MARIA NOGUEIRA DE MENEZES

**PAPEL DA IL-1 α NA MALÁRIA EXPERIMENTAL CAUSADA
PELO *Plasmodium chabaudi***

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima

Versão original

São Paulo
2018

RESUMO

Menezes, M. N. **Papel da IL-1 α na malária experimental causada pelo *Plasmodium chabaudi***. 2018. 72f. Tese (Doutorado em: Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A malária causa complicações envolvendo diversos órgãos, inclusive o fígado, onde se sabe que ocorrem inflamação e dano hepáticos, os quais contribuem para a severidade da doença. A interleucina (IL)-1 α é uma citocina pró-inflamatória que pertence à família da IL-1 e que pode ser produzida e liberada tanto por células não-hematopoiéticas, como hematopoiéticas em contextos como dano tecidual, infecção e doenças autoimunes em diversos órgãos. O presente estudo tem como objetivo avaliar a produção e o papel da IL-1 α na imunopatogênese e na proteção durante a malária experimental. A produção da IL-1 α foi investigada durante a inflamação e necrose no fígado em camundongos C57BL/6 infectados com o estágio eritrocítico do *Plasmodium chabaudi*. A fonte de IL-1 α no fígado dos camundongos infectados foi determinada por imunofluorescência e citometria de fluxo. Camundongos *IL1A*^{-/-} foram utilizados para avaliar o papel da IL-1 α neste contexto. Durante a infecção aguda com o *P. chabaudi*, a inflamação hepática e o desenvolvimento das lesões necróticas são acompanhados pelo aumento nos níveis de IL-1 α no fígado, que ocorre de forma independente do inflamassoma NLRP3 (*Nod-like receptor protein 3*). Os neutrófilos foram identificados como sendo a fonte de IL-1 α no fígado dos camundongos C57BL/6 infectados. De forma sistêmica, a deficiência em IL-1 α resultou numa diminuição da perda de peso e da hipotermia causados pela malária, mas teve um efeito menos significativo no controle da parasitemia. No fígado, a ausência de IL-1 α reduziu o número de células TUNEL⁺, atenuando a necrose induzida pela infecção. A melhora no dano hepático nos camundongos *IL1A*^{-/-} infectados está associada com uma menor resposta inflamatória em comparação aos camundongos C57BL/6 infectados, incluindo uma menor produção do TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*), citocina associada à apoptose de hepatócitos e, consequentemente, à necrose do tecido hepático durante a malária causada pelo *P. chabaudi*. Apesar de exercer um importante papel na imunopatogênese do dano e

inflamação do fígado durante a fase eritrocítica da infecção pelo *P. chabaudi*, a ausência da IL-1 α não impediu a proteção conferida pela presença das formas eritrocíticas contra a reinfeção com esporozoítos. Em conclusão, neutrófilos produzem IL-1 α no fígado durante a fase aguda da malária causada pelo *P. chabaudi*. Esta citocina amplifica a resposta inflamatória à infecção e promove a necrose hepática, assim como exacerba a perda de peso e a hipotermia.

Palavras-chave: Malária. IL-1alfa. Neutrófilos. Fígado. Inflamação.

ABSTRACT

Menezes, M. N. **Role of IL-1 α in experimental *P. chabaudi* malaria**. 2018. 72p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Malaria causes complications involving several organs, including the liver, where there are inflammation and damage that contribute to the disease severity. Interleukin (IL)-1 α is a pro-inflammatory cytokine from the IL-1 family that can be released by non-hematopoietic or hematopoietic cells during tissue damage, infection and autoimmune diseases in different organs. The present study aims to evaluate the production and the role of IL-1 α in the immunopathogenesis and in the protection during experimental malaria. IL-1 α production was assessed during hepatic inflammation and necrosis in C57BL/6 mice infected with blood stages of *Plasmodium chabaudi*. The source of IL-1 α in the liver of infected mice was determined by immunofluorescence and flow cytometry analyses. *IL1A*^{-/-} mice were used to assess the role of IL-1 α in this context. During acute *P. chabaudi* infection, hepatic inflammation and development of necrotic lesions were accompanied by an increase in IL-1 α levels in the liver, which occurred independently of the Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome. Neutrophils were identified as the source of IL-1 α in the liver of infected C57BL/6 mice. Systemically, IL-1 α deficiency resulted in reduction of weight loss and hypothermia caused by *P. chabaudi* malaria, but had minor effect on parasitemia control. In the liver, the absence of IL-1 α reduced the number of TUNEL⁺ cells and attenuated the necrotic process induced by infection. The amelioration of liver damage in infected *IL1A*^{-/-} mice was associated with lower inflammatory response compared to infected C57BL/6 mice, in particular with a decrease in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production, which has been directly implicated in the apoptosis of hepatocytes and, in consequence, the necrosis of the liver tissue during *P. chabaudi* malaria. Despite the important role in liver damage and inflammation immunopathogenesis during the blood-stage *P. chabaudi* infection, the absence of IL-1 α did not impair the protection conferred by blood stages against sporozoite reinfection. This study shows that neutrophils produce IL-1 α in the

liver during acute *P. chabaudi* malaria. This cytokine amplifies the inflammatory response to infection and promotes liver necrosis, as well as exacerbates the weight loss and hypothermia.

Keywords: Malaria. IL-1alpha. Neutrophils. Liver. Inflammation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 As citocinas da família IL-1

A descoberta das citocinas da família IL-1 se inicia antes mesmo do termo interleucina existir. Entre os anos 1950 e 1970, muitos estudos buscavam identificar uma proteína produzida por leucócitos, capaz de promover a febre, que foi inicialmente chamada de pirógeno endógeno [1-3]. Apenas em 1984, as sequências de dois diferentes pirógenos foram determinadas e foram então identificadas como IL-1 α e IL-1 β [4, 5]. A síntese de proteínas recombinantes destas moléculas permitiu confirmar o papel delas na indução da febre e de diversas outras funções biológicas durante a resposta imune aguda.

Atualmente, a família IL-1 abrange 11 citocinas, incluindo IL-18 e IL-33. A estrutura gênica dos membros desta família é altamente conservada, sugerindo que tenham sido originadas a partir da duplicação de um gene ancestral comum [6]. Apenas o gene que codifica o IL-1Ra (*IL-1 receptor antagonist*) apresenta uma sequência de peptídeo sinal para secreção pela via clássica do retículo endoplasmático e complexo de Golgi [7]. Os mecanismos de secreção das demais citocinas da família da IL-1 por células vivas ainda não são bem estabelecidos e são alvos de diversos estudos. Recentemente, foi descrito que uma proteína chamada gasdermina D forma um poro pelo qual a IL-1 β é secretada após a ativação de macrófagos por agonistas do inflamassoma NLRP3 [8]. Os receptores das citocinas da família IL-1 apresentam uma porção intracelular composta pelo domínio TIR (Toll/IL-1R), que recruta a molécula adaptadora MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*), assim como as vias de sinalização dos TLRs (*Toll-like receptors*) [7, 9, 10]. O papel das citocinas da família da IL-1 na resposta imune torna-se então, claro, já que esta sinalização culmina na ativação das vias do NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) e da MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) [11, 12].

IL-1 α e IL-1 β são as principais citocinas desta família e embora sejam reconhecidas pelo mesmo receptor, possuem diferenças quanto à sua produção, liberação e atividade. Ambas são produzidas em sua forma

precursora que pode ser clivada por diferentes proteínas. Enquanto a IL-1 β necessita ser clivada pela caspase-1 para tornar-se biologicamente ativa, a forma não clivada da IL-1 α já é capaz de ligar-se ao IL-1R (*IL-1 receptor*) e exercer seu papel biológico [13].

1.1.1 Produção e liberação da IL-1 α

A IL-1 α é expressa de forma constitutiva no interior das células, mesmo em homeostase, possuindo um papel ativo no núcleo como regulador da transcrição, mas também atuando fora da célula na imunidade e inflamação. A forma precursora da IL-1 α contém uma sequência de localização nuclear que se liga ao DNA após a translocação para o núcleo em resposta à sinalização de TLR4 ou indução de apoptose [14, 15]. Células não-hematopoiéticas, como células epiteliais do trato gastrointestinal, rim e pulmão, além de queratinócitos, hepatócitos e fibroblastos podem produzir IL-1 α e ter sua expressão aumentada em situações de inflamação [16-20]. Além disso, muitos leucócitos também já foram descritos como produtores de IL-1 α em diferentes modelos experimentais. Em modelos de inflamação estéril no fígado, sabe-se que a IL-1 α produzida pelas células de Kupffer é essencial para promover a inflamação após o dano tecidual [21, 22]. Células da microglia também produzem IL-1 α durante a isquemia, sendo esta citocina responsável por iniciar o processo de inflamação no cérebro [23]. No entanto, a produção de IL-1 α por células hematopoiéticas não se restringe aos macrófagos. Linfócitos T CD4⁺ expressam IL-1 α de forma independente da sua diferenciação em Th1 ou Th2 [24]. Por fim, neutrófilos também produzem IL-1 α , a qual inicia o processo inflamatório e recruta ainda mais neutrófilos para o sítio de inflamação estéril [25].

A indução da expressão de IL-1 α ocorre rapidamente em resposta a diferentes estímulos fisiológicos ou patológicos. O stress oxidativo parece aumentar a expressão da IL-1 α através da elevação das concentrações de H₂O₂ ou em situações de hipóxia, podendo ser dependente ou não do HIF-1 (*Hipoxia-inducible factor 1*) [26, 27]. O hormônio estradiol é capaz de induzir a expressão de IL-1 α em fibroblastos, podendo estar relacionado à maior

incidência de artrite reumatóide em mulheres do que em homens [28]. Agentes que causam dano no DNA, como radiação ultravioleta e agentes químicos, também são capazes de aumentar a expressão e liberação de IL-1 α , mesmo sem perda de integridade da membrana celular [29-31]. Por fim, diferentes fatores da resposta imune também são capazes de modular a expressão de IL-1 α . Embora muitos modelos estabeleçam a IL-1 α como iniciadora do processo inflamatório, sabe-se que a ativação de NF- κ B, a partir da sinalização de receptores como TLR, IL-1R ou o TNFR (*TNF receptor*), é capaz de induzir o aumento da expressão de IL-1 α . A própria IL-1 α , através de uma sinalização autócrina, aumenta a sua produção, resultando em um ciclo de amplificação da inflamação [32, 33]. Além disso, patógenos, como a bactéria *Legionella pneumophila*, podem diretamente ativar a produção de IL-1 α em macrófagos, sendo esta produção essencial para o desenvolvimento da resposta inflamatória contra a bactéria [34]. Da mesma forma, a combinação da *Mycobacterium tuberculosis* atenuada com TNF- α promove a elevação da expressão de IL-1 α em células epiteliais do pulmão [35].

A liberação da IL-1 α pode dar-se de forma ativa ou passiva, uma vez que está presente no núcleo e citoplasma das células. Além disso, a forma precursora da IL-1 α pode ser encontrada ligada à membrana através de interações do tipo lectina [36]. Esta forma foi identificada em macrófagos e é capaz de ativar linfócitos T e NK através do contato direto entre as células [37, 38]. Atualmente sabe-se que muitas células, como fibroblastos, monócitos e células endoteliais, também são capazes de expressar IL-1 α associada à membrana em resposta ao stress ou infecção, exercendo um papel importante na resposta inflamatória local através de uma sinalização justácrina entre as células [39-41]. A polarização de células T para o perfil Th17 também parece ser influenciada por esta forma da IL-1 α [42]. Os mecanismos pelos quais a liberação ativa da IL-1 α acontece estão pouco esclarecidos. O aumento do influxo de cálcio através do tratamento com ionomicina é capaz de promover a liberação da forma madura da IL-1 α por macrófagos, de forma independente de caspase-1 [43]. Uma alternativa à via clássica de secreção para proteínas que não possuem o peptídeo sinal também foi proposta para explicar a secreção da IL-1 α em resposta ao stress. A ligação da forma precursora da IL-1 α a um

complexo multiproteico contendo cobre permite a passagem desta molécula pela membrana celular em uma formação denominada pelos autores como “glóbulo fundido”. A deleção de uma das proteínas presentes neste complexo, a ligante de cobre S100A13, é capaz de inibir a liberação da IL-1 α após o stress provocado pelo calor [44, 45]. A falta de informações quanto aos mecanismos de liberação ativa da IL-1 α reside principalmente no fato de muitos estudos demonstrarem a produção e secreção de IL-1 α pelas células, sem especificar sua forma de liberação na ausência de morte celular [22, 46, 47].

A forma de liberação mais estudada da IL-1 α tem sido a sua liberação passiva por células necróticas. Esta propriedade permite classificá-la como uma citocina de dupla função, uma vez que, além do papel clássico como citocina, esta molécula também pode atuar como um DAMP. Esta liberação passiva pode ser vista a partir da indução de necrose em hepatócitos, que permite a detecção de altos níveis de IL-1 α no sobrenadante dos seus lisados [19]. A liberação da IL-1 α durante a necrose reside no fato desta molécula estar presente no citoplasma durante este tipo de morte celular, o que parece ser um processo altamente controlado. Em contraste, durante a apoptose, ocorre uma translocação da IL-1 α para o núcleo e esta se mantém ligada à cromatina, não podendo ser liberada [14]. A inoculação de células necróticas no peritônio é suficiente para gerar um recrutamento neutrofílico de forma dependente da IL-1 α [48]. Este efeito sobre o recrutamento de neutrófilos ocorre de modo independente de caspase-1 e o papel do inflamassoma na liberação da IL-1 α permanece controverso. Em muitos modelos observa-se uma liberação de IL-1 α independente dos componentes do inflamassoma NLRP3 [34, 49-51], porém há estudos que mostram o contrário, associando a liberação de IL-1 α não só à ativação do inflamassoma, mas também à liberação simultânea de IL-1 β [52, 53]. A gasdermina-D também parece ter um papel na liberação da IL-1 α , mesmo sem indução da morte celular, após ativação do inflamassoma NLRP3 [8]. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer se existe uma regulação ativa desta liberação ou se é apenas decorrente do fato do poro formado pela gasdermina-D (10-15 nm) ser suficiente para a passagem passiva da IL-1 α (4,5 nm) [54, 55].

Outro aspecto sobre a IL-1 α que permanece controverso é a diferença entre suas formas clivada e não clivada quanto à atividade biológica. É bem estabelecido que a calpaína é capaz de clivar a forma precursora da IL-1 α (31 kDa) em sua forma madura (17 kDa) por um processo dependente de cálcio dentro ou fora da célula [56, 57]. Além disso, outras moléculas parecem ser capazes de exercer esse papel, como é o caso da granzima-B, elastase e quimase [58]. A forma madura resultante da clivagem da IL-1 α por estas proteases induz maiores níveis de IL-6 e IL-8 em células HeLa quando comparada à forma não-clivada usada como estímulo *in vitro* [58]. No entanto, os sítios de clivagem da IL-1 α por cada uma destas moléculas é diferente, gerando formas maduras distintas que podem justificar a diferença na atividade biológica. Por outro lado, também já foi demonstrado em linhagem de células epiteliais e em células mononucleares do sangue periférico que os tratamentos com as proteínas recombinantes das formas precursora ou clivada da IL-1 α induzem níveis similares de TNF- α e IL-6 *in vitro* [13]. A liberação da forma precursora da IL-1 α é suficiente para induzir inflamação em modelos de hipóxia, o que é revertido com a utilização do antagonista do receptor IL-1R, demonstrando, portanto, o papel biológico da molécula íntegra [25].

1.1.2 Funções biológicas da IL-1 α

Os trabalhos que visam avaliar o papel da IL-1 α em diferentes contextos raramente distinguem qual forma da molécula (clivada ou não) está sendo estudada. De uma forma geral, é atribuída uma função pró-inflamatória à molécula, independente do seu processamento. O papel da IL-1 α como iniciadora da inflamação estéril tem sido amplamente estudado devido à sinalização de dano celular exercida por ela. Em modelos de hipóxia, onde as células que não recebem oxigênio acabam morrendo por necrose, o acúmulo de IL-1 α e o consequente recrutamento de neutrófilos antecede a produção de IL-1 β e posterior recrutamento de monócitos [25]. No cérebro isquêmico, também se verifica um aumento precoce da expressão de IL-1 α [23]. Além disso, plaquetas ativam o endotélio, via sinalização de IL-1 α , que passa a produzir CXCL1 e expressar moléculas de adesão que permitem a infiltração de neutrófilos [59]. Camundongos IL-1 $\alpha^{-/-}$ ou o tratamento com anticorpos

neutralizantes anti-IL-1 α são capazes de inibir a resposta imune após a injúria isquêmica em modelo de infarto de miocárdio [60]. O mesmo é verdade em modelos de colite, em que camundongos deficientes para IL-1 α , ou com uma deleção específica da IL-1 α em células epiteliais do cólon, exibem uma colite mais moderada após indução da doença por sulfato de sódio dextrana (DSS) [16].

O dano hepático causado por diferentes fatores tem sido um modelo muito utilizado para avaliar o papel da IL-1 α . É consenso entre todos os trabalhos que a sinalização desencadeada pela IL-1 α é fundamental para o processo inflamatório que ocorre em resposta ao dano hepático estéril, independente do agente causador da injúria [21, 22, 61-64]. Já o significado biológico desta inflamação induzida por IL-1 α para a patologia em estudo pode variar de acordo com o modelo. A IL-1 α liberada por hepatócitos necróticos parece atuar nas células de Kupffer, induzindo a produção de IL-6 por estas células, que contribui para a tumorigênese no fígado [19]. No entanto, a superexpressão da forma ligada à membrana da IL-1 α induz o aumento do número de linfócitos T infiltrados no fígado, além de elevar a produção de IFN- γ (*Interferon-gamma*) e a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ e células NK, o que contribui significativamente para o controle do hepatocarcinoma [38]. Durante o dano hepático causado por tetracloreto de carbono, foi demonstrado que as diferentes formas da IL-1 α também podem produzir diferentes efeitos. Enquanto a forma ligada à membrana protege o animal do dano hepático, a forma secretada agrava o quadro. Neste caso, a forma secretada é capaz de ativar linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, induzir a produção de IL-6, além de aumentar o recrutamento de células mieloides para o fígado, através da produção das quimiocinas CXCL5 e CCL2 [65]. A administração de tunicamicina em camundongos causa uma esteatohepatite induzida por stress do retículo endoplasmático. Neste modelo, a IL-1 α , além de induzir a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , também influencia na ativação de caspase-3 em hepatócitos, agravando o dano hepático [63]. Já na esteatohepatite causada por dieta aterogênica, a deficiência de IL-1 α protege os animais da inflamação e fibrose hepática, com redução nos níveis das já citadas citocinas pró-inflamatórias e da amiloide A sérica. No entanto, transplantes com células da medula óssea

nestes animais não permitiram concluir se a IL-1 α iniciadora do processo inflamatório provém dos hepatócitos ou das células de Kupffer [21, 61]. A presença do IL-1R nos hepatócitos é fundamental para o desencadeamento da falência hepática aguda, influenciando na sobrevivência de animais tratados com D-galactosamina e lipopolissacarídeo (LPS) [64]. Neste modelo, ambas IL-1 α e IL-1 β são importantes para o dano hepático [62], atuando sobre o hepatócito e promovendo o aumento da ativação de NF- κ B e da apoptose mediada por caspase-3 [64]. A administração de IL-1 α em cultura de hepatócitos *in vitro* exacerba a morte celular induzida por TNF- α , além de *in vivo*, ser suficiente para aumentar os níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em camundongos tratados com D-galactosamina (D-gal) e LPS [64]. Por fim, no modelo clássico de dano hepático induzido por acetaminofeno (APAP), a ativação do inflamassoma NLRP3 e a produção de IL-1 β parecem ser dispensáveis, enquanto a inibição da IL-1 α promove a sobrevivência dos animais e reduz o recrutamento de neutrófilos, que atuam amplificando a inflamação e o dano tecidual. Além disso, neste caso, as células de Kupffer parecem ser a principal fonte de IL-1 α após ativação via MyD88 [22].

A IL-1 α atua na indução da inflamação tecidual não apenas em modelos de inflamação estéril, mas também em resposta a diferentes patógenos. Em infecções fúngicas, a IL-1 α possui um papel fundamental para a resposta neutrofílica, ajudando no controle do crescimento do fungo. Enquanto na mucosa oral, os queratinócitos são responsáveis pela produção de IL-1 α , os monócitos assumem este papel no pulmão. O recrutamento de neutrófilos parece ser dependente da produção de CXCL1 induzida pela IL-1 α e, além disso, a produção de GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) e a geração de novos neutrófilos da medula óssea também é influenciada pela sinalização do IL-1R [50, 66]. No pulmão, também foi demonstrado que, além dos monócitos, células dendríticas são capazes de produzir IL-1 α em resposta à infecção com *M. tuberculosis* [67]. A deficiência de IL-1 α neste modelo resulta na falta de controle da bactéria a nível intracelular, levando à mortalidade precoce dos animais infectados, mesmo na presença da imunidade adaptativa contra a bactéria [35]. O infiltrado de células

mononucleares no pulmão após infecção com a *M. tuberculosis* é maior na ausência do IL-1 α , no entanto, o contrário acontece para a população polimorfonuclear [35]. De modo similar, a infecção com a bactéria *L. pneumophila* leva a um recrutamento neutrofílico precoce no pulmão que acontece de forma dependente da IL-1 α [34]. Além deste papel protetor contra infecções bacterianas, a IL-1 α também atua em infecções virais, conferindo imunidade protetora a animais infectados com o vírus HSV-1 (*Herpes simplex vírus 1*) [51]. Atua também na formação dos centros germinativos do tecido linfóide induzido associado ao brônquio após infecção com o vírus influenza A, provavelmente através da indução de CXCL13, uma quimiocina que recruta linfócitos B [68]. Após a vacinação com a forma atenuada do vírus, a morte celular de macrófagos resulta na liberação da IL-1 α , a qual inicia uma cascata inflamatória essencial para a ativação das células dendríticas e posterior produção de anticorpos antivirais [69].

Em relação às infecções causadas por protozoários, ainda há poucos estudos avaliando a função da IL-1 α na resposta imune a estes patógenos. Sabe-se que durante a infecção por *Leishmania major* em camundongos BALB/c, a deficiência de IL-1 α melhora a sobrevivência dos animais ao reduzir a inflamação que piora as lesões induzidas pelo parasito [70]. No entanto, a produção de IL-1 α por células dendríticas retiradas de camundongos BALB/c em resposta à *L. major* é significativamente menor do que a produção por células dendríticas de C57BL/6, o que levou a acreditar que a IL-1 α poderia ser um dos mecanismos de resistência dos animais C57BL/6 à infecção por este protozoário. De fato, o tratamento de camundongos BALB/c com IL-1 α reduziu significativamente as lesões, aumentou a produção de citocinas do perfil Th1 e diminuiu a produção de citocinas do perfil Th2 de modo dependente de IL-12 [71]. No entanto, a infecção de animais C57BL/6 IL-1 α $\beta^{-/-}$ com *L. major* não alterou o fenótipo de resistência dos camundongos C57BL/6 [72], indicando que talvez diferentes mecanismos regulem a susceptibilidade entre diferentes linhagens de camundongos. O tratamento de células HeLa infectadas pelo *Toxoplasma gondii* com IL-1 α leva ao aumento da produção de IL-8 e a ativação de NF- κ B nestas células [73]. Além disso, sabe-se que os monócitos inflamatórios essenciais no controle da doença cerebral causada pelo *T. gondii*

são células produtoras de IL-1 α [74]. No modelo de malária murina causada pelo *Plasmodium berghei*, uma glomerulonefrite é bem caracterizada e a participação do IL-1 α na patogênese deste processo parece ser fundamental [75]. Além disso, sabe-se que a administração de hemozoína sintética na cavidade peritoneal de camundongos é capaz de induzir a produção de IL-1 α [76], embora os efeitos desta IL-1 α não tenham sido avaliados.

1.2 Aspectos gerais da malária

A malária é uma doença parasitária que atinge países tropicais e subtropicais, com muitas áreas sendo consideradas endêmicas para a doença. Segundo levantamento da Organização Mundial da Saúde, a situação da doença no ano de 2016 consiste em uma estimativa de mais de 200 milhões de casos em todo o mundo, com cerca de 450 mil mortes, sendo que 78% destas acometem crianças abaixo dos cinco anos de idade. Na região das Américas, a transmissão da malária ocorre em 18 países e mais de 120 milhões de pessoas estão sob algum risco de contrair a doença. Além disso, somente o Brasil é responsável por 18% dos casos nesta região [77].

A doença é desencadeada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa e ao gênero *Plasmodium* e atualmente são descritas cinco espécies capazes de infectar humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* [78]. A transmissão da doença ocorre por meio de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados com o parasito [79]. A infecção inicia-se no momento em que a fêmea do *Anopheles*, que possui hábito hematófago, realiza o repasto sanguíneo e inocula, juntamente com sua saliva, os esporozoítos, formas infectantes do parasito, que alcançam a corrente sanguínea do hospedeiro. Alguns minutos depois, os esporozoítos alcançam os hepatócitos, invadindo-os e iniciando a fase pré-eritrocítica do seu ciclo biológico. Uma vez dentro do hepatócito, o esporozoíto se diferencia em trofozoíto pré-eritrocítico que irá iniciar a reprodução assexuada por esquizogonia. Formam-se, então, os esquizontes teciduais, que liberam os merossomos na corrente sanguínea, os quais, após romperem-se, liberam milhares de merozoítos [80]. A invasão dos

eritrócitos pelos merozoítos caracteriza o início da fase eritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium*. No interior do eritrócito, o parasito volta a realizar sucessivas divisões dando origem ao esquizonte. O eritrócito se rompe pela ação do parasita e libera novos merozoítos que irão infectar novos eritrócitos. Alguns dias após as primeiras manifestações clínicas da doença, uma pequena porção dos merozoítos diferenciam-se em gametócitos masculinos e femininos, que uma vez ingeridos pelo mosquito em um novo repasto sanguíneo, darão início à fase sexual do ciclo de vida do parasito no interior do mosquito.

Em regiões endêmicas para a malária, crianças em idade mais avançada e adultos adquirem proteção contra a doença grave, embora a imunidade estéril nunca seja adquirida [81]. Sabe-se que estes indivíduos podem ser infectados diversas vezes, desenvolvendo um fenômeno chamado de superinfecção. Através da utilização do modelo murino de malária, foi demonstrado que o desenvolvimento da fase hepática da infecção é significativamente inibido pela presença da fase eritrocítica do *Plasmodium* sp., de forma que os parasitas decorrentes de uma infecção secundária de esporozoítos nunca alcancem o sangue [82]. O mecanismo proposto para explicar essa proteção é baseado na distribuição de ferro regulada pelo hormônio hepcidina. Na presença do estágio eritrocítico do *Plasmodium* sp., a disponibilidade de ferro nos hepatócitos é reduzida, consequentemente, comprometendo o desenvolvimento das formas hepáticas do *Plasmodium* sp. [82]. Embora a hepcidina seja uma molécula chave neste processo, alguns aspectos desta proteção permanecem sem explicação e o papel do sistema imune não pode ser totalmente descartado.

1.2.1 Imunopatogênese da malária

A ruptura dos eritrócitos que contêm os esquizontes durante a fase eritrocítica do ciclo do *Plasmodium* é tipicamente acompanhada por febre, náuseas, dores de cabeça e outros sintomas de uma resposta sistêmica de citocinas pró-inflamatórias oriundas, principalmente, das células do sistema imune inato [83]. Isto se deve ao fato de que a ruptura destes eritrócitos libera na corrente sanguínea os componentes bioativos do parasito, além de

moléculas próprias do hospedeiro contidas nos eritrócitos, que entram em contato com as células do sistema imune desencadeando respostas imunológicas exacerbadas. Muitos estudos com pacientes têm demonstrado associações entre a forma grave da malária e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , assim como as quimiocinas CCL3 (MIP-1 α) e CCL4 (MIP-1 β) [84, 85]. Entretanto, esta resposta inflamatória também é importante para a proteção contra a doença, como, por exemplo, no caso do TNF- α atuando em sinergia com o IFN- γ num papel antiparasitário ao induzir a produção de óxido nítrico (NO) e outros radicais tóxicos [86]. A resposta de citocinas como TGF- β (*Transforming growth factor beta*) e IL-10 é essencial para regular essa resposta pró-inflamatória em diferentes momentos, já que altos níveis destas citocinas no início da infecção podem comprometer os mecanismos efetores e baixos níveis tardiamente podem não controlar a cascata inflamatória de citocinas e resultar na doença grave [87].

As infecções humanas pelas diferentes espécies de *Plasmodium* podem gerar complicações que atingem diferentes órgãos aumentando a severidade da doença. Durante a fase eritrocítica do ciclo, a expressão de determinadas moléculas do parasito na superfície do eritrócito infectado faz com que esta célula possa aderir ao endotélio de tecidos periféricos. Este é considerado um mecanismo de evasão do *Plasmodium* para que ele evite a destruição durante a passagem do eritrócito parasitado pelo baço [88]. O *P. falciparum* tem sido a espécie mais estudada em relação a este fenômeno, embora mais recentemente alguns estudos têm mostrado que o mesmo pode ocorrer em infecções com o *P. vivax* [89-91]. A capacidade de citoadesão do parasito está relacionada com a severidade da doença decorrida da infecção, uma vez que a presença de eritrócitos parasitados aderidos ao endotélio vascular pode levar à obstrução do fluxo sanguíneo nos capilares, à ativação endotelial e à inflamação nos tecidos [92]. A presença de eritrócitos parasitados no cérebro é altamente associada com o desenvolvimento da malária cerebral em indivíduos infectados com o *P. falciparum* [93]. A malária cerebral é a forma mais grave de manifestação da doença responsável por grande parte da mortalidade decorrente da malária. Sabe-se ainda que os eritrócitos parasitados podem aderir aos pulmões, fígado, pele, rins e placenta, causando complicações

nestes tecidos em indivíduos infectados [93-96]. Sintomas de falência hepática, como icterícia e altos níveis de ALT e AST no soro, são frequentemente encontrados em pacientes com malária [97-101]. É possível encontrar no tecido hepático de pacientes infectados com o *P. falciparum* com lesões necróticas e células de Kupffer hiperplásicas e com pigmento malárico, hemozoína, em seu interior [97]. A infecção pelo *P. vivax* também é capaz de causar disfunções hepáticas [101]. Hiperbilirrubinemia (bilirrubina sérica > 3 mg/dL) juntamente com um aumento maior que três vezes na concentração normal de aminotransferases no soro caracterizam uma hepatopatia malárica [100, 102], a qual pode ser associada com outras complicações, como malária cerebral, choque e lesão renal aguda [102]. Além disso, foi proposto que a falência hepática aguda induzida pela malária pode estar envolvida na patogênese da malária cerebral [103].

O estudo de mecanismos imunológicos em pacientes humanos é muitas vezes restrito por questões éticas que impossibilitam abordagens experimentais. Desta forma, o uso de roedores para estudar a imunopatologia da malária vem sendo largamente aplicado. A infecção pelo *Plasmodium chabaudi* é considerada o principal modelo experimental para a compreensão da resposta imune contra a malária [104]. A infecção de camundongos C57BL/6 com o *P. chabaudi* AS causa uma malária não letal e caracterizada por uma esplenomegalia associada a uma ativação policlonal de linfócitos B do baço [105-107]. As citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ são produzidas em grande quantidade no baço, e estão presentes de forma transiente no plasma, tendo sido demonstrado que na ausência de IFN- γ , os camundongos apresentam maior dificuldade para controlar e eliminar a infecção primária [108]. Estudos comparativos entre animais suscetíveis e resistentes à infecção com *P. chabaudi* têm demonstrado que as respostas pró-inflamatórias parecem ser necessárias para o subsequente desenvolvimento da imunidade protetora [109]. Com a progressão da doença, grande parte dos linfócitos que foram ativados policlonalmente na fase aguda são eliminados por morte celular [110] e o subsequente desenvolvimento de anticorpos específicos e linfócitos Th1 de memória efetora resulta na eliminação do parasita e na proteção contra a reinfeção. No entanto, assim como na malária humana, a imunidade completa

contra a reinfecção parece não ser duradoura no modelo do *P. chabaudi*. Isso parece ser devido ao declínio da resposta de células Th1 de memória e ocorre mesmo na presença de altos níveis de anticorpos específicos [111], sendo restaurada como o tratamento com doses baixas de IFN- γ [112].

Os modelos experimentais de malária reproduzem muitos dos aspectos patogênicos encontrados na malária humana. O *P. berghei* tem sido amplamente utilizado para avaliar aspectos imunopatológicos por causar malária cerebral e lesão pulmonar aguda em camundongos C57BL/6 e malária placentária em camundongos BALB/c [113-115]. Na infecção pelo *P. chabaudi* é possível observar a aderência de eritrócitos parasitados ao endotélio vascular em órgãos como baço, fígado, pulmão e placenta, o que pode levar a complicações da doença como dano tecidual nestes órgãos e malária placentária [104, 116, 117]. A necrose hepática, o infiltrado de leucócitos e o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias no fígado podem influenciar na resposta à doença causada pelas infecções com os estágios eritrocíticos dos *Plasmodium yoelli*, *P. chabaudi* e *P. berghei* [116, 118-121]. A hemólise intravascular decorrente da infecção pelo *P. yoelli* tem sido implicada no dano hepático através do stress oxidativo induzido pelo acúmulo do grupamento heme livre na circulação. Este stress oxidativo leva à produção de TNF- α e ao recrutamento de neutrófilos que parecem estar relacionados com a lesão hepática decorrente da infecção [122]. A expressão e a atividade da heme oxigenase-1 (HO-1), enzima que cataboliza o heme livre, encontram-se aumentadas após a eliminação do *P. yoelli* e isto parece estar relacionado com o restabelecimento da função hepática após o dano [123]. Já a necrose hepática causada pelo *P. berghei* parece ser regulada positivamente pela sinalização do MyD88 e da IL-12 e negativamente pela enzima óxido nítrico sintase (iNOS) [124-126], além de ser dependente da presença do parasito na circulação [127]. O acúmulo de eritrócitos parasitados pelo *P. chabaudi* ocorre preferencialmente no fígado e pode ser modulado pelo sistema imune do hospedeiro, uma vez que a deficiência de IL-10 é capaz de aumentar este fenômeno [128, 129]. Além disso, a presença do parasito no fígado está diretamente relacionada com a ocorrência do dano hepático e inflamação tecidual [129, 130]. Assim como para o *P. yoelli*, a HO-1 exerce um papel

importante na proteção ao dano hepático após infecção pelo *P. chabaudi*. Camundongos deficientes em HO-1 desenvolvem uma falência hepática fatal. A expressão da HO-1 protege os hepatócitos da morte celular induzida por TNF- α na presença do grupamento heme livre [131]. De modo semelhante, a IL-22 também possui um papel protetor contra o dano hepático, reduzindo em até 50% a mortalidade dos animais, sem afetar a parasitemia e alterações de temperatura dos animais infectados pelo *P. chabaudi* [132]. Um fator que promove a necrose hepática neste mesmo modelo é a infiltração de neutrófilos no fígado, possivelmente após a ativação pelo IFN do tipo I [133], embora o mecanismo pelo qual estes neutrófilos atuam não tenha sido estabelecido. Muitos aspectos da imunopatogênese da malária vêm sendo esclarecidos com o uso de modelos animais e a participação de citocinas nestes processos é um achado recorrente. No entanto, o papel da IL-1 α na malária ainda é pouco estudado e a participação desta citocina na resposta imune e na patogênese causada pela infecção pelo *Plasmodium* ainda é algo a ser estabelecido.

REFERÊNCIAS

1. Beeson, P.B., *Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leucocytes*. J Clin Invest, 1948. **27**(4): p. 524.
2. Atkins, E. and W.B. Wood, Jr., *Studies on the pathogenesis of fever. II. Identification of an endogenous pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine*. J Exp Med, 1955. **102**(5): p. 499-516.
3. Dinarello, C.A., N.P. Goldin, and S.M. Wolff, *Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens*. J Exp Med, 1974. **139**(6): p. 1369-81.
4. Auron, P.E., et al., *Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(24): p. 7907-11.
5. Lomedico, P.T., et al., *Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in Escherichia coli*. Nature, 1984. **312**(5993): p. 458-62.
6. Nicklin, M.J., et al., *A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster*. Genomics, 2002. **79**(5): p. 718-25.
7. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. Nat Rev Immunol. **10**(2): p. 89-102.
8. Evavold, C.L., et al., *The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages*. Immunity. **48**(1): p. 35-44 e6.
9. O'Neill, L.A., *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 10-8.
10. Gay, N.J. and F.J. Keith, *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 355-6.
11. Stylianou, E., et al., *Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes*. J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 15836-41.
12. O'Neill, L.A., T.A. Bird, and J. Saklatvala, *How does interleukin 1 activate cells? Interleukin 1 signal transduction*. Immunol Today, 1990. **11**(11): p. 392-4.
13. Kim, B., et al., *The Interleukin-1alpha Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines*. Front Immunol. **4**: p. 391.
14. Cohen, I., et al., *Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(6): p. 2574-9.
15. Werman, A., et al., *The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2434-9.
16. Bersudsky, M., et al., *Non-redundant properties of IL-1alpha and IL-1beta during acute colon inflammation in mice*. Gut. **63**(4): p. 598-609.
17. Kawaguchi, Y., M. Hara, and T.M. Wright, *Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1253-60.
18. Aden, N., et al., *Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis*. J Invest Dermatol. **130**(9): p. 2191-200.
19. Sakurai, T., et al., *Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis*. Cancer Cell, 2008. **14**(2): p. 156-65.
20. Suwara, M.I., et al., *IL-1alpha released from damaged epithelial cells is sufficient and essential to trigger inflammatory responses in human lung fibroblasts*. Mucosal Immunol. **7**(3): p. 684-93.
21. Olteanu, S., et al., *Lack of interleukin-1alpha in Kupffer cells attenuates liver inflammation and expression of inflammatory cytokines in hypercholesterolaemic mice*. Dig Liver Dis. **46**(5): p. 433-9.

22. Zhang, C., et al., *Macrophage-derived IL-1alpha promotes sterile inflammation in a mouse model of acetaminophen hepatotoxicity*. Cell Mol Immunol.
23. Luheshi, N.M., et al., *Interleukin-1alpha expression precedes IL-1beta after ischemic brain injury and is localised to areas of focal neuronal loss and penumbral tissues*. J Neuroinflammation. **8**: p. 186.
24. Bayley, J.P., et al., *Allele-specific expression of the IL-1 alpha gene in human CD4+ T cell clones*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2349-53.
25. Rider, P., et al., *IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation*. J Immunol. **187**(9): p. 4835-43.
26. Rider, P., et al., *The transcription of the alarmin cytokine interleukin-1 alpha is controlled by hypoxia inducible factors 1 and 2 alpha in hypoxic cells*. Front Immunol. **3**: p. 290.
27. McCarthy, D.A., et al., *Redox-control of the alarmin, Interleukin-1alpha*. Redox Biol. **1**: p. 218-25.
28. Itoh, Y., et al., *17beta-estradiol induces IL-1alpha gene expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through estrogen receptor alpha (ERalpha) and augmentation of transcriptional activity of Sp1 by dissociating histone deacetylase 2 from ERalpha*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 3059-66.
29. Mallardo, M., et al., *DNA damaging agents increase the stability of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 transcripts and the production of the relative proteins*. J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 14899-904.
30. Cohen, I., et al., *IL-1alpha is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity*. Sci Rep. **5**: p. 14756.
31. Nozaki, S., et al., *Augmentation of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression by ultraviolet irradiation is mediated by interleukin 1 in Pam 212 keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(1): p. 10-4.
32. Kimura, H., et al., *Molecular analysis of constitutive IL-1alpha gene expression in human melanoma cells: autocrine stimulation through NF-kappaB activation by endogenous IL-1alpha*. Cytokine, 1998. **10**(11): p. 872-9.
33. Di Paolo, N.C. and D.M. Shayakhmetov, *Interleukin 1alpha and the inflammatory process*. Nat Immunol. **17**(8): p. 906-13.
34. Barry, K.C., et al., *IL-1alpha signaling initiates the inflammatory response to virulent Legionella pneumophila in vivo*. J Immunol. **190**(12): p. 6329-39.
35. Di Paolo, N.C., et al., *Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of Mycobacterium tuberculosis Infection*. Immunity. **43**(6): p. 1125-36.
36. Brody, D.T. and S.K. Durum, *Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction*. J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1183-7.
37. Kurt-Jones, E.A., et al., *Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(4): p. 1204-8.
38. Lin, D., et al., *Membrane IL1alpha Inhibits the Development of Hepatocellular Carcinoma via Promoting T- and NK-cell Activation*. Cancer Res. **76**(11): p. 3179-88.
39. Orjalo, A.V., et al., *Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(40): p. 17031-6.
40. Kurt-Jones, E.A., W. Fiers, and J.S. Pober, *Membrane interleukin 1 induction on human endothelial cells and dermal fibroblasts*. J Immunol, 1987. **139**(7): p. 2317-24.
41. Kaplanski, G., et al., *Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4242-8.
42. Foucher, E.D., et al., *IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1alpha*. Eur J Immunol. **45**(4): p. 1092-102.

43. Brough, D., et al., *Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3029-36.
44. Mandinova, A., et al., *S100A13 mediates the copper-dependent stress-induced release of IL-1alpha from both human U937 and murine NIH 3T3 cells*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2687-96.
45. Prudovsky, I., et al., *The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 24): p. 4871-81.
46. Kuan, E.L. and S.F. Ziegler, *A tumor-myeloid cell axis, mediated via the cytokines IL-1alpha and TSLP, promotes the progression of breast cancer*. Nat Immunol. **19**(4): p. 366-374.
47. Wiedemann, G.M., et al., *Cancer cell-derived IL-1alpha induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells*. Oncoimmunology. **5**(9): p. e1175794.
48. Chen, C.J., et al., *Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 851-6.
49. Oleszycka, E., et al., *IL-1alpha and inflammasome-independent IL-1beta promote neutrophil infiltration following alum vaccination*. FEBS J. **283**(1): p. 9-24.
50. Caffrey, A.K., et al., *IL-1alpha signaling is critical for leukocyte recruitment after pulmonary Aspergillus fumigatus challenge*. PLoS Pathog. **11**(1): p. e1004625.
51. Milora, K.A., et al., *Interleukin-1alpha released from HSV-1-infected keratinocytes acts as a functional alarmin in the skin*. Nat Commun. **5**: p. 5230.
52. Gross, O., et al., *Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1*. Immunity. **36**(3): p. 388-400.
53. Fetschschoss, A., et al., *Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression*. Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(44): p. 18055-60.
54. Liu, X., et al., *Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores*. Nature. **535**(7610): p. 153-8.
55. Graves, B.J., et al., *Structure of interleukin 1 alpha at 2.7-A resolution*. Biochemistry, 1990. **29**(11): p. 2679-84.
56. Carruth, L.M., S. Demczuk, and S.B. Mizel, *Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor*. J Biol Chem, 1991. **266**(19): p. 12162-7.
57. Kavita, U. and S.B. Mizel, *Differential sensitivity of interleukin-1 alpha and -beta precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27758-65.
58. Afonina, I.S., et al., *Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1alpha*. Mol Cell. **44**(2): p. 265-78.
59. Thornton, P., et al., *Platelet interleukin-1alpha drives cerebrovascular inflammation*. Blood. **115**(17): p. 3632-9.
60. Lugin, J., et al., *Cutting edge: IL-1alpha is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction*. J Immunol. **194**(2): p. 499-503.
61. Kamari, Y., et al., *Lack of interleukin-1alpha or interleukin-1beta inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice*. J Hepatol. **55**(5): p. 1086-94.
62. Sultan, M., et al., *Interleukin-1alpha and Interleukin-1beta play a central role in the pathogenesis of fulminant hepatic failure in mice*. PLoS One. **12**(9): p. e0184084.
63. Kandel-Kfir, M., et al., *Interleukin-1alpha deficiency attenuates endoplasmic reticulum stress-induced liver damage and CHOP expression in mice*. J Hepatol. **63**(4): p. 926-33.
64. Gehrke, N., et al., *Hepatocyte-specific deletion of IL1-RI attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation*. J Hepatol. **68**(5): p. 986-995.

65. Lin, D., et al., *Secreted IL-1alpha promotes T-cell activation and expansion of CD11b(+) Gr1(+) cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice*. Eur J Immunol. **45**(7): p. 2084-98.
66. Altmeier, S., et al., *IL-1 Coordinates the Neutrophil Response to C. albicans in the Oral Mucosa*. PLoS Pathog. **12**(9): p. e1005882.
67. Mayer-Barber, K.D., et al., *Innate and adaptive interferons suppress IL-1alpha and IL-1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection*. Immunity. **35**(6): p. 1023-34.
68. Neyt, K., et al., *Early IL-1 Signaling Promotes iBALT Induction after Influenza Virus Infection*. Front Immunol. **7**: p. 312.
69. Chatziandreou, N., et al., *Macrophage Death following Influenza Vaccination Initiates the Inflammatory Response that Promotes Dendritic Cell Function in the Draining Lymph Node*. Cell Rep. **18**(10): p. 2427-2440.
70. Voronov, E., et al., *IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice*. Int Immunol. **22**(4): p. 245-57.
71. Von Stebut, E., et al., *Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in Leishmania major-susceptible BALB/c mice*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 191-9.
72. Kautz-Neu, K., et al., *IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in Leishmania-resistant mice*. Exp Dermatol. **20**(1): p. 76-8.
73. Kim, J.M., et al., *Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to Toxoplasma gondii infection*. Parasitol Res, 2001. **87**(9): p. 758-63.
74. Biswas, A., et al., *Ly6C(high) monocytes control cerebral toxoplasmosis*. J Immunol. **194**(7): p. 3223-35.
75. Sinniah, R., L. Rui-Mei, and A. Kara, *Up-regulation of cytokines in glomerulonephritis associated with murine malaria infection*. Int J Exp Pathol, 1999. **80**(2): p. 87-95.
76. Griffith, J.W., et al., *Pure Hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5208-20.
77. World Health Organization, *World malaria report*, World Health Organization: Geneva, Switzerland. p. volumes.
78. White, N.J., *Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 172-3.
79. Tuteja, R., *Malaria - an overview*. FEBS J, 2007. **274**(18): p. 4670-9.
80. Sturm, A., et al., *Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids*. Science, 2006. **313**(5791): p. 1287-90.
81. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
82. Portugal, S., et al., *Host-mediated regulation of superinfection in malaria*. Nat Med. **17**(6): p. 732-7.
83. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-80.
84. Lyke, K.E., et al., *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, 2004. **72**(10): p. 5630-7.
85. Ochi, D.O., et al., *Differential regulation of beta-chemokines in children with Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4190-7.
86. Anstey, N.M., et al., *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. **184**(2): p. 557-67.

87. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 145-52.
88. Tilley, L., M.W. Dixon, and K. Kirk, *The Plasmodium falciparum-infected red blood cell*. Int J Biochem Cell Biol. **43**(6): p. 839-42.
89. De las Salas, B., et al., *Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of Plasmodium vivax isolates from Colombia*. Malar J. **12**: p. 347.
90. Lopes, S.C., et al., *Paucity of Plasmodium vivax mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential*. J Infect Dis. **209**(9): p. 1403-7.
91. Marin-Menendez, A., et al., *Rosetting in Plasmodium vivax: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia*. PLoS Negl Trop Dis. **7**(4): p. e2155.
92. Coban, C., M.S.J. Lee, and K.J. Ishii, *Tissue-specific immunopathology during malaria infection*. Nat Rev Immunol. **18**(4): p. 266-278.
93. Milner, D.A., Jr., et al., *The systemic pathology of cerebral malaria in African children*. Front Cell Infect Microbiol. **4**: p. 104.
94. Anstey, N.M., et al., *Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation*. J Infect Dis, 2007. **195**(4): p. 589-96.
95. Prommano, O., et al., *A quantitative ultrastructural study of the liver and the spleen in fatal falciparum malaria*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2005. **36**(6): p. 1359-70.
96. Fried, M. and P.E. Duffy, *Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta*. Science, 1996. **272**(5267): p. 1502-4.
97. Joshi, Y.K., et al., *Acute hepatic failure due to Plasmodium falciparum liver injury*. Liver, 1986. **6**(6): p. 357-60.
98. Kochar, D.K., et al., *Hepatocyte dysfunction and hepatic encephalopathy in Plasmodium falciparum malaria*. QJM, 2003. **96**(7): p. 505-12.
99. Rupani, A.B. and A.D. Amarapurkar, *Hepatic changes in fatal malaria: an emerging problem*. Ann Trop Med Parasitol, 2009. **103**(2): p. 119-27.
100. Fazil, A., et al., *Clinical profile and complication of malaria hepatopathy*. J Infect Public Health, 2013. **6**(5): p. 383-8.
101. Singh, H., et al., *Plasmodium vivax malaria: is it actually benign?* J Infect Public Health, 2011. **4**(2): p. 91-5.
102. Jain, A., R. Kaushik, and R.M. Kaushik, *Malarial hepatopathy: Clinical profile and association with other malarial complications*. Acta Trop, 2016. **159**: p. 95-105.
103. Martins, Y.C. and C.T. Daniel-Ribeiro, *A new hypothesis on the manifestation of cerebral malaria: the secret is in the liver*. Med Hypotheses, 2013. **81**(5): p. 777-83.
104. Cox, J., S. Semoff, and M. Hommel, *Plasmodium chabaudi: a rodent malaria model for in-vivo and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs*. Parasite Immunol, 1987. **9**(5): p. 543-61.
105. Falanga, P.B., et al., *Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by Plasmodium chabaudi and in immune-protected mice*. Eur J Immunol, 1987. **17**(5): p. 599-603.
106. Sardinha, L.R., M.R. D'Imperio Lima, and J.M. Alvarez, *Influence of the polyclonal activation induced by Plasmodium chabaudi on ongoing OVA-specific B- and T-cell responses*. Scand J Immunol, 2002. **56**(4): p. 408-16.
107. Langhorne, J., S.J. Quin, and L.A. Sanni, *Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology*. Chem Immunol, 2002. **80**: p. 204-28.
108. Su, Z. and M.M. Stevenson, *Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. Infect Immun, 2000. **68**(8): p. 4399-406.

109. Langhorne, J., et al., *Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection*. Immunol Rev, 2004. **201**: p. 35-47.
110. Helmbj, H., G. Jonsson, and M. Troye-Blomberg, *Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage Plasmodium chabaudi* AS. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1485-90.
111. Freitas do Rosario, A.P., et al., *Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to Plasmodium chabaudi* AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8344-55.
112. da Silva, H.B., et al., *IFN-gamma-induced priming maintains long-term strain-transcending immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi* malaria. J Immunol, 2013. **191**(10): p. 5160-9.
113. Engwerda, C., et al., *Experimental models of cerebral malaria*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **297**: p. 103-43.
114. Lovegrove, F.E., et al., *Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model*. PLoS Pathog, 2008. **4**(5): p. e1000068.
115. Neres, R., et al., *Pregnancy outcome and placenta pathology in Plasmodium berghei ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1608.
116. Brugat, T., et al., *Sequestration and histopathology in Plasmodium chabaudi* malaria are influenced by the immune response in an organ-specific manner. Cell Microbiol, 2014. **16**(5): p. 687-700.
117. Zuzarte-Luis, V., M.M. Mota, and A.M. Vigario, *Malaria infections: what and how can mice teach us*. J Immunol Methods, 2014. **410**: p. 113-22.
118. Scaccabarozzi, D., et al., *Differential induction of malaria liver pathology in mice infected with Plasmodium chabaudi* AS or *Plasmodium berghei* NK65. Malar J. **17**(1): p. 18.
119. Haque, A., et al., *High parasite burdens cause liver damage in mice following Plasmodium berghei* ANKA infection independently of CD8(+) T cell-mediated immune pathology. Infect Immun, 2011. **79**(5): p. 1882-8.
120. Oliveira-Lima, O.C., et al., *Mice lacking inducible nitric oxide synthase develop exacerbated hepatic inflammatory responses induced by Plasmodium berghei* NK65 infection. Microbes Infect, 2013. **15**(13): p. 903-10.
121. Fu, Y., et al., *Comparative histopathology of mice infected with the 17XL and 17XNL strains of Plasmodium yoelii*. J Parasitol, 2012. **98**(2): p. 310-5.
122. Dey, S., et al., *Impact of intravascular hemolysis in malaria on liver dysfunction: involvement of hepatic free heme overload, NF-kappaB activation, and neutrophil infiltration*. J Biol Chem. **287**(32): p. 26630-46.
123. Dey, S., et al., *Association of heme oxygenase 1 with the restoration of liver function after damage in murine malaria by Plasmodium yoelii*. Infect Immun. **82**(8): p. 3113-26.
124. Yoshimoto, T., et al., *A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain Plasmodium berghei* NK65 infection. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5500-5.
125. Oliveira-Lima, O.C., et al., *Mice lacking inducible nitric oxide synthase develop exacerbated hepatic inflammatory responses induced by Plasmodium berghei* NK65 infection. Microbes Infect. **15**(13): p. 903-10.
126. Adachi, K., et al., *Plasmodium berghei* infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5928-34.
127. Haque, A., et al., *High parasite burdens cause liver damage in mice following Plasmodium berghei* ANKA infection independently of CD8(+) T cell-mediated immune pathology. Infect Immun. **79**(5): p. 1882-8.

128. Medeiros, M.M., et al., *Liver accumulation of Plasmodium chabaudi-infected red blood cells and modulation of regulatory T cell and dendritic cell responses*. PLoS One. **8**(11): p. e81409.
129. Brugat, T., et al., *Sequestration and histopathology in Plasmodium chabaudi malaria are influenced by the immune response in an organ-specific manner*. Cell Microbiol. **16**(5): p. 687-700.
130. Deroost, K., et al., *Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the Plasmodium strain*. PLoS One. **9**(11): p. e113519.
131. Seixas, E., et al., *Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15837-42.
132. Mastelic, B., et al., *IL-22 Protects Against Liver Pathology and Lethality of an Experimental Blood-Stage Malaria Infection*. Front Immunol. **3**: p. 85.
133. Rocha, B.C., et al., *Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria*. Cell Rep. **13**(12): p. 2829-2841.
134. Cavinato, R.A., et al., *Susceptibility of the different developmental stages of the asexual (schizogonic) erythrocyte cycle of Plasmodium chabaudi chabaudi to hyperimmune serum, immunoglobulin (Ig)G1, IgG2a and F(ab')2 fragments*. Parasite Immunol, 2001. **23**(11): p. 587-97.
135. Podoba, J.E. and M.M. Stevenson, *CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS*. Infect Immun, 1991. **59**(1): p. 51-8.
136. Thoolen, B., et al., *Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system*. Toxicol Pathol. **38**(7 Suppl): p. 5S-81S.
137. Borges da Silva, H., et al., *In vivo approaches reveal a key role for DCs in CD4+ T cell activation and parasite clearance during the acute phase of experimental blood-stage malaria*. PLoS Pathog. **11**(2): p. e1004598.
138. Del Portillo, H.A., et al., *The role of the spleen in malaria*. Cell Microbiol. **14**(3): p. 343-55.
139. Liaskou, E., D.V. Wilson, and Y.H. Oo, *Innate immune cells in liver inflammation*. Mediators Inflamm. **2012**: p. 949157.
140. Ambade, A., et al., *Inhibition of heat shock protein (molecular weight 90 kDa) attenuates proinflammatory cytokines and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in mice*. Hepatology. **55**(5): p. 1585-95.
141. Muxel, S.M., et al., *The spleen CD4+ T cell response to blood-stage Plasmodium chabaudi malaria develops in two phases characterized by different properties*. PLoS One. **6**(7): p. e22434.
142. Singh, H., et al., *Plasmodium vivax malaria: is it actually benign?* J Infect Public Health. **4**(2): p. 91-5.
143. Fazil, A., et al., *Clinical profile and complication of malaria hepatopathy*. J Infect Public Health. **6**(5): p. 383-8.
144. Fu, Y., et al., *Comparative histopathology of mice infected with the 17XL and 17XNL strains of Plasmodium yoelii*. J Parasitol. **98**(2): p. 310-5.
145. Ataide, M.A., et al., *Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection*. PLoS Pathog. **10**(1): p. e1003885.
146. Choi, H.S., J.W. Kang, and S.M. Lee, *Melatonin attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of necroptosis*. Transl Res. **166**(3): p. 292-303.
147. Sanz-Garcia, C., et al., *Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2*. J Biol Chem. **288**(21): p. 15342-51.

148. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Front Immunol. **5**: p. 508.
149. Feintuch, C.M., et al., *Activated Neutrophils Are Associated with Pediatric Cerebral Malaria Vasculopathy in Malawian Children*. MBio. **7**(1): p. e01300-15.
150. Al-Salahy, M., et al., *Parasitaemia and Its Relation to Hematological Parameters and Liver Function among Patients Malaria in Abs, Hajjah, Northwest Yemen*. Interdiscip Perspect Infect Dis. **2016**: p. 5954394.
151. Sercundes, M.K., et al., *Correction: Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice*. PLoS Pathog. **13**(11): p. e1006730.
152. Mota, M.M., et al., *Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes adhere to CD36 and bind to microvascular endothelial cells in an organ-specific way*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4135-44.
153. Oldenburg, H.S., et al., *Cachexia and the acute-phase protein response in inflammation are regulated by interleukin-6*. Eur J Immunol, 1993. **23**(8): p. 1889-94.
154. Lee, P., et al., *Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 1906-10.