



MARCELE FONTENELLE BASTOS

**“EFEITO DO CONDROITIM SULFATO FUCOSILADO E DE
UM ANÁLOGO DA HEPARINA NA CITOADESÃO E INVASÃO
DE *Plasmodium falciparum*”**

**“FUCOSYLATED CHONDROITIN SULFATE AND AN
HEPARIN ANALOG EFFECT ON *Plasmodium falciparum*
CYTOADHESION AND MEROZOITE INVASION”**

**CAMPINAS
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARCELE FONTENELLE BASTOS

**“EFEITO DO CONDRUITIM SULFATO FUCOSILADO E DE UM
ANÁLOGO DA HEPARINA NA CITOADESÃO E INVASÃO DE
Plasmodium falciparum”**

**“FUCOSYLATED CHONDROITIN SULFATE AND AN HEPARIN
ANALOG EFFECT ON *Plasmodium falciparum* CYTOADHESION AND
MEROZOITE INVASION”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutora
em Genética e Biologia Molecular, na área de
Imunologia.

*Thesis presented to the Biology Institute of the
University of Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor in Genetics and
Molecular Biology, in the Immunology area.*

Orientador: Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
MARCELE FONTENELLE BASTOS, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. FABIO TRINDADE MARANHÃO
COSTA.



ASSINATURA DO ORIENTADOR

CAMPINAS
2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B297e Bastos, Marcele Fontenelle, 1986-
Efeito do condroitim sulfato fucosilado e de um análogo da heparina na
citoadesão e invasão de *Plasmodium falciparum* / Marcele Fontenelle Bastos. –
Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

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

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fucosylated chondroitin sulfate and an heparin analog effect on
Plasmodium falciparum cytoadhesion and merozoite invasion

Palavras-chave em inglês:

Fucosylated chondroitin sulfate

Plasmodium falciparum

Malaria

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabio Trindade Maranhão Costa [Orientador]

Daniel Youssef Bargieri

Danilo Ciccone Miguel

Daniel Ruiz Abánades

Érica Martins Braga

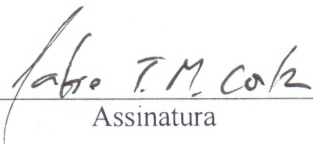
Data de defesa: 15-04-2015

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular


Campinas, 15 de abril de 2015

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa (Orientador)


Assinatura

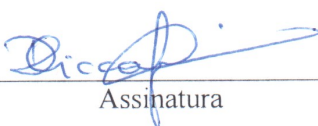
Profa. Dra. Érika Martins Braga


Assinatura

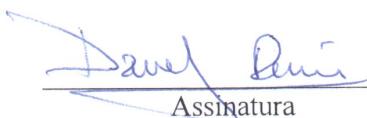
Prof. Dr. Daniel Youssef Bargieri


Assinatura

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel


Assinatura

Dr. Daniel Ruiz Abánades


Assinatura

Prof. Dr. Ronei Mamoni

Assinatura

Prof. Dr. Henrique Marques de Souza

Assinatura

Dra. Carolina Francelin Rovarotto

Assinatura

RESUMO

Acredita-se que o sequestro de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* (Pf-EIs) na microvasculatura de órgão vitais, contribua para a patogênese de síndromes graves da malária, como a malária cerebral (MC), síndrome da angústia respiratória grave, anemia grave e malária na gravidez. Apesar do tratamento com drogas antimaláricas eficazes, mortalidade significativa ainda é observada em casos graves da doença. Assim, tem sido sugerido o uso de terapias adjuvantes. Nesse sentido, polissacarídeos sulfatados, como a heparina, têm demonstrado capacidade em inibir a citoaderência de *P. falciparum* a vários receptores do hospedeiro, inibir a invasão de merozoítos e romper rosetas. A heparina foi utilizada no passado como tratamento para malária grave, no entanto o seu uso foi interrompido devido à ocorrência de efeitos colaterais graves, tais como hemorragia. Além disso, muitos desses polissacarídeos sulfatados são derivados de mamíferos, o que aumenta o risco de contaminação por agentes patogênicos, como príons. Apesar de muitos compostos terem sido testados como terapia adjuvante para diferentes aspectos patogênicos da malária grave, nenhum destes demonstrou evidência inequívoca de melhora dos pacientes nos testes clínicos. Sendo assim, nesse estudo, investigamos a ação de dois polissacarídeos sulfatados extraídos de invertebrados na citoadesão e desenvolvimento de *P. falciparum*. Já foi demonstrado que esses compostos; o condroitim sulfato fucosilado (FucCS), extraído do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea*, e o análogo da heparina (heparam sulfato), extraído do molusco bivalve *Nodipecten nodosus*; possuem ação anticoagulante e antitrombótica, porém em menor escala do que a heparina comercial. Além disso, apresentam efeito anti-inflamatório e antimetastático. Aqui, nós mostramos que o FucCS e o heparam sulfato (HS) de molusco foram eficazes em inibir a citoadesão de *P. falciparum* em condições estáticas e de fluxo a células endoteliais de pulmão humano (HLECs). Eles também foram capazes de inibir o desenvolvimento parasitário por interferir na invasão de merozoítos. Além de romper rosetas eficientemente. Ainda, o FucCS inibiu a adesão de Pf-EIs a criocortes de placenta. Finalmente, a remoção das cadeias de fucose sulfatadas presentes na estrutura do FucCS praticamente aboliu o efeito inibitório do composto, evidenciando a importância dessas cadeias para sua atividade. Sendo assim, sugerimos o FucCS e o HS de molusco como candidatos promissores a terapia

adjuvante no tratamento da malária grave e na prevenção ao agravamento da doença, além de abrir perspectivas para continuação e aprofundamento do estudo desses compostos no tratamento da malária.

ABSTRACT

It is believed that sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes (Pf-iEs) in the microvasculature of vital organs, contributes to the pathogenesis of severe malaria syndromes such as, cerebral malaria (CM), severe respiratory distress, severe anemia and malaria in pregnancy (MiP). Despite treatment with effective antimalarial drugs, high mortality is still observed in severe cases of the disease. Thus, the use of adjuvant therapies has been suggested. Accordingly, sulfated polysaccharides, such as heparin, have been shown to prevent *P. falciparum* cytoadherence to several host receptors, inhibit merozoite invasion and disrupt rosettes. Heparin was used in the past as treatment for severe malaria, however its use was abandoned due to the occurrence of serious side effects such as bleeding. Moreover, many of these compounds are derived from mammals, which increase the risk of contamination by pathogens, such as prions. Although many compounds have been tested as adjunct therapy to different pathophysiological features of severe malaria, none of them showed clear evidence of patients' improvement in clinical trials. Therefore, in this study, we investigated the action of two sulfated compounds extracted from invertebrates in *P. falciparum* cytoadhesion and development. It has been shown that these compounds; chondroitin sulfate fucosylated (FucCS), extracted from the sea cucumber *Ludwigothurea grisea*, and the heparin analogue (heparan sulfate), extracted from the bivalve mollusk *Nodipecten nodosus*; have anticoagulant and antithrombotic action, but on a smaller scale than the commercial heparin. They also have anti-inflammatory and antimetastatic effect. Here, we show that FucCS and mollusk heparan sulfate (HS) were effective in inhibiting *P. falciparum* cytoadhesion, under static and flow conditions to human lung endothelial cells (HLECs). They were also able to block parasite development by interfering with merozoite invasion, and to disrupt rosettes efficiently. In addition, FucCS inhibited Pf-iEs adhesion to placenta cryosections. Finally, removal of sulfated fucose branches on the FucCS molecule virtually abolished its inhibitory effect, indicting a central role played by these structures. Then, we suggest FucCS and mollusk HS as promising candidates for adjunct therapy in the treatment of severe malaria and in preventing disease worsening. Also, we open new avenues to understand the mechanisms of action of these compounds in malaria treatment.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Aspectos Gerais.....	1
Situação da malária no Brasil e no mundo.....	4
Malária Grave.....	10
Terapias Adjuvantes.....	19
Polissacarídeos Sulfatados.....	22
Condroitim Sulfato Fucosilado (FucCS) e Heparan Sulfato de Molusco (HSM).....	26
OBJETIVOS.....	33
CAPÍTULO 1- Artigo	35
<i>“Fucosylated Chondroitin Sulfate Inhibits Plasmodium falciparum Cytoadhesion and Merozoite Invasion”</i>	<i>37</i>
CAPÍTULO 2- Artigo.....	49
<i>“Effect of a new heparan sulfate from the mollusk Nodipecten nodosus on Plasmodium falciparum cytoadhesion and merozoite invasion”</i>	<i>51</i>
DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS.....	121

Patente 1- <i>“Composição farmacêutica contendo o condroitin sulfato fucosilado (FucCS) para tratamento e prevenção do desenvolvimento da malária cerebral e gestacional e seu uso”</i>	123
Patente 2- <i>“Método para extração de heparan sulfato de moluscos bivalves, composição farmacêutica contendo o heparan sulfato obtido segundo o método e seus usos”</i>	147
Manuscrito 1- <i>“Improving Host Tolerance to Pathogens: The Role of Pressurized Oxygen in Cerebral Malaria”</i>	183
Manuscrito 2- <i>“Perspectives in Gaseous Therapy against Severe Malaria: Solid and Vaporizing Facts”</i>	209

“Acho que na sociedade actual nos falta filosofia. Filosofia como espaço, lugar, método de reflexão, que pode não ter um objectivo determinado, como a ciência, que avança para satisfazer objectivos. Falta-nos reflexão, pensar, precisamos do trabalho de pensar, e parece-me que, sem ideias, não vamos a parte nenhuma.”

José Saramago, Revista do *Expresso*, Portugal (entrevista), 2008

“O viajante está feliz. Nunca na vida teve tão pouca pressa. Senta-se na beira de um destes túmulos, afaga com as pontas dos dedos a superfície da água, tão fria e tão viva, e, por um momento, acredita que vai decifrar todos os segredos do mundo. É uma ilusão que o assalta de longe em longe, não lho levem a mal.”

José Saramago, In *Viagem a Portugal*.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho. Sem vocês tudo isso não seria possível.

Ao professor Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa pela oportunidade de desenvolver esse projeto, pela orientação, pela paciência, pelo apoio e sobretudo pela grande confiança no meu trabalho.

Aos professores Membros da pré-banca e banca: Dra. Érika Martins Braga, Dr. Daniel Bargieri, Dr. Danilo Ciccone Miguel, Dr. Daniel Ruiz Abánades, Dra. Elisabeth Bilsland.

Aos professores Dr. Paulo Mourão e Dr. Mauro Pavão pelo fornecimento dos compostos utilizados nesse trabalho, pelas sugestões e pela colaboração no desenvolvimento deste projeto.

Aos professores e colegas do Instituto de Biologia pelos ensinamentos em disciplinas e nas conversas de corredor.

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

A todos os integrantes que fizeram ou fazem parte do Lipex, e que permitiram que os dias de trabalho fossem mais divertidos: Carol, Juliana, Stefanie, Letusa, Isabel, Catarina C., Catarina B., João, Ana, Yara, Bruna, Wanessa, Laura, Natálias, muito obrigada pela convivência, pela ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas e por tantas outras não tão científicas. Em especial, à Stefanie que sempre me ajudou e apoiou desde os primeiros passos no laboratório, e à Letusa pela grande contribuição intelectual, pela ajuda nos experimentos e pela amizade. À Ju e a Carol não só pela ajuda no laboratório, mas por estarem sempre presentes nas horas boas e ruins, e por sempre me apoiarem, obrigada pela amizade e o carinho de vocês.

Aos grandes amigos que Campinas me trouxe: Edson, Cris, Paula, Matheus, Geps, Fih, Bia e tantos outros, por fazerem meus dias mais felizes e divertidos, pelas incansáveis risadas, pela compreensão, pelo apoio e por serem únicos e adoráveis. Em especial ao Edson, pelo companheirismo, pela disponibilidade, pelos conselhos e pelos bons momentos.

As minhas queridas amigas de Salvador por serem tão presentes mesmo a distância. Amo vocês!

Ao Rafa por tornar os meus dias mais leves, pelo amor, paciência, pela ajuda e incentivo.

Ao meu padrinho, Ivo, pelo amor, por todo apoio e torcida e por simplesmente acreditar e confiar em mim.

As minhas queridas tias, por serem simplesmente as melhores.

À minha irmã, Jamile, pela amizade de uma vida inteira.

Aos meus pais, por serem responsáveis pela pessoa que me tornei. Obrigada por sempre apoiarem minhas decisões, pela compreensão, pela confiança, pelo amor e sobretudo por sempre me ensinarem a importância dos estudos e da honestidade. Amo vocês!

À FAPESP pelo apoio financeiro, pela bolsa fornecida nesses quatro anos de trabalho e por me permitir conhecer um pouco do mundo.

À Unicamp pelos tantos momentos incríveis que vivi, pelas pessoas maravilhosas que conheci e por possibilitar o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A Deus.

LISTAS DE ABREVIATURAS

ACT- Terapia Combinada à base de Artemisinina

AQUAMAT- *African Quinine Artesunate Malaria Trial*

CD36- *Cluster of Differentiation 36*

CM- *Cerebral Malaria*

CSA- Condroitim Sulfato A; *Chondroitin Sulfate A*

CSP- Proteína circunsporozoíta

deFucCS- Condroitim Sulfato Fucosilado defucosilado

DBL- *Duffy binding-like*

DDT- Dicloro-Difenil-Tricloroetano

EBA-140- *Erythrocyte binding antigen 140*

EBPs- *Erythrocyte binding proteins*

Eis- Eritrócitos Infectados

EPCR- *Endothelial Protein C Receptor*

FucCS- Condroitim Sulfato Fucosilado

HA- Ácido Hialurônico

HepG2- Células de Hepatoma Humano

HLECs- Células Endoteliais de Pulmão Humano

HS- Heparan Sulfato

ICAM- *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*

IPTp- Tratamento preventivo intermitente durante a gravidez

IRS- Borrifação intradomiciliar de inseticida de efeito residual

LLIN- Inseticida de longa duração

LPS- Lipopolissacarídeo

MC- Malária Cerebral

MG- Malária Grave

MSP-1- *Merozoite surface protein-1*

MiP- Malária na gravidez, *Malaria in pregnancy*

NO- Óxido Nítrico

OMS- Organização Mundial de Saúde

PfEMP-1- *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1*

Pf-EIs- Eritrócitos Infectados por *Plasmodium falciparum*

Pf-iEs- *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes

SEAQUAMAT- *South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial*

SIVEP- Sistema de Informação em Vigilância Epidemiológica

WHO- World Health Organization

INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras da malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Cinco espécies do gênero *Plasmodium* são responsáveis por todos os casos de malária em humanos. *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, e *Plasmodium ovale* são espécies de malária humana que se propagam de uma pessoa para outra por meio de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Existem cerca de 400 diferentes espécies de mosquitos *Anopheles*, mas apenas 30 delas são vetores de maior importância (World Health Organization., 2014). Nos últimos anos foram registrados casos humanos de malária causados pelo *Plasmodium knowlesi*, espécie que causa malária entre macacos, e ocorre em certas áreas do sudeste asiático (Kantele & Jokiranta, 2011).

Entre as principais espécies de *Plasmodium* que infectam humanos *P. falciparum* e *P. vivax* causam a maioria das infecções (World Health Organization., 2014). *P. falciparum* é mais prevalente no continente africano, e é responsável pela maioria das mortes por malária (World Health Organization., 2014). *P. vivax* tem uma distribuição geográfica mais ampla que *P. falciparum* (World Health Organization., 2014). *P. ovale* é pouco comum, sendo encontrado principalmente na África Ocidental, enquanto *P. malariae* é encontrado em todo o mundo, mas também com relativa baixa frequência (Tuteja, 2007).

As espécies do gênero *Plasmodium* apresentam um ciclo de vida complexo (**Figura 1**), envolvendo dois hospedeiros, um hospedeiro definitivo (invertebrado) e um hospedeiro intermediário (vertebrado). No hospedeiro vertebrado observamos um ciclo pré-eritrocítico (assintomático), que ocorre nas células hepáticas, e um ciclo eritrocítico, que se desenvolve nos eritrócitos e é responsável pelos sintomas da doença. Os sintomas mais característicos são febre, dor de cabeça, calafrios e sudorese, mas tonturas, dores abdominais, náuseas, diarreia e vômitos também podem estar presentes (revisado em(Trampuz et al., 2003)).

A fase pré-eritrocítica do ciclo de vida do parasito se inicia quando o mosquito fêmea infectado do gênero *Anopheles* inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Essas formas móveis do parasito circulam rapidamente na corrente sanguínea antes de invadirem os hepatócitos, onde ocorre o ciclo assexuado. Os esporozoítos podem permanecer por até 6 horas no local da inoculação, ficando retidos na pele antes de atingirem a corrente sanguínea e invadirem os hepatócitos (Amino et al., 2007; Yamauchi et al., 2007). Alguns deles migram ativa ou passivamente para os linfonodos regionais (Amino et al., 2006). Ao atingir o parênquima hepático, os esporozoítos continuam a migrar através de vários hepatócitos antes de finalmente infectar um deles. Nos hepatócitos, os parasitos se multiplicam assexuadamente por esquizogonia originando milhares de merozoítos. Nas infecções causadas pelo *P. vivax* e *P. ovale* o parasito pode evoluir para formas hepáticas latentes (hipnozoítas), que podem dar início a um novo ciclo sanguíneo semanas ou meses mais tarde, sem que haja necessidade de contato com o mosquito infectado. Os merozoítos saem dos hepatócitos dentro de vesículas, denominadas merossomos (Sturm et al., 2006), que são liberadas nos sinusóides hepáticos e rompem na corrente sanguínea liberando os merozoítos na circulação (Baer et al., 2007).

Uma vez livres na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos dando início ao ciclo eritrocítico. Esse ciclo assexuado leva cerca de 48h para o *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, 72h para o *P. malariae* e apenas 24h para o *P. knowlesi*. Os parasitas se ligam e entram nos eritrócitos por várias vias através de diferentes interações receptor-ligante. Uma vez dentro dos eritrócitos, os parasitas se diferenciam em trofozoítos e se multiplicam assexuadamente através da divisão nuclear, dando origem aos esquizontes. Os esquizontes se rompem e liberam entre 6-30 novos merozoítos, cada um dos quais podem invadir outros eritrócitos e repetir o ciclo assexuado. O sintoma clássico da doença, a febre intermitente, coincide com a ruptura dos eritrócitos e liberação dos merozoítos.

Alguns parasitas dentro dos eritrócitos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos. Não se sabe ao certo que fatores estimulam a gametogênese (Drakeley et al., 2006), no entanto tem sido sugerido que a mesma pode ser influenciada por fatores ambientais, drogas ou fatores da resposta imune inata (Ramiro et al., 2011; Reece et al., 2010). Após a ingestão dos gametócitos femininos e masculinos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo, ocorre a fusão dos gametas no intestino do mosquito com formação do zigoto e subsequentemente do oocineto. Os oocinetos penetram na parede do intestino do inseto formando oocistos entre o epitélio intestinal e a lâmina basal. Os oocistos passam por uma fase de desenvolvimento assexuado complexo, que gera esporozoítos infectantes, os quais podem ser introduzidos no hospedeiro humano pelo mosquito garantindo a continuação do ciclo de vida do parasito.

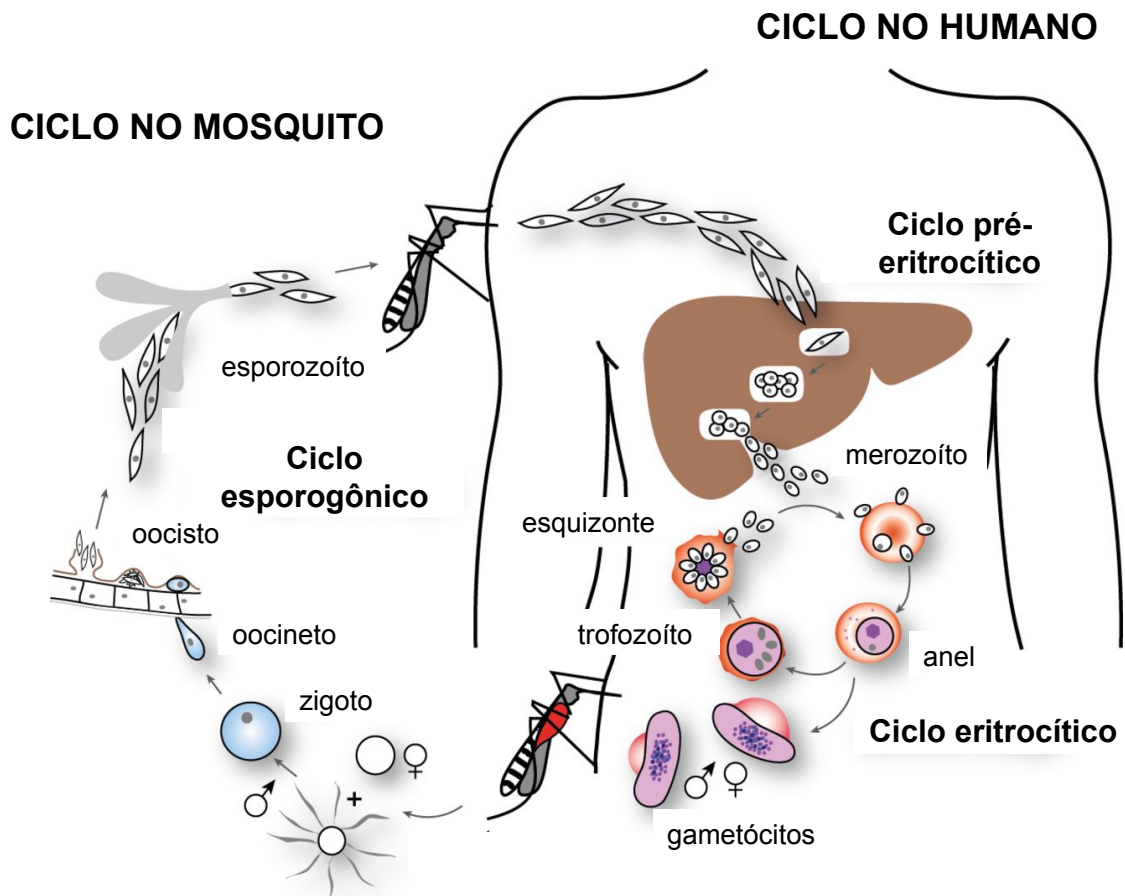


Figura 1: Ciclo de vida de *Plasmodium sp.* (Cowman et al., 2012).

Situação da malária no mundo e no Brasil

A malária continua sendo um dos mais significativos problemas para a saúde pública no mundo, com quase metade da população mundial- 3.2 bilhões de pessoas em 97 países- vivendo em áreas de risco de infecção da doença (**Figura 2**) (World Health Organization., 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorreram 198 milhões (variando entre 124-283 milhões) de casos de malária em 2013 no mundo e 584 mil (variando entre

367-755 mil) mortes (World Health Organization., 2014). A maioria dos casos (82%) e das mortes (90%) ocorreram na África, sendo 78% das mortes de crianças menores de 5 anos (World Health Organization., 2014).

A malária tem uma ampla distribuição atingindo países distribuídos em seis regiões definidas pela OMS: Região Africana, Região das Américas, Região do Mediterrâneo Oriental, Região Europeia, Região do Sudeste Asiático e Região do Pacífico Ocidental (**Figura 2**) (World Health Organization., 2014). A doença afeta principalmente países de baixa renda, sendo as populações mais pobres e marginalizadas desses países as mais gravemente afetadas. Além disso, em geral, elas sofrem os maiores riscos associados a malária e possuem menor acesso aos serviços de prevenção diagnóstico e tratamento (World Health Organization., 2014).

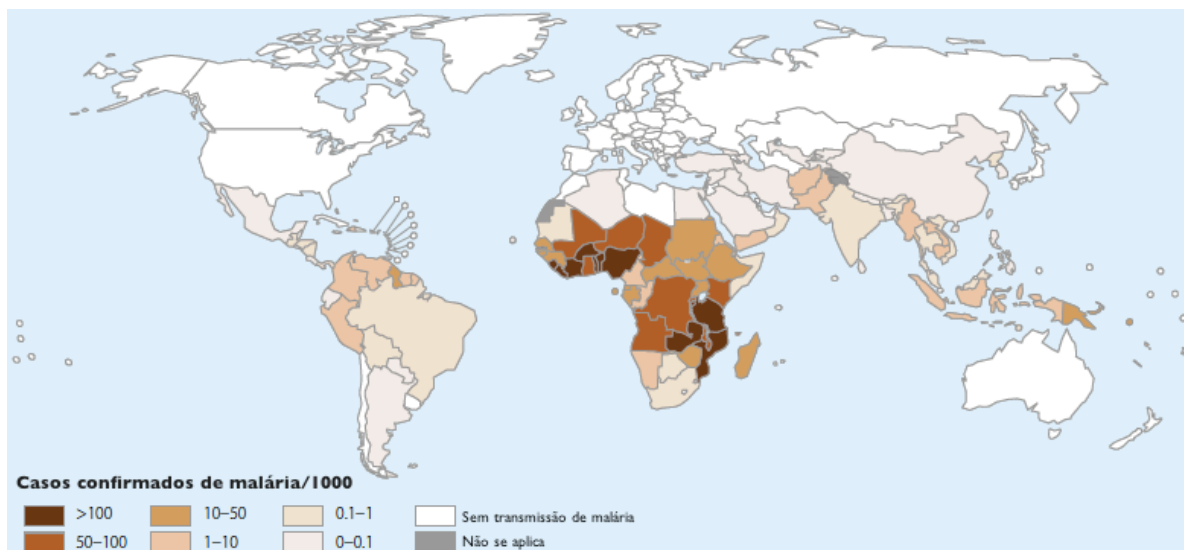


Figura 2: Mapa de transmissão da malária em 2013

Fonte: Adaptado de World Malaria Report, 2014 (World Health Organization., 2014)

Na região das américas, três países foram responsáveis por 72% dos casos de malária em 2013: Brasil (42%), Venezuela (18%) e Colômbia (12%) (World Health Organization., 2014). A região registrou 82 mortes por malária em 2013, um declínio de 79% comprado ao ano 2000 (World Health Organization., 2014), sendo que metade das mortes da região ocorreram no Brasil (World Health Organization., 2014).

No Brasil, a transmissão da malária concentra-se na Região Amazônica (99,5% dos casos em 2013)(de Pina-Costa et al., 2014), composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, compreendendo 807 municípios (**Figura 3**) (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde., 2013). Foram registrados 177.767 casos de malária no Brasil em 2013, causados principalmente pelo *P. vivax* (82%) e pelo *P. falciparum* (18%), sendo registradas 41 mortes nesse período (World Health Organization., 2014).

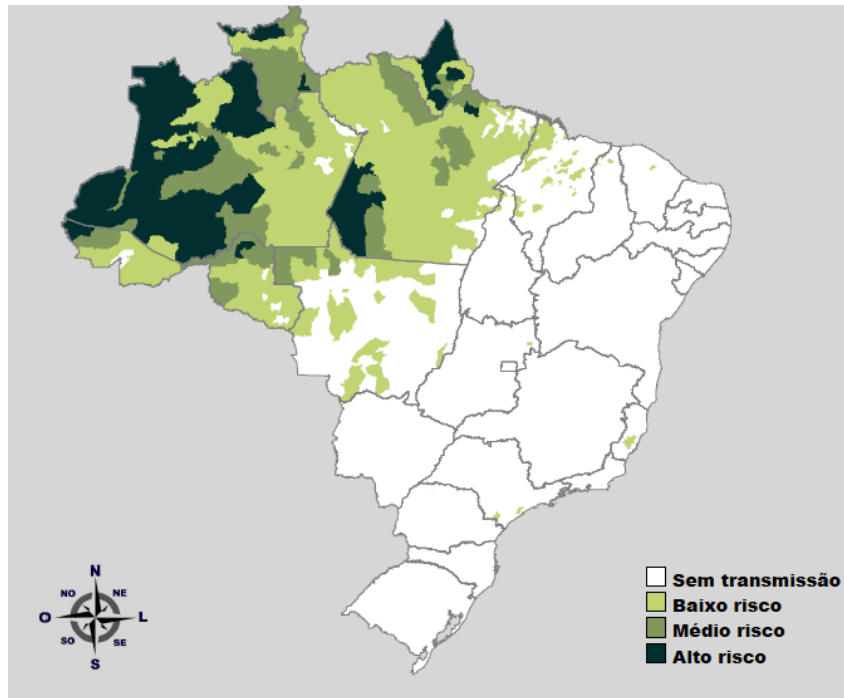


Figura 3: Mapa de risco de infecção da malária por município, Brasil, 2013

Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS (<http://portalsaude.saude.gov.br>)

Seis décadas atrás, o descobrimento e implementação da cloroquina no tratamento antimalárico aumentou a esperança de erradicação da malária (Eastman & Fidock, 2009). O uso desta droga altamente eficaz, de ação rápida e barata, juntamente com o potente inseticida DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), rapidamente demonstrou sucesso em reduzir substancialmente a incidência da malária em muitas áreas do mundo, e particularmente na região subtropical (Eastman & Fidock, 2009). Contudo, muitas dificuldades para o controle da doença foram surgindo nos países que permaneceram endêmicos, como a falta de financiamentos, a emergência e disseminação da resistência à cloroquina pelo *Plasmodium* e a resistência do mosquito *Anopheles* ao DDT (Eastman & Fidock, 2009; Payne, 1987). Esta situação levou a aumentos significativos da malária em todo o mundo (Payne, 1987).

Nos últimos anos, tem havido um declínio na transmissão da malária em muitas regiões, levando a esperança de que a eliminação da doença possa ser alcançada em inúmeros países (Ceesay et al., 2008; Greenwood, 2008; O'Meara et al., 2010; Okiro et al., 2010; Snow & Marsh, 2010; World Health Organization., 2012b). Nesse sentido, estima-se que, globalmente, 670 milhões menos casos e 4,3 milhões menos mortes por malária ocorreram entre 2001 e 2013 do que teria ocorrido se as taxas de incidência e mortalidade permanecessem inalteradas desde 2000 (World Health Organization., 2014).

Intervenções importantes que vêm contribuindo para o declínio da prevalência e da mortalidade da malária incluem o uso de mosquiteiros impregnados com inseticida de longa duração (LLIN), borrifação intradomiciliar de inseticida de efeito residual (IRS), uso de terapia combinada à base de artemisinina (ACT), maior eficiência no diagnóstico da doença, tratamento preventivo com sulfadoxina-pirimetamina em mulheres grávidas (IPTp) (Bridges et al., 2012; World Health Organization., 2014). Embora estas intervenções venham sendo bem sucedidas em muitos países, sua utilidade está ameaçada tendo em vista o desenvolvimento de resistência aos inseticidas e as drogas convencionalmente utilizadas, medicamentos falsificados, e insuficiência dos serviços de saúde (Bridges et al., 2012).

Nesse sentido, a resistência à drogas tem sido um dos maiores obstáculos na luta contra malária (Kokwaro, 2009). Resistência aos antimaláricos tem sido documentada para *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*. Para *P. falciparum*, a resistência tem sido observada para todos os antimaláricos atualmente utilizados (amodiaquina, cloroquina, mefloquina, quinino e sulfadoxina-pirimetamina) e, mais recentemente, para os derivados de artemisininas (World Health Organization., 2010).

Depois da recomendação oficial da OMS em 2001 (Global Partnership to Roll Back Malaria., 2001) para uso de terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs) como o tratamento de primeira linha de malária causada por *P. falciparum*, observou-se a partir de 2005, um declínio substancial nos casos da doença (World Health Organization., 2012b). No entanto, a resistência do *P. falciparum* à artemisinina já foi detectada em cinco países: Camboja, Laos, Mianmar, Tailândia e Vietnã (World Health Organization., 2014). Apesar das alterações na sensibilidade do parasita a artemisinina nesses países, em geral, ACTs têm permanecido clinicamente e parasitologicamente eficientes, desde que o medicamento associado permaneça eficaz (World Health Organization., 2014).

Sendo assim, a luta pelo controle da malária é ainda um desafio, e por isso, o desenvolvimento de novas drogas e de vacinas eficientes contra a doença é extremamente necessário. Além disso, o fortalecimento do sistema de saúde, desenvolvimento de infraestrutura e redução da pobreza são também pontos essenciais para o controle e eliminação da doença (World Health Organization., 2014).

Atualmente, a vacinação é o método mais eficaz de prevenção de doenças infecciosas e representa a maior contribuição da imunologia para a saúde humana (Arama & Troye-Blomberg, 2014). Muito tempo, esforço e dinheiro têm sido gastos no desenvolvimento de vacinas contra a malária. Até o momento, a vacina de subunidade RTS,S, que é baseada na proteína circunsporozoíta (CSP) de *P. falciparum*, é a vacina mais avançada em desenvolvimento (White et al., 2014). Essa vacina tem demonstrado 30-50% de proteção em humanos em ensaios clínicos de campo na África (Agnandji et al., 2012; Guinovart et al., 2009). Como a proteção foi relativamente de curta duração, como melhorar a eficácia da vacina através da manipulação da resposta imune do hospedeiro é um desafio para os

próximos anos (Arama & Troye-Blomberg, 2014). Além disso, grandes desafios logísticos e técnicos permanecem por serem resolvidos para que haja o desenvolvimento de vacinas eficazes contra a malária (Arama & Troye-Blomberg, 2014).

Malária Grave

As síndromes graves da malária ou malária grave (MG) remete a manifestações associadas com um risco aumentado de morte ou de outro efeito adverso (e.g. lesão cerebral) (Cunnington et al., 2013a). A definição de malária grave tem como base os critérios da OMS (World Health Organization., 2012a) e inclui características clínicas e laboratoriais, que são preditivos de morte em indivíduos recebendo tratamento antimalárico (Cunnington et al., 2013a).

Entre as espécies de *Plasmodium* que causam a doença, *P. falciparum* é responsável pela maioria dos casos graves e das mortes por malária (WHO, 2014). No entanto, apesar de contribuir em número muito menor, *P. vivax* e *P. knowlesi* também podem causar complicações clínicas graves e eventualmente acarretar em óbito (WHO, 2014).

A incidência anual global de malária grave pode ser estimada em cerca de 2 milhões de casos (WHO, 2014). Em algumas partes do mundo onde a transmissão de *P. falciparum* é intensa e estável, ela acomete principalmente crianças a partir dos primeiros meses de vida até cerca de 5 anos (WHO, 2014). Assim, torna-se menos comum em crianças e adultos mais velhos devido a aquisição de certo grau de imunidade específica (WHO, 2014). Acredita-se que cerca de 90% da malária grave e fatal do mundo afete crianças mais novas na África Subsaariana (Black et al., 2010). Em áreas de baixa endemicidade, acomete adultos e

crianças, sendo viajantes e trabalhadores não imunes bastante vulneráveis a infecção grave (WHO, 2014).

As principais síndromes graves observadas são a malária cerebral, síndrome da angústia respiratória grave e anemia grave (Marsh et al., 1995). Essas síndromes podem ocorrer sozinhas ou combinadas e as taxas de mortalidade diferem entre elas (Marsh et al., 1995; Oduro et al., 2007; Ranque et al., 2008). A malária na gravidez (MiP), também é um forma grave importante, afetando 125 milhões de mulheres todos os anos e levando 200 mil crianças a morte (Dellicour et al., 2010; Snow et al., 2005).

A patogênese da malária grave é bastante debatida, uma vez que alguns pesquisadores sugerem que o sequestro/citoadesão é o principal mecanismo patogênico (White et al., 2013), enquanto outros, acreditam que os processos inflamatórios são mais relevantes (Clark & Allea, 2009). No entanto, evidências indicam que a disfunção do endotélio vascular é também importante (Kim et al., 2011) e poderia agir como interface entre o sequestro e a inflamação (Grau & Craig, 2012). De fato, alguns autores acreditam que todos os três mecanismos são relevantes e estão intrinsicamente ligados, mas a importância de cada um deles pode variar entre as síndromes graves da malária (Cunnington et al., 2013a).

A citoaderência refere-se a um grupo de mecanismos no qual os eritrócitos infectados por formas maduras de *P. falciparum* se ligam a receptores expressos na superfície de diferentes células do hospedeiro, como células endoteliais, eritrócitos não infectados e plaquetas. Dentre esses mecanismos destacam-se: o sequestro parasitário, que corresponde à retirada das formas maduras do parasito da circulação periférica para a microvasculatura, onde ficam retidos, podendo aderir às células endoteliais; a formação de rosetas, que é a adesão de eritrócitos infectados (EIs) a outros não infectados; e a autoaglutinação, que

corresponde à adesão entre eritrócitos infectados, podendo esta ser mediada por plaquetas (Handunnetti et al., 1992; Ho & White, 1999; Rowe et al., 2009).

P. falciparum é o mais virulento dentre as espécies de *Plasmodium* que causam malária em humanos. Acredita-se, que grande parte desta virulência seja resultado da capacidade do parasita de alterar os eritrócitos infectados por *P. falciparum* (Pf-EIs) através de modificações no citoesqueleto e na superfície da membrana do eritrócito (Miller et al., 2002; Scherf et al., 2008). Dessa maneira, formas assexuadas (trofozoítos maduros e esquizontes) do parasito e gametócitos em seus primeiros estágios podem citoaderir. Como resultado, essas formas são raramente observadas em esfregaços sanguíneos, havendo então predomínio de formas jovens do parasito (revisado por (Miller et al., 2002). No entanto, em amostras *post-mortem* de pacientes com malária grave, o sequestro de formas assexuais jovens (anéis) foram observadas (Haldar et al., 2007).

Apesar de a citoaderência ser uma característica típica de *P. falciparum*, já foi demonstrado que *P. vivax* tem a capacidade de aderir *ex vivo* a células endoteliais e a criocortes de placenta (Carvalho et al., 2010; Chotivanich et al., 2012; De las Salas et al., 2013). No entanto, a contribuição da citoaderência para a fisiopatologia da malária vivax ainda não está bem estabelecida. Desse modo, uma importante diferença entre o *P. falciparum* e as outras malárias humanas é a maneira como esse parasito modifica a membrana do eritrócito infectado (Miller et al., 2002). Assim, a superfície dos eritrócitos infectados por trofozoítos maduros e esquizontes de *P. falciparum* são cobertos por protruções elétrondensas, *knobs*, que são as regiões de contato com as células do hospedeiro (Newbold et al., 1999). Esse *knobs* são formados por muitas proteínas codificadas pelo parasita, dentre elas a

PfEMP-1 (do Inglês, *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1*) (Craig & Scherf, 2001).

A PfEMP1, proteína altamente polimórfica, é codificada pelos membros da família de genes *var*, do qual existem cerca de 60 por genoma do parasito (Smith et al., 2013). O parasito pode alternar entre as diferentes variantes que são exportadas para a superfície dos Pf-EIs (Kraemer & Smith, 2006). Dessa maneira, a variação na expressão dos genes *var* resulta num elevado grau de plasticidade das propriedades antigênicas e adesivas do parasita, permitindo assim a evasão do sistema imune e a alteração de suas capacidades citoadesivas (Kyes et al., 2007; Rowe et al., 2009).

As proteínas PfEMP1 possuem um ectodomínio polimórfico, ligado através de uma única hélice transmembrana a uma região citoplasmática relativamente conservada (Baruch et al., 1995; Smith et al., 1995; Su et al., 1995). A cauda citoplasmática ancora essas proteínas aos *knobs* na superfície do eritrócito (Maier et al., 2009). O ectodomínio da PfEMP1 é formado por uma combinação dos domínios de adesão DBL (do Inglês, Duffy binding-like) e CIDR (do Inglês, cysteine-rich interdomain region) (Smith et al., 2000), que são encontrados apenas em *Plasmodium*. A super-família DBL abrange duas importantes propriedades adesivas do *P. falciparum*, tendo um papel chave na invasão de eritrócitos (DBL- erythrocyte binding proteins, DBL-EBPs) e nas interações citoadesivas dos eritrócitos infectados (DBL-PfEMP1) (Miller et al., 2002).

Nesse sentido, a PfEMP1 desempenha um papel central na capacidade do parasito de sequestrar na microvasculatura do indivíduo infectado e de formar rosetas entre eritrócitos infectados e não infectados (David et al., 1983; Normark et al., 2007; Roberts et al., 2000). Nesse sentido, a PfEMP1 pode ligar-se a uma variedade de receptores da célula hospedeira,

incluindo: ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*) (Berendt et al., 1989), que parece ser o receptor mais importante no cérebro; CSA (*Chondroitin Sulfate A*) (Robert et al., 1995; Rogerson et al., 1995); na placenta; e CD36 (*Cluster of Differentiation 36*) (Ockenhouse et al., 1989); na maioria dos outros órgãos. Descobertas recentes têm relacionado o receptor EPCR (*Endothelial Protein C Receptor*) à malária grave (Turner et al., 2013).

Acredita-se que a citoaderência/sequestro contribua para a manutenção do parasita, uma vez que o ambiente venoso microaerofílico é mais adequado para a sua maturação e a adesão ao endotélio permite aos eritrócitos infectados (Pf-EIs) escaparem da eliminação pelo baço, em virtude da perda de deformabilidade destes eritrócitos (Cranston et al., 1984; Looareesuwan et al., 1987). Além disso, o sequestro pode evitar a indução de uma resposta imune (David et al., 1983).

De fato, há indícios de que os processos de adesão são fundamentais para a patogênese da malária falciparum (WHO, 2014). Assim, a adesão de eritrócitos infectados na forma madura às células endoteliais leva ao sequestro de Pf-EIs na microvasculatura de vários órgãos e tecidos, tais como coração, pulmão, cérebro, músculo, tecido adiposo e placenta. Esse sequestro pode interferir no fluxo da microcirculação, com obstrução do fluxo sanguíneo e redução do aporte e oxigênio nos órgãos, além de interferir no metabolismo, que passa a ser anaeróbico com produção de ácido lático e finalmente com uma queda no pH do sangue (acidose), e no funcionamento do endotélio vascular (Haldar et al., 2007; Hanson et al., 2012; MacPherson et al., 1985; Pongponratn et al., 2003) . É importante destacar que além da adesão às células endoteliais, a formação de rosetas também parece contribuir para obstrução da microvasculatura (Kaul et al., 1991), sendo portanto associada com todas as síndromes

graves da malária (Doumbo et al., 2009), incluindo MC (Carlson et al., 1990; Doumbo et al., 2009; Handunnetti et al., 1989; Udomsangpetch et al., 1989).

Além da citoadesão/sequestro explicitado acima, uma outra popular hipótese para explicar a patogênese da MG, se baseia numa resposta inflamatória exacerbada ou desregulada (Reed, 1929), com elevada concentração de mediadores inflamatórios, quando comparada com a malária não complicada (Awandare et al., 2006; Kurtzhals et al., 1998; Thuma et al., 2011). Citocinas e outros mediadores inflamatórios liberados a partir de leucócitos podem ter efeitos diretos sobre os órgãos-alvo (Clark & Alleva, 2009; Tisoncik et al., 2012), efeitos combinatórios com outras moléculas sensibilizantes, como o heme livre (Seixas et al., 2009), ou efeitos indiretos mediados por meio da ativação do endotélio vascular (Coltel et al., 2004; Kim et al., 2011; Moxon et al., 2013), disfunção mitocondrial, ou distúrbio metabólico (Fullerton & Singer, 2011; Planche & Krishna, 2005). Infelizmente, o completo entendimento da contribuição na malária grave de fenômenos imunopatológicos é fator de debate, tal qual a relação com o sequestro parasitário (Cunnington et al., 2013a).

Cada vez mais acredita-se que a ativação do endotélio vascular tenha um papel importante na patogênese da malária grave (Cunnington et al., 2013a). O endotélio vascular pode ser ativado por citocinas inflamatórias e materiais liberados por eritrócitos infectados, como hemoglobina, glicosilfosfatidilinositol e histonas (Gillrie et al., 2012; Miller et al., 2013; Tripathi et al., 2009), e pela adesão de eritrócitos infectados (Moxon et al., 2013). Essa ativação, pode causar anormalidades na perfusão, coagulação, na permeabilidade vascular e na amplificação da resposta inflamatória (Cunnington et al., 2013b; Pate et al., 2010), todos aspectos que foram descritos em maior ou menor grau na malária grave (Kim et al., 2011).

Assim, sequestro, inflamação, e ativação endotelial estão provavelmente fortemente ligados. Ambos, inflamação e adesão de eritrócitos infectados, podem causar a ativação do endotélio vascular, enquanto que a ativação do endotélio vascular pode aumentar a ligação de eritrócitos infectados a receptores, tal como ICAM-1 (Grau & Craig, 2012), tornando-se quase impossível determinar o fator desencadeador das manifestações da malária grave (Cunnington et al., 2013a).

Entre as síndromes graves da malária, a malária cerebral (MC) é uma das complicações de maior impacto no número de óbitos nas infecções por *P. falciparum* (Murray et al., 2012). A MC é definida como uma síndrome neurológica caracterizada por coma, na presença de formas assexuadas de *P. falciparum* e sem nenhuma outra causa de encefalopatia (WHO, 2000).

As manifestações clínicas da MC variam de acordo com sinais de comprometimento cerebral, variando de confusão ao coma profundo; muitas vezes associado a um histórico de febre, dor de cabeça, convulsões, irritabilidade e comportamento anormal (Higgins et al., 2011). Até o momento, não há consenso sobre a patogênese dessa síndrome. De fato, este tema tem sido um dos mais dogmáticos e discutidos na pesquisa em malária. Dessa maneira, como mostrado acima, existem várias hipóteses que tentam explicar a patogênese da malária grave, e em especial, da malária cerebral.

O sequestro de Pf-EIs na microvasculatura cerebral tem sido uma característica consistente em estudos patológicos na MC desde os estudos de Marchiafava (Marchiafava & Bignami, 1894) há mais de um século atrás. No entanto, os mecanismos pelos quais o sequestro leva a complicações neurológicas e a morte ainda não estão claramente definidos. Tem sido postulado, que o sequestro de Pf-EIs provoca oclusão de capilares cerebrais,

redução do fluxo microvascular, diminuição do fornecimento de nutrientes para o cérebro, e lesão na parede do vaso, levando a hemorragias e alterações neuronais (Berendt et al., 1994). Além disso, a adesão de Pf-EIs ao receptor endotelial ICAM-1, tem sido associado ao sequestro na microvasculatura cerebral e a MC (Ochola et al., 2011; Silamut et al., 1999). No entanto, é provável que o sequestro de Pf-EIs não seja exclusivamente responsável pela MC, podendo vias patológicas diferentes ou alternativas contribuírem para patogênese da doença.

Sendo assim, estudos têm demonstrado uma associação entre MG e a intensa proliferação de células do sistema imunológico (macrófagos, neutrófilos e células T efectoras), contribuindo para o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-1b (Day et al., 1999; Kwiatkowski et al., 1990; Lyke et al., 2004; Malaguarnera & Musumeci, 2002). A estimulação de células endoteliais por meio de citocinas pró-inflamatórias e/ou a interação direta com componentes dos parasitas podem mediar eventos patológicos que causam a MC, incluindo o aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio cerebral e perda da integridade das células endoteliais (Armah et al., 2005; Higgins et al., 2011).

Assim, as teorias que tentam explicar a patogênese da MC não são mutuamente exclusivas. Nesse sentido, existe um acúmulo de provas que sugerem que a combinação do sequestro de eritrócitos infectados na microvasculatura cerebral, resposta imune exacerbada e ativação endotelial contribuem para as características patológicas dessa síndrome. Isso abrange a disfunção da integridade da barreira hemato-encefálica, oclusão vascular, distúrbio metabólico e perturbação no parênquima cerebral, incluindo edema, hemorragia, e dano neuronal (revisado por (Higgins et al., 2011)).

Uma outra forma grave da malária muito importante é a malária associada a gravidez. Entre os adultos expostos à malária, as mulheres grávidas correm maior risco de contrair a doença do que as mulheres não-grávidas. Este aumento da susceptibilidade pode ser explicado pelas alterações imunológicas induzidas pela gravidez, por fatores hormonais (Rogerson et al., 2007), e pela maior atratividade de mulheres grávidas para mosquitos (Ansell et al., 2002; Lindsay et al., 2000). Além disso, as mulheres são mais susceptíveis a MiP na primeira gravidez devido a ausência de imunidade protetora que é adquirida nas gestações subsequentes (Brabin, 1983; Rogerson et al., 2007; Staalsoe et al., 2004).

De acordo com a OMS, a malária na gravidez (MiP) é definida como a presença de parasitemia na placenta ou no sangue periférico (World Health Organization., 2008), e apresenta-se como um importante problema de saúde pública devido aos significativos efeitos adversos para a saúde, tanto da mãe quanto do feto (Moya-Alvarez et al., 2014).

O sequestro de Pf-EIs na placenta é um aspecto central na patogênese da MiP, e pode estar associado a uma intensa atividade inflamatória. Na infecção ativa da placenta, o sequestro parasitário é observado no espaço interviloso, sendo mediado pela ligação ao glicosaminoglicano condroitim sulfato A (CSA), que é expresso pelo sinciciotrofoblasto placentário (Fried & Duffy, 1996). A adesão de Pf-EIs ao CSA é mediada pela proteína PfEMP-1 específica, VAR2CSA (Khunrae et al., 2010; Salanti et al., 2003). Essa proteína é reconhecida por anticorpos que podem ter ação protetora quando ocorrer uma infecção malárica numa gravidez subsequente (Fried et al., 1998).

Outras descobertas associadas com a MiP incluem o aumento do número de fagócitos no espaço interviloso, com predomínio de monócitos, linfócitos e alguns neutrófilos (Walter et al., 1982; WHO, 2014). Além disso, é possível observar a elevada expressão de citocinas

pró-inflamatórias e quimiocinas (Ordi et al., 1998; Rogerson et al., 2003), a deposição de hemozoína, um subproduto da digestão da hemoglobina pelo parasita, em leucócitos fagocíticos e dentro de depósitos de fibrina no espaço intervilo (Rogerson et al., 2007).

Assim, efeitos adversos causados pelo sequestro parasitário na placenta, e pela inflamação estão associados as diversas complicações observadas na MiP, como baixo peso do feto ao nascer, parto prematuro, bem como anemia materna, levando a taxas substanciais de morbidade e mortalidade (Desai et al., 2007).

Quanto às infecções por *P. vivax* durante a gravidez, a mortalidade é raramente vista, mas há associação com várias recaídas, anemia, aborto, e uma redução no peso do feto ao nascer (Anstey et al., 2009; McGready et al., 2012; Nosten et al., 1999; Rijken et al., 2012). Além disso, a adesão de *P. vivax* na placenta (Carvalho et al., 2010; Chotivanich et al., 2012), incluindo potenciais efeitos deletérios no tecido placentário têm sido descritos (Souza et al., 2013).

Terapias Adjuvantes

Atualmente, o uso de artesunato intravenoso tem sido o tratamento de primeira escolha nos casos graves de malária em crianças e adultos, seguindo dois importantes estudos clínicos, SEAQUAMAT e AQUAMAT (Dondorp et al., 2005; Dondorp et al., 2010). Estes, demonstraram a superioridade do tratamento com artesunato em relação a quinina em pacientes com malária grave na Ásia e na África (Dondorp et al., 2005; Dondorp et al., 2010). No entanto, apesar da eficácia do artesunato intravenoso, a mortalidade causada pela malária grave em geral, e pela MC em particular, permanece elevada, sendo de 18% para as crianças

africanas e de 30% para os adultos do sudeste Asiático, mesmo com assistência e tratamento adequado aos pacientes (Dondorp et al., 2005; Dondorp et al., 2010). Além disso, 11% das crianças que sobrevivem a MC apresentam déficits neurológicos graves e até 25% podem manter déficits cognitivos a longo prazo (Boivin, 2002; Boivin et al., 2007; Brewster et al., 1990; Carter et al., 2005; John et al., 2008). Assim, essas observações sugerem que estratégias que focam apenas na eliminação do parasita podem ser insuficientes para prevenir complicações neurológicas e a morte nos casos de malária grave.

Nesse sentido, terapias adjuvantes, definidas como terapias administradas em combinação com drogas antiparasitárias, que modificam processos patofisiológicos causados pela malária, têm sido almejadas com o objetivo de amenizar as complicações causadas pela malária grave (Serghides, 2012). Uma vez que as drogas antimaláricas frequentemente demoram 12-18 h para matar os parasitas, terapias adjuvantes administradas nesse período poderiam reduzir o risco de mortalidade e de sequelas neurocognitivas, particularmente em pacientes com MC (Mishra & Newton, 2009). É possível, que terapias dessa natureza, estendam o tempo de vida do paciente permitindo que haja mais tempo para ação das drogas antiparasitárias (Miller et al., 2013).

Diferentes terapias adjuvantes que visam modular processos fisiopatológicos que ocorrem em resposta à infecção malárica foram ou vêm sendo testados (**Tabela 1**). Dentre eles, estão tratamentos que visam: a modulação da resposta imune à infecção (dexametasona, anti-TNF- α , pentoxifilina, curdlam sulfato); redução da carga de ferro (desferrioxamina); redução do estresse oxidativo (N-acetilcisteína); ação anticoagulante (heparina, aspirina); redução da parasitemia (transfusão sanguínea), redução da acidose (albumina); diminuição da pressão intracraniana e do edema cerebral (manitol); aumento do nível de NO (arginina, NO

inalável); neuroproteção (eritropoietina), dentre outros (revisado por (Higgins et al., 2011; John et al., 2010; Mishra & Newton, 2009)).

Uma vez que a adesão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (Pf-EIs) à células humanas apresenta um papel chave na patogênese da MG (White et al., 2013), o uso de terapias antiadesivas tem sido estudadas. Como exemplo, citamos o levamisole (Dondorp et al., 2007; Maude et al., 2014) e diversos glicosaminoglicanos sulfatados (Kyriacou et al., 2007; Rogerson et al., 1994; Vogt et al., 2006; Xiao et al., 1996). Assim, acredita-se que tratamentos que visam a inibição ou reversão da citoaderência parasitária, poderiam além da melhora clínica, prevenir o agravamento da doença, minimizando as complicações causadas pelo *P. falciparum* (Land et al., 1995).

Contudo, até o momento, nenhum dos tratamentos adjuvantes demonstrou evidência inequívoca de melhoras dos pacientes nos testes clínicos e conseqüentemente, nenhum deles pôde ser recomendado como estratégia de tratamento até o momento (John et al., 2010; Mishra & Newton, 2009).

Tabela 1. Terapias adjuvantes para malária grave avaliadas em ensaios clínicos.
Revisado por John et al., 2010, Higgins et al., 2011 and Mirsha et al., 2009

Objetivo	Terapias
Modulação da resposta imune	<ul style="list-style-type: none"> • Dexametasona • Anti-TNF-α • Pentoxifilina • Curdlam sulfato
Redução da carga de ferro	<ul style="list-style-type: none"> • Desferrioxamina • Deferiprona
Redução do estresse oxidativo	<ul style="list-style-type: none"> • N-acetilcisteína
Ação anticoagulante	<ul style="list-style-type: none"> • Heparina • Aspirina
Redução da parasitemia	<ul style="list-style-type: none"> • Transfusão sanguínea
Redução da acidose	<ul style="list-style-type: none"> • Albumina
Diminuição da pressão intracraniana e do edema cerebral	<ul style="list-style-type: none"> • Manitol
Aumento do nível de NO	<ul style="list-style-type: none"> • L-arginina, • NO inalável
Neuroproteção	<ul style="list-style-type: none"> • Eritropoietina
Ação antiadesiva	<ul style="list-style-type: none"> • Levamisole • Derivado da heparina de baixa ação anticoagulante

Polissacarídeos Sulfatados

Polissacarídeos sulfatados constituem um grupo complexo de macromoléculas, conhecidas por possuírem uma vasta gama de propriedades biológicas. Esses polímeros aniônicos participam de importantes processos patológicos e fisiológicos e estão difundidos

pela natureza, ocorrendo em uma grande variedade de organismos, como algas e invertebrados marinhos, até mamíferos (Biermann et al., 2004; Caterson et al., 1990).

Na malária, polissacarídeos sulfatados vem demonstrando ter papel importante em diversos estágios do ciclo de vida do parasita. Assim, existem vários exemplos do envolvimento desses compostos sulfatados como receptores/ligantes de *P. falciparum*. Isso é particularmente evidente na malária na gravidez, uma vez que tem sido demonstrado que a ligação da PfEMP-1 ao glicosaminoglicano condroitim sulfato A (CSA) medeia o sequestro de Pf-EIs à placenta humana (Beeson et al., 2007; Fried & Duffy, 1996; Madhunapantula et al., 2007; Robert et al., 1995; Rogerson et al., 1995). Desse modo, o CSA aparenta ser o principal receptor envolvido no sequestro parasitário nesse órgão (Fried et al., 2006; Fried & Duffy, 1996), apesar de alguns estudos também sugerirem a participação do ácido hialurônico (HA) (Beeson & Brown, 2004; Beeson et al., 2000; Chai et al., 2001)

Também podemos destacar, que a ligação de Pf-EIs a células do hospedeiro mediada pelas PfEMP-1 pode resultar na formação de rosetas e na interação com o endotélio vascular através da ligação com o heparan sulfato (HS) e com moléculas similares (*HS-like*) (Adams et al., 2014; Chen et al., 1998; Vogt et al., 2003; Vogt et al., 2004). Heparina e HS também são alvos da proteína circunsporozoíta (CSP) na interação dos esporozoítos com os hepatócitos durante a fase hepática da malária (Ancsin & Kisilevsky, 2004; Frevert et al., 1993; Pancake et al., 1992; Pinzon-Ortiz et al., 2001; Rathore et al., 2001). No mais, a heparina parece se ligar a várias proteínas do merozoíto (Kobayashi et al., 2013; Zhang et al., 2013), incluindo proteínas de invasão, como a MSP-1 (*merozoite surface protein-1*) (Boyle et al., 2010) e a EBA-140 (*erythrocyte binding antigen 140*) (Kobayashi et al., 2010). Assim,

heparina e moléculas similares parecem ter um potencial papel na invasão de merozoítos de *P. falciparum* (Boyle et al., 2010).

Sendo assim, diversos estudos tem mostrado que polissacarídeos sulfatados tem ação na inibição da citoadesão parasitária, invasão de merozoítos e esporozoítos e no rompimento de rosetas (Clark et al., 1997; Kulane et al., 1992; Xiao et al., 1996) (**Tabela 2**). Desse modo, compostos sulfatados como, heparina (Kulane et al., 1992), dextram sulfato, fucoidam (Chen et al., 2009), pentosam polissulfato (Clark et al., 1997; Xiao et al., 1996), curdlam sulfato (Havlik et al., 1994), gelam sulfato (Recuenco et al., 2014) têm demonstrado inibir a invasão de merozoítos *in vitro*. Além disso, alguns estudos *in vivo*, demonstraram que o fucoidam e o dextram sulfato foram capazes de inibir significativamente a parasitemia de animais infectados com *Plasmodium berghei* (Chen et al., 2009; Xiao et al., 1996).

Alguns estudos tem mostrado que rosetas podem ser rompidas por diversos glicoconjugados sulfatados como, heparina (Carlson et al., 1992), heparam sulfato, dextram sulfato, fucoidam, pentosam polissulfato (Rogerson et al., 1994), curdlam sulfato (Evans et al., 1998; Havlik et al., 2005). Muitos desses compostos também são capazes de inibir a ligação da CSP com células hepáticas (Ancsin & Kisilevsky, 2004; Frevert et al., 1993; Pancake et al., 1992) e a citoadesão de Pf-EIs a vários receptores do hospedeiro (Xiao et al., 1996). Dentre eles podemos citar o fucoidan, dextram sulfato e a heparina (Andrews et al., 2005; Bastos et al., 2014; Xiao et al., 1996). Além disso, o CSA solúvel é capaz de inibir e reverter especificamente a adesão de eritrócitos infectados que aderem ao CSA, *in vitro* e *in vivo*, em modelo de infecção em macacos (Pouvellet et al., 1997).

Dessa maneira, com base no exposto, o uso de polissacarídeos sulfatados como terapias adjuvantes na malária vem sendo proposto. No entanto, o uso de muitos desses

compostos tem sido evitado, uma vez que podem apresentar fortes efeitos anticoagulantes e/ou alta toxicidade (Kyriacou et al., 2007; Rowe et al., 1994; Vogt et al., 2006).

Importante, a heparina foi o único glicoconjugado sulfatado usado clinicamente na malária humana (Munir et al., 1980; Rampengan, 1991), no entanto seu uso foi descontinuado devido a ocorrência de hemorragias e morte de algumas crianças tratadas (WHO, 1986). Nesse sentido, estudo com derivado da heparina com baixa ação anticoagulante tem mostrado que o composto é capaz de bloquear a invasão de merozoítos, romper rosetas, inibir a adesão endotelial *in vitro*, e reverter o sequestro parasitário em modelos *in vivo* de malária grave (Vogt et al., 2006). Estudos clínicos com o derivado da heparina para uso como terapia adjuvante na malária estão em andamento (Patente N° WO2013095276A1).

Polissacarídeos sulfatados de fontes marinhas estão atualmente sendo explorados devido as suas potenciais aplicações terapêuticas. Assim, novos polissacarídeos estão sendo vistos como alternativa para drogas já utilizadas como a heparina (Mourao et al., 1998).

Tabela 2. Polissacarídeos sulfatados com potencial para atuar como terapias adjuvantes na malária grave

Polissacarídeos Sulfatado	Ação	Observações	Referências
Heparina	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da citoadesão • Rompimento de rosetas • Inibição da invasão de merozoítos 	Ação anticoagulante. Pode causar hemorragias.	(Barragan et al., 1999; Carlson et al., 1992; Clark et al., 1997; Kulane et al., 1992; Rogerson et al., 1994; Rowe et al., 1994; Xiao et al., 1996)
Derivado da heparina de baixa ação anticoagulante	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da citoadesão • Rompimento de rosetas • Inibição da invasão de merozoítos 	Testes clínicos em andamento. Até o momento demonstrou ser seguro e bem tolerado.	(Leitgeb et al., 2011; Vogt et al., 2006)
Curdlam sulfato	<ul style="list-style-type: none"> • Rompimento de rosetas • Inibição da invasão de merozoítos 	Não demonstrou diferença na mortalidade em dois estudos clínicos.	(Evans et al., 1998; Havlik et al., 2005; Kyriacou et al., 2007)
Dextram sulfato	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da citoadesão • Rompimento de rosetas • Inibição da invasão de merozoítos 	Não foi testado em humanos.	(Barragan et al., 1999; Clark et al., 1997; Rogerson et al., 1994; Rowe et al., 1994; Xiao et al., 1996)
Pentosam polissulfato	<ul style="list-style-type: none"> • Rompimento de rosetas • Inibição da invasão de merozoítos 	Não foi testado em humanos.	(Clark et al., 1997; Rogerson et al., 1994)
Fucoidam	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da citoadesão • Rompimento de rosetas • Inibição da invasão de merozoítos 	Não foi testado em humanos.	(Barragan et al., 1999; Chen et al., 2009; Clark et al., 1997; Rogerson et al., 1994; Rowe et al., 1994; Xiao et al., 1996)
Gelam sulfato	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da invasão de merozoítos 	Não foi testado em humanos.	(Recuenco et al., 2014)
CSA	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da citoadesão 	Reverteu a citoadesão em macacos, mas não foi testado em humanos.	(Pouvelle et al., 1998; Pouvelle et al., 1997)

Condroitim Sulfato Fucosilado (FucCS) e Heparin Sulfato de Molusco (HSM)

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

estudos é comparar estes polissacarídeos com os glicosaminoglicanos bem conhecidos que ocorrem em tecidos de vertebrados e relacionar sua estrutura com propriedades físico-químicas e biológicas. Estudos estruturais desses polissacarídeos revelaram diferenças interessantes entre eles e glicosaminoglicanos bem conhecidos de tecidos conectivos de vertebrados (Vieira & Mourao, 1988). A maioria desses compostos de invertebrados são componentes da matriz extracelular (Albano & Mourao, 1986; Santos et al., 1992; Vieira & Mourao, 1988; Vieira et al., 1991; WHO, 1986) ou estão envolvidos na interação entre gametas (Alves et al., 1997; Pavao et al., 1998; Pereira et al., 1999).

Um desses polissacarídeos, o condroitim sulfato fucosilado (FucCS), é um composto característico do equinodermo pepino-do-mar (Yamada et al., 2011). Esse glicosaminoglicano tem demonstrado apresentar várias atividades biológicas como ação antitrombótica, anticoagulante, antitumoral, anti-inflamatória, profilática à aterosclerose, hipolipidêmica, atenuação da fibrose renal, angiogênica, entre outras (Borsig et al., 2007; Hu et al., 2013; Liu et al., 2002; Melo-Filho et al., 2010; Song et al., 2013; Zhang et al., 2009).

Em estudo de Vieira & Mourão (1988) (Vieira & Mourao, 1988) polissacarídeos sulfatados foram isolados da parede do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea*, entre eles, o condroitim sulfato fucosilado (FucCS). Esse glicosaminoglicano altamente sulfatado é componente da matriz extracelular e apresenta analogia fisiológica com proteoglicanos de tecidos conjuntivos de vertebrados (Albano & Mourao, 1986; Vieira et al., 1993). Além disso, possui analogia em estrutura com glicosaminoglicanos de mamíferos e fucanas sulfatadas de alga marrom (Mourao et al., 2001).

O FucCS apresenta uma base estrutural formada por unidades dissacarídicas repetitivas alternando entre o ácido β -D-glucurônico e a N-acetil- β -D-galactosamina, a

mesma estrutura do condroitim sulfato de mamíferos. No entanto, alguns dos resíduos do ácido β -D-glucurônico apresentam na posição 3, cadeias de fucose sulfatadas ou são 3-O-sulfatados (Mourao et al., 1996; Vieira & Mourao, 1988) (**Figura 4**). As cadeias de fucose sulfatadas podem ser removidas por hidrólise ácida dando origem a uma cadeia de condroitim sulfato linear. Algumas unidades de fucose sulfatadas (~25% do total) permanecem após a hidrólise ácida, mas são principalmente resíduos não sulfatados (Mourao et al., 1996).

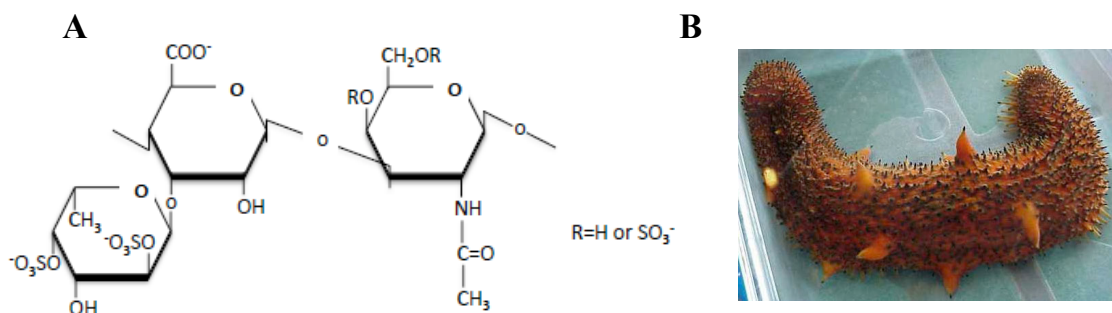


Figura 4: Estrutura molecular do condroitim sulfato fucosilado (FucCS) (A) e foto do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea* (B). FucCS contém uma base estrutural de condroitim sulfato de mamífero: [4- β -D-GalA-1 \rightarrow 3- β -D-GalNAc]_n, e cadeias de 2-4-dissulfato α -fucopirranose.

Diversas atividades biológicas já foram atribuídas ao glicosaminoglicano isolado de *Ludwigothurea grisea* em específico, dentre elas estão atividades anticoagulantes, antitrombóticas, anti-inflamatórias e antimetastáticas (Borsig et al., 2007; Mourao et al., 1998; Mourao et al., 1996).

Nesse sentido, estudos tem mostrado que o FucCS apresenta uma alta atividade anticoagulante (Glaser et al., 2008; Mourao et al., 1996) devido a sua habilidade em potencializar a inibição da trombina e do fator Xa pela antitrombina ou pelo cofator II da heparina (Mourao et al., 1996). Esse glicosaminoglicano também demonstrou ser uma droga

antitrombótica efetiva em modelos experimentais de trombose arterial e venosa quando administrados por via intravenosa (Pacheco et al., 2000) ou por via oral (Fonseca & Mourao, 2006). A remoção das cadeias de fucose sulfatadas por hidrólise ácida reduz sua atividade anticoagulante e antitrombótica ao mesmo nível do condroitim sulfato de mamífero, assim como a dessulfatação do composto (Mourao et al., 1996). Isso demonstra a importância das cadeias de fucose sulfatadas para atividade anticoagulante e antitrombótica do glicosaminoglicano. Em contraste, essas atividades se mantêm após a carboxi-redução dos resíduos de ácido glucurônico (Mourao et al., 1996; Zancan & Mourao, 2004).

Além das ações descritas acima, Borsig e colaboradores (Borsig et al., 2007) mostraram que o FucCS possui ação anti-inflamatória e antimetastática, consequência do seu potente efeito inibitório das interações mediadas por P- e L-selectina. Para que essa atividade inibitória aconteça, há evidências de que é fundamental a presença das cadeias de fucose sulfatadas (Borsig et al., 2007), assim como para ocorrência da ação anticoagulante e antitrombótica (Mourao et al., 1996; Zancan & Mourao, 2004). Nesse estudo, o composto demonstrou ser capaz de inibir adesão de células tumorais com maior potência do que a heparina, sem exibir efeito hemorrágico significativo e em doses inferiores ao requerido para causar efeito anticoagulante (Borsig et al., 2007). Além disso, os resultados obtidos em dois modelos experimentais de inflamação (peritonite induzida por tioglicolato e inflamação pulmonar induzida por LPS) mostraram que o FucCS inibe o recrutamento de neutrófilos para tecidos inflamados. No entanto, apesar do composto ter sido capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos nestes modelos, ele não reduziu a produção de TNF- α . Isso indica, que o efeito anti-inflamatório desse composto parece envolver principalmente eventos mediados por selectinas (Borsig et al., 2007).

Assim, diante do exposto, é importante destacar que além das atividades citadas acima, o FucCS não necessita de fracionamento ou modificações químicas após sua purificação (Glauser et al., 2008), ocorre em altas concentrações no pepino-do-mar e pode ser isolado com rendimento relativamente elevado (cerca de 1% do peso seco) (Glauser et al., 2008). Além disso, apresenta efeito anticoagulante e antitrombótico menor que o da heparina (Mourao et al., 1996; Vieira & Mourao, 1988) e atua, *in vitro* e *in vitro*, em concentrações menores que as exigidas para ativar seu efeito anticoagulante (Borsig et al., 2007). Esse composto pode também ser administrado oralmente, o que é uma outra vantagem em comparação com outros polissacarídeos sulfatados (Fonseca & Mourao, 2006). Importante, não foram observados efeitos tóxicos ou cumulativos nos tecidos após administração de FucCS em ratos numa dose diária de 50 mg/Kg durante 30 dias (M.S.G Pavão e E.O. Kozlowski, dados não publicados).

Nesse trabalho, também utilizamos um outro polissacarídeo sulfatado, um novo heparam sulfato (HS), extraído do molusco bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Gomes et al., 2010). A composição desse análogo de heparina foi proposta recentemente através de análises de ressonância magnética. Estas permitiram propor que o HS do molusco é composto por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido glucurônico 2- ou 3-sulfatado e N-acetil glucosamina N-acetilada, N-sulfatada ou N,6 di-sulfatada, nas proporções mostradas na **Figura 5** (Gomes et al., 2014; Gomes et al., 2010).

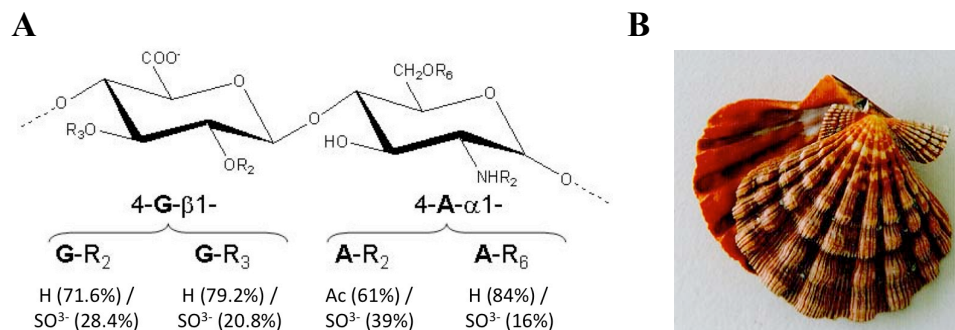


Figura 5: Estrutura proposta para a principal unidade dissacarídica do heparam sulfato do molusco (A) e foto do molusco bivalve *Nodipecten nodosus* (B). Os resíduos marcados com G e A são glucoronato e D-glucosamina, respectivamente. R_n representam os radicais, onde seus respectivos grupos químicos são listados abaixo, e onde os respectivos números subscritos correspondem a posição no anel do açúcar. **Fonte:** Gomes et al, 2010.

O HS de *Nodipecten nodosus* tem sido estudado principalmente pela sua ação anticoagulante. Esse composto apresenta atividade anticoagulante e antitrombótica menor que a da heparina de porco, porém significativa tanto no modelo de trombose venosa, quanto arterial, sem provocar hemorragias (Gomes et al., 2010). Além disso, apresenta efeito anti-inflamatório, pois inibe eficientemente a ação de selectinas, responsáveis pela fase inicial do recrutamento das células imunológicas (Gomes et al., 2014; Werneck et al., 2011). O composto também é capaz de inibir a ligação de células cancerígenas à P-selectina, apresentando efeito terapêutico na metástase tumoral (Gomes et al., 2014; Werneck et al., 2011). Essas ações observadas ocorrem em doses que não induzem efeitos colaterais como sangramento, geração de bradicinina e efeitos citotóxicos sobre fibroblastos de mamíferos (Gomes et al., 2014; Gomes et al., 2010; Werneck et al., 2011).

É importante destacar que a espécie *Nodipecten nodosus* pertence a família Pectinidae, a qual possui grande importância econômica em países como Canadá, Reino Unido, França, Espanha e Japão, onde são altamente valorizados por importantes indústrias da pesca e da aquicultura (Maeda-Martínez, 2002). Esse invertebrado é de fácil obtenção, manuseio, armazenamento e pode ser cultivado (Werneck et al., 2011). No Brasil, desde 1991, essa espécie tem sido cultivada com sucesso através da produção de larvas e pós-larvas em laboratório e cultivo em fazendas marinhas (Gomes et al., 2010). Nesse sentido, o análogo de heparina extraído desse molusco, está presente na matriz extracelular do manto e da brânquia (Gomes et al., 2010), estando restrito aos órgãos que são descartados para comercialização do invertebrado (Werneck et al., 2011). Dessa maneira, os aspectos destacados acima favorecem sua exploração comercial.

Assim, com base nas informações mostradas, tanto o FucCS quanto o HS de molusco apresentam potencial para uso terapêutico em doenças relacionadas com trombose, inflamação e câncer. Além disso, esses compostos podem ser uma potencial alternativa para heparina não só para uso como anticoagulante e antitrombótico, já que apresentam menos efeitos colaterais, mas também para redução de metástase e inflamação. Atualmente, as preparações comerciais de heparina são obtidas de mamíferos (intestino de porcos ou bovinos ou pulmão de bovinos) (Liu et al., 2009). No entanto, há agora um maior interesse em terapias preparadas de fontes não derivadas de mamíferos, evitando assim o risco de contaminação com agentes patogênicos (Mourao et al., 1998), como príons relacionados a encefalopatia espongiforme e vírus (Borsig et al., 2007). Sendo os compostos em questão extraídos de invertebrados, esse aspecto os torna ainda mais atrativos como potenciais agentes terapêuticos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Esse trabalho visa investigar os efeitos do FucCS e do HS de molusco na citoadesão de eritrócitos infectados por *P. falciparum*, bem como analisar a ação desses compostos no rompimento de rosetas e na invasão parasitária.

Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do FucCS e do HS de molusco;
- 2- Avaliar a capacidade do FucCS nativo e seus derivados, e do HS de molusco em inibir a adesão de parasitas *P. falciparum* a receptores endoteliais em condição estática;
- 3- Avaliar a capacidade do FucCS e do HS de molusco em dessequestrar parasitas *P. falciparum* de receptores endoteliais em condição de fluxo;
- 4- Avaliar a capacidade do FucCS em inibir a adesão parasitária à receptores endoteliais em condição de fluxo;
- 5- - Avaliar a capacidade do FucCS em inibir a adesão de *P. falciparum* à cortes histológicos de placenta humana;
- 6- Avaliar a capacidade do FucCS nativo e seus derivados, e do HS de molusco em inibir a invasão de *P. falciparum*;
- 7- Avaliar a capacidade do FucCS nativo e seus derivados, e do HS de molusco em romper rosetas de *P. falciparum*;

CAPÍTULO 1

“Fucosylated Chondroitin Sulfate Inhibits *Plasmodium falciparum* Cytoadhesion and Merozoite Invasion”

Marcele F. Bastos, Letusa Albrecht, Eliene O. Kozlowski, Stefanie C. P. Lopes, Yara C. Blanco, Bianca C. Carlos, Catarina Castiñeiras, Cristina P. Vicente, Claudio C. Werneck, Gerhard Wunderlich, Marcelo U. Ferreira, Claudio R. F. Marinho, Paulo A. S. Mourão, Mauro S. G. Pavão and Fabio T. M. Costa

Artigo publicado na revista *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2014, 58(4):1862-1871.

Fucosylated Chondroitin Sulfate Inhibits *Plasmodium falciparum* Cytoadhesion and Merozoite Invasion

Marcele F. Bastos,^a Letusa Albrecht,^a Eliene O. Kozłowski,^b Stefanie C. P. Lopes,^a Yara C. Blanco,^a Bianca C. Carlos,^c Catarina Castiñeiras,^a Cristina P. Vicente,^d Claudio C. Werneck,^e Gerhard Wunderlich,^c Marcelo U. Ferreira,^c Claudio R. F. Marinho,^c Paulo A. S. Mourão,^b Mauro S. G. Pavão,^b Fabio T. M. Costa^a

Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil^a; Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil^b; Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^c; Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil^d; Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil^e

Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes (Pf-iEs) in the microvasculature of vital organs plays a key role in the pathogenesis of life-threatening malaria complications, such as cerebral malaria and malaria in pregnancy. This phenomenon is marked by the cytoadhesion of Pf-iEs to host receptors on the surfaces of endothelial cells, on noninfected erythrocytes, and in the placental trophoblast; therefore, these sites are potential targets for antiadhesion therapies. In this context, glycosaminoglycans (GAGs), including heparin, have shown the ability to inhibit Pf-iE cytoadherence and growth. Nevertheless, the use of heparin was discontinued due to serious side effects, such as bleeding. Other GAG-based therapies were hampered due to the potential risk of contamination with prions and viruses, as some GAGs are isolated from mammals. In this context, we investigated the effects and mechanism of action of fucosylated chondroitin sulfate (FucCS), a unique and highly sulfated GAG isolated from the sea cucumber, with respect to *P. falciparum* cytoadhesion and development. FucCS was effective in inhibiting the cytoadherence of Pf-iEs to human lung endothelial cells and placenta cryosections under static and flow conditions. Removal of the sulfated fucose branches of the FucCS structure virtually abolished the inhibitory effects of FucCS. Importantly, FucCS rapidly disrupted rosettes at high levels, and it was also able to block parasite development by interfering with merozoite invasion. Collectively, these findings highlight the potential of FucCS as a candidate for adjunct therapy against severe malaria.

Malaria still accounts for nearly one million deaths annually (1), and it is often associated with severe complications, such as cerebral malaria (CM) and malaria in pregnancy (MiP). MiP affects 125 million women each year and results in 200,000 infant deaths (2, 3). Despite recent advances in malaria treatment, CM still has mortality rates of 15 to 20%, even after appropriate antimalarial treatment (4, 5), and pregnant women are also at risk for additional complications (e.g., CM) (6).

High levels of proinflammatory cytokines are commonly observed in patients with CM (7, 8) and MiP (9–11), and pathological studies have revealed sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes (Pf-iEs) in the brain microvasculature (12, 13) and in the placenta (14–16). Recently, sequestration of Pf-iEs in the brain microvasculature has been associated with severe CM and death (17). Additionally, poor outcomes for both mother and fetus in MiP are related to greater amounts of Pf-iEs sequestered in the placenta (18, 19).

Sequestration results in the removal of mature Pf-iE forms (>20 h after reinvasion) from the peripheral circulation, as a consequence of the adhesion of parasitized cells to the capillary and postcapillary endothelium and to placental trophoblasts (15, 16, 20, 21). Specific adhesion of Pf-iEs during the early ring stage has also been observed *in vitro* (22). Another major adhesion phenotype is rosetting, which results from the binding of noninfected erythrocytes (niEs) to Pf-iEs and has been associated with all severe malarial syndromes (23), including CM (23–28). In contrast, no significant correlation between rosetting and disease severity has been reported for isolates from Papua, New Guinea (29), indicating that geographic variations in parasite strains matter (29). Recently, a pivotal role for cytoadherence through the endothelial protein C receptor in the development of severe malaria was de-

scribed (30). Cytoadhesion of Pf-iEs is mediated by members of the *P. falciparum* membrane protein 1 (PfEMP-1) family, which mediates parasite interactions with various host receptors, including CD36 (31), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (32), and chondroitin sulfate A (CSA) (33, 34), a receptor frequently associated with MiP (15, 33, 35).

Glycosaminoglycans (GAGs), including heparin, have been employed as a strategy to prevent malaria complications due to their abilities to inhibit parasite cytoadhesion, to block invasion, and to disrupt rosettes (36–46). However, the side effects of heparin, mostly serious bleeding (47), and the potential risk of contamination (because some GAGs are obtained from mammals) have hampered GAG-based adjunct therapies. Recently, we have shown that fucosylated chondroitin sulfate (FucCS), a GAG isolated from the marine invertebrate sea cucumber, contains a central chondroitin sulfate backbone like mammalian GAGs; however, FucCS has sulfated fucose branches (48–50), displays anticoagulant activity (48), and prevents thrombosis (51). FucCS also reduces the recruitment of inflammatory cells, most likely by inhibiting cell adhesion to the host endothelium (52). Here, we

Received 8 April 2013 Returned for modification 17 May 2013

Accepted 11 December 2013

Published ahead of print 6 January 2014

Address correspondence to Fabio T. M. Costa, costaftm@unicamp.br.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00686-13>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00686-13

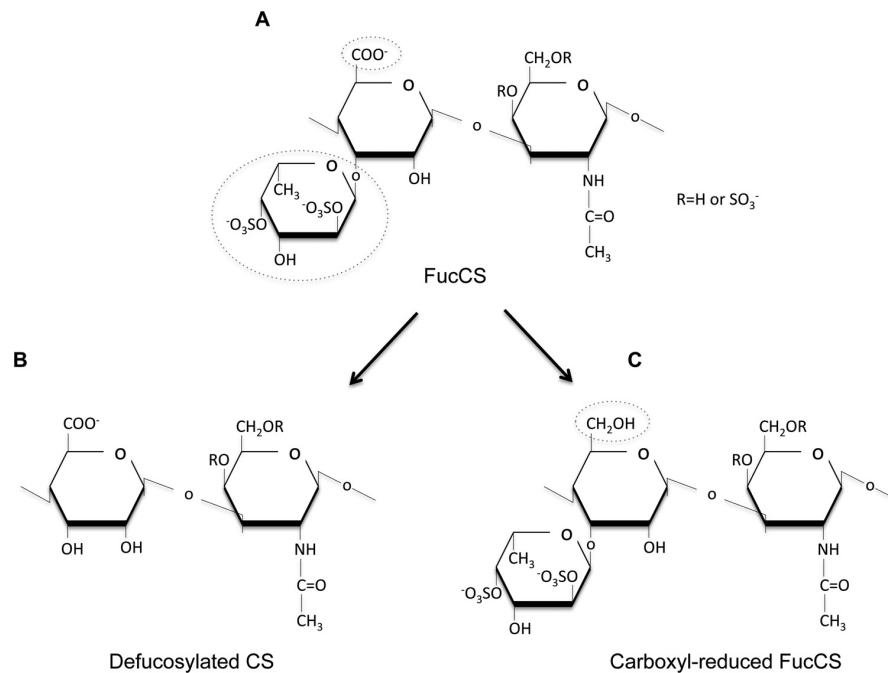


FIG 1 Chemical structures of fucosylated chondroitin sulfate and its modified forms. (A) Native FucCS. (B) Defucosylated chondroitin sulfate. (C) Carboxyl-reduced chondroitin sulfate. FucCS contains a central core with a chondroitin sulfate-like structure and branches of 2,4-disulfated fucose branches. These branches are easily removed by mild acid hydrolysis, yielding the defucosylated form. The glucuronic acid units found in the central core may be reduced and form glucose units in the carboxyl-reduced form of FucCS.

investigate the effects of FucCS on the adhesion of Pf-iEs to endothelial cells and placenta cryosections, as well as its abilities to disrupt rosettes and to block parasite invasion.

MATERIALS AND METHODS

Native and chemically modified FucCS. Native fucosylated chondroitin sulfate was extracted from the body wall of sea cucumbers (*Ludwigothurea grisea*), which were freshly collected from Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil). FucCS was extracted by papain digestion, and purification was performed as described previously (49, 50). The FucCS backbone is made up of repeating disaccharide units of alternating β -D-glucuronic acid and N-acetyl- β -D-galactosamine, which is the same structure as mammalian chondroitin sulfate (Fig. 1A). Partial removal of sulfated fucose branches from the fucosylated chondroitin sulfate, yielding defucosylated chondroitin sulfate (deFucCS) (Fig. 1B), was achieved by mild acid hydrolysis, as described elsewhere (48). Carboxyl-reduced chondroitin sulfate (CRFucCS) was obtained from reduction of the hexuronic acid carboxyl groups in the polysaccharide with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-NaBH₄ (50, 53) (Fig. 1C).

Cytotoxicity assays. FucCS cytotoxicity was evaluated in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells with the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich) assay. Briefly, cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Nutri-cell, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (1 unit/ml), and streptomycin (1 unit/ml), in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. HepG2 cells were seeded into 96-well plates at a density of 2×10^4 cells per well and were incubated with different concentrations of FucCS. After 48 h, a solution of 5 mg/ml MTT was added, the cells were incubated for 4 h, and the resulting formazan crystals were resuspended in 50 μ l of isopropanol. Absorbance at 590 nm (A_{590}) of the cells, with medium alone (control) or different concentrations of FucCS, was determined by spectrophotometry (Asys Expert Plus, United Kingdom). Tox-

icity was determined as percent inhibition, which was calculated according to the following formula: percent inhibition = $[1 - (A_c/A_t)] \times 100$. A_t and A_c refer to the absorbance of experimentally tested samples (FucCS) and control samples (medium), respectively. FucCS toxicity was also determined in noninfected erythrocytes (niEs) incubated in the presence or absence (control) of FucCS. After 48 h of incubation at 37°C under conditions similar to those used for *P. falciparum* growth, red blood cell density (RBCD) was determined by counting the intact cells in a Neubauer chamber. The percent RBCD was calculated with the following formula: percent RBCD = $[1 - (\text{no. of niEs treated with FucCS}/\text{no. of niEs not treated})] \times 100$. Nontoxic samples were those in which no significant inhibition of HepG2 cell growth or RBCD, relative to controls, was observed.

Cultivation of laboratory strains and clinical isolates of *P. falciparum*-infected erythrocytes. In this work, we used *P. falciparum* strains FCR3 (54, 55) and FCR3S1.2 (56). FCR3S1.2 is a highly rosetting and autoagglutinating parasite, kindly provided by Mats Wahlgren (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden). The rosetting rate was kept at >75% by centrifugation on Ficoll-Paque (GE, Germany), as described previously (56). For some of the cytoadhesion assays, we used two fresh *P. falciparum* isolates (Pf38A and PfKA) that were recently harvested from infected patients in Acre State (western Amazon Basin of Brazil). All Pf-iE strains and isolates were cultured as described previously (57). Briefly, Pf-iEs were cultivated in fresh type O⁺ human erythrocytes (Blood Center, Universidade Estadual de Campinas) and suspended at a final hematocrit level of 4% in complete parasite medium (RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine, 25 mM HEPES, 2 g/liter glucose, and 10% homologous human plasma [pH 7.4]).

Selection of monophenotypic *P. falciparum* parasites. The following cell types were used in this study: human lung endothelial cells (HLECs) (58, 59) adapted for culture from primary explants and Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with human ICAM-1 (CHO-ICAM) or

CD36 (CHO-CD36) (60). HLECs, CHO cells, and FCR3 parasites were kindly donated by Jürg Gysin and Artur Scherf (Institute Pasteur, Paris, France). FCR3 parasites that adhered to CSA (Pf-iEs^{CSA}) were selected by panning (5 rounds) on HLECs (61, 62) with the addition of soluble CSA (100 µg/ml; Sigma-Aldrich). Briefly, enriched *P. falciparum* FCR3 parasites were incubated over confluent HLEC monolayers in cytoadhesion medium (RPMI 1640 medium [pH 6.8]) for 1 h at 37°C. Cells were then washed extensively with cytoadhesion medium to remove nonadherent Pf-iEs. For specific elution of CSA-binders, soluble CSA (100 µg/ml; Sigma-Aldrich) was added and detached parasites were recultured. Monophenotypic Pf-iEs capable of binding to ICAM-1 (Pf-iEs^{ICAM}) or CD36 (Pf-iEs^{CD36}) were obtained after panning (5 rounds) of mature-stage Pf-iEs on CHO-ICAM or CHO-CD36 cells, respectively (58, 63). To ensure selection of monophenotypic Pf-iEs^{CSA}, static cytoadhesion assays were performed with HLECs that had been previously treated with chondroitinase-ABC (0.5 U/ml; Sigma-Aldrich) or by incubation with soluble CSA. High-level expression of *var2csa*-related transcripts in selected Pf-iEs^{CSA} was confirmed by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) using cDNA from ring-stage parasites as a template and oligonucleotides specific for the genes *PFL0020c*, *PFD0995c/PFD1000c*, and *PFL0030w (var2csa)* and the internal control targets *PF07_0073* and *PF14_0425*, as described previously (64). The selection of Pf-iEs^{ICAM} and Pf-iEs^{CD36} was confirmed using anti-ICAM-1 (10 µg/ml, 84H10; Chemicon) and anti-CD36 (10 µg/ml, FA6-152; Santa Cruz Biotechnology) monoclonal antibodies, respectively.

Static cytoadhesion assays. We assessed the ability of native or modified FucCS and other GAGs to inhibit the adhesion of Pf-iEs^{CSA}, Pf-iEs^{ICAM}, Pf-iEs^{CD36}, and *P. falciparum* isolates to human lung endothelial cells (HLECs) by performing static cytoadhesion assays, as described elsewhere (34, 61, 65, 66), with minor modifications. Briefly, HLECs (5×10^4 cells) were grown to confluence on 8-well culture slides (each well, 0.69 cm²; Becton, Dickinson). We then added 5×10^4 Voluten-enriched Pf-iEs per well in a total volume of 300 µl of cytoadhesion medium (RPMI 1640 medium [pH 6.8]), alone or in the presence of increasing concentrations of heparin (Calbiochem, China), CSA, native FucCS, or modified FucCS structures (deFucCS and CRFucCS). Culture slides were incubated for 1 h at 37°C and then extensively washed in cytoadhesion medium. Alternatively, we performed static cytoadhesion assays on placenta cryosections as described previously (54, 58, 65, 66), with minor modifications. Briefly, placental biopsy specimens from healthy pregnant women were collected immediately after delivery, snap-frozen in liquid nitrogen/*n*-hexane (Merck, Germany), and then stored frozen in Tissue-Tek (Thermo) before use. Serial placenta cryosections (5 to 7 mm) were cut with a cryotome and mounted on individual glass slides. Cryosections were washed and air-dried, and an area of approximately 1 cm² was delimited with a Dako-Pen device. Cytoadhesion assays were performed as for endothelial cells; however, 1×10^5 Pf-iEs^{CSA} were added to placenta cryosections. The percent inhibition, relative to control (medium) values, was determined by counting, with the aid of a microscope after Giemsa staining, the number of Pf-iEs per mm² that adhered to an endothelial cell monolayer or a placenta cryosection. Adhesion assays were performed at least 2 or 3 times independently, and inhibitory values did not differ significantly.

Flow-based cytoadhesion assays. The ability of FucCS to desquester Pf-iEs^{CSA} was assessed through flow-based cytoadhesion assays, as described previously (54, 58). Briefly, HLECs (5×10^5) were cultured to confluence in single-well culture slides (8.6 cm²; Becton, Dickinson); then, 5×10^5 Pf-iEs^{CSA} were added to the culture slides and were left for static cytoadherence. After 1 h of incubation at 37°C, the culture slides were mounted in a flow chamber system (Immunetics), and cytoadhesion medium (control) or FucCS (100 µg/ml) was circulated at a shear stress of 0.09, 0.36, or 1.44 Pa, for 10, 5, or 2.5 min, respectively. For the flow adhesion assay, enriched Pf-iEs (2×10^6) were subjected to the flow system for 10 min at a shear stress of 0.09 Pa. The culture slides were coupled in the flow chamber system, through which passed cytoadhesion medium

(control) or FucCS (100 µg/ml) together with parasites. In both experiments, the remaining adherent Pf-iEs^{CSA} per mm² were counted in 30 randomly chosen fields, which were captured using a 5.0-megapixel digital camera (Moticam 2500; Motic) adapted to the inverted microscope.

Rosette disruption assay. This assay was performed essentially as described previously (36). Briefly, different concentrations of FucCS, deFucCS, heparin, or CSA were added to 18-µl aliquots of a rosetting FCR3S1.2 culture in a 96-well microtiter plate, which was then incubated for 1 h at 37°C. FCR3S1.2 was also monitored over time (2, 10, 30, and 60 min) after treatment with 50 µg/ml of FucCS or heparin, to examine the kinetics of rosette disruption. A rosette was scored when a parasitized cell bound to at least two noninfected red blood cells. Rosetting was assessed after acridine orange (Sigma-Aldrich) staining. The percent rosetting, relative to control (medium) values, was expressed as follows: percent rosetting = (no. of rosette-forming late-stage Pf-iEs/total no. of late-stage Pf-iEs) \times 100.

Growth inhibition assays. The effects of FucCS, deFucCS, CRFucCS, and other GAGs on Pf-iE development were assessed by growth inhibition assays (GIAs) (67). Briefly, synchronized young-stage forms (<24 h) of *P. falciparum* cultures with 4% parasitemia and hematocrit levels were grown for 24 or 48 h at 37°C in a 96-well microtiter plate in the presence of increasing concentrations of GAGs. Parasite growth inhibition, expressed as a percentage of control (medium) values, was determined by counting Pf-iEs in at least 1,000 cells on Giemsa-stained smears, under a light microscope.

Merozoite invasion inhibition assay. The merozoite invasion inhibition assay with native and modified FucCS, or other GAGs, was performed as described previously (37), with modifications. In short, synchronized late-stage forms (>24 h) of *P. falciparum* cultures were grown for 24 to 30 h at 37°C in a 96-well microtiter plate with increasing concentrations of GAGs, and parasite invasion inhibition was determined as described for GIAs.

Statistical analysis. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) or Student's *t* test for parametric data. Kruskal-Wallis and *post hoc* tests or the Mann-Whitney *U* test was used for nonparametric data. All statistical analyses were performed using Prism version 5.02 (GraphPad Software), and values were considered significant at *P* < 0.05.

RESULTS

Effects of FucCS on *P. falciparum* cytoadherence and rosette disruption. Based on the ability of various GAGs, including heparin, to prevent parasite cytoadherence, we assessed the cytoadherence-inhibiting effect of FucCS using monophenotypic Pf-iEs with HLECs and human placenta cryosections. To evaluate FucCS toxicity, several concentrations of the compound were incubated with HepG2 cells and noninfected erythrocytes (niEs). FucCS significantly impaired hepatic cell growth only at a high concentration of 10,000 µg/ml, and no effect on niEs was observed at any of the tested doses (see Fig. S1A and B in the supplemental material). Thus, we analyzed the ability of FucCS to inhibit *P. falciparum* cytoadherence to endothelial cells (Fig. 2). Indeed, FucCS abolished cytoadherence in a dose-dependent manner similar to that of heparin. The adhesion of parasites that bind to specific host receptors, such as CSA (Pf-iEs^{CSA}), ICAM-1 (Pf-iEs^{ICAM}), and CD36 (Pf-iEs^{CD36}), was inhibited by 99.1, 64.6, and 71.2%, respectively (Fig. 2A to C). Moreover, at a concentration as low as 1 µg/ml, FucCS was more efficient than heparin (Fig. 2A). As natural infections of *P. falciparum* often involve multiphenotypic parasites (e.g., those binding to different receptors) (68, 69), we examined whether FucCS could block the adhesion of fresh *P. falciparum* isolates. According to Fig. 2D and E, FucCS also inhibited adhesion of clinical isolates in a dose-dependent manner and

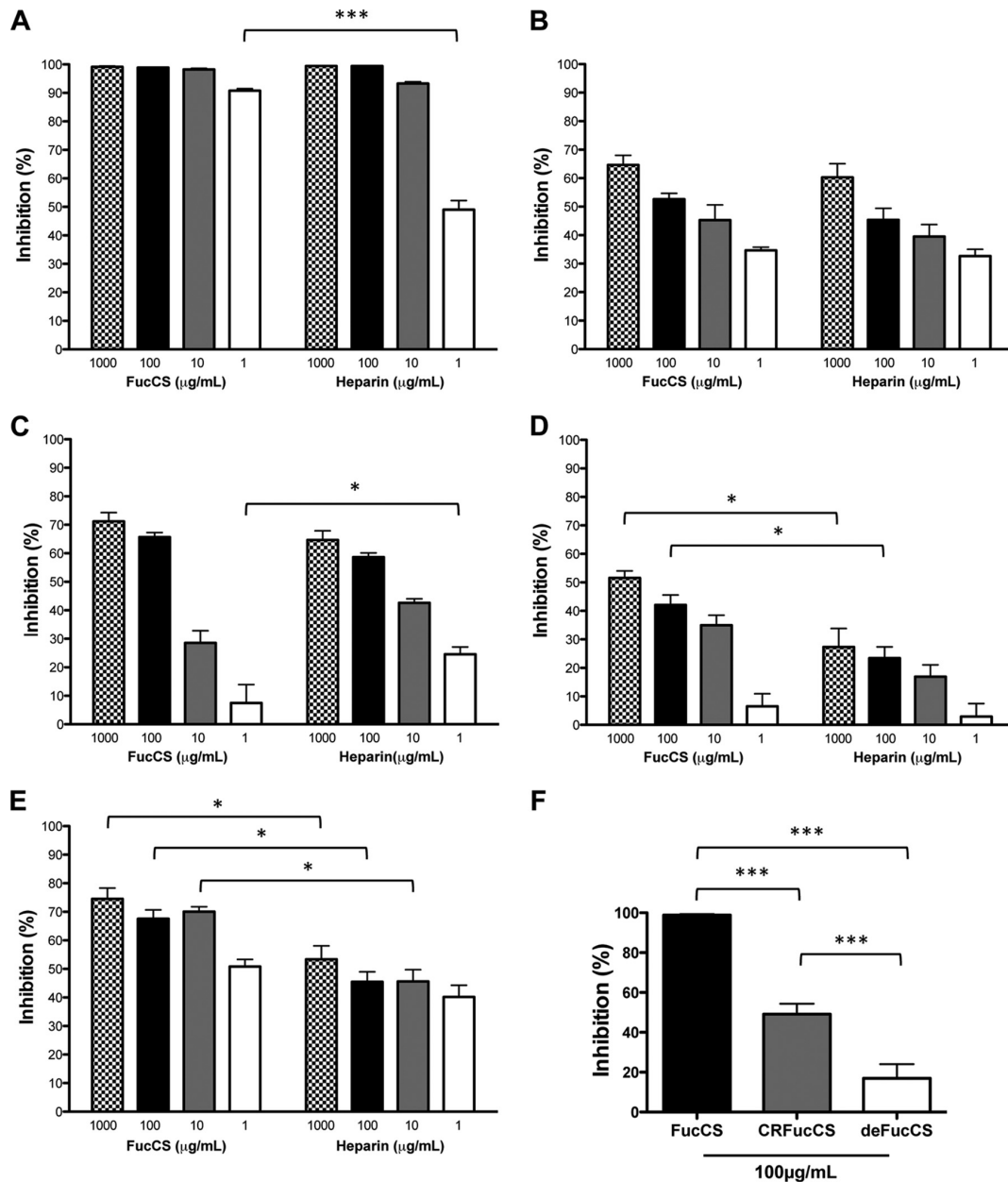


FIG 2 Effects of FucCS (native or modified) on the cytoadhesion of *P. falciparum* (laboratory strains or clinical isolates) to HLECs. *P. falciparum* monophenotypic laboratory strains Pf-iEs^{CSA} (A), Pf-iEs^{ICAM} (B), and Pf-iEs^{CD36} (C) and clinical Amazonian isolates PfKA (D) and Pf38A (E) were incubated for 1 h at 37°C on 8-well culture slides containing HLECs, in the presence or absence (control) of different concentrations of FucCS or heparin, or Pf-iEs^{CSA} were incubated for 1 h at 37°C on HLECs in the presence of 100 µg/ml of native FucCS or the modified forms (deFucCS or CRFucCS) or culture medium alone (control) (F). Slides were extensively washed, and bound Pf-iEs were counted after Giemsa staining. Inhibition was determined as a percentage, relative to control values, and results are expressed as the means \pm standard deviations (SD) of four wells from 2 independent assays. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ (ANOVA).

was significantly more effective than heparin at several tested concentrations.

Next, we investigated the major structural motifs in FucCS involved in the inhibition of parasite adhesion, using two chemically modified polysaccharides. As observed in Fig. 2F, both deFucCS and CRFucCS were significantly less effective than native FucCS in inhib-

iting Pf-iEs^{CSA} adhesion. CRFucCS blocked parasite adhesion at higher levels than did deFucCS ($P < 0.001$), and similar effects were noted for Pf-iEs^{ICAM} and Pf-iEs^{CD36} (see Fig. S2A and B in the supplemental material).

Given that CSA is a receptor associated with MiP and that FucCS abolished adhesion of Pf-iEs^{CSA}, we evaluated the capacity

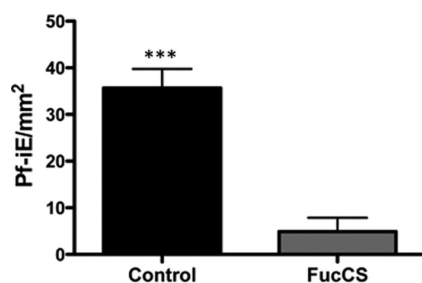


FIG 3 FucCS inhibition of adhesion of CSA-bound parasites to placenta. Cultured *P. falciparum* parasites selected for CSA binding (Pf-iEs^{CSA}) were incubated at 37°C with placenta cryosections, with FucCS (100 µg/ml) or cytoadhesion medium (control). After 1 h, placental tissue samples were extensively washed, and adhered parasites were Giemsa stained and then visualized and counted using a Nikon microscope at ×100 magnification. The results are expressed as the mean ± SD of the number of bound Pf-iEs^{CSA}/mm² counted in at least 30 randomly selected fields after Giemsa staining. ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test).

of FucCS to inhibit the binding of this parasite to placenta cryosections. As shown in Fig. 3, 100 µg/ml of FucCS abrogated Pf-iEs^{CSA} adherence to the human placenta. We also evaluated the effects of FucCS on parasite adhesion under flow conditions. As shown in Fig. 4A, virtually no Pf-iEs adhered to HLECs under a constant flow pressure of 0.09 Pa in a solution of 100 µg/ml FucCS. Importantly, FucCS, in comparison with the control (medium), removed a significant amount of CSA-adherent parasites, even under conditions of low shear stress (0.09 Pa) (Fig. 4B).

Having demonstrated the ability of FucCS to prevent parasite binding under static and flow conditions, we investigated the disruptive effects of FucCS on *P. falciparum* rosettes (FCR3S1.2 strain). As seen in Fig. 5A, FucCS disrupted rosettes in a dose-dependent manner and virtually abolished rosette formation, even at low concentrations such as 10 µg/ml. As observed in cytoadhesion assays, deFucCS proved to be less efficient than the native compound in disrupting rosettes. We then evaluated how quickly FucCS could disrupt rosettes by treating FCR3S1.2 cultures with FucCS or heparin at different time points. As shown in Fig. 5B, FucCS was able to disrupt rosettes at high levels within only 2 min after its addition, similar to heparin.

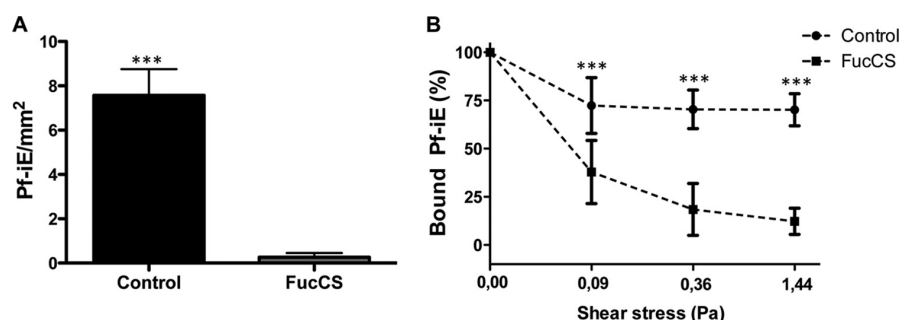


FIG 4 FucCS inhibition, under flow conditions, of Pf-iE^{CSA} cytoadhesion and unbound adhered parasites on HLECs. (A) Enriched Pf-iEs^{CSA}, in the presence of FucCS (100 µg/ml) or cytoadhesion medium only (control), were circulated for 10 min at 0.09 Pa on culture slides with HLECs coupled in the flow chamber system. The results are expressed as the number of bound Pf-iEs^{CSA} per square millimeter. (B) Alternatively, cytoadhesion medium (control) or FucCS (100 µg/ml) flowed through single-well microslides containing HLECs with adhered Pf-iEs^{CSA}, under increasing shear stress conditions (0.09, 0.36, and 1.44 Pa). Data are expressed as a percentage, relative to the adhesion at 0.00 Pa (control). In both situations, the remaining bound Pf-iEs^{CSA} were counted in 30 randomly selected fields. ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test).

Effects of FucCS on *P. falciparum* growth and erythrocyte invasion. As previous studies have reported, GAGs, including heparin, have major effects on parasite invasion (37, 40, 70, 71); therefore, we investigated the action of FucCS on parasite development by GIA. *P. falciparum* blood-stage parasites were incubated with native or modified FucCS, as well as heparin or CSA, for 48 h. As shown in Fig. 6A, similar to heparin, FucCS exhibited dose-dependent inhibitory effects and completely abolished parasite development at concentrations of 100 and 1,000 µg/ml. Importantly, as noted in the cytoadhesion assays, CRFucCS significantly hampered parasite development, whereas deFucCS did not. Additionally, CSA inhibition was observed only at the highest tested dose (1,000 µg/ml). Then, to determine whether FucCS could act on a specific parasite blood stage, we incubated synchronous young-stage (<24 h postinvasion) forms of *P. falciparum* with native or modified FucCS, as well as heparin or CSA. As seen in Fig. 6B, neither FucCS (native or modified) nor any of the tested GAGs significantly inhibited ring-stage maturation.

Assuming that FucCS affects parasite development despite its inability to stop ring-stage maturation, we analyzed the role of FucCS in the invasion of noninfected erythrocytes (niEs) by *P. falciparum* merozoites. As shown in Fig. 6C, CRFucCS but not deFucCS significantly inhibited parasite invasion at 100 µg/ml, and FucCS or heparin hampered merozoite invasion in a dose-dependent manner, at levels similar to those observed in GIAs, after 48 h of incubation.

DISCUSSION

Here we show that FucCS exhibited marked inhibition of the cytoadhesion of cultured Pf-iEs and clinical isolates to endothelial cells and placenta cryosections under static and flow conditions. FucCS was also highly effective in disrupting rosettes and interfering with parasite invasion. These results suggest that FucCS may prove to be a useful adjunct therapy for severe malaria.

The observed effects of FucCS on *P. falciparum* cytoadhesion and invasion were very similar to those of heparin in most assays. In fact, heparin displays potent inhibitory effects on Pf-iE cytoadherence and rosette formation *in vitro* (28, 36, 42, 72–74) and remains the only sulfated glycoconjugate used to treat severe human malaria (75–77). However, despite some success as an ad-

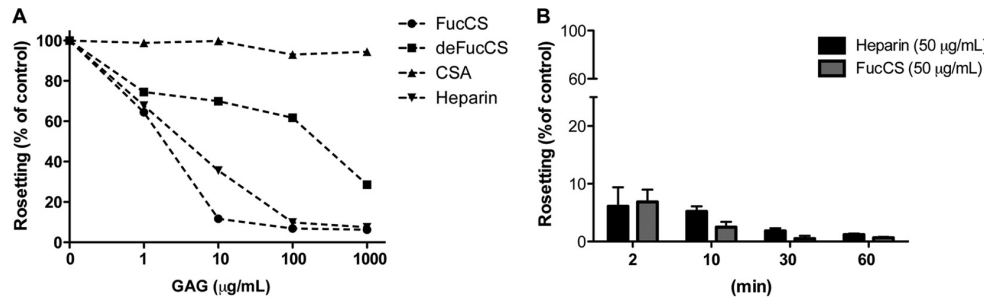


FIG 5 FucCS disruption of *P. falciparum* rosettes. Rosetting parasite cultures (FCR3S1.2) were incubated for 1 h with or without (control) FucCS, deFucCS, heparin, or CSA at various concentrations (A) or were treated with FucCS or heparin (both at 50 µg/ml) at different time points (2, 10, 30, and 60 min) (B). The percentage of rosetting, relative to control, was expressed as (no. of rosette-forming late-stage Pf-iEs)/(total no. of late-stage Pf-iEs) × 100. Data are from one representative experiment from three independent assays.

junct treatment for complications of malaria (77–79), the use of heparin was abandoned due to severe bleeding and the deaths of some children under treatment (47).

When we analyzed the effects of modified compounds derived

from native FucCS, we noted marked differences between these compounds (Fig. 2F; also see Fig. S2 in the supplemental material). Although both modified FucCS structures exhibited inhibitory cytoadhesion capacity that was significantly less than that of

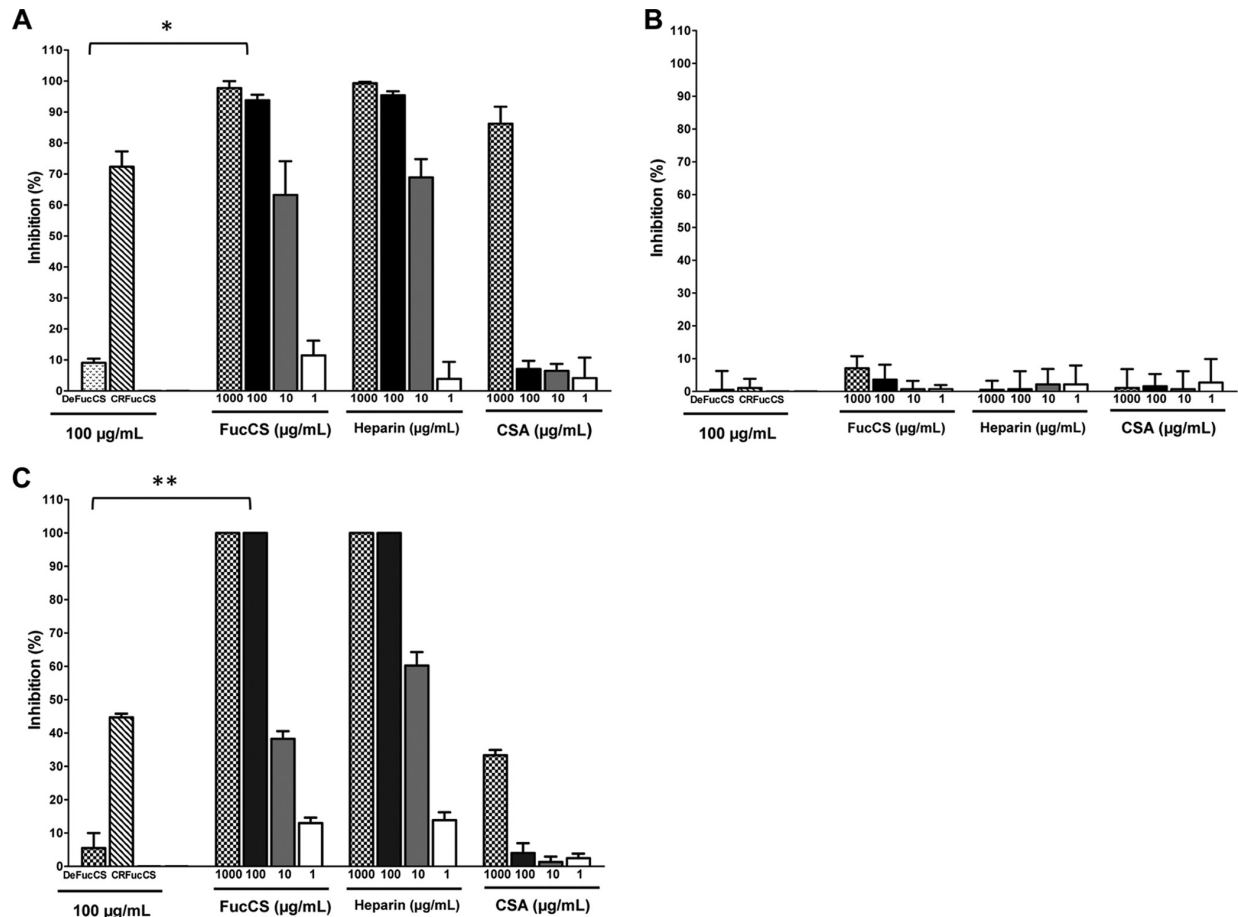


FIG 6 FucCS inhibition of *P. falciparum* growth (GIA) and merozoite invasion. Ring-synchronized *P. falciparum*-infected erythrocytes (A and B) or late-stage forms (trophozoites) (C) cultured at 4% parasitemia and hematocrit levels were incubated at 37°C for 48 h (A) or 24 h (B and C) with increasing concentrations of FucCS, heparin, CSA, or defucosylated (100 µg/ml) or carboxyl-reduced (100 µg/ml) modified FucCS. As a control, parasites were grown in RPMI 1640 medium. The percentage of growth inhibition was calculated relative to control values, and results are expressed as the means ± SD of triplicates. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Kruskal-Wallis test).

the native compound, deFucCS was nearly 3-fold less efficient than CRFucCS. These findings demonstrate that the presence of sulfated fucose branches in the native compound is critical for the inhibition of Pf-iEs, and they corroborate previous observations that removal of these branches abolishes the anticoagulant and antithrombotic effects of FucCS (80). The presence of these branches was essential for preserving the inhibitory effects of FucCS in interactions mediated by P- and L-selectin (52), thus indicating that these branches play a key role in supporting the biological effects of FucCS.

Cytoadhesion of *P. falciparum* to CSA, and possibly other placental receptors, triggers host inflammatory processes, which in turn affect placental function and contribute to the poor clinical outcomes of MiP (18, 19). Based on this fact, CSA has previously been considered for the adjunct treatment of malaria complications during pregnancy (41), due to its inhibitory effects on the *in vitro* and *in vivo* cytoadherence of Pf-iEs (41). In this context, we showed that FucCS was very efficient in inhibiting the adhesion of Pf-iEs^{CSA} to HLECs and virtually abolished adhesion to human placenta. Additionally, FucCS was effective in preventing adhesion and removing Pf-iEs^{CSA} from HLECs under flow conditions.

Apart from CSA (42, 72), rosettes can be disrupted by other sulfated glycoconjugates, such as heparin (36, 38, 42), dextran sulfate, and fucoidan (38, 72). Here we have shown that FucCS has effects that are similar to those of heparin, including the speed of action for rosette disruption (Fig. 5). This action was dependent on the sulfated fucose branches in the native structure of FucCS, as deFucCS proved to be less effective than the native compound.

Studies have shown that heparin and other sulfated polysaccharides (e.g., pentosan polysulfate, dextran sulfate, Curdlan sulfate, and fucoidan) inhibit the progression of *P. falciparum* through its blood stages (40, 43, 71, 81, 82). Moreover, it has been demonstrated that heparin and other GAGs, but not CSA (40, 42), efficiently inhibit the invasion of erythrocytes by the merozoites of different strains of *P. falciparum* (37, 40, 42, 43). Corroborating these findings, we showed that FucCS inhibited continuous cultivation of *P. falciparum* *in vitro* (Fig. 6A), most likely by interfering with merozoite invasion (Fig. 6C) rather than by blocking parasite development from the young- to late-stage forms, as assessed in cultures of 24 and 48 h (Fig. 6A and B). In contrast, CSA did not show any significant inhibitory effects on merozoite invasion (Fig. 6C) and parasite development (Fig. 6A and B) except at the highest dose tested (1,000 mg/ml), which was most likely due to a nonspecific effect of an excess of the compound in the medium. These results agree with previous studies in which CSA had no significant inhibitory effects on reinvasion, especially at lower doses, with only marginal effects at high doses (40, 42).

Some studies have attempted to explain the mechanisms involved in the inhibition of invasion by sulfated polysaccharides. Clark and colleagues showed that only densely sulfated polysaccharides (heparin, dextran sulfate, and fucoidan) were effective in inhibiting parasite invasion (43), suggesting that inhibition was the result of not only nonspecific ionic interactions but also a particular conformation of anions present in the compounds. Boyle and colleagues demonstrated that the level and pattern of sulfation are crucial for the inhibitory activity of heparin and similar compounds (83).

The effect of FucCS seems to be similar to that of heparin, which inhibits parasite invasion, adhesion, and rosetting by binding to regions of PfEMP-1 and merozoite surface protein-1

(MSP-1) (83–85). Based on these findings, we hypothesized that FucCS could block interactions of adhesion and invasion proteins with host receptors that are glycoproteins expressed constitutively in erythrocytes, most likely by binding to conserved regions of these proteins, such as region RII (86). Docking analyses are under way to examine this hypothesis.

In addition to the effects described in this study, FucCS does not require fractionation and/or chemical modification after purification (87) and is not derived from mammals (88), in contrast to heparin and CSA, thus reducing the risk of contamination by pathogens. Moreover, FucCS occurs at high concentrations in sea cucumber and can be isolated with relatively high yields (approximately 1% of the dry weight) (87). Also, it has weaker anticoagulant and antithrombotic effects than heparin (48, 89) and acts, *in vitro* and *in vivo*, at concentrations lower than those required to trigger its anticoagulant effects (52). FucCS can also be administered orally, which is another advantage in comparison with other sulfated polysaccharides (90). Importantly, no toxic or cumulative effects in tissue were observed after administration of FucCS to animals at a daily dose of 50 mg/kg of body weight for 30 days (M. S. G. Pavão and E. O. Kozłowski, unpublished data).

In conclusion, the observed similarities in the inhibitory effects of FucCS and heparin on Pf-iE cytoadhesion, rosette formation, and blockage of parasite invasion, as well as the unique sulfated composition of FucCS, which confers advantages over other compounds that have already been tested, raise hopes for the use of FucCS in human trials as an adjunct therapy for the treatment of several complications that characterize severe malaria.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). M.F.B., L.A., S.C.P.L., and B.C.C. were sponsored by FAPESP fellowships. Y.C.B. was supported by a CNPq fellowship. F.T.M.C., C.C.W., M.U.F., P.A.S.M., G.W., and M.S.G.P. are CNPq research fellows. C.R.F.M. was supported by FAPESP and CNPq.

Many thanks go to Maria José Menezes (Department of Parasitology, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, San Paulo, Brazil) for technical support.

REFERENCES

1. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434:214–217. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03342>.
2. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO. 2010. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLoS Med.* 7:e1000221. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1000221>.
3. Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C. 2001. The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64:28–35.
4. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. 2000. Severe falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94(Suppl 1): S1–S90.
5. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N. 2005. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet* 366:717–725. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67176-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67176-0).
6. Menendez C. 2006. Malaria during pregnancy. *Curr. Mol. Med.* 6:269–273. <http://dx.doi.org/10.2174/156652406776055186>.
7. Clark IA, Rockett KA. 1994. The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol. Today* 10:410–412. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90237-2](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(94)90237-2).
8. Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. 1991. Role of TNF in cerebral malaria. *Lancet* 337:302–303.

9. Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. 1998. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN- γ and TNF- α associated with pregnancy outcomes. *J. Immunol.* 160:2523–2530.
10. Suguitan AL, Jr, Leke RG, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, Fogako J, Megnekou R, Taylor DW. 2003. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 188:1074–1082. <http://dx.doi.org/10.1086/378500>.
11. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, Chaouat G. 2001. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *J. Infect. Dis.* 183:1530–1534. <http://dx.doi.org/10.1086/320201>.
12. Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, Fosiko NG, Lewallen S, Liomba NG, Molyneux ME. 2004. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat. Med.* 10:143–145. <http://dx.doi.org/10.1038/nm986>.
13. 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.
14. Beeson JG, Amin N, Kanjala M, Rogerson SJ. 2002. Selective accumulation of mature asexual stages of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in the placenta. *Infect. Immun.* 70:5412–5415. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.10.5412-5415.2002>.
15. Fried M, Duffy PE. 1996. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science* 272:1502–1504. <http://dx.doi.org/10.1126/science.272.5267.1502>.
16. Bray RS, Sinden RE. 1979. The sequestration of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in the placenta. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73:716–719. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90028-2](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(79)90028-2).
17. Hanson J, Lam SW, Mahanta KC, Pattnaik R, Alam S, Mohanty S, Hasan MU, Hossain A, Charunwathana P, Chotivanich K, Maude RJ, Kingston H, Day NP, Mishra S, White NJ, Dondorp AM. 2012. Relative contributions of macrovascular and microvascular dysfunction to disease severity in falciparum malaria. *J. Infect. Dis.* 206:571–579. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis400>.
18. Beeson JG, Reeder JC, Rogerson SJ, Brown GV. 2001. Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. *Trends Parasitol.* 17:331–337. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01917-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01917-1).
19. Duffy PE, Fried M. 2005. Malaria in the pregnant woman. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 295:169–200.
20. Miller LH. 1969. Distribution of mature trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum* in the organs of *Aotus trivirgatus*, the night monkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18:860–865.
21. Luse SA, Miller LH. 1971. *Plasmodium falciparum* malaria: ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20:655–660.
22. Pouvelle B, Buffet PA, Lepolard C, Scherf A, Gysin J. 2000. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* ring-stage-infected erythrocytes. *Nat. Med.* 6:1264–1268. <http://dx.doi.org/10.1038/81374>.
23. Doumbo OK, Thera MA, Kone AK, Raza A, Tempest LJ, Lyke KE, Ploem CV, Rowe JA. 2009. High levels of *Plasmodium falciparum* rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81:987–993. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0406>.
24. Udonsangpetch R, Wahlin B, Carlson J, Berzins K, Torii M, Aikawa M, Perlmann P, Wahlgren M. 1989. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. *J. Exp. Med.* 169:1835–1840. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.169.5.1835>.
25. Handunnetti SM, David PH, Perera KL, Mendis KN. 1989. Uninfected erythrocytes form “rosettes” around *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:115–118.
26. Carlson J, Helmbly H, Hill AV, Brewster D, Greenwood BM, Wahlgren M. 1990. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet* 336:1457–1460. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)93174-N](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(90)93174-N).
27. Treutiger CJ, Hedlund I, Helmbly H, Carlson J, Jepson A, Twumasi P, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Wahlgren M. 1992. Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:503–510.
28. Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K. 1995. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect. Immun.* 63:2323–2326.
29. al-Yaman F, Genton B, Mokela D, Raiko A, Kati S, Rogerson S, Reeder J, Alpers M. 1995. Human cerebral malaria: lack of significant association between erythrocyte rosetting and disease severity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89:55–58. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90658-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(95)90658-4).
30. Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JEV, Avril M, Brazier AJ, Freeth J, Jespersen JS, Nielsen MA, Magistrado P, Lusingu J, Smith JD, Higgins MK, Theander TG. 2013. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* 498:502–505. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12216>.
31. Ockenhouse CF, Tandon NN, Magowan C, Jamieson GA, Chulay JD. 1989. Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. *Science* 243:1469–1471. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2467377>.
32. Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. 1989. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 341:57–59. <http://dx.doi.org/10.1038/341057a0>.
33. Rogerson SJ, Chaiyaroj SC, Ng K, Reeder JC, Brown GV. 1995. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* 182:15–20. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.182.1.15>.
34. Robert C, Pouvelle B, Meyer P, Muanza K, Fujioka H, Aikawa M, Scherf A, Gysin J. 1995. Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Res. Immunol.* 146:383–393. [http://dx.doi.org/10.1016/0923-2494\(96\)81042-X](http://dx.doi.org/10.1016/0923-2494(96)81042-X).
35. Fried M, Domingo GJ, Gowda CD, Mutabingwa TK, Duffy PE. 2006. *Plasmodium falciparum*: chondroitin sulfate A is the major receptor for adhesion of parasitized erythrocytes in the placenta. *Exp. Parasitol.* 113:36–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.12.003>.
36. Carlson J, Wahlgren M. 1992. *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *J. Exp. Med.* 176:1311–1317. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.176.5.1311>.
37. Kulane A, Ekre HP, Perlmann P, Rombo L, Wahlgren M, Wahlin B. 1992. Effect of different fractions of heparin on *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46:589–594.
38. Rowe A, Berendt AR, Marsh K, Newbold CI. 1994. *Plasmodium falciparum*: a family of sulphated glycoconjugates disrupts erythrocyte rosettes. *Exp. Parasitol.* 79:506–516. <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1994.1111>.
39. Rogerson SJ, Reeder JC, al-Yaman F, Brown GV. 1994. Sulfated glycoconjugates as disrupters of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:198–203.
40. Xiao L, Yang C, Patterson PS, Udhayakumar V, Lal AA. 1996. Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes. *Infect. Immun.* 64:1373–1378.
41. Pouvelle B, Meyer P, Robert C, Bardel L, Gysin J. 1997. Chondroitin-4-sulfate impairs in vitro and in vivo cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol. Med.* 3:508–518.
42. Vogt AM, Pettersson F, Moll K, Jonsson C, Normark J, Ribacke U, Egwang TG, Ekre HP, Spillmann D, Chen Q, Wahlgren M. 2006. Release of sequestered malaria parasites upon injection of a glycosaminoglycan. *PLoS Pathog.* 2:e100. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0020100>.
43. Clark DL, Su S, Davidson EA. 1997. Saccharide anions as inhibitors of the malaria parasite. *Glycoconj. J.* 14:473–479. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1018551518610>.
44. Andrews KT, Klatt N, Adams Y, Mischnick P, Schwartz-Albiez R. 2005. Inhibition of chondroitin-4-sulfate-specific adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by sulfated polysaccharides. *Infect. Immun.* 73:4288–4294. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.7.4288-4294.2005>.
45. Kyriacou HM, Steen KE, Raza A, Arman M, Warimwe G, Bull Havlik PCI, Rowe JA. 2007. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* rosette formation by Curdlan sulfate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1321–1326. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01216-06>.
46. John CC, Kutamba E, Mugarura K, Opoka RO. 2010. Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of *Plasmodium falciparum* malaria. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8:997–1008. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.10.90>.
47. World Health Organization, Malaria Action Programme. 1986. Severe and complicated malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80(Suppl):3–50.
48. Mourao PA, Pereira MS, Pavao MS, Mulloy B, Tollefsen DM, Mowinckel MC, Abildgaard U. 1996. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm: sulfated fucose

- branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *J. Biol. Chem.* 271:23973–23984.
49. Vieira RP, Mourao PA. 1988. Occurrence of a unique fucose-branched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber. *J. Biol. Chem.* 263:18176–18183.
 50. Vieira RP, Mulloy B, Mourao PA. 1991. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber: evidence for the presence of 3-O-sulfo- β -D-glucuronosyl residues. *J. Biol. Chem.* 266:13530–13536.
 51. Mourao PA, Giumaraes B, Mulloy B, Thomas S, Gray E. 1998. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *Br. J. Haematol.* 101:647–652. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00769.x>.
 52. Borsig L, Wang L, Cavalcante MC, Cardilo-Reis L, Ferreira PL, Mourao PA, Esko JD, Pavao MS. 2007. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber: effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *J. Biol. Chem.* 282:14984–14991. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M610560200>.
 53. Taylor RL, Shively JE, Conrad HE. 1976. Stoichiometric reduction of uronic acid carboxyl groups in polysaccharides. *Methods Carbohydr. Chem.* 7:149–151.
 54. Avril M, Traore B, Costa FT, Lepolard C, Gysin J. 2004. Placenta cryosections for study of the adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A in flow conditions. *Microbes Infect.* 6:249–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2003.12.007>.
 55. Lekana Douki JB, Traore B, Costa FT, Fusai T, Pouvelle B, Sterkers Y, Scherf A, Gysin J. 2002. Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood* 100:1478–1483. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-01-0315>.
 56. Fernandez V, Treutiger CJ, Nash GB, Wahlgren M. 1998. Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immun.* 66:2969–2975.
 57. Moll K, Ljungström I, Perlmann P, Scherf A, Wahlgren M (ed). 2008. *Methods in malaria research*, 5th ed. MR4/ATCC, Manassas, VA. <http://www.mr4.org/Publications/MethodsInMalariaResearch/tabid/333/Default.aspx>.
 58. 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, Araujo MO, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Renia L, Costa FT. 2010. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J. Infect. Dis.* 202:638–647. <http://dx.doi.org/10.1086/654815>.
 59. Muanza K, Gay F, Behr C, Scherf A. 1996. Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadherence. *Res. Immunol.* 147:149–163. [http://dx.doi.org/10.1016/0923-2494\(96\)83167-1](http://dx.doi.org/10.1016/0923-2494(96)83167-1).
 60. Hasler T, Albrecht GR, Van Schravendijk MR, Aguiar JC, Morehead KE, Pasloske BL, Ma C, Barnwell JW, Greenwood B, Howard RJ. 1993. An improved microassay for *Plasmodium falciparum* cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48:332–347.
 61. Gay F, Robert C, Pouvelle B, Peyrol S, Scherf A, Gysin J. 1995. 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* 184:15–28.
 62. Pouvelle B, Fusai T, Gysin J. 1998. *Plasmodium falciparum* and chondroitin-4-sulfate: the new key couple in sequestration. *Med. Trop. (Mars)* 58:187–198. (In French.)
 63. Noviyanti R, Brown GV, Wickham ME, Duffy MF, Cowman AF, Reeder JC. 2001. Multiple *var* gene transcripts are expressed in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes selected for adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114:227–237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00266-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00266-3).
 64. Salanti A, Staaloe T, Lavstsen T, Jensen AT, Sowa MP, Arnot DE, Hviid L, Theander TG. 2003. Selective upregulation of a single distinctly structured *var* gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol. Microbiol.* 49:179–191. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03570.x>.
 65. Costa FT, Fusai T, Parzy D, Sterkers Y, Torrentino M, Douki JB, Traore B, Petres S, Scherf A, Gysin J. 2003. Immunization with recombinant duffy binding-like- γ 3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies against placental chondroitin sulfate A-binding *Plasmodium falciparum* parasites. *J. Infect. Dis.* 188:153–164. <http://dx.doi.org/10.1086/375800>.
 66. Pouvelle B, Traore B, Nogueira PA, Pradines B, LePolard C, Gysin J. 2003. Modeling of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion in microvascular conditions: chondroitin-4-sulfate binding, a competitive phenotype. *J. Infect. Dis.* 187:292–302. <http://dx.doi.org/10.1086/346050>.
 67. Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE. 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: an in-vitro microtechnique. *Lancet* 1(8054):22–23.
 68. 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.* 57:389–398.
 69. Rogerson SJ, Tembenu R, Dobano C, Plitt S, Taylor TE, Molyneux ME. 1999. Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61:467–472.
 70. Sivaraman CA, Rai Chowdhuri AN. 1983. Effect of heparin sodium on in vitro development of *Plasmodium falciparum*. *Indian J. Exp. Biol.* 21:247–250.
 71. Butcher GA, Parish CR, Cowden WB. 1988. Inhibition of growth in vitro of *Plasmodium falciparum* by complex polysaccharides. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:558–559. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(88\)90504-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(88)90504-4).
 72. Barragan A, Spillmann D, Kremsner PG, Wahlgren M, Carlson J. 1999. *Plasmodium falciparum*: molecular background to strain-specific rosette disruption by glycosaminoglycans and sulfated glycoconjugates. *Exp. Parasitol.* 91:133–143. <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1998.4349>.
 73. Chen Q, Barragan A, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Sahlen A, Carlson J, Datta S, Wahlgren M. 1998. Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J. Exp. Med.* 187:15–23. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.187.1.15>.
 74. Carlson J, Nash GB, Gabutti V, al-Yaman F, Wahlgren M. 1994. Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood* 84:3909–3914.
 75. Sheehy TW, Reba RC. 1967. Complications of falciparum malaria and their treatment. *Ann. Intern. Med.* 66:807–809. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-66-4-807>.
 76. Munir M, Tjandra H, Rampengan TH, Mustadjab I, Wulur FH. 1980. Heparin in the treatment of cerebral malaria. *Paediatr. Indones.* 20:47–50.
 77. Smitskamp H, Wolhuis FH. 1971. New concepts in treatment of malignant tertian malaria with cerebral involvement. *Br. Med. J.* 1(5751):714–716. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.1.5751.714>.
 78. Rampengan TH. 1991. Cerebral malaria in children: comparative study between heparin, dexamethasone and placebo. *Paediatr. Indones.* 31:59–66.
 79. Jaroonvesama N. 1972. Intravascular coagulation in falciparum malaria. *Lancet* 299:221–223. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(72\)90621-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(72)90621-6).
 80. Zancan P, Mourao PA. 2004. Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 15:45–54. <http://dx.doi.org/10.1097/00001721-200401000-00008>.
 81. Evans SG, Morrison D, Kaneko Y, Havlik I. 1998. The effect of Curdlan sulphate on development in vitro of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92:87–89. [http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90969-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90969-5).
 82. Havlik I, Rovelli S, Kaneko Y. 1994. The effect of Curdlan sulphate on in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:686–687. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90230-5](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(94)90230-5).
 83. Boyle MJ, Richards JS, Gilson PR, Chai W, Beeson JG. 2010. Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood* 115:4559–4568. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-09-243725>.
 84. Valle-Delgado JJ, Urban P, Fernandez-Busquets X. 2013. Demonstration of specific binding of heparin to *Plasmodium falciparum*-infected vs. non-infected red blood cells by single-molecule force spectroscopy. *Nanoscale* 5:3673–3680. <http://dx.doi.org/10.1039/c2nr32821f>.
 85. Juillerat A, Lewit-Bentley A, Guillotte M, Gangnard S, Hessel A, Baron B, Vigan-Womas I, England P, Mercereau-Puijalon O, Bentley GA. 2011. Structure of a *Plasmodium falciparum* PfEMP1 rosetting domain reveals a role for the N-terminal segment in heparin-mediated rosette inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:5243–5248. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1018692108>.
 86. Ranjan A, Chitnis CE. 1999. Mapping regions containing binding resi-

- dues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **96**: 14067–14072. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.24.14067>.
87. Glauser BF, Pereira MS, Monteiro RQ, Mourao PA. 2008. Serpin-independent anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate. Thromb. Haemost. **100**:420–428. <http://dx.doi.org/10.1160/TH08-04-0210>.
88. Pacheco RG, Vicente CP, Zancan P, Mourao PA. 2000. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. Blood Coagul. Fibrinolysis **11**:563–573. <http://dx.doi.org/10.1097/00001721-200009000-00009>.
89. Mourao PA, Boisson-Vidal C, Tapon-Brethaudiere J, Drouet B, Bros A, Fischer A. 2001. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Thromb. Res. **102**:167–176. [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00230-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00230-4).
90. Fonseca RJ, Mourao PA. 2006. Fucosylated chondroitin sulfate as a new oral antithrombotic agent. Thromb. Haemost. **96**:822–829. <http://dx.doi.org/10.1160/TH06-06-0304>.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

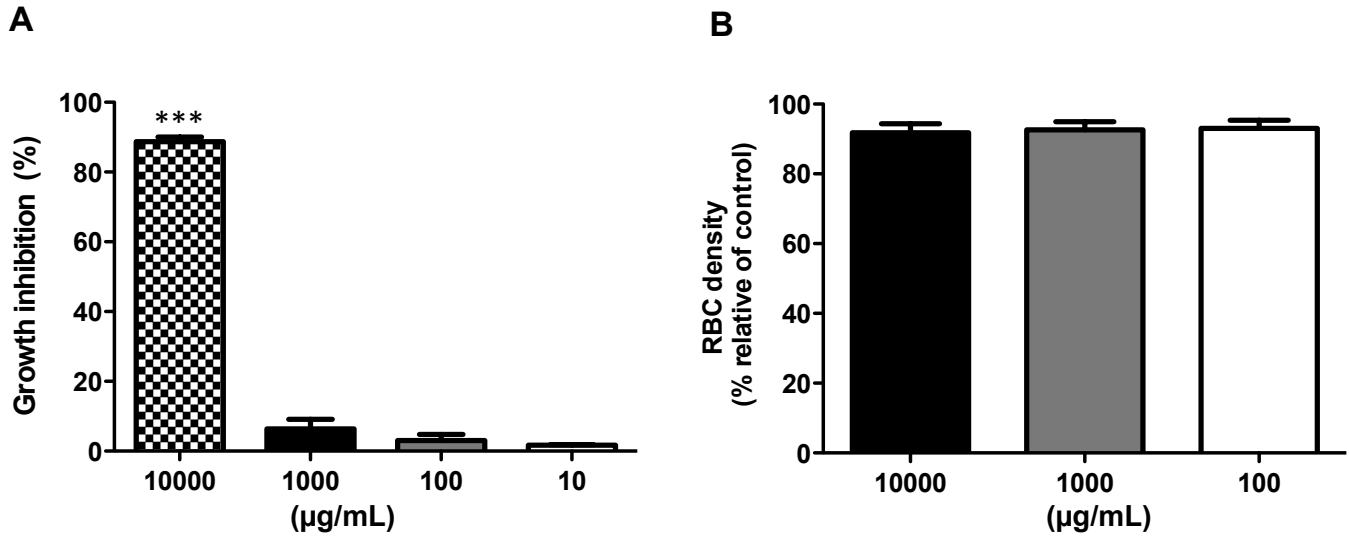


FIG S1. FucCS cytotoxic effects. HepG2 cells (A) or non-infected erythrocytes (niEs) (B) were incubated during 48 h at 37°C with increased concentrations of FucCS. As control, cells were incubated in RPMI medium only. Growth inhibition of HepG2 cells was evaluated by means of MTT assay and calculated in relation to control. Red blood cell density (RBCD) was determined as a percentage relative to control. In both cases results are expressed as the mean of triplicates \pm SD. *** $P < 0.001$ (t-test).

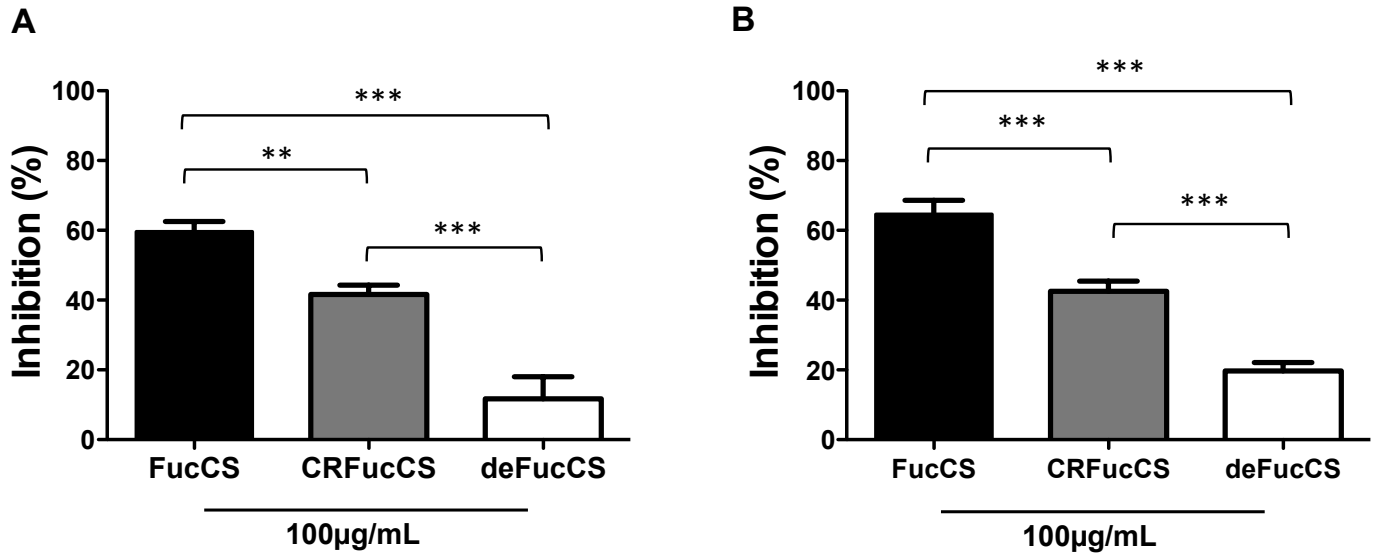


FIG S2. Effects of native FucCS and its modified forms on monophenotypic parasites. Pf-iEs^{ICAM} (A), Pf-iEs^{CD36} (B) were left during 1 h at 37°C on HLECs with 100 μg/mL of native FucCS; defucosylated FucCS (deFucCS); or carboxy-reduced FucCS (CRFucCS) addition or not (control). Inhibition was determined in Giemsa stained slides as a percentage, relative to control, and results are expressed as the mean ± SD of four wells ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (ANOVA test).

CAPÍTULO 2

**“Effect of a new heparan sulfate from the mollusk
Nodipecten nodosus on *Plasmodium falciparum*
cytoadhesion and merozoite invasion”**

Marcele F. Bastos, Letusa Albrecht, Angélica M. Gomes, Stefanie C. P. Lopes,
Cristina P. Vicente, Claudio C. Werneck, Paulo A. S. Mourão,
Mauro S. G. Pavão and Fabio T. M. Costa

Artigo escrito conforme as normas da revista *PLoS One*

Effect of a new heparan sulfate from the mollusk *Nodipecten nodosus* on *Plasmodium falciparum* cytoadhesion and merozoite invasion

Marcele F. Bastos¹, Letusa Albrecht², Angélica M. Gomes³, Stefanie C. P. Lopes⁴, Cristina P. Vicente⁵, Claudio C. Werneck⁶, Paulo A. S. Mourão³,
Mauro S. G. Pavão³ and Fabio T. M. Costa^{1*}

¹ Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

² Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Curitiba, PR, Brazil.

³ Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴ Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil.

⁵ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

⁶ Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author

Email: costaftm@unicamp.br or fabiotmc72@gmail.com.br (FTMC)

Abstract

Severe human malaria is marked by an excessive sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected (Pf-iEs) and uninfected erythrocytes in vital organs. This sequestration contributes to the pathogenesis of severe malaria syndromes such as cerebral malaria (CM), severe respiratory distress, severe anemia and malaria in pregnancy (MiP). Despite treatment with effective antimalarial drugs, high mortality is still observed in severe cases of the disease. Therefore, the use of adjunct therapies has been suggested. Accordingly, sulfated polysaccharides, such as heparin, have been shown to prevent *P. falciparum* cytoadherence to several host receptors, inhibit merozoite invasion and disrupt rosettes. Heparin was used in the past as treatment for severe malaria, however its use was abandoned due to the occurrence of serious side effects such as bleeding. The present work focused on the effect of a unique heparan sulfate (HS) from the bivalve mollusk *Nodipecten nodosus* on *P. falciparum* cytoadhesion and development. Mollusk HS showed to be effective in inhibiting *P. falciparum* cytoadherence to human lung endothelial cells (HLEC) under static and flow conditions. In addition, this glycan efficiently blocked merozoite invasion and disrupted rosettes. These findings open perspective to use mollusk HS for adjunct therapy in severe malaria.

Introduction

The main serious syndromes observed in *P. falciparum* infections include cerebral malaria (CM), severe respiratory distress and severe anemia [1]. Malaria in pregnancy (MiP) is also an important form of severe disease, affecting 125 million women each year and leading 200,000 children to death [2,3]. Disease severity magnitude varies depending on the amount of *P. falciparum*-infected erythrocytes (Pf-iEs) binding to the vascular endothelium (cytoadherence), and to infected and uninfected erythrocytes (rosetting and auto-agglutination) [4-8]. Thus, it is supposed that sequestration of Pf-iEs in the microvasculature of several organs involves a sequence of events that contributes to the pathogenesis of severe malaria [4,9]. Cytoadhesion is mediated mainly by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), a highly polymorphic protein, expressed at the surface of Pf-iEs [10-12]. This protein interacts with several host receptors on endothelial and red blood cells [13-15], including ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) [16]; CSA (Chondroitin Sulfate A) [17,18]; CD36 (Cluster of Differentiation 36) [19] and EPCR (Endothelial Protein C Receptor) [20].

Despite treatment with effective antimalarial drugs, high mortality is still observed in severe cases of the disease [21,22]. In addition, some of the children who survive from severe malaria present neurological damage and can maintain long-term cognitive deficits [23-27]. Thus, it is possible that strategies focusing only on parasite elimination are not sufficient to prevent neurological complications and death in severe malaria. Based on this, the use of adjunct therapies has been proposed. Accordingly, sulfated polysaccharides, such

as heparin, dextran sulfate, fucoidan and fucosylated chondroitin sulfate have been shown to prevent *P. falciparum* cytoadherence to several host receptors [28-30]. In addition, sulfated polysaccharides, including heparin, also inhibit merozoite invasion [28,31-33] and disrupt rosettes [34-36]. Heparin was used in the past as treatment for severe malaria, however its use was discontinued due to the occurrence of serious side effects such as bleeding [37-39]. Indeed, although many compounds have been tested, none demonstrated unequivocal evidence of prevention and treatment improvement of severe malaria in clinical trials [40,41].

In recent studies, we described a new heparan sulfate (HS) isolated from the mollusk bivalve *Nodipecten nodosus* [42,43]. This sulfated glycan, an heparin analogue, exhibits anticoagulant and antithrombotic activity without inducing bleeding [43]. Moreover, we have demonstrated that mollusk HS inhibits P-selectin-mediated events such as metastasis and inflammatory cell recruitment [42]. Here, we show that mollusk HS inhibited *P. falciparum* cytoadherence, under static and flow conditions, to human lung endothelial cells (HLECs). Importantly, the compound also efficiently blocked parasite reinvasion and disrupted rosettes.

Material and Methods

Isolation of HS from *N. nodosus*

Adult specimens of the bivalve mollusk *N. nodosus* (Linnaeus 1778) were collected from Baia da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil. The polysaccharides were extracted by protease digestion and purified as previously described [42,43]. As shown in Fig. 1, HS is formed by glucuronic acid and glucosamine and can also contain a rare sulfation pattern on carbon 2 or 3 of the glucuronic acid units [43].

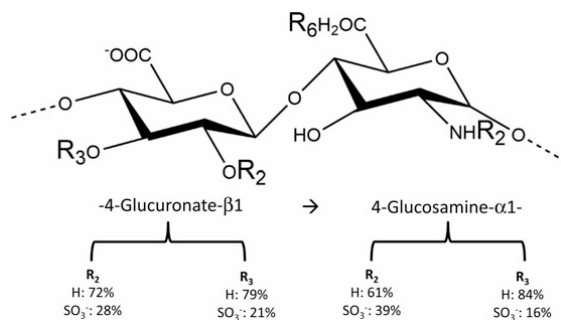


Fig. 1. Chemical structure of the mollusk heparan sulfate (HS). Major disaccharide unit of the mollusk *N. nodosus* HS [44].

Cytotoxicity assays

The mollusk HS cytotoxicity assay was performed as previously described [30]. Briefly, non-infected erythrocytes (niEs) were incubated in the presence or absence (control) of mollusk HS. After 48 h incubation at 37°C under conditions similar to those used for *P. falciparum* growth, red blood cell density (RBCD) was determined by counting the intact cells in a Neubauer chamber. The percentage of RBCD, relative to 0 h, was

calculated with the following formula: % RBCD = [1 - (n° niEs treated with mollusk HS/n° niEs not treated)] x 100. Nontoxic samples were those in which no significant inhibition of RBCD relative to controls was observed.

Cultivation of laboratory strains of *P. falciparum*-infected erythrocytes and endothelial cells

In this work, we used *P. falciparum* FCR3 [45,46] and FCR3S1.2 [47] strains. FCR3S1.2 is a highly rosetting and auto-agglutinating parasite, kindly provided by Dr. Mats Wahlgren (Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden). The rosetting rate was kept at >75% by centrifugation on Ficoll-Paque™ (GE, Germany) as previously described [47]. *P. falciparum* strains were cultured in fresh O⁺ human type erythrocytes (Blood Center, Universidade Estadual de Campinas) and suspended at 4% final hematocrit in complete parasite medium (RPMPI-1640 supplemented with L- glutamine, 25 mM HEPES, 2 g/L glucose and 10% homologous human plasma, pH 7.4) [48].

In this study were used human lung endothelial cells (HLECs) [49,50] adapted to culture from primary explants. HLEC and FCR3 parasites were kindly donated by Profs. Jürg Gysin and Artur Scherf (Institute Pasteur; Paris, France).

Static cytoadhesion assay

We assessed the ability of mollusk HS to inhibit the adhesion of Pf-iEs to human lung endothelial cells (HLECs) by performing static cytoadhesion assays, as described elsewhere [17,51-53] with minor modifications. Briefly, HLECs (5x10⁴ cells) were grown

to confluence on 8-well culture slides (0.69 cm² each well; Becton & Dickinson). We then added 5x10⁴ VoluvenTM-enriched Pf-iEs per well in a total volume of 300 µL of cytoadhesion medium (RPMI-1640, pH 6.8), alone or in the presence of increased concentrations of mollusk HS. Culture slides were incubated for 1 h at 37°C, and then extensively washed in cytoadhesion medium. The slides were fixed and stained with Giemsa and the number of Pf-iEs adhered to the endothelial monolayer was counted in an optical microscope (100x). The percent inhibition, relative to control (medium) values, was determined.

Flow-based cytoadhesion assay

The ability of mollusk HS to desegregate Pf-iEs was assessed through flow-based cytoadhesion assays, as previously described [45,49]. Briefly, HLECs (5x10⁵) were cultured to confluence in single-well culture slides (8.6 cm²; Becton & Dickinson, USA). Then, 5x10⁵ Pf-iEs were added to the culture slides and left to cytoadhere statically. After 1 h of incubation at 37°C, culture slides were mounted in a flow chamber system (Immunitics). Cytoadhesion medium (control) or mollusk HS (100 µg/mL) were circulated at a shear stress of 0.09, 0.36 and 1.44 Pascal (Pa), for 10, 5 and 2.5 min, respectively. The remaining Pf-iEs adherents per mm² were counted in 30 randomly chosen fields that were captured using a 5.0-megapixel digital camera (Motic, Motacam 2500TM) adapted to an inverted microscope.

Rosette disruption assay

This assay was performed essentially as previously described [34]. Briefly, different concentrations of mollusk HS or heparin (Calbiochen, China) were added to 18 μ L aliquots of a rosetting FCR3S1.2 culture in a 96-well microtiter plate, which was then incubated for 1 h at 37°C. A rosette is scored when a parasitized cell binds to at least two non-infected erythrocytes. Rosetting was assessed after acridine orange (Sigma-Aldrich, USA) staining. The percent rosetting, relative to the control (medium), was expressed as (number of rosette-forming late-stage Pf-iEs/total number of late-stage Pf-iEs) x 100.

Growth inhibition assays (GIAs)

The effects of mollusk HS and heparin on Pf-iEs development was assessed by growth inhibition assays (GIAs) [54]. Briefly, synchronized young-stage forms (<24 h) of *P. falciparum* cultures with 0.8% parasitemia and 2% hematocrit levels were grown for 24 or 48 h at 37°C in a 96-well microtiter plate in the presence of increasing concentrations of heparin and mollusk HS. In order to quantify the parasitemia, samples were stained for 10 min with Sybr® Green (Applied Biosystems, Paisley, UK) and then analyzed using a FACS Calibur instrument from Becton Dickinson (Mountain View, California, USA). A minimum of 100,000 cells per sample was collected. Parasite growth inhibition was expressed as a percentage relative to control (medium).

Merozoite invasion inhibition assay

The merozoite invasion inhibition assay with mollusk HS, or heparin, was performed as previously described [31] with modifications. In short, synchronized late-

stage forms (>24 h) of *P. falciparum* cultures were grown for 24-30 h at 37°C in a 96-well microtiter plate with increasing concentrations of mollusk HS or heparin; and parasite invasion inhibition was determined as described for GIAs.

Statistical analysis

Statistical significance was determined using one-way analysis of variance or Student's *t* test for parametric data. Kruskal-Wallis and post hoc tests or Mann-Whitney's *U* test were used for non-parametric data. All statistical analyses were performed using Prism™ version 5.02 (GraphPad software, USA), and values were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Cytotoxic effect

To evaluate the cytotoxic effect of HS extracted from the *N. nodosus* on non-infected erythrocytes (niEs), different concentrations of mollusk HS were incubated with niEs for 48 h. As shown in Fig. 2, no significant ($P > 0.05$) effect on niEs was observed at any of the tested doses (1,000, 100, 10 and 1 µg/mL). Thus, these doses were used on the following assays.

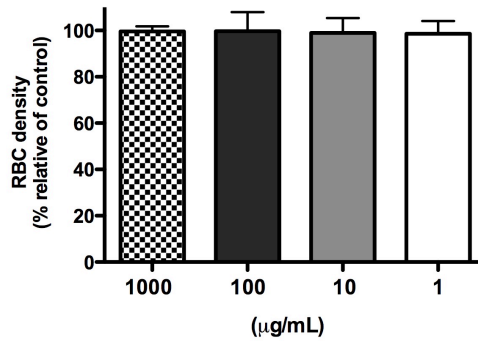


Fig. 2. Mollusk HS cytotoxic effect. Non-infected erythrocytes (niEs) were incubated during 48 h at 37° with increased concentrations of mollusk HS. As control, cells were incubated in RPMI medium only. Red blood cell density (RBCD) was determined as a percentage relative to control. Results are expressed as the mean of triplicates ± SD.

Effects of mollusk HS on *P. falciparum* cytoadherence and rosetting *in vitro*

It is believed that parasite cytoadherence is critical to falciparum malaria pathogenesis [9]. Based on this, and on the ability of heparin and other sulfated glycoconjugates in inhibiting *P. falciparum* cytoadhesion, we evaluated the ability of mollusk HS to block *P. falciparum* cytoadhesion to endothelial cells (Fig. 3). The mollusk glycan was highly efficient in inhibiting *P. falciparum* cytoadherence to HLECs, exhibiting a dose dependent effect. This compound reached 86% inhibition at the highest dose (1,000 µg/ml) and 39% at the lowest dose (1 µg/ml).

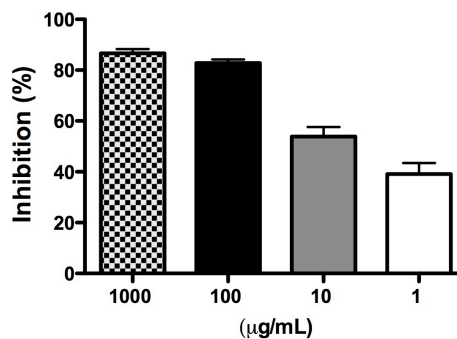


Fig.3. Effect of mollusk HS on cytoadhesion of *P. falciparum* laboratory strain (FCR3) to HLECs. *P. falciparum* laboratory strain were incubated for 1 hour at 37°C on 8-well culture slides containing HLECs in the presence, or absence (control), of different concentrations of mollusk HS. Slides were extensively washed and bound Pf-iEs were counted after Giemsa staining. Inhibition was determined as a percentage relative to control values, and results are expressed as the means \pm SD of four wells.

Having demonstrated the ability of mollusk HS to prevent parasite binding under static conditions, we investigated if the compound was able to reverse parasite cytoadhesion to HLECs under flow conditions mimicking blood flow. For this, binding parasites were submitted to different shear stress in the presence or absence of 100 μ g/ml of mollusk HS. As seen in Fig. 4, mollusk HS significantly ($P < 0.05$) reversed *P. falciparum* FCR3 adhesion when compared to control in all shear stress tested.

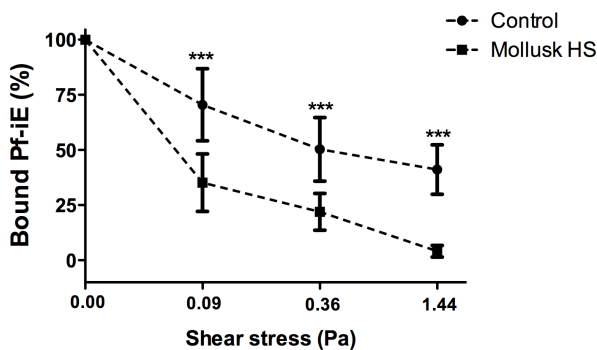


Fig. 4. Mollusk HS unbound adhered Pf-iEs on HLECs under flow conditions. Cytoadhesion medium (control) or mollusk HS (100 μ g/mL) were flowed through single-well culture slides containing HLECs with adhered Pf-iEs under increasing shear stress conditions (0.09, 0.36, and 1.44 Pa). Data are expressed as percentage, relative to the adhesion at 0.00 Pa (control). Remaining bound Pf-iEs were counted in 30 randomly selected fields*** $P < 0.001$ (Mann-Whitney test).

We also evaluated the effect of mollusk HS in disrupting *P. falciparum* FCR3S1.2 rosettes (Fig. 5). Mollusk HS and heparin disrupted rosettes in a dose dependent manner and

presented very similar effect. For both compounds, almost total disruption was reached at 1,000 µg/ml.

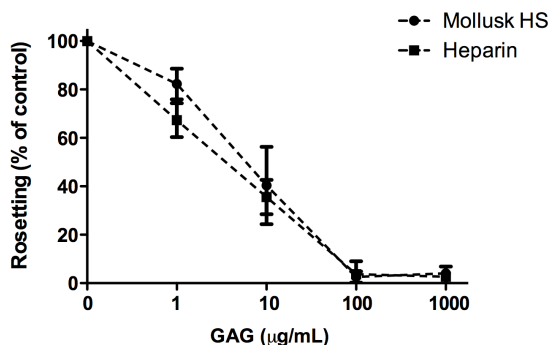


Fig. 5. Mollusk HS disrupts *P. falciparum* rosettes. Rosetting parasite cultures (FCR3S1.2) were incubated during 1 hour with, or without (control) mollusk HS or heparin, at various concentrations. Percentage of rosetting, relative to control, was expressed as (number of rosette-forming late-stage Pf-iEs)/(total number of late-stage Pf-iEs) X 100. Results are expressed as the means \pm SD of three independent assays.

Effects of mollusk HS on *P. falciparum* growth and merozoite invasion *in vitro*

Studies have shown that heparin and other sulfated polysaccharides may inhibit *P. falciparum* development *in vitro* [28,33,36,55,56]. Thus, we investigated the effect of mollusk HS on parasite development. For this purpose, *P. falciparum* FCR3 blood forms were incubated with increasing concentrations of mollusk HS or heparin for approximately 48 h. As show in Fig. 6A, the mollusk glycan exhibited a very efficient inhibitory effect in a dose dependent manner, similar to heparin. At highest doses, 1,000 and 100 µg/ml, the compound reached 84% and 63% of parasite development inhibition respectively. To investigate the possibility that the inhibitory effect of mollusk HS on parasite development was due to detrimental effect of this compound on the growth of intra-erythrocytic parasites, ring stage

parasites were cultured for 24h in the presence of increased concentrations of mollusk HS and heparin. We found that both, mollusk HS and heparin, had no significant effect on the growth of intra-erythrocytic parasites (Fig. 6B).

Based on this result, and assuming that mollusk HS affects *P. falciparum* development, we evaluated the effect of this compound on merozoite invasion of non-infected erythrocytes (niEs). As observed in Fig. 6C, the result of merozoite invasion inhibition in the presence of mollusk HS was similar to that observed in the parasite development assay (Fig. 6A), especially at higher doses (1,000 and 100 $\mu\text{g/ml}$). Thus, we observed that both, mollusk HS and heparin, blocked merozoite invasion in a dose-dependent manner and reached up to 91 and 70% inhibition respectively at the higher dose (1,000 $\mu\text{g/ml}$).

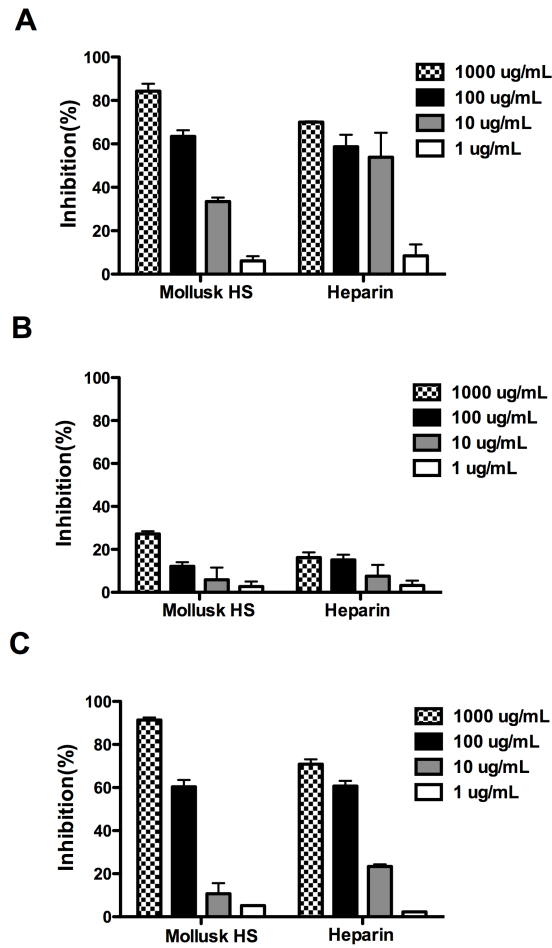


Fig. 6. Mollusk HS inhibits *P. falciparum* growth (GIA) and merozoite invasion. Ring synchronized *P. falciparum*-infected erythrocytes (A e B) or late-stage forms (trophozoites) (C) cultured at 0.8% parasitemia and 2% hematocrit were incubated at 37°C for 48h (A) or 24h (B e C) with increasing concentrations of mollusk HS or heparin. As control, parasites were grown in RPMI 1640 medium. The percentage of growth inhibition was calculated relative to control values, and results are expressed as the means \pm SD of triplicates.

Discussion

Here we showed the efficient inhibition of *P. falciparum* cytoadhesion to endothelial cells, the rosetting disruption ability and the inhibition of merozoite invasion by unique HS extracted from the mollusk *Nodipecten nodosus*. These results suggest that mollusk HS may be valuable as adjunct treatment for severe malaria.

Mollusk HS demonstrated no toxicity against non-infected erythrocytes (niEs) in any concentrations tested in this work (Fig. 2). The concentrations were selected based on previously reported studies performed *in vitro* [57-59].

We have shown before that fucosylated chondroitin sulfate, a sulfated polysaccharide, extracted from an invertebrate inhibits *P. falciparum* cytoadherence and disrupts rosettes [30]. Covering that, with the importance of *P. falciparum* sequestration to pathophysiologic process of severe malaria [4,60], and a better knowledge about its mechanisms, encouraged us to search for new anti-sequestration compounds. In fact, several sulfated polysaccharides such as heparin, are able to inhibit and reverse parasite cytoadherence [28-30,57,61]. Thus, the potent mollusk heparin analog effect in inhibiting Pf-iEs cytoadhesion under static (Fig. 3) and flow conditions (Fig. 4) seems interesting since therapeutic approaches that interfere with parasite sequestration has potential to attenuate microvascular obstruction [8] and could ameliorate the pathophysiological events of severe malaria [62].

Furthermore, a recent study [63] has shown that *in vitro* cytoadherence of Pf-iEs continues for several hours after parasite killing by antimalarial drugs, as a result of slow degradation of PfEMP-1 on the surface of Pf-iEs [63]. This ability may contribute to

malaria pathology after antimalarial treatment and could in part explain the high mortality rate in the first 24 hours after hospital admission [63]. Accordingly, it is conceivable that the observed phenomenon could be targeted by adjunct therapies capable of preventing or preferably reversing cytoadhesion [63], as observed here *in vitro* by mollusk HS.

Rosetting have been associated with malaria severity [64,65], and its disruption by heparin, HS, low anticoagulant heparin (LAH) and other sulfated polysaccharides is well described in several studies [30,57,59,66,67]. Here, when comparing rosette disruption data between heparin and mollusk HS (Fig. 5), we observed a very similar effect between them. Actually, heparin effect in rosette disruption is well known and described in the literature [57], confirming our results. Moreover, heparin was the unique sulfated polysaccharide previously used in the treatment of severe malaria [38,68,69], but it was later abandoned because of its strong anticoagulant activity, which results in side effects such as intracranial bleedings [39].

Besides the anti-sequestration properties, mollusk HS was able to inhibit *P. falciparum* development. We discovered that mollusk HS blocked parasite development (Fig. 6A) by interfering with merozoite invasion (Fig. 6C) and not with parasite development from young- to late-stage (Fig. 6B). Actually, the effect of sulfated polysaccharides on merozoite invasion has been previously reported [28,30,31,33,57]. Despite that, the exact mechanism involved in the inhibition of merozoite invasion by sulfated polysaccharides is not well understood, it seems to involve the interactions between parasite invasion proteins with sulfated proteoglycans present on the erythrocytes surface [70,71]. Accordingly, some studies have shown that heparin interacts with invasion proteins such as MSP-1 and EBA-140 [71-73]. Thus, it will be interesting to explore the

mechanisms by which mollusk HS inhibits *P. falciparum* invasion, as well as its involvement in rosette disruption and cytoadherence inhibition. Thus, heparin and heparin-like compounds might share similar mechanisms.

In addition to the effects shown here, it is important to highlight that the mollusk glycan does not induce the hemorrhagic effects observed in mammalian heparin [43]. Also, different from heparin which is obtained from mammals, mollusk HS is extracted from a marine invertebrate, thus avoiding the risk of contamination by pathogens [74-76]. In fact, polysaccharides from marine sources are currently gaining popularity for their medical potential and therapeutic applications [77].

Furthermore, the technical and economic possibility of obtaining very large quantities of the compound is of paramount importance. The mollusk HS is isolated at reasonable yields by procedures similar to those already employed in the preparation of pharmaceutical heparin [43]. Several species of mollusks, including those containing high quantities of heparin analogs, have been successfully cultivated in different parts of the world [43], which facilitates the commercial exploitation of the mollusk glycan.

Overall, the present work demonstrated that a unique heparan sulfate from the mollusk *N. nodosus* inhibits merozoite invasion, parasite cytoadhesion and disrupts rosettes. Since severe malaria is usually associated with *P. falciparum* cytoadhesion events, we suggest that the mollusk HS is an attractive candidate to be tested as adjunct therapy in severe malaria.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant # 2012/16525-2) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). MFB was supported by a FAPESP fellowship (grant # 2010/18751-6). FTMC, CCW, CPV, PASM, and MSGP are CNPq research fellows.

References

1. Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, et al. (1995) Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med* 332: 1399-1404.
2. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI (2005) The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434: 214-217.
3. Dellicour S, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW, ter Kuile FO (2010) Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLoS Med* 7: e1000221.
4. White NJ, Turner GD, Day NP, Dondorp AM (2013) Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J Infect Dis* 208: 192-198.
5. Cunnington AJ, Riley EM, Walther M (2013) Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. *Trends Parasitol* 29: 585-592.
6. Handunnetti 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: 928-932.

7. Ho M, White NJ (1999) Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol* 276: C1231-1242.
8. 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* 11: e16.
9. (2014) Severe malaria. *Trop Med Int Health* 19 Suppl 1: 7-131.
10. Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, Lavstsen T (2013) Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell Microbiol* 15: 1976-1983.
11. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, et al. (1995) Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82: 77-87.
12. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, et al. (1995) The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell* 82: 89-100.
13. David PH, Hommel M, Miller LH, Udeinya IJ, Oligino LD (1983) Parasite sequestration in Plasmodium falciparum malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5075-5079.
14. Roberts DJ, Pain A, Kai O, Kortok M, Marsh K (2000) Autoagglutination of malaria-infected red blood cells and malaria severity. *Lancet* 355: 1427-1428.
15. Normark J, Nilsson D, Ribacke U, Winter G, Moll K, et al. (2007) PfEMP1-DBL1alpha amino acid motifs in severe disease states of Plasmodium falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15835-15840.

16. Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K (1989) Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. *Nature* 341: 57-59.
17. Robert C, Pouvelle B, Meyer P, Muanza K, Fujioka H, et al. (1995) Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Res Immunol* 146: 383-393.
18. Rogerson SJ, Chaiyaroj SC, Ng K, Reeder JC, Brown GV (1995) Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med* 182: 15-20.
19. Ockenhouse CF, Tandon NN, Magowan C, Jamieson GA, Chulay JD (1989) Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. *Science* 243: 1469-1471.
20. Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JE, et al. (2013) Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*.
21. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N (2005) Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet* 366: 717-725.
22. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, et al. (2010) Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet* 376: 1647-1657.
23. Brewster DR, Kwiatkowski D, White NJ (1990) Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet* 336: 1039-1043.
24. Boivin MJ (2002) Effects of early cerebral malaria on cognitive ability in Senegalese children. *J Dev Behav Pediatr* 23: 353-364.

25. Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, et al. (2007) Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics* 119: e360-366.
26. Carter JA, Mung'ala-Odera V, Neville BG, Murira G, Mturi N, et al. (2005) Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 476-481.
27. John CC, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, et al. (2008) Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics* 122: e92-99.
28. Xiao L, Yang C, Patterson PS, Udhayakumar V, Lal AA (1996) Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes. *Infect Immun* 64: 1373-1378.
29. Andrews KT, Klatt N, Adams Y, Mischnick P, Schwartz-Albiez R (2005) Inhibition of chondroitin-4-sulfate-specific adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by sulfated polysaccharides. *Infect Immun* 73: 4288-4294.
30. Bastos MF, Albrecht L, Kozlowski EO, Lopes SC, Blanco YC, et al. (2014) Fucosylated chondroitin sulfate inhibits *Plasmodium falciparum* cytoadhesion and merozoite invasion. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 1862-1871.
31. Kulane A, Ekre HP, Perlmann P, Rombo L, Wahlgren M, et al. (1992) Effect of different fractions of heparin on *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 46: 589-594.
32. Chen JH, Lim JD, Sohn EH, Choi YS, Han ET (2009) Growth-inhibitory effect of a fucoidan from brown seaweed *Undaria pinnatifida* on *Plasmodium* parasites. *Parasitol Res* 104: 245-250.

33. Clark DL, Su S, Davidson EA (1997) Saccharide anions as inhibitors of the malaria parasite. *Glycoconj J* 14: 473-479.
34. Carlson J, Wahlgren M (1992) Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *J Exp Med* 176: 1311-1317.
35. Rogerson SJ, Reeder JC, al-Yaman F, Brown GV (1994) Sulfated glycoconjugates as disrupters of Plasmodium falciparum erythrocyte rosettes. *Am J Trop Med Hyg* 51: 198-203.
36. Evans SG, Morrison D, Kaneko Y, Havlik I (1998) The effect of curdlan sulphate on development in vitro of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 87-89.
37. Munir M, Tjandra H, Rampengan TH, Mustadjab I, Wulur FH (1980) Heparin in the treatment of cerebral malaria. *Paediatr Indones* 20: 47-50.
38. Rampengan TH (1991) Cerebral malaria in children. Comparative study between heparin, dexamethasone and placebo. *Paediatr Indones* 31: 59-66.
39. (1986) Severe and complicated malaria. World Health Organization Malaria Action Programme. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80 Suppl: 3-50.
40. John CC, Kutamba E, Mugarura K, Opoka RO (2010) Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of Plasmodium falciparum malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 997-1008.
41. Mishra SK, Newton CR (2009) Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. *Nat Rev Neurol* 5: 189-198.
42. Gomes AM, Kozłowski EO, Borsig L, Teixeira FC, Vlodaysky I, et al. (2014) Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin analog from the mollusk Nodipecten

nodosus: Effect on P-selectin, heparanase, metastasis and cellular recruitment. Glycobiology.

43. Gomes AM, Kozłowski EO, Pomin VH, de Barros CM, Zaganeli JL, et al. (2010) Unique extracellular matrix heparan sulfate from the bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) safely inhibits arterial thrombosis after photochemically induced endothelial lesion. *J Biol Chem* 285: 7312-7323.
44. (!!! INVALID CITATION !!!).
45. Avril M, Traore B, Costa FT, Lepolard C, Gysin J (2004) Placenta cryosections for study of the adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A in flow conditions. *Microbes Infect* 6: 249-255.
46. Lekana Douki JB, Traore B, Costa FT, Fusai T, Pouvelle B, et al. (2002) Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood* 100: 1478-1483.
47. Fernandez V, Treutiger CJ, Nash GB, Wahlgren M (1998) Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 66: 2969-2975.
48. Moll K, Ljungström I, Perlmann P, Scherf A, Wahlgren M (2008) *Methods in Malaria Research*, 5th ed. MR4/ATCC Manassas, Virginia. <http://www.mr4.org/Publications/MethodsInMalariaResearch/tabid/333/Default.aspx>.

49. Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, et al. (2010) On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 202: 638-647.
50. Muanza K, Gay F, Behr C, Scherf A (1996) Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadherence. *Res Immunol* 147: 149-163.
51. Gay F, Robert C, Pouvelle B, Peyrol S, Scherf A, et al. (1995) 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* 184: 15-28.
52. Costa FT, Fusai T, Parzy D, Sterkers Y, Torrentino M, et al. (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: 153-164.
53. Pouvelle B, Traore B, Nogueira PA, Pradines B, LePolard C, et al. (2003) Modeling of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadhesion in microvascular conditions: chondroitin-4-sulfate binding, A competitive phenotype. *J Infect Dis* 187: 292-302.
54. Rieckmann KH, Campbell GH, Sax LJ, Mrema JE (1978) Drug sensitivity of plasmodium falciparum. An in-vitro microtechnique. *Lancet* 1: 22-23.
55. Butcher GA, Parish CR, Cowden WB (1988) Inhibition of growth in vitro of Plasmodium falciparum by complex polysaccharides. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82: 558-559.
56. Havlik I, Rovelli S, Kaneko Y (1994) The effect of curdlan sulphate on in vitro growth of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 686-687.

57. Vogt AM, Pettersson F, Moll K, Jonsson C, Normark J, et al. (2006) Release of sequestered malaria parasites upon injection of a glycosaminoglycan. *PLoS Pathog* 2: e100.
58. Vogt AM, Barragan A, Chen Q, Kironde F, Spillmann D, et al. (2003) Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes via the DBL1alpha domain of PfEMP1. *Blood* 101: 2405-2411.
59. Leitgeb AM, Blomqvist K, Cho-Ngwa F, Samje M, Nde P, et al. (2011) Low anticoagulant heparin disrupts *Plasmodium falciparum* rosettes in fresh clinical isolates. *Am J Trop Med Hyg* 84: 390-396.
60. Marchiafava, Bignami (1894) On summer-autumn malarial fevers. Two monographs on malaria and the parasites of malarial fevers (translated from the first Italian edition by JH Thompson). London: New Sydenham Society. pp. 1-234.
61. Pouvelle B, Meyer P, Robert C, Bardel L, Gysin J (1997) Chondroitin-4-sulfate impairs in vitro and in vivo cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Med* 3: 508-518.
62. Land KM, Sherman IW, Gysin J, Crandall IE (1995) Anti-adhesive antibodies and peptides as potential therapeutics for *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitol Today* 11: 19-23.
63. Hughes KR, Biagini GA, Craig AG (2010) Continued cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells after antimalarial treatment. *Mol Biochem Parasitol* 169: 71-78.

64. Doumbo OK, Thera MA, Kone AK, Raza A, Tempest LJ, et al. (2009) High levels of *Plasmodium falciparum* rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg* 81: 987-993.
65. Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K (1995) *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun* 63: 2323-2326.
66. Carlson J, Ekre HP, Helmby H, Gysin J, Greenwood BM, et al. (1992) Disruption of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes by standard heparin and heparin devoid of anticoagulant activity. *Am J Trop Med Hyg* 46: 595-602.
67. Rowe A, Berendt AR, Marsh K, Newbold CI (1994) *Plasmodium falciparum*: a family of sulphated glycoconjugates disrupts erythrocyte rosettes. *Exp Parasitol* 79: 506-516.
68. Jaroovvesama N (1972) Intravascular coagulation in falciparum malaria. *Lancet* 1: 221-223.
69. Smitskamp H, Wolthuis FH (1971) New concepts in treatment of malignant tertian malaria with cerebral involvement. *Br Med J* 1: 714-716.
70. Recuenco FC, Kobayashi K, Ishiwa A, Enomoto-Rogers Y, Fundador NG, et al. (2014) Gellan sulfate inhibits *Plasmodium falciparum* growth and invasion of red blood cells in vitro. *Sci Rep* 4: 4723.
71. Boyle MJ, Richards JS, Gilson PR, Chai W, Beeson JG (2010) Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood* 115: 4559-4568.
72. Kobayashi K, Kato K, Sugi T, Takemae H, Pandey K, et al. (2010) *Plasmodium falciparum* BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. *J Biol Chem* 285: 1716-1725.

73. Kobayashi K, Takano R, Takemae H, Sugi T, Ishiwa A, et al. (2013) Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep* 3: 3178.
74. Mourao PA, Giumaraes B, Mulloy B, Thomas S, Gray E (1998) Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *Br J Haematol* 101: 647-652.
75. Borsig L, Wang L, Cavalcante MC, Cardilo-Reis L, Ferreira PL, et al. (2007) Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *J Biol Chem* 282: 14984-14991.
76. Liu H, Zhang Z, Linhardt RJ (2009) Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat Prod Rep* 26: 313-321.
77. Pavao MS (2014) Glycosaminoglycans analogs from marine invertebrates: structure, biological effects, and potential as new therapeutics. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 123.

DISCUSSÃO

Mostramos nesse trabalho, que dois compostos sulfatados extraídos de invertebrados marinhos – o condroitim sulfato fucosilado (FucCS) e o heparam sulfato (HS) de molusco – foram capazes de inibir eficientemente a adesão de *P. falciparum* a células endoteliais em condições estáticas e de fluxo. Esses compostos também exibiram efeito importante no rompimento de rosetas e na inibição da invasão de merozoítos. Em particular, o FucCS inibiu a adesão de *P. falciparum* a criocortes de placenta, e a remoção das cadeias de fucose sulfatadas desse composto aboliu suas ações inibitórias. Assim, nossos resultados sugerem que o FucCS e o HS de molusco podem ser úteis como terapias adjuvantes no tratamento da malária grave.

Recentemente, polissacarídeos sulfatados com estruturas únicas e atividades farmacológicas têm sido descritos em diferentes invertebrados marinhos (Pavao, 2014). A estrutura química, atividades biológicas e seus mecanismos de ação têm sido estudados devido ao grande potencial desses compostos para uso em aplicações terapêuticas e medicinais (Pavao, 2014).

Assim, mostramos inicialmente que o FucCS e o HS de molusco exibiram baixa toxicidade nas concentrações utilizadas nos nossos experimentos. As concentrações foram selecionadas com base em estudos anteriores (Leitgeb et al., 2011; Vogt et al., 2003; Vogt et al., 2006).

Diversos estudos têm mostrado, que vários polissacarídeos sulfatados como a heparina, são capazes de inibir e reverter a citoaderência parasitária (Andrews et al., 2005; Bastos et al., 2014; Pouvelle et al., 1997; Vogt et al., 2006; Xiao et al., 1996). Dessa maneira,

a importância do sequestro de *P. falciparum* para o processo patofisiológico da malária grave (Marchiafava & Bignami, 1894; White et al., 2013) e o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na citoadesão parasitária, nos encorajou a buscar novos compostos com ação antiadesiva. Nesse sentido, demonstramos que tanto o FucCS quanto o HS de molusco inibiram a citoadesão de Pf-EIs em condições estáticas e de fluxo. Esses resultados são interessantes, uma vez que abordagens que interferem com o sequestro parasitário tem potencial para atenuar a obstrução microvascular (Rowe et al., 2009) e poderiam amenizar eventos fisiopatológicos da malária grave (Land et al., 1995).

Além disso, estudo recente (Hughes et al., 2010) mostrou *in vitro*, que a capacidade citoadesiva de *P. falciparum* é mantida por várias horas após a morte dos parasitos por diferentes antimaláricos. Essa habilidade seria resultado da degradação lenta da PfEMP-1 na superfície de Pf-EIs demonstrada por imunofluorescência, devido a estabilidade das alterações feitas pelo parasito aos eritrócitos do hospedeiro (Hughes et al., 2010). Assim, acredita-se que esta capacidade possa contribuir para a patogênese da malária após o tratamento antimalárico e poderia, em parte, explicar a alta taxa de mortalidade nas primeiras 24 horas após a internação hospitalar (Hughes et al., 2010). Conseqüentemente, sugere-se que o fenômeno observado poderia ser alvo de terapias adjuvantes capazes de prevenir ou preferencialmente reverter a citoadesão (Hughes et al., 2010), como observado *in vitro* para o HS de molusco e o FucCS.

Ainda nesse contexto, mostramos que o FucCS foi muito eficiente em inibir a adesão de Pf-EIs monofenotípicos (selecionados para aderir a CSA), à HLECs e a criocortes de placenta humana. Além disso, o FucCS foi capaz de prevenir a adesão e de remover Pf-EIs monofenotípicos aderidos a HLECs em condições de fluxo. De fato, a adesão de *P.*

falciparum a CSA está relacionada com aspectos patogênicos da malária na gravidez (MiP), como à acentuada resposta inflamatória do hospedeiro, que pode causar danos à placenta (Beeson et al., 2001; Duffy & Fried, 2005). Baseado nisso, o CSA já foi avaliado como tratamento adjuvante na malária durante a gravidez (Pouvelle et al., 1997), tendo em vista seu efeito inibitório *in vitro* e *in vivo* na citoaderência de Pf-EIs (Pouvelle et al., 1997).

Uma outra importante forma de adesão, as rosetas, tem sido associadas as síndromes graves da malária (Dumbo et al., 2009). Ainda, o efeito de polissacarídeos sulfatados, como heparina, HS, fucoidan no rompimento de rosetas tem sido reportados em diversos estudos (Bastos et al., 2014; Carlson et al., 1992; Leitgeb et al., 2011; Rowe et al., 1994; Vogt et al., 2006). Aqui, nós mostramos que o FucCS e o HS de molusco foram muito eficientes em romper rosetas e exibiram efeito semelhante ao da heparina.

De maneira geral, podemos afirmar que os efeitos do FucCS e do HS de molusco observados nesse trabalho foram muito similares aos da heparina, não só no rompimento de rosetas, mas também na citoadesão e invasão parasitária. De fato, o efeito da heparina no rompimento de rosetas é bem conhecido e descrito na literatura (Carlson et al., 1992; Vogt et al., 2006). Sua ação na citoadesão e na invasão também vem sendo reportada (Butcher et al., 1988; Carlson et al., 1992; Vogt et al., 2006; Xiao et al., 1996). Ainda, a heparina foi o único glicoconjugado sulfatado usado no passado no tratamento da malária grave (Munir et al., 1980; Rampengan, 1991; Sheehy & Reba, 1967), no entanto seu uso foi descontinuado devido a ocorrência de sérios efeitos colaterais, como hemorragias (WHO, 1986). Nesse sentido, tem sido mostrado que um derivado da heparina com baixa ação anticoagulante tem ação na citoadesão e invasão parasitária *in vitro* e é capaz de reverter o sequestro parasitário em

modelos *in vivo* (Vogt et al., 2006). Estudos clínicos com o derivado da heparina para uso como tratamento na malária estão em andamento (Patente N° WO2013095276A1).

Além das propriedades antiadesivas, o FucCS e o HS de molusco foram capazes de inibir o desenvolvimento de formas sanguíneas de *P. falciparum*. Assim, demonstramos que ambos os compostos bloquearam o desenvolvimento do parasita interferindo com a invasão dos merozoítos e não com o desenvolvimento do parasita do estágio jovem (anel) para o tardio. Na realidade, o efeito da heparina e de outros polissacarídeos sulfatados na inibição da invasão de merozoítos já foram anteriormente reportados (Bastos et al., 2014; Clark et al., 1997; Kulane et al., 1992; Vogt et al., 2006; Xiao et al., 1996). Em contraste, o CSA não demonstrou ter efeito inibitório significativo na invasão parasitária, exceto na maior dose testada. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Vogt et al., 2006; Xiao et al., 1996).

Apesar do mecanismo exato envolvido na inibição da invasão de merozoítos por polissacarídeos sulfatados não ser ainda bem compreendido, este parece envolver interações entre proteínas de invasão do parasita com proteoglicanos sulfatados presentes na superfície de eritrócitos (Boyle et al., 2010; Recuenco et al., 2014). Assim, alguns estudos mostraram que a heparina interage com proteínas de invasão, tais como a MSP-1, que é um dos principais candidatos vacinais para uma vacina contra malária e a EBA-140, também conhecida como BAEBL, que interage com o receptor glicoforina C presente na superfície dos eritrócitos (Boyle et al., 2010; Kobayashi et al., 2010; Kobayashi et al., 2013).

Nesse sentido, Boyle e colaboradores mostraram que uma forma processada da MSP-1 (proteína essencial para invasão), a MSP-42, tem capacidade de se ligar a heparina e parece ser o alvo de moléculas semelhantes a ela na mediação da inibição da invasão (Boyle et al.,

2010). Além disso, o nível de sulfatação demonstrou ser crucial para a atividade inibitória de moléculas semelhantes à heparina. O padrão de sulfatação também demonstrou ser importante pro processo (Boyle et al., 2010).

Desse maneira, como o FucCS e o HS de molusco compartilham efeitos similares ao da heparina, seria interessante explorar os mecanismos pelos quais esses compostos inibem a invasão de *P. falciparum*, e também o envolvimento no rompimento de rosetas e na inibição da citoaderência. É possível que a heparina e compostos relacionados partilhem mecanismos semelhantes.

Nesse sentido, acreditamos que essas análises poderiam ser iniciadas com ferramentas *in silico* e depois com ensaios funcionais. Mais especificamente, a ideia seria iniciar a análise investigando a interação dos compostos com a região RII das EBLs. A região RII está presente nas EBLs, proteínas pertencentes a uma importante família de proteínas adesivas expressas pelo parasito e que estão relacionadas com a invasão (Adams et al., 1992). Membros dessa família, como EBA-175, EBA-181, EBA-140 (Iyer et al., 2007) têm em sua estrutura uma região denominada RII, essencial para adesão a carboidratos e compostas por dois domínios DBL, uma região C-terminal rica em cisteína, e um domínio transmembrana (Ranjan & Chitnis, 1999). Na EBA-175 essa região é altamente conservada entre as diferentes linhagens (Liang & Sim, 1997). No entanto, a interação de proteínas de adesão expressas pelo parasito com carboidratos da superfície de células do hospedeiro não está limitada a invasão. A adesão de parasitas a células endoteliais e a eritrócitos não infectados (rosetas) ocorre através da PfEMP1, grupo de proteínas que também apresentam uma estrutura composta de domínios CIDR e domínios DBL, e que tem habilidade de interagir com diferentes receptores humanos, como ICAM-1 e CD36 (Kraemer & Smith, 2006).

Sendo assim, nós hipotetizamos que sendo o FucCS e o HS de molusco carboidratos, eles poderiam estar bloqueando a interação de proteínas de adesão e invasão compostas de domínios DBL com carboidratos expressos em células do hospedeiro. Isso ocorreria provavelmente através da ligação a regiões conservadas destas proteínas, tais como a região RII, essencial para a interação com carboidratos (Ranjan & Chitnis, 1999).

Um outro aspecto a ser discutido aqui, são os efeitos dos compostos modificados derivados do FucCS nativo. Nós observamos que principalmente o composto defucosilado (deFucCS) apresentou atividade significativamente menor que o composto nativo na inibição da citoadesão e da invasão parasitária e também no rompimento de rosetas. Isso demonstra a importância das cadeias de fucose sulfatadas presentes no FucCS nativo para ocorrência das ações inibitórias. De fato, isso corrobora observações anteriores que mostraram que a retirada das cadeias de fucose sulfatadas praticamente aboliram o efeito antitrombótico e anticoagulante do composto (Zancan & Mourao, 2004). Além disso, a presença destas cadeias foi essencial para preservar os efeitos inibitórios do composto em interações mediadas por P e L-selectina (Borsig et al., 2007). Assim, as cadeias de fucose sulfatadas parecem desempenhar um papel fundamental na ocorrência dos efeitos biológicos do FucCS.

Além dos efeitos descritos nesse trabalho, é importante destacar que tanto o FucCS quanto o HS de molusco apresentam ação anticoagulante e antitrombótica menor que o das heparinas comerciais (Gomes et al., 2010; Mourao et al., 2001; Mourao et al., 1996). Ainda, o HS de molusco não induz os efeitos hemorrágicos observados nas heparinas de mamíferos (Gomes et al., 2010) e o FucCS age em concentrações inferiores aquelas necessárias para ativar seu efeito anticoagulante (Borsig et al., 2007).

Diferente da heparina que é obtida de mamíferos, ambos os compostos utilizados nesse trabalho são provenientes de invertebrados marinhos, o que evita o risco de contaminação por patógenos (Borsig et al., 2007; Liu et al., 2009; Mourao et al., 1998). Nesse sentido, a associação de proteínas priônicas de mamíferos com a encefalopatia espongiforme restringiu o uso de heparina bovina na Europa, Estados Unidos e Japão (Pavao, 2014). Nesses países, a heparina comercial é obtida exclusivamente a partir de tecidos suínos e o risco de contaminação com uma proteína priônica ou mesmo um vírus ainda está presente (Pavao, 2014). Assim, torna-se extremamente relevante a pesquisa de compostos alternativos semelhantes à heparina, obtidos a partir de fontes que não sejam de mamífero, possuindo atividades biológicas semelhantes, mas desprovidos dos efeitos colaterais indesejáveis (Pavao, 2014).

Por fim, a viabilidade técnica e econômica de obter grandes quantidades desses compostos é de suma importância. Assim, tanto o FucCS quanto o HS de molusco são isolados com rendimentos razoáveis (Glauser et al., 2008; Gomes et al., 2010). Além disso, várias espécies de moluscos, incluindo aqueles contendo elevadas quantidades de análogos de heparina, foram cultivadas com sucesso em diferentes partes do mundo (Gomes et al., 2010), o que facilita a exploração comercial.

Sendo assim, sugerimos o FucCS e o HS de molusco como candidatos promissores a terapia adjuvante no tratamento da malária grave e na prevenção ao agravamento da doença, e abrimos perspectivas para continuação e aprofundamento do estudo desses compostos no tratamento da malária.

CONCLUSÕES

Diante do exposto podemos concluir que o FucCS e o HS de molusco são potenciais candidatos para uso como terapia adjuvante no tratamento da malária grave. Isso porque, esses compostos mostraram serem capazes de inibir a citoadesão de *P. falciparum* em condições estáticas e de fluxo a células endoteliais de pulmão humano (HLECs). Eles também foram eficazes em inibir o desenvolvimento parasitário por interferir na invasão de merozoítos, além de romper rosetas eficientemente. Ainda, o FucCS inibiu a adesão de Pf-EIs a criocortes de placenta. Além disso, concluímos que a presença de cadeias de fucose sulfatadas no FucCS é essencial para ocorrência das suas ações inibitórias. Por fim, destacamos que o FucCS e o HS de molusco exibiram baixa toxicidade e efeito similar ao da heparina de mamífero na inibição da citoadesão e invasão parasitária e também no rompimento de rosetas.

REFERÊNCIAS

- Adams, J. H., Sim, B. K., Dolan, S. A., Fang, X., Kaslow, D. C., & Miller, L. H. 1992. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15): 7085-7089.
- Adams, Y., Kuhnrae, P., Higgins, M. K., Ghumra, A., & Rowe, J. A. 2014. Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind to human brain microvascular endothelial cells in vitro, demonstrating a dual adhesion phenotype mediated by distinct P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains. *Infect Immun*, 82(3): 949-959.
- Agnandji, S. T., Lell, B., Fernandes, J. F., Abossolo, B. P., Methogo, B. G., Kabwende, A. L., Adegnika, A. A., Mordmuller, B., Issifou, S., Kremsner, P. G., Sacarlal, J., Aide, P., Lanaspá, M., Aponte, J. J., Machevo, S., Acacio, S., Buló, H., Sigauque, B., Macete, E., Alonso, P., Abdulla, S., Salim, N., Minja, R., Mpina, M., Ahmed, S., Ali, A. M., Mtoro, A. T., Hamad, A. S., Mutani, P., Tanner, M., Tinto, H., D'Alessandro, U., Sorgho, H., Valea, I., Bihoun, B., Guiraud, I., Kabore, B., Sombie, O., Guiguemde, R. T., Ouedraogo, J. B., Hamel, M. J., Kariuki, S., Oneko, M., Odero, C., Otieno, K., Awino, N., McMorro, M., Muturi-Kioi, V., Laserson, K. F., Slutsker, L., Otieno, W., Otieno, L., Otsyula, N., Gondi, S., Otieno, A., Owira, V., Oguk, E., Odongo, G., Woods, J. B., Ogutu, B., Njuguna, P., Chilengi, R., Akoo, P., Kerubo, C., Maingi, C., Lang, T., Olotu, A., Bejon, P., Marsh, K., Mwambingu, G., Owusu-Agyei, S., Asante, K. P., Osei-Kwakye, K., Boahen, O., Dosoo, D., Asante, I., Adjei, G., Kwara, E.,

Chandramohan, D., Greenwood, B., Lusingu, J., Gesase, S., Malabeja, A., Abdul, O., Mahende, C., Liheluka, E., Malle, L., Lemnge, M., Theander, T. G., Drakeley, C., Ansong, D., Agbenyega, T., Adjei, S., Boateng, H. O., Rettig, T., Bawa, J., Sylverken, J., Sambian, D., Sarfo, A., Agyekum, A., Martinson, F., Hoffman, I., Mvalo, T., Kamthunzi, P., Nkomo, R., Tembo, T., Tegha, G., Tsidya, M., Kilembe, J., Chawinga, C., Ballou, W. R., Cohen, J., Guerra, Y., Jongert, E., Lapierre, D., Leach, A., Lievens, M., Ofori-Anyinam, O., Olivier, A., Vekemans, J., Carter, T., Kaslow, D., Lebouilleux, D., Loucq, C., Radford, A., Savarese, B., Schellenberg, D., Sillman, M., & Vansadia, P. 2012. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med*, 367(24): 2284-2295.

Albano, R. M., & Mourao, P. A. 1986. Isolation, fractionation, and preliminary characterization of a novel class of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata Tunicata). *J Biol Chem*, 261(2): 758-765.

Alves, A. P., Mulloy, B., Diniz, J. A., & Mourao, P. A. 1997. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *J Biol Chem*, 272(11): 6965-6971.

Amino, R., Thiberge, S., Blazquez, S., Baldacci, P., Renaud, O., Shorte, S., & Menard, R. 2007. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc*, 2(7): 1705-1712.

Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Menard, R. 2006. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*, 12(2): 220-224.

- Ancsin, J. B., & Kisilevsky, R. 2004. A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. *J Biol Chem*, 279(21): 21824-21832.
- Andrews, K. T., Klatt, N., Adams, Y., Mischnick, P., & Schwartz-Albiez, R. 2005. Inhibition of chondroitin-4-sulfate-specific adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by sulfated polysaccharides. *Infect Immun*, 73(7): 4288-4294.
- Ansell, J., Hamilton, K. A., Pinder, M., Walraven, G. E., & Lindsay, S. W. 2002. Short-range attractiveness of pregnant women to Anopheles gambiae mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(2): 113-116.
- Anstey, N. M., Russell, B., Yeo, T. W., & Price, R. N. 2009. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*, 25(5): 220-227.
- Arama, C., & Troye-Blomberg, M. 2014. The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives. *J Intern Med*, 275(5): 456-466.
- Armah, H., Dodoo, A. K., Wiredu, E. K., Stiles, J. K., Adjei, A. A., Gyasi, R. K., & Tettey, Y. 2005. High-level cerebellar expression of cytokines and adhesion molecules in fatal, paediatric, cerebral malaria. *Ann Trop Med Parasitol*, 99(7): 629-647.
- Awandare, G. A., Goka, B., Boeuf, P., Tetteh, J. K., Kurtzhals, J. A., Behr, C., & Akanmori, B. D. 2006. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe Plasmodium falciparum malaria with respiratory distress. *J Infect Dis*, 194(10): 1438-1446.
- Baer, K., Roosevelt, M., Clarkson, A. B., Jr., van Rooijen, N., Schnieder, T., & Frevort, U. 2007. Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiol*, 9(2): 397-412.

- Barragan, A., Spillmann, D., Kremsner, P. G., Wahlgren, M., & Carlson, J. 1999. Plasmodium falciparum: molecular background to strain-specific rosette disruption by glycosaminoglycans and sulfated glycoconjugates. *Exp Parasitol*, 91(2): 133-143.
- Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B., Bi, X., Ma, X. C., Feldman, M., Taraschi, T. F., & Howard, R. J. 1995. Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*, 82(1): 77-87.
- Bastos, M. F., Albrecht, L., Kozlowski, E. O., Lopes, S. C., Blanco, Y. C., Carlos, B. C., Castineiras, C., Vicente, C. P., Werneck, C. C., Wunderlich, G., Ferreira, M. U., Marinho, C. R., Mourao, P. A., Pavao, M. S., & Costa, F. T. 2014. Fucosylated chondroitin sulfate inhibits Plasmodium falciparum cytoadhesion and merozoite invasion. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(4): 1862-1871.
- Beeson, J. G., Andrews, K. T., Boyle, M., Duffy, M. F., Choong, E. K., Byrne, T. J., Chesson, J. M., Lawson, A. M., & Chai, W. 2007. Structural basis for binding of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 to chondroitin sulfate and placental tissue and the influence of protein polymorphisms on binding specificity. *J Biol Chem*, 282(31): 22426-22436.
- Beeson, J. G., & Brown, G. V. 2004. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes demonstrate dual specificity for adhesion to hyaluronic acid and chondroitin sulfate A and have distinct adhesive properties. *J Infect Dis*, 189(2): 169-179.
- Beeson, J. G., Reeder, J. C., Rogerson, S. J., & Brown, G. V. 2001. Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. *Trends Parasitol*, 17(7): 331-337.

- Beeson, J. G., Rogerson, S. J., Cooke, B. M., Reeder, J. C., Chai, W., Lawson, A. M., Molyneux, M. E., & Brown, G. V. 2000. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. *Nat Med*, 6(1): 86-90.
- Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I., & Marsh, K. 1989. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 341(6237): 57-59.
- Berendt, A. R., Tumer, G. D., & Newbold, C. I. 1994. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today*, 10(10): 412-414.
- Biermann, C. H., Marks, J. A., Vilela-Silva, A. C., Castro, M. O., & Mourao, P. A. 2004. Carbohydrate-based species recognition in sea urchin fertilization: another avenue for speciation? *Evol Dev*, 6(5): 353-361.
- Black, R. E., Cousens, S., Johnson, H. L., Lawn, J. E., Rudan, I., Bassani, D. G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C. F., Cibulskis, R., Eisele, T., Liu, L., & Mathers, C. 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*, 375(9730): 1969-1987.
- Boivin, M. J. 2002. Effects of early cerebral malaria on cognitive ability in Senegalese children. *J Dev Behav Pediatr*, 23(5): 353-364.
- Boivin, M. J., Bangirana, P., Byarugaba, J., Opoka, R. O., Idro, R., Jurek, A. M., & John, C. C. 2007. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics*, 119(2): e360-366.
- Borsig, L., Wang, L., Cavalcante, M. C., Cardilo-Reis, L., Ferreira, P. L., Mourao, P. A., Esko, J. D., & Pavao, M. S. 2007. Selectin blocking activity of a fucosylated

- chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *J Biol Chem*, 282(20): 14984-14991.
- Boyle, M. J., Richards, J. S., Gilson, P. R., Chai, W., & Beeson, J. G. 2010. Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood*, 115(22): 4559-4568.
- Brabin, B. J. 1983. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ*, 61(6): 1005-1016.
- Brewster, D. R., Kwiatkowski, D., & White, N. J. 1990. Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet*, 336(8722): 1039-1043.
- Bridges, D. J., Winters, A. M., & Hamer, D. H. 2012. Malaria elimination: surveillance and response. *Pathog Glob Health*, 106(4): 224-231.
- Butcher, G. A., Parish, C. R., & Cowden, W. B. 1988. Inhibition of growth in vitro of *Plasmodium falciparum* by complex polysaccharides. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82(4): 558-559.
- Carlson, J., Ekre, H. P., Helmby, H., Gysin, J., Greenwood, B. M., & Wahlgren, M. 1992. Disruption of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes by standard heparin and heparin devoid of anticoagulant activity. *Am J Trop Med Hyg*, 46(5): 595-602.
- Carlson, J., Helmby, H., Hill, A. V., Brewster, D., Greenwood, B. M., & Wahlgren, M. 1990. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet*, 336(8729): 1457-1460.
- Carter, J. A., Mung'ala-Odera, V., Neville, B. G., Murira, G., Mturi, N., Musumba, C., & Newton, C. R. 2005. Persistent neurocognitive impairments associated with severe

- falciparum malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76(4): 476-481.
- Carvalho, B. O., Lopes, S. C., Nogueira, P. A., Orlandi, P. P., Bargieri, D. Y., Blanco, Y. C., Mamoni, R., Leite, J. A., Rodrigues, M. M., Soares, I. S., Oliveira, T. R., Wunderlich, G., Lacerda, M. V., del Portillo, H. A., Araujo, M. O., Russell, B., Suwanarusk, R., Snounou, G., Renia, L., & Costa, F. T. 2010. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. *J Infect Dis*, 202(4): 638-647.
- Caterson, B., Mahmoodian, F., Sorrell, J. M., Hardingham, T. E., Bayliss, M. T., Carney, S. L., Ratcliffe, A., & Muir, H. 1990. Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease. *J Cell Sci*, 97 (Pt 3): 411-417.
- Ceesay, S. J., Casals-Pascual, C., Erskine, J., Anya, S. E., Duah, N. O., Fulford, A. J., Sesay, S. S., Abubakar, I., Dunyo, S., Sey, O., Palmer, A., Fofana, M., Corrah, T., Bojang, K. A., Whittle, H. C., Greenwood, B. M., & Conway, D. J. 2008. Changes in malaria indices between 1999 and 2007 in The Gambia: a retrospective analysis. *Lancet*, 372(9649): 1545-1554.
- Chai, W., Beeson, J. G., Kogelberg, H., Brown, G. V., & Lawson, A. M. 2001. Inhibition of adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by structurally defined hyaluronic acid dodecasaccharides. *Infect Immun*, 69(1): 420-425.
- Chen, J. H., Lim, J. D., Sohn, E. H., Choi, Y. S., & Han, E. T. 2009. Growth-inhibitory effect of a fucoidan from brown seaweed Undaria pinnatifida on Plasmodium parasites. *Parasitol Res*, 104(2): 245-250.
- Chen, Q., Barragan, A., Fernandez, V., Sundstrom, A., Schlichtherle, M., Sahlen, A., Carlson, J., Datta, S., & Wahlgren, M. 1998. Identification of Plasmodium falciparum

- erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J Exp Med*, 187(1): 15-23.
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Suwanarusk, R., Pukrittayakamee, S., Wilairatana, P., Beeson, J. G., Day, N. P., & White, N. J. 2012. Plasmodium vivax adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One*, 7(4): e34509.
- Clark, D. L., Su, S., & Davidson, E. A. 1997. Saccharide anions as inhibitors of the malaria parasite. *Glycoconj J*, 14(4): 473-479.
- Clark, I. A., & Alleva, L. M. 2009. Is human malarial coma caused, or merely deepened, by sequestration? *Trends Parasitol*, 25(7): 314-318.
- Coltel, N., Combes, V., Hunt, N. H., & Grau, G. E. 2004. Cerebral malaria -- a neurovascular pathology with many riddles still to be solved. *Curr Neurovasc Res*, 1(2): 91-110.
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. 2012. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*, 198(6): 961-971.
- 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(2): 129-143.
- Cranston, H. A., Boylan, C. W., Carroll, G. L., Suter, S. P., Williamson, J. R., Gluzman, I. Y., & Krogstad, D. J. 1984. Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability. *Science*, 223(4634): 400-403.
- Cunnington, A. J., Riley, E. M., & Walther, M. 2013a. Stuck in a rut? Reconsidering the role of parasite sequestration in severe malaria syndromes. *Trends Parasitol*, 29(12): 585-592.

- Cunnington, A. J., Walther, M., & Riley, E. M. 2013b. Piecing together the puzzle of severe malaria. *Sci Transl Med*, 5(211): 211ps218.
- David, P. H., Hommel, M., Miller, L. H., Udeinya, I. J., & Oligino, L. D. 1983. Parasite sequestration in Plasmodium falciparum malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(16): 5075-5079.
- Day, N. P., Hien, T. T., Schollaardt, T., Loc, P. P., Chuong, L. V., Chau, T. T., Mai, N. T., Phu, N. H., Sinh, D. X., White, N. J., & Ho, M. 1999. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis*, 180(4): 1288-1297.
- De las Salas, B., Segura, C., Pabon, A., Lopes, S. C., Costa, F. T., & Blair, S. 2013. Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of Plasmodium vivax isolates from Colombia. *Malar J*, 12: 347.
- de Pina-Costa, A., Brasil, P., Di Santi, S. M., de Araujo, M. P., Suarez-Mutis, M. C., Santelli, A. C., Oliveira-Ferreira, J., Lourenco-de-Oliveira, R., & Daniel-Ribeiro, C. T. 2014. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109(5): 618-633.
- Dellicour, S., Tatem, A. J., Guerra, C. A., Snow, R. W., & ter Kuile, F. O. 2010. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLoS Med*, 7(1): e1000221.
- Desai, M., ter Kuile, F. O., Nosten, F., McGready, R., Asamo, K., Brabin, B., & Newman, R. D. 2007. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*, 7(2): 93-104.

- Dondorp, A., Nosten, F., Stepniewska, K., Day, N., & White, N. 2005. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*, 366(9487): 717-725.
- Dondorp, A. M., Fanello, C. I., Hendriksen, I. C., Gomes, E., Seni, A., Chhaganlal, K. D., Bojang, K., Olaosebikan, R., Anunobi, N., Maitland, K., Kivaya, E., Agbenyega, T., Nguah, S. B., Evans, J., Gesase, S., Kahabuka, C., Mtove, G., Nadjm, B., Deen, J., Mwangi-Amumpaire, J., Nansumba, M., Karema, C., Umulisa, N., Uwimana, A., Mokuolu, O. A., Adedoyin, O. T., Johnson, W. B., Tshefu, A. K., Onyamboko, M. A., Sakulthaew, T., Ngum, W. P., Silamut, K., Stepniewska, K., Woodrow, C. J., Bethell, D., Wills, B., Oneko, M., Peto, T. E., von Seidlein, L., Day, N. P., & White, N. J. 2010. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*, 376(9753): 1647-1657.
- Dondorp, A. M., Silamut, K., Charunwatthana, P., Chuasuwanchai, S., Ruangveerayut, R., Krinratun, S., White, N. J., Ho, M., & Day, N. P. 2007. Levamisole inhibits sequestration of infected red blood cells in patients with falciparum malaria. *J Infect Dis*, 196(3): 460-466.
- Doumbo, O. K., Thera, M. A., Kone, A. K., Raza, A., Tempest, L. J., Lyke, K. E., Plowe, C. V., & Rowe, J. A. 2009. High levels of Plasmodium falciparum rosetting in all clinical forms of severe malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg*, 81(6): 987-993.
- Drakeley, C., Sutherland, C., Bousema, J. T., Sauerwein, R. W., & Targett, G. A. 2006. The epidemiology of Plasmodium falciparum gametocytes: weapons of mass dispersion. *Trends Parasitol*, 22(9): 424-430.

- Duffy, P. E., & Fried, M. 2005. Malaria in the pregnant woman. *Curr Top Microbiol Immunol*, 295: 169-200.
- Eastman, R. T., & Fidock, D. A. 2009. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol*, 7(12): 864-874.
- Evans, S. G., Morrison, D., Kaneko, Y., & Havlik, I. 1998. The effect of curdlan sulphate on development in vitro of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92(1): 87-89.
- Fonseca, R. J., & Mourao, P. A. 2006. Fucosylated chondroitin sulfate as a new oral antithrombotic agent. *Thromb Haemost*, 96(6): 822-829.
- Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B., & Nussenzweig, V. 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med*, 177(5): 1287-1298.
- Fried, M., Domingo, G. J., Gowda, C. D., Mutabingwa, T. K., & Duffy, P. E. 2006. Plasmodium falciparum: chondroitin sulfate A is the major receptor for adhesion of parasitized erythrocytes in the placenta. *Exp Parasitol*, 113(1): 36-42.
- Fried, M., & Duffy, P. E. 1996. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. *Science*, 272(5267): 1502-1504.
- Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B. J., & Duffy, P. E. 1998. Maternal antibodies block malaria. *Nature*, 395(6705): 851-852.
- Fullerton, J. N., & Singer, M. 2011. Organ failure in the ICU: cellular alterations. *Semin Respir Crit Care Med*, 32(5): 581-586.

- Gillrie, M. R., Lee, K., Gowda, D. C., Davis, S. P., Monestier, M., Cui, L., Hien, T. T., Day, N. P., & Ho, M. 2012. Plasmodium falciparum histones induce endothelial proinflammatory response and barrier dysfunction. *Am J Pathol*, 180(3): 1028-1039.
- Glauser, B. F., Pereira, M. S., Monteiro, R. Q., & Mourao, P. A. 2008. Serpin-independent anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate. *Thromb Haemost*, 100(3): 420-428.
- Global Partnership to Roll Back Malaria. 2001. *Antimalarial drug combination therapy : report of a WHO technical consultation, 4-5 April 2001*. Geneva: World Health Organization.
- Gomes, A. M., Kozlowski, E. O., Borsig, L., Teixeira, F. C., Vlodaysky, I., & Pavao, M. S. 2014. Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin analog from the mollusk Nodipecten nodosus: Effect on P-selectin, heparanase, metastasis and cellular recruitment. *Glycobiology*.
- Gomes, A. M., Kozlowski, E. O., Pomin, V. H., de Barros, C. M., Zaganeli, J. L., & Pavao, M. S. 2010. Unique extracellular matrix heparan sulfate from the bivalve Nodipecten nodosus (Linnaeus, 1758) safely inhibits arterial thrombosis after photochemically induced endothelial lesion. *J Biol Chem*, 285(10): 7312-7323.
- Grau, G. E., & Craig, A. G. 2012. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiol*, 7(2): 291-302.
- Greenwood, B. M. 2008. Control to elimination: implications for malaria research. *Trends Parasitol*, 24(10): 449-454.
- Guinovart, C., Aponte, J. J., Sacarlal, J., Aide, P., Leach, A., Bassat, Q., Macete, E., Dobano, C., Lievens, M., Loucq, C., Ballou, W. R., Cohen, J., & Alonso, P. L. 2009. Insights

- into long-lasting protection induced by RTS,S/AS02A malaria vaccine: further results from a phase IIb trial in Mozambican children. *PLoS One*, 4(4): e5165.
- Haldar, K., Murphy, S. C., Milner, D. A., & Taylor, T. E. 2007. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol*, 2: 217-249.
- Handunnetti, S. M., David, P. H., Perera, K. L., & Mendis, K. N. 1989. Uninfected erythrocytes form "rosettes" around Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg*, 40(2): 115-118.
- Handunnetti, S. M., Hasler, T. H., & Howard, R. J. 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(3): 928-932.
- Hanson, J., Lam, S. W., Mahanta, K. C., Pattnaik, R., Alam, S., Mohanty, S., Hasan, M. U., Hossain, A., Charunwatthana, P., Chotivanich, K., Maude, R. J., Kingston, H., Day, N. P., Mishra, S., White, N. J., & Dondorp, A. M. 2012. Relative contributions of macrovascular and microvascular dysfunction to disease severity in falciparum malaria. *J Infect Dis*, 206(4): 571-579.
- Havlik, I., Looareesuwan, S., Vannaphan, S., Wilairatana, P., Krudsood, S., Thuma, P. E., Kozbor, D., Watanabe, N., & Kaneko, Y. 2005. Curdlan sulphate in human severe/cerebral Plasmodium falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99(5): 333-340.
- Havlik, I., Rovelli, S., & Kaneko, Y. 1994. The effect of curdlan sulphate on in vitro growth of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88(6): 686-687.

- Higgins, S. J., Kain, K. C., & Liles, W. C. 2011. Immunopathogenesis of falciparum malaria: implications for adjunctive therapy in the management of severe and cerebral malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9(9): 803-819.
- Ho, M., & White, N. J. 1999. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol*, 276(6 Pt 1): C1231-1242.
- Hu, S., Chang, Y., Wang, J., Xue, C., Shi, D., Xu, H., & Wang, Y. 2013. Fucosylated chondroitin sulfate from *Acaudina molpadioides* improves hyperglycemia via activation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle of insulin resistant mice. *Food Funct*, 4(11): 1639-1646.
- Hughes, K. R., Biagini, G. A., & Craig, A. G. 2010. Continued cytoadherence of Plasmodium falciparum infected red blood cells after antimalarial treatment. *Mol Biochem Parasitol*, 169(2): 71-78.
- Iyer, J., Gruner, A. C., Renia, L., Snounou, G., & Preiser, P. R. 2007. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. *Mol Microbiol*, 65(2): 231-249.
- John, C. C., Bangirana, P., Byarugaba, J., Opoka, R. O., Idro, R., Jurek, A. M., Wu, B., & Boivin, M. J. 2008. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics*, 122(1): e92-99.
- John, C. C., Kutamba, E., Mugarura, K., & Opoka, R. O. 2010. Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of Plasmodium falciparum malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8(9): 997-1008.
- Kantele, A., & Jokiranta, T. S. 2011. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, Plasmodium knowlesi. *Clin Infect Dis*, 52(11): 1356-1362.

- Kaul, D. K., Roth, E. F., Jr., Nagel, R. L., Howard, R. J., & Handunnetti, S. M. 1991. Rosetting of Plasmodium falciparum-infected red blood cells with uninfected red blood cells enhances microvascular obstruction under flow conditions. *Blood*, 78(3): 812-819.
- Khunrae, P., Dahlback, M., Nielsen, M. A., Andersen, G., Ditlev, S. B., Resende, M., Pinto, V. V., Theander, T. G., Higgins, M. K., & Salanti, A. 2010. Full-length recombinant Plasmodium falciparum VAR2CSA binds specifically to CSPG and induces potent parasite adhesion-blocking antibodies. *J Mol Biol*, 397(3): 826-834.
- Kim, H., Higgins, S., Liles, W. C., & Kain, K. C. 2011. Endothelial activation and dysregulation in malaria: a potential target for novel therapeutics. *Curr Opin Hematol*, 18(3): 177-185.
- Kobayashi, K., Kato, K., Sugi, T., Takemae, H., Pandey, K., Gong, H., Tohya, Y., & Akashi, H. 2010. Plasmodium falciparum BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. *J Biol Chem*, 285(3): 1716-1725.
- Kobayashi, K., Takano, R., Takemae, H., Sugi, T., Ishiwa, A., Gong, H., Recuenco, F. C., Iwanaga, T., Horimoto, T., Akashi, H., & Kato, K. 2013. Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of Plasmodium falciparum. *Sci Rep*, 3: 3178.
- Kokwaro, G. 2009. Ongoing challenges in the management of malaria. *Malar J*, 8 Suppl 1: S2.
- Kraemer, S. M., & Smith, J. D. 2006. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol*, 9(4): 374-380.

- Kulane, A., Ekre, H. P., Perlmann, P., Rombo, L., Wahlgren, M., & Wahlin, B. 1992. Effect of different fractions of heparin on Plasmodium falciparum merozoite invasion of red blood cells in vitro. *Am J Trop Med Hyg*, 46(5): 589-594.
- Kurtzhals, J. A., Adabayeri, V., Goka, B. Q., Akanmori, B. D., Oliver-Commey, J. O., Nkrumah, F. K., Behr, C., & Hviid, L. 1998. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet*, 351(9118): 1768-1772.
- Kwiatkowski, D., Hill, A. V., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J., Manogue, K. R., Cerami, A., Brewster, D. R., & Greenwood, B. M. 1990. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet*, 336(8725): 1201-1204.
- Kyes, S. A., Kraemer, S. M., & Smith, J. D. 2007. Antigenic variation in Plasmodium falciparum: gene organization and regulation of the var multigene family. *Eukaryot Cell*, 6(9): 1511-1520.
- Kyriacou, H. M., Steen, K. E., Raza, A., Arman, M., Warimwe, G., Bull, P. C., Havlik, I., & Rowe, J. A. 2007. In vitro inhibition of Plasmodium falciparum rosette formation by Curdlan sulfate. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4): 1321-1326.
- Land, K. M., Sherman, I. W., Gysin, J., & Crandall, I. E. 1995. Anti-adhesive antibodies and peptides as potential therapeutics for Plasmodium falciparum malaria. *Parasitol Today*, 11(1): 19-23.
- Leitgeb, A. M., Blomqvist, K., Cho-Ngwa, F., Samje, M., Nde, P., Titanji, V., & Wahlgren, M. 2011. Low anticoagulant heparin disrupts Plasmodium falciparum rosettes in fresh clinical isolates. *Am J Trop Med Hyg*, 84(3): 390-396.

- Liang, H., & Sim, B. K. 1997. Conservation of structure and function of the erythrocyte-binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175. *Mol Biochem Parasitol*, 84(2): 241-245.
- Lindsay, S., Ansell, J., Selman, C., Cox, V., Hamilton, K., & Walraven, G. 2000. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet*, 355(9219): 1972.
- Liu, H., Zhang, Z., & Linhardt, R. J. 2009. Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat Prod Rep*, 26(3): 313-321.
- Liu, H. H., Ko, W. C., & Hu, M. L. 2002. Hypolipidemic effect of glycosaminoglycans from the sea cucumber Metriatyla scabra in rats fed a cholesterol-supplemented diet. *J Agric Food Chem*, 50(12): 3602-3606.
- Looareesuwan, S., Ho, M., Wattanagoon, Y., White, N. J., Warrell, D. A., Bunnag, D., Harinasuta, T., & Wyler, D. J. 1987. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med*, 317(11): 675-679.
- Lyke, K. E., Burges, R., Cissoko, Y., Sangare, L., Dao, M., Diarra, I., Kone, A., Harley, R., Plowe, C. V., Doumbo, O. K., & Sztein, M. B. 2004. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun*, 72(10): 5630-5637.
- MacPherson, G. G., Warrell, M. J., White, N. J., Looareesuwan, S., & Warrell, D. A. 1985. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol*, 119(3): 385-401.

- Madhunapantula, S. V., Achur, R. N., & Gowda, D. C. 2007. Developmental stage- and cell cycle number-dependent changes in characteristics of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte adherence to placental chondroitin-4-sulfate proteoglycan. *Infect Immun*, 75(9): 4409-4415.
- Maeda-Martínez, A. N. 2002. *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica : ciencia y acuicultura* (1st ed.). Mexico city, Mexico: Editorial Limusa.
- Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F., & Tilley, L. 2009. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol*, 7(5): 341-354.
- Malaguarnera, L., & Musumeci, S. 2002. The immune response to Plasmodium falciparum malaria. *Lancet Infect Dis*, 2(8): 472-478.
- Marchiafava, & Bignami. 1894. On summer-autumn malarial fevers, *Two monographs on malaria and the parasites of malarial fevers (translated from the first Italian edition by JH Thompson)*, Vol. 150: 1-234. London: New Sydenham Society.
- Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., Newton, C., Winstanley, P., Warn, P., Peshu, N., & et al. 1995. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med*, 332(21): 1399-1404.
- Maude, R. J., Silamut, K., Plewes, K., Charunwatthana, P., Ho, M., Abul Faiz, M., Rahman, R., Hossain, M. A., Hassan, M. U., Bin Yunus, E., Hoque, G., Islam, F., Ghose, A., Hanson, J., Schlatter, J., Lacey, R., Eastaugh, A., Tarning, J., Lee, S. J., White, N. J., Chotivanich, K., Day, N. P., & Dondorp, A. M. 2014. Randomized controlled trial of levamisole hydrochloride as adjunctive therapy in severe falciparum malaria with high parasitemia. *J Infect Dis*, 209(1): 120-129.

- McGready, R., Lee, S. J., Wiladphaingern, J., Ashley, E. A., Rijken, M. J., Boel, M., Simpson, J. A., Paw, M. K., Pimanpanarak, M., Mu, O., Singhasivanon, P., White, N. J., & Nosten, F. H. 2012. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. *Lancet Infect Dis*, 12(5): 388-396.
- Melo-Filho, N. M., Belmiro, C. L., Goncalves, R. G., Takiya, C. M., Leite, M., Jr., Pavao, M. S., & Mourao, P. A. 2010. Fucosylated chondroitin sulfate attenuates renal fibrosis in animals submitted to unilateral ureteral obstruction: a P-selectin-mediated event? *Am J Physiol Renal Physiol*, 299(6): F1299-1307.
- Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X. Z., & Wellems, T. E. 2013. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*, 19(2): 156-167.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872): 673-679.
- Mishra, S. K., & Newton, C. R. 2009. Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. *Nat Rev Neurol*, 5(4): 189-198.
- Mourao, P. A., Boisson-Vidal, C., Tapon-Brethaudiere, J., Drouet, B., Bros, A., & Fischer, A. 2001. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *Thromb Res*, 102(2): 167-176.
- Mourao, P. A., Giumaraes, B., Mulloy, B., Thomas, S., & Gray, E. 1998. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *Br J Haematol*, 101(4): 647-652.

- Mourao, P. A., Pereira, M. S., Pavao, M. S., Mulloy, B., Tollefsen, D. M., Mowinckel, M. C., & Abildgaard, U. 1996. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *J Biol Chem*, 271(39): 23973-23984.
- Moxon, C. A., Wassmer, S. C., Milner, D. A., Jr., Chisala, N. V., Taylor, T. E., Seydel, K. B., Molyneux, M. E., Faragher, B., Esmon, C. T., Downey, C., Toh, C. H., Craig, A. G., & Heyderman, R. S. 2013. Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children. *Blood*, 122(5): 842-851.
- Moya-Alvarez, V., Abellana, R., & Cot, M. 2014. Pregnancy-associated malaria and malaria in infants: an old problem with present consequences. *Malar J*, 13: 271.
- Munir, M., Tjandra, H., Rampengan, T. H., Mustadjab, I., & Wulur, F. H. 1980. Heparin in the treatment of cerebral malaria. *Paediatr Indones*, 20(1-2): 47-50.
- Murray, C. J., Rosenfeld, L. C., Lim, S. S., Andrews, K. G., Foreman, K. J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., & Lopez, A. D. 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*, 379(9814): 413-431.
- Newbold, C., Craig, A., Kyes, S., Rowe, A., Fernandez-Reyes, D., & Fagan, T. 1999. Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*, 29(6): 927-937.
- Normark, J., Nilsson, D., Ribacke, U., Winter, G., Moll, K., Wheelock, C. E., Bayarugaba, J., Kironde, F., Egwang, T. G., Chen, Q., Andersson, B., & Wahlgren, M. 2007. PfEMP1-DBL1alpha amino acid motifs in severe disease states of *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(40): 15835-15840.

- Nosten, F., McGready, R., Simpson, J. A., Thwai, K. L., Balkan, S., Cho, T., Hkirijaroen, L., Looareesuwan, S., & White, N. J. 1999. Effects of Plasmodium vivax malaria in pregnancy. *Lancet*, 354(9178): 546-549.
- O'Meara, W. P., Mangeni, J. N., Steketee, R., & Greenwood, B. 2010. Changes in the burden of malaria in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis*, 10(8): 545-555.
- Ochola, L. B., Siddondo, B. R., Ocholla, H., Nkya, S., Kimani, E. N., Williams, T. N., Makale, J. O., Liljander, A., Urban, B. C., Bull, P. C., Szeszak, T., Marsh, K., & Craig, A. G. 2011. Specific receptor usage in Plasmodium falciparum cytoadherence is associated with disease outcome. *PLoS One*, 6(3): e14741.
- Ockenhouse, C. F., Tandon, N. N., Magowan, C., Jamieson, G. A., & Chulay, J. D. 1989. Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. *Science*, 243(4897): 1469-1471.
- Oduro, A. R., Koram, K. A., Rogers, W., Atuguba, F., Ansah, P., Anyorigiya, T., Ansah, A., Anto, F., Mensah, N., Hodgson, A., & Nkrumah, F. 2007. Severe falciparum malaria in young children of the Kassena-Nankana district of northern Ghana. *Malar J*, 6: 96.
- Okiro, E. A., Alegana, V. A., Noor, A. M., & Snow, R. W. 2010. Changing malaria intervention coverage, transmission and hospitalization in Kenya. *Malar J*, 9: 285.
- Ordi, J., Ismail, M. R., Ventura, P. J., Kahigwa, E., Hirt, R., Cardesa, A., Alonso, P. L., & Menendez, C. 1998. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol*, 22(8): 1006-1011.
- Pacheco, R. G., Vicente, C. P., Zancan, P., & Mourao, P. A. 2000. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 11(6): 563-573.

- Pancake, S. J., Holt, G. D., Mellouk, S., & Hoffman, S. L. 1992. Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J Cell Biol*, 117(6): 1351-1357.
- Pate, M., Damarla, V., Chi, D. S., Negi, S., & Krishnaswamy, G. 2010. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Adv Clin Chem*, 52: 109-130.
- Pavao, M. S. 2014. Glycosaminoglycans analogs from marine invertebrates: structure, biological effects, and potential as new therapeutics. *Front Cell Infect Microbiol*, 4: 123.
- Pavao, M. S., Aiello, K. R., Werneck, C. C., Silva, L. C., Valente, A. P., Mulloy, B., Colwell, N. S., Tollefsen, D. M., & Mourao, P. A. 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, 273(43): 27848-27857.
- Payne, D. 1987. Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, 3(8): 241-246.
- Pereira, M. S., Mulloy, B., & Mourao, P. A. 1999. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem*, 274(12): 7656-7667.
- Pinzon-Ortiz, C., Friedman, J., Esko, J., & Sinnis, P. 2001. The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for plasmodium sporozoite attachment to target cells. *J Biol Chem*, 276(29): 26784-26791.

- Planche, T., & Krishna, S. 2005. The relevance of malaria pathophysiology to strategies of clinical management. *Curr Opin Infect Dis*, 18(5): 369-375.
- Pongponratn, E., Turner, G. D., Day, N. P., Phu, N. H., Simpson, J. A., Stepniewska, K., Mai, N. T., Viriyavejakul, P., Looareesuwan, S., Hien, T. T., Ferguson, D. J., & White, N. J. 2003. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 69(4): 345-359.
- Pouvelle, B., Fusai, T., & Gysin, J. 1998. [*Plasmodium falciparum* and chondroitin-4-sulfate: the new key couple in sequestration]. *Med Trop (Mars)*, 58(2): 187-198.
- Pouvelle, B., Meyer, P., Robert, C., Bardel, L., & Gysin, J. 1997. Chondroitin-4-sulfate impairs in vitro and in vivo cytoadherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Med*, 3(8): 508-518.
- Ramiro, R. S., Alpedrinha, J., Carter, L., Gardner, A., & Reece, S. E. 2011. Sex and death: the effects of innate immune factors on the sexual reproduction of malaria parasites. *PLoS Pathog*, 7(3): e1001309.
- Rampengan, T. H. 1991. Cerebral malaria in children. Comparative study between heparin, dexamethasone and placebo. *Paediatr Indones*, 31(1-2): 59-66.
- Ranjan, A., & Chitnis, C. E. 1999. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24): 14067-14072.
- Ranque, S., Poudiougou, B., Traore, A., Keita, M., Oumar, A. A., Safeukui, I., Marquet, S., Cabantous, S., Diakite, M., Mintha, D., Cisse, M. B., Keita, M. M., Dessein, A. J., & Doumbo, O. K. 2008. Life-threatening malaria in African children: a prospective study in a mesoendemic urban setting. *Pediatr Infect Dis J*, 27(2): 130-135.

- Rathore, D., McCutchan, T. F., Garboczi, D. N., Toida, T., Hernaiz, M. J., LeBrun, L. A., Lang, S. C., & Linhardt, R. J. 2001. Direct measurement of the interactions of glycosaminoglycans and a heparin decasaccharide with the malaria circumsporozoite protein. *Biochemistry*, 40(38): 11518-11524.
- Recuenco, F. C., Kobayashi, K., Ishiwa, A., Enomoto-Rogers, Y., Fundador, N. G., Sugi, T., Takemae, H., Iwanaga, T., Murakoshi, F., Gong, H., Inomata, A., Horimoto, T., Iwata, T., & Kato, K. 2014. Gellan sulfate inhibits Plasmodium falciparum growth and invasion of red blood cells in vitro. *Sci Rep*, 4: 4723.
- Reece, S. E., Ali, E., Schneider, P., & Babiker, H. A. 2010. Stress, drugs and the evolution of reproductive restraint in malaria parasites. *Proc Biol Sci*, 277(1697): 3123-3129.
- Reed, A. C. 1929. Malaria-a Practical Review. *Cal West Med*, 30(4): 217-221.
- Rijken, M. J., McGready, R., Boel, M. E., Poespoprodjo, R., Singh, N., Syafruddin, D., Rogerson, S., & Nosten, F. 2012. Malaria in pregnancy in the Asia-Pacific region. *Lancet Infect Dis*, 12(1): 75-88.
- Robert, C., Pouvelle, B., Meyer, P., Muanza, K., Fujioka, H., Aikawa, M., Scherf, A., & Gysin, J. 1995. Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Res Immunol*, 146(6): 383-393.
- Roberts, D. J., Pain, A., Kai, O., Kortok, M., & Marsh, K. 2000. Autoagglutination of malaria-infected red blood cells and malaria severity. *Lancet*, 355(9213): 1427-1428.
- Rogerson, S. J., Chaiyaroj, S. C., Ng, K., Reeder, J. C., & Brown, G. V. 1995. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med*, 182(1): 15-20.

- Rogerson, S. J., Mwapasa, V., & Meshnick, S. R. 2007. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg*, 77(6 Suppl): 14-22.
- Rogerson, S. J., Pollina, E., Getachew, A., Tadesse, E., Lema, V. M., & Molyneux, M. E. 2003. Placental monocyte infiltrates in response to Plasmodium falciparum malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg*, 68(1): 115-119.
- Rogerson, S. J., Reeder, J. C., al-Yaman, F., & Brown, G. V. 1994. Sulfated glycoconjugates as disrupters of Plasmodium falciparum erythrocyte rosettes. *Am J Trop Med Hyg*, 51(2): 198-203.
- Rowe, A., Berendt, A. R., Marsh, K., & Newbold, C. I. 1994. Plasmodium falciparum: a family of sulphated glycoconjugates disrupts erythrocyte rosettes. *Exp Parasitol*, 79(4): 506-516.
- Rowe, J. A., Claessens, A., Corrigan, R. A., & Arman, M. 2009. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*, 11: e16.
- Salanti, A., Staalsoe, T., Lavstsen, T., Jensen, A. T., Sowa, M. P., Arnot, D. E., Hviid, L., & Theander, T. G. 2003. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering Plasmodium falciparum involved in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol*, 49(1): 179-191.
- Santos, J. A., Mulloy, B., & Mourao, P. A. 1992. Structural diversity among sulfated alpha-L-galactans from ascidians (tunicates). Studies on the species Ciona intestinalis and Herdmania monus. *Eur J Biochem*, 204(2): 669-677.

- Scherf, A., Lopez-Rubio, J. J., & Riviere, L. 2008. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*, 62: 445-470.
- Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 2013. Situação epidemiológica da malárico Brasil, 2000 a 2011, *Boletim Epidemiológico*, Vol. 44: 16 p. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde.,.
- Seixas, E., Gozzelino, R., Chora, A., Ferreira, A., Silva, G., Larsen, R., Rebelo, S., Penido, C., Smith, N. R., Coutinho, A., & Soares, M. P. 2009. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(37): 15837-15842.
- Serghides, L. 2012. The Case for the Use of PPARgamma Agonists as an Adjunctive Therapy for Cerebral Malaria. *PPAR Res*, 2012: 513865.
- Sheehy, T. W., & Reba, R. C. 1967. Complications of falciparum malaria and their treatment. *Ann Intern Med*, 66(4): 807-809.
- Silamut, K., Phu, N. H., Whitty, C., Turner, G. D., Louwrier, K., Mai, N. T., Simpson, J. A., Hien, T. T., & White, N. J. 1999. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol*, 155(2): 395-410.
- Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G., Roberts, D. J., Hudson-Taylor, D. E., Peterson, D. S., Pinches, R., Newbold, C. I., & Miller, L. H. 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, 82(1): 101-110.
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., & Lavstsen, T. 2013. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol*, 15(12): 1976-1983.

- Smith, J. D., Subramanian, G., Gamain, B., Baruch, D. I., & Miller, L. H. 2000. Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family. *Mol Biochem Parasitol*, 110(2): 293-310.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y., & Hay, S. I. 2005. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature*, 434(7030): 214-217.
- Snow, R. W., & Marsh, K. 2010. Malaria in Africa: progress and prospects in the decade since the Abuja Declaration. *Lancet*, 376(9735): 137-139.
- Song, Y., Jin, S. J., Cui, L. H., Ji, X. J., & Yang, F. G. 2013. Immunomodulatory effect of Stichopus japonicus acid mucopolysaccharide on experimental hepatocellular carcinoma in rats. *Molecules*, 18(6): 7179-7193.
- Souza, R. M., Ataide, R., Dombrowski, J. G., Ippolito, V., Aitken, E. H., Valle, S. N., Alvarez, J. M., Epiphonio, S., & Marinho, C. R. 2013. Placental histopathological changes associated with Plasmodium vivax infection during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(2): e2071.
- Staalsoe, T., Shulman, C. E., Bulmer, J. N., Kawuondo, K., Marsh, K., & Hviid, L. 2004. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet*, 363(9405): 283-289.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J. M., Menard, R., & Heussler, V. T. 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313(5791): 1287-1290.

- Su, X. Z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P., Guinet, F., Herrfeldt, J. A., Peterson, D. S., Ravetch, J. A., & Wellems, T. E. 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell*, 82(1): 89-100.
- Thuma, P. E., van Dijk, J., Bucala, R., Debebe, Z., Nekhai, S., Kuddo, T., Nouraie, M., Weiss, G., & Gordeuk, V. R. 2011. Distinct clinical and immunologic profiles in severe malarial anemia and cerebral malaria in Zambia. *J Infect Dis*, 203(2): 211-219.
- Tisoncik, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P., Farrar, J., Martin, T. R., & Katze, M. G. 2012. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(1): 16-32.
- Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I., & Prabhu, R. M. 2003. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care*, 7(4): 315-323.
- Tripathi, A. K., Sha, W., Shulaev, V., Stins, M. F., & Sullivan, D. J., Jr. 2009. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood*, 114(19): 4243-4252.
- Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E., Avril, M., Brazier, A. J., Freeth, J., Jespersen, J. S., Nielsen, M. A., Magistrado, P., Lusingu, J., Smith, J. D., Higgins, M. K., & Theander, T. G. 2013. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*.
- Tuteja, R. 2007. Malaria - an overview. *FEBS J*, 274(18): 4670-4679.
- Udomsangpetch, R., Wahlin, B., Carlson, J., Berzins, K., Torii, M., Aikawa, M., Perlmann, P., & Wahlgren, M. 1989. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. *J Exp Med*, 169(5): 1835-1840.

- Vieira, R. P., & Mourao, P. A. 1988. Occurrence of a unique fucose-branched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber. *J Biol Chem*, 263(34): 18176-18183.
- Vieira, R. P., Mulloy, B., & Mourao, P. A. 1991. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues. *J Biol Chem*, 266(21): 13530-13536.
- Vieira, R. P., Pedrosa, C., & Mourao, P. A. 1993. Extensive heterogeneity of proteoglycans bearing fucose-branched chondroitin sulfate extracted from the connective tissue of sea cucumber. *Biochemistry*, 32(9): 2254-2262.
- Vogt, A. M., Barragan, A., Chen, Q., Kironde, F., Spillmann, D., & Wahlgren, M. 2003. Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes via the DBL1alpha domain of PfEMP1. *Blood*, 101(6): 2405-2411.
- Vogt, A. M., Pettersson, F., Moll, K., Jonsson, C., Normark, J., Ribacke, U., Egwang, T. G., Ekre, H. P., Spillmann, D., Chen, Q., & Wahlgren, M. 2006. Release of sequestered malaria parasites upon injection of a glycosaminoglycan. *PLoS Pathog*, 2(9): e100.
- Vogt, A. M., Winter, G., Wahlgren, M., & Spillmann, D. 2004. Heparan sulphate identified on human erythrocytes: a Plasmodium falciparum receptor. *Biochem J*, 381(Pt 3): 593-597.
- Walter, P. R., Garin, Y., & Blot, P. 1982. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol*, 109(3): 330-342.
- Werneck, C. C., Gomes, A. M., Farias, E. O. K., Pavao, M. S. G., Vicente, C. P., Bastos, M. F., Costa, F. T. M., & Sousa, H. S. P. 2011. Método para extração de heparan sulfato

de moluscos bivalves, composição farmacêutica contendo o extrato de heparan obtido segundo o método descrito e seus usos, Vol. PI11011394. Brasil.

White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., & Dondorp, A. M. 2014. Malaria. *Lancet*, 383(9918): 723-735.

White, N. J., Turner, G. D., Day, N. P., & Dondorp, A. M. 2013. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J Infect Dis*, 208(2): 192-198.

WHO. 1986. Severe and complicated malaria. World Health Organization Malaria Action Programme. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 80 Suppl: 3-50.

WHO. 2000. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94 Suppl 1: S1-90.

WHO. 2014. Severe malaria. *Trop Med Int Health*, 19 Suppl 1: 7-131.

World Health Organization. 2008. *Technical expert group meeting on intermittent preventive treatment in pregnancy (IPTp), WHO headquarters, Geneva, 11-13 July 2007*. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization. 2010. *Guidelines for the treatment of malaria* (2nd ed.). Geneva: World Health Organization.

World Health Organization. 2012a. *Management of severe malaria : a practical handbook* (3rd ed.). Geneva: World Health Organization.

World Health Organization. 2012b. *World malaria report 2012*. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization. 2014. *World malaria report 2014*. Geneva: World Health Organization.

- Xiao, L., Yang, C., Patterson, P. S., Udhayakumar, V., & Lal, A. A. 1996. Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes. *Infect Immun*, 64(4): 1373-1378.
- Yamada, S., Sugahara, K., & Ozbek, S. 2011. Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study. *Commun Integr Biol*, 4(2): 150-158.
- Yamauchi, L. M., Coppi, A., Snounou, G., & Sinnis, P. 2007. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol*, 9(5): 1215-1222.
- Zancan, P., & Mourao, P. A. 2004. Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 15(1): 45-54.
- Zhang, W., Lu, Y., Xu, B., Wu, J., Zhang, L., Gao, M., Zheng, S., Wang, A., Zhang, C., Chen, L., & Lei, N. 2009. Acidic mucopolysaccharide from *Holothuria leucospilota* has antitumor effect by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion in vivo and in vitro. *Cancer Biol Ther*, 8(15): 1489-1499.
- Zhang, Y., Jiang, N., Lu, H., Hou, N., Piao, X., Cai, P., Yin, J., Wahlgren, M., & Chen, Q. 2013. Proteomic analysis of *Plasmodium falciparum* schizonts reveals heparin-binding merozoite proteins. *J Proteome Res*, 12(5): 2185-2193.

ANEXOS



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: costaftm@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 sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
 Listagem de sequências 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 CONDROITIN SULFATO FUCOSILADO (FucCS) PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA CEREBRAL E GESTACIONAL E SEU USO”.

CAMPO DA INVENÇÃO

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

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

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 A malária apresenta elevados índices de mortalidade e morbidade. Estima-se 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: $[4-\beta\text{-D-GalA-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-GalNAc}]_n$, mas substituído na posição 3 dos resíduos de ácido $\beta\text{-D-glucurônico}$ com cadeias de 2-4-dissulfato α -

fucopirranose (Vieira & Mourão, *J Biol Chem* 263: 18176-83 (1988), Mourão e col., *J Biol Chem* 271: 23973-84 (1996)). O FucCS apresenta analogia em estrutura com glicosaminoglicanos de mamíferos, e tem demonstrado possuir diferentes atividades biológicas, como ação anticoagulante, devido a sua habilidade de potencializar a inibição da trombina e do fator Xa pela antitrombina e pelo cofator II da heparina, atribuída principalmente as cadeia de fucose sulfatada ligadas a condroitin sulfato (Mourão e col., *J Biol Chem* 271: 23973-84 (1996); Mourão., PIBr 9603405-0 (1998)). Este apresenta também, ação antitrombótica, atuando como uma droga antitrombótica efetiva em modelo experimental de trombose venosa e arterial quando administrada por via intravenosa em ratos (Pacheco e col., *Blood 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 -fucopiranose na posição 3, ou são 3-O-sulfatados (R1). A maioria das N-acetil- β -D-galactosamina são sulfatadas na posição 6 (R2).

30

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

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

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

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

Figura 6: Inibição da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* monofenotípico (PfeI^{CSA}) por diferentes GAGs. PfeI^{CSA} no estágio de trofozoíto 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).

10 **Figura 7:** Inibição da reinvasão de merozoítos de *P. falciparum* monofenotípico (PfeI^{ICAM}) por diferentes GAGs. PfeI^{ICAM} no estágio de trofozoíto 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

20 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

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

30

Seleção monofenotípica do parasita através de Panning

A técnica de Panning foi baseada no protocolo de Pouvelle *et al.* (1997) e objetivou a seleção monofenotípica do parasita. Células endoteliais CHO capazes de expressar apenas um receptor (ICAM, CD36) ou células HLEC, capazes de expressar principalmente o receptor CSA, foram crescidas até a confluência em garrafas de 75

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

30 (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

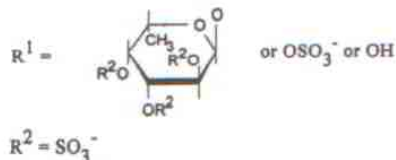
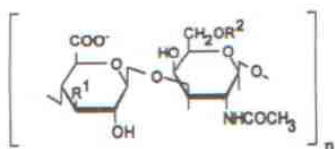
30

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.

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



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

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

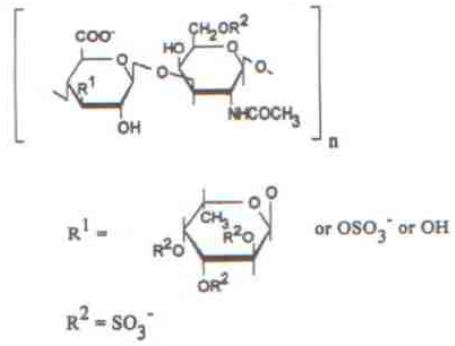


Figura 1

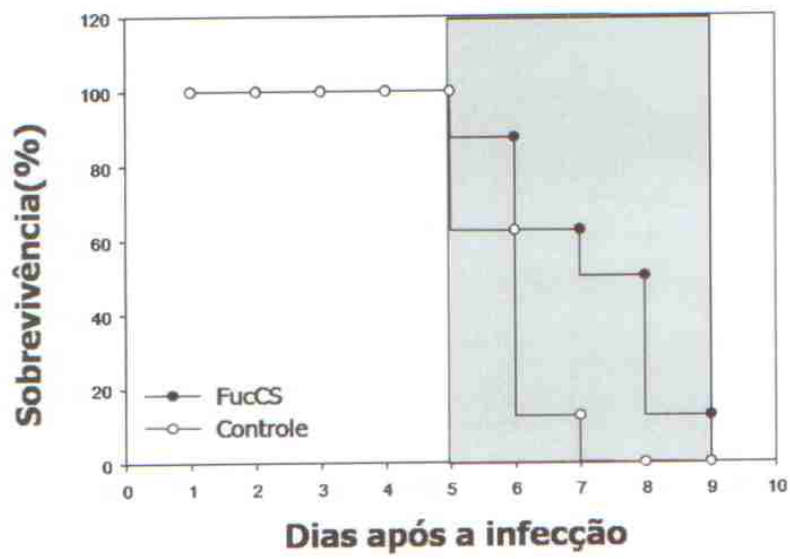


Figura 2

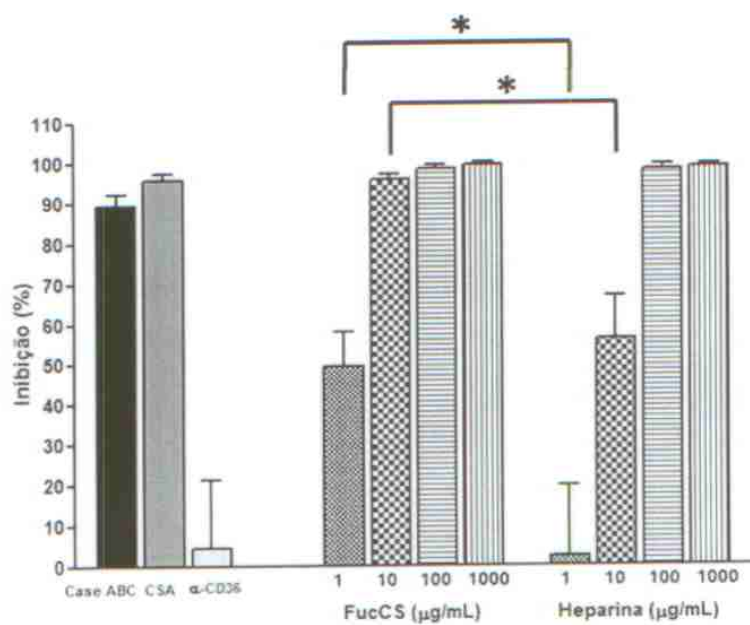


Figura 3

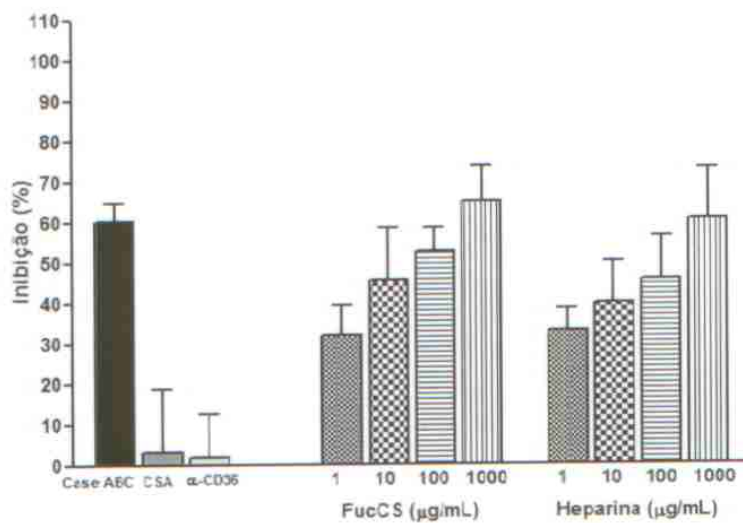


Figura 4

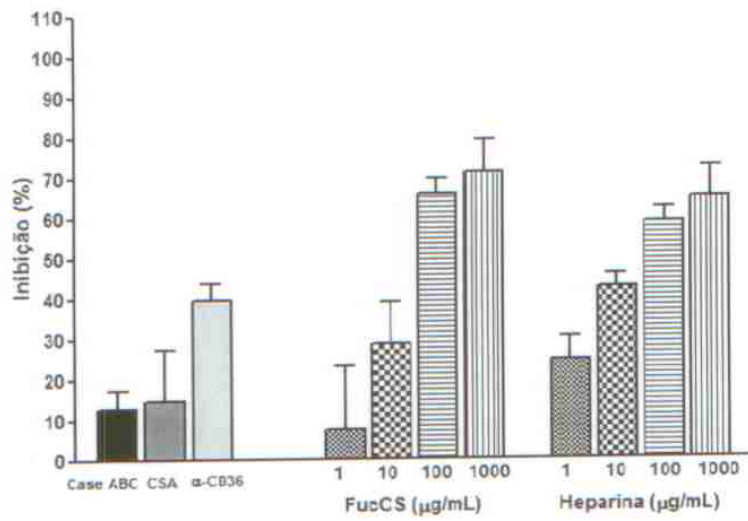


Figura 5

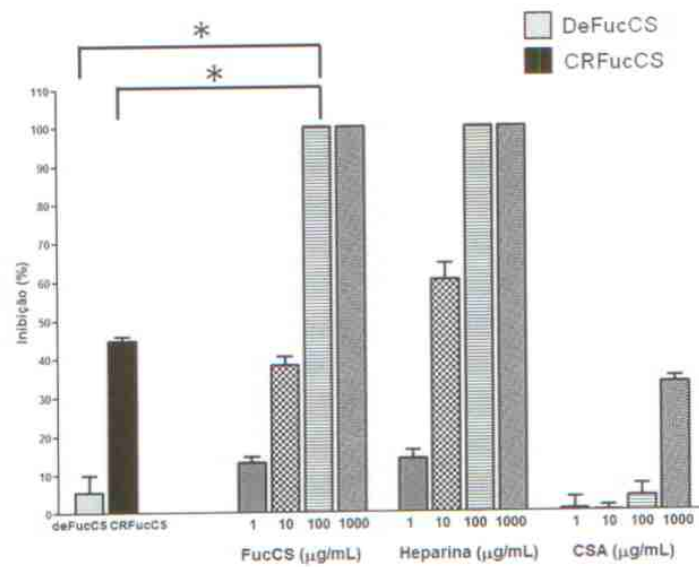


Figura 6

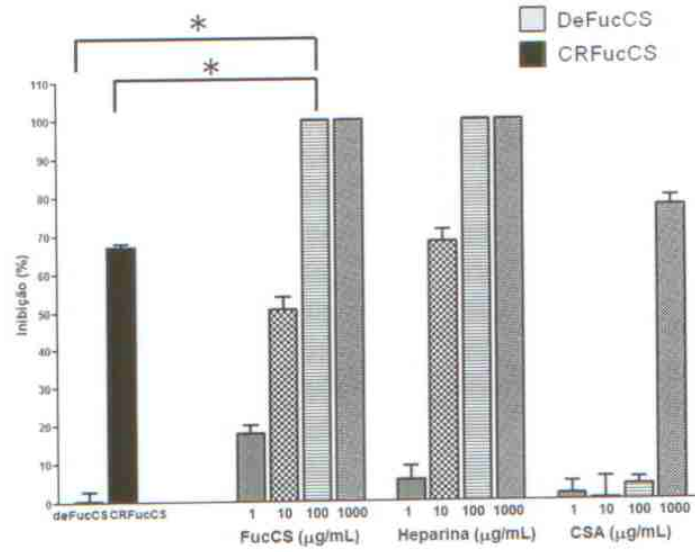


Figura 7

RESUMO

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

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

15



< Uso exclusivo do INPI >



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):

"MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE HEPARAN SULFATO DE MOLUSCOS BIVALVES, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O HEPARAN SULFATO OBTIDO SEGUNDO O MÉTODO DESCRITO E SEUS USOS"

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):

País 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: CLÁUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK
6.2 Qualificação: BRAS, PROF. UNIV, CASADO 6.3 CPF: 918687937-53
6.4 Endereço completo: Rua Iracema Salani Palazzo, 229, 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

continua em folha anexa

447-MOLUSO

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 - Campinas - SP

9.5 CEP: 13083-970

9.6 Telefone: 19 3521-4767

9.7 Fax: 19 3289-4245

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

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

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
 Listagem de sequências em formato impresso: fls.
 Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	16 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	5 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	6 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): 30 fls.

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

Campinas, SP, 30.03.11

Local e Data



Assinatura e Carimbo
Fernanda Lavras Costallat Silvano
Procuradora de Universidade Subchefe
Matrícula 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 sete inventores:

6.1 Nome: **ANGÉLICA MACIEL GOMES**

6.2 Qualificação: brasileira, solteira, bióloga

6.3 CPF nº 111.772.867-69

6.4 Endereço completo: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco,
255, Ilha do Fundão, no Rio de Janeiro - RJ

6.5 CEP: 21941-913

6.6 Telefone: (21) 3297.2228

6.7 FAX: (21) 2562.2090

6.8 E-Mail: amgomes@bioqmed.ufrj.br

6.1 Nome: **ELIENE OLIVEIRA KOZLOWSKI DE FARIAS**

6.2 Qualificação: brasileira, solteira, biomédica

6.3 CPF nº 103.310.707-74

6.4 Endereço completo: Rua Ministro Lafaiete de Andrade,
1683, Bloco 5/208, Bairro Marco II, em Nova Iguaçu - RJ

6.5 CEP: 26261-220

6.6 Telefone: (21) 2768.0760

6.7 FAX: (21) 2562.2090

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

6.1 Nome: **MAURO SÉRGIO GONÇALVES PAVÃO**

6.2 Qualificação: brasileiro, casado, professor colaborador

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: **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: **MARCELE FONTENELLE BASTOS**

6.2 Qualificação: brasileira, solteira, estudante de pós-graduação

6.3 CPF nº 025.372.235-78

6.4 Endereço completo: Rua Condessa do Pinhal, 440, Bairro Cidade Universitária I, Distrito de Barão Geraldo, 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: **FÁBIO TRINDADE MARANHÃO COSTA**

6.2 Qualificação: brasileiro, solteiro, professor universitário

6.3 CPF nº 573.444.341-72

6.4 Endereço completo: Rua Visconde de Pirajá, 358, Bairro San Conrado, Distrito de Sousas, em Campinas - SP

6.5 CEP: 13104-186

6.6 Telefone: (19) 3521.6594

6.7 FAX:

6.8 E-Mail: costaftm@unicamp.br

- 6.1 Nome: **HEITOR SIFFERT PEREIRA DE SOUZA**
- 6.2 Qualificação: brasileiro, casado, médico
- 6.3 CPF nº 888.171.997-53
- 6.4 Endereço completo: Av. Erico Veríssimo. 389/202,
Bairro da Barra, no Rio de Janeiro - RJ
- 6.5 CEP: 22621-180
- 6.6 Telefone: (21) 2429.3813
- 6.7 FAX: (21) 2562.2669
- 6.8 E-Mail: hsouza@hucff.ufrj.br

**“MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE HEPARAN SULFATO DE MOLUSCOS BIVALVES,
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O HEPARAN SULFATO OBTIDO SEGUNDO
O MÉTODO DESCRITO E SEUS USOS”**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção compreende um método para extração de heparan sulfato, um análogo da heparina, de vísceras do molusco bivalve *Nodipen nodosus*, através de precipitações seletivas dos polissacarídeos totais em etanol, uma composição farmacêutica contendo o heparan sulfato obtido segundo o método descrito e seus usos.

10 O composto obtido pelo método descrito, vantajosamente tem risco diminuído de acarretar problemas relacionados à contaminação viral ou por príons, em relação à heparina obtida de mamíferos, como bovinos ou porcos. Apresenta efeito anti-inflamatório, pois inibe eficientemente a ação de selectinas, responsáveis pela fase inicial do recrutamento das células imunológicas circulantes para os tecidos e,
15 apresenta atividade antitrombóticas testada em modelo arterial sem induzir riscos de sangramento.

O campo de aplicação da presente invenção visa à produção de medicamentos anti-inflamatórios e antitrombóticos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

20 A heparina é um polissacarídeo constituído de unidades alternadas de ácido glicurônico e glicosamina, com alto conteúdo de ésteres sulfato. Atualmente, a heparina, obtida de intestino e pulmão de bovinos e suínos, é o principal composto utilizado no tratamento e profilaxia da trombose venosa profunda (**Warkentin TE e Greinacher A, Chest, 126-3 Suppl:311S-337S, 2004; Ramzi DW e Leeper KV, Am Fam**
25 **Physician, 69:2841-8, 2004; Bernardi et al., Semin Thromb Hemost, 32:729-36, 2006).**

O mecanismo pelo qual a heparina exerce ação anticoagulante deve-se, principalmente, à sua interação com a antitrombina e com o cofator II da heparina, formando complexos covalentes inativos com a trombina e o fator Xa. Todavia, este

polissacarídeo é menos efetivo na inibição da trombina e do fator Xa situados dentro do coágulo.

A principal complicação clínica no uso da heparina é o sangramento por distúrbio da coagulação e/ou trombocitopenia (Rosenberg RD, Semin Hematol, 34
5 Suppl.4:2-8, 1997; Hirsch J e Raschke R, Chest, 126:188S-203S, 2004), e, além disso, pelo fato de ser extraída de tecidos de mamíferos (principalmente pulmão bovino e intestino de porco), pode acarretar problemas de contaminação viral e doença dos príons.

Além de sua atividade anticoagulante, as heparinas possuem outros efeitos
10 biológicos, tais como inibição de heparanases envolvidas na degradação da membrana basal, modulação de fatores de crescimento e proteases extracelulares, alteração da função de integrinas, inibição da angiogênese, etc. (Taylor KR e Gallo RL, FASEB J, 20:9-22, 2006).

Dentre as ações não-anticoagulantes, destaca-se a inibição de selectinas,
15 moléculas envolvidas na adesão e migração celular. Selectinas são moléculas de adesão celular responsáveis pela fase inicial do processo de recrutamento de células imunológicas circulantes para os tecidos, chamada de rolamento celular. As selectinas P e L, são lectinas tipo C que reconhecem ligantes fucosilados, sialilados, e sulfatados. A P-selectina é armazenada no interior de plaquetas e células endoteliais quiescentes,
20 mas sofre indução e transloca-se para a superfície celular mediante estimulação. No processo de rolamento, as células circulantes reduzem sua velocidade na luz vascular e aproximam-se do endotélio, resultando em ativação recíproca, expressão de integrinas, seguida de adesão firme das células ao vaso e diapedese ou transmigração para o tecido (Bevilacqua MP e Nelson RM, J Clin Invest, 91:379-387, 1993; Varki A,
25 Proc Natl Acad Sci USA, 91:7390-7397, 1994).

Existem diversos documentos que relacionam efeito inibitório de polissacarídeos sobre P-selectina. Por exemplo, no documento WO2007/014049, é descrito o efeito da heparina não fracionada, heparinas de baixo peso molecular e um pentassacarídeo sintético presente na molécula de heparina sob a ligação da L-

selectina e P-selectina e seus ligantes. Todas as moléculas testadas com exceção do pentassacarídeo inibiram P-selectina. Porém, é possível observar algumas desvantagens relativas a essa técnica. Nela, por exemplo, é feita a utilização de heparina não fracionada, a qual pode induzir hemorragia, e de pentassacarídeo, cuja síntese desse composto envolve aproximadamente 50 reações químicas, o que acaba encarecendo muito sua produção. Adicionalmente, esse composto não possui nenhum antídoto e não é capaz de inibir P-selectina, diferentemente do heparam sulfato do molusco, o qual inibiu de forma significativa P-selectina e por isso apresentou efeito antiinflamatório.

10 A utilização do molusco *Nodipen nodosus* é interessante, pois oferece uma nova fonte de obtenção de heparina, diminuindo a dependência das poucas fontes de extração utilizadas no momento. O análogo da heparina presente no molusco não ocasiona sangramentos, se mostrando um composto seguro em relação à heparina não fracionada. Adicionalmente, esse composto é capaz de inibir a ligação entre P-selectina e seus ligantes, gerando efeitos antiinflamatórios sem apresentar efeitos citotóxicos.

As doenças inflamatórias, cardiovasculares, e neoplásicas, apresentam distribuição universal, com elevada prevalência, morbidade e mortalidade, sendo o tratamento, freqüentemente, apenas sintomático ou paliativo e quase sempre acompanhado de efeitos adversos. Entretanto, estas doenças estão inter-relacionadas e apresentam componentes moleculares comuns, tais como as selectinas (Ludwig RJ *et al.*, *Expert Opin Ther Targets*, **11:1103-1117**, 2007). O padrão de expressão das selectinas P e L é compatível com sua participação na coagulação, e em doenças envolvendo inflamação e reperfusão (McEver RP *et al.*, *J Biol Chem*, **270:11025-11028**, 1995; Butcher EC e Picker LJ, *Science*, **272:60-66**, 1996; Myers DD *et al.* *Thromb Haemost*, **97:400-407**, 2007), e também em metástases (Borsig L, *Semin Thromb Hemost*, **33:540-546**, 2007), sendo seu papel confirmado em experimentos com animais deficientes para as moléculas (Iwaki T *et al.*, *Blood*, **107:3883-3891**, 2006; Schmitt-Sody M *et al.*, *Platelet*, **18:365-372**, 2007; Woollard KJ e Chin-Dusting J, *Inflamm Allergy Drug Targets*, **6:69-74**, 2007; Jiao A *et al.*, *Ann Allergy Asthma Immunol*, **98:83-88**, 2007).

Vários estudos documentaram o efeito inibitório de heparinas sobre selectinas P e L, como potencialmente relevante tanto para o mecanismo da trombose, como da inflamação, e da disseminação de metástases (Gao Y *et al.*, *Mol Cells*, 19:350-355, 2005; Stevenson JL *et al.*, *Clin Cancer Res*, 11:7003-7011, 2005; Maugeri N *et al.*, 5 *Thromb Haemost*, 97:956-973, 2007; Niers TM *et al.*, *Crit Rev Oncol Hematol*, 61:195-207, 2007).

Outros agentes antitrombóticos alternativos a heparina vêm sendo descritos. Entre eles, destaca-se o dermatam sulfato, um polissacarídeo cuja estrutura é semelhante à da heparina, porém com menor ação anticoagulante (Du HY *et al.*, 10 *Thromb Res*, 119:377-384, 2007). Portanto, altas doses, calculadas em mg/kg de peso corporal, são necessárias para o estabelecimento do efeito antitrombótico *in vivo*, podendo causar dor e hematoma no local de sua aplicação. O dermatam sulfato também é extraído de tecidos de mamíferos podendo causar os mesmos problemas de contaminação com vírus e prions já citados para a heparina.

15 Embora as ações anti-inflamatória e anti-neoplásica da heparina comercial tenham sido caracterizadas anteriormente, a medicação não é preconizada para o tratamento desses transtornos por não haver avaliação favorável quanto aos riscos e benefícios. As doses necessárias para a produção do efeito anti-inflamatório ou anti-neoplásico tornam elevado o risco de hemorragia.

20 No documento **US 2003/0147848** é proposta uma modificação estrutural na molécula de heparina com tratamentos químicos a fim de se obter um composto com efeitos antiinflamatórios sem gerar sangramento, porém, diversos fatores podem alterar a reação química, como temperatura, concentração dos reagentes dentre outros dificultando uma reprodutibilidade na técnica.

25 Na presente invenção, é proposto um método para extração de um análogo de heparina do molusco e este composto apresenta efeito antiinflamatório por ser um potente inibidor de P-selectina, sem induzir efeitos hemorrágicos. A principal vantagem da presente invenção deve-se ao fato de a obtenção desse composto através do método descrito possibilitar que não seja necessário realizar nenhuma 30 alteração na estrutura da molécula através de procedimentos químicos, diminuindo os

gastos para obtenção do composto. Além disso, diversos fatores podem alterar uma reação química, como temperatura, concentração dos reagentes dentre outros dificultando uma reprodutibilidade na técnica.

Outra ação da heparina relaciona-se à trombose arterial e trombose venosa, e importantes avanços têm ocorrido na compreensão dos mecanismos moleculares das trombozes e de medicamentos anti-trombóticos.

As moléculas envolvidas na trombose arterial derivam de células inflamatórias presentes na placa aterosclerótica, e de plaquetas circulantes. A ação combinada dessas moléculas promove instabilidade da placa e trombogenicidade, e a ruptura da placa aterosclerótica é seguida pela formação de trombo, mediada por plaquetas e pela ativação do sistema de coagulação, freqüentemente levando a obstrução arterial e suas conseqüências tais como o infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico e síndromes isquêmicas periféricas. Por outro lado, na trombose venosa, as moléculas que governam o processo patológico são predominantemente as derivadas da cascata de coagulação ativada. As drogas com ação anti-trombótica são classificadas de acordo com seus alvos terapêuticos: agentes anti-plaquetários e agentes anti-coagulantes, tais como heparinas, antagonistas da vitamina K, e inibidores diretos da trombina. (Wu KK e Matijevic-Aleksic N, *Crit Rev Clin Lab Sci*, 42:249-277, 2005).

Há muito, a molécula de adesão celular P-selectina é reconhecida como responsável pelo rolamento e migração de leucócitos para locais de inflamação tecidual (Luscinskas FW *et al.*, *J Exp Med.*, 181:1179-1186, 1995; Rainger GE *et al.*, *Curr Biol*, 7:316-325, 1997). Recentemente, a P-selectina também foi revelada como essencial na hemostasia e na trombose, mediando o rolamento de plaquetas, sendo capaz de gerar micropartículas pró-coagulantes contendo fator tecidual ativo, e intensificando a deposição de fibrina (Cambien B e Wagner DD, *Trends Mol Med*, 10:179-186, 2004; Gross PL *et al.*, *J Leukoc Biol*, 78:1318-1326, 2005). Portanto, níveis elevados da forma solúvel da P-selectina estão associados com transtornos trombóticos e são preditivos de futuros eventos cardiovasculares (Sakurai S *et al.*, *Vasc Med*, 2:163-168, 1997; Varughese GI *et al.*, *J Intern Med*, 261:384-391, 2007).

A descoberta de que a interação de P-selectina com seu receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) está envolvida no mecanismo pelo qual a P-selectina induz a formação de micropartículas pró-coagulantes e recruta micropartículas para trombos (Vandendries ER *et al.*, *Thromb Haemost*, **92:459-466**, 2004), assim como no
5 recrutamento de monócitos para a placa de ateroma durante o processo aterogênico (Galkina E and Ley K, *Curr Drug Targets*, **8:1239-1248**, 2007), faz dessa interação um alvo bastante atraente para a intervenção terapêutica.

Além dessas características já descritas, devemos considerar que embora aparentemente não estejam relacionados, inflamação e câncer estão intimamente
10 associados com doença tromboembólica e vice-versa (Geng JG *et al.*, *Curr Med Chem*, **11:2153-2160**, 2004; Stevenson JL *et al.*, *Clin Cancer Res*, **11:7003-7011**, 2005). Corroborando estas observações, alguns ensaios clínicos mostram que as heparinas utilizadas para a prevenção da recorrência de trombo-embolismo venoso, também melhoram a sobrevida dos pacientes com câncer, efeito não observado com os
15 antagonistas da vitamina K (Lee AY, *Thromb Res*, **120 Suppl 2:S121-127**, 2007). Sugere-se que a atividade anti-câncer das heparinas ocorra mais pela inibição da disseminação de metástases do que sobre o crescimento do tumor primário (Niers TM *et al.*, *Crit Ver Oncol Hematol*, **61:195-207**, 2007).

Além da participação em estados inflamatórios e na formação de trombos, um
20 papel fundamental é atribuído a P-selectina na formação de metástases tumorais (Varki NM e Varki A. *Semin Thromb Hemost*, **28:53-66**, 2002). Evidências mostram que células tumorais expressam níveis mais elevados de ligantes de selectinas do que células normais livres de tumor, apresentando uma relação inversa da expressão de formas solúveis de selectinas com a sobrevivência de pacientes com câncer de pulmão
25 (Roselli M *et al.*, *Int J Biol Markers*, **17:56-62**, 2002) e de cólon (Ferroni P *et al.*, *Int J Câncer*, **111:404-408**, 2004).

Embora o mecanismo exato pelo qual as heparinas exercem atividade anti-neoplásica ainda não esteja bem estabelecido, sugere-se a existência de ações biológicas adicionais. Sendo que os mecanismos mais aceitos para explicar o efeito das
30 heparinas sobre a formação de metástases são o bloqueio das selectinas, a inibição da

invasão celular, e o bloqueio da angiogênese (Simonis D *et al.*, *Semin Thromb Hemost*, 33:534-539, 2007; Hostettler N *et al.*, *FASEB J*, 21:3562-3572, 2007).

Entre os vários invertebrados marinhos, os moluscos bivalves apresentam um análogo da heparina. O invertebrado marinho *Nodipecten nodosus*, do qual é extraído o heparan sulfato através do método descrito na presente invenção, é de fácil obtenção, manuseio, armazenamento e pode ser cultivado. É também proporcionalmente muito mais rico no glicosaminoglicano análogo da heparina do que os mamíferos, chegando a representar 0,5% de peso seco do molusco, em comparação com 0,22% do peso seco obtido na mucosa intestinal suína. Por serem invertebrados e de pequeno tamanho comparativamente aos mamíferos, a extração e a purificação dos glicosaminoglicanos análogos da heparina torna-se mais simples, mais rápida, e com maior rendimento.

Estudos recentes mostraram que o composto análogo da heparina do molusco apresenta ação anticoagulante e antitrombótica significativa, sem produzir sangramento, efeito tóxico em fibroblastos murinos e produção de bradicinina mediada pela ativação do fator XII.

A presente invenção apresenta uma metodologia para isolamento deste composto, envolvendo precipitações seletivas com álcool. Além disso, o composto apresenta atividade anticoagulante, atividade antitrombótica menor que a da heparina de porco, porém significativa modelo de trombose arterial. Também há a possibilidade de obtenção de grandes quantidades do molusco através de cultivo, como por exemplo, em 1999, cerca de 73 mil toneladas de molusco foram produzidas no mundo (Bourne NF, *The potential for scallop culture - the next millenium. Aquacult Int* 8 (2-3):113-122, 2000).

25

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Para a extração do composto, vísceras do molusco *Nodipecten nodosus* devem ser separadas dos músculos adutores, fragmentadas e imersas em propanona por 12 horas a 4°C.

Depois de secas a 60°C, as vísceras são suspensas em tampão contendo acetato de sódio, papaína, EDTA, e cisteína e incubadas a 60°C por 12 horas. Em seguida, essa mistura deve ser centrifugada à temperatura ambiente, o sobrenadante separado e o precipitado incubado com papaína, sendo este procedimento repetido por 3 vezes nas
5 mesmas condições descritas acima.

Os sobrenadantes obtidos devem ser agrupados e misturados com solução de cloreto de cetilpiridina por 12 horas a temperatura ambiente, enquanto o precipitado é lavado com uma solução também de cloreto de cetilpiridina, e ressuspenso em NaCl e etanol.

10 A solução que contém o precipitado com cloreto de cetilpiridina, NaCl e etanol, é misturada novamente com etanol, mantida a 4°C por 12 horas e centrifugada à temperatura ambiente. Esse novo precipitado deve ser seco e dissolvido em NaCl 2%.

Em seguida, esse novo precipitado dissolvido em NaCl 2% deve ser misturado com etanol absoluto, até alcançar a concentração final de 35,6%, e mantido a 4°C por
15 12 horas.

Em seguida, a mistura contendo o precipitado dissolvido em NaCl 2%, misturado com álcool deve ser centrifugada e o precipitado formado conterá uma fração de glicanos, denominada P-1. O sobrenadante, por sua vez, deve ser misturado com etanol absoluto até alcançar a concentração final de etanol de 47%.

20 Este sobrenadante é submetido novamente à centrifugação e o precipitado que se formará, conterá outra fração de glicanos, denominado P-2.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Figura apresenta as frações dos polissacarídeos em eletroforese de gel de agarose, obtidos no processo de precipitação seletiva com etanol (A). Frações P-1, P-2
25 e P-3. Caracterização da fração P-2 por tratamento químico com ácido nítrico.

Figura 2: Espectro de Proton do heparam sulfato de *N. Nodosus*, mostrando os sinais característicos de ácido glucurônico (G) e Glucosamina (A). G2S, ácido glucurônico 2-

sufatado; G3S, ácido glucurônico 3-sufatado; ANAC, glucosamina N-acetilada; ANS, glucosamina N-sulfatada; AN,6S, glucosamina N,6-sulfatada.

Figura 3: Estrutura das principais unidades dissacarídicas repetitivas do heparan sulfato do *N.nodosus*.

- 5 Figuras 4: Gráfico de barras mostrando o prolongamento do tempo de oclusão da artéria carótida pelo heparan sulfato de *N.nodosus* e heparina de mamífero no experimento de trombose arterial induzido por lesão endotelial por Laser, *in vivo* (A). Perda de sangue induzida pela administração do heparan sulfato do molusco e pela heparina de mamífero no experimento de hemorragia *in vivo* (B).
- 10 Figura 5: Gráfico mostrando a velocidade na produção de bradicinina, mediada pela ativação do fator XII pelo heparan sulfato do molusco e a heparina de mamífero (A). Efeito do heparan sulfato do molusco na viabilidade de fibroblastos de mamíferos (B).

Figura 6: Gráfico mostrando que o heparan sulfato do molusco e a heparina de mamífero inibem a ligação de células tumorais humanas a P-selectina.

- 15 Figura 7: Gráfico de barras mostrando a capacidade de inibição de migração de neutrófilos provocada pela Heparina e pelo heparan sulfato de *N. nodosus*, utilizando o tampão PBS como controle.

Figura 8: Gráfico de barras apresentando comparação de perda de sangue entre animais tratados com heparina de mamíferos e Heparan Sulfato do molusco *N.*

- 20 *nodossus*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

- A presente invenção refere-se a um método de extração de heparan sulfato, um análogo de heparina, de vísceras de moluscos bivalves, bem como a uma composição medicamentosa que contém o heparan sulfato obtido pelo método descrito e seus
- 25 usos. O molusco utilizado nesta invenção é o da espécie *Nodipecten nodosus* e o heparan sulfato obtido através do método descrito nesta invenção apresenta atividade

anti-selectina e efeito terapêutico na trombose arterial, inflamação e metástase tumoral.

Para a extração do heparan sulfato, o corpo de moluscos bivalves *Nodipecten nodosus* devem ser retirados das conchas e suas vísceras separadas do músculo adutor, o qual não contém heparina. As vísceras devem então ser fragmentadas em pequenos pedaços e imersas em propanona por um período de 12 horas a 4°C.

O material deve ser seco em estufa a 60°C e as vísceras, depois de secas, suspensas em 20 ml de tampão compreendendo 0,1 M acetato de sódio (pH 5,5), contendo 100 mg de papaina, 5 mM EDTA, e 5 mM cisteína, e incubado à 60°C por 12 horas.

Em seguida, a mistura contendo as vísceras ressuspensas e o tampão deve ser centrifugada a 2000 x g por 10 min, a temperatura ambiente. Separa-se, então, o sobrenadante e incuba-se o precipitado com papaina, sendo este procedimento repetido por 3 vezes nas mesmas condições descritas acima.

Os sobrenadantes obtidos nas extrações devem ser agrupados, enquanto o precipitado é lavado com uma solução de cloreto de cetilpiridina, na concentração final de 0,05%, e suspenso em 2 M de NaCl em etanol absoluto (100:15, v/v).

Mistura-se, então, a solução com 2 volumes de etanol absoluto e mantém-se a 4°C por 12 horas. Em seguida, deverá ser centrifugada a 2000 g por 10 min, a temperatura ambiente e, após a centrifugação, o precipitado formado que conterà os glicídeos totais deverá ser seco e dissolvido em água destilada.

O fracionamento dos glicídeos presentes nas vísceras do molusco que foram processadas pode ser realizado submetendo o precipitado obtido na última centrifugação descrita, e que foi dissolvido em água destilada, à precipitação diferencial em etanol. Neste procedimento, a solução aquosa dos glicanos totais deve ser misturada com etanol absoluto, até alcançar a concentração final de 35,6%, e mantida a 4°C por 12 horas.

Após centrifugação, precipitará uma primeira fração de glicanos, denominada de P-1. O sobrenadante, por sua vez, é misturado com etanol absoluto até alcançar a concentração final de etanol de 47%.

Este sobrenadante é submetido novamente à centrifugação e o precipitado que se forma, e contém a segunda fração de glicanos, é denominado P-2.

Os glicanos P-1 e P-2 devem ser secos, suspensos em água destilada e analisados por eletroforese em gel de agarose. A fração P-2, contém o heparam sulfato purificado, como indicado pela degradação específica por ácido nitroso.

EXEMPLOS

Exemplo 1: A ANÁLISE DA ESTRUTURA DO HEPARAN SULFATO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONS

Os glicanos obtidos após a extração e precipitação, denominados de P-1, P-2 foram secos e suspensos em água destilada e analisados por eletroforese em gel de agarose (**Figuras 1A e 1B**). A fração P-2, contém o heparam sulfato purificado, como indicado pela degradação específica por ácido nitroso (**Figura 1B**).

A análise da estrutura do composto foi realizada por ressonância magnética nuclear de protons (**Figura 2**), que evidenciou a presença de resíduos característicos de heparam sulfato contendo ácido glucurônico sulfatado no carbono 2 ou no carbono 3, glucosamina N-sulfatada ou N e 6-sulfatada ou, ainda, glucosamina N-acetilada. As análises por ressonância permitiram propor que o heparam sulfato do molusco é composto por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido glucurônico 2- ou 3-sulfatado e N-acetil glucosamina N-acetilada, N-sulfatada ou N,6 di-sulfatada, nas proporções mostradas na **Figura 3**.

Exemplo 2: ENSAIO DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO*

Após consentimento, plasma humano de doadores sadios foi coletado em uma solução de citrato de sódio 3,8%, na proporção de 9:1 e analisado pelo Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT) (**Anderson et al, 1976**), no qual 90 µL de um

“pool” de plasma é incubados por 1 min a 37 °C com 10 µL de soluções com diferentes concentrações de HS do molusco ou heparina (de porco). Posteriormente, 100 µL de cefalina ativada foram adicionados à mistura, que foi incubada por mais 2 min. Em seguida, 100 µL de CaCl₂ 0,25 M foram acrescentados e o tempo de coagulação foi registrado em um microcoagulômetro.

O heparam do molusco possui uma atividade anticoagulante de 38,3 UI mg⁻¹, medida pelo aPTT, enquanto que a da heparina suína é de 180 UI mg⁻¹, inibindo a trombina e o fator Xa pela antitrombina, sendo sua concentração necessária para inibir 50% da atividade (IC₅₀) de 0,012 e 0,9 µg ml⁻¹, respectivamente, e a trombina pelo cofator II da heparina com IC₅₀ de 4 µg ml⁻¹. Dessa forma, o mecanismo molecular envolvido na atividade anticoagulante do heparam sulfato do molusco ocorre através da potencialização da antitrombina e do cofator II da heparina.

Exemplo 3: INIBIÇÃO DA TROMBINA OU FATOR XA POR AT OU HCII NA PRESENÇA DE POLISSACARÍDEOS

Em placas de 96 poços, adicionaram-se anti-trombina (AT) em concentração de 10 nM, ou cofator II da heparina (HCII) em concentração de 15 nM, além de 2 nM de trombina ou fator Xa e diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados em 40 µL de tampão Tris/PEG (Tris/HCl 0,02 M, NaCl 0,15 M e 1,0 mg/mL de polietileno glicol 8.000, pH 7,4) e 100 µM de substrato cromogênico.

A trombina ou o fator Xa foi adicionado no início da reação. Depois de 60 segundos de incubação com os glicosamino glicanos (GAGs) e com os inibidores a 37°C, 25 µL de substrato cromogênico para trombina ou para fator Xa foram adicionados e a absorbância a 405 nm foi registrada por 120 segundos.

As taxas de variações na absorbância foram proporcionais à atividade da trombina ou do fator Xa remanescentes na incubação e não houve inibição nos experimentos controle onde a trombina ou fator Xa foi incubado com AT ou HCII na ausência de polissacarídeos sulfatados.

Além disso, nenhuma inibição foi observada quando a trombina ou fator Xa foram incubados somente com polissacarídeos sulfatados ao longo das concentrações testadas. Considerou-se como controle, 100% da atividade da trombina usando os reagentes sem a adição de polissacarídeos sulfatados, e a concentração de polissacarídeos sulfatados suficiente para conseguir 50% da inibição da atividade da trombina ou fator Xa (IC50).

Exemplo 4: TROMBOSE ARTERIAL INDUZIDA POR LESÃO FOTOQUÍMICA DA CARÓTIDA

A trombose na artéria carótida foi induzida de acordo com a metodologia descrita por Vicente et al., 2004 (VICENTE, C. P., HE, L., PAVÃO, M. S. G., TOLLEFSEN, Douglas. *Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II-deficient mice. Blood (Philadelphia)*, v.104, p.3965 - 3970, 2004), na qual ratos adultos, fêmeas ou machos de 200 g de peso corporal foram anestesiados com injeção intramuscular de quetamina com dose de 100 mg kg⁻¹ e xilazina na dose de 16 mg kg⁻¹, imobilizados em posição supina sob microscópio de dissecação.

A artéria carótida direita foi isolada através de uma incisão cervical e um probe de fluxo ultrassônico foi aplicado. Um feixe de laser de 1.5-mW, 540-nm foi aplicado na carótida de uma distância de 6 cm. Em seguida, a injúria foi iniciada pela injeção do corante foto-sensível rosa de bengala, em uma concentração de 50 mg kg⁻¹, dissolvido em tampão fosfato salina (PBS). O fluxo sanguíneo foi monitorado até a ocorrência de uma oclusão completa e estável.

Heparina de mamífero ou a sua análoga obtida do molusco foi dissolvida em 0.15 M NaCl e injetada por via intravenosa na veia cava 15 min antes da injeção do corante rosa de bengala. O tempo de oclusão da artéria foi determinado pelo medidor de fluxo. O volume total de material injetado não excedeu 10% do volume de sangue do rato. Pelo menos 5 animais foram utilizados por grupo e o tempo de oclusão foi determinado em minutos.

Verificou-se que o heparam do molusco prolonga o tempo de oclusão da artéria carótida de forma dependente da dose, sendo que na dose de 1 mg por kilo, seu efeito

antitrombótico é semelhante ao da heparina suína na dose de 0.1 mg por kilo. Nesta dose, como observado pela **Figura 4B**, o heparam do molusco não causa nenhum efeito de sangramento significativo. Da mesma forma, na dose antitrombótica máxima de 1 mg por kilo, o heparam do molusco não promove a produção de caliceína, mediado pela ativação do fator XII, como mostra a **Figura 5A**, assim como não causa nenhum efeito tóxico em células de fibroblasto humano, **Figura 5B**.

Exemplo 5: ATIVAÇÃO DO FATOR XII NA PRESENÇA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Plasma humano normal (40 μ L) foi diluído com 3 volumes de tampão Tris/ Polietilenoglicol (PEG) e incubado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados (30 μ L). Depois de 60 segundos de incubação a 37°C, 30 μ L de substrato cromogênico S-2302 a 0,6 mM foram adicionados, e a absorbância a 405 nm foi registrada por 300 segundos.

O S-2302 é um substrato cromogênico para a caliceína plasmática, que é ativada a partir de seu precursor pré-caliceína pela ação do fator XII ativo. O método para a determinação da atividade é baseado na diferença de absorbância entre a p-nitroanilida formada e o substrato original. A taxa de formação da p-nitroanilida, ou seja, o aumento da absorbância a 405 nm é proporcional a atividade da enzima. Não ocorre ativação do fator XII na ausência de polissacarídeos sulfatados. O resultado pode ser observado na **Figura 5A**.

Exemplo 6: INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS A P-SELECTINA

O efeito inibitório do análogo da heparina do molusco na ligação da células tumorais humanas às selectinas imobilizadas foi realizado através de ensaio de ELISA onde as selectinas foram adsorvidas em uma placa de 96 poços e incubadas com as células tumorais (carcinoma de colo humano – LS 180), na presença ou ausência dos compostos. Em seguida, a percentagem de inibição da ligação foi calculada.

A **Figura 6** mostra a habilidade do heparam sulfato do molusco em inibir a ligação de células LS-180, carcinoma de colo humano, à P-selectina. O análogo da

heparina do molusco inibe a ligação de células tumorais a P-selectina de uma maneira dose-dependente. A partir da curva da **Figura 6**, é possível se obter a concentração dos compostos necessária para inibir 50% da ligação (IC50). O IC50 do composto do molusco é de 38,19 $\mu\text{g ml}^{-1}$, próximo a da heparina de mamíferos que é de 24 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

5 Exemplo 7: EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO

O efeito antiinflamatório do heparam sulfato do molusco foi avaliado pelo modelo de inflamação peritoneal induzida por tioglicolato.

Segundo essa técnica, 2 ml de uma solução estéril de tioglicolato a 3%, ou salina, são injetados intraperitonealmente em camundongos. Após 5 minutos, os
10 animais recebem 0,2 ml de salina estéril com ou sem heparam sulfato de molusco ou heparina de mamífero (0,5 mg/animal).

Os animais são sacrificados após 3 h, e as cavidades peritoneais lavadas com 8 ml de PBS gelado contendo 3 mM de EDTA. As células peritoneais foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas por microscópio.

15 Neste experimento mediu-se o recrutamento de neutrófilos para o peritônio inflamado, na presença ou ausência de compostos antiinflamatórios. A partir do gráfico da **Figura 7**, pode-se observar que a administração intravenosa do heparam sulfato do molusco foi capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos de forma semelhante à heparina de mamífero, indicando, dessa forma, um efeito
20 antiinflamatório do composto.

Exemplo 8: EFEITO HEMORRÁGICO

Ratos Wistar (com aproximadamente 200 g de peso corporal) foram anestesiados com uma combinação de ketamina e xilazina e uma cânula foi inserida na artéria carótida direita para a administração intravascular de heparan sulfato do *N. nodosus* ou heparina.
25

Após 5 minutos de circulação da amostra, um segmento de 3 mm da cauda do rato foi cortado e, logo após, a cauda foi inserida cuidadosamente numa proveta

contendo 40 mL de água destilada. A perda sangüínea foi determinada após 60 minutos, mensurando o nível de hemoglobina dissolvida na água pelo método espectrofotométrico descrito por Herbert e colaboradores (HEBERT, J.M., BERNAT A., MAFFRANDJ.P., **Importance of platelets in experimental venous thrombosis in rats. Blood 80: 2281-2286; 1992**). O volume de sangue perdido foi determinado através de uma curva padrão baseada na absorbância a 540 nm.

O resultado pode ser observado no gráfico de barras apresentado na **Figura 8**.

Exemplo 9: ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A toxicidade do heparan sulfato do *N. nodosus* para células BHK-21 (células de rim de hamster sírio) foi avaliada por meio do ensaio de redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63. O MTT é reduzido por células viáveis, por meio da atividade de redutases mitocondriais, em um composto denominado formazana, que pode ser quantificado por medidas espectrofotométricas

Monocamadas celulares em placa de 96 poços foram incubadas com diferentes concentrações do heparan sulfato do *N. nodosus* e heparina a 37°C por 48 horas, sendo, subseqüentemente, adicionado ao meio o MTT a uma concentração final de 250 µg/mL. Após 4 horas de incubação a 37°C, os cristais de formazana gerados foram solubilizados em uma solução de lise (DMF 50% e SDS 20%, pH 4,8) e a viabilidade celular determinada analisando-se a absorbância das amostras a 570 nm. O resultado pode ser observado na Figura B.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para extração de heparan sulfato **caracterizado por** conter as seguintes etapas:

- a) Separação das vísceras de molusco bivalve;
- 5 b) Fragmentação das ditas vísceras do molusco;
- c) Imersão dos fragmentos das vísceras do molusco em propanona;
- d) Secagem do tecido descrito em (c) ou resultante de (c);
- e) Incubação do tecido seco (d) em solução tampão;
- f) Centrifugação da mistura obtida em (e);
- 10 g) Incubação do precipitado obtido em (f) com papaína;
- h) Agrupamento dos sobrenadantes obtidos nas centrifugações feitas em (f);
- i) Lavagem dos precipitados obtidos nas centrifugações descritas em (f), com cloreto de cetilpiridina;
- j) Repetição dos procedimentos descritos de (d) a (h) por 3 vezes;
- 15 k) Suspensão do precipitado descrito em (j) em NaCl e etanol;
- l) Mistura da solução descrita em (k) em etanol;
- m) Centrifugação da mistura descrita em (l) e separação do precipitado obtido;
- n) Secagem do precipitado obtido em (m);
- o) Dissolução do precipitado seco descrito em (n) em NaCl 2%;
- 20 p) Adição de etanol absoluto à mistura descrita em (o);
- q) Centrifugação da mistura descrita em (p) e precipitação de uma primeira fração de glicanos;
- r) Adição de etanol absoluto ao sobrenadante da centrifugação (q);

- s) Centrifugação da mistura descrita em (r) e precipitação de uma segunda fração de glicanos;
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** imersão do músculo adutor em propanona (c) ocorrer entre 6 e 13 horas.
- 5 3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** imersão do músculo adutor em propanona (c) ser feita preferencialmente por 12 horas.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** imersão do músculo adutor em propanona (c) ocorrer entre 0 e 24 graus Celsius.
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** imersão do músculo adutor ser feita em propanona (c), preferencialmente a 4° C.
- 10 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** solução utilizada em (e) compreender acetato de sódio, de papaina, EDTA e cisteína.
7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pela** solução utilizada em (e) compreender preferencialmente 0,1 M acetato de sódio (pH 5,5), 100 mg de papaina, 5 mM EDTA, e 5 mM cisteína, sendo acrescentada preferencialmente em volume igual a 20 vezes o peso do material seco.
- 15 8. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pela** solução utilizada em (e) ser acrescentada preferencialmente em volume igual a 20 vezes o peso do material seco.
- 20 9. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pela** incubação descrita em (e) ocorrer entre 40 e 65 graus Celsius.
10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada pela** incubação (e) ocorrer preferencialmente a 60°C.
11. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada pela** incubação descrita em (e) ocorrer entre 6 e 13 horas.
- 25

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada pela** incubação descrita em (e) ser feita preferencialmente por 12 horas.
13. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** centrifugação (f) ser feita a pelo menos 2000 x g, durante pelo menos 10 minutos .
- 5 14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** sobrenadante derivado da centrifugação (f) ser misturado com cloreto de cetilpiridina (h) em concentração final preferencialmente de 0,5%.
15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pela** mistura dos sobrenadantes com cloreto de cetilpiridina (h) ser feita entre 6 e 13 horas.
- 10 16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pela** mistura dos sobrenadantes com cloreto de cetilpiridina (h) ser feita preferencialmente por 12 horas.
17. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** lavagem do precipitado com cloreto de cetilpiridina (i) ser feita preferencialmente na concentração de até 0,05 %.
- 15 18. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** suspensão do precipitado (k) ser feita preferencialmente em NaCl 2M e etanol com 95% de volume.
19. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** solução (l) misturada em etanol ser mantida entre 0 e 5 graus.
- 20 20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado pela** mistura da solução (l) em etanol ser feita preferencialmente a 4° C.
21. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** mistura da solução (l) em etanol ocorrer por pelo menos 6 horas.
22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pela** mistura da solução (l) em etanol ocorrer preferencialmente por 12 horas.
- 25

23. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** centrifugação (m) ser feita a pelo menos 2000 x g, preferencialmente por 10 minutos.
24. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fracionamento dos glicanos (p) ser feito pela mistura de (o) em etanol.
- 5 25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado pela** primeira fração de glicanos ser obtida adicionando-se preferencialmente 41% de etanol absoluto à solução descrita em (o).
26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pela** incubação da solução (o) em etanol absoluto ocorrer preferencialmente em 4 graus Celsius.
- 10 27. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pela** incubação da solução (o) em etanol absoluto ocorrer preferencialmente por 12 horas.
28. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** centrifugação (q) ser feita a pelo menos 2000 x g, preferencialmente por 10 minutos.
29. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizada pela** segunda fração de glicanos ser obtida adicionando-se etanol absoluto ao sobrenadante da primeira fração obtida até a concentração de 47%.
- 15 30. Método, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado pela** incubação do sobrenadante em etanol absoluto ocorrer preferencialmente a 4 graus Celsius.
31. Método, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado pela** incubação do sobrenadante em etanol absoluto ocorrer preferencialmente por 12 horas.
- 20 32. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** centrifugação (s) ser feita a pelo menos 2000 x g, preferencialmente por 10 minutos.
33. Composição medicamentosa **caracterizada por** compreender heparan sulfato obtido segundo o método descrito nas reivindicações de 1 a 32, e um veículo
- 25 farmacêuticamente aceitável.

34. Uso do método para obtenção de heparan sulfato **caracterizado por** ser descrito nas reivindicações de 1 a 32.

35. Uso de heparan sulfato **caracterizado por** ter sido obtido de acordo com o método descrito nas reivindicações de 1 a 32.

5

FIGURAS

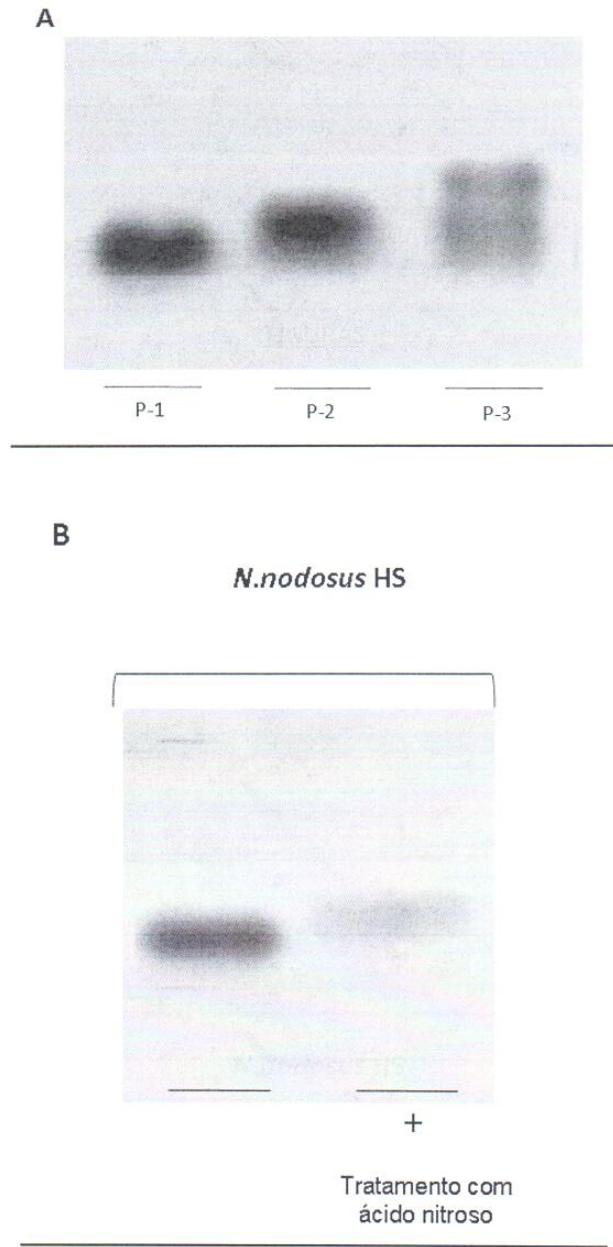


Figura 1

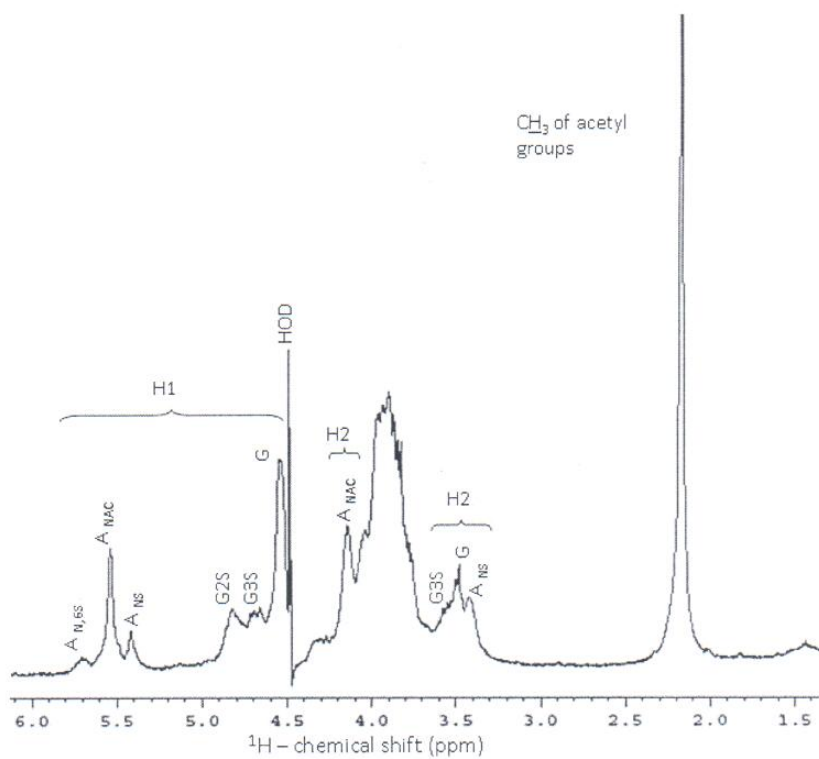


Figura 2

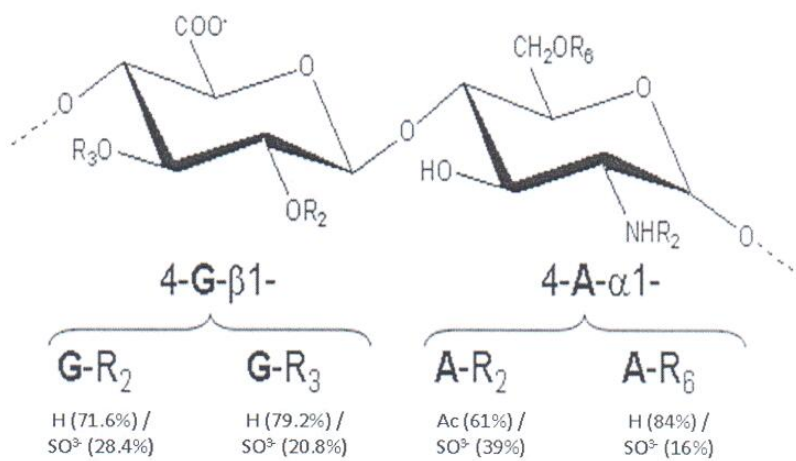


Figura 3

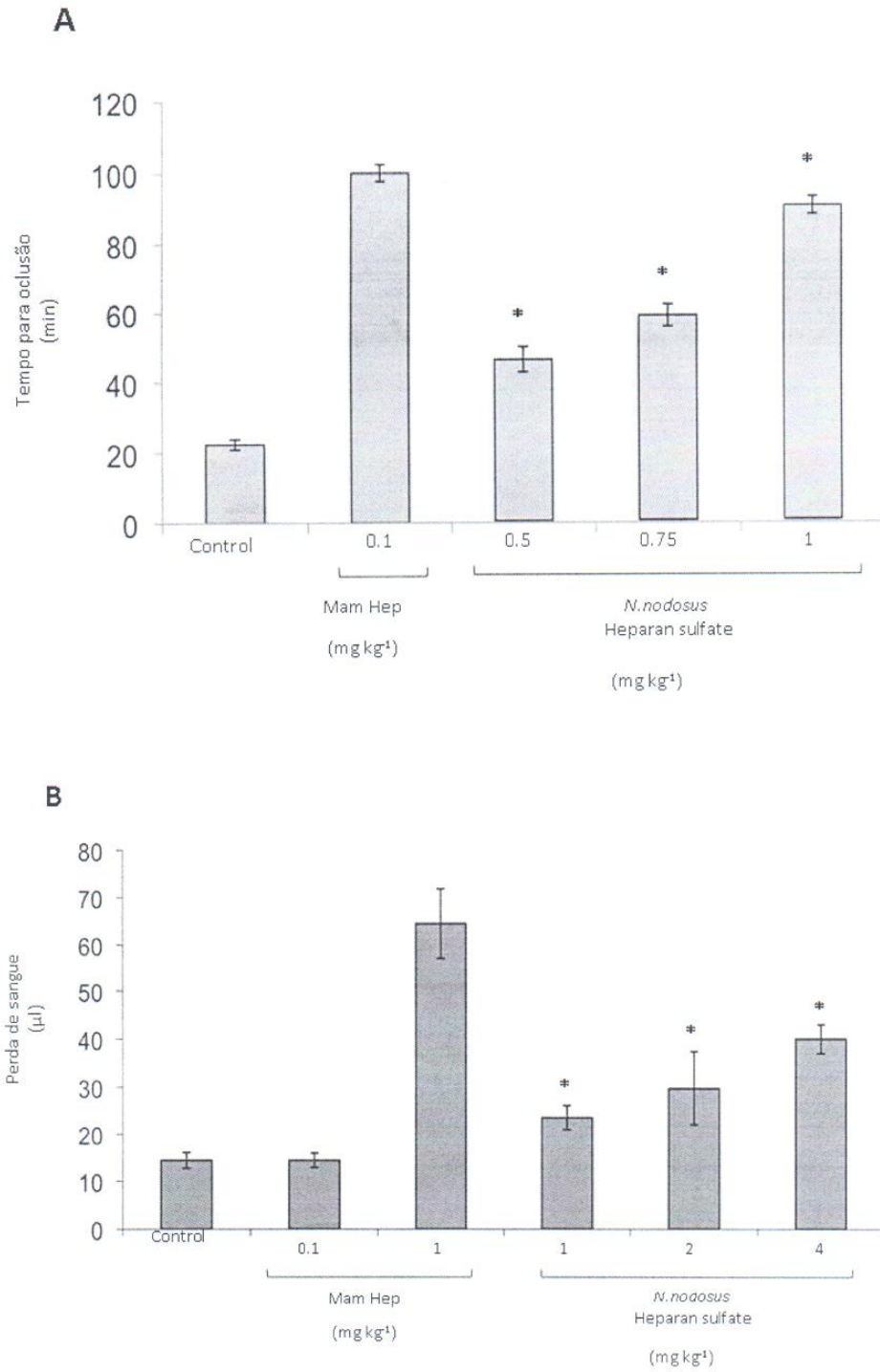


Figura 4

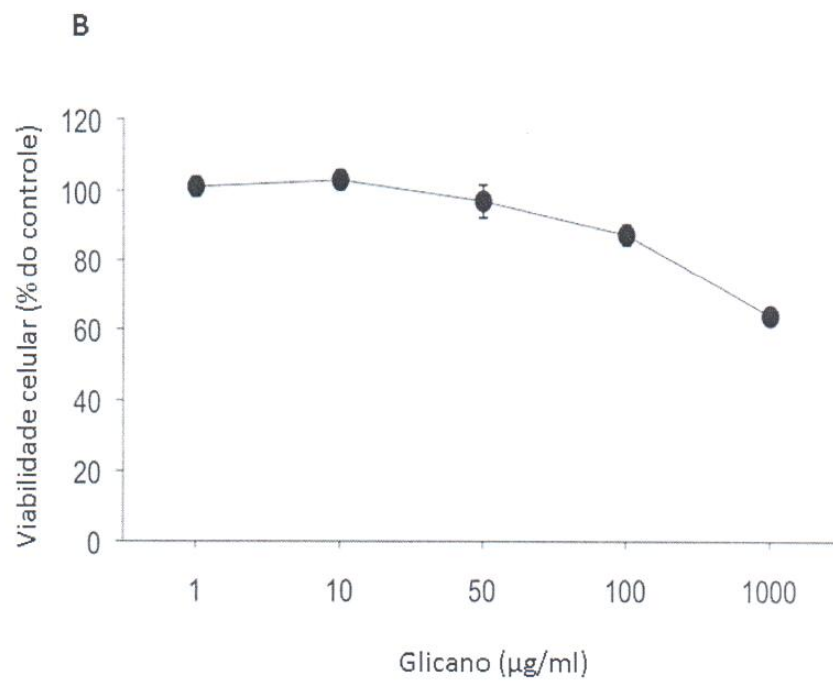
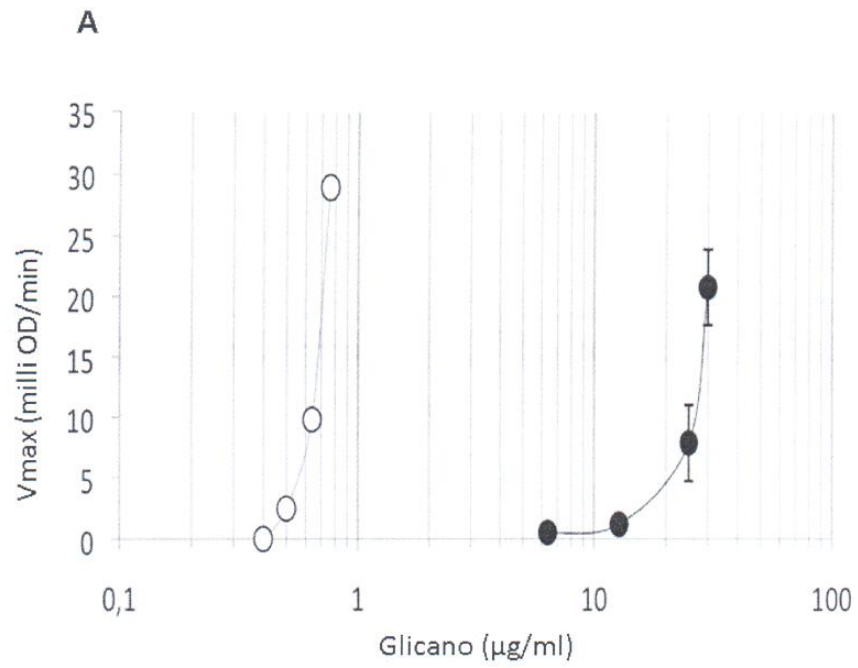


Figura 5

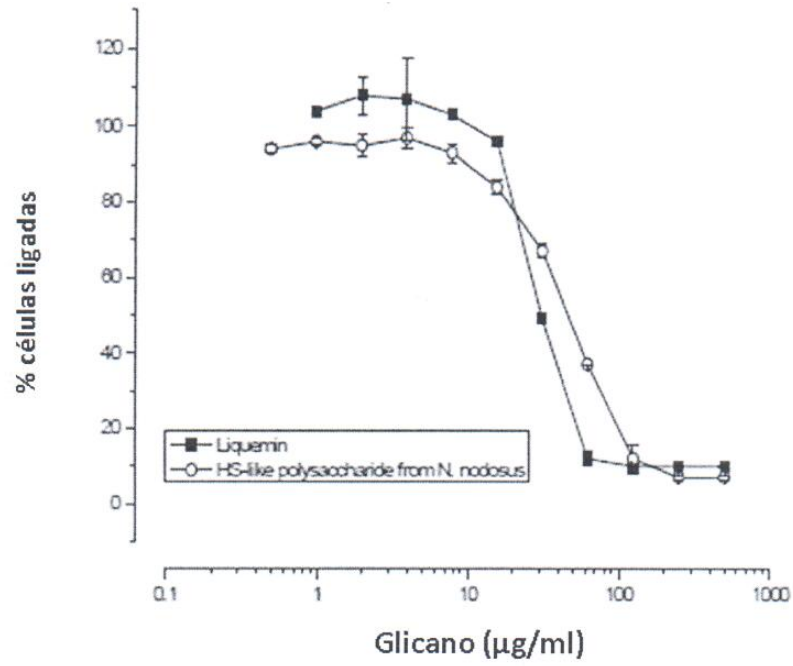


Figura 6

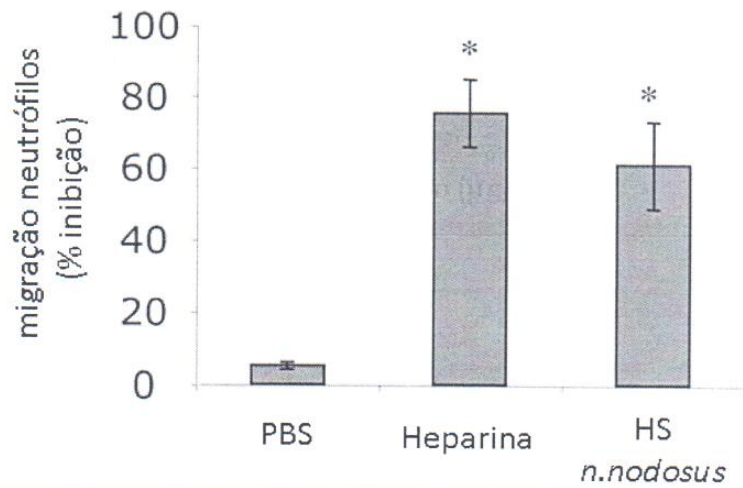


Figura 7

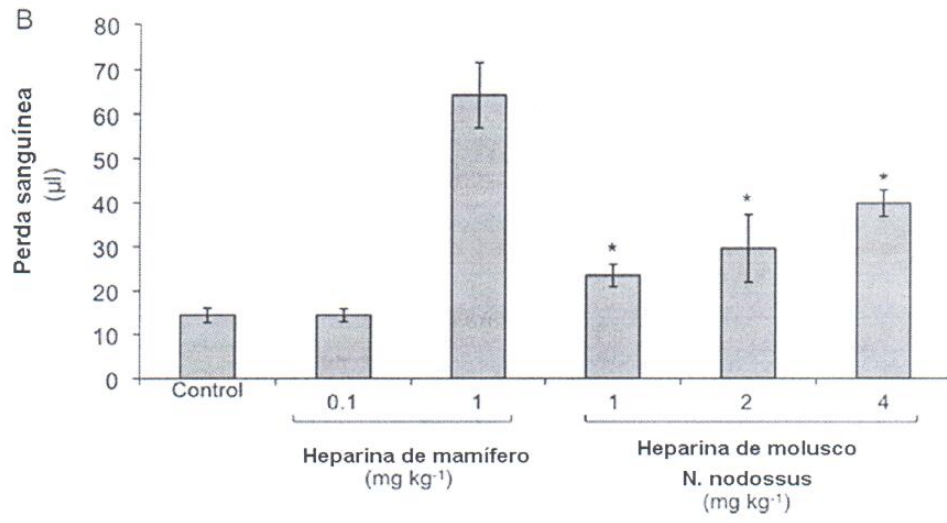


Figura 8

RESUMO**“MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE HEPARAN SULFATO DE MOLUSCOS BIVALVES,
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO O HEPARAN SULFATO OBTIDO SEGUNDO
5 O MÉTODO DESCRITO E SEUS USOS”**

A presente invenção descreve um método para extração de heparan sulfato, um análogo da heparina, de moluscos bivalves, bem como o heparan sulfato obtido pelo método descrito e seus usos. A metodologia de extração, realizada em *Nodipecten nodosus*, consiste em dissoluções seletivas das vísceras do molusco em
10 etanol.

Observa-se que o composto obtido pelo método descrito na presente invenção apresenta potente atividade inibitória sobre selectinas e como conseqüência inibe trombose, inflamação e metástase em doses que não induzem efeitos colaterais como sangramento, geração de bradicinina e efeitos citotóxicos sobre fibroblastos de
15 mamíferos. Dessa forma, é possível um potencial uso terapêutico do composto em doenças mediadas por selectinas, em doenças como trombose, inflamação e câncer.

PRELIMINARY VERSION

***Improving Host Tolerance to Pathogens: The Role of Pressurized Oxygen in
Cerebral Malaria***

Running title: Role of Pressurized Oxygen in ECM.

Marcele F Bastos¹, Ana Carolina AV Kayano¹, Yara C Blanco¹, Michelle K Sercundes²,
Luana S Ortolan², Carolina Francelin³, Rosa Elias⁴, Gustavo Facchini¹, Ronei Mamoni¹,
Stefanie CP Lopes¹, Letusa Albrecht¹, Alessandro S Farias¹, Cristina P Vicente³,
Niels OS Câmara³, Gerhard Wunderlich⁵, Claudio C Werneck⁶, Leonilda MB Santos¹,
Selma Giorgio⁷, Liana Verinaud³, Sabrina Epiphanio², Claudio RF Marinho⁵,
Rogerio Amino⁸ and Fabio TM Costa¹

¹ Dep. Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Campinas, SP. Brazil.

² Dep. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP),
Diadema, SP. Brazil.

³ Dep. Biologia Estrutural e Funcional. UNICAMP.

⁴ Dep. Imunologia, Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP. Brazil.

⁵ Dep. Parasitologia, USP.

⁶ Dep. Bioquímica, UNICAMP.

⁷ Dep. Biologia Animal, UNICAMP.

⁸ Unité de Biologie et Génétique du Paludisme, Institut Pasteur. Paris, France.

Key words: Host tolerance, Pressurized oxygen, Experimental cerebral malaria, *Plasmodium berghei* ANKA, Intravital Microscopy, Oxidative Stress, Nitric Oxide.

***Corresponding author:** Dr. Fabio T. M. Costa, Departamento Genética, Evolução e
Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP; P.O. Box 6109;
13083-862. Brazil. Tel. (+55) 19 3521-6594, E-mail: costaftm@unicamp.br or
fabiotmc72@gmail.com.br

ABSTRACT

Cerebral malaria (CM) is responsible for 1 million deaths annually, mainly in sub-Saharan African children. Despite the optimal antimalarial treatment in some areas and the development of several adjunctive therapies, a significant proportion of individuals still succumb due to CM, and 1 out of 4 survivors develop neurological sequelae and carry cognitive impairments for life. Although not completely understood, CM pathogenesis is marked by uncontrolled production of cytokines, coagulopathy and oxidative stress. These features affect cerebral microcirculation, endothelial cell integrity, leading to blood-brain barrier dysfunction, convulsions, coma and death. Moreover, ICAM-1 has been implicated as an endothelial host receptor of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes (Pf-iEs) adhesion to brain microvasculature, then associated to CM in humans. Pressurized oxygen, or hyperbaric oxygen (HBO), has been widely used for treat refractory wounds, radiation injury and decompression sickness. However, recent studies demonstrate its efficacy in ameliorating several parameters related to ischemic process and brain disorders. Indeed, we have recently shown protective effects induced by HBO against experimental cerebral malaria (ECM). Here, using several approaches, we provide first evidence that pressurized oxygen modulates ICAM-1 and nitric oxide expression levels, alter oxidative stress, improves microcirculatory brain blood flow, and inhibits leukocyte adhesion into microvasculature. Collectively, because of the pressurized oxygen effects on host parameters implicated in malaria severity, and the fact that HBO does not interfere directly on parasite development, we believe that HBO could act as an effective adjunct therapy, synergizing with antimalarial treatment.

INTRODUCTION

Among malaria complications, cerebral malaria (CM) caused by *Plasmodium falciparum* is associated to high mortality and morbidity rates, mainly in sub-Saharan African children, and accounts for near 1 million deaths per year [Snow et al., 2005]. Although a tremendous effort has been done to control CM mortality, including numerous clinical trials of different sort adjunctive therapies, 18% of African children and 30% of Southeast Asian adults still die, and 25% of those survivors develop neurological sequelae and cognitive impairments even after the optimal antimalarial treatment [Idro et al., 2005; Dondorp et al., 2005; John et al., 2008a; John et al., 2008b; Dondorp et al., 2010].

Uncontrolled production of pro-inflammatory cytokines, coagulopathy and endothelial activation and oxidative stress are often associated to cerebral malaria poor outcomes [Dondorp et al., 2003; Van der Heyde et al., 2006; Francischetti et al., 2008; Seixas et al., 2009]. CM pathological features also include vascular occlusion, ischemia, brain edema and hemorrhages, neuronal and endothelial damage, blood-brain barrier dysfunction, convulsions, coma and death [Maitland & Newton, 2005; Hunt et al., 2006; Van der Heyde et al., 2006].

Although host immune response plays a pivotal role in CM pathogenesis, sequestration of parasitized erythrocytes (PE) into the deep microvasculature is noticed in autopsies of CM patients and correlates to BBB breakdown [MacPherson et al., 1985; Brown et al., 2001; Jambou et al., 2010]. Indeed, mature forms of *Plasmodium falciparum*-infected (Pf-iEs) are able to cytoadhere to several host receptors (e.g. intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) [Chakravorty & Craig, 2005], which is upregulated in CM patients [Newbold et al., 1997]. Moreover, Pf-iEs harvested from CM individuals have a high affinity for ICAM-1 [Ochola et al., 2011], which, demonstrating an association between Pf-iEs adhesion to this specific receptor and disease severity.

Administration of pressurized oxygen, also referred as hyperbaric oxygen therapy (HBO), has been successful used in humans in variety of disorders such as refractory wounds, radiation injury and decompression sickness [Hampson et al., 1999], and recent findings demonstrate that

this therapy is also able to transiently suppresses the inflammatory process of ischemic trauma and improving blood flow, thus ameliorating brain disorders such as stroke [Al-Waili et al., 2005].

We have recently demonstrated that HBO therapy, in conditions also suitable for human use, protects against mice infected by *P. berghei* ANKA (PbA) [Blanco et al., 2008], a murine model widely used for experimental cerebral malaria (ECM), sharing several similarities with human CM, especially in children [Engwerda et al., 2005; Hunt & Grau, 2003]. However, the protective mechanisms involved in oxygen administration remained unveiled. Here, combining ECM model and in vitro assays in lung and brain endothelial cell lines and monophenotypic Pf-iEs, we provide first evidence that pressurized oxygen modulates ICAM-1 and nitric oxide levels, oxidative stress, blood flow, microvascular leukocyte sequestration and endothelial damage.

METHODS

Mice and murine parasites

C57BL/6 mice (7-10 weeks old) were purchased from the University of Campinas Bioterism Center (CEMIB-UNICAMP) and maintained in our specific pathogen-free animal facility. All experiments and procedures were approved by the UNICAMP Committee for Ethics in Animal Research (Protocols No. 1366-1 and 2200-1). Two different strains of *P. berghei* were used: the cloned line of *P. berghei* ANKA (PbA) and *P. berghei* NK65 (PbNK65), 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 as described elsewhere [Engwerda *et al.* 2005]. Mice were infected intraperitoneally (i.p.) with 10^6 parasitized erythrocytes (PE) and parasitemia and the neurological signs for CM were monitored daily.

Administration of hyperbaric oxygen (HBO) in infected mice

Mice HBO treatments were conducted as previously describe [Blanco *et al.*, 2008]. Briefly, 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 until the day the assay was performed. The chamber was pressurized and decompressed at a rate of 0.5 ATA/min as described elsewhere [Arrais-Silva *et al.*, 2005]. Infected mice in the control group (non-exposed) were left in an airy room.

Real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR)

ICAM-1 and Hmox expression levels and parasite load in mice brains were assessed by RT-qPCR. On days 6-7 post-infection (p.i.), PbA-infected mice were perfused intracardially with PBS using a peristaltic pump (Harvard Apparatus) to remove circulating PE and leukocytes. Then, mice brains were frozen in liquid nitrogen, crushed and placed in the Trizol reagent

(Invitrogen, USA) according to the protocol described by the manufacturer. Extraction of total RNA from mice brains was performed with RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Non-infected mice were used as baseline levels, control group. After extraction, RNA concentration and quality were assessed by means of NanoDrop ND-100 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). One microgram of total RNA was reverse-transcribed to single-strand cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit protocol (Roche Applied Science). ICAM-1 transcripts in the cDNA pool obtained from the reverse transcriptase reaction were quantified by qRT-PCR. SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) was used for parasite load 18S rRNA to quantify gene expression. ICAM-1 and Hmox expression was quantified using TaqMan Gene Expression Assays (Mn00516023-m1) with TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems). RNA expression levels were calculated using the ABI Prism 7500 SDS Software, and normalized against the expression levels of the housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). The following primer sequences were used: *P. berghei* 18S: 5'-AGCATTAAATAAAGCGAATACATCCTTAC-3' and 5'-GGAGATTGGTTTTGACGTTTATGTG - 3', HPRT, 5'-TGCTCGAGATGTG ATGAAGG-3' and 5'-TCCCCTGTTGACTGGTCATT-3', mHmox1, 5'- TCTCAGGGGGTCA GGTC-3' and 5'-GGA GCGGTGTCTGGGATG-3', ICAM, 5'-CGAAGGTGGTTCTTCTGAGC-3' and 5'-GTCTGCTGA GACCCCTCTTG-3'. The difference in expression of the genes was calculated using the comparative threshold cycle (CT) method to yield fold-difference in transcript levels [Schmittgen et al., 2008].

Immunoblotting

Mice brain protein crude extract were homogenized in extraction buffer (EDTA - pH 7,4 - 0,01 M; Tris-HCl - pH 7,4 - 0,1mM; Sodium pyrophosphate -10 mM, Sodium Fluoride - 100 mM, Sodium orthovanadate – 10 mM; Triton - 1% and Protease inhibitor cocktail - 1% (Sigma, USA)). Protein concentration was determined by a colorimetric method [Bradford, 1976]. Thus, 100 µg of protein crude extract was boiled at 95°C for 5 min with 1 volume of Laemmli sample and submitted to electrophoretic separation on an 8% SDS-polyacrylamide gel [Laemmli, 1970]. The proteins were electro-transferred onto a nitrocellulose membrane (BioRad) as described

elsewhere [Towbin et al., 1979], and incubated for 1 h with blocking solution (5% dried milk, 50 mM PBS - pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.1% PBS-Tween). The transferred proteins were incubated with monoclonal antibodies against eNOS, nNOS and iNOS (all purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), for 12 h at 4°C and diluted at 1:1,000 in a PBS-Tween solution. After washing with PBS-Tween, blots were incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (Zymax - Zymed Laboratories) diluted at 1:10,000. The immunoreactive blots were detected by autoradiography on a Kodak film GBX2 with chemiluminescence kit SuperSignal West Pico (Pierce, USA). The optical density of immunoreactive bands was determined by digital optical densitometry (Scion Image Software), and the values expressed in relation to the α -Tubulin used as internal control.

Assessment of oxidative stress by total free heme quantification

Infected animals were anesthetized with Ketamine (100 mg/Kg) and Xylazine (16 mg/Kg), and blood samples were collected on day 6 p.i. from the vena cava using EDTA as anticoagulant. Thus, plasma was obtained after centrifugation at 1,000 x g, for 15 min, at 4°C, for total free heme assessment. Total heme was quantified using a chromogenic assay according to the manufacturer's instructions (QuantiChrom™ Heme Assay Kit, Bioassay Systems).

Craniotomy and intravital microscopy

Intravital microscopy of brain microvasculature was performed as previously described [Vilela et al. 2009, Lacerda-Queiroz et al. 2010] with slight modifications. Briefly, on day 5 p.i., groups of 4-6 PbNK65-, PbA-infected mice or non-infected animals exposed, or not, to HBO were anesthetized with Ketamine (100 mg/Kg) and Xylazine (16 mg/Kg), and maintained at 37°C using a heating pad. Thus, a skull opening of 3- to 4-mm-diameter was made in the left parietal lobe using a surgical drill (Beltec, Brazil). Dura mater and arachnoid were lifted away from the skull to expose the pia mater blood vessels. To observe leukocyte/endothelium interactions, leukocytes were fluorescently labeled by i.v. administration of rhodamine 6G (0.3 mg/kg, Sigma) and observed using an intravital microscope (Zeiss, Axio ImagerA2) with a 10 X objective and a 590 nm emission filter, coupled with a camera (AxioCam) to record images. The images obtained

were analyzed using the ImageJ software, and leukocytes adhered were counted. Adhered leukocytes were considered as those cells that remained attached for 30 seconds or more onto the endothelium. The counting of adherent leukocytes was expressed as cells attached to the endothelium in a 100- μ m-length of vessel. Velocity (pixel/ms) of rhodamine 6G-labeled cells were determined with a specific ImageJ software Plug-in in 3-4 recorded movies of each condition. After procedure, all animals were euthanized with a high dose of ketamine and Xylazine.

Tissue Processing

For detection of hypoxia and apoptosis at a comparable time point, all mice were euthanized in an experiment when susceptible mice exhibited clinical signs of CM. All PbA-infected mice demonstrated signs of CM at days 6-7 after infection, respectively, and most of these mice had entered in the terminal phase of murine CM. On the day of euthanasia, groups of 4-6 PbNK65-, PbA-infected mice or non-infected animals exposed, or not, to HBO were anesthetized with Ketamine (100 mg/Kg) and Xylazine (16 mg/Kg), and were perfused intracardially with Phosphate - Buffered 4% Paraformaldehyde for 20 minutes. The brain was removed quickly, split sagittally, and immersion-fixed in Phosphate - Buffered 4% Paraformaldehyde for 2 hours at room temperature before transfer to 70% ethanol. Tissues were processed for paraffin inclusion, which included immersion baths in ethanol-xilol-paraffin gradients. After inclusion sections of 5 μ m were obtained for immunohistochemical analysis.

Immunohistochemical analysis

The presence of HIF positive cells in brain from mice infected with *Plasmodium berghei* NK65 or *Plasmodium berghei* ANKA (treated or not with HBO) and non-infected mice was detected by immunohistochemical stain. Brain sections from midbrain were deparaffinized with xylene and hydrated in an ethanol gradient before stain reaction. Directly after, incubation was performed with 1% H₂O₂ to block endogenous peroxidase activity (10min). From here all procedures were done according with ImmunoCruz™ rabbit ABC Staining System (sc-2018) datasheet. Briefly, all sections were incubated with goat serum to avoid secondary antibody nonspecific binding for one hour at room temperature and then incubated with specific primary

antibodies to mouse HIF- α (Santa Cruz sc-10790) for 16 hours at 4°C. After washing with saline phosphate buffer, sections were overlaid for 1h with the biotin-conjugated secondary antibody at room temperature. This was followed by incubation with AB enzyme reagent to amplification of signal reaction. Bound antibodies was detected by reactivity with 3,3'-diaminobenzidine plus H₂O₂. After tap washing, the slides were counterstained by Harris Haematoxilin and mounted with Entelan. For immunohistochemical controls primary antibodies were omitted from the staining procedure and were negative for any reactivity. Quantification of the immunostaining was done by using the Image J software [Collins T.J., 2007]. For it, all slides were blinded and assessed using digital images. In total, 1000 cells were counted for each specimen by using an ocular grid. Percentage of HIF- α positive cells was performed by a single observer (C.F) blinded to the animal status, and defined as follows: % of HIF- α positive cells = HIF- α positive cells/total cells.

TUNEL staining of apoptotic cells

The distribution of apoptotic cells in tissue sections of brain from PbNK65-, PbA-infected mice or non-infected animals exposed, or not, to HBO was determined by the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling (TUNEL) method as previous described (Francelin et al., 2011). In brief, 5 μ m sections were de-waxed, and rehydrated specimens were incubated in proteinase K (40 μ g/ml) for one hour at 37°C, and were then treated with 3% H₂O₂ in methanol for 30 minutes at room temperature. After, the specimens were incubated with TdT and digoxigenin (DIG)-dUTP for 1 h at 37°C. Anti-DIG peroxidase was added to the slides, followed by incubation for 30 minutes at 37°C. Slides were stained with diaminobenzine for 10 minutes and counterstained with haematoxylin. Controls for the TUNEL procedure were handled in the same manner as the test samples except that the TdT enzyme was omitted in the nucleotide mixture and was replaced with dH₂O. Apoptotic cells were identified by TUNEL in conjunction with characteristic morphological changes, such as cell shrinkage, membrane blebbing, and chromatin condensation, to distinguish apoptotic cells and apoptotic bodies from necrotic cells. The latter were not

considered apoptotic cells. In total, 500 cells were counted for each specimen by using an ocular grid. The apoptotic body index (ABI) was performed by a single observer (C.F) blinded to the animal status, and defined as follows: apoptotic body index (%)= $100 \times \text{apoptotic cells}/\text{total cells}$.

Statistical analysis

Statistical significance was determined using one-way analysis of variance or *t-test* for parametric data. Kruskal-Wallis and post hoc tests or Mann-Whitney *U* test were used for non-parametric data. All statistical analyses were performed using BioEstat version 5.0 (CNPq, Brazil) and Prism version 3.02 (Graphpad, USA) softwares. Values were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

We have previously demonstrate that pressurized oxygen or HBO is capable of protecting mice against ECM by reducing pro-inflammatory cytokines expression levels and number of adhered T cells in mice brain, preventing BBB breakdown [Blanco et al., 2008].

It was recently showed that sequestration of CD8 T cells in the brain is not sufficient for the development of cerebral malaria in C57BL/6 mice, but that the concomitant presence of parasitized red blood cells is crucial for the onset of pathology [Baptista et al., 2010]. Based on this, we addressed the question whether pressurized oxygen could diminish brain parasite load. For this, qRT-PCR was performed on material extracted from the brains of PbA and PbA-HBO mice before and after intracardiac perfusion. We can observe in Figure 1A, that there is no significant difference in parasite load in the brain of animals that were not previously perfused. However, as shown in Figure 1B, parasite accumulation in the brain was significantly lowers in PBA-HBO mice than in PbA mice after intracardiac perfusion when assessed at day 6 after infection.

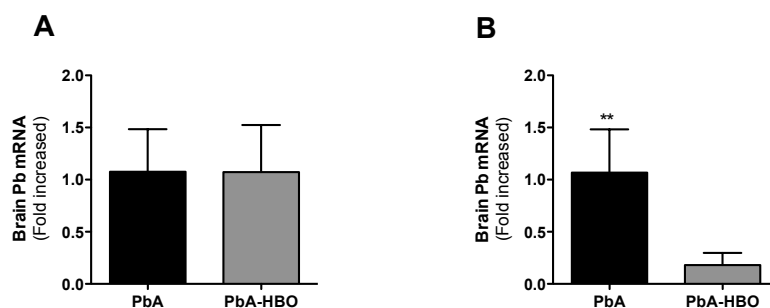


Figure 1. Hyperbaric oxygen reduces parasite accumulation in the brain of infected mice after intracardiac perfusion. Groups of 5-7 animals infected with PbA (PbA group) were daily exposed, or not, to HBO (PbA-HBO) conditions (100% O₂, 3 ATA, 1 h). On days 6-7 post infection (p.i.), when mice showed signs of ECM, mice brains were collected before (**A**) or after (**B**) intracardiac perfusion and *P. berghei* 18S rRNA levels were quantified by RT-qPCR. Values were expressed as the mean of specific 18S fold increase genes copies, normalized against HPRT expression levels, of five-seven mice \pm SD. ** $P < 0.01$ (t-test)

Besides the accumulation of both, CD8 T cells and IRBC, be essential to ECM development [Baptista et al., 2010], it was demonstrated that CD8 T cells mediate the increase in total parasite biomass and IRBC accumulation in the brain during ECM, at the time when mice develop clinical signs [Claser et al., 2011]. Therefore, to examine the potential mechanisms leading to reduce brain accumulation of PbA in HBO treated mice; we assessed ICAM-1 expression in mice brains, leukocytes amount and microcirculatory hemodynamics by intravital microscopy.

ICAM-1 is a cytokine-inducible cell surface receptor, and is a key molecule involved in the inflammatory process, leading to leukocyte and parasite cytoadhesion [Chakravorty & Craig, 2005; Newbold et al., 1997]. This molecule has been shown to be associated with cerebral malaria [Ochola et al., 2011]. In mice, ICAM-1 is upregulated in PbA infection and is relevant for the sequestration of leukocytes to the mice brain during ECM [Favre et al., 1999]. As shown in **Figure 2**, PbA infected mice exposed to HBO (PbA-HBO) had significantly lower levels of ICAM-1 mRNA in the brains when compared to PbA-infected animals (PbA group), showing a level of expression similar to NK65-infected mice (NK65 group), a non-cerebral line of *P. berghei*. Also, the significant difference in ICAM-1 expression levels between PbA and NK65 groups demonstrate that specific role of ICAM-1 in ECM.

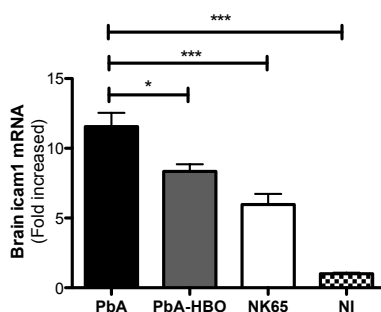


Figure 2. Pressurized oxygen reduces ICAM-1 levels in the brain of infected animals. Groups of 5-7 animals infected with 10^6 *P. berghei* ANKA-infected erythrocytes (PbA group) were daily exposed, or not, to HBO (PbA-HBO) conditions (100% O₂, 3 ATA, 1 h). On days 6-7 post infection (p.i.), when mice showed signs of ECM, mice brains were collected and ICAM-1 levels

were quantified by RT-qPCR. As controls, brains of non-infected mice and animals infected with 10^6 blood forms of *P. berghei* NK65 (PbNK65) (parasitemia and day p.i. match) were used. Values were expressed as the mean of specific ICAM-1 fold increase genes copies, normalized against HPRT expression levels, of five-seven mice \pm standard deviation (SD). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (ANOVA test).

Cerebral blood flow impairment, vasoconstriction, vascular occlusion by adherent leukocytes and parasites are common features in CM [Dondorp et al., 2003; Van der Heyde et al, 2006; Francischetti et al., 2008]. Therefore, using intravital microscopy through a closed cranial window, we assessed which effect pressurized oxygen could play in the leukocyte recruitment and in brain microcirculatory hemodynamics of PbA-infected animal when compared with non-exposed PbA, PbNK65 and naive mice. In sharp contrast to the group of mice infected with PbA, exposure to HBO significantly reverted leukocyte accumulation to brain microvasculature (Figure 3A, B), and improved significantly microcirculation velocity (Figure 3C, D). As an ECM specificity control, we assessed leukocyte adhesion and cell velocity in mice infected with a non-cerebral line (PbNK65). As expected only a minor adhesion of leukocytes and decreased in brain microcirculation was noticed in comparison to naive animals (Figures 3B, D).

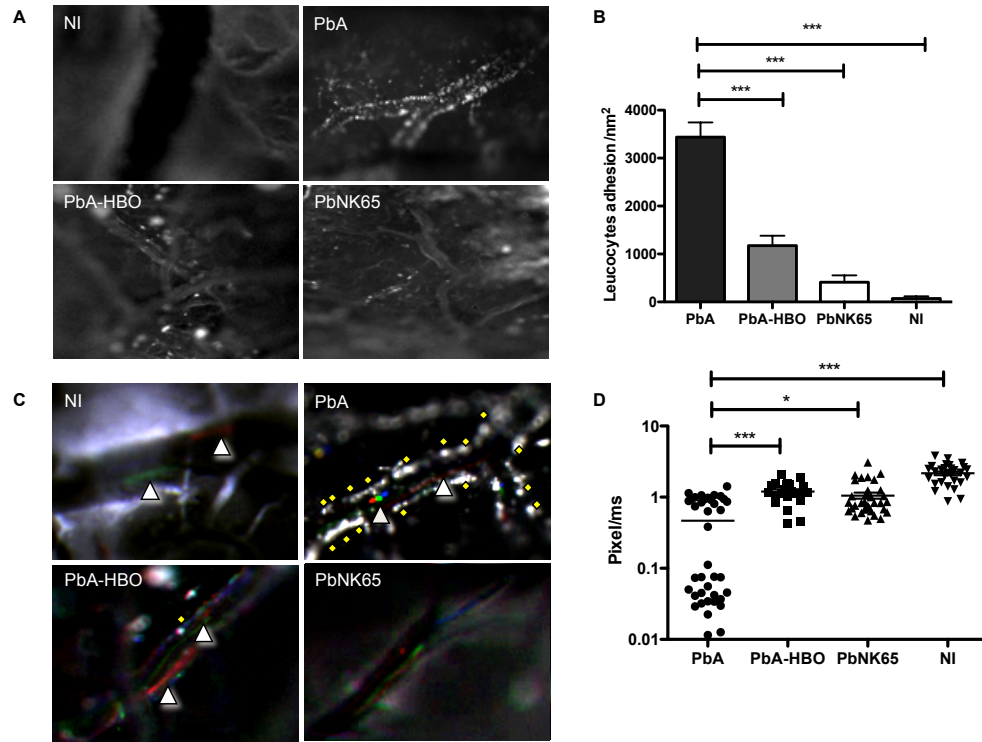


Figure 3. Pressurized oxygen reduces leukocytes adhesion in brain microvasculature and improves blood flow in ECM. Using intravital microscopy, leukocyte adhesion to brain microvasculature (**A-B**) and microcirculation velocity (**C-D**) of groups of 4-6 mice non-infected (NI) or infected with *P. berghei* NK65 (PbNK65) or PbA submitted to pressurized oxygen (PbA-HBO), or not (PbA), were assessed on day 5 p.i.. Results are expressed as the mean of adhered leukocytes per nm² in at least 4 animals \pm SD. *** $P < 0.001$. Representative brain microcirculation photomicrographs of NI, PbA-, PbA-HBO or PbNK65-infected mice showing leukocytes adhesion (**A**) and microcirculation flow velocity of rhodamine 6G-labeled cells (**C**). The triangles indicate cells with high speed, and diamonds represent cells with low speed, that drag on the endothelium and the red dots represent the mean velocities of labeled cells. * $P < 0.05$ (ANOVA test, **B**).

Nitric oxide (NO) plays an important role in regulating endothelium function by inhibiting inflammatory responses, decreasing the expression of cell adhesion molecules, and limiting intravascular platelet and leukocytes aggregation [Bogdan, 2001; Clark & Rockett, 1996]. It has

been reported that, low nitrite levels and hypoargininemia are associated with the development of cerebral malaria in Tanzanian children [Anstey., et al, 1996; Lopansri., et al, 2003]. In mice, low NO bioavailability contributes to the genesis of ECM and that restoring NO bioavailability is protective [Gramaglia et al., 2006]. Based on this, we investigate the ability of HBO to increase the expression of the enzymes e-NOS, i-NOS e n-NOS. For this, the brain of PbA-infected mice exposed, or not, to pressurized oxygen were collected at day 6-7 p.i., period in which PbA group clearly showed the clinical signs associated with experimental cerebral malaria in contrast to PbA-HBO group as previous demonstrate [Blanco et al., 2008]. Accordingly to immunoblotting analyzes and quantification of the immunoreactive bands of these two group of mice a significant increase in the expression of eNOS (Figures 4A,B) and nNOS (Figures 4C,D) was noticed. Nevertheless, no modulation in the levels of iNOS was observed (Figures 4E,F).

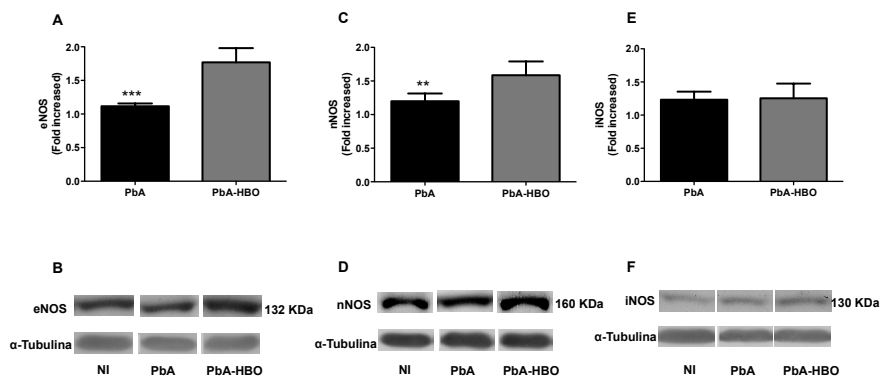


Figure 4. Exposure to pressurized oxygen potentiates the expression of endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) nitric oxidase synthase levels in the brain of infected animals. Groups of 5-7 animals non-infected (NI) or infected with 10^6 *P. berghei* ANKA-infected erythrocytes (PbA group) were daily exposed, or not, to HBO (PbA-HBO) conditions (100% O₂, 3 ATA, 1 h). On days 6-7 p.i., when mice showed signs of ECM, mice brains were collected and brain protein crude extract were analyzed by immunoblotting to determine (A) eNOS, (C) nNOS and (E) iNOS expression levels. Values were expressed in optical densities as the mean of immunoreactive specific bands in relation to α -Tubulin bands of six-seven mice \pm SD. * P <0.05, PbA vs. PbA-HBO group of mice. Representative immunoblotting photomicrographs of (B) eNOS,

(D) nNOS and (F) iNOS, as well α -tubulin expression bands. $**P<0.01$, $***P<0.001$ (t-test).

Malaria infection is associated with severe hemolysis and therefore with the oxidation of cell free-hemoglobin [Balla et al., 2005], leading to the release of free heme, which is thought to trigger a wide range of pro-inflammatory signals that activate the immune system [Wagener et al., 2003]. It has been shown that scavenging of nitric oxide (NO) by cell-free hemoglobin generated during malaria infection promotes the onset of ECM [Gramalia et al., 2006]. It is possible that NO treatment might reduce the concentration of circulating free hemoglobin by converting it to NO-inert methemoglobin acting in a protective manner [Gramalia et al., 2006].

Thus, to assess whether HBO could affect heme amount in PbA-infected mice we determine the levels of total heme. As shown in Figure 5, administration of pressurized oxygen in PbA-infected mice significantly reduced total heme levels on day 5 p.i., day that starts ECM clinical signs, to levels noticed to NK65 group of mice presenting similar parasitemia levels. Importantly, to assure that daily administration of pressurized oxygen (100% O₂, 3.0 ATA, 1 hour) do not increase oxidative stress, we determine the total heme in the plasma of naive mice exposed, or not, to HBO during seven consecutive days (0-6), and no significant difference was observed between these two group of animals.

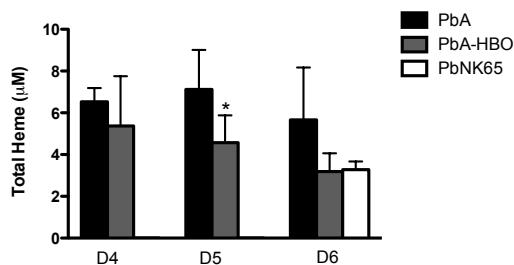


Figure 5. Hyperbaric oxygen prevents oxidative stress in PbA-infected mice by reducing total free heme levels. Oxidative stress products were assessed on days 4-6 p.i. in mice infected with PbA exposed to HBO (PbA-HBO), or not (PbA) and on day 6 p.i. in animals infected with *P. berghei* NK65 (PbNK65). Quantification of toxic free heme were determined in the plasma of infected mice exposed, or not, to HBO. The results represent the average of 6-8 animals per

group \pm SD. * P <0.05 (ANOVA test).

Heme oxygenase (HO) is the rate-limiting enzyme in the catabolism of free heme [Otterbein et al, 2003] and it is induced by heme and multiple stimuli associated with critical illness [Alam & Cook, 2007]. It has been reported that *P. falciparum* infections increase HO-1 levels and it is possible that a genetic predisposition to strongly upregulate HO-1 is associated with severe forms of malaria and increased risk of dying [Walther et al; 2012]. However, in mice, it was demonstrated that the induction of HO-1 helps prevent severe forms of malaria [Pamplona et al., 2007; Seixas et al., 2009].

Thus, knowing the possible importance of this enzyme in severe malaria, we asked whether HBO could modulate the expression of HO-1. We can observe in Figure 6 that expression of HO-1 mRNA was significantly down regulated in the brain of PbA infected mice treated with HBO at day 6-7 after infection when compared with PbA untreated mice. Mice infected with PbNK65 exhibited low expression of HO-1 mRNA then PbA-HBO mice.

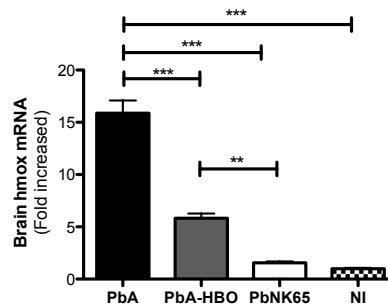


Figure 6. Pressurized oxygen reduces Hmox levels in the brain of infected animals. Groups of 5-7 animals infected with 10^6 *P. berghei* ANKA-infected erythrocytes (PbA group) were daily exposed, or not, to HBO (PbA-HBO) conditions (100% O_2 , 3 ATA, 1 h). On days 6-7 post infection (p.i.), when mice showed signs of ECM, mice brains were collected and Hmox levels were assessed by RT-qPCR. As controls, brains of non-infected mice and animals infected with 10^6 blood forms of *P. berghei* NK65 (PbNK65) (parasitemia and day p.i. match) were used. Values were expressed as the mean of specific Hmox fold increase genes copies, normalized

against HPRT expression levels, of five-seven mice \pm standard deviation (SD). $**P<0.01$, $***P<0.001$ (ANOVA test).

A recent study demonstrated the presence of multifocal areas of cerebral hypoxia in murine models of CM, suggesting that cerebral hypoperfusion lead to tissue hypoxia in ECM and that this is likely a key event in development of acute cerebral disease [Hempel et al; 2011]. During hypoxia, the transcription factor hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α is rapidly up-regulated [Jewell et al., 2001; Sharp et al., 2004], thus, we decided to investigate whether treatment with HBO could reduce hypoxia in the brains of PbA-infected mice. As shown in Figure 7, few areas and cells seemed to be hypoxic in non-infected mice (Figure 7A). In PbNK65-infected mice, a non-CM parasite, some cells stained positive for hypoxia (Figure 7B). However, the level of (HIF)-1 α was significantly increased in PbA infected mice (Figure 7C) when compared with PbA-HBO mice (Figure 7D), showing that HBO is capable of reduce hypoxia in mice brain.

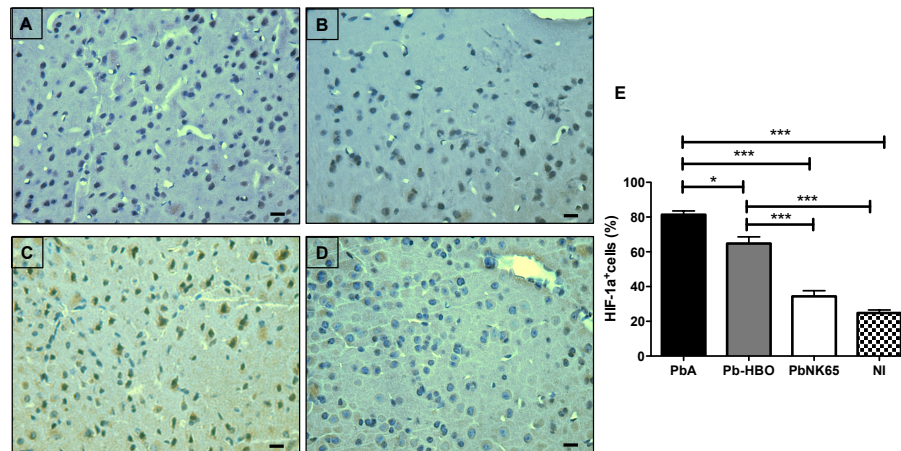


Figure 7. Pressurized oxygen reduces HIF-1 α ⁺ cells in the brain of infected animals. Groups of animals infected with 10^6 *P. berghei* ANKA-infected erythrocytes (PbA group) were daily exposed, or not, to HBO (PbA-HBO) conditions (100% O₂, 3 ATA, 1 h). On days 6-7 post infection (p.i.), when mice showed signs of ECM, they were perfused intracardially and mice brains were collected, brains of non-infected mice and animals infected with 10^6 blood forms of *P. berghei* NK65 (PbNK65) (parasitemia and day p.i. match) were also used. Representative images

of HIF-1a⁺ cells in mice brains of noninfected (A), PbNK65 (B), PbA (C), PbA-HBO (D) are shown. **P*<0.05, ****P*<0.001 (ANOVA test).

We also evaluate the occurrence of apoptosis by TUNEL technique (Figure 8). It was observed a strongly positive reaction in the brain of PbA-infected mice, indicating a significantly increase of programmed cell death when compared with the other groups. Non-infected mice, PbNK65 and PbA-HBO mice showed similar levels of apoptosis in the brain.

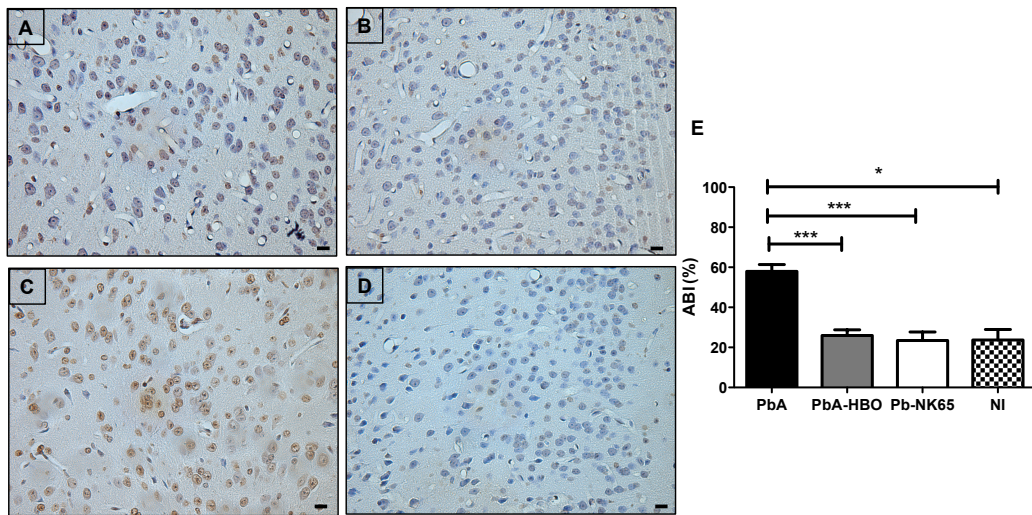


Figure 8. Pressurized oxygen reduces the number of TUNEL-positive cells in the brain of infected animals. Groups of animals infected with 10^6 *P. berghei* ANKA-infected erythrocytes (PbA group) were daily exposed, or not, to HBO (PbA-HBO) conditions (100% O₂, 3 ATA, 1 h). On days 6-7 post infection (p.i.), when mice showed signs of ECM, they were perfused intracardially and mice brains were collected, brains of non-infected mice and animals infected with 10^6 blood forms of *P. berghei* NK65 (PbNK65) (parasitemia and day p.i. match) were also used. Representative photographs of TUNEL-positive cells in mice brains of noninfected (A), PbNK65 (B), PbA (C), PbA-HBO (D) are shown. The data represent means \pm SE of 5 different mice per group, expressed as the apoptotic body index (ABI) (E). Scale barr:10 microns. ****P*<0.001 (ANOVA test).

DISCUSSION

We have previously demonstrated a neuroprotective effect of HBO in ECM [Blanco et al., 2008], our present study provides an understanding of the protective mechanisms of pressurized oxygen in PbA-infected animals.

Administration of pressurized oxygen on endothelial cells from bovine carotid artery or human umbilical cord also induces a reduction in levels of ICAM-1 [Buras et al., 2000]. Indeed, among the protective mechanisms of HBO in ECM described by us. This reduction on ICAM-1 expression levels, and parasite cytoadhesion, have important implications as this receptor has been suggested as a host receptor involved in the pathology of cerebral malaria [Silamut et al., 1999; Newbold et al., 1997; Chakravorty & Craig, 2005] and is upregulated in the brain endothelium of CM patients [Turner et al., 1994]. Important, a recent study conducted with more than 100 isolates collected from *P. falciparum*-infected individuals demonstrate an association between adhesion to ICAM-1 and cerebral malaria [Ochola et al., 2011]. Furthermore, mature forms of *P. vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) collected from several patients are capable of binding to ICAM-1 under static or flow conditions [Carvalho et al., 2010], suggesting an association with severity, as an increasing number in complications of vivax malaria has been report recently [Costa et al., 2011]. Also, transfected *P. falciparum* parasites with *P. vivax* VIR antigens have confirmed the role of ICAM-1 in Pv-iEs [Barnabeu et al., 2011].

Nitric oxide (NO) low bioavailability contributes to the induction of EMC and low levels of nitrite and hipoarginemia are associated with the development of cerebral malaria in children [Anstey et al. 1996; Lopansri et al. 2003; Gramaglia et al. 2006]; therefore the use of nitric oxide (NO) donors has been encouraged and used with relative success to protect against ECM [Gramaglia *et al.*, 2006; Zanini et al., 2011; Cabrales et al., 2011; Bertinaria et al., 2011]. These observations are in line with increasing expression levels of eNOS and nNOS in the brain of PbA-infected mice detected by us and corroborate with the findings that NOS is the main mediator of NO production in rats, nNOS and in the predominant isoform in response to hyperoxia in mice and eNOS is increased in endothelial cells exposed to HBO [Thom *et al.*, 2002; Hagioka *et al.*, 2005; Chavko et al., 2001; Buras et al., 2000].

Moreover, as HBO exposure leads to an augmentation in NO production and, in turn, to an improvement in cerebral blood flow in mice brain detected by Doppler [Hagioka et al., 2005] and administration of NO donors improve microcirculatory physiology in ECM [Cabrales et al., 2011], the increasing levels of eNOS and nNOS and the reduction in ICAM-1 expression levels in the brains PbA-infected mice exposed to HBO together justify with our findings on reduction on leukocytes microvascular adhesion and blood brain velocity increasing observed by intravital microscopy.

Our results demonstrated that HBO reduces total free heme levels on days 5-6 p.i. in mice presenting CM clinical signs and corroborate to the findings in the brain of ischemic rats, in which reduction on oxidative stress levels are observed by quantification several products, including superoxide dismutase (SOD), after HBO exposure [Wang et al., 2011]. However, this contrasts with findings showing that repetitive long-term exposure to pressurized oxygen increases oxidative stress levels in animals [Simsek et al., 2011]. Nevertheless, we showed that the HBO administration protocol used by us did not increase total heme free levels in naïve mice, even after 7 consecutive days of exposure. Moreover, by controlling free heme in the plasma, HBO may act protecting endothelial cell damage and interfering in NO availability. Indeed, it has been shown that the release of free heme contributes to an augmentation of oxidative stress in PbA-infected mice, falciparum malaria, and has recently been reported in complications due to *P. vivax* [Seixas et al., 2009; Pamplona et al., 2007; Andrade et al., 2010]. Also, free heme plays an important role in scavenging NO production from endothelial cells, thus inducing cell damage and leading to blood-brain barrier impairment [Gramaglia et al., 2006].

Our data shown that HBO can modulate the expression of HO-1 in the brains of PbA treated mice. We observed that expression of HO-1 mRNA was downregulated in the brain of these mice when compared with PbA untreated mice. In mice infected with PbNK65, a non-ECM-causing strain, a lower expression of HO-1 mRNA then in PbA-HBO group was found. Unlike what was seen in our results, it was previously reported that heme oxygenase-1 prevents the development of ECM and that inhibition of HO-1 activity increased ECM incidence [Pamplona et

al., 2007]. It is possible that the protection observed with HBO treatment is not due to the action of HO-1, or maybe the time it was made the analysis was not optimal.

However, it has been observed in humans that the amount of HO-1 produced is influenced by a genetic polymorphism in the HMOX1 gene promoter region. Individuals with fewer (GT)_n repeats have a high HO-1 inducibility, while those with higher (GT)_n repeats have a lower response [reviewed in Exner; et al 2004]. A recent study with Gambian children showed that short (GT)_n repeat alleles in the HMOX1 gene are associated with higher HMOX1 expression in white blood cells of this population, and that short repeat alleles are strongly associated with severe disease and death, whilst high HMOX1 mRNA and HO-1 protein levels are associated with severe disease [Walther et al., 2012].

In summary, because of the HBO effects on host parameters clear implicated in malaria severity, including adhesion of Pf-iEs on endothelial cells, and the fact that HBO does not interfere directly on murine- or human-derived parasite development, we believe that HBO could act in synergism during the antimalarial treatment as adjunct therapy.

REFERENCES

- 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.
- Andrade BB, Araújo-Santos T, Luz NF, Khouri R, Bozza MT, Camargo LM, Barral A, Borges VM, Barral-Netto M. 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.* 2010 Jul 15;185(2):1196-204.
- Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, Arnelle DR, Hollis D, McDonald MI, Granger DL. 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.* 1996 Aug 1;184(2):557-67.
- Aronowski J, Zhao X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. *Stroke.* 2011 Jun;42(6):1781-6. Epub 2011 Apr 28.
- 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.
- Avril M, Traoré B, Costa FT, Lépolard 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;6:249-55.
- Barsotti A, Di Napoli P, Taccardi AA, Spina R, Stuppia L, Palka G, Barbacane RC, De Caterina R, Conti P. MK-954 (losartan potassium) exerts endothelial protective effects against reperfusion injury: evidence of an e-NOS mRNA overexpression after global ischemia. *Atherosclerosis.* 2001 Mar;155(1):53-9.
- Bernabeu M, Lopez F, Ferrer M, Martin-Jaular L, Razaname A, Corradin G, Maier A, Del Portillo H, Fernandez-Becerra C. Functional analysis of *Plasmodium vivax* VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. *Cell Microbiol.* 2011 Nov 21. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01726.x.
- Bertinaria M, Guglielmo S, Rolando B, Giorgis M, Aragno C, Fruttero R, Gasco A, Parapini S, Taramelli D, Martins YC, Carvalho LJ. Amodiaquine analogues containing NO-donor substructures: synthesis and their preliminary evaluation as potential tools in the treatment of cerebral malaria. *Eur J Med Chem.* 2011 May;46(5):1757-67. Epub 2011 Feb 22.
- Blanco YC, Farias AS, Goelnitz U, Lopes SC, Arrais-Silva WW, Carvalho BO, Amino R, Wunderlich G, Santos LM, Giorgio S, Costa FT. Hyperbaric oxygen prevents early death caused by experimental cerebral malaria. *PLoS One.* 2008 Sep 4;3(9):e3126.
- Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Mar-Apr;64(3-4):207-13.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
- Briolant S, Parola P, Fusaï T, Madamet-Torrentino M, Baret E, Mosnier J, Delmont JP, Parzy D, Minodier P, Rogier C, Pradines B. Influence of oxygen on asexual blood cycle and susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine: requirement of a standardized in vitro assay. *Malar J.* 2007 Apr 16;6:44.
- Brown H, Rogerson S, Taylor T, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, Turner G.
- Buras JA, Stahl GL, Svoboda KK, Reenstra WR. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Feb;278(2):C292-302.
- Cabrales P, Zanini GM, Meays D, Frangos JA, Carvalho LJ. Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology. *J Infect Dis.* 2011 May 15;203(10):1454-63. Epub 2011 Mar 16.
- 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. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis.* 2010 Aug 15;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.
- Chavko M, Xing G, Keyser DO. Increased sensitivity to seizures in repeated exposures to hyperbaric oxygen: role of NOS activation. *Brain Res.* 2001 May 11;900(2):227-33.
- Costa FT, Fusaï T, Parzy D, Sterkers Y, Torrentino M, Douki JB, Traoré B, Petres S, Scherf A, Gysin J. 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.* 2003. 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. On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*: raison d'être?

Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Aug;106 Suppl 1:79-84.

Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N; South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005 Aug 27-Sep 2;366(9487):717-25.

Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*. 2010 Nov 13;376(9753):1647-57. Epub 2010 Nov 7. Erratum in: *Lancet*. 2011 Jan 8;377(9760):126.

Dondorp AM, Omodeo-Salè F, Chotivanich K, Taramelli D, White NJ. Oxidative stress and rheology in severe malaria. *Redox Rep*. 2003;8(5):292-4.

Engwerda C, Belnoue E, Grüner AC, Renia L (2005) Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol* 297: 103-143.

Francischetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation*. 2008 Feb;15(2):81-107.

Gay F, Robert C, Pouvelle 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.

Gramaglia I, Sobolewski P, Meays D, Contreras R, Nolan JP, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde HC. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2006 Dec;12(12):1417-22. Epub 2006 Nov 12.

Hagioka S, Takeda Y, Zhang S, Sato T, Morita K. Effects of 7-nitroindazole and N-nitro-L-arginine methyl ester on changes in cerebral blood flow and nitric oxide production preceding development of hyperbaric oxygen-induced seizures in rats. *Neurosci Lett*. 2005 Jul 15;382(3):206-10.

Hampson N. (1999) Hyperbaric Oxygen Therapy: 1999 Committee Report. (Undersea and Hyperbaric Medical Society, Kensington, MD

Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, Medana IM, Miu J, Ball HJ. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol*. 2006 May 1;36(5):569-82. Epub 2006 Mar 20.

Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*. 2003 Sep;24(9):491-9.

Idro R, Jenkins NE, Newton CR. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol*. 2005 Dec;4(12):827-40.

Jambou R, Combes V, Jambou MJ, Weksler BB, Couraud PO, Grau GE. *Plasmodium falciparum* adhesion on human brain microvascular endothelial cells involves transmigration-like cup formation and induces opening of intercellular junctions. *PLoS Pathog*. 2010 Jul 29;6(7):e1001021.

John CC, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, Wu B, Boivin MJ. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics*. 2008 Jul;122(1):e92-9. Epub 2008 Jun 9.

John CC, Panoskaltis-Mortari A, Opoka RO, Park GS, Orchard PJ, Jurek AM, Idro R, Byarugaba J, Boivin MJ. Cerebrospinal fluid cytokine levels and cognitive impairment in cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Feb;78(2):198-205

Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*. 2005 Jul 4;157(3):175-88. Epub 2005 Apr 7.

Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Vilela MC, Miranda AS, Amaral DC, Camargos ER, Carvalho LJ, Howe CL, Teixeira MM, Teixeira AL. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei*(strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol*. 2010 Jul;125(3):271-8.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lekana Douki JB, Traore B, Costa FT, Fusaï T, Pouvelle B, Sterkers Y, Scherf A, Gysin J. Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood*. 2002;100:1478-83.

Lopansri BK, Anstey NM, Weinberg JB, Stoddard GJ, Hobbs MR, Levesque MC, Mwaikambo ED, Granger DL. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet*. 2003 Feb 22;361(9358):676-8.

MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol*. 1985 Jun;119(3):385-401.

Maitland K, Newton CR. Acidosis of severe falciparum malaria: heading for a shock? *Trends Parasitol*. 2005 Jan;21(1):11-6. Review.

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. 147:149-63.

Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B, Msobo M, Peshu N, Marsh K. Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Oct;57(4):389-98.

Noviyanti R, Brown GV, Wickham ME, Duffy MF, Cowman AF, Reeder JC. Multiple var gene transcripts are expressed in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes selected for adhesion. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;114:227-37

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. Specific receptor usage in *Plasmodium falciparum* cytoadherence is associated with disease outcome. *PLoS One*. 2011 Mar 3;6(3):e14741.

Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, Chora A, Rodrigues CD, Gregoire IP, Cunha-Rodrigues M, Portugal S, Soares MP, Mota MM. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007 Jun;13(6):703-10. Epub 2007 May 13.

Pouvelle B, Traoré B, Nogueira PA, Pradines B, LéPolard 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.

Robert C, Pouvelle B, Meyer P, Muanza K, Fujioka H, Aikawa M, Scherf A, Gysin J. Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Res Immunol*. 1995;146:383-93

Schmittgen TD, Livak KJ. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.

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.

Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GD, Louwrier K, Mai NT, Simpson JA, Hien TT, White NJ. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol*. 1999 Aug;155(2):395-410.

Simsek K, Ay H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Ucar E, Acikel CH, Yesilyurt O, Korkmaz A, Oter S, Yildiz Slnhal. Long-term exposure to repetitive hyperbaric oxygen results in cumulative oxidative stress in rat lung tissue. *Toxicol*. 2011 Feb;23(3):166-72

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005 Mar 10; 434 (7030): 214-7.

Thom SR, Bhopale V, Fisher D, Manevich Y, Huang PL, Buerk DG. Stimulation of nitric oxide synthase in cerebral cortex due to elevated partial pressures of oxygen: an oxidative stress response. *J Neurobiol*. 2002 May;51(2):85-100.

Towbin H, Staehelin T, Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.

Trager, W. and J. B. Jensen. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 193:673-675.

Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B, et al. 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*. 1994 Nov;145(5):1057-69

van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol*. 2006 Nov;22(11):503-8. Epub 2006 Sep 18.

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.

Wang RY, Chang HC, Chen CH, Tsai YW, Yang YR. Effects of hyperbaric oxygenation on oxidative stress in acute transient focal cerebral ischemic rats. *Eur J Appl Physiol*. 2011 May 1. [Epub ahead of print]

Wang RY, Chang HC, Chen CH, Tsai YW, Yang YR. Effects of hyperbaric oxygenation on oxidative stress in acute transient focal cerebral ischemic rats. *Eur J Appl Physiol*. 2011 May 1. [Epub ahead of print]

Zanini GM, Cabrales P, Barkho W, Frangos JA, Carvalho LJ. Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in mice. *J Neuroinflammation*. 2011 Jun 7;8:66.

PRELIMINARY VERSION

Perspectives in Gaseous Therapy against Severe Malaria:

Solid and Vaporizing Facts

Ana Carolina AV Kayano¹; Marcele F Bastos¹; João Conrado K Dos-Santos¹;

Júlio Aliberti² and Fabio TM Costa^{1*}

¹Dep. of Genetics, Evolution and Bioagents. Institute of Biology. University of Campinas - (UNICAMP). Campinas - SP, Brazil.

²Children's Memorial Hospital. Medical Center. Cincinnati, OH, USA

* Corresponding author

Email: costaftm@unicamp.br or fabiotmc72@gmail.com.br (FTMC)

Introduction

Malaria is a disease with a heavy burden over human populations, with an estimated 124–283 million cases in 2013 and nearly 1 million deaths (1). Currently, intravenous artesunate is the treatment of choice in severe malaria cases in children and adults, following two important clinical studies, SEAQUAMAT (2) and AQUAMAT (3). These demonstrated the superiority of treatment with artesunate over quinine in patients with severe malaria in Asia and Africa. However, despite the efficacy of intravenous artesunate, mortality from severe malaria in general, and from cerebral malaria (CM) in particular, remains high, at 18% for African children and 30% for adults of Southeast Asia, even with assistance and treatment to patients (2, 3). In addition, 11% of children who survive CM have severe neurological deficits and up to 25% can maintain long-term cognitive deficits (4-8). Therefore, these observations suggest that strategies that focus only on eliminating the parasite may be insufficient to prevent neurological complications and death in severe malaria.

Accordingly, adjuvant therapies, defined as therapies administered in combination with anti-parasitic drugs that modify pathophysiological processes caused by malaria are being sought in order to mitigate complications caused by severe malaria (9). Since the antimalarial drugs often take 12-18 hours to kill parasites, adjuvant therapies administered during this period could reduce the risk of neurocognitive sequelae and mortality, particularly in patients with CM (10).

Different adjuvant therapies aimed at modulating pathophysiological processes that occur in response to malarial infection have been or are being tested. Among these are treatments aimed at the: modulation of the immune response to infection (dexamethasone,

intravenous immunoglobulin, pentoxifylline, curdlan sulfate); reduction of iron burden (desferrioxamine); reduction of the oxidative stress (N-acetylcysteine); modulation of prothrombotic state (heparin, aspirin); reduction of parasitaemia (blood transfusion); reduction of acidosis (albumin); decrease in intracranial pressure, cerebral edema (mannitol and dexamethasone); neuroprotection (erythropoietin); among others (reviewed elsewhere) (10, 11). However, to date, none of adjunct treatments showed unequivocal evidence of improvement of patients in clinical trials and therefore none of them can be definitely recommended as a treatment strategy for human beings (10, 11). Thus, pursuing new adjunctive therapies for malaria remains a priority of research in the area.

It is in this scenario that the gas-based therapies for malaria arise. The study of the administration of some gas therapies, such as pressurized (hyperbaric) oxygen (HBO) and nitric oxide (NO) has advanced in some areas such as complicated wound healing (12-14) and acute respiratory distress syndrome (15, 16), respectively. Nevertheless, the use of gaseous therapy for malaria is still incipient. At the moment, only two Phase II Clinical Trials are taking place, both with NO (17). Nevertheless, some *in vitro* and *in vivo* studies – using the Experimental Cerebral Malaria (ECM) model – have shed light on the topic and opened perspectives for the future of adjunct therapies in malaria. Herein, we review the state of art of the study of the gas-based therapies for malaria pointing out the solid and vaporizing facts.

Development of new Cerebral Malaria Therapies – the case of ECM

As stated already, cerebral malaria is the deadliest presentation of malaria and, consequently, is one towards which much effort in the discovery of new treatment strategies

is directed. In the quest for new drugs and treatment strategies in the most diverse areas of Medicine, the use of animals, especially mice, is well established, even though it is a matter of a wide debate not only in biomedical sciences (18, 19), but also in ethics (20, 21). Discussing extensively these matters is way beyond the scope of this review; however, it is necessary to bring the topic of animal experimentation and models to this paper, because all of the strategies reviewed in here were, at some point, tested in mice, i.e. ECM. What is called ECM in this paper is more specifically the Murine Experimental Cerebral Malaria, which consists in the infection of C57BL/6 or CBA mice with the *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) strain (22, 23). This model develops a neurological syndrome characterized by total or partial paralysis of the limbs, head tilt, seizures and coma that happens between days 5-10 post-infection, leading to death about 90% of the animals infected. Despite intense debate about the validity of this model (24-26), it shares several features in common with the CM in humans - as pro inflammatory cytokines, endothelial activation, adhesion cell, vascular leakage and hemorrhagic spots in cerebral tissue - (25, 27-29) and is widely used for ECM, as human studies face obvious ethics limitations. On the one hand those who are critics of the ECM argue that there are some fundamental differences between the pathogenesis of human and murine CM - mainly in the type of cell that adhere to brain endothelium, as parasitized erythrocytes (PE) are more evident in human tissue autopsies, while leukocyte adherence is more notable in mice - and that none of the adjunct therapies proposed from ECM studies worked for humans (24). On the other hand, those who favor the murine model argue that many aspects of CM were discovered through ECM (29) and that there is a lack of receptivity of ideas arising from ECM by “those who are in a position to influence the subject of clinical

trials” (25). Whether the gas-based therapies reviewed here are going to become first line adjuvant therapies for malaria or not is something hard to predict.

Hydrogen Sulfide (H₂S)

Hydrogen sulfide (H₂S) is a gas produced endogenously as a byproduct of the amino acid L-cysteine metabolism, which is a substrate metabolized by at least three enzymes: cystathionine β -synthase, cystathione γ -lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. Labeled as a toxic gas, H₂S has emerged as an important signaling molecule, a gastransmitter, influencing physiological and pathological processes (30-32). Its pleiotropic effect has been reported in inflammation, neuromodulation and apoptosis (33). A protective action was observed in the use of H₂S in animal models of atherosclerosis (34, 35), shock (36), arrest cardiac (37) and cerebral ischemia (38). This molecule also has shown effect in malaria (39). Tests *in vitro* against *P. falciparum* (3D7, PA and HB3) with NaHS and GYY4137, fast and slow donors of HS, respectively, have demonstrated an antimalarial activity, inhibiting parasitemia in a dose dependent manner. HS acted against the parasite altering its cellular metabolism. However, treatment *in vivo* did not prevent the development of cerebral malaria neither death of infected mice (39). This study indicates that HS could contribute to protein thiolation and interfere with cellular redox balance but the mechanisms were not elucidated. Despite preliminary results with H₂S have not shown exciting results against malaria *in vivo*, a reformulation in the delivery system of H₂S, with a prolonged half-life time, could generate promising results, opening perspectives for its use as antimalarial therapy.

Carbon Monoxide (CO) and Heme-Oxygenase 1

Carbon monoxide (CO) is a gas physiologically produced as a byproduct of the degradation of heme. Although most widely known for its toxicity due to the binding of hemoglobin, CO has drawn scientific attention for its role as a signaling molecule in gastrointestinal tract, paracrine mediator of smooth muscle hyperpolarization and immunomodulatory effector (40-42). The immune actions of CO take part in the 'immunological web' of heme-oxygenase 1 (HO-1), the inducible form of heme-oxygenase, which expression is up regulated in situations of cell exposition to oxidants, pathogens and other stressors (41). The co-location of HO-1 expression and vascular lesions in brains of patients that died from cerebral malaria (CM) evidences the induction of HO-1, however the authors conclude that this expression took place too late during the course of the disease to exert an adequate protective outcome (43).

In an experimental model of CM (ECM), BALB/c mice exhibited a higher expression of Heme-oxygenase-1 gene (*Hmox-1*) than C57BL/6 mice, and were less likely to die of ECM. Furthermore, the deletion of *Hmox-1* rendered BALB/c mice susceptible to death by ECM (44). The protective action of the augmented expression of HO-1 in the setting of ECM is believed to take place through the production of CO and its binding of cell-free hemoglobin (44-46). Cell-free hemoglobin is produced in malaria due to hemolysis, and the degradation of cell-free hemoglobin leads to the formation of free heme, a highly oxidant molecule, supposed to be a key mediator of the blood-brain barrier (BBB) dysfunction – a hallmark of CM. Addressing this aspect of cerebral malaria pathogenesis, Pena *et al* (45) have developed a CO-releasing molecule (CO-RM) that fully protected mice from death due

to ECM, and this effect was associated with prevention from neuroinflammation and BBB disruption. The use of the CO-RM in combination with artesunate was superior to the use of artesunate alone in this study, indicating the potential of this molecule to work as an adjunctive therapy.

Nevertheless, the effect of CO and HO-1 in CM is still a matter of debate. Studies from Myanmar, Angola and Gambia have found an association between shorter (GT)_n repeat polymorphisms in the promoter region of *Hmox-1* – correlated with higher expression of the gene and higher levels of HO-1 in peripheral blood – and the incidence of severe malaria (47-49). Indeed, highest levels of blood HO-1 were found in the most severely ill patients (48). The authors of this study argue that while this observation may simply reflect an adequate but insufficient response, the higher induction of HO-1 in patients with shorter (GT)_n repeat alleles indicate that levels of HO-1 above a certain threshold might directly participate in the disease pathogenesis, something already demonstrated before (50). Mechanisms through which a high upregulation of *Hmox-1* might lead to deleterious effects involve oxidative pathways via activation of neutrophils oxidative burst (48) and release of iron, which mediates reactions leading to the formation of hydroxyl radicals (50). These findings highlight a problem to be overcome in the experimental models dealing with CO and HO-1 in malaria as inbred mice lack the variability of HO-1 (GT)_n repeat polymorphism (51).

Moreover, in experiments with ECM (44, 45, 52) the liver phase of malarial infection is skipped, and the increase in parasite load due to upregulation of HO-1 in liver (53) (a factor possibly contributing to the severity of disease due to the overexpression of HO-1) is missed. Therefore, an experimental model working with a combination of the administration of HO-1 upregulatory molecules and CO and mosquito bite infection might yield results closer to what

is observed in nature. In regard to the liver stage, as disease is diagnosed during blood phase of infection, HO-1/CO-based therapeutic approaches possibly would not face the dilemma of increasing parasite load in *P. falciparum* infection, but the same is not warranted for species that produce hypnozoites.

Therefore, there is still a long way until CO can become an adjunctive therapy for human malaria. Trying to synchronize both timing and tightly regulated concentrations of HO-1, in order to potentiate its beneficial effects while avoiding the deleterious ones are some directions to be taken in future studies.

Nitric Oxide (NO)

NO is a free radical that plays a physiological role in neuronal and vascular cells, regulating vasodilation and blood pressure. NO is produced by the activity of the NO synthase (NOS) enzymes whose substrates are the amino acid L-arginine and O₂. There are three subtypes already identified: neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS). nNOS and eNOS are calcium dependent enzymes expressed constitutively while iNOS is expressed in response to an acute inflammatory stimuli (54). NO has been related to numerous pathological conditions including artery disease (55), heart failure (56), cerebrovascular stroke (57), hypertension (58), sepsis (59) and ischemic injury.

In severe malaria, NO has been intensively studied as a potential adjunct therapy to traditional antimalarials, for its capacity to modulate the expression of several molecules involved in the pathogenesis of the disease. Its reduced bioavailability has been reported in human (60) and murine model of cerebral malaria (61) and this phenomenon could contribute to the development of disease by impairment of endothelial function and vascular perfusion.

Acting on vascular endothelium, NO decreases the expression of some markers of activation, such as von Willebrand factor (vWF) and angiotensin 2 (Ang-2), which are expressed after an inflammatory stimulus and promote platelet adhesion to sites of vascular injury (62) and vascular permeability (63), respectively. Moreover, in the presence of NO some cell adhesion molecules such as ICAM-1 and P-selectin are expressed in lower levels and it is reflected in the decrease of leukocytes and platelets adhesion (64).

Tissue autopsy of patients who died of cerebral malaria reveals the sequestration of parasitized erythrocytes (PE) in the capillaries and post-capillary venules of multiple organs, suggesting a role for the cytoadherence of these PE in the pathogenesis of severe malaria, including CM (65-67). It was shown that NO reduces the adherence of PE to the endothelium under flow conditions *in vitro* (68) and decreases biomass of infected erythrocytes on cerebral tissue in ECM. Thus, despite the fact that NO does not interfere with the replication or viability of the parasite, it may well play a role against CM through its anti-adhesive effects.

Several factors, such as hypoargininemia (low L-arginine concentration) (69), increased concentration of the NOS inhibitor and reduced expression of NOS, are related to the low levels of NO in malaria. Therefore, adjuvant therapies to restore NO levels, such as Dipropylenetriamine NONOate (DPTA-NO, a donor of NO), inhaled NO (iNO) and L-arginine infusion, were developed and have shown interesting and promising results. In PbA-infected mice, DPTA-NO treatment increased the survival, contributing to endothelial barrier integrity and protecting the brain tissue from extravasation and petechial hemorrhaging (70). Despite these encouraging results, DPTA-NO treatment caused hypotension in mice and even

though some strategies of treatment were delineated to avoid this negative effect, neither of them obtained a significant success (71).

An alternative form of NO treatment with no adverse effect reported is the inhalation of NO. iNO treatment has been approved by FDA for the treatment of respiratory failure, hypoxia and pulmonary hypertension. In ECM, iNO also modulates negatively the expression of activation markers of endothelial cells, decreasing the number of parasites in brain of infected animals and maintains brain endothelial integrity. The combination of iNO with artesunate at dose of 10mg/kg starting on D3 or D5.5 post infection, improved mice survival from 70% to 100%, when compared to artesunate alone (72). The fact that iNO is being applied for the treatment of other diseases, having a well-established safety profile associated with positive results in animal tests, makes iNO an attractive option for clinical tests. Moreover, it shows low cost and easy administration. Based in these advantages, a randomized clinical test in patients with severe malaria is ongoing in Uganda (73) and the results about its efficacy should be published soon.

Another candidate for adjunctive treatment based on the rising of NO levels is the infusion of L-arginine, a formulation commercially available. There is a correlation between increased levels of L-arginine and the improvement of endothelial function in patients with severe falciparum malaria treated with antimalarial drugs (74). For this reason, an infusion of L-arginine at the dose at up 12g was tested to ensure its safety. L-arginine was effective, improving NO bioavailability with no significant effects on vital signs (75). Despite the encouraging results, in patients with severe falciparum, the infusion of 12g over 8 hours did not change lactate clearance time, a marker of endothelial function, demonstrating there was no increase in production of endothelial NO (76). The higher clearance of L-arginine found in

these patients might be explained by a higher arginase concentration in severe malaria. Additional tests for adjusting the doses and ensuring its safety should be performed soon.

Studies with NO therapy have acquired important advances but the molecular mechanisms involved in its protection are not yet completely elucidated. Recent research suggests that NO protection could be explained, at least in part, by induction of HO-1 and consequently CO production. CO, in turn, prevents deleterious activity of cell free Hb while NO probably exerts a pro oxidant effect, preventing activation, proliferation and expansion of T cells (52).

The increase of NO levels in malaria seems to be beneficial in controlling harmful inflammatory activation in the brain. Despite some strategies of treatment based on the increase of NO levels have shown success in ECM, none of them was validated up to now to for severe malaria in human beings. For this reason, new formulations to increase endogenous NO should be delineated and further studies of NO mechanisms of action in cerebral malaria protection are required.

Hyperbaric Oxygen (HBO)

Hyperbaric oxygen (HBO) is defined as a treatment of exposure to oxygen (100%) at a pressure greater than one atmosphere absolute (ATA) (77). In comparison to the other gas-based therapies reviewed in this paper, HBO is the one most extensively studied in humans. It is the only treatment for decompression sickness (77), and is recommended for complicated wound healing (14). Moreover, HBO is widely used as an adjunctive therapy in many conditions, such as diabetic ulcer healing, traumatic brain injury and ischemic stroke. Nevertheless, there is a lack of good evidence for the use of HBO in diverse clinical situations

(78). In fact, recent meta-analysis of clinical trials for the later three conditions cited above found no conclusive evidence of the benefit in the use HBO therapy, stating that more studies are needed (13, 79, 80).

Besides its widespread application, HBO treatment is relatively safe, with its most common adverse effect being ear pain, and with rare severe complications such as seizures (81, 82). In addition, some studies have shown that HBO presents anti-inflammatory effects (83-85). These features make HBO treatment a good candidate for investigation on adjunct therapies for a wide range of diseases, especially infections (86). Hitherto, variant evidence drawn from human studies suggest that HBO might be useful in the treatment of some bacterial and fungal infections, like purpura fulminans (87), zygomycosis (88, 89), necrotizing fasciitis (90). However, to date, only a few studies have investigated the application of HBO to protozoan infections (91, 92), including malaria (22, 93).

HBO was shown to have a beneficial effect in disease outcome in one study using ECM (22). Blanco and colleagues (22) have demonstrated that HBO therapy, in conditions also suitable for human use, has a neuroprotective effect in ECM. It prevents ECM clinical symptoms and death of 50% of the HBO treated mice. To explain its neuroprotective effect, they have shown that HBO decreased mRNA levels of IFN- γ , TNF- α and IL-10 and reduced sequestration of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in mice brains. In addition, HBO therapy prevented BBB dysfunction and hypothermia. Moreover, HBO therapy significantly decreased parasite burden of PbA-infected mice and mice infected with *P. berghei*-NK65 (non-cerebral strain). Indeed, this reduction of parasite burden in HBO-treated mice had already been demonstrated (93).

These data open perspectives for use of HBO as an adjunct therapy for CM. However, a better understanding of the mechanisms involved in the protection of ECM by HBO is necessary.

Conclusion

In spite of advances in malaria therapeutics, the morbidity and mortality rates attributable to cerebral malaria are still high. Therefore, an adjuvant therapy that minimizes the complications, sequelae and deaths in cerebral malaria patients is urgent. However, little attention has been given to the development of a gas-based therapy for malaria treatment. Possibly, the emphasis on the toxic properties of some of the gases discussed in this review has limited their study. However, as more information about the physiological roles of these gases emerges, greater scientific interest builds on their research. Among therapies based in gas already tested, NO is the most investigated but its effect on cerebral malaria is not yet validated in human beings and its mechanism of action remains unclear. The investigation of the pleiotropic activity of these molecules, which regulate a large number of biologic processes, is needed, considering that cerebral malaria is a multifactorial process. In addition, it is necessary to search for new molecules with therapeutic potential to open perspectives to combat a disease that costs several lives every year.

References

1. WHO. World Malaria Report 2014. World Health Organization, 2014.
2. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N, group SEAQAMTS. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005;366(9487):717-25.
3. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet*. 2010;376(9753):1647-57.
4. Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, et al. Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study. *Pediatrics*. 2007;119(2):e360-6.
5. Boivin MJ. Effects of early cerebral malaria on cognitive ability in Senegalese children. *J Dev Behav Pediatr*. 2002;23(5):353-64.
6. Brewster DR, Kwiatkowski D, White NJ. Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet*. 1990;336(8722):1039-43.
7. Carter JA, Mung'ala-Odera V, Neville BG, Murira G, Mturi N, Musumba C, et al. Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(4):476-81.
8. John CC, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, et al. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics*. 2008;122(1):e92-9.
9. Serghides L. The Case for the Use of PPAR γ Agonists as an Adjunctive Therapy for Cerebral Malaria. *PPAR Res*. 2012;2012:513865.
10. Mishra SK, Newton CR. Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malaria. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(4):189-98.
11. John CC, Kutamba E, Mugarura K, Opoka RO. Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of Plasmodium falciparum malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(9):997-1008.
12. Liu R, Li L, Yang M, Boden G, Yang G. Systematic review of the effectiveness of hyperbaric oxygenation therapy in the management of chronic diabetic foot ulcers. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(2):166-75.
13. O'Reilly D, Pasricha A, Campbell K, Burke N, Assasi N, Bowen JM, et al. Hyperbaric oxygen therapy for diabetic ulcers: systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care*. 2013;29(3):269-81.
14. Dauwe PB, Pulikkottil BJ, Lavery L, Stuzin JM, Rohrich RJ. Does hyperbaric oxygen therapy work in facilitating acute wound healing: a systematic review. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(2):208e-15e.
15. Kumar P, Newborn CoFa, Pediatrics AAo. Use of inhaled nitric oxide in preterm infants. *Pediatrics*. 2014;133(1):164-70.
16. Adhikari NK, Dellinger RP, Lundin S, Payen D, Vallet B, Gerlach H, et al. Inhaled nitric oxide does not reduce mortality in patients with acute respiratory distress syndrome regardless of severity: systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*. 2014;42(2):404-12.

17. Bergmark B, Bergmark R, Beaudrap PD, Boum Y, Mwanga-Amumpaire J, Carroll R, et al. Inhaled nitric oxide and cerebral malaria: basis of a strategy for buying time for pharmacotherapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(12):e250-4.
18. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3507-12.
19. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014.
20. Lane-Petter W. The ethics of animal experimentation. *J Med Ethics*. 1976;2(3):118-26.
21. Singer P. To do or not to do? *Hastings Cent Rep*. 1989;19(6):42-4.
22. Blanco YC, Farias AS, Goelnitz U, Lopes SC, Arrais-Silva WW, Carvalho BO, et al. Hyperbaric oxygen prevents early death caused by experimental cerebral malaria. *PLoS One*. 2008;3(9):e3126.
23. Engwerda C, Belnoue E, Grüner AC, Rénia L. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;297:103-43.
24. White NJ, Turner GD, Medana IM, Dondorp AM, Day NP. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends in parasitology*. 2010;26(1):11-5.
25. Hunt NH, Grau GE, Engwerda C, Barnum SR, van der Heyde H, Hansen DS, et al. Murine cerebral malaria: the whole story. *Trends in parasitology*. 2010;26(6):272-4.
26. Carvalho LJ. Murine cerebral malaria: how far from human cerebral malaria? *Trends Parasitol*. 2010;26(6):271-2.
27. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415(6872):673-9.
28. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(9):722-35.
29. de Souza JB, Hafalla JC, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology*. 2010;137(5):755-72.
30. Wang M, Zhu J, Pan Y, Dong J, Zhang L, Zhang X, et al. Hydrogen sulfide functions as a neuromodulator to regulate striatal neurotransmission in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research*. 2014.
31. Giuliani D, Ottani A, Zaffe D, Galantucci M, Strinati F, Lodi R, et al. Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms. *Neurobiology of learning and memory*. 2013;104:82-91.
32. Meng G, Ma Y, Xie L, Ferro A, Ji Y. Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases. *British journal of pharmacology*. 2014.
33. Kabil O, Motl N, Banerjee R. H₂S and its role in redox signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1844(8):1355-66.
34. Xu S, Liu Z, Liu P. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. *International journal of cardiology*. 2014;172(2):313-7.
35. Mani S, Li H, Untereiner A, Wu L, Yang G, Austin RC, et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(25):2523-34.

36. Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(1):103-13.
37. Minamishima S, Bougaki M, Sips PY, Yu JD, Minamishima YA, Elrod JW, et al. Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation*. 2009;120(10):888-96.
38. Wang Y, Jia J, Ao G, Hu L, Liu H, Xiao Y, et al. Hydrogen sulfide protects blood-brain barrier integrity following cerebral ischemia. *Journal of neurochemistry*. 2014;129(5):827-38.
39. DellaValle B, Staalsoe T, Kurtzhals JA, Hempel C. Investigation of hydrogen sulfide gas as a treatment against *P. falciparum*, murine cerebral malaria, and the importance of thiolation state in the development of cerebral malaria. *PloS one*. 2013;8(3):e59271.
40. Farrugia G, Szurszewski JH. Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2014;147(2):303-13.
41. Wegiel B, Hanto DW, Otterbein LE. The social network of carbon monoxide in medicine. *Trends Mol Med*. 2013;19(1):3-11.
42. Rochette L, Cottin Y, Zeller M, Vergely C. Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol Ther*. 2013;137(2):133-52.
43. Schluesener HJ, Kremsner PG, Meyermann R. Heme oxygenase-1 in lesions of human cerebral malaria. *Acta Neuropathol*. 2001;101(1):65-8.
44. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007;13(6):703-10.
45. Pena AC, Penacho N, Mancio-Silva L, Neres R, Seixas JD, Fernandes AC, et al. A novel carbon monoxide-releasing molecule fully protects mice from severe malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(3):1281-90.
46. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(10):1097-111.
47. Takeda M, Kikuchi M, Ubalee R, Na-Bangchang K, Ruangweerayut R, Shibahara S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Jpn J Infect Dis*. 2005;58(5):268-71.
48. Walther M, De Caul A, Aka P, Njie M, Amambua-Ngwa A, Walther B, et al. HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002579.
49. Sambo MR, Trovoada MJ, Benchimol C, Quinhentos V, Gonçalves L, Velosa R, et al. Transforming growth factor beta 2 and heme oxygenase 1 genes are risk factors for the cerebral malaria syndrome in Angolan children. *PLoS One*. 2010;5(6):e11141.
50. Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J*. 1999;13(13):1800-9.
51. Bauer M, Huse K, Settmacher U, Claus RA. The heme oxygenase-carbon monoxide system: regulation and role in stress response and organ failure. *Intensive Care Med*. 2008;34(4):640-8.
52. Jeney V, Ramos S, Bergman ML, Bechmann I, Tischer J, Ferreira A, et al. Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide. *Cell Rep*. 2014;8(1):126-36.

53. Epiphanio S, Mikolajczak SA, Gonçalves LA, Pamplona A, Portugal S, Albuquerque S, et al. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. *Cell Host Microbe*. 2008;3(5):331-8.
54. Ho JJ, Man HS, Marsden PA. Nitric oxide signaling in hypoxia. *Journal of molecular medicine*. 2012;90(3):217-31.
55. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *The Journal of pathology*. 2000;190(3):244-54.
56. Bhushan S, Kondo K, Polhemus DJ, Otsuka H, Nicholson CK, Tao YX, et al. Nitrite therapy improves left ventricular function during heart failure via restoration of nitric oxide-mediated cytoprotective signaling. *Circulation research*. 2014;114(8):1281-91.
57. Molnar T, Pusch G, Papp V, Feher G, Szapary L, Biri B, et al. The L-arginine pathway in acute ischemic stroke and severe carotid stenosis: temporal profiles and association with biomarkers and outcome. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2014;23(8):2206-14.
58. Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO, 3rd. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation*. 1995;91(6):1732-8.
59. Villalpando S, Gopal J, Balasubramanyam A, Bandi VP, Guntupalli K, Jahoor F. In vivo arginine production and intravascular nitric oxide synthesis in hypotensive sepsis. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(1):197-203.
60. Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, et al. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(2):557-67.
61. Gramaglia I, Sobolewski P, Meays D, Contreras R, Nolan JP, Frangos JA, et al. Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nature medicine*. 2006;12(12):1417-22.
62. Stel HV, Sakariassen KS, de Groot PG, van Mourik JA, Sixma JJ. Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood*. 1985;65(1):85-90.
63. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*. 2005;11(6):RA194-205.
64. Zanini GM, Cabrales P, Barkho W, Frangos JA, Carvalho LJ. Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during Plasmodium berghei ANKA infection in mice. *J Neuroinflammation*. 2011;8:66.
65. Pongponratn E, Riganti M, Punpoowong B, Aikawa M. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44(2):168-75.
66. Frevert U, Nacer A. Fatal cerebral malaria: a venous efflux problem. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:155.
67. Ho M, White NJ. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol*. 1999;276(6 Pt 1):C1231-42.
68. Serirom S, Raharjo WH, Chotivanich K, Loareesuwan S, Kubes P, Ho M. Anti-adhesive effect of nitric oxide on Plasmodium falciparum cytoadherence under flow. *Am J Pathol*. 2003;162(5):1651-60.

69. Lopansri BK, Anstey NM, Weinberg JB, Stoddard GJ, Hobbs MR, Levesque MC, et al. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet*. 2003;361(9358):676-8.
70. Cabrales P, Zanini GM, Meays D, Frangos JA, Carvalho LJ. Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(10):1454-63.
71. Martins YC, Zanini GM, Frangos JA, Carvalho LJ. Efficacy of different nitric oxide-based strategies in preventing experimental cerebral malaria by *Plasmodium berghei* ANKA. *PloS one*. 2012;7(2):e32048.
72. Serghides L, Kim H, Lu Z, Kain DC, Miller C, Francis RC, et al. Inhaled nitric oxide reduces endothelial activation and parasite accumulation in the brain, and enhances survival in experimental cerebral malaria. *PloS one*. 2011;6(11):e27714.
73. Hawkes M, Opoka RO, Namasopo S, Miller C, Thorpe KE, Lavery JV, et al. Inhaled nitric oxide for the adjunctive therapy of severe malaria: protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2011;12:176.
74. Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, McNeil YR, et al. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(11):2693-704.
75. Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, McNeil YR, et al. Recovery of endothelial function in severe falciparum malaria: relationship with improvement in plasma L-arginine and blood lactate concentrations. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(4):602-8.
76. Yeo TW, Lampah DA, Rooslamati I, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, et al. A randomized pilot study of L-arginine infusion in severe falciparum malaria: preliminary safety, efficacy and pharmacokinetics. *PloS one*. 2013;8(7):e69587.
77. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM*. 2004;97(7):385-95.
78. Leach RM, Rees PJ, Wilmshurst P. Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ*. 1998;317(7166):1140-3.
79. Bennett MH, Trytko B, Jonker B. Hyperbaric oxygen therapy for the adjunctive treatment of traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;12:CD004609.
80. Bennett MH, Weibel S, Wasiak J, Schnabel A, French C, Kranke P. Hyperbaric oxygen therapy for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;11:CD004954.
81. Plafki C, Peters P, Almeling M, Welslau W, Busch R. Complications and side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Aviat Space Environ Med*. 2000;71(2):119-24.
82. Camporesi EM. Side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med*. 2014;41(3):253-7.
83. Buras JA, Stahl GL, Svoboda KK, Reenstra WR. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;278(2):C292-302.
84. Al-Waili NS, Butler GJ. Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action. *TheScientificWorldJournal*. 2006;6:425-41.

85. Yang ZJ, Bosco G, Montante A, Ou XI, Camporesi EM. Hyperbaric O₂ reduces intestinal ischemia-reperfusion-induced TNF- α production and lung neutrophil sequestration. *European journal of applied physiology*. 2001;85(1-2):96-103.
86. Kaide CG, Khandelwal S. Hyperbaric oxygen: applications in infectious disease. *Emerg Med Clin North Am*. 2008;26(2):571-95, xi.
87. Cooper JS, Allinson P, Keim L, Sisson J, Schuller D, Sippel J, et al. Hyperbaric oxygen: a useful adjunct for purpura fulminans: case report and review of the literature. *Undersea Hyperb Med*. 2014;41(1):51-7.
88. John BV, Chamilos G, Kontoyiannis DP. Hyperbaric oxygen as an adjunctive treatment for zygomycosis. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(7):515-7.
89. Tragiannidis A, Groll AH. Hyperbaric oxygen therapy and other adjunctive treatments for zygomycosis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15 Suppl 5:82-6.
90. Feldmeier JJ. Hyperbaric oxygen 2003: indications and results: the Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report. Kensington, MD.: Undersea and Hyperbaric Medical Society 2003.
91. Arrais-Silva WW, Collhone MC, Ayres DC, de Souza Souto PC, Giorgio S. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitol Int*. 2005;54(1):1-7.
92. Arrais-Silva WW, Pinto EF, Rossi-Bergmann B, Giorgio S. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice. *Acta Trop*. 2006;98(2):130-6.
93. Rencricca NJ, Coleman RM, Altschule MD, Faletra PP, Gray AD, Desrochers PE, et al. Quantification of hyperbaric oxygen-induced toxicity utilizing a malarial system. *Aviat Space Environ Med*. 1981;52(2):85-7.

