, we assessed the involvement of VIR proteins as a potential Pv-iE ligand.

METHODS

Ethical approval. Informed consent was sought and granted from all patients attending the Tropical Medicine Foundation of Amazonas (FMT-AM), Amazonas, in northern Brazil. The procedures were approved by the Ethics Committee Board of the FMT-AM (process 2758/2008-FMT-AM; approval no. 1943).

Parasite isolation and enrichment. Once microscopic diagnosis of uncomplicated vivax or falciparum malaria was made and before the treatment was initiated, 5–10 mL of blood were collected into citrate-coated Vacutainer tubes (BD). Parasitemia levels rarely exceeded 5000 parasites/ μ L of blood. The blood was immediately processed to obtain enriched Pv-iEs. On average, a total of $\sim 1 \times 10^6$ Pv-iEs could be obtained, allowing only a limited number of cytoadhesion assays to be conducted. Patients who had received antimalarial treatment 3–4 weeks before the test were excluded. Immediately after collection, the red blood cells containing trophozoites and schizonts were separated from the younger forms on a 45% Percoll (Amersham) gradient, as described elsewhere [13] with minor modifications. Briefly, after plasma separation by centrifugation, blood pellets were washed 3 times and then resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma) to a final hematocrit of 10%. Five milliliters of this suspension was overlaid on a 5-mL 45% Percoll solution

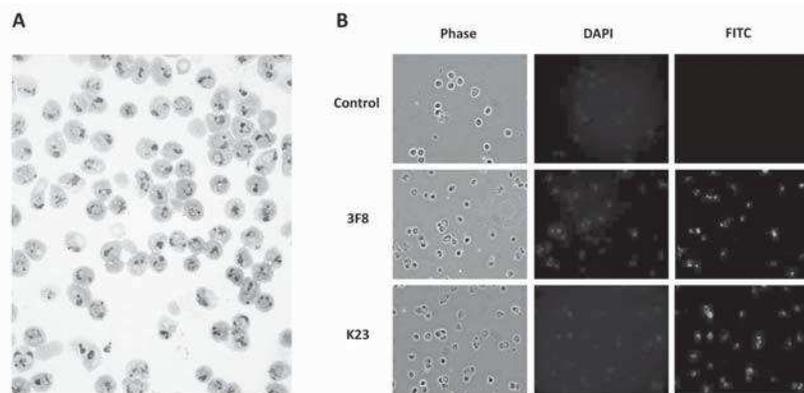


Figure 1. Percoll gradient enrichment of *Plasmodium vivax* maturing forms. *A*, Giemsa staining of the mature trophozoites and young schizonts obtained after Percoll gradient enrichment, yielding cell suspensions with 85%–97% *P. vivax*-infected erythrocytes. *B*, Parasite species and maturity confirmed by immunofluorescence assay using anti-PvMSP-1₁₉ conformational antibodies (3F8 and K23) diluted at 1:50. Normal mouse serum samples were used as negative controls. DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; FITC, fluorescein isothiocyanate.

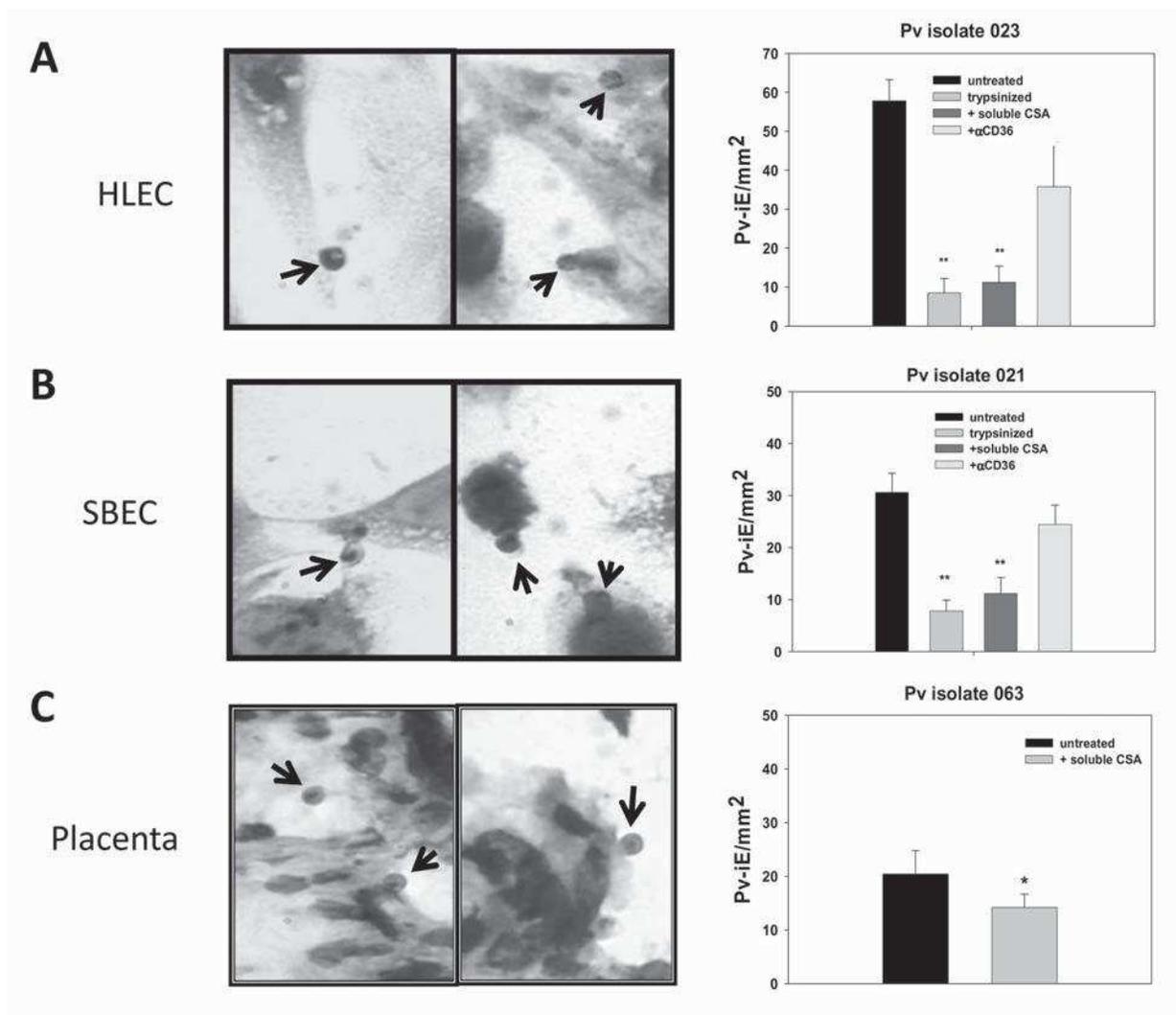


Figure 2. Adhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) to lung and brain endothelial cells or placental cryosections. Shown are representative photomicrographs of (left) and cytoadhesion assays for (right) Pv-iEs binding to human lung endothelial cells (HLECs) (A), *Saimiri* brain endothelial cells (SBECs) (B), and placental cryosections (C) stained with Giemsa stain and visualized using a Nikon microscope at $\times 100$ magnification. Arrows indicate Pv-iEs bound to host cells. Representative results for Pv-iEs obtained from different patients and used for cytoadhesion assays conducted on untreated cells, on Pv-iEs pretreated with trypsin, or in the presence of soluble chondroitin sulfate A (CSA) or anti-CD36 antibody are shown. In all cases, parasites (5×10^4) were left for 1 h at 37°C in 8-well culture slides ($0.69 \text{ cm}^2/\text{well}$) and then extensively washed, and adhered Pv-iEs were counted. Data are the mean number of bound Pv-iEs per square millimeter, normalized to an input of 1×10^3 Pv-iEs/mm²; error bars indicate standard deviations. *.05 > P > .01 and **.01 > P > .001 (Kruskal-Wallis test).

(2.25 mL of Percoll, 0.5 mL of RPMI 1640 [$\times 10$], and 2.25 mL of distilled water) in a 15-mL tube. After centrifugation, floating mature iEs were collected and resuspended in RPMI 1640. Ex vivo, Pf-iEs were enriched in Percoll gradient at 60%, as described elsewhere [14]. Giemsa-stained thick smears (before enrichment) and thin smears (after enrichment) were examined to determine the *Plasmodium* species and the percentage of mature stages, respectively. A sensitive nested polymerase chain reaction (PCR) assay was applied to the samples to confirm the diagnosis [15].

***P. vivax* slide preparation and immunofluorescence assays.** Immunofluorescence assays (IFAs) were performed in 8-well slides containing mature stages of *P. vivax*. Immediately after enrichment on Percoll, Pv-iEs were washed and resuspended in 10% fetal calf serum (FCS) (Nutricell) and then deposited on IFA slides ($50 \mu\text{L}/\text{well}$), fixed in acetone for 10 min, air-dried, and stored at -20°C until use. Ten micrograms per milliliter of each monoclonal antibody (3F8 or K23) against *P. vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP1) [16] was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and applied to slides for 30

Table 1. Cytoadhesion Assays for *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes (Pv-iEs) and *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes (Pf-iEs) Collected from 24 Patients

Parasite, patient	HLECs					SBECs				Placental cryosections	
	Adhesion ^a	% of inhibition ^b				Adhesion ^a	% of inhibition ^b			Adhesion ^a	sCSA, % of inhibition ^b
		Trypsinized	sCSA	Anti-CD36	CaseABC		Trypsinized	sCSA	Anti-CD36		
Pv-iEs											
008						58.2 ± 9.8	19 ± 10				
015						32.4 ± 11.04	52 ± 11*				
016	52.4 ± 8.5	70 ± 7*									
019	36.1 ± 10.6	59 ± 10 **	25 ± 21								
021						30.6 ± 3.7	74 ± 7**	63 ± 10**	20 ± 12		
022	28.3 ± 4.5	29 ± 21**	52 ± 8**	2 ± 27							
023	57.8 ± 5.5	85 ± 6**	81 ± 7**	38 ± 20							
024	33.9 ± 3.7	76 ± 7**	65 ± 8**	20 ± 11							
030	16.6 ± 3.4	46 ± 10***				12.8 ± 2.8	42 ± 18*				
031	26.1 ± 4.5	47 ± 15***									
034	56.7 ± 7.4		18 ± 10*			49.5 ± 7.9		28 ± 9*			
035	37.5 ± 9.4		41 ± 13**			23.9 ± 8.0		31 ± 30			
036										22.3 ± 5.4	23 ± 19
063										20.4 ± 4.4	30 ± 12*
065	33.5 ± 8.8		51 ± 13***								
066										9.9 ± 3.2	15 ± 40
076	19.7 ± 4.0		34 ± 18***		7 ± 25						
083	38.6 ± 7.3		49 ± 15**		4 ± 21						
086	30.1 ± 6.5		40 ± 16**		13 ± 22						
087	41.3 ± 5.2		16 ± 23		3 ± 15						
Pf-iEs											
002	130.1 ± 23.7										
003	636.7 ± 119.2										
005										773.5 ± 179.5	87 ± 7*
008	454.4 ± 45.4										

NOTE. Data from *P. falciparum* isolates confirmed that the host cells and placental cryosections used were able to sustain parasite cytoadhesion. Asterisks indicate statistical significance with respect to adhesion values, as follows: *.05 > P > .01; **.01 > P > .001; and P < .001. HLECs, human lung endothelial cells; SBECs, *Saimiri* brain endothelial cells; SD, standard deviation.

^a Mean no. (±SD) of bound infected erythrocytes per square millimeter, normalized to an input of 1 × 10³ infected erythrocytes/mm².

^b Percentage of inhibition (±SD) of adhesion was calculated after enumeration of adherent infected erythrocytes either following trypsinization of infected erythrocytes or prior to the assay, or when the assay was conducted in the presence of soluble CSA (sCSA), anti-CD36 monoclonal antibody, or in endothelial cells pretreated with chondroitinase ABC (CaseABC).

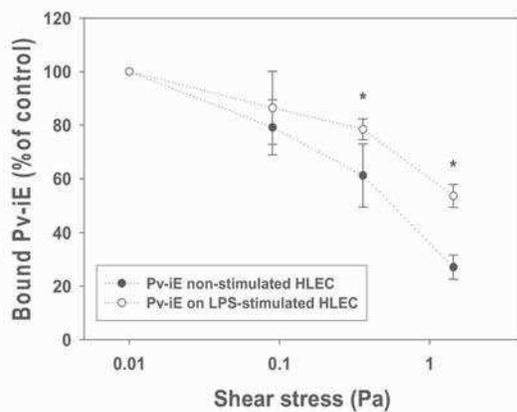


Figure 3. Resistance of *Plasmodium vivax*-infected erythrocyte (Pv-iE) cytoadhesion to flow conditions. Enriched Pv-iEs (5×10^5) were allowed to adhere to human lung endothelial cells (HLECs) during a 1-h incubation at 37°C in single-well microslides (8.6 cm²) mounted in a flow chamber system, and cytoadhesion medium (RPMI 1640 [pH 6.8]) was flowed through at a wall shear stress of 0.09, 0.36, and 1.44 Pa for 10, 5, and 2.5 min, respectively; medium was not flowed through the control chamber. The Pv-iEs that still bound at the end of the flow period were counted in 20 randomly selected fields, and the percentage of binding compared with that in the control chamber were calculated. Data are mean binding percentages for 2 patient isolates (104 and 106) on HLECs previously treated with lipopolysaccharide (LPS) (1.0 µg/mL) or left untreated; error bars indicate standard deviations. * $P < .05$ for the comparison of adhesion to nonstimulated vs LPS-stimulated HLECs (Mann-Whitney U test).

min at 37°C. After washing with PBS, slides were incubated with 10 µg/mL fluorescein isothiocyanate-conjugated sheep anti-mouse immunoglobulin G (Sigma) and 100 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Molecular Probes) for 30 min at 37°C and then washed several times. Positive monoclonal antibody recognition was detected with the aid of an immunofluorescence microscope (Nikon). For IFAs conducted using VIR antisera, Pv-iEs were left in suspension (liquid phase). Briefly, parasites were fixed in 2% paraformaldehyde and washed and diluted in FCS, and then mouse VIR-A4 and VIR-E5 antisera were added at a final dilution of 1:20 and incubated for 60 min. After 2 washes with FCS, cells were incubated with 100 µg/mL Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) and 500 µg/mL DAPI for 30 min at 37°C and then washed twice with FCS. In both assays, positive recognition by monoclonal antibody, VIR-A4, VIR-E5, or MSP-1₁₉ antisera was detected with the aid of an immunofluorescence microscope.

Polyclonal VIR antisera were generated by injecting mice with VIR-A4 or VIR-E5 glutathione S-transferase (GST) fusion proteins belonging to the A or E *vir* subfamilies, respectively [17, 18] and raised after 2 immunizations (21-day interval) with each recombinant protein (5 µg/animal/dose) emulsified

in complete or incomplete Freund adjuvant. No Pv-iE-positive labeling was visualized by means of GST antisera.

Selection of monophenotypic cultured *P. falciparum* parasites and cells. The *P. falciparum* lines FCR3 [19] and S20 [20] were cultured in candle jars. Briefly, Pf-iEs were cultivated in fresh type O⁺ human erythrocytes (Blood Center, Universidade Estadual de Campinas) suspended at a final hematocrit of 4% in complete medium (RPMI 1640 [pH 7.2]) (Sigma) and supplemented with 10% homologous human plasma.

The following cell lines were used in this study: *Saimiri* brain endothelial cells (SBECs) and human lung endothelial cells (HLECs) [21, 22], adapted from cultured primary explants, and CHO-ICAM, CHO-CD36 and CHO-K1 cells [23]. Selection of FCR3 parasites to CSA (FCR3^{CSA}) was performed by panning (5 rounds) of mature-stage iEs on endothelial cells [21, 24] in the presence of soluble CSA (100 µg/mL; Sigma).

Mature S20 trophozoites were selected on CHO-ICAM cells (5 rounds) and then by a further 2 rounds on plastic plates coated with recombinant ICAM-1 [25]. The selected S20^{ICAM} parasite line bound strongly to CHO-ICAM cells but poorly to nontransfected CHO-K1 cells (data not shown).

Static cytoadhesion assays. We assessed the ability of Pv-iEs or Pf-iEs obtained from infected patients to adhere to placenta cryosections, HLECs, and SBECs by performing static cytoadhesion assays as described elsewhere [19, 21, 26] with minor modifications. Briefly, HLECs or SBECs were grown to confluence on 8-well culture slides (0.69 cm²/well; BD), and 5×10^4 Percoll-enriched iEs were then added to each well in a total volume of 200 µL of cytoadhesion medium (RPMI 1640 [pH 6.8]), either alone or in the presence of 100 µL of soluble CSA (100 µg/mL) or anti-CD36 (5 µg/mL). Culture slides were incubated for 1 h at 37°C and then extensively washed in cytoadhesion medium. To confirm that the ligands on the surface of Pv-iEs were proteins, Pv-iEs were treated with trypsin (1 mg/mL) for 45 min at 37°C before incubation over endothelial cells. For confirmation of CSA as a receptor, HLECs were previously incubated with chondroitinase ABC (CaseABC) (0.5 U/mL; Sigma) for 2 h at 37°C. Involvement of VIR antigens in the cytoadhesion of Pv-iEs to HLECs was evaluated in an assay where inhibition of parasite binding was tested with antisera (diluted at 1:5 or 1:10) to VIR-A4 or VIR-E5 GST-fused proteins. Serum samples from mice immunized solely with GST in complete or incomplete Freund adjuvant were used as specificity controls. For these assays, inhibition was determined as a percentage of the negative control and was expressed as the mean value for 3 wells \pm standard deviation.

Assays of adhesion to placental trophoblasts were performed as described elsewhere [19, 26, 27] with minor modifications. Placental biopsy samples from 3 human immunodeficiency virus-negative Brazilian women with malaria were collected immediately after delivery, snap-frozen in liquid nitrogen/*n*-hex-

Table 2. Cytoadhesion Assays for *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes (Pv-iEs) Obtained from 7 Patients or Cultured *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes (Pf-iEs) to Human Lung Endothelial Cells (HLECs) under Flow Conditions

Parasite, patient (LPS treatment)	Adhesion ^a at 0.00 Pa	Shear stress					
		0.09 Pa		0.36 Pa		1.44 Pa	
		Adhesion ^a	Binding, ^b %	Adhesion ^a	Binding, ^b %	Adhesion ^a	Binding, ^b %
Pv-iEs							
090 (no)	67.4 ± 14.4	34.2 ± 8.6	50.8	30.4 ± 9.6	45.2	ND	...
090 (yes)	55.6 ± 9.6	48.0 ± 17.8	86.3	42.7 ± 15.4	76.9	ND	...
091 (yes)	53.0 ± 6.1	39.0 ± 7.7	73.6	38.5 ± 10.1	72.6	ND	...
092 (no)	17.6 ± 9.6	13.4 ± 8.2	76.1	10.8 ± 2.9	61.1	ND	...
093 (no)	47.9 ± 12.0	29.9 ± 8.2	62.4	ND	...	ND	...
094 (no)	60.4 ± 13.8	51.3 ± 9.1	84.9	ND	...	ND	...
104 (no)	30.4 ± 9.1	26.3 ± 5.3	86.5	16.1 ± 5.3	52.9	9.2 ± 7.7	30.3
104 (yes)	32.5 ± 13.8	25.0 ± 5.3	76.9	24.6 ± 5.3	75.7	16.4 ± 6.7	50.5
106 (no)	28.6 ± 8.6	20.5 ± 14.9	71.7	19.8 ± 6.1	69.2	6.8 ± 5.8	23.8
106 (yes)	29.1 ± 8.2	27.9 ± 10.6	96.2	23.6 ± 7.2	81.1	16.4 ± 6.7	56.4
Pf-iEs							
S20 ^{CAM} (no)	39.8 ± 15.8	19.2 ± 13.0	47.9	12.0 ± 5.8	30.0	9.6 ± 8.2	24.3
FCR3 ^{CSA} (no)	370.9 ± 50.9	333.1 ± 25.0	89.8	294.5 ± 36.9	79.4	190.8 ± 34.7	51.4

NOTE. *P. vivax* or cultured *P. falciparum*, selected on intercellular adhesion molecule 1 (S20^{CAM}) or chondroitin sulfate A (FCR3^{CSA}), were allowed to adhere to HLECs either previously incubated with 1.0 μg/mL lipopolysaccharide (LPS) or not incubated with LPS, and then cytoadhesion medium was flowed through at a wall shear stress of 0.09, 0.36, or 1.44 Pa for 10, 5, and 2.5 min, respectively. ND, not determined; SD, standard deviation.

^a No. of remaining adherent parasites after application of a flow condition. Data are the mean no. (±SD) of infected erythrocytes per square millimeter, normalized to an input of 1×10^3 infected erythrocytes/mm².

^b Percentage of parasites that remained cytoadherent after being subjected to wall shear stress.

ane (Merck), and then stored frozen in Tissue-Teck (Thermo) before use. Serial placenta cryosections (5–7 μm) were cut with a cryostome and mounted on individual glass slides. Cryosections were washed and air-dried, and an area of ~1 cm² was delimited with a Dako Pen device. Assays of the adhesion of Pv-iEs to placental cryosections were performed as for endothelial cells. Three to 4 placenta cryosections were used for each adhesion assay. After a 1-h incubation at 37°C and following Giemsa staining, the number of infected erythrocytes that adhered to the endothelial cell monolayer or to placenta cryosections was counted under the microscope.

Involvement of CD36 or ICAM-1 host receptors was verified by allowing Pv-iEs to adhere under static conditions to CHO-CD36 cells, CHO-ICAM cells, or CHO-745 cells, a cell line that does not express either of these receptors [23]. In these experiments, we performed adhesion assays without using human serum in the medium because it has been shown that human immunoglobulins present in normal serum can mediate binding of Pf-iEs to CHO-745 cells [28].

Flow-based cytoadhesion assays. To assess the resistance of Pv-iEs to shear stress, we performed flow-based cytoadhesion assays according to a modified version of a method that has been described elsewhere [19, 26, 27]. Briefly, HLECs were cultured to confluence in single-well culture microslides (8.6 cm², corresponding to 12.5 times the area of each well in a 8-well culture slide), to which 1.5 mL of 5×10^5 Pv-iEs enriched

on 45% Percoll gradient was added. After a 1-h incubation at 37 °C, microslides were mounted in a flow chamber system (Immunitics), and cytoadhesion medium (RPMI 1640 [pH 6.8]) was flowed through at a wall shear stress of 0.09, 0.36, or 1.44 Pa for 10, 5, and 2.5 min, respectively. After this, the

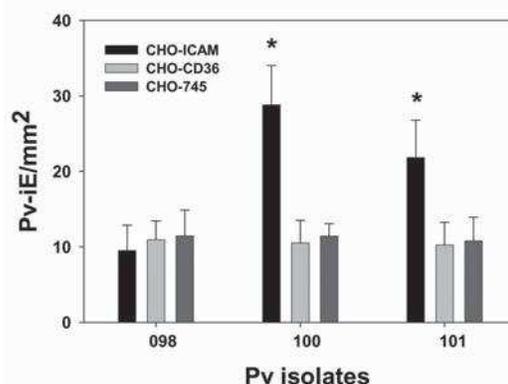


Figure 4. Adhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) to specific receptors. Pv-iEs (5×10^4 cells/well) were allowed to adhere to CHO–intercellular adhesion molecule (ICAM), CHO-CD36, or control CHO-745 cells. Data are the mean number of bound Pv-iEs per square millimeter, normalized to an input of 1×10^3 Pv-iEs/mm²; error bars indicate standard deviations. * $P < .001$ for the comparison of adhesion to CHO-ICAM cells vs CHO-CD36 or CHO-745 cells (Kruskal-Wallis test).

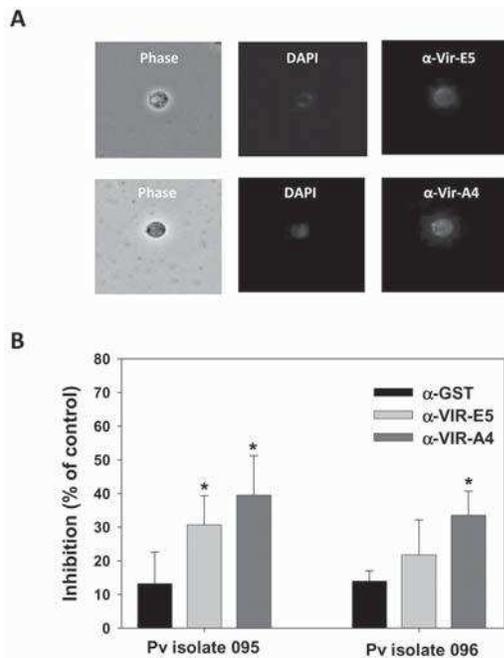


Figure 5. Recognition and blocking of *Plasmodium vivax*-infected erythrocyte (Pv-iE) cytoadhesion to human lung endothelial cells (HLECs) by specific VIR antisera. *A*, Immunofluorescence of a Pv-iE labeled with antisera against VIR-A4 (1:20) or VIR-E5 (1:20). Shown are results for phase contrast, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining, and mouse anti-VIR-E5 (*top*) or anti-VIR-A4 (*bottom*) with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G. *B*, Results of incubation of Pv-iEs (5×10^4 cells/well) for 1 h at 37°C alone or in the presence of VIR-A4 or VIR-E5 antisera diluted at 1:5 (isolate 095) or 1:10 (isolate 096). In both assays, serum samples from mice immunized solely with glutathione S-transferase (GST) in Freund adjuvant were used as a negative control. For these assays, inhibition was determined as the percentage of negative control counts, expressed as mean values for triplicate wells; error bars indicate standard deviations. * $P < .05$ for the comparison of inhibition with GST antisera (Kruskal-Wallis test).

remaining bound Pv-iEs were counted in 20 randomly selected fields through a digital camera attached to a microscope (Moticam 2500; Motic). Results were expressed as the mean number of infected erythrocytes per square millimeter \pm standard deviation. In some experiments, microslides were stained with Giemsa after a determined shear stress condition, to visualize bound Pv-iEs. Alternatively, HLECs were incubated with lipopolysaccharide (LPS) (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma) for 4 h at 37°C and then washed before parasite cytoadhesion. Cultured *P. falciparum* panned isolates (FCR3^{CSA} and S20^{ICAM}) were used as controls. To ascertain whether *P. vivax* adhesion to HLECs occurred under flow conditions, 1×10^6 enriched Pv-iEs diluted in cytoadhesion medium were flowed at a wall shear stress of 0.09 or 0.36 Pa for 1 h and then filmed. For both the static and flow-based assay, parasite adhesion was normalized to 1×10^3 infected erythrocytes/ mm^2 , taking into account the area

and the number of infected erythrocytes used in each assay (5×10^4 infected erythrocytes in 0.69 cm^2 or 5×10^5 infected erythrocytes in 8.6 cm^2).

Flow cytometry. Levels of ICAM-1 expression on HLECs were assessed by flow cytometry. Briefly, 1×10^6 cells either treated with LPS (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or left untreated were harvested, incubated with anti-human CD54 (ICAM-1) (phycoerythrin; BD Bioscience) for 30 min at 4°C, washed, and fixed in 2% formaldehyde. Analysis was performed using a FACScanto flow cytometer (BD), and the mean fluorescence intensity and the percentage of positive cells were analyzed with the aid of FCS Express software (version 3.00.0320; De Novo Software). For each sample, a minimum of 100,000 events were acquired.

Statistical analysis. The statistical significance of adhesion to different cells types at various conditions was determined using the Mann-Whitney *U* test or the Kruskal-Wallis test. Calculations were performed using BioEstat software (version 3.0; CNPq, Brazil) and Prism software (version 3.02; GraphPad Software). Differences were considered significant at $P < .05$.

RESULTS

Our investigation of Pv-iE cytoadherence was substantially facilitated by the availability of in vitro-cultured *P. falciparum*, an avenue not open for *P. vivax*. We conducted our experiments with Pv-iEs using samples obtained directly from patients presenting with uncomplicated *P. vivax* malaria in Manaus, Brazil. The limitations imposed by reliance on clinical samples with parasites of diverse genotypes and of varying suitability for cytoadherence assays were compensated for by the collection of a relatively large number of samples ($n = 34$). As controls for the cytoadhesion assays, *P. falciparum*-infected blood was also obtained from 4 patients attending the same hospital. In all cases, a sensitive PCR assay was used to exclude the presence of mixed-species infections. As an initial step, cytoadherence was assessed using HLECs, SBECs, and human placental cryosections. These cell lines and placental cryosections have been characterized and validated for assays of *P. falciparum* cytoadhesion [19, 21, 22, 26, 27]. In *P. falciparum* infection, mature forms of the parasite cytoadhere more strongly than do freshly invaded forms. We hypothesized that this could be also the case for *P. vivax* infection. Given the different densities of mature-stage and early-stage parasites, we subjected *P. vivax* parasites collected from the patients directly and without prior short-term culturing to a Percoll gradient, enabling the recovery of almost-pure trophozoite- and schizont-stage Pv-iEs (Figure 1). Of note, after enrichment the percentage of MSP-1₁₉-expressing forms observed in IFA varied from 85% to 97%.

Pv-iEs were first tested for their ability to cytoadhere to HLECs, SBECs, and placental cryosections under static conditions. For some patients, aliquots of the same Pv-iE suspension were tested after digestion with trypsin or in the presence

of soluble CSA, anti-CD36 monoclonal antibody in the cytoadhesion medium, or HLECs pretreated with CaseABC (Figure 2 and Table 1). All the Pv-iEs tested displayed some level of cytoadherence to HLECs and/or SBECs or to placental cryosections. Pv-iE binding to areas not containing endothelial cells was not observed. Pretreatment of Pv-iEs with trypsin generally decreased adhesion to HLECs or SBECs by 19%–85% (mean, 54%), depending on the parasite isolate. Significant inhibition of cytoadherence was also observed in the presence of soluble CSA (range, 16%–81%; mean, 42%). By contrast, when assays were conducted in the presence of anti-CD36, the extent of inhibition of cytoadherence was not statistically significant (Table 1), although only a few isolates could be tested. Moreover, unlike the higher inhibition observed with soluble CSA, HLECs pretreated with CaseABC did not significantly abolish adhesion of the same Pv-iEs (Table 1). Cytoadhesion assays were also conducted in parallel with similarly enriched mature Pf-iEs derived from 4 patients. The levels of cytoadherence observed were ~10-fold higher than those recorded for Pv-iEs (Table 1).

Having demonstrated that Pv-iEs could cytoadhere to endothelial cells under static conditions, it was important to evaluate whether the observed cytoadherence was biologically relevant and whether it could be maintained under the flow conditions that parasites are subjected to in the bloodstream. Shear stress in postcapillary venules is close to 0.08 Pa [29]. Thus, we enriched Pv-iEs from 7 individuals and conducted flow-based cytoadhesion assays on HLECs at shear stress conditions varying from 0.09 to 1.44 Pa. The parasites that remained attached after being subjected to increasing flow rates for defined periods were enumerated by microscopic examination after Giemsa staining (Figure 3 and Table 2). Given that HLECs express CSA and ICAM-1 on their surface, we performed parallel assays using *P. falciparum* FCR3 and the S20 iEs preselected on CSA (FCR3^{CSA}) and ICAM-1 (S20^{ICAM}). As for Pf-iEs (FCR3^{CSA}), even at a relatively high shear stress (1.44 Pa) a substantial proportion (30%) of the cytoadherent Pv-iEs could not be detached (Table 2). Furthermore, stimulation of the HLECs with LPS significantly strengthened the cytoadherence, because 56% of the cytoadherent Pv-iEs could not be detached at 1.44 Pa (Figure 3). Of note, LPS treatment augmented ICAM-1 expression levels by 3-fold (data not shown). The strength of Pv-iE adhesion was similar to that observed for *P. falciparum* FCR3^{CSA} to unstimulated HLECs (Table 2). The behavior of the cytoadherent Pv-iEs to HLECs under flow conditions was recorded in real time and can be seen in Videos 1 and 2, which are available in the online version of the *Journal* and which show that cytoadherent Pv-iEs display the rolling characteristics of cytoadherent *P. falciparum* parasites [30]. Video 1 shows the rolling and binding of a Pv-iE to an HLEC; parasites were diluted in medium and flowed at a wall shear

stress of 0.09 Pa. Video 2 shows 2 Pv-iEs bound to HLECs under a flow condition of 0.36 Pa.

We then tested whether CD36 or ICAM-1, both present on the HLEC surface [21, 22], were implicated in the observed Pv-iE cytoadherence. For this, CHO lines transfected with CD36 or ICAM-1 were used. None of the Pv-iEs from the 3 samples tested showed binding to CD36 (Figure 4), because the levels of cytoadherent Pv-iEs were not significantly different from background (binding of Pv-iEs to untransfected CHO-745 cells). By contrast, a 2.1–2.7-fold increase in cytoadhesion to ICAM-1 over background was observed for Pv-iEs from 2 of the 3 samples tested (Figure 4). Low cytoadhesion of Pv-iEs isolated from patient 098 may indicate variations in the binding phenotypes of different isolates.

Finally, we investigated potential parasite ligands involved in Pv-iE cytoadhesion. A multigene family orthologous to the *P. falciparum* var genes does not occur in the genome of *P. vivax* [31]. However, a superfamily of surface-expressed variant antigens genes (*vir*) is present in *P. vivax*; it has ~350 members, which can be subdivided into 10 subfamilies and unclustered members [17, 31, 32]. Hence, we tested 2 specific polyclonal antisera, VIR-A4 and VIR-E5, from the A and E subfamilies, respectively [18]. Pv-iEs were specifically recognized by both antisera in IFAs (Figure 5A) but not by the control GST antisera. Significant inhibition of Pv-iE cytoadherence on HLECs was observed when either VIR antisera was included in the assay medium but not in the presence of the GST antisera (Figure 5B).

DISCUSSION

Our observations provide the first evidence, to our knowledge, that mature Pv-iEs are capable of cytoadhering to endothelial cells and placental cryosections. Two receptors used by *P. falciparum* for binding to endothelial cells, ICAM-1 and CSA, were also implicated in the cytoadhesion of *P. vivax* parasites, at least to some extent. However, CaseABC treatment suggested that cytoadhesion to CSA, a highly negative charged molecule, might be due to charge interaction. Indeed, it has been shown that binding to CSA is highly dependent on ionic strength [33]. The fraction of Pv-iEs that cytoadhered was up to 10-fold lower than that for Pf-iEs. Importantly, cytoadhesion of Pv-iEs, once established, is as strong as that of CSA-selected Pf-iEs, as demonstrated by the flow assays (Table 2). Because the parasites we assayed were directly obtained from patients, our data suggest that only a minor fraction of *P. vivax* would have the capacity to cytoadhere in vivo. Partial retention of *P. vivax* from the peripheral circulation would explain why the mature forms of this parasite are generally found in peripheral blood. This is consistent with the observation of partial and differential accumulation of Pv-iEs in organs of *P. vivax*-infected squirrel monkeys [34], as well as with observations of partial depletion

of mature *P. vivax* in the peripheral blood of humans [35, 36]. Our observation of Pv-iE cytoadhesion to placental tissue from sections of the placenta obtained after delivery (data not shown) suggests that the phenomenon can occur in vivo. However, the histopathological studies of postmortem tissues that would be required to indicate whether this phenomenon extends to other organs in infected individuals are limited.

For all isolates for which trypsin treatment was tested, the only partially abrogated Pv-iE cytoadhesion suggests that trypsin-resistant ligands commonly occur on the Pv-iE surface. It would be important to establish whether other receptors are implicated in Pv-iE cytoadhesion and explore the precise roles played by ICAM-1 and CSA. Finally, detailed investigations of the role played by VIR proteins as cytoadhesive ligands, for which we present indirect evidence, are complicated because (1) multiple members of the VIR protein family are expressed on the infected red blood cell surface [17], unlike the clonally expressed *var* genes of *P. falciparum* [37], and (2) the high number of *vir* genes present in the genome (346 *vir* genes for the Sal line of *P. vivax* [31], as opposed to 59 *var* genes for the 3D7 line of *P. falciparum*) [38]. Nevertheless, our data call for further investigation of the role played by VIR proteins in Pv-iE cytoadhesion.

Although infections with *P. vivax* are less life-threatening than those with *P. falciparum*, morbidity in *P. vivax* infection is associated with anemia and a pronounced cytokine-mediated inflammatory response [4]. Differential accumulation of a proportion of parasites to some organs, such as the lungs or placenta, might be targeted by the inflammatory response to this organ, leading to a more severe clinical presentation [4, 39, 40].

In conclusion, our observations add a new aspect to the pathophysiology of a major (yet mostly neglected) human pathogen, which could lead to novel therapeutic approaches to alleviate the increasingly recognized health burden globally imposed by this distinctly not-so-benign parasite.

Acknowledgments

We especially thank Dr Jürg Gysin (Institut Pasteur, Guadeloupe, France) and Dr Artur Scherf (Institut Pasteur, Paris, France) for providing endothelial cells, *P. falciparum* FCR3 parasites, and CHO-CD36 cells. We thank Dr Cristina Vicente and Dr Claudio C. Werneck for providing the megapixel digital camera and for discussion. We are grateful to Anne Charlotte Grüner for her critical comments. L.R. and G.S. are currently part of an official collaboration between the Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology, and Research, and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Laboratoire International Associé). F.T.M.C. dedicates this study to Zeci T. M. Costa (in memoriam).

References

1. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **2002**; 415:673–679.

2. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **2001**; 64:97–106.
3. Nosten F, McGready R, Simpson JA, et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet* **1999**; 354:546–549.
4. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* **2009**; 25:220–227.
5. Genton B, D'Acremont V, Rare L, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* **2008**; 5:e127.
6. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis* **2005**; 11:132–134.
7. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* **2008**; 5:e128.
8. Kyes S, Horrocks P, Newbold C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol* **2001**; 55:673–707.
9. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* **2008**; 62:445–470.
10. Cserti CM, Dzik WH. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* **2007**; 110:2250–2258.
11. Fairhurst RM, Welles TE. Modulation of malaria virulence by determinants of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 display. *Curr Opin Hematol* **2006**; 13:124–130.
12. Duffy PE. *Plasmodium* in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. *Parasitology* **2007**; 134:1877–1881.
13. Ihalamulla RL, Mendis KN. *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1987**; 81:25–28.
14. Fernandez V. Purification and synchronization of erythrocytic stages. In: Ljungström I, Perlmann H, Schlichterle M, Scherf A, Wahlgren M. *Methods in malaria research*. 4th ed. Manassas, Virginia: MR4/ATCC, **2004**:26–7.
15. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med* **2002**; 72:189–203.
16. Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella* Typhimurium FltC flagellin. *Vaccine* **2008**; 26:6132–6142.
17. Fernandez-Becerra C, Pein O, de Oliveira TR, et al. Variant proteins of *Plasmodium vivax* are not clonally expressed in natural infections. *Mol Microbiol* **2005**; 58:648–658.
18. Oliveira TR, Fernandez-Becerra C, Jimenez MC, Del Portillo HA, Soares IS. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. *Malar J* **2006**; 5:83.
19. Costa FT, Fusai T, Parzy D, et al. Immunization with recombinant duffy binding-like-γ3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies against placental chondroitin sulfate A-binding *Plasmodium falciparum* parasites. *J Infect Dis* **2003**; 188:153–164.
20. di Santi SM, Boulos M, Vasconcelos MA, Oliveira S, Couto A, Rosario VE. Characterization of *Plasmodium falciparum* strains of the state of Rondonia, Brazil, using microtests of sensitivity to antimalarials, enzyme typing and monoclonal antibodies [in Portuguese]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1987**; 29:142–147.
21. Gay F, Robert C, Pouvell B, Peyrol S, Scherf A, Gysin J. Isolation and characterization of brain microvascular endothelial cells from *Saimiri* monkeys: an in vitro model for sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol Methods* **1995**; 184:15–28.
22. Muanza K, Gay F, Behr C, Scherf A. Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadherence. *Res Immunol* **1996**; 147:149–163.
23. Hasler T, Albrecht GR, Van Schravendijk MR, et al. An improved microassay for *Plasmodium falciparum* cytoadherence using stable trans-

- formants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. *Am J Trop Med Hyg* **1993**;48:332–347.
24. Pouvelle B, Fusai T, Lepolard C, Gysin J. Biological and biochemical characteristics of cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate. *Infect Immun* **1998**;66:4950–4956.
 25. Noviyanti R, Brown GV, Wickham ME, Duffy ME, Cowman AF, Reeder JC. Multiple var gene transcripts are expressed in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes selected for adhesion. *Mol Biochem Parasitol* **2001**;114:227–237.
 26. Pouvelle B, Traore B, Nogueira PA, Pradines B, LePolard C, Gysin J. Modeling of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion in microvascular conditions: chondroitin-4-sulfate binding, a competitive phenotype. *J Infect Dis* **2003**;187:292–302.
 27. Avril M, Traore B, Costa FT, Lepolard C, Gysin J. Placenta cryosections for study of the adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A in flow conditions. *Microbes Infect* **2004**;6:249–255.
 28. Andrews KT, Adams Y, Viebig NK, Lanzer M, Schwartz-Albiez R. Adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CHO-745 cells and inhibition of binding by protein A in the presence of human serum. *Int J Parasitol* **2005**;35:1127–1134.
 29. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* **1996**;88:1525–1541.
 30. Cooke BM, Berendt AR, Craig AG, MacGregor J, Newbold CI, Nash GB. Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. *Br J Haematol* **1994**;87:162–170.
 31. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* **2008**;455:757–763.
 32. del Portillo HA, Fernandez-Becerra C, Bowman S, et al. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* **2001**;410:839–842.
 33. Resende M, Ditlev SB, Nielsen MA, et al. Chondroitin sulphate A (CSA)-binding of single recombinant Duffy-binding-like domains is not restricted to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 expressed by CSA-binding parasites. *Int J Parasitol* **2009**;39:1195–1204.
 34. Fremount HN, Rossan RN. The sites of sequestration of the Uganda-Palo Alto strain of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells in the squirrel monkey, *Samimiri sciureus*. *J Parasitol* **1974**;60:534–536.
 35. Rudolf GD, Ramsay JC. Enumeration of parasites in therapeutic malaria. *J Trop Med Hyg* **1927**;30:1–8.
 36. Field JW, Shute PG. The microscopic diagnosis of human malaria. II. A morphological study of the erythrocytic parasites. Kuala Lumpur: Government Press, **1956**.
 37. Chen Q, Fernandez V, Sundstrom A, et al. Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **1998**;394:392–395.
 38. Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2002**;419:498–511.
 39. Anstey NM, Handojo T, Pain MC, et al. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis* **2007**;195:589–596.
 40. Tan LK, Yacoub S, Scott S, Bhagani S, Jacobs M. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infect Dis* **2008**;8:449–454.

Regulatory T Cell Induction during *Plasmodium chabaudi* Infection Modifies the Clinical Course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Alessandro S. Farias*, Rafael L. Talaisys, Yara C. Blanco, Stefanie C. P. Lopes, Ana Leda F. Longhini, Fernando Pradella, Leonilda M. B. Santos, Fabio T. M. Costa*

Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is used as an animal model for human multiple sclerosis (MS), which is an inflammatory demyelinating autoimmune disease of the central nervous system characterized by activation of Th1 and/or Th17 cells. Human autoimmune diseases can be either exacerbated or suppressed by infectious agents. Recent studies have shown that regulatory T cells play a crucial role in the escape mechanism of *Plasmodium* spp. both in humans and in experimental models. These cells suppress the Th1 response against the parasite and prevent its elimination. Regulatory T cells have been largely associated with protection or amelioration in several autoimmune diseases, mainly by their capacity to suppress proinflammatory response.

Methodology/Principal Findings: In this study, we verified that CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (T regs) generated during malaria infection (6 days after EAE induction) interfere with the evolution of EAE. We observed a positive correlation between the reduction of EAE clinical symptoms and an increase of parasitemia levels. Suppression of the disease was also accompanied by a decrease in the expression of IL-17 and IFN- γ and increases in the expression of IL-10 and TGF- β 1 relative to EAE control mice. The adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺ cells from *P. chabaudi*-infected mice reduced the clinical evolution of EAE, confirming the role of these T regs.

Conclusions/Significance: These data corroborate previous findings showing that infections interfere with the prevalence and evolution of autoimmune diseases by inducing regulatory T cells, which regulate EAE in an apparently non-specific manner.

Citation: Farias AS, Talaisys RL, Blanco YC, Lopes SCP, Longhini ALF, et al. (2011) Regulatory T Cell Induction during *Plasmodium chabaudi* Infection Modifies the Clinical Course of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. PLoS ONE 6(3): e17849. doi:10.1371/journal.pone.0017849

Editor: Lisa Ng Fong Poh, Agency for Science, Technology and Research - Singapore Immunology Network, Singapore

Received: December 9, 2010; **Accepted:** February 10, 2011; **Published:** March 25, 2011

Copyright: © 2011 Farias et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported financially by the Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq) and The Academy of Sciences for the Developing World (TWAS; Grant # 05-049 RG/BIO/LA), The National Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq-INCTV) and Rede de Malaria (CNPq). ASF was supported by a FAPESP fellowship (#2009/15620-9). RLT, YCB and ALFL received a Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) fellowship and SCPL was supported by CNPq. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: asfarias@unicamp.br (ASF); costatfm@unicamp.br (FTMC)

Introduction

The determinants underlying the heterogeneity of multiple sclerosis (MS) remain unclear. However, current evidence indicates the involvement of a complex genetic trait that probably requires an environmental factor, such as an infection, to be triggered [1]. Classical studies have demonstrated that experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an experimental model of MS, can be either exacerbated or suppressed by infectious agents [2–6]. EAE is an inflammatory demyelinating autoimmune disease of the CNS that is characterized by the activation of Th1 and/or Th17 cells [7,8]. Amplification of the response of these lymphocytes leads to tissue injury, which can result in demyelination. Regulatory mechanisms might be activated to down regulate exacerbated inflammatory responses. Indeed, regulatory cells that are positive for the expression of the transcription factor Foxp3 have a crucial function in activating immune suppression and in the maintenance

of immune homeostasis [9–11]. A deficiency in either the number or function of Foxp3-positive T cells has been described in both the MS and the EAE model [12–15]. The Foxp3⁺ IL-10-producing cells are associated with the recovery phase of EAE, and *in vitro*-generated or purified natural regulatory T cells prevent the induction of EAE by producing IL-10 [16].

On the other hand, some studies have shown that the activation of T regs, either in experimental models of malaria or in humans infected by the malaria parasite, suppresses the Th1 response and prevents elimination of the parasite. The enhancement of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells probably plays a crucial role in this escape mechanism [17–22]. These natural regulatory cells seem to be associated with a burst of TGF- β production and decreases in antigen-specific responses and proinflammatory cytokine production [23].

In the present study, we used experimental malaria infection and the murine MS model to investigate how the regulatory

mechanisms induced during *Plasmodium* infection interfere with the clinical course and immune responses in the EAE model.

Materials and Methods

Animals

C57BL/6 mice (6–8 weeks old) were purchased from the University of Campinas (Campinas, SP, Brazil) and maintained in a specific pathogen-free animal facility. All experiments and procedures were approved by the UNICAMP Committee for Ethics in Animal Research (Protocol No. 857-1).

Induction of EAE

Briefly, mice were injected subcutaneously (s.c.) with 100 µg/animal of pMOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) or pCIR₁₈₀₋₁₉₈ (NPYCNVLTNLKN DYDKIRK) (Genemed Synthesis, CA, USA) emulsified in complete Freund's adjuvant containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI, USA). Each immunized animal receives a total of 100 µl of the emulsion in the both upper flanks and 200 ng/mouse of Pertussis toxin intraperitoneal (i.p.) (List Biochemicals, Campbell, CA, USA) on days 0 and 2 after immunization. Clinical expression of the disease was graded on a clinical index scale of 0 to 5 as previously described [24].

Malaria infection

Mice were infected i.p. with 10⁶ infected red blood cells (iRBCs) of the non-lethal line of *P. chabaudi chabaudi* AS or were injected with saline only (negative control group), 6 days after EAE induction (6 d.a.i) or 25 days prior the EAE induction (post-infection with *P. chabaudi*). The group injected with *P. chabaudi* 6 d.a.i. presented a peak of parasitemia in the same day of EAE maximum clinical score.

The blood stage forms of both parasites were stored in liquid nitrogen after *in vivo* passages in C57BL/6 mice according to a protocol described elsewhere [25]. The percentage of parasitemia was determined daily by counting the number of iRBCs among at least 1,000 erythrocytes in Giemsa-stained blood smears. The corporal temperatures and relative body weights of the mice were evaluated daily, starting on day 1 post-infection, by rectal introduction of a precision digital thermometer (model TE-300, Instrucamp, Brazil) and with a precision balance (Mettler Toledo), respectively.

Flow Cytometry

All analyses were performed using a flow cytometer (FACScanto or FACSCalibur) (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). For Foxp3 labeling, permeabilization buffer (PBS 10% rat serum and 1% Triton) was used. The antibodies were as follows: anti-CD4 FITC, anti-CD4 PE, anti-CD25 PE (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) and anti-Foxp3 APC (eBioscience, San Diego, CA, USA). The data were analyzed using FACSDiva (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) or MDI 2.9 software.

Cell sorting

All sorting were performed using a cell sorter flow cytometer FACSAria (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Cells were kept on ice before and after sorting analysis. Cell purity was confirmed immediately after sorting and cell viability was assured before the transfer. Each animal was injected (i.v.) with 1 × 10⁶ viable cells.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

mRNA was extracted using Trizol and reverse transcribed to generate cDNA. Taqman analysis was performed using a Taqman

ABI Prism 7500 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The primers GAPDH, IL-17A, IL-10, TGF-β₁, IL-27 and Foxp3 were obtained from Applied Biosciences (Mm00439619_m1 (IL-17A), Mm99999915_m1 (GAPDH), Mm00475156_m1 (Foxp3), Mm03024053 (TGFβ1), Mm00461164 (IL-27), Mm00439616_m1 (IL-10)). The specific mRNAs were normalized to the expression of a housekeeping gene (GAPDH). The data were obtained using independent duplicate measurements. The threshold cycle value of the individual measurements did not exceed 0.5 amplification cycles.

Statistical Analysis

The statistical significance of the results was determined using a non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test), the Mann-Whitney test (U-test) or a non-parametric correlation (Spearman's rank). A *p* value less than 0.05 was considered significant.

Results

Modulation of EAE and *P. chabaudi* infection

The inductions of EAE and *P. chabaudi* infection were designed to coincide with the peak of the clinical symptoms of EAE. EAE was more severe approximately 14 days after immunization with pMOG₃₅₋₅₅, and the peak of parasitemia occurred 7 days after infection (Fig. 1A). The presence of an autoimmune response during EAE induction did not change the parasitemia levels (Fig. 1B) or the corporal temperature of the animals during the course of malaria infection (Fig. 1C). However, the clinical course of EAE was significantly diminished until 28 days post-EAE induction (Fig. 1D). The reduction in clinical signs correlated with a loss of body weight. As shown in Figure 1E, animals with EAE and infected with *P. chabaudi* 6 d.a.i presented a modest loss of body weight relative to the group with EAE alone. Of note, parasitemia and clinical symptoms of EAE were significantly negatively correlated during the clinical course of the disease in the group of mice infected with *P. chabaudi* 6 d.a.i (Fig. 1F).

Next, we measured cytokine expression by qRT-PCR to verify whether the reduction in the clinical signs of EAE observed in infected with *P. chabaudi* 6 d.a.i was related to differences in the cytokine expression profile. As shown in Figure 2, a significant reduction in IL-17A expression was noted in the regional lymph nodes in the EAE-malaria group in comparison to the EAE group. Moreover, corroborating the reduction in the pro-inflammatory profile, we discovered higher expression of IL-10, TGF-β₁ and IL-27 in both lymph nodes in the EAE-malaria mice relative to the EAE-alone mice (Fig. 2).

Involvement of regulatory T cells

Corroborating with previous studies investigating experimental malaria infection models [17], the percentages of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells increased in the spleen as the parasitemia evolved, with a peak observed on day 4 after infection (6.4%) (Fig. 3A). By contrast, naive mice presented CD4⁺CD25⁺ percentages (2.0%) were three fold lower than those detected in malaria-infected mice. A significant difference in the percentage of T regs was noted on day 4 post-infection in the spleen of EAE mice when compared to EAE-malaria-infected animals (Fig. 3B). Indeed, whereas only 6.0% of the cells harvested from EAE mice were CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells, in the EAE animals harboring a malaria infection, up to 14.1% of the CD4⁺ cells expressed CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Analyses of peripheral blood cells revealed a minor increase in the percentage of T reg cells in the EAE-malaria

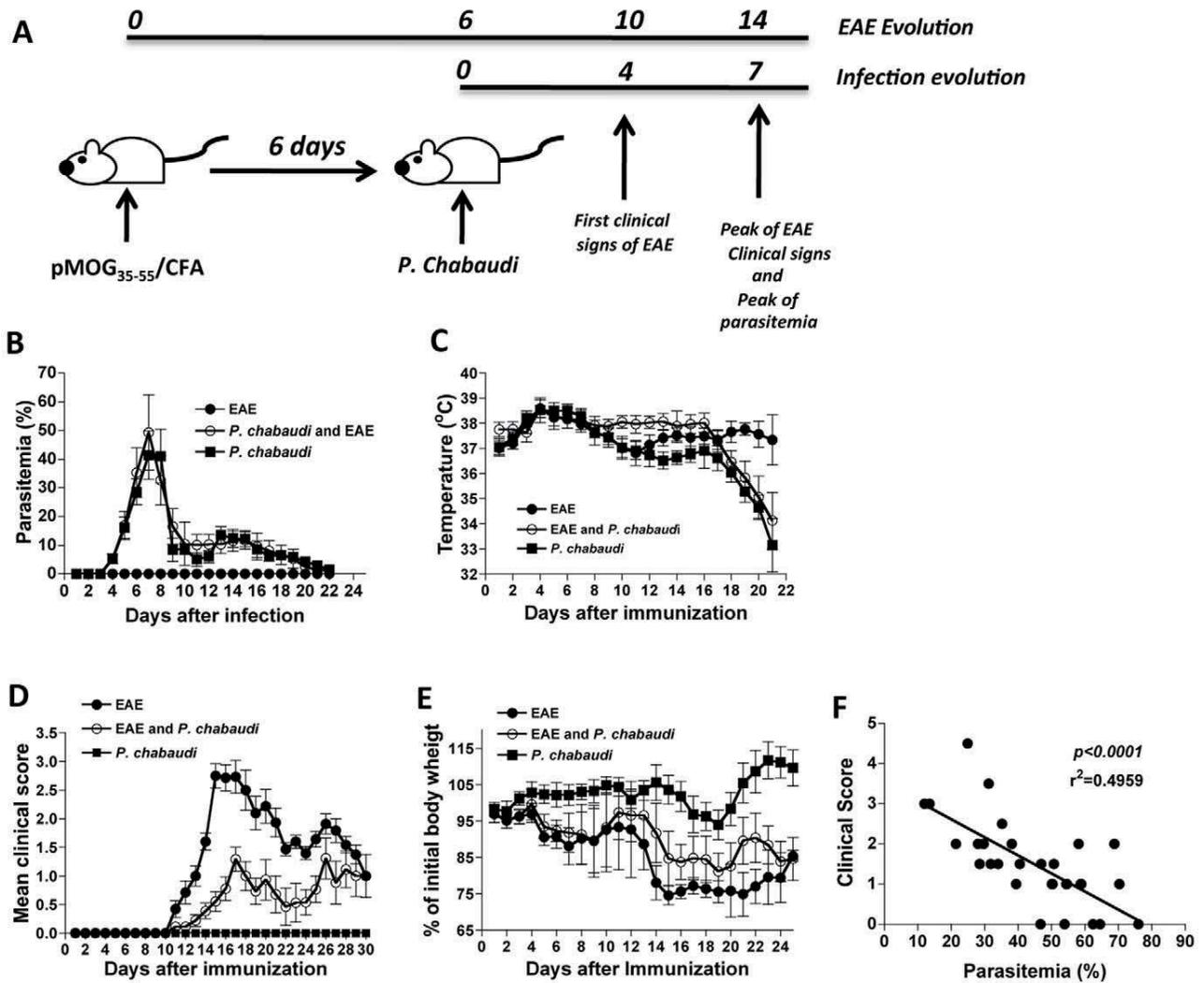


Figure 1. Malaria infection *P. chabaudi*-infected mice 6 d.a.i ameliorates clinical signs of autoimmunity. (A) Experimental design of EAE induction and *P. chabaudi* infection. (B) Parasitemia levels, (C) corporal temperature, (D) EAE clinical score and (E) weight loss in groups of mice infected with *P. chabaudi* alone (*P. chabaudi* - black squares), *P. chabaudi* infected 6 days after EAE induction (*P. chabaudi* + EAE - white circles), and in mice harboring EAE alone (EAE - black circles). The results are expressed as the mean of each group of mice (n=5–8) ± SD. (F) Correlation between parasitemia level and EAE clinical score in the pool of mice harboring a malaria infection 6 days after EAE induction. doi:10.1371/journal.pone.0017849.g001

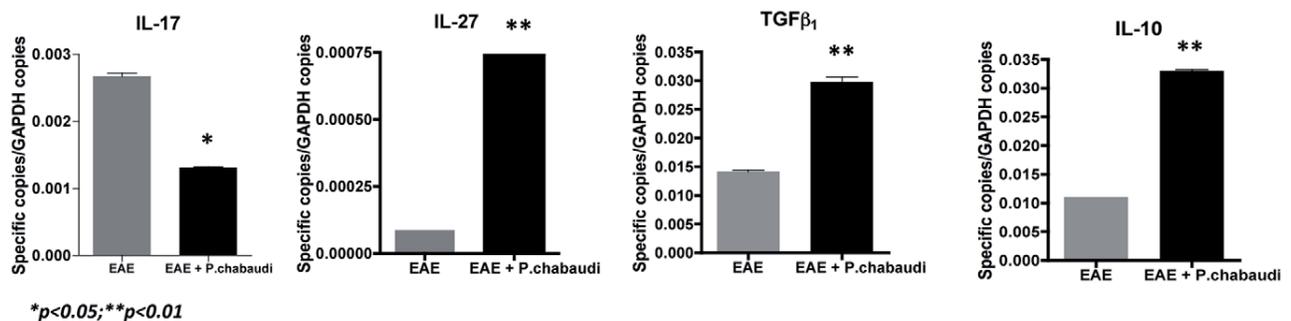


Figure 2. Induction of EAE in *Plasmodium chabaudi*-infected mice modulates their cytokine expression profile. Expression levels of IL-17A, IL-10, IL-27 and TGF-β₁ measured by qRT-PCR in *P. chabaudi* infected 6 days after EAE induction (black bars) and the EAE alone (gray bars) group. The values represent the mean number of specific cytokine gene copies relative to GAPDH in three-five mice ± SD. doi:10.1371/journal.pone.0017849.g002

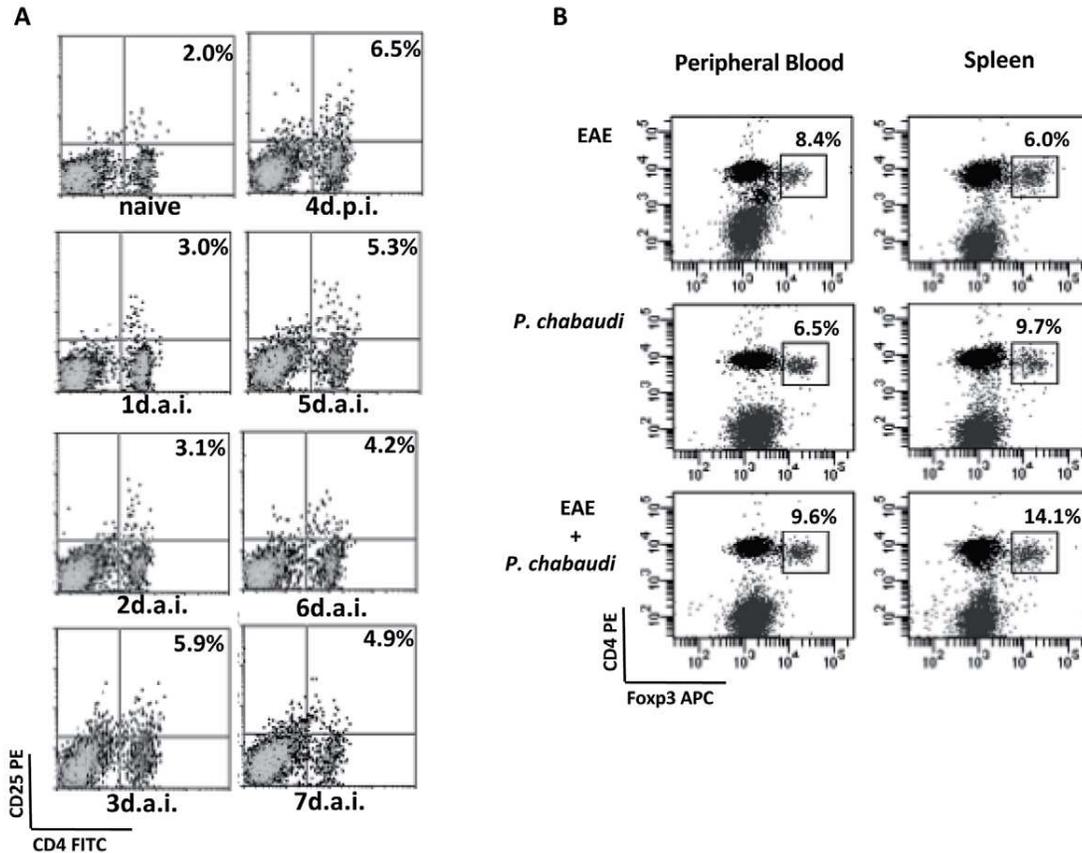


Figure 3. Mice harboring a malaria infection display an increase in the percentage of T regs during EAE evolution. (A) Daily quantification of CD4⁺CD25⁺ cells in *P. chabaudi*-infected mice on days 0–7 post-infection. **(B)** Quantification of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells 4 days post-infection and/or 10 days after EAE induction. The percentages are relative to the total number of CD4⁺ cells and are representative of three independent assays.

doi:10.1371/journal.pone.0017849.g003

(9.6%) relative to the EAE-only mice (8.4%). Nevertheless, these values did not reach statistical significance (Fig. 3C).

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell transfer

To verify the participation of CD4⁺CD25⁺ cells in the regulation of autoimmune responses during EAE, we transferred purified CD4⁺CD25⁺ T cells from *P. chabaudi*-infected mice four days after infection into MOG_{35–55}-immunized mice. No parasites were detected in the CD4⁺CD25⁺ cell preparation. Sorting analyses revealed that CD4⁺CD25[−] (Fig. 4C) and CD4⁺CD25⁺ (Fig. 4D) T cells were highly pure (95% ± 2%) and expressed high levels of Foxp3, as revealed by testing an aliquot of 10⁶ sorted cells (Fig. 4E). Thus, each set (CD4⁺CD25[−] or CD4⁺CD25⁺) of T cells were transferred intravenously into a different group of MOG_{35–55} immunized mice 10 days after EAE induction. The transfer of CD4⁺CD25⁺ cells harvested and sorted from EAE-malaria mice significantly diminished the evolution of clinical signs of EAE ($p < 0.01$) as compared to animals that were immunized only, or even to the group that received CD4⁺CD25[−] cells (Fig. 4F). Of note, the anti-inflammatory effect of the T regs was temporary, because 10 days after the transfer, no significant difference in EAE clinical scores were found between the two groups.

Longevity of the regulatory T cell effect

To determine whether the malaria-induced regulatory T cells were able to sustain their anti-inflammatory effect and thereby

prevent mice from developing clinical signs of EAE, we induced EAE 25 days after infection with *P. chabaudi* (Fig. 5A). At this time point, almost no parasites were detected in the peripheral blood (Fig. 1B). No significant differences in the evolution of the disease were observed between the group with previous *P. chabaudi* infection and the group that was immunized with MOG peptide only (EAE) (Fig. 5B). Indeed, this observation is consistent with the low percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells (2.2%) harvested from the mice 35 days p.i. (Fig. 5C), which did not differ significantly from the percentage observed in naïve animals. These results indicate that the mechanism that suppresses the autoimmune response in *P. chabaudi* infection is transitory and does not generate a specific memory.

Discussion

In the present study, we used *P. chabaudi* infection and EAE induction to demonstrate that the immune response to *Plasmodium* spp. modulates the autoimmune response.

One of the main challenges of multiple sclerosis is an understanding its etiology. It is currently well accepted that the disease results from a genetic predisposition combined with an environmental factor such as an infection [26]. However, many recent studies have demonstrated an immunoregulatory role of infectious agents or their products during the evolution of EAE or MS [4–6]. In all likelihood, both observations are compatible

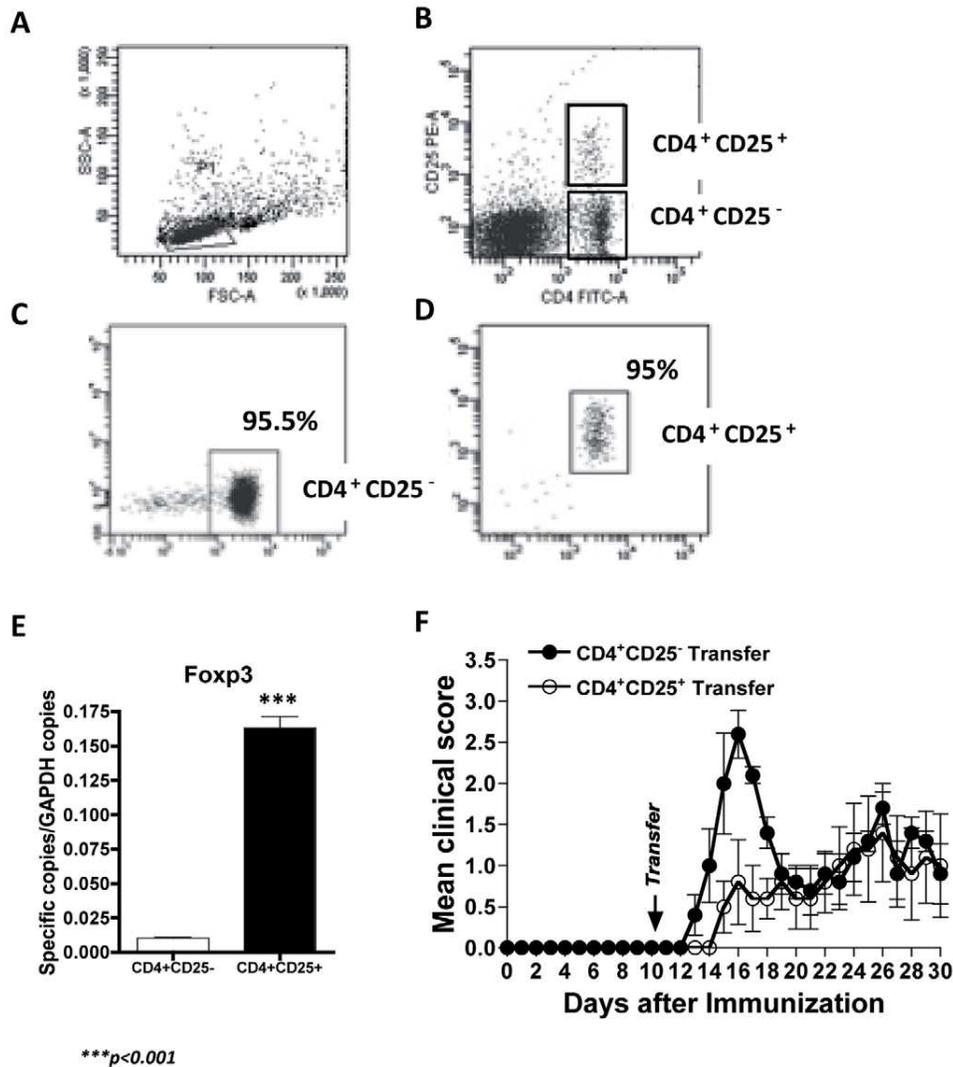


Figure 4. Transfer of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells diminishes the clinical signs of EAE. (A) Lymphocytes are gated from whole spleen cells from a pool of 3–4 mice infected with *P. chabaudi*. (B) Selection of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ cells before sorting. (C) Purity of the sorted CD4⁺CD25⁻ and (D) CD4⁺CD25⁺ cells. (E) qRT-PCR assessment of expression levels of Fcpx3 in CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ cells after sorting. The values represent the mean number of specific cytokine gene copies relative to GAPDH \pm SD. (F) Evolution of the clinical scores of EAE following the transfer of CD4⁺CD25⁺ (white circles) or CD4⁺CD25⁻ cells (black circles). The results represent the mean of three-five mice \pm SD. doi:10.1371/journal.pone.0017849.g004

depending on the genetic predisposition of each individual, the specific action of each infectious agent and the specific timing of the infection.

Here, we conducted a study to understand the effects of malaria infection on the evolution of MS in a murine experimental model. When EAE induction coincided with the peak of infection in *P. chabaudi*-infected mice, we observed a reduction in the clinical signs of EAE, including weight loss. Of note, we discovered a negative correlation between the clinical score for EAE and the percentage of iRBCs. The protective effect of malaria infection on EAE evolution was correlated with the high expression levels of IL-10, IL-27 and TGF- β 1 and reduced levels of IL-17. Moreover, an elevated percentage of T regs on day 4 p.i. with *P. chabaudi* seemed to play a pivotal role in EAE amelioration. Interestingly, the presence of a proinflammatory response evoked during EAE evolution did not alter the evolution of parasitemia. The specific proinflammatory response to MOG₃₅₋₅₅ might not influence

reactivity to malarial antigens. The suppression of immune responses by *Plasmodium* parasites might be explained, at least in part, by the capacity of human or murine iRBCs to convert latent TGF- β into its bioactive form [27]. The activation of TGF- β by the parasite might induce the conversion of naive T cells into T reg cells, or it might directly suppress the autoimmune response [28–29].

In recent years, a growing body of evidence has demonstrated the importance of T regs in the immunological response induced during malaria infection in humans [19–22], and in several experimental models [17,30]. The enhancement of T regs apparently contributes to the immune evasion mechanism of *Plasmodium spp.* and allows parasite development, although this phenomenon may not hold true for all murine-derived *Plasmodium* species [31]. In vitro co-cultures of PBMCs and *P. falciparum*-infected red blood cells induce CD4⁺CD25⁺Fcpx3⁺ T cells [32], and a positive correlation between the absolute number of

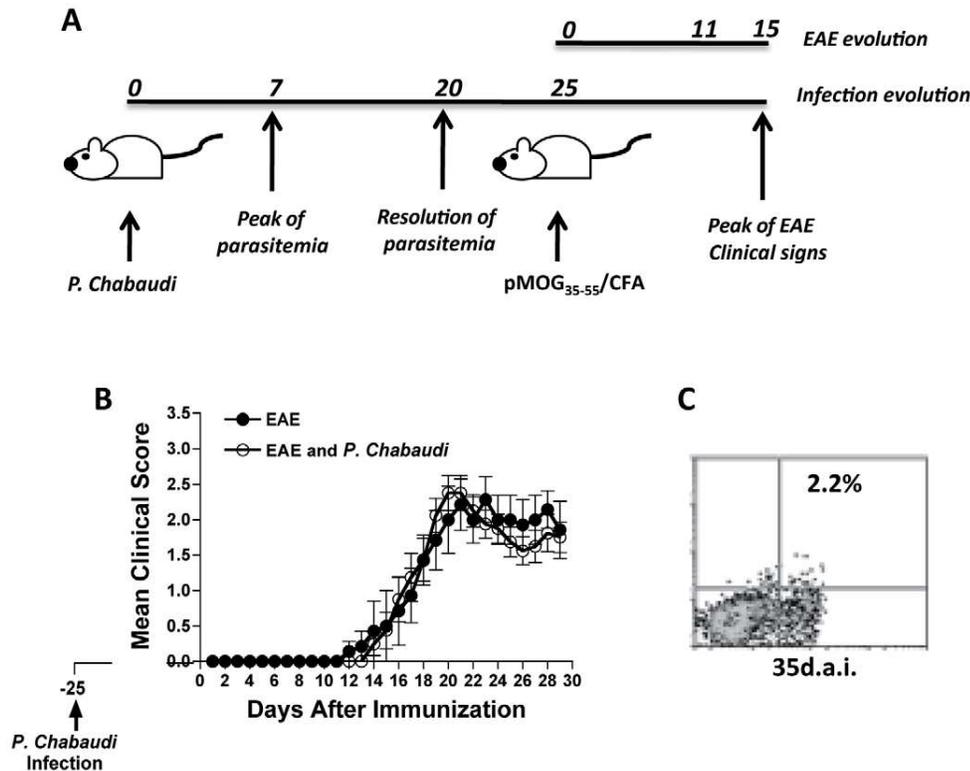


Figure 5. Induction of EAE after recovery from malaria infection does not reduce clinical signs. (A) Experimental design of post *P. chabaudi* infection EAE induction in *P. chabaudi*-infected mice ($n=5-7$). (B) EAE induction 25 days post-*P. chabaudi* infection (white circles) or EAE induction alone (black circles). The results represent the mean of three-five mice \pm SD. (C) CD4⁺CD25⁺ quantification 25 days post-*P. chabaudi* infection. doi:10.1371/journal.pone.0017849.g005

circulating T regs and the parasite burden during acute *P. vivax* infection has been recently observed [22].

Our data demonstrate a progressive increase in the percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells during *P. chabaudi* infection, with a peak observed on day 4 after infection. These CD4⁺CD25⁺ T cells express high amounts of Foxp3 in both *P. chabaudi*-infected mice and in *P. chabaudi*-infected mice 6 d.a.i when compared with EAE-alone mice. This finding may explain the observed suppressive effect of malaria infection on the course of EAE. A large number of reports have highlighted the role of regulatory T cells both in the prevention of EAE induction [33–34] and in the resolution of the disease [16,35], mainly via IL-10 and/or TGF- β induction in these cells [36].

Because CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regs are capable of inhibiting proinflammatory responses by releasing IL-10 and TGF- β ₁, in our model and in other autoimmune models [10], it is conceivable that these CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regs might play a central role in regulating the autoimmune response during *Plasmodium* infection. To test this hypothesis, we transferred highly pure sorted CD4⁺CD25⁺ T cells from *P. chabaudi*-infected mice four days after infection into MOG₃₅₋₅₅ immunized mice, avoiding the introduction of parasites into the system. The adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells, which express higher amounts of Foxp3, but not of CD4⁺CD25⁻ cells, significantly diminished the clinical signs of EAE for approximately 10 days, similar to the signs observed with *P. chabaudi*-infected mice 6 d.a.i. These results unequivocally demonstrated the central role of malaria-induced T regs in the control of EAE development. However, when EAE was induced in a group of mice with controlled parasitemia, no amelioration of the clinical signs of EAE was observed, and the

percentage of CD4⁺CD25⁺ cells was comparable to that in naïve animals. Our findings indicate that the process of T reg cell enhancement is not long lasting and probably does not induce immunological memory. Indeed, these T regs are rapidly inducible and short-lived, as previously described [37]. Nonetheless, malaria-induced T regs are able to suppress responses to non-malarial antigens [38].

Despite these indications, we tried to establish some cross-specificity between the MOG protein and *P. chabaudi* antigens. Using the Sanger Plasmodium databank, we were able to demonstrate significant homology between the MOG protein (NP_034944) and the CIR protein (PC500044.00.0). Five different regions presented some similarity when the two proteins were aligned (Fig. S1A). One of these five regions exactly matched the MOG₃₅₋₅₅ peptide (Fig. S1B). However, no cross-reactivity was observed when this peptide (CIR₁₈₀₋₁₉₈) was used either to induce EAE in naïve animals or to treat MOG₃₅₋₅₅ immunized animals (data not shown). However, we cannot exclude the possibility of polyclonal expansion of lymphocytes promoted by the malaria infection, which may enhance MOG₃₅₋₅₅ specific T regs and thereby cause the phenomena described herein, albeit in smaller numbers. Nevertheless, our data provide strong evidence that once activated by the TCR or during polyclonal expansion, T regs may exert their suppression in a completely non-specific manner. Indeed, Thornton and Shevach have proposed this non-specific suppressor mechanism using an *in vitro* model system [39]. Moreover, the regulatory functions of these T regs are probably due to their expression and release of inhibitory cytokines such as TGF- β and IL-10 in a standard suppressive manner.

In the present study we describe for the first time the ability of *Plasmodium* infection to interfere with the EAE autoimmune response. Our findings indicate that the T reg cells generated during *P. chabaudi* infection act in an apparently non-specific manner to control the proinflammatory response, mainly via increased expression of IL-10 and TGF- β_1 .

Supporting Information

Figure S1 (A) Amino acid sequence alignment of the MOG (black) and CIR proteins (<http://www.ebi.ac.uk>: Accession number: needle-20100715-1546033194.output) (red). Green symbols indicate identical amino acids; yellow symbols represent conservative changes and blue symbols represent semi-conservative changes.

References

- Hauser SL, Oksenberg JR (2006) The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 52: 61–76.
- Brocke S, Gaur A, Piercy C, Gautam A, Gijbels K, et al. (1993) Induction of relapsing paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by bacterial superantigen. *Nature* 365: 642–644.
- Peacock JW, Elsawa SF, Petty CC, Hickey WF, Bost KL (2003) Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents infected with murine gammaherpesvirus-68. *Eur J Immunol* 33: 1849–1858.
- Lehmann D, Ben-Nun A (1992) Bacterial agents protect against autoimmune disease. I. Mice pre-exposed to Bordetella pertussis or Mycobacterium tuberculosis are highly refractory to induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 5: 675–690.
- Tadokoro CE, Vallochi AL, Rios LS, Martins GA, Schlesinger D, et al. (2004) Experimental autoimmune encephalomyelitis can be prevented and cured by infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Autoimmun* 23: 103–115.
- Bach JF (2001) Protective role of infections and vaccinations on autoimmune diseases. *J Autoimmun* 16: 347–353.
- Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E (2007) Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19: 362–371.
- O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, et al. (2008) Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181: 3750–3754.
- Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636–645.
- Wing K, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 11: 7–13.
- Tang Q, Bluestone JA (2008) The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9: 239–244.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, et al. (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212: 8–27.
- O'Connor RA, Anderton SM (2008) Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 193: 1–11.
- Feger U, Luther C, Poeschel S, Melms A, Tolosa E, et al. (2007) Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 147: 412–418.
- Anderton SM, Liblau RS (2008) Regulatory T cells in the control of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 21: 248–254.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM (2005) Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175: 3025–3032.
- Hisaeda H, Yasutomo K, Himeno K (2005) Malaria: immune evasion by parasites. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 700–706.
- Finney OC, Nwakanma D, Conway DJ, Walther M, Riley EM (2009) Homeostatic regulation of T effector to Treg ratios in an area of seasonal malaria transmission. *Eur J Immunol* 39: 1288–1300.
- Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, et al. (2009) Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4+ T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* 5: e1000364.
- Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L (2006) Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol* 28: 35–49.
- Bueno LL, Moraes CG, Araujo FF, Gomes JA, Correa-Oliveira R, et al. *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS ONE* 5: e9623.

(B) Sequence comparison of the MOG₃₅₋₅₅ and CIR₁₈₀₋₁₉₈ peptides.
(TIF)

Acknowledgments

Special thanks to Professor Antonio Carlo Boschero for the use of the real-time PCR machine and Rosemeire F. O. dePaula for the technical support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FTMC ASF. Performed the experiments: ASF RLT YCB SCPL ALFL FP. Analyzed the data: FTMC ASF. Contributed reagents/materials/analysis tools: LMBS. Wrote the paper: FTMC ASF.

- Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, et al. (2009) Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog* 5: e1000402.
- Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, et al. (2005) Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23: 287–296.
- Farias AS, de la Hoz C, Castro FR, Oliveira EC, Ribeiro dos Reis JR, et al. (2007) Nitric oxide and TNF α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. *Neuroimmunomodulation* 14: 32–38.
- Blanco YC, Farias AS, Goelnitz U, Lopes SC, Arrais-Silva WW, et al. (2008) Hyperbaric oxygen prevents early death caused by experimental cerebral malaria. *PLoS ONE* 3: e3126.
- Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, et al. (2005) Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204: 208–231.
- Omer FM, de Souza JB, Corran PH, Sultan AA, Riley EM (2003) Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. *J Exp Med* 198: 1817–1827.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, et al. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198: 1875–1886.
- Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, et al. (2008) A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 9: 632–640.
- Nie CQ, Bernard NJ, Schofield L, Hansen DS (2007) CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T-cell function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. *Infect Immun* 75: 2275–2282.
- Cambos M, Belanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T (2008) Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol* 38: 229–238.
- Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M (2009) *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25Foxp3 CD4+ T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGF β . *PLoS Pathog* 5: e1000543.
- Furtado GC, Olivares-Villagomez D, Curotto de Lafaille MA, Wensky AK, Latkowski JA, et al. (2001) Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Rev* 182: 122–134.
- Olivares-Villagomez D, Wang Y, Lafaille JJ (1998) Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 188: 1883–1894.
- Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, et al. (2007) Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* 13: 423–431.
- Bettini M, Vignali DA (2009) Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 21: 612–618.
- Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N, Gurster S, Dunger N, et al. (2005) Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut* 54: 1546–1552.
- Todryk SM, Walther M, Bejon P, Hutchings C, Thompson FM, et al. (2009) Multiple functions of human T cells generated by experimental malaria challenge. *Eur J Immunol* 39: 3042–3051.
- Thornton AM, Shevach EM (2000) Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164: 183–190.



0000220906188242



PI1001787-9

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

382 - INVERTEBRADO

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 n° 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
Matricula 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 CONDRITIN 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 diversos desses agentes como corticosteróides de ação antiinflamatória, desferrioxamina (quelante de ferro), glicosaminoglicanos (heparina, curdlan 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 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, 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, 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 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 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 Condroitin sulfato fucosilado (FucCs), um polissacarídeo altamente sulfatado, extraído de pepino do mar, *Ludwigothurea grisea*, 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 $\beta\text{-D-glucurônico}$ 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 Coagul 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 -fucopirranose 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 10^5 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 $\beta\text{-D-glucurônico}$ 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.

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 intraperitonealmente (i.p.) com 10^6 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

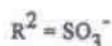
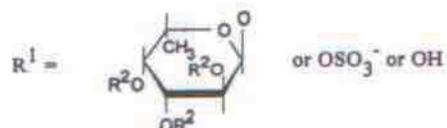
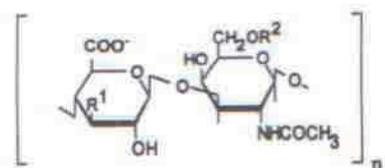
30

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.

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



15 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.

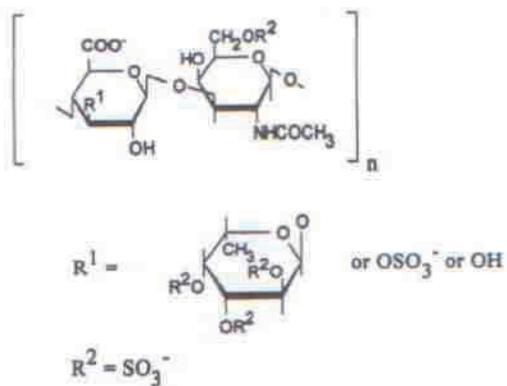


Figura 1

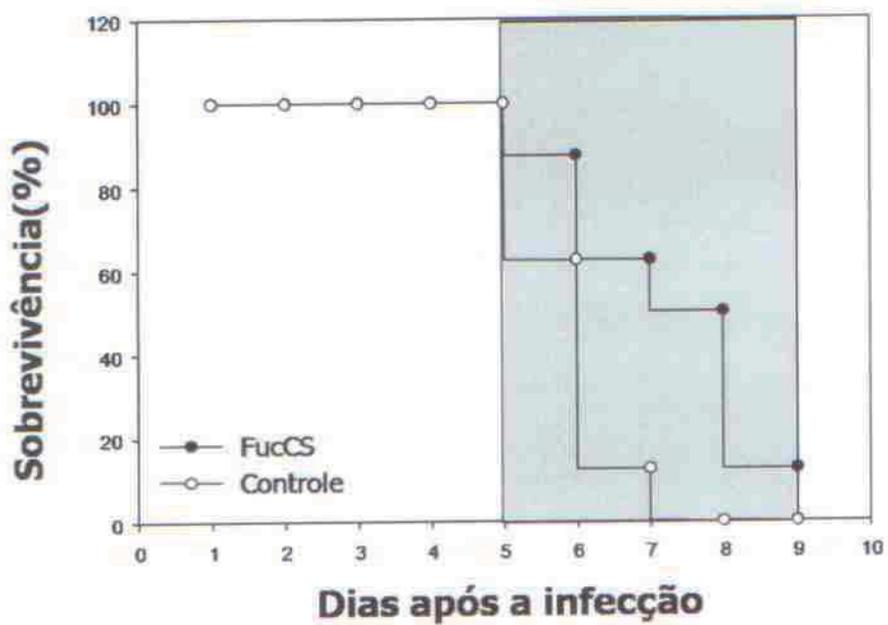


Figura 2

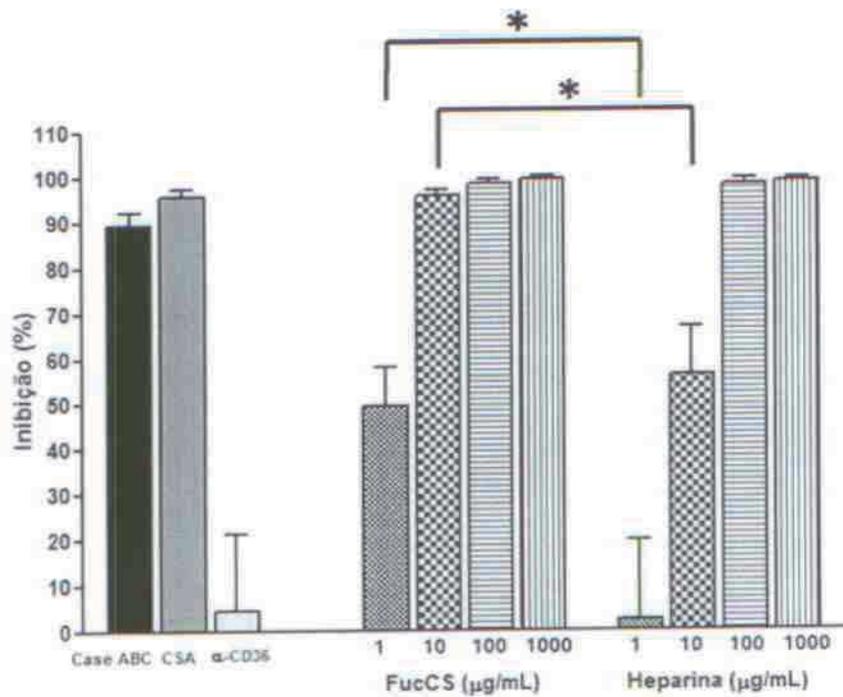


Figura 3

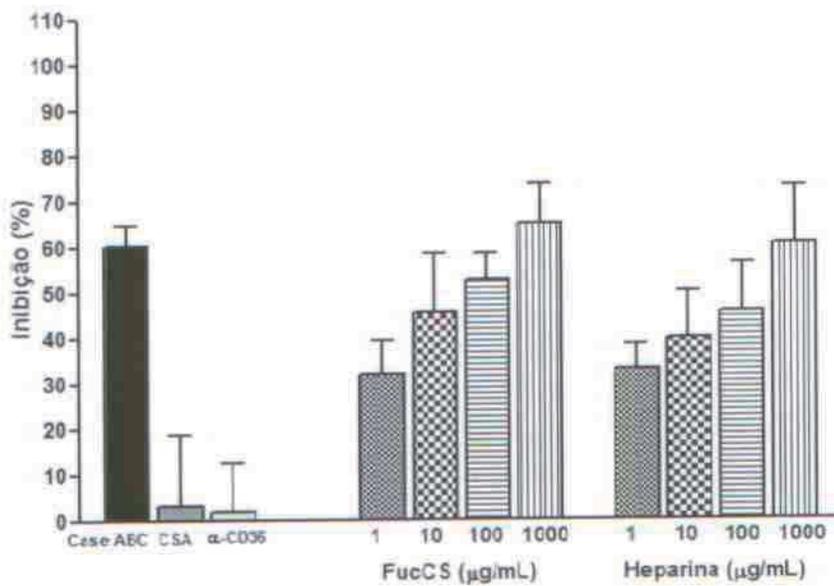


Figura 4

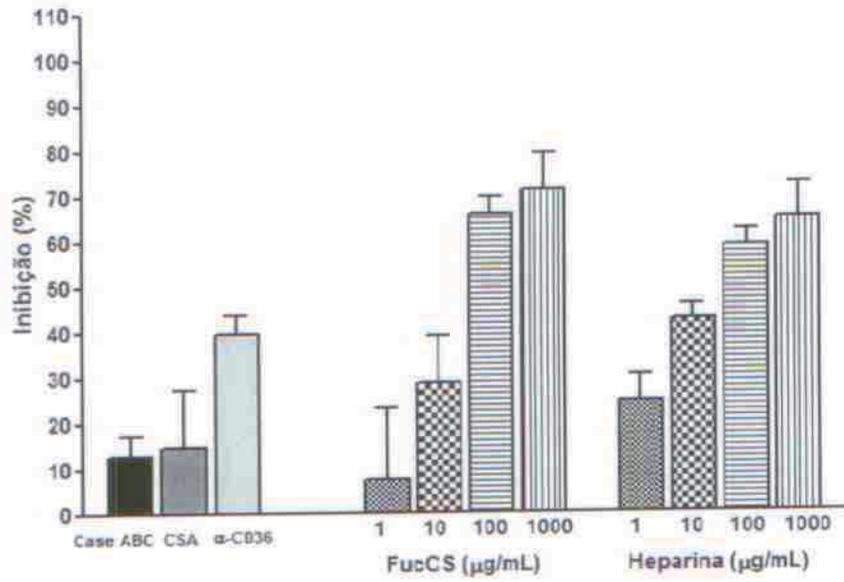


Figura 5

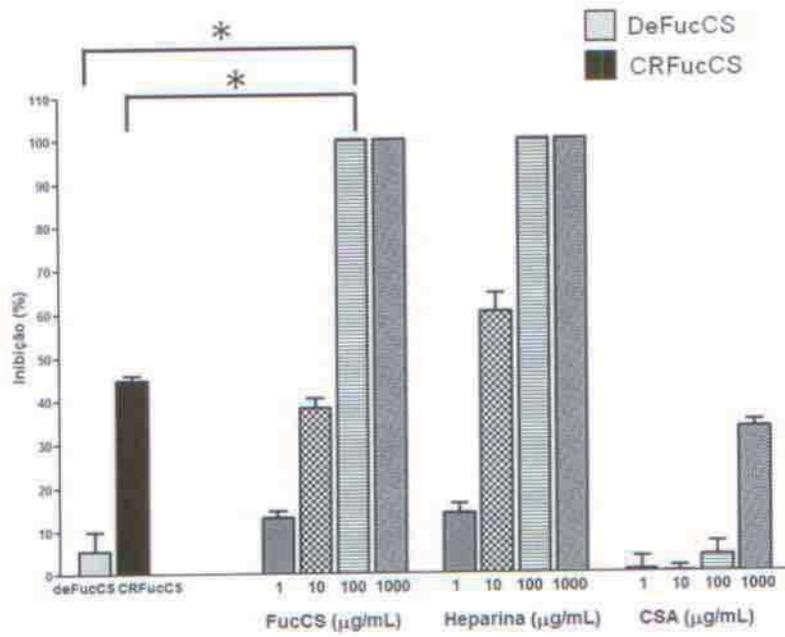


Figura 6

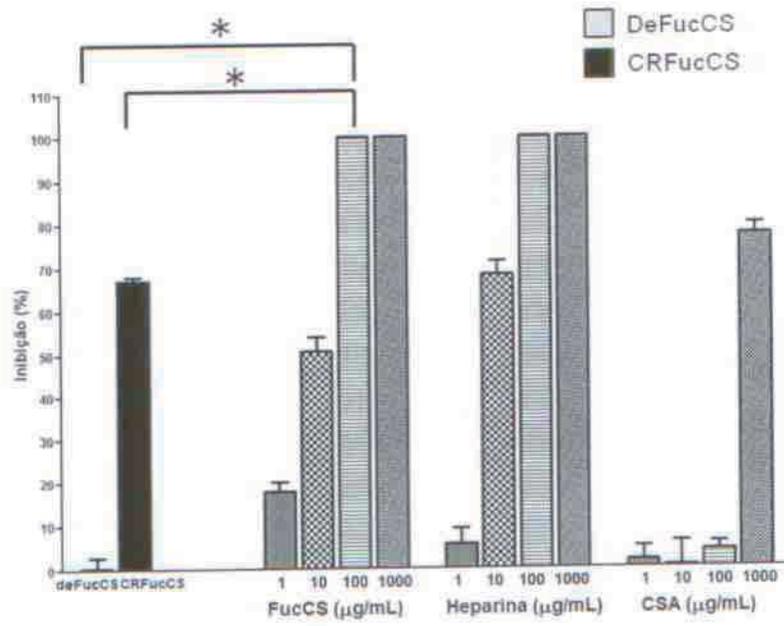


Figura 7

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.