ARAMYS SILVA DOS REIS

**PAPEL DO INFLAMASSOMA NA IMUNOPATOGENESE
DA MALÁRIA GRAVE**

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

São Paulo
2016

ARAMYS SILVA DOS REIS

**PAPEL DO INFLAMASSOMA NA IMUNOPATOGÊNESE DA MALÁRIA
GRAVE**

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho

Versão Original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Reis, Aramys Silva dos
Papel do inflamassoma na imunopatogênese da
malária grave / Aramys Silva dos Reis; orientador
Claudio Romero Farias Marinho. -- São Paulo, 2016.
200 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasmodium. 2. Malária. 3. Malária
Placentária. 4. Síndrome Respiratória. 5.
Inflamassoma. I. Marinho, Claudio Romero Farias,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Aramys Silva dos Reis

Título da Tese: Papel do Inflamassoma na Imunopatogênese da Malária Grave

Orientador: Cláudio Romero Farias Marinho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado

() Reprovado

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **058** nas fls. **128** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Claudio Romero Farias Marinho**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel do inflamassoma na imunopatogênese da Malária Placentária*" do qual participam o(s) aluno(s) **Aramys Silva dos Reis** e os pesquisadores **Renato Barboza**, **Sabrina Epiphanyo**, **Karina Ramalho Bortolucci**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **04.06.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 05 de junho de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Este trabalho foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bolsa de Doutorado, Processo nº 2011/19048-8.

À minha família e à minha noiva.
De todas as coisas, vocês são as mais importantes.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre está ao meu lado. Por ser minha inspiração e meu refúgio.

Ao prof. Dr Cláudio Marinho, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa e pela orientação durante esses anos de doutorado. Obrigado por todo o conhecimento compartilhado, confiança, paciência e amizade. Todos os ensinamentos me permitiram um enorme crescimento pessoal e científico.

Aos meus queridos pais, Conceição e Nilson, por toda dedicação, compreensão e amor incondicional. Por compreenderem sonhos e decisões. Tudo que sou hoje é graças a vocês e é por vocês. Amo-os. Vocês são o meu tudo.

À minha querida irmã, Artemise, por toda amizade e afeição. Desejo-te tudo de melhor que o mundo pode oferecer. Sempre conte comigo.

Aos meus avós Luzia e Lili, e Raimunda (*in memoriam*) e Sabino (*in memoriam*). Vocês são meus exemplos, meus doutores. Obrigado por todo o carinho e conhecimento transmitido!

A todos os meus familiares que estiveram sempre presentes na minha vida. Agradeço todo o esforço nos momentos difíceis e também por todo o carinho.

À minha noiva e companheira Luecy por esses anos de convivência e cuidado. Pela paciência quanto estávamos distantes, pelo amor e amizade. Agradeço pela ajuda na elaboração da tese, correções, sugestões e até pelos experimentos que eu a obrigava a fazer quando vinha a São Paulo. Amo-te.

Ao prof Dr Renato Barboza por todo o ensinamento transmitido desde o início dessa jornada. Por toda a amizade e companheirismo dentro ou fora do laboratório.

Aos meus “colaboradores”... Minha “força tarefa”... Enfim, são várias denominações, mas a que melhor define é AMIGOS. Agradeço de todo coração a meus amigos/as, Flávia Lima, Oscar Murilo, Erika Machado, Rodrigo Medeiros, Luana Ortolan, Michelle Secundes, Carla Bandeira e Lígia Gonçalves pela ajuda para a finalização deste trabalho. Vocês são partes essenciais desta tese.

A todos os amigos que me aturaram durante esses anos de USP. Obrigados pela amizade, ricas discussões (científicas ou não), ajuda e momentos de descontração. São tantos e de diferentes laboratórios e institutos que correria o risco de esquecer algum. Mas não poderia deixar de citar meus companheiros de

laboratório (Jamille, Leandro, Keitty, Daniela, Douglas e Natércia) e de residência (Clovis, Fabrício, André “Grilo” e Alexandre “Alê”).

Aos professores Dra Sabrina Epiphany, Dra Karina Bortoluci, Dra Estela Bevilacqua, Dra Silvia Boscardin, Dra Regina Lima e Dr José Alvarez Mosig pelas colaborações, ajuda e ensinamentos.

Ao prof Dr Dario Zamboni pela doação dos camundongos NLRP3^{-/-}, AIM2^{-/-} e IL1R^{-/-}.

Aos funcionários do departamento de Parasitologia que, de muitas formas, contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos técnicos do Biotério, Daniela, Juliana, Luís e Anderson pela amizade e inestimável ajuda com os animais.

À profa Dra Flávia Nascimento pelas ótimas sugestões à redação final da tese, pela amizade, pela disponibilidade e por toda contribuição a minha formação científica.

Aos meus amigos pesquisadores do Laboratório de Imunofisiologia (UFMA-MA) que tanto contribuíram para minha formação enquanto pesquisador: Dra Flávia Amaral, Dra Silvana Libério, Dra Rosane Guerra, Dra Lucilene Amorim, Dra Ana Paula Azevedo, Dr Graciomar Costa, Dr Paulo Vitor, Anne Karine, Jollen Lopes, Thiare Fortes, Eder Magalhães, Mayara Cristina, Diego Arruda e tantos outros. Obrigado.

À Lucelya e ao Joaquim pela ótima estadia durante as idas e vindas a São Paulo e correções da tese.

Ao Álvaro Bezerra e à Ana Karlla pela amizade e toda a contribuição à edição da tese.

À FAPESP pela bolsa concedida e por todo o suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Ciências Biomédicas pela oportunidade de fazer parte do seu corpo discente, bem como pelo conhecimento gerado e adquirido dentro dessa instituição.

À todos que contribuíram para a realização desse trabalho e formação científica, muito obrigado.

*“Quem pretende dizer que um técnico, um médico, um engenheiro, **um cientista de qualquer categoria**, deve trabalhar com seus instrumentos, somente em seu ramo específico, enquanto seu povo morre de fome, ou se mata na luta, de fato tomou partido pelo outro lado. Não é apolítico, é político, porém contrário aos movimentos de libertação.”*

Ernesto Guevara de la Serna

RESUMO

REIS, A. S. **Papel do inflamassoma na imunopatogênese da malária grave.** 2016. 200 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e a malária placentária (MP) são complicações graves da malária. No entanto, possuem mecanismos imunopatogênicos pouco compreendidos. O objetivo deste trabalho é investigar o papel da via de sinalização TLR/MyD88 e dos inflamassomas na patogênese dessas duas complicações. Para avaliar o papel dessas vias de sinalização na progressão da SDRA, estabeleceu-se um modelo experimental, no qual camundongos C57Bl/6 infectados com *Plasmodium berghei* NK65, apresentaram alta taxa de mortalidade associada a lesão pulmonar, efusão pleural, aumento do Pehn e redução da frequência respiratória. Em adição, houve o aumento de citocinas pró-inflamatórias no pulmão e na cultura de esplenócitos de camundongos com SDRA. Em consonância com os resultados de IL-1 β , evidenciou-se a ativação de Caspase-1 em macrófagos pulmonares e esplênicos. A fim de confirmar a importância da Caspase-1 e da via MyD88 no desenvolvimento da SDRA, foram usados camundongos nocaute. Notavelmente, uma alta taxa de camundongos MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} não desenvolveu SDRA, indo a óbito devido ao quadro de anemia severa associada à hiperparasitemia. Posteriormente, demonstrou-se que, embora esse mecanismo dependa do inflamassoma AIM2, não depende dos inflamassomas NLRP3 e NLRC4 e do eixo IL1. Em uma segunda etapa do projeto, avaliou-se o papel da via de sinalização do TLR/MyD88 e dos inflamassomas na progressão da MP. A princípio, mostrou-se que as alterações placentárias e o baixo peso de recém-nascidos em gestantes infectadas com *Plasmodium falciparum* estão acompanhados do aumento de monócitos, de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e Caspase-1 ativa, na placenta. Além disso, foi demonstrado in vitro que eritrócitos infectados com *P. falciparum* induzem a ativação de Caspase-1 e a liberação de IL-1 β em linhagem de trofoblastos. Em complemento, mostrou-se um perfil similar, utilizando um modelo murino onde grávidas C57Bl/6 foram infectadas no 13º dia gestação, no qual se evidenciou alterações placentárias, aumento de abortos, baixo peso dos fetos, elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, aumento da expressão de genes das vias dos TLRs e NLRs e ativação da Caspase-1 em placentas de camundongos com MP. Cabe ressaltar que essas complicações são decorrentes da ativação das vias de sinalização TLR4/9/MyD88, mas não do TLR2. Ademais, evidenciou-se a participação dos inflamassomas NLRP3 e AIM2, porém não do NLRC4, nesse processo. Por fim, os dados obtidos sugerem que a ativação dessas vias culmina com a liberação de IL-1 β que, ao agir em seu receptor, inibe a expressão de transportadores de aminoácidos e glicose, com consequente disfunção do desenvolvimento do feto em camundongos grávidas com MP. Em conformidade com esses resultados, consegue-se prevenir as alterações na expressão de transportadores placentários de nutrientes e o baixo desenvolvimento fetal em camundongos grávidas infectadas e tratadas com Anakinra. Em conclusão, este trabalho traz uma grande contribuição para a compreensão da patogênese da malária grave e, apresenta, pela primeira vez, uma associação entre a ativação da via MyD88 e dos inflamassomas pelo plasmódio e a progressão da SDRA e MP.

Palavras-chave: *Plasmodium*. Malária. Malária Placentária. Síndrome Respiratória. Inflamassoma.

ABSTRACT

REIS, A. S. **Role of the inflammasome in the immunopathogenesis of severe malaria.** 2016. 200 p. Ph. D. thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) and placental malaria (PM) are severe complications of the malaria. However, the immunopathogenic mechanisms are poorly understood. The aim of this study is to investigate the role of the TLR/MyD88 signaling pathway and of the inflammasomes in the pathogenesis of both ARDS and MP. To assess the role of these signaling pathways in the ARDS progression, an experimental model was established in which C57Bl/6 mice infected with *Plasmodium berghei* NK65 had a high mortality rate associated with lung injury, pleural effusion, Pehn increase and reduction of respiratory rate. In addition, there was an increase proinflammatory cytokines in the lung and in the spleen cells culture of mice with ARDS. In agreement with the results of IL-1 β , the activation of Caspase-1 in pulmonary and splenic macrophages was shown. To confirm the importance of the Caspase-1 and MyD88 pathway in the ARDS development, knockout mice were used. Notably, a high rate of MyD88^{-/-} and Casp 1/11^{-/-} mice did not develop ARDS, leading to death due to severe anemia associated to hyperparasitemia. Subsequently, it was been shown that although such mechanism depends on the AIM2 inflammasome, it does not depend on the NLRP3 and NLRC4 inflammasomes and the IL-1 axis. In a second stage of the project, the role of the TLR/MyD88 signaling pathway and the inflammosomes in the PM progression were assessed. Initially, placental changes and low birth at weight in pregnant women infected with *Plasmodium falciparum* were shown to be accompanied by increased monocytes, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, and active Caspase-1 in the placenta. Furthermore, erythrocytes infected with *P. falciparum* were shown *in vitro* to induce the activation of the Caspase-1 and the release of IL-1 β in a trophoblast strain. Furthermore, a similar profile was shown by using a murine model where pregnant C57Bl/6 mice were infected on the 13th day of gestation, in which placental alterations, increased abortions, low fetal weight, high concentrations of pro-inflammatory cytokines, increased expression of TLR and NLR pathway genes, and activation of Caspase-1 in mice placentas with MP. It should be noted that those complications are due to the activation of the TLR4/9/MyD88 signaling pathways, but not the TLR2. In addition, the participation of the NLRP3 and AIM2 inflammosomes, but not the NLRC4 was shown in that process. Finally, the data suggest that the activation of these pathways culminates with the release of the IL-1 β which acts on its receptor inhibiting the amino acid expression and glucose transporters with a consequent dysfunction in the fetal development of pregnant mice with MP. In accordance to those results, it is possible to prevent changes in the expression of placental nutrient transporters and the low fetal development in infected and treated Anakinra pregnant mice. In conclusion, this work makes a great contribution to the understanding of the pathogenesis of severe malaria and it presents for the first time an association between the MyD88 pathway activation and inflammasomes by plasmodium and the progression of the ARDS and MP.

Keywords: *Plasmodium*. Malaria. Placental malaria. Respiratory syndrome. Inflammasome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de sinalização TLRs	26
Figura 2 – Composição estrutural dos inflamassomas.	30
Figura 3 – Mecanismos de ativação dos inflamassomas canônicos.	31
Figura 4 – Mecanismo de ativação do inflamassoma não canônico.....	38
Figura 5 – Incidência de malária no mundo no ano de 2014.	39
Figura 6 – Mapa de transmissão da malária no Brasil no ano de 2014.	40
Figura 7 – Ciclo de vida do plasmódio.....	42
Figura 8 – Mecanismos de ativação dos TLRs e dos inflamassomas pelo plasmódio.	44
Figura 9 – Componentes celulares envolvidos na patogênese da SDRA-AM.	54
Figura 10 – Possíveis mecanismos para a RCIU mediado pela resposta inflamatória na malária placentária.	59
Figura 11 – Camundongos C57Bl/6 (WT) infectados <i>P. berghei</i> NK65 apresentam alta taxa de mortalidade e baixa parasitemia.	72
Figura 12 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz SDRA-AM em camundongos C57Bl/6 (WT).....	74
Figura 13 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 altera parâmetros respiratórios em camundongos C57Bl/6 (WT).	75
Figura 14 – Pulmões de camundongos com SDRA-AM apresentam concentrações de citocinas pró-inflamatórias.....	77
Figura 15 – Esplenócitos de camundongos com SDRA-AM produzem elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias.....	79
Figura 16 – Camundongos com SDRA-AM apresentam elevadas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias.	80
Figura 17 – Caspase-1 está ativada em macrófagos esplênicos de camundongos com SDRA-AM.	82
Figura 18 – Caspase-1 está ativada em macrófagos pulmonares de camundongos com SDRA-AM.	83
Figura 19 – Letalidade precoce da infecção por <i>P. berghei</i> NK65 depende de MyD88 e Caspase-1.....	85
Figura 20 – Quadro clínico de camundongos com SDRA-AM depende de MyD88 e Caspase-1.....	86

Figura 21 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz anemia severa em camundongos deficientes de MyD88 e Casp1/11.....	87
Figura 22 – MyD88 e Caspase-1 estão envolvidas na produção de IL-1 β e IL-1 α por macrófagos estimulados com PAMPs do plasmódio.....	90
Figura 23 – Inflamassomas AIM2 e NLRP3 estão envolvidas na produção de IL-1 β e IL-1 α por macrófagos estimulados com PAMPs do plasmódio.	92
Figura 24 – Desenvolvimento de SDRA-AM em camundongos depende do inflamassoma AIM2.....	94
Figura 25 – Desenvolvimento de SDRA-AM em camundongos independe do IL1R.	96
Figura 26 – Protocolo experimental do modelo de malária placentária.	115
Figura 27 – Infecção por <i>P. falciparum</i> causa alterações placentárias.....	121
Figura 28 – Mulheres com infecção ativa por <i>P. falciparum</i> apresentam baixo peso dos fetos, das placentas e aumento de infiltrado inflamatório.	122
Figura 29 – Gestantes com infecção ativa por <i>P. falciparum</i> apresentam altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias no sangue placentário.	123
Figura 30 – Caspase-1 está ativada na placenta de mulheres infectadas com <i>P. falciparum</i>	124
Figura 31 – Caspase-1 é ativada em células trofoblásticas na presença de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i>	126
Figura 32 – <i>P. berghei</i> NK65 adere ao tecido placentário via CSA.	128
Figura 33 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz malária placentária em camundongos C57Bl/6.....	129
Figura 34 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz baixo peso ao nascer e abortos.	130
Figura 35 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz baixa expressão placentária de transportadores de nutrientes.....	131
Figura 36 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 induz aumento de citocinas pró-inflamatórias na placenta e no sangue.....	133
Figura 37 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 modula a expressão de genes da via TLR em placentas de camundongos.....	134
Figura 38 – Vias de sinalização dos Receptores do Tipo Toll.	136
Figura 39 – Eritrócitos parasitados com <i>P. berghei</i> NK65 são reconhecidos por TLR2, TLR4 e TLR9.	138

Figura 40 – TLR4 e TLR9 são importantes para o desenvolvimento da malária placentária em camundongos.	139
Figura 41 – TLR4 contribuem para a suscetibilidade de grávidas à infecção por <i>P. berghei</i> NK65.	140
Figura 42 – MyD88 e TRIF/TICAM são importantes para o desenvolvimento da malária placentária em camundongos.....	141
Figura 43 – MyD88 e TRIF não contribuem para a suscetibilidade de grávidas à infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	142
Figura 44 – Infecção por <i>P. berghei</i> NK65 modula a expressão de genes da via NLR em placentas de camundongos.....	143
Figura 45 – Vias de sinalização dos Receptores do Tipo NOD.	144
Figura 46 – Caspase-1 está ativada na placenta de camundongos com malária placentária.....	145
Figura 47 – MyD88 e Caspase-1 são importantes para o desenvolvimento da malária placentária em camundongos.....	147
Figura 48 – MyD88 e Caspase-1 não contribuem para a suscetibilidade de grávidas à infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	148
Figura 49 – MyD88 e Caspase-1 são importantes para o desenvolvimento da malária placentária em camundongos.....	150
Figura 50 – Receptor AIM2 contribui para a suscetibilidade de grávidas à infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	151
Figura 51 – Receptor para IL-1 contribui para redução do desenvolvimento fetal em camundongos com malária placentária.....	153
Figura 52 – Receptor para IL-1 contribui para a baixa expressão de mRNA de transportadores de nutrientes em camundongos com malária placentária.	155
Figura 53 – Receptor para IL-1 não contribuem para a suscetibilidade de grávidas à infecção por <i>P. berghei</i> NK65.....	156
Figura 54 – Mecanismo proposto para a RCIU mediado pelos TLRs e pelos inflamassomas durante malária placentária.	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Manifestações clínicas da malária grave.	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido Colomínico
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
ANG-1	Angiopoetina 1
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BPN	Baixo peso ao nascer
cAMP	AMP cíclico
CARD	<i>Caspase activating and recruitment domain</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COX-2	Ciclooxygenase 2
CREB	<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>
CSA	<i>Chondroitin sulfate A</i>
CSB	<i>Chondroitin sulfate B</i>
D0	Dia Zero
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
EnP	Eritrócitos não Parasitados
EP	Eritrócitos Parasitados
FIIND	<i>Function to find domain</i>
FiO ₂	Fração de oxigênio inspirado
FR	Frequência Respiratória
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GIPL	Glicoinositolfosfolipideo
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H&E	Hematoxilina e eosina
HMGB1	<i>High mobility group box 1 protein</i>
HSP	<i>Heat shock proteins</i>
Hz	Hemozoina
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>

IFN- γ	Interferon gama
IGF	<i>Insulin-like growth factors</i>
IL	Interleucina
IL-18BP	<i>IL-18 binding protein</i>
IL-1Ra	<i>IL-1 receptor antagonista</i>
IL-1RI	<i>IL-1 receptor I</i>
IRAKs	<i>IL-1R-associated kinases</i>
IRF	<i>Interferon-regulatory factor</i>
JNK	<i>JUN N-terminal kinase</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
MAL	<i>MyD88-adaptor-like</i>
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MD2	<i>Myeloid differentiation</i>
MDP	Muramil dipeptideo
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLR	<i>Nod-like receptors</i>
NOS-2	<i>Nitric oxide sintase 2</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
oxPAPC	Oxidados derivados de palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina
P2X7	<i>P2X purinoceptor 7</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PaO ₂	Pressão de oxigênio parcial

Penh	Pausa respiratória
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>P. falciparum erythrocyte membrane protein-1</i>
PGE ₂	Prostaglandina E
PGLC	<i>Proteoglycolipid complex</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PYD	<i>Pyrin domain</i>
RCIU	Restrição do crescimento intrauterino
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SDRA-AM	Síndrome do desconforto respiratório agudo associada à Malária
SFB	Soro Fetal Bovino
SLC38A	Gene que codifica SNAT
SNAT	<i>System A transporters</i>
T3SS	Type III secretion systems
T4SS	<i>Type III secretion systems</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR-containing adaptor protein,</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factors</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial cell growth factor</i>
WT	<i>Wild type</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
-/-	Nocauté
®	Marca registrada
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µL/mL	Microlitro por mililitro
µM	Micromolar
CO ₂	Dioxido de carbono
g	gramas
h	horas
K	Potássio
mg/Kg	miligrama por quilograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	milímetros de mercúrio
N ₂	Gás nitrogênio
ng	nanograma
O ₂	Gás oxigênio
°C	Graus Celsius
pg/mg	picograma por mililitro
pg/mL	picograma por mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
v/v	volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2.1	CAPÍTULO 1 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1.1	Resposta imune inata a patógenos	25
2.1.1.1	<i>Receptores do tipo Toll</i>	<i>25</i>
2.1.1.2	<i>Inflamassoma</i>	<i>29</i>
2.1.2	Características gerais e epidemiologia da Malária.....	39
2.1.3	Sensores inatos do plasmódio	42
2.1.4	Patogênese da malária não complicada	47
2.1.5	Patogênese da malária grave	48
2.5.1.1	<i>Síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária</i>	<i>52</i>
2.5.1.2	<i>Malária placentária</i>	<i>56</i>
3.2	CAPÍTULO 2 PAPEL DO INFLAMASSOMA NA SDRA ASSOCIADA À MALÁRIA.....	61
3.2.1	Introdução.....	61
3.2.2	Objetivos	62
3.2.3	Material e Métodos	63
3.2.3.1	<i>Animais</i>	<i>63</i>
3.2.3.2	<i>Parasitos e infecção</i>	<i>64</i>
3.2.3.3	<i>Acompanhamento da parasitemia, mortalidade e sinais clínicos de SRDA.....</i>	<i>64</i>
3.2.3.4	<i>Eutanásia dos camundongos</i>	<i>65</i>
3.2.3.5	<i>Necropsia e análise histopatológica</i>	<i>65</i>
3.2.3.6	<i>Avaliação da função pulmonar</i>	<i>65</i>
3.2.3.7	<i>Ensaio de permeabilidade vascular pulmonar e edema.....</i>	<i>66</i>
3.2.3.8	<i>Obtenção de células esplênicas.....</i>	<i>66</i>
3.2.3.9	<i>Obtenção de células do tecido pulmonar</i>	<i>66</i>
3.2.3.10	<i>Extração proteica do tecido pulmonar</i>	<i>67</i>
3.2.3.11	<i>Cultura de células esplênicas.....</i>	<i>67</i>
3.2.3.12	<i>Imunofenotipagem e marcação de Caspase-1 ativa</i>	<i>67</i>
3.2.3.13	<i>Sincronização e enriquecimento dos eritrócitos parasitados.....</i>	<i>68</i>
3.2.3.14	<i>Obtenção de extrato de eritrócitos parasitados com P. berghei NK65.....</i>	<i>68</i>
3.2.3.15	<i>Obtenção de DNA de P. berghei NK65.....</i>	<i>68</i>
3.2.3.16	<i>Obtenção de macrófagos peritoneais.....</i>	<i>69</i>
3.2.3.17	<i>Ensaio de ativação de macrófagos</i>	<i>69</i>

3.2.3.18	Quantificação de citocinas	70
3.2.3.19	Parâmetros hematológicos.....	70
3.2.3.20	Análise Estatística	70
3.2.4	Resultados	71
3.2.4.1	Camundongos C57Bl/6 infectados com <i>P. berghei</i> NK65 apresentam alta mortalidade e baixa parasitemia associadas ao desenvolvimento de SDRA-AM... ..	71
3.2.4.2	Camundongos C57Bl/6 infectados com <i>P. berghei</i> NK65 apresentam alterações na função pulmonar	75
3.2.4.3	Citocinas pró-inflamatórias estão elevadas em camundongos C57Bl/6 com SDRA-AM.....	76
3.2.4.4	Caspase-1 está ativada em macrófagos esplênicos e pulmonares de camundongos C57Bl/6 com SDRA-AM.....	80
3.2.4.5	Desenvolvimento de SDRA-AM em camundongos C57Bl/6 é dependente de MyD88 e Caspase-1	83
3.2.4.6	<i>P. berghei</i> NK65 e seus PAMPs induz secreção de IL-1 β e IL-1 α por macrófagos peritoneais, por um mecanismo dependente de MyD88 e Caspase-1 ..	88
3.2.4.7	<i>P. berghei</i> NK65 e seus PAMPs induz secreção de IL-1 β e IL-1 α por macrófagos peritoneais, por um mecanismo dependente dos inflamassomas NLRP3 e AIM2	90
3.2.4.8	O desenvolvimento de SDRA-AM em camundongos C57Bl/6 é dependente do inflamassoma AIM2	93
3.2.4.9	Receptor de IL-1 não contribui para o desenvolvimento de SDRA-AM	95
3.2.5	Discussão	97
3.2.6	Conclusão.....	102
4.3	CAPÍTULO 3 PAPEL DO INFLAMASSOMA NA MALÁRIA PLACENTÁRIA.....	104
4.3.1	Introdução.....	104
4.3.2	Objetivos	106
4.3.3	Material e Métodos	106
4.3.3.1	Gestantes incluídas.....	106
4.3.3.2	Coleta das amostras biológicas humanas.....	107
4.3.3.3	Análise histopatológica das placentas humanas	107
4.3.3.4	Imuno-histoquímica das placentas humanas	108
4.3.3.5	Obtenção de extrato de eritrócitos parasitados com <i>P. falciparum</i>	108
4.3.3.6	Ensaio de ativação de trofoblastos humanos <i>in vitro</i>	109
4.3.3.7	Marcação de Caspase-1	109
4.3.3.8	Animais	110

4.3.3.9	<i>Sincronização e enriquecimento dos eritrócitos parasitados P. berghei NK65</i>	110
4.3.3.10	<i>Ensaio de inibição de citoaderência</i>	111
4.3.3.11	<i>Ensaio de NF-kB luciferase</i>	112
4.3.3.12	<i>Monitoramento da gravidez em camundongos</i>	113
4.3.3.13	<i>Parasitas e infecção</i>	114
4.3.3.14	<i>Tratamento de grávidas com antagonista do receptor de IL-1</i>	114
4.3.3.15	<i>Determinação da parasitemia</i>	115
4.3.3.16	<i>Coleta e processamento das placentas de camundongos</i>	116
4.3.3.17	<i>Análise morfométrica</i>	116
4.3.3.18	<i>Análise da expressão gênica via qRT-PCR</i>	116
4.3.3.19	<i>Western blot para Caspase-1</i>	117
4.3.3.20	<i>Extração proteica da placenta para dosagem de citocinas</i>	118
4.3.3.21	<i>Quantificação de citocinas</i>	118
4.3.3.22	<i>Análise Estatística</i>	119
4.3.4	Resultados	119
4.3.4.1	<i>Mulheres grávidas infectadas com P. falciparum apresentam aumento de citocinas pró-inflamatórias e Caspase-1 ativa na placenta</i>	119
4.3.4.2	<i>Caspase-1 está ativada em células BeWo estimuladas por eritrócitos parasitados com P. falciparum.</i>	125
4.3.4.3	<i>Infecção por P. berghei NK65 induz desenvolvimento de malária placentária em camundongos C57Bl/6.</i>	127
4.3.4.4	<i>Placentas de camundongos com malária placentária têm baixa expressão de transportadores de nutrientes</i>	131
4.3.4.5	<i>Malária placentária experimental está associada a aumento, local e sistêmico, de citocinas pró-inflamatórias</i>	132
4.3.4.6	<i>Eritrócitos parasitados com P. berghei NK65 regulam e ativam a via de sinalização dos TLRs</i>	133
4.3.4.7	<i>Desenvolvimento de malária placentária é decorrente das vias de sinalização TLR4 e TLR9</i>	138
4.3.4.8	<i>Caspase-1 é regulada e ativada durante infecção por P. berghei NK65..</i>	142
4.3.4.9	<i>Desenvolvimento de malária placentária é decorrente de Caspase-1</i>	146
4.3.4.10	<i>Desenvolvimento da malária placentária é decorrente da ativação do inflamassoma</i>	149
4.3.4.11	<i>O eixo IL-1 contribui para o baixo peso dos fetos de grávidas com malária placentária.</i>	152

4.3.4.12	<i>Receptor para IL-1 é importante para expressão de transportadores de nutrientes</i>	153
4.3.5	Discussão	157
4.3.6	Conclusões	166
5	CONCLUSÕES GERAIS	168
	REFERÊNCIAS	169

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária de grande importância clínico-epidemiológica, cujas características clínicas variam de sintomas inespecíficos, especialmente febre, a formas mais graves, com o comprometimento de órgãos vitais que podem levar à morte (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2015a). A evolução para a malária grave depende de diversos fatores, especialmente da espécie e densidade de parasitas circulantes, bem como do estado imunológico e vulnerabilidade do hospedeiro. O agravamento da infecção é bastante prevalente em indivíduos primo-infectados, gestantes e crianças menores de cinco anos, nos quais pode acarretar quadros de malária cerebral, disfunção pulmonar, falência renal aguda, anemia severa e/ou hemorragia, malária placentária e outros (GOMES et al., 2011; TRAMPUZ et al., 2003).

Apesar do avanço realizado pelos estudos voltados à compreensão da patogênese da malária grave, muitos mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados. Contudo, uma característica marcante para o desenvolvimento desse quadro reside no sequestro do parasito em tecidos específicos, propiciando um intenso processo inflamatório local.

Sabe-se que algumas moléculas derivadas da infecção por *Plasmodium spp*, agente etiológico da malária, como o glicosilfostatilinosil e hemozoína, ácido urico e DNA genômico, podem ser reconhecidas por receptores do tipo Toll e receptores dos inflamassomas, ativando essas vias e desencadeando uma resposta inflamatória. Apesar de alguns estudos sugerirem a participação desses vias de sinalização na malária cerebral, ainda não foi mostrado se esses receptores estão envolvidos em outras complicações associadas à malária, tão graves quanto, e quais os mecanismos envolvidos (GAZZINELLI et al., 2014).

Assim, esta pesquisa investigou o papel do inflamassoma e dos receptores do tipo Toll (sinal primário de ativação do inflamassoma) na patogênese da lesão pulmonar aguda associada à malária e à malária placentária, utilizando dois modelos murinos específicos para cada uma das complicações.

2.1 CAPÍTULO 1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Resposta imune inata a patógenos

Receptores para padrões moleculares (PRR, do inglês *pattern recognition receptors*) desempenham um papel crítico na detecção de patógenos e ativação da resposta imune inata. São exemplos, os receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) e os receptores do tipo Nod (NLR, do inglês *Nod-like receptors*). Estas duas importantes famílias de receptores estão envolvidas no reconhecimento e na ativação de respostas inflamatórias diante de diferentes parasitos.

Esses receptores podem ser ativados por uma grande quantidade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) ou padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*). Os PAMPs são componentes microbianos altamente conservados evolutivamente, a exemplo do lipopolissacarídeo (LPS); flagelina; ácido lipoteicoico, hemozoína e outros. Já os DAMPs são moléculas importantes para as funções fisiológicas normais que, devido a algum agente indutor, seja infeccioso ou não, têm seus níveis alterados; incluindo ATP, HMGB1, (do inglês *high mobility group box 1 protein*), proteínas do choque térmico (HSP, do inglês, *heat shock proteins*), proteínas do complemento, ácido úrico e outros (TANG et al., 2012).

2.1.1.1 Receptores do tipo Toll

Os TLRs são proteínas transmembranas do tipo I, caracterizadas por um domínio extracelular contendo repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *leucine-rich repeat*), responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, e uma porção intracelular semelhante a do receptor de IL-1 (TIR, do inglês *Toll/IL-1 receptor*) (PASARE; MEDZHITOV, 2005). O LRR confere um código único para cada TLR, permitindo sua interação com ligantes específicos.

Atualmente já foram identificados treze membros desta família de receptores em mamíferos, sendo dez em humanos (TLR1 – TLR10) e doze em camundongos (TLR1 – TLR9 e TLR11 – TLR13) (GAY; GANGLOFF, 2007). Destes, seis (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) são extracelulares, localizados na superfície da membrana plasmática da célula, e sete (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e

TLR13) são intracelulares, presentes na membrana de endossomos (KAWASAKI; KAWAI, 2014; O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013) (**Figura 1**).

Figura 1 – Vias de sinalização TLRs

Nature Reviews | Immunology

Esquema mostrando os principais ligantes e cascatas de sinalização dos receptores TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9, TLR11 e TLR13. A estimulação desses receptores culmina com a ativação de diferentes fatores de transcrição nucleares, incluindo CREB, AP1, NF-κB, IRF3 e IRF7 e, por conseguinte, a expressão de moléculas inflamatórias. Fonte: Adaptada de O'Neill; Golenbock e Bowie (2013)

Cada TLR responde individual e especificamente a um limitado número de diferentes ligantes. Porém, coletivamente, a família TLR pode responder a uma variedade de moléculas associadas a bactérias, vírus, fungos, parasitas contribuindo para a montagem da resposta imunológica do hospedeiro.

O primeiro TLR identificado em humanos e o mais bem estudado é o TLR4 que possui como principal LPS de bactérias Gram-negativas (JANEWAY; MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT, 1997; POLTORAK et al., 1998). Contudo, a

interação do LPS com o TLR4 não ocorre de forma direta. Inicialmente é necessária a conjugação do LPS com a proteína de fase aguda, LBP (do inglês *lipopolysaccharide binding protein*); a proteína MD2 (do inglês *myeloid differentiation*) e o CD14 (do inglês, *cluster of differentiation 14*), para, então, ocorrer o reconhecimento e a sinalização pelo TLR4. (KIRKLAND et al., 1993; SHIMAZU et al., 1999). No entanto, não se trata de um mecanismo exclusivo do LPS. Tem sido mostrado que PAMPs de protozoários, tais como os glicoconjugados PGLC (do inglês *proteoglycolipid complex*) de *Leishmania* e GIPL (do inglês *glycoinositolphospholipids*) de *Trypanosoma cruzi* também dependem de MD2 e CD14 para ativarem o TLR4 (OLIVEIRA et al., 2004; WHITAKER et al., 2008). Esse receptor está constitutivamente expresso em monócitos/macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, trofoblastos e outras, sendo relevante para a resposta inflamatória (ABRAHAMS; MOR, 2005; GUILLOTT et al., 2004; VAURE; LIU, 2014).

Apontado, dentre os TLRs identificados, como o que possui maior especificidade, o TLR2 classicamente pode não só reconhecer lipoproteínas bacterianas, ácido lipoteicoico e peptideoglicano de bactérias Gram-positivas, bem como o polissacarídeo de parede celular fúngica, zimosan (LIN et al., 2000; SCHWANDNER et al., 1999; YOSHIMURA et al., 1999). O reconhecimento desses produtos microbianos pelo TLR2 depende da formação de heterodímeros com TLR1 ou TLR6, e, provavelmente, com TLR10 (DOWLING; MANSELL, 2016). Âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *T. cruzi* e lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* também podem ser reconhecidos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (BECKER et al., 2003; CAMPOS et al., 2001).

O TLR5 é conhecido por reconhecer flagelina, uma proteína de bactérias flageladas e os TLR3, TLR7 e TLR8 são hábeis em interagir com ácidos nucleicos microbianos. Enquanto os TLR7 e TLR8, receptores estruturalmente relacionados, podem ser estimulados por RNA de fita simples, o TLR3 reconhece RNA de fita dupla; ambos são frequentemente associados a infecções virais (ALEXOPOULOU et al., 2001; HEIL et al., 2003). O TLR9 está envolvido no reconhecimento da região CpG de DNA de bactérias, vírus e protozoários, com consequente indução de resposta pró-inflamatória (ASHKAR; ROSENTHAL, 2002; BARTHOLOMEU et al., 2008; COBAN et al., 2005; WU et al., 2006).

Até então, pouco se sabia a respeito dos ligantes para TLR11, TLR12 e TLR13. Entretanto, alguns estudos mostraram que os TLR11 e TLR12 podem

reconhecer profilina de *Toxoplasma gondii* e o TLR13 é apontado como sensor de RNA bacteriano (ANDRADE et al., 2013; KOBLANSKY et al., 2013; OLDENBURG et al., 2012). Além disto, Zhang et al., (2004) têm sugerido que TLR11 também se mostra importante para o controle de infecção por bactérias uropatogênicas.

A interação de padrões moleculares com os TLRs resulta na ativação de vias de sinalização que induzem a regulação positiva de citocinas, quimiocinas e moléculas coestimuladoras. Em suma, a sinalização é iniciada por uma dimerização do domínio TIR do TLR com proteínas adaptadoras contendo domínio TIR, tais como a proteína 88 de diferenciação mieloide (MyD88, do inglês *myeloid differentiation primary response protein 88*); a proteína adaptadora contendo TIR (TIRAP, do inglês *TIR-containing adaptor protein*, também conhecida como MAL [do inglês, *MyD88-adaptor-like*]); o adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon β (TRIF, do inglês *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β*) e a molécula do adaptador relacionado a TRIF (TRAM, do inglês *TRIF-related adaptor molecule*) (AKIRA; YAMAMOTO; TAKEDA, 2003). Destas, a proteína adaptadora MyD88 possui uma posição de destaque, pois, com exceção do TLR3, interage com todos os demais TLRs. Particularmente, após sua ativação, o TLR3 recruta a molécula adaptadora TRIF, continuando a cascata de sinalização. Além da MyD88, o TLR4 pode interagir com a TRIF, sendo necessária a participação da proteína TRAM. Diferente dos outros TLRs, o recrutamento de MyD88 após a ativação dos TLR2 e TLR4 necessita, impreterivelmente, da interação com a proteína TIRAP (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013; PANDEY; AGRAWAL, 2006).

O acoplamento das moléculas adaptadoras estimula uma sequência de vias de sinalização que envolve a interação de quinases associadas a IL1R (IRAKs, do inglês *IL1R-associated kinases*) e fatores associados ao receptor do TNF (TRAF, do inglês *TNF receptor-associated factors*). Estes estimulam proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *mitogen-activated protein kinases*), JUN N-terminal quinase (JNK, do inglês *JUN N-terminal kinase*) e p38 que conduzem a ativação de fatores de transcrição, a exemplo do NF- κ B e do fator regulador de interferon (IRF, do inglês *Interferon-regulatory factor*); proteínas chave na via de sinalização dos TLRs.

Outros fatores de transcrição, como a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB, do inglês *cyclic AMP-responsive element-binding protein*) e a proteína ativadora-1 (AP-1, do inglês *activator protein 1*), também são ativadas.

Esse processo leva à indução de proteínas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-8 e IL-6, interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β), entre outras (TAKEDA; AKIRA, 2005; WARNER; NUNEZ, 2013).

2.1.1.2 *Inflamassoma*

Inflamassomas são complexos multiproteicos ativados em resposta a diversos PAMPs e DAMPs, e responsáveis por controlarem vários aspectos da resposta inflamatória, inclusive a ativação e a secreção de importantes citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18 e a regulação da piroptose, um tipo de morte celular programada associada à inflamação. Esses complexos são geralmente montados no citoplasma de células imunes inatas, porém podem ser ativados em outros tipos celulares como queratinócitos, trofoblastos e células epiteliais (ABRAHAMS, 2011; PEETERS et al., 2015; SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Frequentemente, os inflamassomas são formados por um receptor para moléculas microbianas ou sinais de estresse; uma proteína adaptadora e uma caspase inflamatória (**Figura 2**). O receptor determina a especificidade e a denominação do inflamassoma, sendo comumente, membro da família NLR (GEDDES; MAGALHÃES; GIRARDIN, 2009; MARTINON et al., 2007). Entretanto, também tem sido descrito inflamassomas que não contêm NLRs, a exemplo do formado pelo receptor AIM2 (inglês *absent in melanoma 2*), um membro da família PYHIN (que contém os domínios pyrin e HIN) (HORNUNG et al., 2009).

Figura 2 – Composição estrutural dos inflamassomas.

Esquema mostrando os componentes dos inflamassomas NLRP1, NLRP3, NLRP12, NLRC4 e AIM2.
Fonte: Adaptada de Schroder e Tschopp, (2010)

Os membros da família NLR são caracterizados estruturalmente por um domínio central de ligação a nucleotídeos e oligomerização (NACHT); uma região C-terminal com domínio LRR, que funciona como detector de ligantes e uma região N-terminal, com variações de acordo com a subfamília, e requerida, no caso dos inflamassomas, para o recrutamento, direto ou indireto da pró-Caspase-1 (GEDDES; MAGALHÃES; GIRARDIN, 2009) (**Figura 3**).

Figura 3 – Mecanismos de ativação dos inflamassomas canônicos.

Esquema mostrando os principais ligantes e cascatas de sinalização dos inflamassomas NLRP1B, NLRP3, NLRC4 e AIM2. A estimulação dos respectivos receptores culmina com a clivagem da pró-Caspase-1 em sua forma ativa e, por conseguinte, liberação de IL-1 β e indução de piroptose. Fonte: Adaptada de Broz e Dixit (2016)

Sendo o primeiro NLR a ser mostrado compondo um inflamassoma, o NLRP1 contém, além de NACHT e LRR, um domínio FIIND (do inglês, *function to find domain*), que sofre um autoprocessamento, aparentemente necessário para que o NLRP1 torne-se responsivo a seus ligantes (FINGER et al., 2012).

Além disso, o NLRP1 possui na porção C-terminal, um domínio de recrutamento e ativação de caspase (CARD, do inglês *caspase activating and recruitment domain*) e na porção N-terminal um domínio pyrin (PYD, do inglês *pyrin domain*) (CHAVARRÍA-SMITH; VANCE, 2015). Ao contrário do NLRP1 humano, os seus ortólogos murinos (Nlrp1a, b, c) não tem um domínio PYD funcional. O domínio CARD pode interagir diretamente com a pró-Caspase-1, sem a necessidade de recrutamento da molécula adaptadora ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*). Entretanto, a concomitante interação do domínio PYD com ASC pode potencializar a atividade do inflamassoma NLRP1 humano (FAUSTIN et al., 2007). Tem sido mostrado que esse inflamassoma é responsivo à toxina letal do *Bacillus anthracis* (BOYDEN; DIETRICH, 2006), participa como mecanismo de resistência à infecção por *T. gondii* (CIRELLI et al., 2014), além de ser sugerida sua ativação mediada pelo fragmento de peptidoglicano bacteriano, muramil dipeptideo (MDP) (FAUSTIN et al., 2007).

O inflamassoma NLRP3, atualmente o mais bem estudado de todos os inflamassomas, é formado por um NLR de mesmo nome, um adaptador ASC e Caspase-1. Após o reconhecimento do ligante, há uma interação entre o domínio PYD do receptor NLRP3 e o domínio PYD do adaptador ASC, que, por sua vez, recruta a pró-Caspase-1 através de uma ligação CARD-CARD formando o complexo proteico (JIN; FLAVELL, 2010). Vários PAMPs, DAMPs e agentes ambientais tais como toxinas bacterianas formadoras de poros, a exemplo de nigericina *Streptomyces hygroscopicus*, listeriolisina de *Listeria monocytogenes* e estreptolisina de *Streptococcus pyogenes* (HARDER et al., 2009; MARIATHASAN et al., 2006); cristais de ácido úrico (MARTINON et al., 2006); sílica, amianto e sais de alumínio (DOSTERT et al., 2008; HORNUNG et al., 2008) e fibrilas de β -amiloide (HALLE et al., 2008) têm sido implicados na ativação desse inflamassoma.

A despeito da grande quantidade de estudo referente a essa plataforma proteica, os mecanismos que provocam a ativação do inflamassoma NLRP3 ainda não foram bem esclarecidos. A distinta e numerosa quantidade de ativadores sugere vias compartilhadas envolvidas na oligomerização do NLRP3 e consequente ativação do inflamassoma. Nesse contexto, têm sido propostos três modelos de ativação do inflamassoma NLRP3: efluxo de íons, especialmente K^+ ; geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*); e desestabilização da membrana lisossomal (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013). O exato

mecanismo dessas vias ainda não está claro, porém, tem sido mostrado que a ativação do inflamassoma NLRP3 por diferentes moléculas depende de, pelo menos, uma dessas vias (JIN; FLAVELL, 2010).

A título de exemplo, a ativação do NLRP3 por ATP extracelular tem sido associada à abertura do canal iônico panexina-1, mediada pela interação do ATP com seu receptor purinérgico P2X7, desencadeando efluxo de K^+ (KAHLENBERG; DUBYAK, 2004; KANNEGANTI et al., 2007). Esse mecanismo também é compartilhado por toxinas formadoras de poros, como nigericina (MARIATHASAN et al., 2006). Em adição, tem sido mostrado que os protozoários intracelulares *Leishmania* sp e *T. cruzi* podem ativar o inflamassoma NLRP3 por mecanismo dependente da enzima lisossomal catepsina B, liberada no citosol após um provável dano à membrana fagolisossomal causado pelos parasitos (GONÇALVES et al., 2013; LIMA-JUNIOR et al., 2013; SILVA et al., 2013). O estudo sugere que o efluxo de K^+ também é importante para ativação do inflamassoma NLRP3 induzida por *L. amazonensis* (LIMA-JUNIOR et al., 2013), porém, ainda é controversa a participação de canais de potássio e geração de ROS na estimulação induzida por *T. cruzi* (GONÇALVES et al., 2013; SILVA et al., 2013). Apesar de importante no controle de diferentes infecções, a ativação do inflamassoma NLRP3 também está associada à progressão de doenças inflamatórias como síndrome de Muckle-Wells, síndrome autoinflamatória familiar ao frio, gota e doença de Alzheimer (BAUERNFEIND et al., 2011).

Similar ao receptor NLRP3, o NLRP12 necessita interagir com o adaptador ASC para recrutar a pró-Caspase-1, formando o inflamassoma. Embora o papel do NLRP12 na resposta imune inata ainda não esteja definido, têm sido sugeridas funções tanto inflamatórias, quanto inibitórias, sobretudo regulando negativamente a via sinalização NF- κ B (ALLEN et al., 2012; WANG et al., 2002). Por extensão, as mutações no gene *NLRP12* têm sido vinculadas a doenças inflamatórias hereditárias (JERU et al., 2008) e à resistência à infecção pela bactéria *Yersinia pestis* (VLADIMER et al., 2012).

Diferente dos receptores da subfamília NLRP, o NLRC4 possui um domínio CARD na sua porção N-terminal ao invés de um domínio PYD, que permite uma interação direta com a região CARD da pró-Caspase-1 e a formação do inflamassoma. Apesar de dispensável, a interação adicional com o adaptador ASC potencializa a ativação da Caspase-1 (MARIATHASAN et al., 2004; SUZUKI et al.,

2007). Ao contrário de outros NLRs, o NLRC4 pode participar da formação de diferentes inflamassomas, sendo necessário o envolvimento de outros receptores da mesma família, conhecidos como NAIP (do inglês, *neuronal apoptosis inhibitory protein*) e que funcionam como sensores para os ligantes desses inflamassomas.

Atualmente são conhecidos quatro NAIPs capazes de formar inflamassomas em camundongos (NAIP1, 2, 5 e 6), enquanto o ser humano expressa somente um receptor NAIP (LAGE et al., 2014). Até então, tem sido mostrado que esses inflamassomas são exclusivamente ativados em resposta a bactérias Gram-negativas, as quais expressam determinados fatores de virulência, como os sistemas de secreção do tipo III (T3SS, do inglês *type III secretion systems*) ou do tipo IV (T4SS), tais como *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella pneumophila* (FRANCHI et al., 2007; MARIATHASAN et al., 2004; PEREIRA et al., 2011; SUZUKI et al., 2007).

Por sua vez, estes sistemas de secreção permitem o transporte direto de fatores de virulência da bactéria, a exemplo da flagelina, para o citoplasma da célula hospedeira (GREEN; MECSAS, 2016). No citosol, a flagelina pode ser reconhecida por NAIP5 ou NAIP6, induzindo a oligomerização do NLRC4 e levando à formação do inflamassoma NAIP5/NLRC4 ou NAIP6/NLRC4, com subsequente ativação da Caspase-1 (LIGHTFIELD et al., 2011; ZHAO et al., 2011). Portanto, o receptor NLRC4 funcionaria apenas como uma molécula adaptadora responsável pelo recrutamento da Caspase-1. Por outro lado, Lightfield et al., (2011) também mostraram que, alternativamente, o inflamassoma NLRC4 pode ser ativado independente da presença de NAIP5. Neste caso, foi demonstrado a contribuição de outra proteína de *S. typhimurium*, não flagelina, a proteína PrgJ, no processo de ativação, sugerindo uma ligação direta com o receptor NLRC4. Em adição, a formação dos inflamassomas NAIP1/NLRC4 e NAIP2/NLRC4 ocorre mediante a interação de subunidades agulha e haste de T3SS bacteriano com o respectivo NAIP (RAYAMAJHI et al., 2013; YANG et al., 2013; ZHAO et al., 2011). Convém ressaltar que tem sido mostrado que embora o NAIP humano reconheça a subunidade agulha de T3SS, não reconhece a subunidade haste ou flagelina (YANG et al., 2013; ZHAO et al., 2011).

No entanto, recentemente foi evidenciada a existência de duas isoformas de NAIP humano e que a isoforma NAIP* variante responde à flagelina de *Salmonella*, similar aos NAIP5/6 de camundongos (KORTMANN; BRUBAKER; MONACK, 2015).

É bem elucidado o papel desses inflamassomas no controle de infecções bacterianas, porém, pouco se conhece acerca da ativação dos inflamassomas NAIP/NLRC4 em resposta a outras classes de patógenos (LAGE et al., 2014; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015).

A importância deste inflamassoma também tem sido investigada em infecções por protozoários. Contudo, um estudo recente evidenciou que, apesar de NAIP2 e NAIP5 estarem altamente expressos no miocárdio de camundongos infectados com *T. cruzi*, a ativação de Caspase-1 pelo parasita independe de NLRC4 (SILVA et al., 2013).

O inflamassoma AIM2, o primeiro dos inflamassomas não NLR identificado, também possui a molécula adaptadora ASC compondo sua estrutura. Semelhante ao NLRP3 e ao NLRP12, ocorre uma interação do domínio PYD do receptor AIM2 com o domínio PYD do adaptador ASC que, por sua vez, interage com a pró-Caspase-1 através de uma ligação CARD-CARD, promovendo a formação do complexo multiproteico (SCHATTGEN; FITZGERALD, 2011). Esse inflamassoma é responsivo a dsDNA microbiano e de mamíferos, presente no citosol, sendo, atualmente, o inflamassoma que tem o ligante identificado mais bem definido e que comprovadamente interage de forma direta com seu receptor (DOMBROWSKI et al., 2011; HORNUNG et al., 2009). Apesar da importância do inflamassoma AIM2 para o reconhecimento de diferentes patógenos e estimulação da resposta imune inata, esse complexo proteico também está relacionado a várias doenças inflamatórias e autoimunes (revisado em MAN; KARKI; KANNEGANTI, 2016).

Por fim, a formação desses inflamassomas inicia a clivagem autoproteolítica da pró-Caspase-1 em dois fragmentos ativos (10 kDa [p10] e 20 kDa [p20]). Em solução, essas duas subunidades formam tetrâmeros que constituem a Caspase-1 ativa propriamente dita. Atualmente, os mais bem elucidados mecanismos efetores dessa protease são a ativação e a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, bem como a indução de piroptose. (BAUERNFEIND et al., 2011; DENES; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2012). A IL-1 β e a IL-18 são sintetizadas como moléculas precursoras biologicamente inativas (pró-IL-1 β e pró-IL-18, respectivamente) no interior de diversas células. Entretanto, diferente da pró-IL-18, a pró-IL-1 β não é expressa constitutivamente em diferentes tipos celulares, incluindo monócitos humanos e murinos (DINARELLO et al., 2013).

A expressão e a síntese de pró-IL-1 β ocorrem mediante estímulos inflamatórios, associados com frequência à ativação de PRRs, a exemplos dos TLRs. Em contraste, a produção de pró-IL-18 sofre uma menor influência desses mecanismos (AREND; PALMER; GABAY, 2008; WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010). Para serem liberadas para o meio extracelular e adquirirem a habilidade de se ligarem a seus receptores e ativarem células, a pró-IL-1 β (com 31 kDa) e a pró-IL-18 (com 24 kDa) precisam ser clivadas proteoliticamente pela Caspase-1, formando peptídeos maduros com 18 kDa e 17 kDa, respectivamente (DINARELLO, 2009).

Para exercer suas funções, a IL-18 forma um complexo de baixa afinidade com a cadeia alfa do receptor de IL-18 (IL-18R α); porém, potencializada após interação com a cadeia beta do receptor (IL-18R β), que, diferente do IL-18R α , não é expresso em todas as células. Essa sinalização, entre outras ações, induz a produção de mediadores inflamatórios, especialmente IFN- γ ; aumenta a atividade citotóxica de células NK e células T e potencializa a diferenciação e ativação de células Th1. Todos esses processos são regulados por seu antagonista endógeno, a proteína de ligação de IL-18 (IL-18BP, do inglês *IL-18 binding protein*) (DINARELLO et al., 2013).

Por outro lado, as ações da IL-1 β são exercidas a partir da ligação com a forma biologicamente ativa do seu receptor (IL1RI, do inglês *IL-1 receptor I*), ativando vias de sinalização similares às dos TLRs e promovendo o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-6; quimiocinas; fatores de crescimento como o VEGF (do inglês *vascular endothelial cell growth factor*), entre outras funções (SIMS; SMITH, 2010).

Adicionalmente, vários distúrbios inflamatórios têm sido caracterizados por uma elevada produção de IL-1 β . De fato, muitos pacientes com estas doenças apresentam uma rápida resposta ao tratamento com bloqueadores das funções dessa citocina, a exemplo do antagonista do receptor de IL-1 (IL1Ra, do inglês *IL-1 receptor antagonist*) recombinante (Anakinra), que impede a ligação da IL-1 β com seu receptor (HAWKINS et al., 2004; HOFFMAN et al., 2004; LOVELL; BOWYER; SOLINGER, 2005), validando a importância da alta produção dessa citocina como mecanismo desses distúrbios inflamatórios. Apesar de pertencer à mesma família da IL-1 β e da IL-18, a IL-1 α , outra importante citocina pró-inflamatória, não depende da Caspase-1. Diferente dessas, o precursor da IL-1 α (pró-IL-1 α) já é biologicamente

ativo, podendo exercer sua ação intra ou extracelularmente. Entretanto, a pró-IL-1 α pode ser clivada pela calpaína, uma protease de membrana dependente de cálcio, levando à liberação de uma pequena quantidade da sua forma clivada (IL-1 α) (AREND; PALMER; GABAY, 2008; DINARELLO, 2009). Além disso, tem sido proposto que a Caspase-1 possa contribuir para sua secreção, mesmo sendo dispensável para o amadurecimento (FETTELSCHOSS et al., 2011; GROSS et al., 2012; YAZDI; DREXLER, 2013)

Outro importante mecanismo efetor da Caspase-1, a piroptose é um tipo de morte celular programada associada a eventos pró-inflamatórios, frequentemente vinculada ao controle de infecções intracelulares (COOKSON; BRENNAN, 2001). Entretanto, a piroptose é morfológica e bioquimicamente distinta da apoptose, outro tipo de morte celular programada, sendo caracterizada por independência de caspases apoptóticas; fragmentação difusa do DNA e perda precoce da integridade da membrana celular com posterior liberação do conteúdo intracelular, a exemplo de lactado desidrogenase (LDH); da HMGB1 e pró-IL-1 α /IL-1 α (LAGE et al., 2014; LAGE; AMARANTE-MENDES; BORTOLUCI, 2013).

Eram desconhecidos os mecanismos pelos quais a Caspase-1 induz piroptose, porém, recentemente foi mostrado que esse processo requer gasdermina D, um pouco conhecido membro da família da gasdermina (GOUGH, 2015; HE et al., 2015; KAYAGAKI et al., 2015; SHI et al., 2015). Neste sentido, a Caspase-1, assim com outras caspases inflamatórias, cliva a gasdermina D, resultando em um fragmento N-terminal que conduz à morte celular por piroptose (SHI et al., 2015). Contudo, ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual a gasdermina induz a piroptose. Interessantemente, também foi mostrado que a liberação, mas não a maturação de IL-1 β , depende de gasdermina D, sugerindo a necessidade de lise celular para a liberação dessa citocina (SHI et al., 2015).

Além do clássico mecanismo de ativação do inflamassoma, recentemente foi evidenciado que bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium*, *Vibrio cholerae*, *S. typhimurium* e *L. pneumophila* induzem uma ativação não canônica de Caspase-1 em que é requerida Caspase-11 murina (ou suas ortólogas humanas Caspases 4 ou 5), além de NLRP3 e ASC (BROZ et al., 2012; CASE et al., 2013; KAYAGAKI et al., 2011). Em adição, foi mostrado que LPS de *E. coli* e *S. typhimurium* pode ser reconhecido no interior da célula hospedeira e ativar Caspase-11, por um mecanismo independente de TLR4 (HAGAR et al., 2013;

KAYAGAKI et al., 2013). Esse processo induz piroptose dependente de Caspase-11 e gasdermina D, mas não do inflamassoma NLRP3 (KAYAGAKI et al., 2011, 2013, 2015) (**Figura 4**).

Figura 4 – Mecanismo de ativação do inflamassoma não canônico.

Esquema mostrando a ativação de Caspase-11 por LPS e, por conseguinte, ativação do inflamassoma NLRP3 e indução de piroptose.

Fonte: Adaptada de Broz e Dixit (2016)

Por outro lado, o inflamassoma NLRP3 mostrou-se indispensável para o processamento e a liberação de IL-1 β . Apesar do mecanismo envolvido ainda não estar completamente elucidado, tem sido mostrado que essa ativação requer promoção de efluxo de K⁺ induzido pela Caspase-11 (RÜHL; BROZ, 2015). Além disso, recentemente foi proposto que os fosfolípidos oxidados derivados de palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (oxPAPC), um conhecido inibidor do TLR4, também pode induzir a ativação de Caspase-11 (IMAI et al., 2008; ZANONI et al.,

2016), porém não há relatos de outras classes de PAMPs ou DAMPs que possam ativar essa caspase.

Além disso, tem sido mostrada a participação dos TLRs e dos inflamassomas na patogênese da malária, uma infecção com perfil imunológico complexo e ainda não totalmente compreendido, bem como um espectro clínico que varia de formas assintomáticas a graves, podendo levar à morte.

2.1.2 Características gerais e epidemiologia da Malária

A malária trata-se da doença parasitária mais incidente do mundo, sendo um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que, aproximadamente, 3 bilhões de pessoas, em mais de 100 países, vivem em regiões com alto risco de infecção. Esta doença atinge, principalmente, regiões tropicais e subtropicais do mundo, com 80% dos casos e 90% dos óbitos ocorrendo na África Subsaariana (**Figura 5**) (WHO, 2015b). Somente em 2015, ocorreram 214 milhões de novos casos com 438 mil mortes decorrentes da infecção, no mundo (WHO, 2015a).

Figura 5 – Incidência de malária no mundo no ano de 2014.

Distribuição dos casos de malária no mundo, mostrando alta incidência da doença em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na África Subsaariana.

Fonte: Adaptada de WHO (2014)

Apesar da significativa redução, nos últimos anos, dos casos de malária nas Américas, o Brasil ainda é responsável pelo maior número de casos (37%) e quase a metade das mortes devido à infecção, no continente. Embora tenha havido diminuição dos casos de malária no país, cerca de 20% da população brasileira ainda encontra-se sob o risco de desenvolver a doença, primordialmente na amazônica (**Figura 6**) (WHO, 2015a).

Figura 6 – Mapa de transmissão da malária no Brasil no ano de 2014.

Risco de desenvolvimento de malária no território brasileiro. Baixo risco = Incidência Parasitária Anual (IPA) maior que 50 casos por 1000 habitantes, Médio risco = IPA entre 10 e 50 casos por 1000 habitantes, Alto Risco = IPA menor que 10 casos por 1000 habitantes.

Fonte: Adaptada de Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida através da picada de fêmeas de insetos do gênero *Anopheles*. Atualmente são conhecidas seis espécies do parasito capazes de infectar os seres humanos, a saber: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e os plasmódios de primatas não humanos, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium cynomolgi* que, mais recentemente, foram identificados parasitando o homem (AHMED; COX-SINGH, 2015; TA et al., 2014).

A espécie *P. falciparum* é considerada a mais importante em termos de gravidade da doença, enquanto a espécie *P. vivax* é a responsável pelo maior

número de casos de malária no mundo (MILLER et al., 2013; WHO, 2015a). Junto a isto, algumas pesquisas assinalam que a infecção por *P. vivax* pode conduzir a uma maior gravidade da doença, porém esses casos ainda são subestimados (NAING et al., 2014). Além destas, existem algumas espécies de plasmódio específicas de roedores, sendo as mais comuns *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmoidium yoelii*. Esses plasmódios induzem distintas patogenias e respostas imunes, sendo largamente utilizadas como modelos para o estudo de diferentes manifestações da doença humana (HUANG; PEARMAN; KIM, 2015).

De modo natural, o ciclo do parasito inicia-se quando, durante o repasto sanguíneo, fêmeas do gênero *Anopheles* inoculam as formas esporozoítos do plasmódio no tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado, incluindo o ser humano (**Figura 7**). Após chegarem à corrente sanguínea e ao fígado, os esporozoítos penetram nos hepatócitos, dando início ao desenvolvimento hepático (fase pré-eritrocítica) (MÉNARD et al., 2013; MOTA et al., 2001). Cada esporozoíto dá origem a milhares de merozoítos que são, posteriormente, liberados nos sinusoides hepáticos, invadindo os eritrócitos, diferenciam-se em trofozoíto e esquizonte, dando início à fase eritrocítica do ciclo (STURM et al., 2006). Diferente dos demais plasmódios humanos, alguns esporozoítos das espécies *P. vivax* e *P. ovale* (e também *P. cynomolgi*) não se desenvolvem imediatamente em esquizontes, permanecendo em uma fase latente denominada hipnozoíto. Após um período, que varia de semanas a anos, essas formas podem reiniciar o seu desenvolvimento, tornando a infecção novamente sintomática (BRAY; GARNHAM, 1982; GALINSKI; MEYER; BARNWELL, 2013; HULDEN; HULDEN, 2011).

Cada novo ciclo da fase eritrocítica ou esquizogonia sanguínea dura de 24 a 72 horas dependendo da espécie do parasito. Essa fase é responsável pela patogênese e manifestações clínicas da malária (COWMAN; CRABB, 2006; HALDAR et al., 2007). Durante esta fase do ciclo, o plasmódio utiliza a hemoglobina do eritrócito como fonte de aminoácidos, sendo essencial para a sobrevivência do parasita (FRANCIS; SULLIVAN; GOLDBERG, 1997). Durante esse processo ocorre liberação do grupamento heme presente na hemoglobina no vacúolo digestório do parasita. Como um mecanismo de desintoxicação, o plasmódio transforma os grupamentos heme em um cristal insolúvel denominado hemozoína ou pigmento malárico, o qual é menos prejudicial ao parasito (EGAN, 2008).

Figura 7 – Ciclo de vida do plasmódio.

Fonte: Adaptada de Mota (2006).

Com a ruptura dos eritrócitos parasitados, ocorre não só a liberação de novos merozoítos, assim como produtos do metabolismo, a exemplo da hemozoína, que frequentemente está conjugada com fragmentos do parasito, como proteínas, glicolípídeos e ácidos nucleicos. (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011). A maior parte dos merozoítos liberados infectarão novos eritrócitos saudáveis, ou, em menor proporção (menos de 10%), irão se diferenciar em gametócitos, formas sexuais responsáveis pela continuação do ciclo no hospedeiro invertebrado (JOSLING; LLINÁS, 2015). Enquanto isso, os produtos e fragmentos do parasita ativarão receptores inatos presentes na célula do hospedeiro, desencadeando uma resposta inflamatória.

2.1.3 Sensores inatos do plasmódio

Nos últimos anos houve um significativo avanço na identificação dos sensores associados à infecção pelo plasmódio, bem como dos receptores que

respondem a estes sinais. Estes estudos têm mostrado que âncoras de GPIs, hemozoína e o DNA genômico derivado do parasito podem ativar TLRs e inflamassomas e induzirem a produção de citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente na malária ocorre uma liberação de cristais de ácido úrico e de grupamento heme durante a ruptura dos eritrócitos, igualmente induzindo a ativação dessas vias (**Figura 8**).

Assim como em outros protozoários, as **âncoras de GPI** estão associadas a muitas proteínas de superfície da membrana plasmática do plasmódio, sendo essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do parasita (NAIK; DAVIDSON; CHANNE GOWDA, 2000). Ademais, possuem importante papel na estimulação da resposta imune durante a infecção por plasmódio. Notavelmente, âncoras de GPI de *P. falciparum* são potentes indutores de moléculas pró-inflamatórias. Esses glicolipídeos promovem a liberação de TNF- α e de IL-1 e a expressão de óxido nítrico sintase 2 (NOS-2, do inglês *nitric oxide sintase 2*) em macrófagos de camundongos (SCHOFIELD et al., 1993; SCHOFIELD; HACKETT, 1993; TACHADO et al., 1997), enquanto suprarregulam a expressão de ICAM-1 (do inglês *intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*) e E-selectina em células endoteliais humanas (SCHOFIELD et al., 1996). Esse processo é resultante da ativação de tirosina quinase e proteína quinase C que, em conjunto, ativam NF- κ B (SCHOFIELD et al., 1996; TACHADO et al., 1997). Essa ativação requer o reconhecimento de âncoras de GPI do parasita pelos heterodímeros TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6 e, em menor grau, pelo TLR4, e depende, especialmente, do número de cadeias de ácidos graxos (DURAI; GOVINDARAJ; CHOI, 2013; KRISHNEGOWDA et al., 2005; ZHU et al., 2011).

Figura 8 – Mecanismos de ativação dos TLRs e dos inflamassomas pelo plasmódio.

PAMPs do plasmódio e DAMPs da malária reconhecem diferentes tipos de receptores inatos, induzindo expressão e liberação de citocinas inflamatórias. GPIs podem ativar TLR2/TLR1 e TLR4, heme livre reconhece TLR4, DNA CpG e, possivelmente, hemozoína ativam TLR9. O inflamassoma NLRP3 é ativado na presença de hemozoína e cristais de urato e o AIM2 por DNA genômico do parasita. Fonte: Adaptada de Gazzinelli et al., (2014)

Enquanto, âncoras de GPI de *P. falciparum* contendo três cadeias de ácidos graxos são potentes ativadores do heterodímero TLR2/TLR1 humano e murino, o complexo TLR2/TLR6 presente em células humanas reconhece preferencialmente GPIs de duas cadeias (KRISHNEGOWDA et al., 2005). Contudo, o complexo

TLR2/TLR1 mostrou-se mais importante na ativação da resposta imune para fazer frente contra o parasita (ZHU et al., 2011).

O **DNA genômico** do plasmódio, contendo motivos CpG, também é apontado como ativador da resposta imune inata. Presumivelmente, após a fagocitose e a degradação de eritrócitos parasitados, ocorre a liberação de DNA do parasito no fagolisossoma. Além disso, o DNA do parasita pode ser carregado do meio extracelular para os compartimentos internos por agregados proteicos ou hemozoína (KALANTARI et al., 2014; PARROCHE et al., 2007; WU et al., 2010).

Em células dendríticas ou macrófagos, os motivos CpG do DNA de *P. falciparum* interagem com TLR9 presente na membrana endossomal, estimulando a via TLR9/MYD88 (KALANTARI et al., 2014; PARROCHE et al., 2007; PICHYANGKUL et al., 2004; WU et al., 2010). Consequentemente, ocorre o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e pró-IL-1 β . Adicionalmente, quando presente no citosol, o DNA de *P. falciparum* também induz a formação do inflamassoma AIM2, promovendo a clivagem e a liberação da forma ativa da pró-IL-1 β (KALANTARI et al., 2014). Neste caso, os cristais de hemozoína contribuem desestabilizando a membrana endossomal e permitindo a transferência do DNA do fagolisossoma para o citosol (KALANTARI et al., 2014).

Estudos *in vitro* e *in vivo* também têm demonstrado que a **hemozoína** pode induzir monócitos, macrófagos e células dendríticas a produzirem citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , algumas quimiocinas e metaloproteínases. (COBAN et al., 2005; DOSTERT et al., 2009; GIRIBALDI et al., 2010; PRATO et al., 2008; SHIO et al., 2009). No entanto, a determinação dos receptores envolvidos nesse processo ainda causa intenso debate.

Estudos realizados por Coban e colaboradores sugerem que tanto a hemozoína natural produzida por *P. falciparum*, normalmente ligada a proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos do parasita e do hospedeiro, quanto a hemozoína sintética (β -hematina) induzem a uma resposta pró-inflamatória dependente de TLR9 (COBAN et al., 2005, 2010). Por outro lado, Parroche et al., (2007) propõem que a hemozoína por si só é imunologicamente inerte e a ativação da resposta imune dependente de TLR9 é mediada pelo DNA do parasita conjugado ao cristal.

Entretanto, estudos recentes indicam que a hemozoína livre de DNA e a β -hematina interagem diretamente com o TLR9, induzindo mudança conformacional

do receptor (COBAN et al., 2010). Contudo, o estudo realizado por Coban e colaboradores sugere que os efeitos adjuvantes da hemozoína sintética embora seja dependente de MyD88, independe de TLR9. Por extensão, a hemozoína induz a secreção de IL-1 β dependente do inflamassoma NLRP3 por macrófagos primados com LPS (DOSTERT et al., 2009; SHIO et al., 2009).

Por outro lado, o mecanismo exato de ativação do NLRP3 pela hemozoína ainda não está totalmente esclarecido. Nesse viés, Shio et al., (2009) propuseram um mecanismo de ativação indireto, já que não observaram translocação de cristais de hemozoína da fagolisossoma para o citoplasma. No estudo, foi mostrado que a hemozoína induz a fosforilação das quinases Syk e Lyn, podendo resultar na ativação do inflamassoma mediado por catepsina B. Propôs-se também que a hemozoína medeia a ativação do inflamassoma NLRP3 por um processo dependente de NADPH oxidase e de efluxo de K⁺ (DOSTERT et al., 2009; SHIO et al., 2009).

Ademais, utilizando um modelo de peritonite, Griffith et al., (2009) relataram que o efeito pró-inflamatório da hemozoína está associado à liberação de ácido úrico, um produto do metabolismo das purinas, por um mecanismo até então desconhecido. De fato, quando em altas concentrações o ácido úrico é convertido em cristais de urato monossódico, mediando vários processos inflamatórios. Dentre os eventos inflamatórios mediados por esse DAMP, é bem conhecido seu papel na ativação do NLRP3 (SHI; MUCSI; NG, 2010).

No interior de eritrócitos parasitados *P. falciparum* também estão presentes altas concentrações de **ácido úrico** e hipoxantina, precursora do ácido úrico. Após a ruptura das hemácias infectadas estes DAMPs são liberados na circulação e induzem uma resposta imune pró-inflamatória (COUPER et al., 2010; LOPERA-MESA et al., 2012; ORENGO et al., 2008). Quando fagocitado por macrófagos ou células dendríticas, os cristais de urato monossódico contribuem para a ativação da via MyD88 e do inflamassoma NLRP3, com secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6, durante a infecção pela plasmódio (GRIFFITH et al., 2009; ORENGO et al., 2008, 2009).

Por fim, outro relevante DAMP da malária é o grupamento **heme**. Após hemólise, a hemoglobina livre é oxidada, levando à liberação do heme que, frequentemente, está associado à formação de espécies reativas de oxigênio e efeitos citotóxicos diretos, resultando em estresse oxidativo e dano vascular

(DUTRA; BOZZA, 2014). Contudo, o heme também promove diversos processos inflamatórios. Pacientes com quadro de hemólise decorrente de anemia falciforme apresentam aumento sérico de IL-1 β e TNF- α (BELCHER et al., 2000). Adicionalmente, foi evidenciado que a produção de TNF- α em macrófagos estimulados com heme é dependente de TLR4, CD14 e MyD88, indicando sua participação na ativação da resposta imune inata (FIGUEIREDO et al., 2007). Além disso, a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais em presença de heme livre também se mostrou dependente de TLR4 (BELCHER et al., 2014).

Recentemente também foi demonstrado que heme livre é hábil em induzir a secreção de IL-1 β dependente do inflamassoma NLRP3 em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (DUTRA et al., 2014). Os autores evidenciaram que essa ativação é dependente de efluxo de K⁺ e da liberação de espécies reativas de oxigênio e sugerem que a presença do ferro na molécula heme, mas não o ferro livre ou no *pool* intracelular é essencial para a ativação do inflamassoma.

Em conjunto, esses estudos mostram que a infecção por plasmódio induz a ativação dos dois sinais requeridos para a ativação do inflamassoma e a consequente secreção de IL-1 β . O primeiro sinal, resultante da ativação de TLR2, TLR4 e TLR9, levando à síntese de pró-IL-1 β , bem como componentes do inflamassoma; e o segundo sinal, a formação dos inflamassomas NLRP3 e AIM2, com posterior secreção de IL-1 β , mediante ativação por hemozoína e/ou DNA genômico (**Figura 8**). Isso contribuiria para a intensa resposta inflamatória observada na malária, provavelmente, associada ao desenvolvimento de quadros mais graves da doença.

2.1.4 Patogênese da malária não complicada

Os sintomas iniciais são comuns às infecções pelas diferentes espécies e são bastante inespecíficos (MILLER et al., 2002). O principal sintoma da malária é a febre, embora possa ser acompanhada de mal-estar, anorexia, prostração, tonturas, dor de cabeça, mialgia, náusea, vômitos e outros. No início, a febre é, frequentemente, irregular com aumento de temperatura associada a tremores e calafrios. Após alguns dias, a febre tende a se tornar periódica dependendo da sincronização da esquizogonia (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012). Geralmente, o início dessas manifestações ocorre ao mesmo tempo em que há ruptura dos eritrócitos parasitados, durante a esquizogonia sanguínea. A liberação dos

merozoítos, produtos do metabolismo e fragmentos do parasita, promove também a liberação de moléculas pró-inflamatórias que acarretam os sinais e sintomas descritos (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

Esse processo promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 (IL-1 β e IL-1 α) e IL-6. A interação dessas citocinas pirógenas com seus respectivos receptores resulta em ativação do NF- κ B e consequente expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2) e síntese de prostaglandina E (PGE₂). No hipotálamo, a PGE₂ interage com o receptor EP₃, induzindo, por exemplo, o aumento de AMP cíclico (cAMP) que contribui para a elevação do ponto de ajuste termostático promovendo a febre (DINARELLO, 2004; NETEA; KULLBERG; VAN DER MEER, 2000). Apesar de envolvidas na patogênese da doença, estas citocinas, juntamente com interferon gama (IFN- γ), são fundamentais para o controle da infecção (STEVENSON; RILEY, 2004).

Além da liberação de citocinas pró-inflamatórias, a adesão de eritrócitos parasitados ao endotélio vascular e a ruptura e a remoção de eritrócitos parasitados ou alterados por macrófagos do baço promove um quadro de anemia, bastante comum em paciente com malária (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

2.1.5 Patogênese da malária grave

Em algumas situações, o quadro de malária não complicada pode evoluir para manifestações mais graves da infecção, com acentuadas disfunções em órgãos vitais. Esse quadro depende, especialmente, da espécie e densidade de parasitas circulantes, bem como do estado imunológico e vulnerabilidade do hospedeiro. Assim, indivíduos primo-infectados, gestantes e crianças menores de 5 anos são os mais vulneráveis às formas mais graves da doença (GOMES et al., 2011; TRAMPUZ et al., 2003).

A malária grave é comumente causada por infecção com *P. falciparum*, contudo, há cada vez mais evidências que *P. vivax* e *P. knowlesi* também podem causar um quadro grave da doença (ANDRADE et al., 2010; GOMES et al., 2011; NAING et al., 2014; WILLIAM et al., 2011). Atualmente, alguns critérios clínico-laboratoriais são usados para definir um quadro de malária grave (**Tabela 1**), sendo que as principais complicações incluem malária cerebral, disfunção pulmonar, falência renal aguda, anemia severa e/ou hemorragia e, no caso de gestantes, malária placentária. Qualquer uma dessas manifestações pode evoluir rapidamente,

levando o paciente a óbito em questão de horas ou dias. Não caso das grávidas, também compromete o desenvolvimento fetal, podendo até provocar abortos (ROGERSON et al., 2007; WHO, 1990, 2000).

Tabela 1 – Manifestações clínicas da malária grave.

Manifestação	Características
<i>Critérios iniciais da Organização Mundial da Saúde de 1990 (WHO, 1990)</i>	
Malária cerebral	Coma não atribuído a outras causas, com Glasgow ≤ 9
Anemia grave	Hemoglobina < 7 g/dl ou hematócrito $< 20\%$ na presença de parasitemia $> 10.000/\mu\text{l}$
Insuficiência renal aguda	Diurese < 400 ml / 24 horas em adultos (< 12 ml/kg/24 horas em crianças) e creatinina sérica $> 3,0$ mg/dl
Edema pulmonar	Alterações radiográficas e hipoxemia severa
Hipoglicemia grave	Glicemia < 40 mg/dl
Choque	Pressão arterial sistólica < 70 mmHg em pacientes com idade superior a 5 anos (< 50 mmHg em crianças)
Sangramento anormal e/ou coagulação	Sangramento espontâneo nasal, trato gastrointestinal ou evidência laboratorial de coagulação intravascular disseminada
Convulsões generalizadas repetidas	≥ 3 episódios observados em 24 horas
Acidose metabólica	pH arterial $< 7,25$ ou $\text{HCO}_3^- < 15$ mmol/l
Hemoglobinúria macroscópica	Hemólise não secundária a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
<i>Critérios adicionais publicados em 2000 (WHO, 2000)</i>	
Comprometimento do estado de consciência	Alteração de nível de consciência
Prostração ou fraqueza	
Hiperparasitemia	$> 5\%$ dos eritrócitos parasitados ou > 250.000 parasitas/ μl em indivíduos não imunes
Hiperpirexia	Temperatura corporal > 40 °C
Hiperbilirrubinemia	Bilirrubina total > 2.5 mg/dl

Fonte: WHO, (1990, 2000)

Muitos aspectos da patogênese da malária grave ainda não estão completamente compreendidos, porém, sabe-se que o sequestro/acúmulo do parasita em órgãos específicos e uma intensa resposta inflamatória, local e sistêmica, contribuem para o desenvolvimento dessas complicações (MILLER et al., 2013). Devido a maior gravidade da infecção, os estudos que buscam entender esses mecanismos estão mais direcionados à infecção por *P. falciparum*. No entanto, modelos experimentais, também, têm contribuído para a compreensão da doença e suas complicações.

Além de produzir altas parasitemias, o *P. falciparum* tem a capacidade de promover alterações funcionais e estruturais nos eritrócitos, levando a modificações na superfície da célula, com exposição de antígenos próprios e inserção de proteínas derivadas do parasita. Isso contribui para a aderência dos eritrócitos

parasitados ao endotélio vascular e a evasão da resposta imune. Até então, o principal grupo de ligantes responsável pela citoaderência dos eritrócitos parasitados com *P. falciparum* são as proteínas da família da PfEMP1 (do inglês, *P. falciparum erythrocyte membrane protein-1*).

A referida proteína é codificada por uma família de genes, composta por aproximadamente 60 alelos e denominada VSA. Isso confere à PfEMP1 uma grande variabilidade antigênica e habilidade de se ligarem a diferentes receptores do hospedeiro, incluindo CD36 (do inglês, *cluster differentiation 36*); molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule-1*); molécula de adesão a célula vascular-1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecule 1*) e sulfato de condroitina A (CSA, do inglês *chondroitin sulfate A*) (KRAEMER; SMITH, 2006; MILLER et al., 2002; PASTERNAK; DZIKOWSKI, 2009). Essa diversidade antigênica da PfEMP1 e distribuição heterogênea dos receptores do hospedeiro contribuem para o sequestro dos eritrócitos parasitados em diferentes órgãos e, por consequência, uma variabilidade de fenótipos da doença (BERNABEU et al., 2016; LAVSTSEN et al., 2012; ROWE; KYES, 2004; TUIKUE NDAM et al., 2005).

O sequestro do parasito na microvasculatura de órgãos específicos, o processo de esquizogonia sanguínea e a destruição de eritrócitos infectados no baço induzem a uma intensa resposta inflamatória local e sistêmica. Vários estudos têm apresentado uma relação entre o aumento sérico e local de citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento de malária grave em indivíduos infectados com *P. falciparum* ou, em menor grau, *P. vivax* (ANDRADE et al., 2010; ATAÍDE et al., 2015; NASR et al., 2014).

A malária cerebral é a manifestação clínica mais comum e principal causa de morte em adultos e crianças com malária grave, sendo caracterizada pela presença de *Plasmodium spp* (especialmente *P. falciparum*) no sangue, uma pontuação na escala de coma de Glasgow ≤ 9 , com exclusão de encefalite por outras causas. Clinicamente, é comum a presença de convulsões ou coma (NEWTON; HIEN; WHITE, 2000).

Apesar dos mecanismos que levam a essas manifestações ainda não estejam completamente elucidados, atualmente se propõe que o desenvolvimento da malária cerebral é uma consequência do sequestro de eritrócitos no cérebro, promovendo obstrução do fluxo sanguíneo e hipóxia cerebral; associado a uma intensa resposta

inflamatória, ativação do endotélio vascular e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α , IFN- γ e IL-1 (HALDAR et al., 2007). De fato, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, já foi evidenciada uma correlação entre o desenvolvimento de malária cerebral e expressão dessas citocinas no cérebro, com um papel de destaque para o TNF- α (ARMAH et al., 2005; MEDANA; HUNT; CHAUDHRI, 1997).

O trabalho de Medana e colaboradores demonstrou que essa citocina está expressa em micróglia, mastócitos, monócitos e células endoteliais do cérebro de camundongos com malária cerebral. Além disso, foi constatada a expressão de IL-1 β em monócitos e endotélio vascular (MEDANA; HUNT; CHAUDHRI, 1997). Essa resposta inflamatória induz a lesão tecidual direta e também potencializa o sequestro do parasita no cérebro, aumentando a hipóxia. De fato, já foi mostrado que TNF- α induz a expressão de ICAM-1 (TURNER et al., 1994), receptor chave para a adesão do *P. falciparum* via PfEMP1 (KRAEMER; SMITH, 2006). Por sua vez, altas concentrações de IFN- γ podem induzir células mononucleares a produzirem TNF- α , cooperando sinergicamente para o aumento da expressão de moléculas de adesão (FRANKOVÁ; ZIDEK, 1998). Além disso, foi evidenciado uma relação entre polimorfismos do TNF- α e IFN- γ e o desenvolvimento de malária cerebral (KOCH et al., 2002; UBALEE et al., 2001).

Nesse contexto, tem sido mostrado o papel de destaque dos TLRs na produção dessas citocinas pró-inflamatórias e na consequente patogênese da malária cerebral (GRIFFITH et al., 2007). Utilizando um modelo de malária aguda, Franklin et al., (2009) mostraram que a via MyD88/TLR9 é essencial para iniciar a resposta efetora da IL-12 e IFN- γ e, portanto, favorecer a hiperprodução de mais citocinas pró-inflamatórias e um quadro agudo de malária similar à sepse. Entretanto, apesar de importante para indução de uma imunidade protetora ao parasita (ZHANG et al., 2016), o TLR9 também está evidentemente associado ao desenvolvimento de malária cerebral (FRANKLIN et al., 2011; GRIFFITH et al., 2007).

Notavelmente, no estudo realizado por Franklin e colaboradores, os pesquisadores conseguiram prevenir o desenvolvimento de malária cerebral em camundongos tratados com um agonista sintético do TLR9, confirmando a importância desse receptor na patogênese da doença. Esses dados reforçam

evidências que mostram uma relação entre polimorfismos do TLR9 e o desenvolvimento de malária cerebral em criança (SAM-AGUDU et al., 2010). Por outro lado, o papel do TLR2 e TLR4 na patogênese da doença ainda é controverso, ora sendo reportados como desnecessários (GRIFFITH et al., 2007), ora como importantes (KORDES; MATUSCHEWSKI; HAFALLA, 2011) para o desenvolvimento da malária cerebral.

A despeito dos TLRs, o papel do inflamassoma no contexto dessa complicação ainda não se encontra completamente esclarecido. As evidências sugerem que a ativação de IL-1 β por Caspase-1, molécula efetora do inflamassoma, é dispensável para o desenvolvimento de malária cerebral em um modelo murino (DOSTERT et al., 2009; KORDES; MATUSCHEWSKI; HAFALLA, 2011; REIMER et al., 2010). Entretanto, o receptor NLRP3, mas não NLRC4, mostrou-se importante para patogênese da doença por um mecanismo supostamente independente do inflamassoma (DOSTERT et al., 2009; REIMER et al., 2010). Esses resultados reforçam o estudo realizado na Tailândia, no qual, não se evidenciou o envolvimento do polimorfismo do gene *IL1B* com a malária cerebral humana (OHASHI et al., 2005). Contudo, a participação do inflamassoma na malária severa precisa ser melhor esclarecida, visto ter sido recentemente demonstrado o envolvimento de outro complexo na infecção por plasmódio (KALANTARI et al., 2014), porém não há evidências do papel do AIM2 na patogênese da malária cerebral, ou outra manifestação da malária grave. Além disso, foi mostrado que os inflamassomas NLRP3 e NLRP12 são envolvidos na hipersensibilidade de camundongos com malária, a infecções bacterianas com consequente quadro de sepse letal (ATAIDE et al., 2014)

Além da malária cerebral, manifestação da malária grave mais comumente estudada, destaca-se a disfunção respiratória associada à malária e à malária placentária. Apesar da importância clínica dessas duas complicações, pouco se sabe acerca dos mecanismos patogênicos associados a estas e receptores inatos envolvidos.

2.5.1.1 *Síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária*

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a forma mais grave, a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), foram definidas inicialmente como síndromes de falência respiratória aguda caracterizadas por infiltrado pulmonar

bilateral, taxa de pressão de oxigênio parcial por fração de oxigênio inspirado ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) menor que 300 mmHg para LPA, ou menor que 200 mmHg na SDRA, sendo atualmente a designação mais utilizada (BERNARD et al., 1994; RUBENFELD et al., 2005). Entretanto, foi definido recentemente um novo método de avaliação onde se considera todos os pacientes com SDRA.

Desse modo, foram propostas três categorias de acordo com o grau de hipoxemia (leve, para $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$; moderado, para $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ e grave, para $\leq 100 \text{ mmHg}$) e quatro variáveis auxiliares (gravidade radiológica, complacência respiratória [$\leq 40 \text{ mL/cmH}_2\text{O}$], pressão expiratória positiva [$\geq 10 \text{ cm H}_2\text{O}$] e volume de expiração corrigido por minuto [$\geq 10 \text{ L/min}$]) (RANIERI et al., 2010).

As causas mais comuns de SDRA são pneumonia primária de origem infecciosa ou por aspiração e sepse severa (MATTHAY; ZEMANS, 2011). Contudo, também podem se apresentar como complicações graves da malária, com alta taxa de letalidade, sobretudo em adultos. (VAN DEN STEEN et al., 2013). Embora seja mais frequente entre pacientes infectados por *P. knowlesi* (DANESHVAR et al., 2009; WILLIAM et al., 2011), a SDRA também é bastante descrita em infecções causadas por *P. falciparum*, *P. malarie*, *P. vivax* e *P. ovale* (DANESHVAR et al., 2009; LAU et al., 2013; LOMAR et al., 2005; LOZANO et al., 1983). Em paralelo, tem sido mostrado que muitos pacientes com malária grave desenvolvem SDRA, durante ou após o tratamento antimalárico, mesmo com ausência de parasitemia periférica, sugerindo que fatores associados ao hospedeiro estão envolvidos na patogênese da síndrome (TAYLOR et al., 2012).

As principais consequências patofisiológicas da SDRA incluem alteração da capilaridade pulmonar, disfunção da capacidade alveolar e aumento do *shunt* intrapulmonar (MATTHAY; ZEMANS, 2011). No caso da SDRA associada à malária (SDRA-AM), tem sido proposto que esses fatores estão relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao parasito. A presença dos eritrócitos infectados no tecido pulmonar geraria uma intensa resposta inflamatória, com consequente lesão tecidual (**Figura 9**) (VAN DEN STEEN et al., 2013).

Figura 9 – Componentes celulares envolvidos na patogênese da SDRA-AM.

Esquema mostrando um alvéolo sadio e um alvéolo durante processo inflamatório decorrente da presença de eritrócitos infectados com plasmódio e seus PAMPs no tecido. Isso promove aumento de infiltrado leucocitário, morte celular, edema, coagulação intravascular e formação de membrana hialina; quando característico de SDRA. Fonte: Adaptada de Van Den Steen et al., (2013)

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome em pacientes com malária grave ainda são pouco compreendidos, porém tem sido sugerido que o sequestro de eritrócitos parasitados no endotélio pulmonar representa um papel decisivo na patogênese da SDRA (PRUDÊNCIO; RODRIGUES; MOTA, 2007; VAN DEN STEEN et al., 2013). De fato, *P. falciparum* pode ser sequestrado no pulmão, contudo, ainda não está claro a quais receptores do hospedeiro estão associados (PETTERSSON et al., 2005; PONGPONRATN et al., 1991).

Um estudo realizado por Fonager et al., (2012) mostrou que sequestro de eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA é mediado por CD36. Além disso, camundongos deficientes de CD36 tiveram uma redução do edema pulmonar decorrente da infecção por *P. berghei* ANKA (FRANKE-FAYARD et al., 2005) e, adicionalmente, ocorre uma diminuição do número de parasitas do tecido pulmonar de camundongos deficientes de ICAM1 (PIGUET et al., 2001). Por outro lado, utilizando um modelo *in vitro*, El-Assaad et al., (2013) propõem que a adesão de

eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA depende de VCAM1, mas não de ICAM1. Em conjunto, esses estudos sugerem uma plasticidade do mecanismo de sequestro do plasmódio no tecido pulmonar, com participação de diferentes moléculas.

Além da resposta inflamatória local decorrente do sequestro de eritrócitos parasitados no tecido pulmonar, presumivelmente, a resposta inflamatória sistêmica desencadeada pela infecção também contribui para a patogênese da SDRA-AM. É frequente a existência de monócitos/macrófagos no tecido pulmonar de pacientes com SDRA-AM e, em algumas situações, com presença de cristais de hemozoína no interior dessas células (CORBETT et al., 1989; DUARTE et al., 1985; PUNYAGUPTA et al., 1974; VALECHA et al., 2009). Portanto, isto supostamente levaria a uma ativação desses fagócitos e produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios.

Utilizando um modelo murino, foi mostrada uma associação entre o desenvolvimento de SDRA-AM, a concentração de hemozoína no tecido pulmonar e a expressão local de TNF- α , MCP-1, IL-6 e IL-1 β (DEROOST et al., 2013; VAN DEN STEEN et al., 2010), revelando a importância dessas citocinas na patogênese da doença. Os cristais de hemozoína tem sido apontados como relevantes ativadores do inflamassoma NLRP3, além de contribuírem para a transferência de DNA do parasita para o citosol da célula, o qual está envolvido na ativação de TLR9 e de AIM2 (GRIFFITH et al., 2009; KALANTARI et al., 2014; PARROCHE et al., 2007).

A ativação desses receptores estaria, em princípio, ligada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias no pulmão de camundongos com SDRA-AM. Assim, é razoável supor uma relação entre a ativação dessas vias pelo plasmódio e o desenvolvimento da síndrome respiratória. Até então não foram mostradas fortes evidências dessa associação, no entanto, estudos experimentais têm demonstrado a associação do TLR4 ou inflamassomas NLRP1 e NLRP3 com o desenvolvimento de SDRA por outras causas, que não a malária (DENG et al., 2013; GASSE et al., 2007; JONES et al., 2014; KAWASAKI et al., 2000; KOVAROVA et al., 2012; ROWE et al., 2002)

Em contrapartida, Epiphany et al., (2010), mostraram que o VEGF produzido por esplenócitos desempenha uma função central no desenvolvimento da SDRA-AM murina, contribuindo não só para o aumento da permeabilidade vascular, como também a letalidade da síndrome. Curiosamente, altas concentrações de IL-1 β

induz a expressão de VEGF via IL1R (HONORATI; CATTINI; FACCHINI, 2004; TANAKA et al., 2000), porém ainda não foi evidenciada essa correlação na SDRA-AM.

2.5.1.2 *Malária placentária*

A malária associada à gravidez, ou seja, qualquer infecção por plasmódio que ocorra durante a gravidez, sem consideração do estado imune do hospedeiro ou envolvimento da placenta, é uma das principais causas de mortalidade em regiões tropicais, resultando em cerca de 10.000 mortes maternas e entre 75.000 e 200.000 mortes infantis a cada ano (STEKETEE et al., 2001). Além disso, tem como outras consequências o baixo desenvolvimento fetal e a anemia materna (ALVAREZ; AL-KHAN; APUZZIO, 2005; UMBERS et al., 2011a). Quando há evidências de *Plasmodium* spp (frequentemente *P. falciparum*) ou seus produtos (a exemplo da hemozoína) na placenta, associadas a alterações histopatológicas específicas, denomina-se a complicação de malária placentária (BULMER et al., 1993; HVIID et al., 2010).

O motivo pelo qual gestantes são particularmente suscetíveis à malária tem sido objeto de intenso debate nos últimos anos. De partida, foi proposto que a maior suscetibilidade seria devido à imunossupressão materna, a qual, por um lado, protege o feto contra a ação do sistema imunológico e, por outro, deixa-a menos resistente às infecções (MENENDEZ, 1995; NOSTEN et al., 2004). Atualmente é proposto que a placenta ofereça um ambiente único para o desenvolvimento de subpopulações do parasito que aderem seletivamente ao glicosaminoglicano CSA, presente em grande quantidade nesse órgão (FRIED; DUFFY, 1996).

A interação com o CSA ocorre através de uma variante da PfEMP1 codificada pelo gene var2CSA (ROWE; KYES, 2004). Entretanto, não se trata de uma característica exclusiva do *P. falciparum*. Nosso grupo mostrou que *P. berghei* ANKA se acumula no tecido placentário de camundongos Balb/c por um mecanismo que depende da ligação do eritrócito parasitado ao CSA presente na placenta (MARINHO et al., 2009; NERES et al., 2008). Além disso, alguns estudos têm mostrado acúmulo de eritrócitos infectados em infecções por *P. chabaudi* (COX; SEMOFF; HOMMEL, 1987; POOVASSERY; MOORE, 2006).

O sequestro dos eritrócitos infectados no ambiente placentário evita sua posterior destruição pelo baço, permitindo sua multiplicação naquele tecido. Com

isso, um intenso infiltrado inflamatório constituído, principalmente, por monócitos, desenvolve-se no espaço intervilo da placenta e a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias induz alterações estruturais e funcionais neste órgão (ATAÍDE et al., 2015; ROGERSON et al., 2007; SALIH et al., 2011).

O desenvolvimento de lesões placentárias e o comprometimento fetal em mulheres grávidas infectadas com *P. falciparum* têm sido associados especialmente a uma elevada produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β tanto sistêmica quanto no tecido placentário (MOORMANN et al., 1999; ROGERSON et al., 2007). Fato idêntico é observado em modelos experimentais. Camundongos grávidas infectadas com *P. chabaudi* apresentaram um robusto aumento de IL-1 β e IFN- γ no sangue, em particular, no momento do aborto (POOVASSERY; MOORE, 2009). Nesse estudo também foi evidenciada uma elevada produção de IL-10, porém foi insuficiente para inibir o impacto negativo das citocinas pró-inflamatórias na placenta.

Nessa direção, Neres et al., (2008) mostraram um intenso infiltrado inflamatório composto predominantemente por monócitos/macrófagos na placenta de camundongos grávidas infectadas com *P. berghei* ANKA. Os dados são condizentes com o aumento da expressão de quimiocinas atrativas de macrófagos, no tecido placentário, também evidenciado nesse estudo. Isto sugere a participação da resposta imune inata na patogênese dessa complicação. Ademais, os trofoblastos, importantes células presentes na interface materno-fetal, produzem altas concentrações de moléculas pró-inflamatórias, incluindo MIF, MIP-1 α , IL-1 β e TNF- α , em resposta a eritrócitos infectados com *P. falciparum* ou hemozoína natural (BOEUF et al., 2013; LUCCHI et al., 2011; LUCCHI; PETERSON; MOORE, 2008). Assim, presumivelmente, o sinciciotrofoblasto também contribui para o ambiente inflamatório local em mulheres com malária placentária.

Semelhante à SDRA-AM, as vias de sinalizações existentes nesse processo inflamatório associado à malária placentária ainda não estão completamente elucidadas. Polimorfismos do TLR1, TLR4 ou TLR9 estão envolvidos com o aumento da suscetibilidade de mulheres grávidas a desenvolverem malária placentária por *P. falciparum* (HAMANN et al., 2010; MOCKENHAUPT et al., 2006), porém não tem sido mostrado o impacto da ativação desses receptores sobre os efeitos negativos da malária na gravidez, como abortos e RCIU.

Por outro lado, a ativação de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 tem sido implicada em um baixo desenvolvimento fetal durante gestação de camundongos com agravos de outra etiologia que não a malária (ARCE et al., 2009, 2012; GOULOPOULOU et al., 2012; ILIEVSKI; LU; HIRSCH, 2007), o que sugere a participação dessas vias na patogênese da malária placentária.

Em adição tem sido mostrado que trofoblastos expressam, em condições basais, vários componentes do inflamassoma, incluindo NALP3, ASC e Caspase-1 (ABRAHAMS, 2011); e que ativação de NLRP3 estaria supostamente associada ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia (MULLA et al., 2011) e contribui para problemas gestacionais em camundongos grávidas infectadas com *Listeria monocytogenes*, contudo sem envolvimento dos inflamassomas AIM2 e NLRC4 (LI et al., 2016).

Considerando o frequente acúmulo de eritrócitos parasitados e a deposição hemozoína no tecido placentário de mulheres com malária placentária (AHMED et al., 2014; ATAÍDE et al., 2015; SOUZA et al., 2013b), presume-se que estas vias estejam envolvidas na resposta inflamatória desencadeada pelo parasita.

Sugere-se também a existência de um forte mecanismo de proteção associado à imunidade específica (NOSTEN et al., 2004). Tem sido evidenciado que uma imunidade específica (especialmente humoral) contra as formas placentárias do parasito é adquirida após sucessivas gestações, podendo prevenir o sequestro e, dessa maneira, evitar a cascata de eventos inflamatórios que conduzem ao agravamento da doença (BEESON; DUFFY, 2005; SCHOFIELD; GRAU, 2005). Paradoxalmente, mulheres que vivem em áreas com alta endemicidade, muitas vezes, apresentam poucos sintomas da doença. Em particular, os mais severos efeitos da malária são observados na primeira e na segunda gravidez, reforçando uma forte contribuição da resposta imune adaptativa nesse processo (NOSTEN et al., 2004)

O crescimento fetal é determinado por fatores genéticos, no entanto, disfunções fetais e/ou maternas podem levar à RCIU e, por conseguinte, ao BPN. O impacto desses fatores adversos no crescimento fetal depende da natureza e do tempo de exposição ao agente agressor (UMBERS et al., 2011a). Assim, as modificações placentárias, bem como o próprio processo inflamatório em si afetam a função vascular normal e desregulam os níveis de hormônios reguladores do crescimento e a transferência de nutrientes para o feto; promovendo abortos,

nascimentos prematuros, restrição do crescimento intrauterino (RCIU) e baixo peso ao nascer (BPN) (**Figura 10**) (BRABIN et al., 2004; UMBERS et al., 2011a).

Figura 10 – Possíveis mecanismos para a RCIU mediado pela resposta inflamatória na malária placentária.

Eritrócitos parasitos com *Plasmodium* spp estimulam o sinciciotrofoblasto e monócitos a produzirem citocinas pró-inflamatórias que podem desregular hormônios reguladores do crescimento e reduzir expressão e função de transportadores de nutrientes. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias, juntamente com C5a ativado desregulam fatores angiogênicos, prejudicando o fluxo sanguíneo da placenta. Todos esses distúrbios induzem a restrição do crescimento intrauterino. Fonte: Adaptada de Umbers et al., (2011a)

Sabe-se que a vascularização da placenta é essencial para o apropriado funcionamento da placenta e crescimento do feto. Em mulheres com malária placentária têm sido observada uma relação entre a disfunção vascular da placenta e a desregulação da produção dos fatores angiogênicos ANG-1, ANG-2, sVEGFR1 e VEGF(ATAÍDE et al., 2015; MUEHLENBACHS et al., 2006; SILVER et al., 2010). Adicionalmente, foi mostrado, em um modelo murino de malária placentária, que o C5a, um efector chave do sistema complemento, contribui para a desregulação da angiogênese e para a restrição do crescimento fetal (CONROY et al., 2009, 2013).

Em estudo realizado com gestantes infectadas com *P. falciparum* foi evidenciada uma associação entre a inflamação placentária e baixas concentrações do fator de crescimento tipo insulina no sangue periférico materno ou sangue do cordão umbilical (IGF, do inglês *insulin-like growth factors*). Em complemento, os

níveis de IGF no sangue do cordão umbilical foram correlacionados com o peso do recém-nascido (UMBERS et al., 2011b).

Uma baixa expressão ou disfunção de importantes transportadores de nutrientes para o feto também tem sido relacionada ao processo inflamatório local e sistêmico e baixo peso de recém-nascidos em mulheres com malária placentária com *P. falciparum*. No caso de transportadores de aminoácidos do sistema A (SNAT1 e SNAT2), a baixa expressão no tecido placentário foi associado a altos níveis de IL-1 β no sangue periférico das gestantes infectadas. Interessantemente, a baixa expressão de SNAT1, mas não de SNAT2, foi correlacionada ao baixo peso ao nascer (BOEUF et al., 2013). Esse grupo também mostrou uma correlação negativa entre a expressão do transportador de glicose GLUT1 e o infiltrado de monócitos na placenta de mulheres infectadas com *P. falciparum*, e uma relação positiva do transportador com o peso dos recém-nascidos (CHANDRASIRI et al., 2014). Em conjunto, esses trabalhos acenam com uma relação entre as alterações nos transportados de nutrientes presentes na placenta, o processo inflamatório e a RCIU em mulheres com malária placentária. Todavia, faz-se necessária a maior compreensão dos mecanismos imunes envolvidos nesse processo.

3.2 **CAPÍTULO 2 PAPEL DO INFLAMASSOMA NA SDRÁ ASSOCIADA À MALÁRIA**

3.2.1 **Introdução**

Atualmente a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é caracterizada por infiltrado pulmonar bilateral, e taxa de pressão de oxigênio parcial por fração de oxigênio inspirado ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) menor que 300 mmHg, como variações que a categorizam de leve a grave, e possui alta taxa de morbimortalidade (RANIERI et al., 2010; RUBENFELD et al., 2005). As principais consequências patofisiológicas incluem alteração da permeabilidade vascular dos pulmões, disfunção da capacidade alveolar e aumento do *shunt* intrapulmonar (MATTHAY; ZEMANS, 2011).

A SDRÁ já foi descrita em pacientes infectados com todas as espécies de plasmódio humano conhecidas, sendo bastante frequente entre pacientes infectados por *P. knowlesi* (DANESHVAR et al., 2009; LAU et al., 2013; LOMAR et al., 2005; LOZANO et al., 1983; WILLIAM et al., 2011), possuindo uma alta taxa de letalidade entre pacientes com malária grave, independente do tratamento antimalárico (VAN DEN STEEN et al., 2013).

Tanto fatores relacionados ao hospedeiro quanto ao parasito têm sido associados à patogênese da SDRÁ associada à malária (-AM). Contudo, ainda não se conhece bem os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome em pacientes com malária grave (PRUDÊNCIO; RODRIGUES; MOTA, 2007; VAN DEN STEEN et al., 2013).

Recentemente nosso grupo mostrou que o VEGF produzido no baço tem papel central no desenvolvimento da SDRÁ-AM murina, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular (EPIPHANIO et al., 2010). Além disso, tem sido reportado que as manifestações de SDRÁ-AM em camundongos C57Bl/6 infectados por *P. berghei* NK65 está relacionada ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{IL-1}\beta$, nos pulmões (VAN DEN STEEN et al., 2010).

Membros da família dos TLRs reconhecem, com grande afinidade, componentes do plasmódio e participam do estímulo de uma resposta imune com produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{IL-1}\beta$ (GAZZINELLI et al., 2014). A ativação desses receptores é mediada por uma

variedade de proteínas adaptadoras, a exemplo da molécula MyD88, que interage com todos os TLRs, exceto TLR3 (MEDZHITOV, 2001). De fato, foi demonstrado que a via TLR9/MyD88 é essencial para o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, em um modelo de malária aguda (FRANKLIN et al., 2009), e que essa via possui uma função relevante na evolução para formas mais graves da doença (BARBOZA et al., 2014; GRIFFITH et al., 2007).

De forma peculiar, após a síntese proteica, é requerido que a pró-IL-1 β – uma das citocinas reguladas pela ativação dos TLRs – seja clivada pela Caspase-1, para liberação da sua forma ativa. Esse processo é dependente da formação do inflamassoma, que requer a estimulação do respectivo NLRs, a exemplo do NLRP3 e NLRC4, ou do receptor AIM2. Estes, quando necessário, recrutam a molécula adaptadora ASC que interage com a Caspase-1 (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Embora não esteja totalmente claro o papel da via sinalização MyD88 e do inflamassoma na patogênese da SDRA-AM, foi reportado a participação desses componentes da imunidade inata no desenvolvimento de SDRA associadas a outras causas que não correspondem à malária. Por exemplo, a via de sinalização IL-1R1/MyD88 e o inflamassoma NLRP3 mostraram-se essenciais para a patogênese da LPA induzida pelo antibiótico bleomicina (GASSE et al., 2007, 2009). O inflamassoma NLRP3 também foi requerido para o desenvolvimento do quadro de hipoxemia em um modelo de LPA induzida por ventilação mecânica associada ao desafio por LPS (JONES et al., 2014). Apesar dos recentes estudos buscarem compreender a patogênese da SDRA-AM, ainda não estão nítidos os mecanismos imunológicos envolvidos nessa injúria, especialmente aqueles relacionados à via sinalização MyD88 e do inflamassoma.

3.2.2 Objetivos

Neste capítulo temos como objetivo central investigar as contribuições da via sinalização MyD88 e dos inflamassomas NLRP3, NLRC4 e AIM2 para o desenvolvimento da SRDA-AM. Assim, pretende-se por meio da análise de diferentes parâmetros:

- i. Estabelecer um modelo de SRDA-AM, induzida por *P. berghei* NK65, em camundongos C57Bl/6;
- ii. Determinar o perfil de citocinas, local e sistêmico, em camundongos com SRDA-AM;

- iii. Investigar a ativação de Caspase-1 em macrófagos pulmonares e esplênicos de camundongos com SRDA-AM;
- iv. Avaliar o desenvolvimento da SRDA-AM em camundongos deficientes de *MyD88*, *IL1R* e componentes dos inflamassomas (ASC, NLRP3, NLRC4 e AIM2 e Caspase-1);
- v. Analisar a produção, *in vitro*, de IL-1 β e IL-1 α em macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 WT, deficientes de *MyD88*, *ASC*, *NLRP3*, *NLRC4* e *AIM2* e *Caspase-1*, com diferentes estímulos;
- vi. Determinar os parâmetros hematológicos de camundongos com ou sem SRDA-AM.

3.2.3 Material e Métodos

3.2.3.1 Animais

Camundongos selvagens C57Bl/6 (WT) e camundongos deficientes de *MyD88* (*MyD88*^{-/-}), *Caspase-1* e *11* (*Casp1/11*^{-/-}); *ASC* (*ASC*^{-/-}); *NLRP3* (*NLRP3*^{-/-}), *AIM2* (*AIM2*^{-/-}), *NLRC4* (*NLRC4*^{-/-}) ou *IL1R* (*IL-1R*^{-/-}) foram criados e mantidos em estantes ventiladas com micro-isoladores, sob condições controladas de umidade, iluminação e temperatura (22 °C a 25 °C) e alimentados *ad libitum* com dieta regular no Biotério Setorial do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os camundongos *Casp1/11*^{-/-}, *ASC*^{-/-}, e *NLRC4*^{-/-} e os camundongos *AIM2*^{-/-}, *NLRP3*^{-/-} e *IL-1R*^{-/-} foram gentilmente fornecidos pela Dra. Karina Bortolucci (Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP) e pelo Dr. Dario Zamboni (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP), respectivamente. Os camundongos *AIM2*^{-/-} e *NLRP3*^{-/-} foram obtidos da empresa Genectech (EUA) e encontram-se na Universidade de São Paulo sob a responsabilidade do Dr. Claudio Marinho, possuindo os MTAs # OM-214010 e OM-129876, respectivamente.

O estudo foi realizado em conformidade com as recomendações do *Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa* do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP (Protocolo nº 58/12 nas fls. 128 do livro 2).

3.2.3.2 *Parasitos e infecção*

Camundongos machos com 6 a 8 semanas de idade foram infectados via intraperitoneal com 1×10^5 eritrócitos parasitados (EP) com a cepa de plasmódio murino *P. berghei* NK65 expressando, constitutivamente, a proteína fluorescente verde (*P. berghei* NK65^{GFP}) (SULTAN et al., 1999), obtidos de estoques congelados.

3.2.3.3 *Acompanhamento da parasitemia, mortalidade e sinais clínicos de SRDA*

A parasitemia foi determinada por citometria de fluxo (JANSE; VAN VIANEN, 1994), por meio da detecção de eritrócitos parasitados marcados com DRAQ5 (Abcam, Reino Unido), um marcador fluorescente vermelho com elevada afinidade por DNA e alta capacidade de penetração em células vivas (SMITH et al., 1999). A marcação de eritrócitos parasitados com DRAQ5 foi uma adaptação do protocolo do fabricante para análise do ciclo celular por citometria de fluxo (RODRIGUES-DUARTE et al., 2012). Assim, 5 μ L de sangue foram coletados da cauda dos camundongos infectados e adicionados a 400 μ L de tampão de marcação (2% de soro fetal bovino [SFB] e 0,05% de azida de sódio em solução tamponada de fosfato [PBS]).

O DRAQ5 foi adicionado à suspensão na concentração final de 1 μ M. As amostras foram delicadamente agitadas para permitir uma adequada incorporação do DRAQ5 ao DNA do parasita e a aquisição destas foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD Biosciences, EUA) utilizando o *software* “CellQuest” versão 5.2 (BD Biosciences, EUA). As parasitemias foram determinadas pelo *software* “FlowJo versão 10.07r2” (Tree Star, Ashland, EUA). Os eritrócitos não infectados não foram marcados por DRAQ5, pois eram desprovidos de DNA. A parasitemia foi expressa em percentual (%) de células marcadas dentro do *gate* para eritrócitos totais. Testes de correlação foram realizados para confirmar a similaridade entre os resultados obtidos por citometria de fluxo e aqueles observados nos esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Essa análise foi realizada através da contagem diferencial de 1.000 eritrócitos por esfregaço em 5 campos diferentes e 100.000 eritrócitos por citometria. O valor da parasitemia foi determinado pela porcentagem de cada contagem.

A mortalidade foi acompanhada diariamente para determinação da curva de sobrevida e a parasitemia a partir do 3º ou do 6º dia pós-infecção, diariamente ou

em intervalos de dois dias, de acordo com o experimento. Camundongos infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} ou não infectados foram monitorados diariamente quanto a sinais de SDRA, incluindo dispneia (EPIPHANIO et al., 2010).

3.2.3.4 *Eutanásia dos camundongos*

Quando necessário, os camundongos foram eutanasiados nos dias 0 (D0), 5 (D5) ou 7 (D7) pós-infecção. Para tanto foi administrada uma dose letal de uma solução composta por 150 mg/Kg de cetamina (Syntec, Brasil) e 15 mg/Kg de xilazina (Syntec, Brasil) via intraperitoneal.

3.2.3.5 *Necropsia e análise histopatológica*

Logo após o óbito, foi realizada a necropsia dos camundongos infectados com *P. berghei* NK65^{GFP}, para investigar a *causa mortis*. Foram analisados os aspectos macroscópicos dos pulmões e da cavidade torácica, objetivando evidenciar sinais clínicos de SDRA (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014). Posteriormente, os órgãos foram coletados e fixados em formalina 10% (v/v) tamponada (Sigma, EUA) e, em seguida, embebidos em parafina. Secções de 5µm foram cortadas e coradas com hematoxilina-eosina (H&E). Os cortes foram examinados em microscópio Zeiss convencional (Axioimage M2) acoplado a uma câmera Zeiss (AxioCamHRc). Foi avaliada a organização tecidual e a presença de hemorragia, edema e infiltrado inflamatório. Os pulmões de camundongos não infectados foram usados como controle.

3.2.3.6 *Avaliação da função pulmonar*

A função respiratória foi avaliada a partir da determinação da frequência respiratória (FR) e aumento da pausa respiratória (Penh) (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014). Para tanto, no 7º dia pós-infecção (início das mortes dos camundongos WT infectados), camundongos infectados e não infectados foram colocados individualmente em câmeras pletismográficas (Buxco Electronics, EUA) por 10 minutos (nível basal). Os dados foram coletados usando o *software* BioSystems XA (BuxcoElectronics, EUA), incluindo a FR (inspirações/minute) e variáveis para calcular o Penh, uma variável teórica que correlaciona a resistência pulmonar com a pressão intrapleural (HAMELMANN et al., 1997). O Penh foi calculado pela fórmula (LOMASK, 2006):

$$\text{Penh} = \frac{\text{Pico de Fluxo Expiratório}}{\text{Pico de Fluxo Inspiratório}} \times \frac{\text{Tempo de Expiração}}{\text{Tempo de Relaxamento} - 1}$$

3.2.3.7 *Ensaio de permeabilidade vascular pulmonar e edema*

Para investigar a permeabilidade vascular dos pulmões, no 7º dia pós-infecção foram administrados intravenosamente 0,2 mL de *Evans Blue* 1% (Sigma, Alemanha) em camundongos WT (DALLAL; CHANG, 1994). Após 45 minutos, os camundongos foram eutanasiados e os pulmões pesados e, em seguida, imersos em 2 mL de formamida (Merck, Alemanha) por 48 horas a 37°C. Posteriormente, a absorvência da formamida foi mensurada a 620 nm. A quantidade de *Evans Blue* captada por miligrama de tecido de pulmão foi calculada a partir de uma curva padrão. Além disso, os camundongos WT não infectados foram utilizados como controle.

3.2.3.8 *Obtenção de células esplênicas*

Para obtenção das células esplênicas, baços de camundongos eutanasiados foram macerados em 3 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, EUA). O material extraído ficou em repouso a 4°C por um período de 5 a 10 minutos e logo após foi centrifugado a 100 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as hemácias foram lisadas com 2 mL de uma solução tamponada de Tris-NH₄Cl (pH 7,65) por 2 minutos. Para inativação da lise foi adicionado 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e, em seguida, as células foram centrifugadas como descrito acima. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 2 mL meio de cultura RPMI suplementado com 3% de SFB ou em tampão de marcação, conforme o experimento.

3.2.3.9 *Obtenção de células do tecido pulmonar*

O tecido pulmonar total foi cortado em pequenos pedaços e digerido com uso de collagenase tipo II (2 mM) e DNase (1 mM) por 40 minutos em estufa a 37°C e 5% CO₂. Para bloquear a reação enzimática foi utilizado o meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Os pulmões foram macerados e filtrados com a ajuda de um êmbolo em *cell strainer* de 70 µm (BD Biosciences, EUA). Logo após, foi centrifugado a 100 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente

descartado e as hemácias foram lisadas como descrito no item 3.2.3.8. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de tampão de marcação.

3.2.3.10 *Extração proteica do tecido pulmonar*

Os lobos esquerdos dos pulmões dos camundongos foram imersos em 1 mL de PBS contendo coquetel de inibidores de proteases (Sigma, Alemanha) na concentração de 10 μ L/mL e macerados vigorosamente com auxílio de um triturador de tecido do tipo Dounce (Sigma, Alemanha), em gelo. Em seguida, o homogenato foi transferido para um tubo cônico de 2 mL e centrifugado a 16.000 g por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro recipiente, submetido a uma dosagem de proteínas totais por espectrofotometria, usando o espectrofotômetro Nanodrop® (ThermoScientific, EUA), e armazenado em alíquotas a -80°C até a análise das amostras.

3.2.3.11 *Cultura de células esplênicas*

Depois de realizada a coleta e processamento do baço, como descrito no item 3.2.3.8, foi verificada a viabilidade celular e realizada a contagem dos esplenócitos em solução de *Trypan Blue* (Invitrogen, EUA). Em seguida, os esplenócitos (3×10^6 células / 300 μ L) foram mantidos em meio RPMI 1.640 suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 μ g/mL), anfotericina B (2,5 μ g/mL); L-glutamina (2 mM), 2-mercaptoetanol (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e SFB (3%), a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado e armazenado em alíquotas a -80 °C até a análise das amostras.

3.2.3.12 *Imunofenotipagem e marcação de Caspase-1 ativa*

Depois do processamento das células do baço e dos pulmões, como descrito nos itens 3.2.3.8 e 3.2.3.9, respectivamente, foi verificada a viabilidade celular e realizada a contagem das células em solução de *Trypan Blue* (Invitrogen, EUA). Em seguida, os esplenócitos ou células pulmonares (1×10^6 células) foram distribuídos em placa com 96 poços com fundo “U” e submetidas à centrifugação a 100 g por 5 minutos. Depois, anticorpos monoclonais (BD PharMingen e Ebioscience, EUA) conjugados com fluorocromos e específicos para moléculas de superfície, tais como CD3 e CD19 para seleção negativa, CD11b e F4/80 para macrófagos foram

incubados por 30 minutos a 4 °C (1 µg Ac / 1 x 10⁶ células), protegido da luz. As placas foram novamente centrifugadas e lavadas com tampão de marcação.

Posteriormente, foram marcadas com a sonda fluorescente FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry Technologies, EUA) que se liga com alta afinidade à forma ativa da Caspase-1 (LIMA-JUNIOR et al., 2013; SMOLEWSKI et al., 2001), por 90 minutos, como recomendado pelo fabricante. Após esse período, as células foram lavadas por três vezes com tampão de marcação e a aquisição destas realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa (BDBiosciences, EUA) e analisadas por meio do *software* “FlowJo versão 10.07r2” (Tree Star, Ashland, EUA).

3.2.3.13 Sincronização e enriquecimento dos eritrócitos parasitados

Para a obtenção de formas maduras de *P. berghei* NK65^{GFP} (trofozoítos maduros e esquizontes), EPs foram sincronizados como descrito previamente (JANSE et al., 2006). Em resumo, EPs foram coletados de camundongos infectados e parasitemia entre 5 e 10%, por punção cardíaca e transferidos para meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 25% de SFB. Os EPs foram, subsequentemente, mantidos em cultura a 37 °C por 14 horas em uma atmosfera contendo 5% de CO₂, 85% de N₂, e 10% de O₂. Posteriormente, foram enriquecidos usando uma coluna de separação magnética (MiltenyiBiotec, Alemanha) para gerar uma população celular contendo aproximadamente 95% de EPs, como analisado por esfregaço delgado.

3.2.3.14 Obtenção de extrato de eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65

Eritrócitos parasitados enriquecidos como descritos no item 3.2.3.13, ou eritrócitos não parasitados, foram contados e ajustados a uma concentração final de 2 x 10⁸ / mL em meio RPMI contendo inibidor de proteases (Sigma, Alemanha) na concentração de 10 µL/mL. As suspensões celulares foram submetidas a cinco ciclos *freeze-thaw* para obtenção do lisado celular. As amostras foram alíquotadas e armazenadas a -80°C até o momento de uso.

3.2.3.15 Obtenção de DNA de *P. berghei* NK65

Para obtenção de DNA genômico (gDNA) foram utilizados eritrócitos parasitados enriquecidos como descrito no item 3.2.3.13. A extração foi realizada utilizando o *kit* de extração DNA *Blood Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), de acordo com

protocolo descrito pelo fabricante. A quantificação e a análise da qualidade do DNA foram determinadas usando o espectrofotômetro Nanodrop® (ThermoScientific, EUA).

3.2.3.16 *Obtenção de macrófagos peritoneais*

Quatro a cinco animais foram injetados intraperitonealmente com 5 mL de uma solução de amido de batata 1,5% (Sigma, EUA). Após cinco dias, as células peritoneais foram obtidas por lavagem peritoneal com PBS gelado (BASTOS et al., 2002). Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 200 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e, quando necessário, as hemácias foram lisadas como descrito no item 3.2.3.8. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 3% de SFB.

3.2.3.17 *Ensaio de ativação de macrófagos*

Após obtenção das células peritoneais, como descrito no item 3.2.3.16, foi verificada a viabilidade e realizada a contagem celular em solução de *Trypan Blue*. Para obtenção da população de células aderentes, as células peritoneais (5×10^5 células / 300 μ L) foram mantidas *overnight* em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 μ M), anfotericina B (2,5 μ M); L-glutamina (2 mM), 2-mercaptoetanol (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 3% SFB, a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37°C.

Para o ensaio de ativação, macrófagos peritoneais aderentes foram pré-estimulados com 0,5 μ M de LPS de *E. coli* (Sigma, EUA) por 3 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS a 37 °C e expostas a diferentes estímulos, como descrito previamente, com adaptações (KALANTARI et al., 2014). Para estimulação, extrato de eritrócitos parasitados (EP) foi adicionado à cultura, em uma proporção equivalente a 10 EPs para 1 macrófago (10:1), por 24 horas. Hemozoína sintética (Hz)(100 μ M) (InvivoGen, EUA), gDNA de *P. berghei* NK65^{GFP} (100 nM) e Poly (dA:dT) (2 μ M) (InvivoGen, EUA) foram adicionados por 12 horas. O gDNA e o Poly (dA:dT) foram carregados para dentro das células utilizando Lipofectamina® 2000 (1 μ M) (Invitrogen, EUA). Nigericina (10 μ M) (Invivogen, EUA) foi adicionada por 1 hora à cultura. Como controle, os macrófagos peritoneais

primados com LPS foram incubados somente com RPMI suplementado como descrito ou com extrato de eritrócitos não parasitados (EnP), por 24 horas. Ao final de cada período foi realizada a coleta dos sobrenadantes e armazenados em alíquotas a -80 °C para posterior dosagem das citocinas IL-1 α e IL-1 β .

3.2.3.18 *Quantificação de citocinas*

As citocinas IL-1 β e IL-1 α (Biolegend, EUA) e o fator de crescimento, VEGF (R&D Systems, EUA) foram mensuradas pelo método de ELISA de acordo com orientações do fabricante. As citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 foram quantificadas pela técnica *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o *kit Mouse Th1/Th2/Th17* (BD Biosciences, EUA), conforme determinações do fabricante. As concentrações das citocinas presentes nas amostras de soro ou sobrenadante de cultura de esplenócitos ou macrófagos peritoneais foram expressas em pg/mL. Para o macerado do tecido pulmonar, as concentrações foram expressas em pg (de citocina)/mg (de proteínas totais).

3.2.3.19 *Parâmetros hematológicos*

O número total de eritrócitos, a concentração total de hemoglobina e o hematócrito dos camundongos foram avaliados nos dias 0, 7, 14 e 21 pós-infecção. Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio 7,5%, como anticoagulante, e analisadas usando o *kit* V-53 (Mindray, China) e o Analisador Hematológico Automático BC-5300Vet (Mindray, China).

3.2.3.20 *Análise Estatística*

As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste de variância ANOVA *one-way* (pós-teste de Bonferroni) ou *two-way*; teste *t* de *Student* ou o teste de *log-rank*, para a análise da sobrevida, de acordo com cada situação, como descrito nas legendas das figuras. Os testes estatísticos foram feitos usando o *software* GraphPadPrism versão 5.0 (Graph-Pad Software, EUA). *P* valores < 0,05; < 0,01 e < 0,001 foram considerados estatisticamente significantes.

3.2.4 Resultados

3.2.4.1 *Camundongos C57Bl/6 infectados com P. berghei NK65 apresentam alta mortalidade e baixa parasitemia associadas ao desenvolvimento de SDRA-AM*

Apesar de provocarem uma alta mortalidade em indivíduos infectados com plasmódio, os mecanismos imunopatogênicos que conduzem à SDRA-AM ainda permanecem pouco compreendidos (VAN DEN STEEN et al., 2013).

Com o intuito de investigar a participação de componentes da resposta imune inata sob o desenvolvimento da SDRA-AM, inicialmente estabelecemos um modelo experimental para a síndrome similar ao desenvolvido por Van Den Steen et al., (2010). Isto posto, camundongos C57Bl/6 (WT) machos foram infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} e acompanhados diariamente, a fim de avaliar a progressão da doença até o óbito. Comprovadamente, essa cepa não induz malária cerebral em camundongos de fundo C57Bl/6 (BAPTISTA et al., 2010; VAN DEN STEEN et al., 2010).

A princípio, mostramos que a infecção por *P. berghei* NK65^{GFP} induz a uma taxa mortalidade de 100% em camundongos C57Bl/6 especialmente entre o 7º e o 11º dia pós-infecção, com mediana de sobrevida de 9 dias (**Figura 11A**). Esse resultado foi acompanhando de uma baixa parasitemia, com valores entre 3,7% e 9,3% durante janela de óbitos (**Figura 11B**), indicando uma alta letalidade da infecção por *P. berghei* NK65 em camundongos C57Bl/6.

Figura 11 – Camundongos C57Bl/6 (WT) infectados *P. berghei* NK65 apresentam alta taxa de mortalidade e baixa parasitemia.

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) foram infectados com 10^5 EPs e monitorados diariamente para avaliação da sobrevivência (**A**) e parasitemia (**B**). A curva de parasitemia foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5 a partir do 3º dia pós-infecção. A área em cinza representa o período no qual os camundongos infectados morrem. Os dados são apresentados com (**A**) a curva de sobrevivência de *Kaplan-Meier* ou (**B**) a média $\pm$ erro padrão da parasitemia de 18 camundongos.

Para determinar a *causa mortis* foi realizada a necropsia, pela qual mostramos que camundongos infectados apresentavam efusão pleural (**Figura 12A vs 12B**) e pulmões avermelhados, com aspecto hemorrágico (**Figura 12C vs 12D**) quando comparados aos animais do grupo controle. Em adição, houve um aumento médio do peso dos pulmões dos WT infectados (WT^{inf}) de 74% em relação ao peso dos controles não infectados (**Figura 12I**), sugerindo a presença de edema. De fato, no 7º dia pós-infecção (início da manifestação dos sinais clínicos de SDRA-AM) foi mensurada a permeabilidade vascular dos pulmões pelo ensaio de *Evans Blue*. Evidenciamos que camundongos WT infectados tiveram um maior extravasamento do corante para o tecido pulmonar (**Figura 12E vs 12F e 12J**). A análise histológica dos pulmões dos camundongos infectados reforçou esses achados, mostrando a presença de um acentuado edema alveolar e hemorragia no tecido pulmonar, características não observadas em pulmões de camundongos WT não infectados (**Figura 12G vs 12H**).

Figura 12 – Infecção por *P. berghei* NK65 induz SDRA-AM em camundongos C57Bl/6 (WT).

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) foram infectados ou não com 10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP}. Imagens representativas de camundongos sem (esquerda) ou com (direita) SDRA-AM mostrando efusão pleural (**A vs B**), hemorragia pulmonar (**C vs D**) e pulmões após marcação com Evans Blue (**E vs F**). Fotomicrografias da região alveolar, indicando edema e hemorragia pulmonar (**G vs H**). No 7º dia pós-infecção foi mensurado o peso dos pulmões (**I**) e a permeabilidade pulmonar (**J**) através do ensaio de *Evans Blue* de camundongos com (WT) ou sem (WT^{inf}) SDRA-AM. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 camundongos por grupo. *** $P < 0,001$ (Teste *t* de Student), comparado ao grupo controle não infectado

3.2.4.2 Camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei* NK65 apresentam alterações na função pulmonar

Para melhor caracterizar a fisiopatologia pulmonar durante a infecção, analisamos a pausa respiratória (Penh) e a frequência respiratória (FR) dos camundongos, no 7º dia pós-infecção. A FR reflete o volume de ar inalado ou exalado pelos pulmões em um minuto e o Penh busca avaliar a resistência pulmonar por intermédio de uma correlação entre as mudanças na pressão da caixa torácica durante a expiração e inspiração (LOMASK, 2006). Como mostrado anteriormente, esses parâmetros respiratórios estão alterados durante a SDRA-AM murina (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014). Similarmente, quando comparados ao grupo controle não infectado, camundongos WT com SDRA-AM (WT^{inf}) tiveram uma redução do Penh (**Figura 13A**) e aumento da frequência respiratória (**Figura 13B**), indicando uma disfunção respiratória nesses animais.

Figura 13 – Infecção por *P. berghei* NK65 altera parâmetros respiratórios em camundongos C57Bl/6 (WT).

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) foram infectados ou não com 10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP}. No 7º dia pós-infecção foi mensurada **(A)** pausa respiratória (Penh) e **(B)** a frequência respiratória de camundongos com (WT) ou sem (WT^{inf}) SDRA-AM. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 camundongos por grupo. *** $P < 0,001$ (Teste *t* de Student), comparado ao grupo controle não infectado.

3.2.4.3 Citocinas pró-inflamatórias estão elevadas em camundongos C57Bl/6 com SDRA-AM

Já é bem estabelecido que o desenvolvimento da SDRA-AM, tanto em seres humanos, quanto em modelos experimentais, está relacionado a um intenso processo inflamatório local e sistêmico (EPIPHANIO et al., 2010; ORTOLAN et al., 2014; VAN DEN STEEN et al., 2013). Para avaliar a resposta inflamatória na infecção por *P. berghei* NK65^{GFP}, investigamos o perfil das citocinas IL-1 β , IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 e do fator de crescimento VEGF, no dia zero (D0), no quinto (D5) e no sétimo (D7) dia pós-infecção. O *time point* D5 representa o período em que não se observam sinais clínicos de SDRA-AM, porém com parasitemia evidente. O D7 representa o início do período de manifestação clínica da disfunção respiratória e consequente óbito dos animais. O D0, por sua vez, foi usado como controle não infectado.

Para avaliação do processo inflamatório local foi realizada a dosagem das citocinas no extrato do tecido pulmonar (**Figura 14**). Quando comparadas ao D0, mostramos um aumento das concentrações de IL-1 β e VEGF logo no D5. Esse aumento de VEGF foi mantido no D7, porém houve uma redução de IL-1 β em relação ao D5, mantendo concentração similar ao D0. Apesar de não ter sido constatada alteração significativa das concentrações de IL-1 α , IFN- γ , TNF- α e IL-6 no D5 em relação ao D0, foi mostrada elevação significativa dessas citocinas no D7. Não houve alteração da concentração de IL-10 em nenhum dos *times points*, quando comparados ao D0.

Figura 14 – Pulmões de camundongos com SDRA-AM apresentam concentrações de citocinas pró-inflamatórias.

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) foram infectados ou não com 10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP}. Nos dias 0 (D0), 5 (D5) e 7 (D7) pós infecção foram coletados os lóbulos direito dos pulmões dos camundongos. Foi realizada a extração proteica para dosagem das citocinas IL-1 β e IL-1 α e o fator de crescimento, VEGF, por ELISA e IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10, por CBA. A quantificação de proteínas totais foi realizada por espectrofotometria óptica. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) one-way).

Buscando investigar a resposta inflamatória sistêmica, também mensuramos a concentração das citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos, *ex vivo* (**Figura 15**), e no soro (**Figura 16**) dos camundongos WT nos diferentes *times points*. Interessantemente, houve maior secreção de IL-1 β , VEGF, IFN- γ , TNF- α e IL-6 pelos esplenócitos no D5, quando comparado ao D0. No entanto, ocorreu uma diminuição desses valores no D7, ficando semelhantes ao observado no D0. Por outro lado, houve aumento da secreção de IL-1 α tanto no D5 quanto no D7, de forma tempo dependente, quando comparados ao D0. Analogamente ao mostrado nos pulmões, o perfil de secreção de IL-10 pelos esplenócitos não foi alterado entre os diferentes *times points*. Já no soro, verificou-se um perfil de citocinas diferente do observado na cultura de esplenócitos. Houve o aumento significativo de IL-1 α , VEGF, IFN- γ e IL-6 em D5, mantendo-se o aumento no D7, quando comparados ao D0. Em contrapartida, somente no D7 foi evidenciada elevação significativa das concentrações de TNF- α e IL-10. Cabe ressaltar que a IL-1 β sérica não foi detectada em nenhum dos *times points*.

Figura 15 – Esplenócitos de camundongos com SDRA-AM produzem elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias.

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) foram infectados ou não com 10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP}. Nos dias 0 (D0), 5 (D5) e 7 (D7) pós-infecção foram coletados os baços dos camundongos. Após processamento, os esplenócitos foram incubados a 37°C por 48 horas em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Foi realizada a dosagem citocinas IL-1 β e IL-1 α e o fator de crescimento, VEGF, por ELISA e IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10, por CBA, no sobrenadante das culturas. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) one-way).

Figura 16 – Camundongos com SDRA-AM apresentam elevadas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias.

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) foram infectados ou não com 10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP}. Nos dias 0 (D0), 5 (D5) e 7 (D7) pós-infecção foi coletado o sangue camundongos. Após processamento e obtenção do soro, foi realizada a dosagem das citocinas IL-1 β e IL-1 α e o fator de crescimento, VEGF, por ELISA e IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10, por CBA. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (Análise de variância (ANOVA) one-way).

3.2.4.4 Caspase-1 está ativada em macrófagos esplênicos e pulmonares de camundongos C57Bl/6 com SDRA-AM

Diferente das demais citocinas, que após a síntese proteica são imediatamente liberadas em resposta ao estímulo inflamatório, a IL-1 β é sintetizada somente na sua forma inativa – pró-IL-1 β . Para ser ativada e liberada a pró-IL-1 β precisa ser clivada pela Caspase-1 a qual, por sua vez, precisa estar ativada (KELLER et al., 2008; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Além disso, evidências sugerem que apesar de já ser sintetizada na sua forma ativa, a liberação de IL-1 α , é

dependente de Caspase-1 ativa (FETTELSCHOSS et al., 2011; GROSS et al., 2012).

Assim sendo, o passo seguinte foi mensurar a ativação de Caspase-1 em macrófagos presentes nos pulmões e no baço dos camundongos com ou sem SDRA-AM, utilizando uma sonda fluorescente (FAM-YVAD-FMK) que se liga com alta afinidade à forma ativa da Caspase-1 (LIMA-JUNIOR et al., 2013; SMOLEWSKI et al., 2001). Estes fagócitos são fundamentais na patogênese da SDRA-AM e conhecidos produtores de IL-1 β dependente de Caspase-1 (VALECHA et al., 2009; VAN DEN STEEN et al., 2010; WU et al., 2013).

Nossos resultados mostram que macrófagos F4/80⁺CD11b⁺CD3⁻CD19⁻ presentes no baço (**Figura 17**) e nos pulmões (**Figura 18**) de camundongos com SDRA-AM apresentam maior intensidade de fluorescência para FAM-YVAD (**Figura 17A, 18A**) quando comparados aos controles não infectados, indicando que a infecção induz um aumento da ativação de Caspase-1 nessas células. Em concordância, também houve maior frequência de macrófagos expressando Caspase-1 ativa, tanto nos baços (**Figura 17B**), quanto nos pulmões (**Figura 18B**) de camundongos com SDRA-AM.

Figura 17 – Caspase-1 está ativada em macrófagos esplênicos de camundongos com SDRA-AM.

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) foram infectados ou não com 10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP}. No 7º dia pós-infecção foi realizada a coleta do baço dos camundongos com (verde) ou sem (cinza) SDRA-AM. Após processamento, os esplenócitos foram marcados com anticorpos anti-F4/80 e anti-CD11b conjugado, respectivamente com APC e PerCP. Anticorpos anti-CD3 e anti-CD19 conjugados com PE foram usados para seleção negativa. Posteriormente foram marcadas com FAM-YVAD por 90 minutos para análise por citometria de fluxo. **(A)** Imagem ilustrativa do histograma. Foram quantificadas **(B)** a média geométrica da intensidade de fluorescência (MFI) e a frequência de macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺CD3⁻CD19⁻) FAM-YVAD⁺ **(C)**. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 camundongos por grupo. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Teste t de *Student*), comparado ao grupo controle não infectado.

Figura 18 – Caspase-1 está ativada em macrófagos pulmonares de camundongos com SDRA-AM.

Camundongos machos C57Bl/6 (WT) foram infectados ou não com 10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP}. No 7º dia pós-infecção foi realizada a coleta dos pulmões dos camundongos com (verde) ou sem (cinza) SDRA-AM. Após processamento, as células pulmonares foram marcadas com anticorpos anti-F4/80 e anti-CD11b conjugado, respectivamente, com APC e PerCP. Anticorpos anti-CD3 e anti-CD19 conjugados com PE foram usados para seleção negativa. Posteriormente foram marcadas com FAM-YVAD por 90 minutos para análise por citometria de fluxo. **(A)** Imagem ilustrativa do histograma. Foram quantificadas **(B)** a media geométrica da intensidade de fluorescência (MFI) e a frequência de macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺CD3⁻CD19⁻) FAM-YVAD⁺ **(C)**. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de cinco camundongos por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (Teste *t* de Student), comparado ao grupo controle não infectado.

3.2.4.5 Desenvolvimento de SDRA-AM em camundongos C57Bl/6 é dependente de MyD88 e Caspase-1

Considerando a evidente relação entre o desenvolvimento de SDRA-AM nos camundongos WT e o aumento de VEGF, IFN- γ , TNF- α , IL-6 e, especialmente, IL-1 β e IL-1 α , decidimos avaliar a contribuição da molécula adaptadora MyD88 e da Caspase-1 para o desenvolvimento do quadro clínico da síndrome. Isso porque MyD88 é uma molécula adaptadora chave para sinalização induzida por TLRs e IL-1R (WARNER; NUNEZ, 2013), essencial para a montagem da resposta inflamatória

na infecção por plasmódio e desenvolvimento de quadros mais severos da doença (BARBOZA et al., 2014; FRANKLIN et al., 2009). Já a Caspase-1, como reportado, é fundamental para a liberação da forma ativa da IL-1 β .

Camundongos MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} foram infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} e avaliados quanto ao desenvolvimento de SDRA-AM. Os camundongos WT infectados foram usando como controle. Foi estabelecido que a morte de camundongos entre o 7º e 12º dia, com baixa parasitemia e presença de efusão pleural, como decorrente do desenvolvimento de SDRA-AM. Logo, quando comparados aos controles WT, foi evidenciado que camundongos MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} tiveram um aumento significativo da curva de sobrevida (**Figura 19A**), indicando a contribuição de ambas as moléculas no desenvolvimento da SDRA-MA.

Em adição, camundongos MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} tiveram aumento gradativo da parasitemia, com picos de 65% e 56%, respectivamente (**Figura 19B**). De fato, diferente dos camundongos WT, cuja necropsia evidenciou presença de efusão pleural e pulmões hemorrágicos, camundongos MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-}, apresentaram ausência de hidrotórax e pulmões com tamanho normal, com aspecto acinzentado e pálido, sugestivo de anemia (**Figura 20**). Para confirmar esta hipótese, avaliamos os parâmetros hematológicos dos camundongos WT, MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} no 7º, 14º e 21º dia pós-infecção, quando possível. O dia 0 foi usado como controle. Foi demonstrado que não houve diferença entre o dia 0 e 7º dia, quanto ao número de eritrócitos totais, à concentração total de hemoglobina e hematócrito (**Figura 21**). No entanto, os valores médios desses parâmetros foram reduzidos progressivamente no 14º e 21º dia pós-infecção dos camundongos MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-}, quando comparados ao dia 0 (**Figura 21**). Não foi possível a análise hematológica dos camundongos WT nesses dois últimos *times points*, pois todos os camundongos foram a óbito até o 11º dia pós-infecção.

Figura 19 – Letalidade precoce da infecção por *P. berghei* NK65 depende de MyD88 e Caspase-1.

Camundongos machos WT, MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} foram infectados com 10⁵ EPs e monitorados diariamente para avaliação **(A)** da sobrevivência e **(B)** da parasitemia. A curva parasitemia foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5 a partir do 3º dia pós-infecção. A área em cinza representa o período no qual os camundongos morrem em consequência da SDRA-AM. Os dados são apresentados com **(A)** a curva de sobrevivência ou **(B)** a média ± erro padrão de 10 a 18 camundongos por grupo. ** P < 0,01; *** P < 0,001 ((**A**) Curva de *Kaplan-Meier*, teste de *Log-rank* [Mantel-Cox]), comparado ao grupo WT.

Figura 20 – Quadro clínico de camundongos com SDRA-AM depende de MyD88 e Caspase-1.

Camundongos machos WT, MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} foram infectados com 10^5 EPs e monitorados diariamente até o 7º (WT) ou 21º (MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-}) dia pós-infecção. Imagens ilustrativas da cavidade torácica de camundongos WT, MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} infectados *P. berghei* NK65^{GFP}, indicando presença ou não de exsudado pleural, aumento do volume e aspecto avermelhado dos pulmões.

Figura 21 – Infecção por *P. berghei* NK65 induz anemia severa em camundongos deficientes de MyD88 e Casp1/11.

Camundongos machos WT, MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} foram infectados com 10⁵ EPs com *P. berghei* NK65^{GFP}. Nos dias 0, 7, 14 e 21 pós-infecção foi coletado o sangue dos camundongos por via retro orbital e mensurado o número de eritrócitos totais hemoglobina total e hematócrito. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 camundongos por grupo. *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) two-way), comparado ao dia zero (D0) e considerando a mesma linhagem.

3.2.4.6 *P. berghei* NK65 e seus PAMPs induz secreção de IL-1 β e IL-1 α por macrófagos peritoneais, por um mecanismo dependente de MyD88 e Caspase-1

Por propormos que a ativação de macrófagos e consequente secreção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 β e IL-1 α , tem papel central no desenvolvimento da SDRA-AM, nós investigamos se o extrato de eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65^{GFP} (EP) e seus PAMPs (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) – hemozoína (Hz) e DNA genômico (gDNA) –, induzem a liberação de IL-1 β e IL-1 α dependente de MyD88 e Caspase-1. Esses PAMPs têm sido mostrados como indutores da secreção de IL-1 β dependente de Caspase-1 (DOSTERT et al., 2009; KALANTARI et al., 2014; SHIO et al., 2009). Para tanto, macrófagos peritoneais de camundongos WT, MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} foram primados com LPS, o qual induz a síntese de pró-IL-1 β e IL-1 α via TLR4/MyD88 (CHOW et al., 1999; KALANTARI et al., 2014). Como mostrado na **Figura 22A**, os EPs induziram um aumento médio de 119,0% e 57,2%, da concentração de IL-1 β , em relação aos macrófagos de camundongos WT não estimulados ou aos estimulados com eritrócitos não parasitados (EnP), respectivamente.

Perfil similar foi observado após o estímulo com Hz sintética, cujo sobrenadante apresentou concentração de IL-1 β 143,5% maior que no dos macrófagos não estimulados. Notavelmente, macrófagos de camundongos WT transfectados com gDNA de *P. berghei* NK65^{GFP} apresentaram concentração média de IL-1 β , aproximadamente 150 e 100 vezes maior que nos macrófagos incubados apenas com Meio ou EnP, respectivamente. Nesse experimento também usamos Nigericina (Nig) e Poly (dA:dT), os quais induzem ativação de Caspase-1, por diferentes vias, e a consequente liberação de IL-1 β (HORNUNG et al., 2009; MARIATHASAN et al., 2006). Ambos induziram secreção de IL-1 β similar aos macrófagos estimulados com gDNA. Já macrófagos de camundongos MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} não apresentaram secreção significativa de IL-1 β com nenhum dos estímulos utilizados. Apesar de menos expressivo, o perfil de secreção de IL-1 α após os diferentes estímulos, seguiu padrão similar à IL-1 β (**Figura 22B**).

Os macrófagos WT estimulados com EP tiveram produção média de IL-1 α , 72,5% e 21,7% maior que os não estimulados (Meio) ou estimulados com EnP, respectivamente. Já os sobrenadantes de macrófagos estimulados com Hz

apresentaram um aumento médio de 68,1% em relação aos incubados apenas com meio. Convém lembrar que tanto gDNA quanto os controles Nigericina e Poly (dA:dT) induziram a produção de altas concentrações de IL-1 α por macrófagos de camundongos WT, quando comparados aos não estimulados (Meio: 230,6 pg/mL $\pm$ 9,1 vs gDNA: 2871,0 $\pm$ 258,4; Nig: 2974,0 $\pm$ 14,5 e 2516,0 $\pm$ 206,2).

Por outro lado, independentemente do estímulo utilizado, a IL-1 α não foi detectada no sobrenadante de nenhuma das culturas de macrófagos de camundongos MyD88^{-/-}. No sobrenadante de macrófagos de camundongos Casp1/11^{-/-} estimulados com EP e Hz, houve uma redução expressiva de IL-1 α em relação aos macrófagos não estimulados. Além disso, a concentração de IL-1 α foi duas vezes menor nos macrófagos de camundongos Casp1/11^{-/-} estimulados com gDNA em comparação aos WT na presença do mesmo estímulo, ainda que expressivamente maior que nos macrófagos não estimulados.

Figura 22 – MyD88 e Caspase-1 estão envolvidas na produção de IL-1 β e IL-1 α por macrófagos estimulados com PAMPs do plasmódio.

Macrófagos peritoneais de camundongos WT, MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} foram primados com 0,5 μ M de LPS por 3 horas e incubados por 24 horas na presença ou não de extrato de eritrócitos não parasitados (EnP) e eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 (EP); por 12 horas na presença Hemozoína sintética (Hz) (100 μ M) e gDNA *P. berghei* NK65^{GFP} (100 nM) transfectado. Como controle positivo foi utilizado Nigericina (10 μ M) (1 hora) e Poly (dA:dT) (2 μ M) transfectado (12 horas). EnP e EP foram usados em proporção equivalente a 10 parasitas/macrófago. A dosagem de (A) IL-1 β e (B) IL-1 α foi realizada por ensaio de ELISA. São mostrados dados representativos três experimentos independentes feitos em triplicata.

3.2.4.7 *P. berghei* NK65 e seus PAMPs induz secreção de IL-1 β e IL-1 α por macrófagos peritoneais, por um mecanismo dependente dos inflamassomas NLRP3 e AIM2

A ativação de Caspase-1 é dependente da formação de um complexo multiproteico denominado inflamassoma, a partir da ativação de diversos receptores intracelulares, como NLRP3, NLRC4 e AIM2 dentre outros (GAZZINELLI et al., 2014; KHARE et al., 2010). Com isso, para determinar qual inflamassoma é responsável pela ativação de Caspase-1 em resposta a EP com *P. berghei* NK65^{GFP} ou a seus PAMPs, nós avaliamos a produção de IL-1 β e IL-1 α , *in vitro*, por macrófagos de camundongos deficientes dos receptores NLRP3, NLRC4 e AIM2 e da molécula adaptadora ASC, pré-estimulados com LPS. Nigericina e Poly (dA:dT), conhecidos ativadores dos inflamassomas NLRP3 e AIM2, respectivamente, bem como eritrócitos não infectados foram usados como controle negativo (HORNUNG et al., 2009; MARIATHASAN et al., 2006). Como mostrado na **Figura 23A**, foi evidenciado que, diferente dos WT, macrófagos de camundongos ASC^{-/-} não tiveram secreção significativa de IL-1 β com nenhum dos estímulos utilizados.

Além disso, nossos resultados indicam que a produção de IL-1 β é dependente dos receptores NLRP3 e AIM2, mas não de NLRC4. Macrófagos de camundongos NLRP3^{-/-} não tiveram produção expressiva de IL-1 β após estímulo com extrato de EP e Hz, nem com nigericina. Por outro lado, foi mantida uma alta produção IL-1 β após transfecção com gDNA ou poly (dA:DT). Em oposição, macrófagos de camundongos AIM2^{-/-} estimulados com gDNA ou poly (dA:dT) tiveram uma redução expressiva na concentração de IL-1 β . Em relação à produção de IL-1 α (**Figura 23B**), nossos resultados sugerem um padrão diferente ao observado quanto à produção de IL-1 β em determinadas circunstâncias.

Semelhante ao observado anteriormente em macrófagos de camundongos Casp1/11^{-/-} (**Figura 22B**), houve uma redução das concentrações de IL-1 α no sobrenadante da cultura de macrófagos de camundongos ASC^{-/-} em comparação aos macrófagos de camundongos WT, com o mesmo estímulo. Contudo, ainda estavam elevadas quando comparadas aos macrófagos não estimulados da mesma linhagem. Vale enfatizar que a ausência de AIM2 induziu uma redução na concentração de IL-1 α , em face de todos os estímulos, entretanto ainda mantendo uma concentração elevada no sobrenadante de macrófagos estimulados com gDNA, nigericina e poly (dA:dT). Já em macrófagos de camundongos NLRP3^{-/-} e NLRC4^{-/-}, as concentrações de IL-1 α com diferentes estímulos seguiram padrões similares a IL-1 β .

Figura 23 – Inflamassomas AIM2 e NLRP3 estão envolvidas na produção de IL-1 β e IL-1 α por macrófagos estimulados com PAMPs do plasmódio.

Macrófagos peritoneais de camundongos WT, ASC^{-/-}, NLRC4^{-/-}, NLRP3^{-/-} e AIM2^{-/-} foram primados com 0,5 μ M de LPS por 3 horas e incubados: por 24 horas na presença ou não de extrato de eritrócitos não parasitados (EnP) e eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 (EP); por 12 horas na presença Hemozoína sintética (Hz) (100 μ M) e gDNA *P. berghei* NK65^{GFP} (100 nM) transfectado. Como controle positivo foi utilizado Nigericina (10 μ M) (1 hora) e Poly (dA:dT) (2 μ M) transfectado (12 horas). EnP e EP foram usados em proporção equivalente a 10 parasitas/macrófago. A dosagem de **(A)** IL-1 β e **(B)** IL-1 α foi realizada por ensaio de ELISA. São mostrados dados representativos três experimentos independentes feitos em triplicata.

3.2.4.8 O desenvolvimento de SDRA-AM em camundongos C57Bl/6 é dependente do inflamassoma AIM2

Após constatarmos a importância dos inflamassomas na secreção de IL-1 β e IL-1 α na presença de eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65^{GFP} ou seus PAMPs, o passo seguinte foi investigar a contribuição dos receptores NLRP3, NLRC4 e AIM2, e da molécula adaptadora ASC, no desenvolvimento da SDRA-AM. Analogamente aos experimentos anteriores, a avaliação foi realizada através do acompanhamento da sobrevida e parasitemia de camundongos ASC^{-/-}, NLRP3^{-/-}, NLRC4^{-/-} e AIM2^{-/-} infectados com *P. berghei* NK65^{GFP}, com base nos parâmetros determinados anteriormente.

Em paralelo ao observado nos camundongos Casp1/11^{-/-} (**Figura 22A**), camundongos ASC^{-/-} e AIM2^{-/-} tiveram aumento significativo da curva de sobrevivência (**Figura 24A**), indicando a participação do inflamassoma AIM2 (AIM2-ASC-Casp1) no desenvolvimento da SDRA-AM. Esses camundongos ASC^{-/-} e AIM2^{-/-} tiveram uma mediana de sobrevida de 15 e 28 dias, respectivamente, com óbito associado a um quadro de hiperparasitemia (**Figura 24B**). Por outro lado, apesar de termos mostrado que receptor NLRP3 é sensível à hemozoína, um PAMP do parasita, nossos resultados apontam que este não contribui para o desenvolvimento de SDRA-AM. Semelhante aos camundongos WT e NLRC4^{-/-}, camundongos deficientes de NLRP3 tiveram uma baixa parasitemia e foram a óbito entre o 7º e 12º dia, com sinais de SDRA (**Figura 24A e 24B**).

Figura 24 – Desenvolvimento de SDRA-AM em camundongos depende do inflamassoma AIM2.

Camundongos machos WT, ASC^{-/-}, NLRC4^{-/-}, NLRP3^{-/-} e AIM2^{-/-} foram infectados com 10^5 EPs e monitorados diariamente para avaliação **(A)** da sobrevivência e **(B)** da parasitemia. A curva parasitemia foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5 a partir do 6º dia pós-infecção. A área em cinza representa o período no qual os camundongos morrem em consequência da SDRA-AM. Os dados são apresentados com **(A)** a curva de sobrevivência ou **(B)** a média $\pm$ erro padrão de 10 a 18 camundongos por grupo. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; comparado ao grupo WT. ### $P < 0,001$; comparado ao grupo NLRP3. § § $P < 0,01$; comparado ao grupo NLRC4. **(A)** Curva de *Kaplan-Meier*, teste de *Log-rank* (Mantel-Cox).

3.2.4.9 *Receptor de IL-1 não contribui para o desenvolvimento de SDRA-AM*

Por evidenciarmos que o inflamassoma AIM2 (AIM2-ASC-Casp1) contribui para o desenvolvimento de SDRA-AM, sugerindo uma participação de IL-1 β e/ou IL-1 α , nós investigamos se o receptor para IL-1 (IL-1R) era importante para o desenvolvimento da síndrome, utilizando camundongos IL-1R^{-/-}. Interessantemente, apesar do aumento de cerca de 20% na sobrevivência dos animais, a ausência do IL-1R não alterou de modo significativo o desenvolvimento de SDRA-AM nos camundongos (**Figura 25A**). Os animais que não morreram em decorrência da síndrome nos estágios iniciais da infecção, foram a óbito entre o 15º e 31º dia pós-infecção, com parasitemia média entre 16,0% e 44,2% (**Figura 25B**).

Figura 25 – Desenvolvimento de SDRA-AM em camundongos independente do IL1R.

Camundongos machos WT e IL1R^{-/-} foram infectados com 10^5 EPs e monitorados diariamente para avaliação **(A)** da sobrevivência e **(B)** da parasitemia. A curva parasitemia foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5 a partir do 6º dia pós-infecção. A área em cinza representa o período no qual os camundongos morrem em consequência da SDRA-AM. Os dados são apresentados com **(A)** a curva de sobrevivência ou **(B)** a média $\pm$ erro padrão de 9 a 18 camundongos por grupo. **(A)** Curva de *Kaplan-Meier*, teste de *Log-rank* (Mantel-Cox).

3.2.5 Discussão

Apesar do aumento de estudos visando compreender a SDRA-AM, os mecanismos patogênicos envolvidos ainda não estão completamente elucidados. Aqui, usando um modelo experimental, mostramos, pela primeira vez, que a via MyD88 e o inflamassoma AIM2 (AIM2-ASC-Caspase-1) estão envolvidos no desenvolvimento da SDRA-AM, por um mecanismo independente do IL-1R.

Para avaliar o envolvimento dessas diferentes vias de sinalização na progressão da SDRA-AM, a princípio estabelecemos um modelo semelhante ao desenvolvido por Van Den Steen et al., (2010). Em analogia ao mostrado anteriormente por nosso grupo utilizando um modelo de DBA/2, camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei* NK65 desenvolvem um quadro característico de SDRA-AM, com aumento da permeabilidade vascular, presença de edema pulmonar, intensa efusão pleural e alteração dos parâmetros respiratórios (Penh e frequência respiratória), indo a óbito entre o 7º e 10º dia pós-infecção (EPIPHANIO et al., 2010).

No modelo proposto por Epiphany et al., (2010) a taxa de desenvolvimento de SDRA em camundongos DBA/2 varia entre 60% e 70%, com óbitos até o décimo segundo dia de infecção e parasitemia entre 30% e 50%. Já, Van Den Steen et al., (2010), usando a mesma linhagem de camundongos e cepa de plasmódio do nosso estudo, estabeleceu uma taxa de SDRA entre 70% e 80% e 15% e 25% de parasitemia. Notavelmente, em nosso modelo, obtivemos 100% de óbitos decorrentes de SDRA, os quais ocorreram entre o 7º e 10º dia pós-infecção; contribuindo consideravelmente para a avaliação dos diferentes parâmetros imunológicos sem necessidade de utilização do modelo preditivo (ORTOLAN et al., 2014). Diferente dos estudos anteriores, essa alta taxa de letalidade está associada a uma baixa parasitemia, com valores entre 3,7% e 9,3%. Esses resultados são bastante interessantes, pois reforça o fato de que alguns pacientes com malária desenvolverem SDRA durante ou até mesmo após o tratamento antimalárico; quando a parasitemia está claramente mais baixa ou até mesmo nula, sugerindo que uma reação inflamatória persistente induza o quadro característico de SDRA (ANSTEY et al., 2002, 2007).

Tem sido mostrado que a exacerbação da resposta inflamatória está diretamente relacionada ao desenvolvimento da SDRA-AM. Um estudo realizado em

uma região endêmica mostrou que cerca de 30% dos pacientes com malária grave causada por *P. vivax* apresentaram falência respiratória aguda e que a severidade da doença está associada a um aumento sérico de IFN- γ e TNF- α (ANDRADE et al., 2010). Perfil inflamatório semelhante também é observado em modelos murinos. Utilizando um modelo típico de malária cerebral, Souza et al., (2013) mostraram que camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei* ANKA apresentam dano no tecido pulmonar, infiltrado inflamatório e edema intersticial, logo nos primeiros dias de infecção. Em associação, esses animais apresentaram um aumento local de IFN- γ , TNF- α e CXCL1.

Já em um modelo específico para SDRA-AM verificou-se uma elevada expressão pulmonar de IFN- γ , TNF- α , IL-10, KC, MIP-2 e IL-10 relacionada à progressão da síndrome (VAN DEN STEEN et al., 2010). Similarmente, evidenciamos um aumento local e sistêmico das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , IL-6 e do fator de crescimento VEGF nos camundongos com ARDS, porém com diferenças quanto à cinética. Cabe frisar que o aumento de IL-1 β pulmonar só ocorreu somente no 5º dia pós-infecção, quando o quadro de SDRA ainda não se encontra estabelecido. Em contrapartida, as demais citocinas pró-inflamatórias também estavam elevadas no 7º dia – início das manifestações clínicas da SDRA-AM –, tanto no pulmão, quanto no soro.

Diferente de outras citocinas, que geralmente afetam de forma direta a função, diferenciação e expansão de linfócitos, a IL-1 β age de forma indireta, sendo hábil em induzir a expressão gênica e síntese de moléculas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-6 e de VEGF (DINARELLO, 2009). Como isso, a redução de IL-1 β , no 7º dia, a concentrações basais, sugere que após sua produção precoce (5º dia), seja no pulmão, seja no baço, a citocina seja consumida mais intensamente, contribuindo para o aumento da resposta inflamatória e dado pulmonar no 7º dia. Em adição, a capacidade de produção de citocinas acima da concentração basal somente por esplenócitos provenientes de camundongos com 5 dias de infecção, indica que a progressão da infecção induz uma disfunção nessas células. Entretanto, essa ativação apenas no 5º dia, mostrou-se suficiente para o desencadeamento da falência respiratória.

Corroborando com o aumento de IL-1 β no baço e nos pulmões, mostramos que macrófagos de camundongos com SDRA presentes no baço e nos pulmões

apresentam um aumento de Caspase-1 ativa. Esse resultado indica que pode haver processamento de pró-IL-1 β a IL-1 β ativa nesses órgãos e sugere a participação da Caspase-1 no desenvolvimento da SDRA-AM.

Para avaliar a contribuição das vias de síntese e ativação da IL-1 β na patogênese da SDRA-AM, investigamos o papel da molécula MyD88 e da Caspase-1 em nosso modelo experimental. Notavelmente, camundongos deficientes de MyD88 ou Caspase-1 apresentaram menor frequência de SDRA e, conseqüentemente, maior sobrevida. Sendo a proteína MyD88, essencial para a via de sinalização da maioria dos TLRs (TAKEDA; AKIRA, 2005) e a Caspase-1 fundamental para liberação da IL-1 β ativa (SCHRODER; TSCHOPP, 2010), esses resultados sugerem que a ausência dessas moléculas reduz a resposta inflamatória causada pela infecção, especialmente a ação da IL-1 β , restringindo a injúria do tecido pulmonar.

De fato, macrófagos peritoneais deficientes de *MyD88* ou de *Caspase-1* e estimulados com extrato de eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 ou seus PAMPs (hemozoína ou DNA genômico) não secretam concentrações expressivas de IL-1 β ou IL-1 α , corroborando com os resultados *in vivo*. Nossos resultados divergem dos observados por Togbe et al., (2007) que mostraram, utilizando o modelo de malária cerebral, que a inflamação pulmonar e o extravasamento vascular independe da via de sinalização TLR/MyD88. Por outro lado, tem sido mostrado que o MyD88 ou o TLR4 medeiam a LPA induzida por bleomicina (GASSE et al., 2007) ou por HMGB-1 (DENG et al., 2013), respectivamente, através da inibição da resposta inflamatória pulmonar, semelhante ao observado em nosso estudo.

O efeito da Caspase-1 na malária severa ainda é controverso. Tem sido mostrado que a indução de malária cerebral em modelo murino é independente da Caspase-1 (KORDES; MATUSCHEWSKI; HAFALLA, 2011; REIMER et al., 2010). Por outro lado, semelhante ao nosso modelo de SDRA-AM, Ataide et al., (2014) mostraram que a ausência de Caspase-1 aumenta a sobrevida de camundongos em um modelo de coinfeção bacteriana com *P. chabaudi*. Paralelamente, a Caspase-1 é importante na LPA induzida por LPS, por um mecanismo relacionado à modulação da apoptose de células endoteliais e neutrófilos (KAWASAKI et al., 2000; ROWE et al., 2002), o que também corrobora com nossos resultados.

Em contraste aos que desenvolveram SDRA-AM, camundongos deficientes de MyD88 ou Caspase-1 foram a óbito entre o 12º e 30º dia pós-infecção, com um

quadro de hiperparasitemia, acompanhado de anemia severa. Esse resultado reflete o paradoxo da resposta inflamatória diante da malária, pois apesar de contribuir para o desenvolvimento de formas mais graves da doença, também se revela essencial para o controle da parasitemia (SCHOFIELD; GRAU, 2005). Logo, era de se esperar que a inexistência de uma resposta inflamatória eficaz devido à ausência dessas relevantes moléculas da imunidade inata, tenha contribuído para a cronicidade da infecção, com um progressivo aumento da parasitemia (CRAMER et al., 2008; GOWDA; WU; GOWDA, 2012).

Contudo, já é estabelecido que uma alta parasitemia pode levar ao quadro de anemia severa, principalmente relacionado à ruptura e ao aumento do sequestro dos eritrócitos infectados na periferia e à inibição da eritropoiese, por um mecanismo dependente de altas concentrações de hemozoína (PERKINS et al., 2011; THAWANI et al., 2014). O baixo número de eritrócitos dificulta o transporte de oxigênio para o tecido, acarretando à morte do camundongo. Esse quadro poderia ser revertido caso fosse realizada uma transfusão sanguínea nos camundongos reestabelecendo a homeostasia (YAP; STEVENSON, 1994).

Tendo sido mostrado que a Caspase-1 é essencial para o desenvolvimento da SDRA-AM murina, o passo seguinte foi determinar quais inflamassomas contribuem para a manifestação da síndrome. Similarmente ao evidenciado em outros estudos, mostramos que hemozoína e DNA genômico de *P. berghei* NK65 induzem a produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais, por um mecanismo dependente dos inflamassomas NLRP3 e AIM2, respectivamente. Apesar de ainda não estar claro o mecanismo de ativação do NLRP3 via hemozoína, tem sido sugerida uma ação indireta mediada pela liberação de ácido úrico (GRIFFITH et al., 2009) e/ou ativação de catepsina B (DOSTERT et al., 2009; SHIO et al., 2010). A hemozoína também contribui para a passagem de DNA genômico do parasito para o interior da célula, o qual interage diretamente com o receptor AIM2, promovendo recrutamento de ASC, ativação de Caspase-1 e liberação de IL-1 β pelos macrófagos (KALANTARI et al., 2014).

Em consonância com esses resultados, mostramos que o inflamassoma AIM2 (AIM2/ASC/Caspase-1) tem uma importante contribuição na patogênese da SDRA-AM. Semelhante ao evidenciado em camundongos deficientes de Caspase-1, a ausência de AIM2 ou ASC aumentou a sobrevivência dos camundongos infectados com *P. berghei* NK65, associada a um aumento progressivo da parasitemia.

Tanto no baço quanto no tecido pulmonar de camundongos infectados com *P. berghei* pode ser encontrado DNA do parasito (PEREIRA, 2012) que, ao ser transferido para o meio intracelular de macrófagos, geralmente complexado com hemozoína, ativa inflamassoma AIM2, potencializando a resposta inflamatória (KALANTARI et al., 2014). Sendo, o DNA do parasito um potente ativador do AIM2, inclusive em baixas concentrações, é justificável a intensa resposta inflamatória nos camundongos com SDRA-AM, mesmo com uma baixa parasitemia. Por outro lado, a resposta inflamatória mediada pelo NLRP3 depende de altas concentrações de hemozoína (GRIFFITH et al., 2009). Como em nosso modelo, há um baixo acúmulo de hemozoína nos camundongos responsável por desenvolver a falência respiratória (*dados não mostrados*), é aceitável que esse inflamassoma não tenha contribuído para o desenvolvimento da síndrome. Contudo, o inflamassoma NLRP3 tem sido mostrado como primordial para o desenvolvimento de SDRA por outras causas, que não malária; fundamentalmente associada à ativação por altas concentrações de ácido úrico (GASSE et al., 2009), um potente ativador desse inflamassoma (SHI; MUCSI; NG, 2010).

Assim, os resultados indicam uma significativa contribuição da via MyD88 e do inflamassoma AIM2 na SDRA-AM, presumivelmente associada à ação efetora da IL-1 β . Entre outras funções, essa citocina é capaz de suprarregular a expressão VEGF (JUNG et al., 2001; TANAKA et al., 2000).

Cabe enfatizar que, em nosso modelo, observamos um substancial aumento de VEGF em camundongos com SDRA. Resultados semelhantes foram observados por Epiphany et al., (2010), utilizando o modelo com DBA2. Esse fator de crescimento é conhecido por ser um potente regulador da permeabilidade vascular, possuindo a habilidade de induzir extravasamento vascular (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003), um dos sinais mais característicos da SDRA (MATTHAY; ZEMANS, 2011). De fato, no trabalho de Epiphany et al., (2010), os autores mostraram que os elevados níveis séricos de VEGF em camundongos com SDRA-MA estão correlacionados com a expressão do seu mRNA no baço; apontando esse órgão como principal produtor desse fator de crescimento e fundamental para a evolução da falência respiratória. Interessantemente, nesse trabalho não houve aumento significativo da expressão de VEGF nos pulmões.

Em contraposição, nossos dados indicam um aumento progressivo de VEGF também no pulmão. Contudo, é importante ressaltar que, diferente de Epiphany et

al., (2010), nós quantificamos a proteína e não o mRNA. Logo, é possível que VEGF presente nos pulmões seja proveniente do baço, visto evidenciarmos que as células desse órgão são capazes de produzir esse fator de crescimento logo no 5º dia pós-infecção. Em pacientes com SDRA não malárica, a concentração plasmática de VEGF está consideravelmente elevada e correlaciona-se com uma baixa sobrevida do paciente (THICKETT et al., 2001). Além disso, tem sido sugerido que o polimorfismo do gene *VEGF* está associado ao desenvolvimento de SDRA humanos (MEDFORD et al., 2005).

Desse modo, os resultados sugerem uma relação entre a liberação IL-1 β dependente do inflamassoma AIM2, o aumento da produção de VEGF e o desenvolvimento da SDRA-AM. Em vista disso, foi investigada a contribuição do IL-1R para o desenvolvimento da síndrome, já que as principais funções da IL-1 β depende desse receptor (AREND; PALMER; GABAY, 2008).

Todavia, a ausência de IL-1R protegeu somente 20% dos camundongos da falência respiratória, e, por consequência, do óbito precoce. Esse resultado sugere que o eixo IL-1 não é um fator primordial para o desenvolvimento SDRA-AM. Similarmente, já foi mostrado em outro modelo de infecção que a contribuição da inflamassoma independe do eixo IL1R (GONÇALVES et al., 2013). Nesse trabalho Gonçalves e colaboradores sugerem que o inflamassoma NLRP3 está correlacionado à produção de óxido nítrico (NO), por um mecanismo independente da ação efetora da IL-1 β . Por outro lado, outro estudo demonstrou que o IL1R é fundamental para a manifestação da LPA em um modelo de indução por bleomicina (GASSE et al., 2007).

Em suma, esses resultados contribuíram sobremaneira para a compreensão dos mecanismos imunopatogênicos da SDRA associada à malária, além de lançar novas perspectivas para a investigação de estratégias terapêuticas que visem reduzir o processo inflamatório relacionado à falência respiratória.

3.2.6 Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- ✓ Camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei* NK65 desenvolvem SDRA associada a um aumento da permeabilidade vascular, presença de

efusão pleural e hemorragia pulmonar e alteração da função respiratória, caracterizada por aumento do Penh e redução da frequência respiratória;

- ✓ SDRA-AM apresenta uma alta taxa de letalidade em camundongos C57Bl/6 associada a uma baixa parasitemia;
- ✓ Camundongos C57Bl/6 com SDRA-AM apresentam uma suprarregulação local e sistêmica de IL-1 β , IL-1 α , VEGF, IFN- γ , TNF- α e IL-6;
- ✓ A ativação de Caspase-1 está suprarregulada em macrófagos esplênicos e pulmonares de camundongos com SDRA-AM;
- ✓ Extrato de eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 e seu DNA genômico e hemozoína induzem a liberação de IL-1 β e IL-1 α macrófagos peritoneais *in vitro*;
- ✓ A liberação de IL-1 β e IL-1 α induzida por hemozoína e DNA genômico é dependente dos inflamassomas NLRP3 e AIM2, respectivamente;
- ✓ O receptor NLRC4 não contribui para a liberação de IL-1 β e IL-1 α induzida por *P. berghei* NK65 ou seus PAMPs;
- ✓ Camundongos deficientes de MyD88, Casp1/11, ASC e AIM2 apresentam menor taxa de desenvolvimento de SDRA-AM promovendo um aumento da sobrevivência;
- ✓ Os receptores NLRP3 e NLRC4 não contribuem para o desenvolvimento de SDRA-AM;
- ✓ Camundongos deficientes de MyD88 e Casp1/11 e infectados com *P. berghei* NK65 vão a óbito com um quadro hiperparasitemia e anemia severa;
- ✓ O receptor para IL-1 não é essencial para o desenvolvimento de SDRA-AM.

4.3 **CAPÍTULO 3 PAPEL DO INFLAMASSOMA NA MALÁRIA PLACENTÁRIA**

4.3.1 **Introdução**

A malária associada à gravidez é uma das principais causas de mortalidade em regiões tropicais, resultando em cerca de 10.000 mortes maternas e entre 75.000 e 200.000 mortes infantis a cada ano (STEKETEE et al., 2001). Quando há evidências de *Plasmodium* spp (frequentemente *P. falciparum*) ou seus produtos (a exemplo da hemozoína) na placenta, associadas a alterações histopatológicas específicas, denomina-se a complicação de malária placentária (BULMER et al., 1993; HVIID et al., 2010). Esta tem como principal consequência o baixo desenvolvimento fetal (ALVAREZ; AL-KHAN; APUZZIO, 2005; UMBERS et al., 2011a).

Tem sido mostrado que eritrócitos infectados com *P. falciparum* por ser sequestrados receptores CSA na placenta da gestante, onde se multiplicam e evitam a destruição pelo baço. Com isso, um intenso infiltrado inflamatório constituído, principalmente, por monócitos, desenvolve-se no espaço intervilloso da placenta, e a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias induz alterações estruturais e funcionais da placenta (FRIED; DUFFY, 1996; ROGERSON et al., 2007). Estas modificações afetam a função vascular normal e desregulam os níveis de hormônios reguladores do crescimento e a transferência de nutrientes para o feto; promovendo abortos, nascimentos prematuros, restrição do crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer (BRABIN et al., 2004; UMBERS et al., 2011a).

A placenta é um órgão transitório singular responsável pelas trocas materno-fetais e funciona como uma barreira imunológica contra infecções microbianas e prevenção de eventos nocivos ao desenvolvimento fetal (ABRAHAMS, 2008; ERLEBACHER, 2013). Nesse contexto, os trofoblastos, importantes células presentes na interface materno-fetal podem reconhecer e responder a diferentes patógenos via PRRs, a exemplo dos TLRs e NLRs (ABRAHAMS, 2011; ABRAHAMS; MOR, 2005). Esses receptores podem reconhecer componentes do plasmódio, induzindo uma resposta inflamatória. Por exemplo, âncoras de GPI do parasito podem ser reconhecidas por TLR2 e TLR4 (KRISHNEGOWDA et al., 2005), enquanto hemozoína – um produto do metabolismo desse protozoário – e DNA podem ativar, respectivamente, os receptores AIM2 (KALANTARI et al., 2014) e

NLRP3 (DOSTERT et al., 2009; SHIO et al., 2009). Já o complexo DNA-hemozoína tem sido implicado na estimulação do TLR9 (COBAN et al., 2010; PARROCHE et al., 2007).

A ativação dos TLRs é mediada por uma variedade de proteínas adaptadoras, a exemplo da MyD88, importante molécula envolvida na expressão de genes pró-inflamatórios, como os das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-1 β (WARNER; NUNEZ, 2013). Enquanto isso, a estimulação de alguns NLRs e do AIM2 inicia a formação do complexo multiproteico, o inflamassoma; culminando com a ativação da Caspase-1, uma protease essencial para ativação e liberação da IL-1 β para o meio extracelular (KHARE et al., 2010).

Em um modelo de malária aguda, foi demonstrado que a via TLR9/MyD88 é essencial para o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (FRANKLIN et al., 2009). Além disso, MyD88 é considerada como uma proteína fundamental para a evolução da malária cerebral (GRIFFITH et al., 2007). Esse papel também foi atribuído ao receptor NLRP3, porém não à Caspase-1 e ao NLRC4 (KORDES; MATUSCHEWSKI; HAFALLA, 2011; REIMER et al., 2010). Em relação aos efeitos dessas vias sobre a gravidez, sugere-se que a ativação do inflamassoma NLRP3 por ácido úrico esteja relacionada ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia por um mecanismo dependente da liberação de IL-1 β (MULLA et al., 2011). Em conformidade, o aumento sistêmico de IL-1 β também tem precedido abortos relacionados à malária placentária experimental (POOVASSERY; MOORE, 2009) e está associado ao baixo peso de recém-nascidos de mulheres com malária placentária (BOEUF et al., 2013). Nesse trabalho, Boeuf e colaboradores propuseram uma relação entre o aumento de IL-1 β , a redução da expressão de transportadores de nutrientes e o baixo desenvolvimento fetal.

Apesar da reconhecida participação da resposta imune inata à patogênese da malária (SCHOFIELD; GRAU, 2005; STEVENSON; RILEY, 2004) e ao desencadeamento de complicações durante a gravidez (BEESON; DUFFY, 2005; ERLEBACHER, 2013), ainda é desconhecido o papel da via TLR e do inflamassoma, em complicações induzidas por plasmódio durante a gravidez. Assim investigar esses mecanismos torna-se imprescindível para a melhor compreensão da patogênese da malária placentária e suas implicações.

4.3.2 Objetivos

Neste estudo, tivemos por objetivo central investigar a contribuição da via dos TLRs e dos inflamassomas e do eixo IL-1 para desenvolvimento da malária placentária. Assim, buscou-se por meio da análise de diferentes parâmetros:

- i. Investigar a relação entre a infecção ativa por *P. falciparum* em gestantes, a resposta inflamatória e ativação de Caspase-1 na placenta humana;
- ii. Determinar a ativação de Caspase-1 e produção de IL-1 β em uma linhagem de trofoblastos humanos estimulados com *P. falciparum*;
- iii. Investigar se a espécie *P. berghei* NK65 é capaz de se aderir ao tecido placentário via ligação ao CSA;
- iv. Estabelecer um modelo de malária placentária, induzida por *P. berghei* NK65, em camundongos C57Bl/6;
- v. Avaliar a relação entre o desenvolvimento da malária placentária murina e a expressão placentária de transportadores de nutrientes; perfil de citocinas e ativação local de Caspase-1;
- vi. Avaliar o desenvolvimento da malária placentária em camundongos deficientes das moléculas adaptadoras MyD88, TRIF e ASC; dos receptores inatos TLR2, TLR4, TLR9, NLRP3, NLRC4 e AIM2; da Caspase-1 e do receptor de IL-1 (IL1R)
- vii. Avaliar no modelo experimental se o tratamento com antagonista do receptor de IL-1 recombinante (Anakinra), reverte o quadro de malária placentária.

4.3.3 Material e Métodos

4.3.3.1 Gestantes incluídas

Foram selecionadas gestantes não infectadas e aquelas com diagnóstico molecular positivo para *P. falciparum* no momento do parto cesariano (infecção ativa) a partir do universo amostral de um estudo longitudinal prospectivo realizado no Hospital da Mulher e da Criança do Juruá (HMCJ) em Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil (SOUZA, 2016).

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e ao CEPSH da Universidade Federal do Acre, sob o número de

Certificado de Apresentação para apreciação Ética (CAAE) 03941012.6.0000.5467, recebendo aprovação através do parecer 70.324 de 8 de agosto de 2012 e 136.622 de 18 de outubro de 2012, respectivamente. Esta pesquisa seguiu as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, em vigor na época da submissão. Todas as gestantes participantes do estudo ou seus representantes legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em todos os momentos fez-se clara a total liberdade do paciente em optar por retirar seu consentimento em qualquer etapa do estudo sem qualquer prejuízo quanto ao seu acompanhamento.

4.3.3.2 *Coleta das amostras biológicas humanas*

Após o parto, os recém-nascidos foram devidamente pesados e o sangue placentário coletado para montagem de lâminas com esfregaço delgado e gota espessa, ou adicionado em tubos com heparina para obtenção do plasma. Em seguida, a placenta foi pesada e amostras de tecido placentário recolhidas e fixadas em formalina tamponada 10% (Sigma, EUA), a 4 °C, por cinco dias, com troca a cada 24h. Posteriormente, foram mantidas em etanol a 70% até o processamento. A confirmação da infecção e diferenciação da espécie de *Plasmodium* foi realizada por PET-PCR (LUCCHI et al., 2013).

Todas as gestantes receberam o tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde após o diagnóstico da malária, por gota espessa e imediata coleta das amostras biológicas (BRASIL, 2010).

4.3.3.3 *Análise histopatológica das placentas humanas*

Foram obtidas secções histológicas de 5 µm de espessura de tecido placentário embebido em parafina, posteriormente coradas com Giemsa, hematoxilina-eosina (H&E) ou pelo método de Von Kossa, para exame histológico. Um microscópio de luz Zeiss Axio Imager M2 equipado com uma câmara Zeiss AxioCam HRc foi usado para capturar imagens do tecido placentário.

Os parâmetros histopatológicos foram analisados utilizando a técnica de *Tissue Microarray* (TMA), realizada no Hospital AC Camargo (São Paulo, SP). Dois patologistas treinados realizaram as análises de forma independente e às cegas. Quando foram detectadas discrepâncias entre as duas avaliações, os casos eram reexaminados pelos mesmos patologistas e decididos por consenso. Uma análise

qualitativa foi realizada para avaliar presença de eritrócitos infectados no espaço intervilloso, deposição de hemozoína e presença de calcificações, agregados nucleares sinciciais e necrose no tecido placentário.

4.3.3.4 *Imuno-histoquímica das placentas humanas*

Para marcação por imuno-histoquímica de secções de tecido placentário obtidos dos blocos de TMA e usado o *kit* para imuno-histoquímica *REVEL Polyvalent HRP-DAB Detection System* (Spring Bioscience, EUA). Inicialmente, secções de tecido foram desparafinizadas e reidratadas para posterior recuperação antigênica utilizando tampão citrato (10 mM, pH 6,0) ou tampão Tris/EDTA (0,01 M / 0,001 M, pH 9,0) em panela pressurizada). A peroxidase endógena foi bloqueada adicionando-se peróxido de hidrogênio 1% (v/v) e as ligações inespecíficas por meio de uma solução de bloqueio de proteínas. As secções foram incubadas com anticorpo anti-CD68 para marcação de monócitos, ou com anticorpo anti-Caspase-1 *overnight* a 4°C e em câmara úmida. Para visualização da marcação, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com HRP (*horseradish* peroxidase) e, posteriormente, fez-se a incubação com DAB (3,3'-diaminobenzidina) para que ocorresse a reação colorimétrica. Por fim, os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Harris por dois minutos, desidratados e as lâminas fechadas com meio de montagem. Como controle positivo, utilizou-se cortes histológicos de baço, rins e fígado e como controle negativo, secções de placenta humana, substituindo o anticorpo primário por PBS.

4.3.3.5 *Obtenção de extrato de eritrócitos parasitados com P. falciparum*

O cultivo de *P. falciparum* NF54 foi realizado conforme descrito anteriormente (TRAGER; JENSEN, 1976). Os parasitas da fase sanguínea foram cultivados em meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado com HEPES (15,9mM), bicarbonato de sódio (1 mM), D-glicose (2 mM), hipoxantina (27,2 µM), gentamicina (25 µM) e Albumax I (5%), em presença de eritrócitos humanos do grupo sanguíneo O⁺. Os parasitas foram cultivados a 37 °C em atmosfera padrão gerada em sistema *candle-jar* e a cada 24 horas foi efetuada a troca do meio de cultura. Para a análise da parasitemia e da fase de desenvolvimento do parasito, esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa foram observados ao microscópio de luz transmitida.

Para a confecção do extrato de eritrócitos parasitados com *P. falciparum*, a cultura das formas sanguíneas dos parasitos foi submetida a uma primeira sincronização com plasmagel (Voluven 6%; Fresenius Kabi) para separação entre formas maduras do parasita (trofozoítos/esquizontes) e formas mais jovens (anel/trofozoítos jovem) juntamente com eritrócitos não parasitados. Portanto, os parasitos maduros foram recuperados e cultivados, de forma sincronizada, por aproximadamente 72 horas em condições padrão. Ao atingirem uma parasitemia de 10%, as formas maduras foram, novamente, enriquecidas em plasmagel, purificados em coluna magnética, contadas e submetidas a dez ciclos *freeze-thaw* para obtenção do lisado celular. Eritrócitos não parasitados, utilizados como controle negativo, foram quantificados e sofreram o mesmo processo de lise celular. Posteriormente, os extratos de eritrócitos parasitados (EP) e não parasitados (EnP) foram armazenados a -80 °C até a utilização.

4.3.3.6 *Ensaio de ativação de trofoblastos humanos in vitro.*

Primeiramente, para que ocorresse o espalhamento, células BeWo (1×10^5 células por poço), uma linhagem de trofoblastos derivada de coriocarcinoma humano (PATTILLO et al., 1968), foram cultivadas em placas de 24 poços, contendo 1 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL); L-glutamina (2 mM) e soro fetal bovino (SFB) (5%), a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 12 horas, as células foram ou não expostas a extrato de EP ou EnP em diferentes concentrações, por um período de 12 horas ou 48 horas, de acordo com o tipo de análise. Os ensaios foram feitos em triplicata e avaliadas por citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e dosagem de IL-1β.

4.3.3.7 *Marcação de Caspase-1*

As células BeWo expostas ou não expostas a extrato de EP ou EnP, na proporção de 20 eritrócitos para 1 célula (20:1), por 12 horas, foram lavadas com PBS e, posteriormente, marcadas com a sonda fluorescente FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry Technologies, EUA) que se liga com alta afinidade à forma ativa da Caspase-1 (LIMA-JUNIOR et al., 2013; SMOLEWSKI et al., 2001), por 90 minutos, como recomendado pelo fabricante.

Após esse período, as células foram lavadas por três vezes com tampão de marcação. As células analisadas por citometria de fluxo foram tripsinizadas para perda a adesão. A aquisição da suspensão celular foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD Biosciencies, EUA) utilizando o *software* “CellQuest” versão 5.2 (BD Biosciencies, EUA) e analisadas pelo *software* “FlowJo versão 10.07r2” (Tree Star, Ashland, EUA). Para análise por microscopia de fluorescência, lâminas contendo células BeWo aderidas e marcadas, como descrito, foram preparadas utilizando meio de montagem com marcador nucleardiamidino-2-fenilindol (DAPI). Para análise foi utilizada uma câmara colorida Zeiss (AxioCam HRc) conectada a um microscópio de fluorescência Zeiss (Axio Imager M2).

4.3.3.8 Animais

Camundongos selvagens C57Bl/6 (WT) e camundongos deficientes de *TLR2* (*TLR2*^{-/-}), *TLR4* (*TLR4*^{-/-}), *TLR9* (*TLR9*^{-/-}), *MyD88* (*MyD88*^{-/-}), *TRIF* (*TRIF*^{-/-}), *Caspase-1 e 11* (*Casp1/11*^{-/-}), *ASC* (*ASC*^{-/-}), *NLRP3* (*NLRP3*^{-/-}), *AIM2* (*AIM2*^{-/-}), *NLRC4* (*NLRC4*^{-/-}) ou *IL1R* (*IL1R*^{-/-}) foram criados e mantidos em estantes ventiladas com microisoladores, sob condições controladas de umidade, iluminação e temperatura (22 °C a 25 °C) e alimentados *ad libitum* com dieta regular no Biotério Setorial do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os camundongos *Casp1/11*^{-/-}, *ASC*^{-/-}, e *NLRC4*^{-/-} e os camundongos *TRIF*^{-/-}, *AIM2*^{-/-}, *NLRP3*^{-/-} e *IL1R*^{-/-} foram gentilmente fornecidos pela Dra. Karina Bortolucci (Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP) e pelo Dr. Dario Zamboni (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP), respectivamente. Os camundongos *AIM2*^{-/-} e *NLRP3*^{-/-} foram obtidos da empresa Genectech (EUA) e encontram-se na Universidade de São Paulo sob a responsabilidade do Dr. Claudio Marinho, possuindo os MTAs # OM-214010 e OM-129876, respectivamente.

O estudo foi realizado em conformidade com as recomendações do *Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa* do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP (Protocolo nº 58/12 nas fls. 128 do livro 2).

4.3.3.9 Sincronização e enriquecimento dos eritrócitos parasitados *P. berghei* NK65

Para obtenção de formas maduras de *P. berghei* NK65^{GFP} (trofozoítos maduros e esquizontes), EPs foram sincronizados como descrito previamente (JANSE et al., 2006), os quais foram coletados de camundongos infectados com parasitemia entre 5 e 10%, por punção cardíaca e transferidos para meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 25% de SFB. Os EPs foram, subsequentemente, mantidos em cultura a 37 °C, por 14 horas, em uma atmosfera contendo 5% de CO₂, 85% de N₂ e 10% de O₂. Posteriormente, foram enriquecidos usando uma coluna de separação magnética (Miltenyi Biotec, Alemanha) para gerar uma população celular contendo aproximadamente 95% de EPs, bem como analisado por esfregaço delgado.

4.3.3.10 Ensaio de inibição de citoaderência

Eritrócitos parasitados enriquecidos e sincronizados como descrito no item 4.3.9 foram coincubados, em meio RPMI, com células CHO que expressam estavelmente sulfato de condroitina A (CSA) (células de CHO-K1) por 1 hora, 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o primeiro período de incubação, as células não aderentes foram removidas por três lavagens em meio RPMI e as células aderentes incubadas durante 20 minutos na presença de doses crescentes de CSA solúvel de traqueia de boi (Sigma-Aldrich, EUA), ou sulfato de condroitina B (CSB) (Sigma-Aldrich, EUA), ou ácido colomínico (AC) (Sigma-Aldrich, EUA) (NERES et al., 2008). Depois de uma lavagem final, as culturas foram fixadas e coradas utilizando o *kit Instant-Prov* (Nova Pv, Brasil) para coloração diferencial. A citoaderência foi determinada por contagem do número de EPs ligados às células CHO-K1.

A aderência *ex vivo* de EP no tecido placentário foi conseguida utilizando placentas de fêmeas não infectadas, obtidas no 19º dia gestacional (G19) e tratadas conforme já descrito (MUTHUSAMY et al., 2004). Em suma, as placentas foram fixadas em formalina a 2% e glutaraldeído a 0,5% durante 10 minutos, aquecida em um forno de micro-ondas antes de serem embebidas em parafina, cortadas em secções de 5 µm e colocadas em lâminas de vidro. Este protocolo de fixação preserva a capacidade de ligação dos glicosaminoglicanos ao espaço intervilloso placentário. Depois da desparafinização e reidratação, os limites das secções de tecido foram delimitados usando uma caneta hidrofóbica.

Para o ensaio de bloqueio, EPs sincronizados (1×10^8 / mL) foram pré-incubados com diferentes concentrações de CSA, CSB, ou AC, à 37 °C, durante 30

minutos, com agitação moderada. Após lavagens, os EPs foram usados para cobrir as secções de placenta, por 60 minutos a 37 °C em câmara úmida. As lâminas foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) e examinadas por microscopia de fluorescência. O número de EPs (pontos verdes) que aderiram às secções de placenta sob cada condição experimental foi determinado por duplo-cego, utilizando a contagem de células aderidas, a partir do *software* ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Cinquenta campos foram contados em cada um dos três experimentos independentes.

4.3.3.11 Ensaio de NF- κ B luciferase

Células COS-7 (4×10^4 células/poço) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e gentamicina (50 μ g/mL). Após 24 horas, as células foram transfectadas utilizando LipofectamineTM 2000 (Invitrogen, EUA), como recomendado pelo fabricante contendo as seguintes quantidades de plasmídeos por poço: 25 ng de E-selectina/luciferase de vaga-lume, 5 ng de β -actina/luciferase de Renila e 25ng de TLR2, TLR4 ou TLR9. Juntamente com os plasmídeos de TLR2 TLR4 foram adicionados plasmídeos que codificam CD14 e CD36. As células que foram transfectadas com TLR4 também receberam 25 ng de MD-2. A concentração total de DNA foi normalizada por intermédio da adição de um vector vazio (pcDNA 3). Seis horas após a transfecção, as células foram lavadas e incubadas em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após um período de 20 a 24 horas, as células foram estimuladas por 6 horas com $3,3 \times 10^6$ EnP ou EP. Após 5 min, a 25°C, as células foram lisadas usando *Passive Lysis Buffer* (Promega, EUA). Como controle positivo foi utilizado PAM3CSK4 (Invivogen, EUA), LPS de *E. coli* O111: B4 (Sigma, EUA) e CpG ODN (Invivogen, EUA), ligantes de TLR2, TLR4 ou TLR9, respectivamente. Os lisados celulares foram incubados com os substratos de luciferase de vaga-lume e luciferase de Renila (Promega, EUA). A luminescência foi mensurada no luminômetro Lumat LB 9507 luminômetro (EG & G Berthold, Alemanha) e a expressão relativa de NF- κ B foi quantificada pela razão da emissão de luz pela luciferase/E-selectina de vaga-lume e a emissão de luz pela luciferase/ β -actina de Renila do controle. A unidade de luz relativa das amostras foi normalizada utilizando a concentração de proteína.

4.3.3.12 *Monitoramento da gravidez em camundongos*

Para obtenção das grávidas, duas fêmeas, com 10 a 12 semanas de idade, foram colocadas juntas com um macho da mesma linhagem e idade. Após um período mínimo de 12 horas foi examinada a presença do tampão vaginal, indicando que houve cópula. Além da detecção do tampão vaginal, a quantificação do peso corporal foi utilizada para monitorar o tempo de gestação (FREYRE et al., 2006). Como indicado na **Figura 26**, o dia de detecção do tampão vaginal foi considerado dia gestacional 1 (G1). A gravidez foi confirmada entre G10 e G13, quando as fêmeas tiveram um aumento médio de peso de 3 g a 4 g. Assim, o ganho de peso foi tomado como um sinal de gravidez e a perda súbita de peso como indicador de injúria ou interrupção da gravidez.

As fêmeas grávidas foram infectadas no G13, período gestacional determinado como sendo o ponto ótimo para a infecção, visto que infecções anteriores não permitem atingir a gravidez a termo, o que é consistente com relatos prévios (HASLER et al., 1993; ROUNIOJA et al., 2005). No G19 (seis dias pós-infecção) foi analisada a parasitemia e após anestesia foi realizada uma cesárea para coleta das placentas e mensuração do peso do feto e quantificação do número de reabsorções e/ou abortos. As grávidas não infectadas foram usadas como controle. Para o cálculo do percentual de redução do peso do feto e reabsorção relativa foram utilizadas as fórmulas a seguir:

$$\text{Percentual de Redução de Peso} = \frac{[(\text{Média de PFc} - \text{PFI}) \times 100]}{\text{Média de PFc}}$$

PFc – Peso do feto de mães não infectadas

PFI – Peso do feto de mães infectadas

$$\text{Taxa de reabsorção} = \frac{(nR \times 100)}{(nFv + nR)}$$

nR – Número total de reabsorções/aborto

nFv – Número total de fetos viáveis

$$\text{Reabsorção relativa} = \frac{\text{Taxa de reabsorção de grávidas infectadas}}{\text{Taxa de reabsorção de grávidas não infectadas}}$$

4.3.3.13 Parasitas e infecção

As camundongos fêmeas grávidas foram infectadas via retro-orbital com 2×10^5 eritrócitos parasitados (EP) com a cepa de plasmódio murinho *P. berghei* NK65 expressando, constitutivamente, a proteína fluorescente verde (*P. berghei* NK65^{GFP}) (SULTAN et al., 1999) obtidos de estoques congelados.

4.3.3.14 Tratamento de grávidas com antagonista do receptor de IL-1

As grávidas C57Bl/6 infectadas e não infectadas com *P. berghei* NK65^{GFP} foram tratadas subcutaneamente com Anakinra (Sobi, Alemanha), um antagonista do receptor de IL-1 (IL1Ra) recombinante na dose de 100mg/Kg, por cinco dias, a partir do G14 (24 horas após a infecção) (ATAIDE et al., 2014). O monitoramento e a avaliação das grávidas ocorreram como descritos no item 4.3.11.

Figura 26 – Protocolo experimental do modelo de malária placentária.

Para obtenção das grávidas, camundongos fêmeas foram mantidas juntas com macho da mesma linhagem e idade. Após um período mínimo de 12 horas foi examinada a presença do tampão vaginal, indicando que houve cópula. A detecção do tampão vaginal foi considerado dia gestacional 1 (G1). Fêmeas grávidas foram infectadas no G13 com 2×10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. No G19 (seis dias pós infecção) foi analisada a parasitemia e após anestesia foi realizada uma cesárea para coleta das placentas, mensuração do peso do feto e quantificação do número de reabsorções e/ou abortos. Em experimentos específicos, grávidas C57Bl/6, infectadas ou não infectadas, foram tratadas a partir do G14 até o G18 com 100 mg/Kg de Anakinra. G21 indica o tempo médio de gestação normal de camundongos.

4.3.3.15 Determinação da parasitemia

A parasitemia foi determinada por citometria de fluxo (JANSE; VAN VIANEN, 1994) por meio da detecção de eritrócitos parasitados marcados com DRAQ5 (Abcam, Reino Unido), um marcador fluorescente vermelho com elevada afinidade por DNA e alta capacidade de penetração em células vivas (SMITH et al., 1999). A marcação de eritrócitos parasitados com DRAQ5 foi uma adaptação do protocolo do fabricante para análise do ciclo celular por citometria de fluxo (RODRIGUES-DUARTE et al., 2012). Assim, 5 µL de sangue foram coletados da cauda dos camundongos infectados e adicionados a 400 µl de tampão de marcação (2% de soro fetal bovino [SFB] e 0,05% de azida de sódio em solução tamponada de fosfato [PBS]).

O DRAQ5 foi adicionado à suspensão na concentração final de 1 µM. As amostras foram delicadamente agitadas para permitir uma adequada incorporação do DRAQ5 ao DNA do parasita e a aquisição destas foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD Biosciencies, EUA) utilizando o *software* "CellQuest" versão 5.2 (BD Biosciencies, EUA). As parasitemias foram determinadas pelo *software* FlowJo versão 10.07r2 (Tree Star, Ashland, EUA). Os eritrócitos não infectados não foram marcados por DRAQ5, pois eram desprovidos de DNA. A parasitemia foi

expressa em percentual (%) de células marcadas dentro do *gate* para eritrócitos totais. Testes de correlação foram realizados para confirmar a similaridade entre os resultados obtidos por citometria de fluxo e aqueles observados nos esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Essa análise foi realizada através da contagem diferencial de 1.000 eritrócitos por esfregaço em 5 campos diferentes e 100.000 eritrócitos por citometria. O valor da parasitemia foi determinado pela porcentagem de cada contagem.

4.3.3.16 *Coleta e processamento das placentas de camundongos*

Inicialmente, quatro placentas inteiras foram coletadas e armazenadas em *pool* a -80°C, até o processamento. As demais placentas foram separadas em duas metades, uma parte foi coletada em RNeasy® (Applied Biosystems, EUA), para posterior extração proteica ou RNA total. A outra metade foi fixada em formalina 10% (v/v) tamponada (Sigma-Aldrich, EUA) por 48 horas, quando foi transferida para etanol 70% até o processamento. Secções de 5 µm não consecutivas de placentas foram coradas com H&E, ácido periódico-Schiff (PAS, do inglês *Periodic Acid-Schiff*), *picrosirius red* e foram examinadas utilizando uma câmara colorida Zeiss (AxioCam HRc) conectada a um microscópio de luz Zeiss (AxioImager M2). Para análise histológica, as secções de placenta foram codificadas e examinadas por indivíduos diferentes por duplo-cego.

4.3.3.17 *Análise morfométrica*

A análise morfométrica das placentas foi feita como descrito previamente (MARINHO et al., 2009; NERES et al., 2008). Em suma, o espaço vascular foi quantificado por meio da análise de secções de placentas coradas com H&E. Para cada secção foram selecionadas aleatoriamente três áreas do espaço intervilo para aquisição de imagens (magnitude de 200x), utilizando uma câmara fotográfica colorida Zeiss (AxioCam HRc) conectada a um microscópio de luz Zeiss (AxioImager M2). As imagens foram analisadas usando o *software* Image J. Para análise morfométrica, as secções de placenta foram codificadas e examinadas por indivíduos diferentes por duplo-cego.

4.3.3.18 *Análise da expressão gênica via qRT-PCR*

O RNA foi extraído de uma amostra de placenta obtida do G19 (6º dia pós-infecção) usando o *kit RNeasy mini kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo para tecido animal descrito pelo fabricante (Animal Cell 1). Um micrograma de RNA total foi convertido em cDNA usando o *kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Suíça) utilizando *primers* hexânicos randômicos.

A expressão gênica relativa de *Slc38a1* (SNAT1), *Slc38a2* (SNAT2) e *Slc2a1* (GLUT1) foi quantificada utilizando *PowerSYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), utilizando sequências de *primers* específicos (JONES; CROMBLEHOLME; HABLI, 2013; KUSINSKI et al., 2012): *Slc38a1* – 5'-GAGCAAGTCTTCGGCACCCAC-3' e 5'-CACCATCACCAACCAACTCG-3'; *Slc38a2* – 5'-GCGTTGGCATTCAATAGC-3' e 5'-CGTTCATCATCCGTCTCC-3'; *Slc2a1* – 5'-TGTGCTCATGACCATCG-3' e 5'-AAGGCCACAAAGCCAAAGAT-3'; *Gapdh* – 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGC-3' e 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'.

Para estudar o perfil de expressão de genes envolvidos nas vias dos TLRs e NLRs foi usado o *kit Mouse Innate & Adaptive Immune Responses RT² Profiler™ PCR Array* (Qiagen, cat #PAMM052Z) de acordo com recomendações do fabricante. A confirmação do *RT² Profiler PCR Array* foi realizada com a análise por qPCR através de ensaio de expressão gênica TaqMan™ (Applied Biosystems, cat #4331182).

A quantificação da expressão gênica foi feita utilizando o termociclador de PCR em tempo real 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Todos os resultados foram normalizados de acordo com a expressão constitutiva do gene *Gapdh*, através do método de quantificação $2^{\Delta\Delta CT}$. Para os ensaios de PCR Array, os valores negativos indicam subexpressão, enquanto valores positivos indicam sobre-expressão.

4.3.3.19 Western blot para Caspase-1

Para a obtenção de extratos de proteínas totais, fragmentos de placentas humanas ou de camundongos preservados em RNAlater foram macerados em tampão RIPA contendo coquetel de inibidores de proteases (10 µl/mL) e incubados por 20 minutos em gelo. As amostras foram centrifugadas e os extratos proteicos, presentes no sobrenadante, foram quantificados utilizando-se o *kit Pierce BCA Protein Assay* (Life Technologies, EUA), segundo recomendação do fabricante. As proteínas totais (30 µg de cada amostra) foram separadas por eletroforese em gel de

poliacrilamida com dedocil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979), a 15%, juntamente com o padrão de peso-molecular (Bio-Rad, EUA) e transferidas para membranas de PVDF (Bio-Rad, EUA) por 18 horas, a 4 °C e 30 Volts. Após o bloqueio das membranas com leite desnatado Molico (Nestlé, Brasil) a 10%, por 2 horas, em temperatura ambiente.

Para detecção da proteína nas amostras de placentas de camundongos, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário específico *caspase-1 p20* (G-19) (Santa Cruz Biotechnology, EUA). As amostras humanas foram incubadas com o anticorpo primário específico *anti-Caspase-1 clone 5B10* (Biolegend, EUA). Após 3 lavagens com TBS-t, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário de cabra conjugado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, EUA). A normalização das amostras foi através da marcação com anti- β -actina (Novus) na concentração 1:500000. Todas as marcações foram reveladas por quimioluminescência (Clarity; Bio-Rad, EUA) e as imagens adquiridas utilizando-se o fotodocumentador ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, EUA) e o *software ImageLab* (Bio-Rad, EUA). A densitometria das bandas foi executada utilizando-se ferramentas do *software ImageJ*.

4.3.3.20 Extração proteica da placenta para dosagem de citocinas

Quatro placentas da mesma camundongo grávida foram imersas em 1 mL de PBS contendo coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, Alemanha) na concentração de 10 μ L/mL e macerados vigorosamente com auxílio de um triturador de tecido do tipo Dounce (Sigma-Aldrich, Alemanha), em gelo. Em seguida, o homogenato foi transferido para um tubo cônico de 2 mL e centrifugado a 16.000 g por 15 minutos a 4°C. Após coleta do sobrenadante, foi feita a dosagem de proteínas totais por espectrofotometria, usando o espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Scientific, EUA) e armazenada em alíquotas a -80 °C para posterior dosagem de citocinas.

4.3.3.21 Quantificação de citocinas

Para quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 do sangue placentário humano foi utilizada a técnica *Cytometric Bead Array* (CBA), através do *kit CBA Human Inflammatory Cytokines* (BD Biosciences, EUA), de acordo com orientações do fabricante.

Para as amostras de camundongos, as citocinas, IL-1 β e IL-1 α (Biolegend, EUA) foram mensuradas pelo método de ELISA e as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 foram quantificadas por CBA utilizando o *kit Mouse Th1/Th2/Th17* (BD Biosciences, EUA), de acordo com determinações dos fabricantes.

As concentrações das citocinas presentes nas amostras de soro ou sobrenadante de cultura foram expressas em pg/mL. Para o macerado do tecido placentário as concentrações foram expressas em pg (de citocina) / mg (de proteínas totais).

4.3.3.22 *Análise Estatística*

As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas pelo teste de variância ANOVA *one-way* (pós-teste de Bonferroni) ou *two-way*; teste *t* de *student* ou Mann-Whitney. O teste de *log-rank* foi usado para a análise da sobrevida. Os testes foram usados de acordo com cada situação, como descritos nas legendas das figuras. Os testes estatísticos foram feitos usando o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, EUA). *P* valor $\leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.3.4 Resultados

4.3.4.1 *Mulheres grávidas infectadas com P. falciparum apresentam aumento de citocinas pró-inflamatórias e Caspase-1 ativa na placenta*

Embora bem caracterizada clinicamente, ainda não estão claros os mecanismos celulares e moleculares que conduzem à patogênese da malária placentária (ROGERSON et al., 2007). Em parte, isto estaria relacionado às limitações intrínsecas do estudo em seres humanos, bem como acesso ao material biológico nos diferentes estágios da gestação. Neste sentido, modelos experimentais são extremamente importantes para a compreensão dos fenômenos observados na infecção humana (HVIID et al., 2010).

Para investigar a relação entre a ativação do inflamassoma e o desenvolvimento da malária, inicialmente foram selecionadas mulheres gestantes com infecção ativa por *P. falciparum* no momento do parto, residentes em uma área endêmica para a doença. A análise das placentas das gestantes infectadas mostrou presença de eritrócitos infectados no espaço intervilo (Figura 27B), deposição de hemozoína (Figura 27C), focos de calcificação (Figura 27D), aumento de agregados

nucleares sinciciais (**Figura 27E**) e áreas de necrose (**Figura 27F**) no tecido placentário. Tais evidências não foram observadas no tecido placentário de mulheres grávidas não infectadas, da mesma região, e que foram usadas como controle (**Figura 27A**). As mulheres infectadas apresentaram significativa redução média do peso da placenta (**Figura 28A**) e dos recém-nascidos (**Figura 28B**), quando comparadas às mulheres não infectadas. Em adição, mostramos, por imunohistoquímica, que as placentas de mulheres infectadas apresentaram um aumento do número células de CD68⁺ no espaço intervilo, indicando uma intensa migração de monócitos associada à infecção (**Figura 28C**). Em conjunto, esses resultados apontam uma relação entre a infecção por *P. falciparum* e alterações placentárias e fetais durante a gestação.

Figura 27 – Infecção por *P. falciparum* causa alterações placentárias.

Foram selecionadas gestantes provenientes de uma região endêmica para malária (Alto do Juruá, Acre, Brasil) e que durante o parto estavam ou não com infecção ativa por *P. falciparum* (Pf). Após o parto cesariano, uma amostra das placentas das gestantes foi coleta para análise histopatológica. As imagens representam fotomicrografias do tecido placentário proveniente de mulheres não infectadas (A) ou infectadas com Pf (B-F). As setas indicam presença de eritrócitos infectados no espaço intervilloso corados com Giemsa (B), deposição de hemozoína (C), analisada através de microscopia de luz polarizada, focos de calcificação placentária, corados pelo método de Von Kossa (D), agregados nucleares sinciciais (E) e áreas de necrose nos vilos (F). (A, C, E, F) Tecidos corados com H&E e ampliação de 400 x (A, E, F), 630 x (B) e 200 x (C, D).

Figura 28 – Mulheres com infecção ativa por *P. falciparum* apresentam baixo peso dos fetos, das placentas e aumento de infiltrado inflamatório.

Após o parto cesariano das gestantes Não Infectadas ou Infectadas com Pf, foi mensurado o peso das placentas (**A**), o peso dos recém-nascidos (RN) (**B**) e coletada uma amostra da placenta para análise do infiltrado inflamatório (**C**). A quantificação de monócitos presentes no espaço intervilo por dez campos, foi determinada por marcação com anticorpo anti-CD68 por imuno-histoquímica. Os dados expressam a média $\pm$ desvio padrão. (grávidas = 59 não infectadas e 19 infectadas com Pf). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (Teste *t* de Student (**A**, **B**) ou teste de Mann Whitney (**C**)), quando comparado às mulheres não infectadas.

Componentes do parasito podem ativar os monócitos, bem como o sinciciotrofoblasto – uma camada de células originada dos trofoblastos e presentes na interface materno-fetal –, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (CHUA et al., 2013). Logo, para compreender a resposta inflamatória local, analisamos o perfil de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias no sangue presente no espaço vascular da placenta. Nossos resultados apontaram um aumento significativo da concentração de IL-1 β (**Figura 29A**), TNF- α (**Figura 29B**), IL-6 (**Figura 29C**) e IL-10 (**Figura 29D**) no sangue placentário, em relação às gestantes não infectadas.

Figura 29 – Gestantes com infecção ativa por *P. falciparum* apresentam altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias no sangue placentário.

Após o parto cesariano das gestantes não infectadas (Controle) ou infectadas com Pf (Infectadas), foi realizada a coleta do sangue da placenta, para quantificação de citocinas. As citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-10 (D), foram mensurados pela técnica “Cytometric Bead Array” (CBA). Os dados expressam a média $\pm$ desvio padrão. (grávidas = 59 não infectadas e 19 infectadas com Pf). * P < 0,05; ** P < 0,01 (Teste de Mann Whitney), quando comparado às mulheres não infectadas.

Adicionalmente, mostramos que Caspase-1 está expressa (**Figura 30A**) e ativada (**Figura 30B e 30C**) no tecido placentário de gestantes infectadas com *P. falciparum*. Em suma, esses resultados indicam que a infecção por *P. falciparum* provoca um intenso processo inflamatório na placenta, presumivelmente associado à ativação da Caspase-1.

Figura 30 – Caspase-1 está ativada na placenta de mulheres infectadas com *P. falciparum*.

Após o parto cesariano das gestantes não infectadas (Controle) ou infectadas com Pf (Infectada) foi coletada uma amostra da placenta para análise da expressão de Caspase-1. A imagem representa fotomicrografia do tecido placentário proveniente de mulheres infectadas, marcado com anticorpo anti-Caspase-1 por imuno-histoquímica (**A**). Para analisar a presença de Caspase-1 ativa, amostras de tecido placentário foram lisadas com tampão RIPA e analisada por *Western blot* usando um anticorpo anti-caspase-1 (**B**). A quantificação foi realizada por densitometria normalizada pela expressão da proteína constitutiva beta-actina (**C**). Os dados expressam a média $\pm$ desvio padrão. (grávidas = 6 não infectadas e 8 infectadas com Pf). ** $P < 0,01$ (teste de Mann Whitney), quando comparado às mulheres não infectadas.

4.3.4.2 *Caspase-1 está ativada em células BeWo estimuladas por eritrócitos parasitados com *P. falciparum*.*

Capazes de reconhecer e responder a diferentes componentes microbianos, os trofoblastos são hábeis em secretar IL-1 β em resposta a diferentes estímulos, por um mecanismo dependente de Caspase-1 (ABRAHAMS, 2011; ABRAHAMS; MOR, 2005; KAVATHAS et al., 2013; MULLA et al., 2011). Porém, ainda não foi mostrado se essas células podem ativar Caspase-1 em resposta ao plasmódio. Para determinar se trofoblastos ativam essa protease em resposta ao parasita, trofoblastos humanos da linhagem BeWo foram estimulados ou não com extrato de eritrócitos infectados com *P. falciparum* (EP) ou não infectados (EnP) e a ativação mensurada utilizando uma sonda fluorescente (FAM-YVAD-FMK) que se liga com alta afinidade à forma ativa dessa protease (LIMA-JUNIOR et al., 2013; SMOLEWSKI et al., 2001).

Nossos resultados mostram que células BeWo estimuladas com EP apresentam maior intensidade de fluorescência para FAM-YVAD, quando comparadas às estimuladas com EnP (**Figura 31A e 31B**), indicando a capacidade desses trofoblastos de ativar a Caspase-1 como resposta a componentes do *P. falciparum*. Em concordância, também houve maior frequência de células BeWo estimuladas com EP expressando Caspase-1 ativa (**Figura 31C**). Esses resultados de citometria foram confirmados por microscopia de fluorescência, onde, novamente, foi evidenciada maior intensidade de fluorescência para FAM-YVAD após estímulo com EP (**Figura 31D**). Em complementação a esses resultados, demonstramos que células BeWo, estimuladas com EP, secretam IL-1 β de forma dose dependente ao estímulo (**Figura 31E**), confirmando a relação entre a ativação da Caspase-1 e secreção dessa citocina.

Figura 31 – Caspase-1 é ativada em células trofoblásticas na presença de eritrócitos infectados com *P. falciparum*.

Células BeWo foram cultivadas na presença ou não de extrato de eritrócitos infectados com *P. falciparum* NF45 para análise da ativação da Caspase-1 (**A-D**) e secreção de IL-1β (**E**). Para avaliar a ativação de Caspase-1, células BeWo foram estimuladas com partículas de eritrócitos infectado (vermelho) ou não (preto) com Pf por 12 horas na proporção equivalente de 20 eritrócitos para 1 célula BeWo (20:1). Posteriormente foram marcadas com FAM-YVAD por 90 minutos para análise por citometria de fluxo. (**A**) Imagem ilustrativa do histograma. Foram quantificadas a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) (**B**) e a frequência de células FAM-YVAD+ (**C**). Em cinza está indicado o grupo controle não estimulado. (**D**) Imagens ilustrativas de células BeWo marcadas com DAPI (superior) e FAM-YVAD+ (inferior) e analisadas por imunofluorescência. A secreção de IL-1β foi determinada por ELISA no sobrenadante de células BeWo estimuladas com eritrócitos parasitados (EP) ou não (EnP) com Pf em diferentes proporções, por 48 horas. São mostrados dados representativos de dois (**A-D**) ou três (**D**) experimentos independentes feitos em triplicata. Os dados expressam a média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) one-way com pós teste de Bonferroni).

4.3.4.3 Infecção por *P. berghei* NK65 induz desenvolvimento de malária placentária em camundongos C57Bl/6

Visando uma melhor compreensão dos mecanismos patogênicos da malária placentária, nosso grupo estabeleceu dois modelos murinos para o estudo dessa complicação, nos quais foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c infectados com *P. berghei* ANKA^{GFP} (MARINHO et al., 2009; NERES et al., 2008). A infecção por *P. berghei* ANKA normalmente leva camundongos da linhagem C57Bl/6 ao óbito, aproximadamente uma semana após a infecção, devido um quadro característico de malária cerebral (DE OCA; ENGWERDA; HAQUE, 2013). Como os animais nocautes utilizados neste estudo apresentam fundo genético C57Bl/6, foi estabelecido um novo modelo, utilizando a cepa *P. berghei* NK65^{GFP}, que não causa malária cerebral em camundongos C57Bl/6 (RODRIGUES-DUARTE et al., 2012).

Sabe-se que a adesão de eritrócitos parasitados ao tecido placentário está associada ao desenvolvimento da malária placentária. Tanto em infecção por *P. falciparum*, quanto por *P. berghei* ANKA, essa adesão é mediada por receptores CSA (FRIED; DUFFY, 1996; MARINHO et al., 2009; NERES et al., 2008). Para determinar se eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65^{GFP} têm capacidade de se aderir a esse receptor, nós avaliamos o efeito do CSA solúvel sobre a adesão de EP maduros sincronizados em células CHO-K1, que expressam CSA em sua superfície (ANDREWS et al., 2005). Nesses experimentos EP foram previamente incubados, ou não, com CSA solúvel e posteriormente colocados em contato com as células CHO-K1. Nós mostramos que CSA solúvel, mas não CSB e ácido colomínico, inibem competitivamente a adesão de EP às células CHO-K1 de maneira dose dependente (**Figura 32A**). Em adição, demonstramos que EP com *P. berghei* NK65^{GFP} aderem ao tecido placentário de camundongos, também por um mecanismo dependente do receptor CSA, visto que altas concentrações de CSA solúvel prejudicam a adesão do EP (**Figura 32B e 32C**). Semelhante ao observado em humanos e em outros modelos murinos, nossos resultados sugerem que o tecido placentário de camundongos com fundo C57Bl/6 é hábil em sequestrar EP com *P. berghei* NK65, levando à lesão placentária.

Figura 32 – *P. berghei* NK65 adere ao tecido placentário via CSA.

(A) Ensaio de competição de eritrócitos parasitados (EP) ligados a células CHO-K1, pré-incubadas com CSA, CSB e AC em diferentes concentrações. Foi contado o número de EP em 10 campos selecionados randomicamente e o percentual médio de ligação comparado com o controle (100%). (B, C) Ensaio de competição em tecido placentário de camundongos não infectados. EP foram pré-incubados com diferentes concentrações de CSA e usados para o ensaio de adesão. As lâminas foram montadas e examinadas em microscópio de fluorescência e (B) quantificado o número de eritrócitos (verde) por campo (média de 50 campos). (C) Imagem representativa do ensaio de competição mostrando EPs, não tratado (esquerda), aderidos à camada de células do sinciciotrofoblasto; ou pré-incubados com CSA nas concentrações de 100mg/mL (meio) ou 1000mg/mL (direita). São mostrados dados representativos de 3 experimentos independentes feitos em triplicata. Os dados expressam a média $\pm$ erro padrão. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) two-way (A) ou one-way com pós teste de Bonferroni (B)).

Fonte: Adaptada de Barboza et al., (2014)

Para definir se a infecção por *P. berghei* NK65^{GFP} induz malária placentária em camundongos C57Bl/6, fêmeas grávidas foram infectadas no 13º dia gestacional (G13) e o impacto da infecção investigado no G19. Nossos resultados mostram que placentas de camundongos C57Bl/6 infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} apresentam aumento da desorganização tecidual, quando comparadas às placentas de fêmeas não infectadas (**Figura 33A vs 33B**), deposição de colágeno na zona do labirinto (**Figura 33D e 33E**) e áreas de necrose entre o espongiotrofoblasto e a decídua (**Figura 33C**). Além disso, foi evidenciada a presença de eritrócitos parasitados no sinciciotrofoblasto (**Figura 33F**).

Figura 33 – Infecção por *P. berghei* NK65 induz malária placentária em camundongos C57Bl/6

Camundongos C57Bl/6 (WT) grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19 para coleta das placentas. As imagens representam fotomicrografias da área sinusoidal das placentas de camundongos (A) não infectadas e (B) infectadas, marcadas com PAS, mostrando organização tecidual e espaço vascular. (C) Áreas de necrose e (F) eritrócitos parasitados presente no sinciciotrofoblasto foram marcadas com H&E. (D, E) Fibras de colágeno foram marcadas com *picrosirius red* e analisadas por microscopia (D) de luz comum e (E) de luz polarizada. As setas indicam (B) necrose, (D, E) fibras de colágeno e (F) eritrócitos parasitados. De, decidua; St, espongiotrofoblasto; Ne, necrose; La, zona do labirinto. Ampliação de 400 x (A-E) e 1000 x (F).

Fonte: Adaptada de Barboza et al., (2014)

As características da malária placentária também incluem redução do espaço vascular – como consequência do espessamento do sinciotrofoblasto –, baixo peso ao nascer e aborto (NERES et al., 2008; UMBERS et al., 2011a). Similarmente, fêmeas grávidas e infectadas com *P. berghei* NK65^{GFP} apresentaram redução do espaço vascular (**Figura 34A**), diminuição da massa corpórea dos fetos ao nascerem (**Figura 34B**) e aumento da taxa de reabsorção ou abortos dos fetos (**Figura 34C**), quando comparadas às controles não infectadas.

Figura 34 – Infecção por *P. berghei* NK65 induz baixo peso ao nascer e abortos.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. **(A)** Imagem ilustrativa (acima) e quantificação relativa da área sinusoidal em relação à área total do tecido placentário usando um método automático de análise morfométrica (abaixo). **(B)** Imagem ilustrativa (acima) e peso corpóreo médio dos fetos em G19 (abaixo). **(C)** Imagem ilustrativa do útero de grávidas (acima) e quantificação relativa do número de reabsorções/abortos em relação ao total de fetos viáveis mais o total de reabsorções/abortos (abaixo). Em **C** as setas indicam reabsorções. As colunas brancas representam o grupo controle (WT^{CT}) e as colunas tracejadas se referem ao grupo de animais infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} (WT^{inf}). Os dados são apresentados com a média $\pm$ erro padrão de 30 a 60 fetos ou placentas (n= 8 a 10 grávidas) por grupo. *** $P < 0,001$ (Teste t de Student), comparado às grávidas não infectadas.

4.3.4.4 Placentas de camundongos com malária placentária têm baixa expressão de transportadores de nutrientes

O desenvolvimento fetal normal depende, entre outros fatores, de um adequado aporte de nutrientes, transferidos pela mãe através da circulação materno-fetal (PARDI; MARCONI; CETIN, 2002). A infecção por *P. falciparum* pode alterar a expressão e função de transportadores de aminoácido, comprometendo a transferência de nutrientes e, por consequência, o crescimento do feto (BOEUF et al., 2013). Convém ressaltar que, em nosso modelo murino, as placentas de camundongos WT infectadas têm uma menor expressão de mRNA para os transportadores de aminoácidos SNAT1 (**Figura 35A**) e SNAT2 (**Figura 35B**) e para o transportador de glicose GLUT1 (**Figura 35C**), quando comparadas às grávidas não infectadas, sugerindo uma redução do transporte de nutrientes para o feto e, por extensão, baixo peso ao nascer.

Figura 35 – Infecção por *P. berghei* NK65 induz baixa expressão placentária de transportadores de nutrientes.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. Expressão relativa de mRNA referente aos transportadores de aminoácidos (A) *SLC38A1* (SNAT1) e (B) *SLC38A2* (SNAT1) e ao transportador de glicose (C) *SLC2A1* (GLUT1), os quais foram quantificados nas placentas por qRT-PCR e a expressão normalizada com o gene constitutivo GAPDH, utilizando o método de quantificação $2^{-\Delta\Delta CT}$. As colunas brancas representam o grupo controle (WT^{CT}) e as colunas tracejadas se referem ao grupo de animais infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} (WT^{inf}). Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 placentas (n= 5 grávidas) por grupo. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (Teste t de Student), comparado às grávidas não infectadas.

4.3.4.5 *Malária placentária experimental está associada a aumento, local e sistêmico, de citocinas pró-inflamatórias*

Sendo a resposta inflamatória intrinsecamente associada à manifestação da patologia placentária em infecção por *P. falciparum* (CHENE et al., 2014; SUGUITAN-JUNIOR et al., 2003), nós avaliamos o perfil de citocinas presentes na placenta e no soro de grávidas infectadas e não infectadas no G19. Semelhante ao observado em humanos, foi evidenciado um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IFN- γ e IL-6 no extrato de placentas de grávidas infectadas, quando comparadas às não infectadas (**Figura 36A**). Em adição, houve aumento da concentração de TNF- α , IFN- γ e IL-6 no plasma de grávidas infectadas, quando comparadas às controles, porém a mesma diferença não foi observada em relação à concentração de IL-1 α (**Figura 36A**). O perfil de IL-10 das grávidas infectadas não foi alterado, tanto na placenta quanto no plasma e IL-1 β não foi detectada no plasma de nenhum dos grupos (**Figura 36A e 36B**). Em conjunto, esses dados sugerem uma relação entre o aumento de citocinas pró-inflamatória e a disfunção placentária durante a infecção.

Figura 36 – Infecção por *P. berghei* NK65 induz aumento de citocinas pró-inflamatórias na placenta e no sangue.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. Mensuração de IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10 na placenta (**A**) e soro (**B**) de fêmeas com ou sem malária placentária. A partir de um pool de quatro placentas por grávida foi realizada a extração protéica para a dosagem de IL-1 β e IL-1 α por ELISA e TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10 por CBA. A quantificação de proteínas totais foi realizada por densitometria óptica. As colunas brancas representam o grupo controle (WT^{CT}) e as colunas tracejadas se referem ao grupo de animais infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} (WT^{inf}). Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 a 6 pools contendo 4 amostras de placentas por grávida (n= 5 a 6 grávidas) por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (Teste t de Student), comparado às grávidas não infectadas.

4.3.4.6 Eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 regulam e ativam a via de sinalização dos TLRs

É bem caracterizado em modelos murinos, que a indução de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo da IL-1 β e IL-1 α , IFN- γ , TNF- α e IL-6, durante infecção por plasmódio, é especialmente regulada pela ativação da via sinalização dos TLRs (GAZZINELLI et al., 2014). A ativação dessa via também promove a expressão de componentes dos inflamassoma e é o primeiro sinal para liberação da IL-1 β ativa (ATAIDE et al., 2014). Assim, primeiramente, foi investigado o perfil de expressão de genes envolvidos na via de sinalização dos TLRs, em placentas de camundongos com malária placentária. Como exibido na **Figura 37**, os resultados indicaram que a partir dos genes analisados, grávidas WT infectadas apresentaram, significativamente, uma suprarregulação gênica de TLR9, TLR4, TLR3, CXCL10,

Stat1, NFKBIA, NFKB1, MYD88 e IRF7 e uma infrarregulação do gene CCL5, quando comparadas a camundongos não infectados.

Figura 37 – Infecção por *P. berghei* NK65 modula a expressão de genes da via TLR em placentas de camundongos.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) grávidas foram infectadas ou não, por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. A expressão relativa de mRNA de componentes da via dos TLRs em placentas dos camundongos foi analisada por *PCR Array* e normalizada com o gene constitutivo GAPDH, utilizando o método de quantificação $\Delta\Delta CT$. O gráfico representa *fold-change* da expressão de mRNA em placentas de camundongos infectados relativo a expressão de mRNA de placentas não infectadas. Regulação para baixo é indicada como valores negativos e regulação para cima como valores positivos. As linhas tracejadas indicam 2 *fold-change* e as linhas pontilhadas indicam 1,5 *fold-change*. Os dados são apresentados com a média $\pm$ D.P. de 3 placentas (n= 3 grávidas) por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (Teste t de Mann-Whitney), comparado às grávidas não infectadas.

Para melhor interpretar as funções biológicas e as interligações entre os genes analisados, fizemos uso do *KEGG Mapper*. Esta ferramenta permitiu mapear as diferenças de expressão obtidas, sugerindo que a resposta imune inata pela via dos TLRs poderá atuar tanto pela via dependente quanto pela via independente de MyD88 (**Figura 38**). A via independente de MyD88, talvez, atue através da sinalização de TLR3, TRIF e IRF7.

Figura 38 – Vias de sinalização dos Receptores do Tipo Toll.

Mapeamento do perfil da expressão de gene da via de sinalização TLR utilizando o mapa KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>), mediante a infecção por *P. berghei* NK65^{GFP}. As cores estão associadas à expressão do gene: amarelo – genes não regulados; laranja – baixa regulação para cima (*fold-change* < 2) e vermelho – alta regulação para cima (*fold-change* ≥ 2), em relação a 1,5 *fold-change* das grávidas não infectadas.

Com base nestes resultados, foi posteriormente investigada a capacidade dos EPs com *P. berghei* NK65 de ativar os TLRs, usando um ensaio funcional em células COS-7 transientemente transfectadas com TLR2, TLR4 e TLR9, bem como um ensaio de luciferase com promotor de E-selectina dependente de NF- κ B. Embora tenha sido observado um aumento da regulação da TLR3, não foi investigada a sua ativação, visto não haver qualquer indicação de um ligante específicos de TLR3 derivado de parasita (GAZZINELLI et al., 2014; PARROCHE et al., 2007). Além disso, sabe-se que o TLR3 reconhece o DNA de cadeia dupla associada com infecção por vírus induzindo a ativação de IRF3 (DOYLE et al., 2002); no entanto, não observamos uma regulação do gene IRF3. Em conjunto, estes resultados sugerem que, em contraste com outros TLRs, TLR3, apesar de suprarregulado, não é ativado em nosso modelo.

Como mostrado na **Figura 39A**, após estimulação com EPs, as células transfectadas com TLR2 ou TLR4 demonstraram um aumento de 2 vezes na expressão de E-selectina repórter em comparação com as células estimuladas com eritrócitos não parasitados. A ativação do TLR9 demonstrou uma resposta mais fraca, o que pode ter sido devido aos baixos níveis do agonista TLR9 na cultura; o TLR9 reconhece os componentes internos do parasita, tal como o DNA ou a hemozoína (COBAN et al., 2005). Para validar o experimento, mostramos que agonistas de TLR2 (PAM3CSK4), TLR4 (LPS) E TLR9 (CpG ODN) também induziram expressão de E-selectina (**Figura 39B**).

Figura 39 – Eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 são reconhecidos por TLR2, TLR4 e TLR9.

Células COS-7 (4×10^4 células/poço) foram transfectadas com plasmídeos de TLRs mais E-luciferase/E-selectina de vaga-lume e luciferase/ β -actina de renilla. As células transfectadas foram estimuladas com $3,3 \times 10^6$ EnP ou EP com *P. berghei* NK65^{GFP} (A) ou com um agonista de TLR2 (PAM3CSK4 – 0,2 μ g/ml); o agonista de TLR4 (LPS – 1 μ g/ml) ou um agonista de TLR9 (CpG ODN – 1 μ g/ml) (B). Após 6 horas, as células foram lisadas e a atividade da luciferase foi mensurada. São mostrados dados representativos de 3 experimentos independentes feitos em triplicata. Os dados expressam a média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) two-way (A) ou one-way com pós teste de Bonferroni (B)).

4.3.4.7 Desenvolvimento de malária placentária é decorrente das vias de sinalização TLR4 e TLR9

Considerando o papel da infecção pelo parasita sobre a regulação e ativação dos TLRs, o passo seguinte foi avaliar a contribuição desses receptores para o desenvolvimento da malária placentária no modelo murino estabelecido. Para isso, analisamos o espaço vascular das placentas de camundongos grávidas TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e TLR9^{-/-}, infectadas e não infectadas. Para uma análise mais adequada, foram feitas comparações dos valores relativos (grávidas infectadas em relação às grávidas não infectadas) entre as linhagens. Quando comparadas às grávidas WT infectadas, que tiveram uma redução média de 18% do espaço vascular, as grávidas TLR4^{-/-} e TLR9^{-/-}, apresentaram, significativamente, uma menor alteração do espaço

sinusoidal (**Figura 40A**). Em adição, camundongos TLR4^{-/-} e TLR9^{-/-} também apresentaram, expressivamente, uma menor alteração do peso dos fetos, indicando a participação desses receptores no desenvolvimento da lesão placentária e baixo desenvolvimento fetal (**Figura 40B**). Por outro lado, apesar de responsivo a componentes do parasito (**Figura 39A**), não foi evidenciada a contribuição do TLR2 na redução do espaço vascular e baixo peso dos fetos, em nosso modelo experimental (**Figura 40**).

Figura 40 – TLR4 e TLR9 são importantes para o desenvolvimento da malária placentária em camundongos.

Fêmeas C57Bl/6 (WT), TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e TLR9^{-/-} grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. Percentual de redução do espaço vascular das placentas (**A**) e percentual de redução do peso corpóreo dos fetos (**B**) de fêmeas infectadas em relação aos das não infectadas em G19. Os dados são apresentados com média $\pm$ erro padrão de 23 a 50 placentas ou de 19 a 40 fetos (n= 5 a 10 grávidas) por grupo. *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) one-way com pós teste de Bonferroni) quando comparado entre as linhagens.

Em seguida, foi avaliada a influência dos TLRs na susceptibilidade à malária, fenômeno previamente observado em infecção humana (ROGERSON; MWAPASA; MESHNICK, 2007) e em modelo murino (MARINHO et al., 2009; NERES et al.,

2008). Para isso, comparou-se a parasitemia de camundongos grávidas e não grávidas infectadas no 6º dia pós-infecção (G19), momento no qual foram eutanasiadas. Semelhantes às WT, grávidas TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-}, tivemos parasitemia maior que as não grávidas da respectiva linhagem (**Figura 41**). Porém, não houve diferença significativa entre as linhagens. Interessantemente, camundongos TLR4^{-/-} não apresentaram alteração na parasitemia associada à gravidez. O resultado confirmou a maior suscetibilidade à infecção durante gravidez, além disso, indicou que esta é influenciada pelo TLR4, mas não por TLR2 e TLR9.

Figura 41 – TLR4 contribuem para a suscetibilidade de grávidas à infecção por *P. berghei* NK65.

Fêmeas C57Bl/6 (WT), TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e TLR9^{-/-} grávidas e não grávidas foram infectadas por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. A parasitemia de fêmeas grávidas e não grávidas após seis dias de infecção (G19) foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5. As colunas não pontilhadas representam fêmeas não grávidas e as colunas pontilhadas se referem à fêmeas grávidas. Os dados são apresentados com a média $\pm$ erro padrão de 8 a 10 fêmeas por grupo. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) two-way).

A via MyD88 tem um papel chave na sinalização induzida por TLRs (WARNER; NUNEZ, 2013), essencial para a montagem da resposta pró-inflamatória diante da infecção por plasmódio e desenvolvimento de quadros mais complexos da doença (FRANKLIN et al., 2009; GRIFFITH et al., 2007). Por outro lado, ainda não

está claro o papel do TRIF – outra importante molécula adaptadora da vias dos TLRs – na infecção pelo parasita (COBAN et al., 2007; LIEHL et al., 2014). Notavelmente, MyD88 e TRIF/TICAN mostraram-se essenciais para o desenvolvimento da malária placentária. Em nosso modelo experimental, grávidas *MyD88*^{-/-} e *TRIF*^{-/-}, apresentaram uma menor alteração quanto a redução do espaço vascular (Figura 42A) e do peso dos fetos (Figura 42B), quando comparadas às grávidas WT.

Figura 42 – MyD88 e TRIF/TICAM são importantes para o desenvolvimento da malária placentária em camundongos.

Fêmeas C57Bl/6 (WT), *MyD88*^{-/-} e *TRIF*^{-/-} grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. Percentual de redução do espaço vascular das placentas (A) e percentual de redução do peso corpóreo dos fetos (B) de fêmeas infectadas em relação aos das não infectadas em G19. Os dados são apresentados com média $\pm$ erro padrão de 33 a 36 placentas ou de 28 a 35 fetos (n= 4 a 10 grávidas) por grupo. *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) one-way com pós teste de Bonferroni) quando comparado entre as linhagens.

Em adição, apesar do aumento da suscetibilidade das grávidas, não foi evidenciada influência das moléculas adaptadoras sobre a parasitemia dos camundongos (Figura 43). Esses resultados indiciam a ativação das vias TLR4/MyD88 e TLR9/MyD88 como mecanismos chave para a indução do processo inflamatório local na malária placentária, agindo como primeiro sinal para ativação

do inflamassoma e liberação de IL-1 β ativa. Além disso, os dados também sugerem que a ativação da via TLR4/TRIF durante a infecção tem impacto negativo sobre a gravidez.

Figura 43 – MyD88 e TRIF não contribuem para a suscetibilidade de grávidas à infecção por *P. berghei* NK65.

Fêmeas C57Bl/6 (WT), MyD88^{-/-} e TRIF^{-/-} grávidas e não grávidas foram infectadas por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. A parasitemia de fêmeas grávidas e não grávidas após seis dias de infecção (G19) foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5. As colunas não pontilhadas representam fêmeas não grávidas e as colunas pontilhadas se referem às fêmeas grávidas. Os dados são apresentados com a média $\pm$ erro padrão de 8 a 10 fêmeas por grupo. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) two-way).

4.3.4.8 Caspase-1 é regulada e ativada durante infecção por *P. berghei* NK65

Semelhante aos TLRs, os NLRs apresentam um papel importante na resposta imune ao *Plasmodium*. Alguns participam da formação do inflamassoma, complexo proteico essencial para ativação da Caspase-1 e liberação de IL-1 β ativa (KALANTARI et al., 2014; SHIO et al., 2009). Para investigar a contribuição da via de sinalização dos NLRs e dos inflamassomas na insuficiência placentária, determinamos o perfil de expressão de genes envolvidos na via de sinalização dos NLRs, em placentas de camundongos com malária placentária. Como é mostrado na **Figura 44**, os resultados indicaram que placentas de grávidas WT infectadas

apresentaram uma suprarregulação da expressão gênica de NOD2, NLRP3 e Caspase-1 quando comparado com camundongos não infectados.

Figura 44 – Infecção por *P. berghei* NK65 modula a expressão de genes da via NLR em placentas de camundongos.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) grávidas foram infectadas ou não, por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. A expressão relativa de mRNA de componentes da via dos TLRs em placentas dos camundongos foi analisada por *PCR Array* e normalizada com o gene constitutivo GAPDH, utilizando o método de quantificação $\Delta\Delta CT$. O gráfico representa *fold-change* da expressão de mRNA em placentas de camundongos infectados relativo a expressão de mRNA de placentas não infectadas. Regulação para baixo é indicada como valores negativos e regulação para cima como valores positivos. As linhas tracejadas indicam 2 *fold-change* e as linhas pontilhadas indicam 1,5 *fold-change*. Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 3 placentas ($n = 3$ grávidas) por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (Teste t de Mann-Whitney), comparado às grávidas não infectadas.

Para melhor interpretar as funções biológicas e as interligações entre os genes analisados, fizemos uso do *KEGG Mapper*. Esta ferramenta permitiu mapear as diferenças de expressão obtidas, sugerindo que a resposta imune inata pela via dos NLRs poderá atuar tanto pela via dependente, quanto pela via independente do inflamassoma (**Figura 45**).

Figura 45 – Vias de sinalização dos Receptores do Tipo NOD.

Mapeamento do perfil da expressão de gene da via de sinalização TLR utilizando o mapa KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>), mediante a infecção por *P. berghei* NK65^{GFP}. As cores estão associadas à expressão do gene: amarelo – genes não regulados; laranja – baixa regulação para cima (*fold-change* < 2) e vermelho – alta regulação para cima (*fold-change* ≥ 2), em relação a 1,5 *fold-change* das grávidas não infectadas.

Com base nestes resultados, posteriormente foi determinado se placentas de grávidas infectadas expressam a forma ativa da Caspase-1. Evidenciamos, por *western blot*, que a infecção por *P. berghei* NK65^{GFP} induziu a liberação da subunidade p20 da Caspase-1 clivada na placenta de camundongos C57Bl/6, indicando que a infecção promove ativação da Caspase-1 nesse tecido (**Figura 46A e 46B**).

Figura 46 – Caspase-1 está ativada na placenta de camundongos com malária placentária.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. **(A)** Amostras de tecido placentário foram lisadas com tampão RIPA e analisada por *Western blot* usando um anticorpo anti-subunidade p20 da caspase-1. **(B)** A quantificação foi realizada por densitometria normalizada pela expressão da proteína constitutiva beta-actina. As colunas brancas representam o grupo controle (WT^{CT}) e as colunas tracejadas se referem ao grupo de animais infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} (WT^{Inf}). Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 4 a 5 *pools* contendo quadro amostras de placentas por grávida (n= 4 a 5 grávidas) por grupo. ** $P < 0,01$ (Teste t de *Student*), comparado às grávidas não infectadas.

4.3.4.9 Desenvolvimento de malária placentária é decorrente de Caspase-1

Conforme demonstrado anteriormente, a via MyD88 tem um importante papel do desenvolvimento da malária placentária. Entre outras funções, a ativação dessa via culmina com expressão de pró-Caspase-1 e pró-IL-1 β (DENES; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2012). Em adição, Caspase-1 é fundamental para liberação da forma ativa da IL-1 β . Como a Caspase-1 foi comprovadamente ativada na placenta de camundongos infectadas com *P. berghei* NK65^{GFP}, o passo seguinte foi avaliar o papel dessa proteína no desenvolvimento da malária placentária murina. Por isso, foram usadas fêmeas grávidas de *Caspase-1* e *Caspase-11* (Casp1/11^{-/-}). Para fins de comparação, também foram usadas fêmeas MyD88^{-/-}. Cabe salientar que os resultados indicam que a infecção teve um menor impacto sobre a redução do peso do feto (**Figura 47A**) e aumento da taxa de reabsorção (**Figura 47B**) nas grávidas MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-}, quando comparadas às WT. Em adição, a redução relativa de reabsorções em grávidas MyD88^{-/-} infectadas foi menor que nas Casp1/11^{-/-}. Em consonância com esses resultados, a produção de IL-1 β no tecido placentário foi menor nas grávidas MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} e não houve diferença entre infectadas e não infectadas, diferente do observado nas grávidas WT (**Figura 47C**). Esses resultados confirmam não só o papel chave da MyD88 e da Caspase-1 para a liberação de IL-1 β , bem como a sua relação com baixo desenvolvimento fetal associado à infecção pelo parasito.

Figura 47 – MyD88 e Caspase-1 são importantes para o desenvolvimento da malária placentária em camundongos.

Fêmeas C57Bl/6 (WT), MyD88^{-/-} e Casp1/11^{-/-} grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. **(A)** Percentual de redução do peso corpóreo dos fetos de fêmeas infectadas em relação aos das não infectadas em G19. **(B)** Relação entre a taxa de reabsorção/abortos de fêmeas infectadas e não infectadas. **(C)** Quantificação de IL-1β em tecido placentário de fêmeas com (Inf) ou sem (Ct) malária placentária. A partir de um *pool* de 4 placentas por grávida foi realizada a extração protéica para a dosagem da citocina por ELISA. A quantificação de proteínas totais foi realizada por densitometria óptica. Os dados são apresentados com a (A) média $\pm$ erro padrão de 30 a 70 fetos (n= 8 a 10 grávidas) por grupo ou (C) média $\pm$ D.P. de 5 a 6 *pools* contendo 4 amostras de placentas por grávida (n= 5 a 6 grávidas) por grupo. *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) one-way com pós teste de Bonferroni (A) ou Teste t de Student (C)), comparado entre as linhagens (A) ou às grávidas não infectadas (C).

Semelhantes às WT, grávidas *MyD88*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} tiveram parasitemia maior que as não grávidas da respectiva linhagem (**Figura 48**), embora não tenha havido diferença significativa as linhagens. Portanto, o resultado indica que *MyD88* ou *Casp1/11* não influenciam na suscetibilidade das grávidas à infecção.

Figura 48 – *MyD88* e *Caspase-1* não contribuem para a suscetibilidade de grávidas à infecção por *P. berghei* NK65.

Fêmeas C57Bl/6 (WT), *MyD88*^{-/-} e *Casp1/11*^{-/-} grávidas e não grávidas foram infectadas por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. A parasitemia de fêmeas grávidas e não grávidas após seis dias de infecção (G19) foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5. As colunas não pontilhadas representam fêmeas não grávidas e as colunas pontilhadas se referem às fêmeas grávidas. Os dados são apresentados com a média $\pm$ erro padrão de 8 a 10 fêmeas por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (Análise de variância (ANOVA) two-way).

4.3.4.10 *Desenvolvimento da malária placentária é decorrente da ativação do inflamassoma*

Como reportado, a ativação de Caspase-1 é decorrente da formação de um complexo multiproteico denominada inflamassoma, a partir da ativação de diversos receptores intracelulares, como NLRP3, NLRC4 e AIM2 (GAZZINELLI et al., 2014; KHARE et al., 2010). Estes podem requerer a proteína adaptadora ASC, para se acoplarem à Caspase-1. Para determinar os inflamassomas que contribuem para o desenvolvimento da malária placentária, foram usadas grávidas *NLRC4^{-/-}* *NLRP3^{-/-}*, *AIM2^{-/-}* e *ASC^{-/-}*. Semelhante ao evidenciado nos camundongos *MyD88^{-/-}* e *Casp1/11^{-/-}*, os percentuais de redução dos pesos das proles de grávidas *ASC^{-/-}* e *AIM2^{-/-}* infectadas foram expressivamente menores em relação às WT (**Figura 49A**). Ademais, foi evidenciada uma significativa redução deste parâmetro em grávidas *NLRP3^{-/-}* infectadas, quando comparadas às WT; porém, de forma menos expressiva que nas grávidas *AIM2^{-/-}*.

Por outro lado, só houve redução significativa da taxa de reabsorção relativa em grávidas *ASC^{-/-}* e *AIM2^{-/-}*. Grávidas infectadas *NLRC4^{-/-}* e *NLRP3^{-/-}* não tiveram alteração importante nesse parâmetro, quando comparadas às grávidas WT (**Figura 49B**). Em adição, os resultados indicam que o receptor NLRC4 também não é importante para a ocorrência de baixo peso na malária placentária. Em concordância com esses achados, não houve diferença entre as concentrações de IL-1 β no tecido placentário de grávidas *ASC^{-/-}*, *NLRP3^{-/-}* e *AIM2^{-/-}* infectadas e não infectadas (**Figura 49C**). Entretanto, teve maior produção de IL-1 β na placenta de grávidas *NLRC4^{-/-}* infectadas, quando comparadas às não infectadas, sugerindo um papel chave dos inflamassomas NLRP3 e AIM2, mas não do NLRC4, para a liberação de IL-1 β associada à infecção por *P. berghei* NK65, bem como seu impacto negativo sobre a gravidez.

Figura 49 – MyD88 e Caspase-1 são importantes para o desenvolvimento da malária placentária em camundongos.

Fêmeas C57Bl/6 (WT), ASC^{-/-}, NLRC4^{-/-}, NLRP3^{-/-} e AIM2^{-/-} grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. **(A)** Percentual de redução do peso corpóreo dos fetos de fêmeas infectadas em relação aos das não infectadas em G19. **(B)** Relação entre a taxa de reabsorção/abortos de fêmeas infectadas e não infectadas. **(C)** Quantificação de IL-1β em tecido placentário de fêmeas com (Inf) ou sem (Ct) malária placentária. A partir de um *pool* de quatro placentas por grávida foi realizada a extração protéica para a dosagem da citocina por ELISA. A quantificação de proteínas totais foi realizada por densitometria óptica. Os dados são apresentados com a **(A)** média ± E.P. de 30 a 70 fetos (n= 8 a 10 grávidas) por grupo ou **(C)** média ± desvio padrão de 5 a 6 *pools* contendo 4 amostras de placentas por grávida (n= 5 a 6 grávidas) por grupo. *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) one-way com pós teste de Bonferroni **(A)** ou Teste t de Student **(C)**), comparado entre as linhagens **(A)** ou às grávidas não infectadas **(C)**.

Apesar do aumento da parasitemia nas grávidas em relação às não grávidas em todas as linhagens, não houve diferença entre as parasitemias dos camundongos WT, *ASC*^{-/-}, *NLRC4*^{-/-} e *NLRP3*^{-/-} (Figura 50). Contudo, a parasitemia das grávidas *AIM2*^{-/-} foi acentuadamente menor que a das demais linhagens.

Figura 50 – Receptor AIM2 contribui para a suscetibilidade de grávidas à infecção por *P. berghei* NK65.

Fêmeas C57Bl/6 (WT), *ASC*^{-/-}, *NLRC4*^{-/-}, *NLRP3*^{-/-} e *AIM2*^{-/-} grávidas e não grávidas foram infectadas por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. A parasitemia de fêmeas grávidas e não grávidas após seis dias de infecção (G19) foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5. As colunas não pontilhadas representam fêmeas não grávidas e as colunas pontilhadas se referem à fêmeas grávidas. Os dados são apresentados com a média $\pm$ erro padrão de 8 a 10 fêmeas por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) two-way).

4.3.4.11 O eixo IL-1 contribui para o baixo peso dos fetos de grávidas com malária placentária.

Por propormos que exista uma relação entre produção de IL-1 β e o baixo peso ao nascer, nós investigamos a participação do receptor de IL-1 (IL1R) no desenvolvimento da prole de grávidas com malária placentária. Para tanto, nós utilizamos camundongos deficientes de *IL1R* (IL1R^{-/-}) ou tratamos grávidas WT infectadas com *P. berghei* NK65^{GFP} ou não infectadas, com Anakinra. Esse fármaco é um recombinante não glicosilado do antagonista do IL1R (IL1Ra) humano, mas que já demonstrou ser efetivo em modelos murinos (ATAIDE et al., 2014). Nossos resultados demonstram que ausência do *IL1R* em grávidas infectadas *P. berghei* NK65^{GFP} promoveu um menor percentual de decaimento do peso do fetal (1,1% *versus* 16,4% dos WT) (**Figura 51A**) e uma menor taxa de reabsorção relativa, quando comparadas as controles WT (**Figura 51B**). De acordo com esses achados, o tratamento com o IL1Ra recombinante reverteu a redução do peso e o aumento da taxa de reabsorções em fetos de grávidas WT infectadas, apresentando um perfil semelhante ao observado na grávidas IL1R^{-/-} (**Figura 51A e 51B**). Isso sugere uma forte contribuição do receptor de IL-1 para as alterações fetais presentes em grávidas com malária placentária.

Figura 51 – Receptor para IL-1 contribui para redução do desenvolvimento fetal em camundongos com malária placentária.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) e IL1R^{-/-} grávidas foram infectadas por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. Vinte e quatro horas após a infecção (G14), grávidas C57Bl/6 (IL1Ra), infectadas ou não, foram tratadas com 100mg/Kg de IL1Ra recombinante (Anakinra) por cinco dias (até G18), subcutaneamente. **(A)** Percentual de redução do peso corpóreo dos fetos de fêmeas infectadas em relação aos das não infectadas em G19. **(B)** Relação entre a taxa de reabsorção/abortos de fêmeas infectadas e não infectadas. Os dados são apresentados com a média $\pm$ erro padrão de 30 a 53 ($n = 7$ a 10 grávidas) / grupo. *** $P < 0,001$ (Análise de variância (ANOVA) one-way com pós teste de Bonferroni), comparado entre as linhagens.

4.3.4.12 Receptor para IL-1 é importante para expressão de transportadores de nutrientes

Tem sido mostrado que a IL-1 β pode suprarregular a expressão e a atividade dos transportadores de aminoácidos SNAT1 e SNAT2 (BOEUF et al., 2013; THONGSONG et al., 2005), o que contribuiria para o pobre desenvolvimento dos fetos em mulheres com malária placentária. Em consonância com esses achados, mostramos que placentas de grávidas IL1R^{-/-} infectadas não tiveram alteração na expressão do mRNA de SNAT1 (**Figura 52A**), SNAT2 (**Figura 52B**) e GLUT1 (**Figura 52B**), quando comparadas às grávidas não infectadas; diferente das fêmeas WT infectadas, que tiveram uma baixa expressão do mRNA dos três transportadores. Em concordância com esses resultados, grávidas WT infectadas com *P. berghei* NK65^{GFP} e tratadas com Anakinra também não alteraram de forma

significativa a expressão de mRNA de *SNAT1* e *SNAT2*, porém mantiveram a baixa expressão de GLUT1, já observada em grávidas WT infectadas (**Figura 52**). Em conjunto, esses resultados assinalam uma relação entre a ativação do IL1R e a baixa expressão de transportadores de nutrientes na placenta.

Figura 52 – Receptor para IL-1 contribui para a baixa expressão de mRNA de transportadores de nutrientes em camundongos com malária placentária.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) e IL1R^{-/-} grávidas foram infectadas ou não por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. Vinte e quatro horas após a infecção (G14), grávidas C57Bl/6 (IL1Ra), infectadas (Inf) ou não (Ct), foram tratadas com 100mg/Kg de IL1Ra recombinante (Anakinra) por cinco dias (até G18), subcutaneamente. Expressão relativa de mRNA referente aos transportadores de aminoácidos *SLC38A1* (SNAT1) (A) e *SLC38A2* (SNAT2) (B), e ao transportador de glicose *SLC2A1* (GLUT1) (C) foi quantificada nas placentas WT (tratadas com Anakinra ou não e grávidas IL1R^{-/-} por qRT-PCR. A expressão foi normalizada pelo gene constitutivo GAPDH utilizando-se o método de quantificação $2^{-\Delta\Delta CT}$. As colunas não tracejadas representam o grupo controle (Ct) e as colunas tracejadas se referem ao grupo de animais infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} (Inf). Os dados são apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de 5 a 6 pools contendo 4 amostras de placentas por grávida (n= 5 grávidas) por grupo. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (Teste t de Student), comparado às grávidas não infectadas.

Interessantemente, ao contrário do observado em grávidas WT sem tratamento, grávidas deficientes de *IL1R* ou tratadas com IL1Ra não aumentaram significativamente a parasitemia em relação às não grávidas da respectiva linhagem (**Figura 53**), indicando que o receptor contribui para a suscetibilidade das grávidas à infecção pelo *P. berghei* NK65.

Figura 53 – Receptor para IL-1 não contribuem para a suscetibilidade de grávidas à infecção por *P. berghei* NK65.

Fêmeas C57Bl/6 (WT) e IL1R^{-/-} grávidas ou não grávidas foram infectadas por via retro-orbital com 2×10^5 EPs com *P. berghei* NK65^{GFP} no 13º dia gestacional (G13) e eutanasiadas no G19. Vinte e quatro horas após a infecção (G14), grávidas C57Bl/6 (IL1Ra), infectadas (Inf) ou não (Ct), foram tratadas com 100 mg/Kg de IL1Ra recombinante (Anakinra) por cinco dias (até G18), subcutaneamente. A parasitemia de fêmeas grávidas e não grávidas após seis dias de infecção (G19) foi determinada por citometria de fluxo usando o marcador nuclear DRAQ5. As colunas não pontilhadas representam fêmeas não grávidas e as colunas pontilhada se referem à fêmeas grávidas. Os dados são apresentados com a média $\pm$ erro padrão de 7 a 10 fêmeas por grupo. * $P < 0,05$ (Análise de variância (ANOVA) two-way).

4.3.5 Discussão

Os mecanismos imunobiológicos envolvidos na patogênese da malária placentária ainda não se encontram completamente elucidados. Neste estudo, mostramos, pela primeira vez, que a liberação de IL-1 β pelos inflamassomas AIM2 e NLRP3 está claramente envolvida com baixo desenvolvimento fetal em um modelo experimental de malária placentária. Os resultados sugerem que, nesse processo, há a participação das vias de sinalização TLR4 e TLR9 dependentes de MyD88 que, reconhecidamente, induzem a expressão de pró-IL-1b quando estimulados pelo *Plasmodium* (COBAN et al., 2005; KALANTARI et al., 2014; KRISHNEGOWDA et al., 2005). O aumento de IL-1 β promove uma baixa expressão de transportadores de nutrientes na placenta, comprometendo o crescimento fetal (**Figura 54**).

Inicialmente foi determinado o perfil inflamatório de gestantes com infecção ativa por *P. falciparum* no momento do parto, visando compreender se a presença do parasito no tecido placentário geraria uma resposta inflamatória local. Optou-se por selecionar somente gestantes que haviam sido submetidas cesarianas, visto que, durante no parto natural já ocorre, local e fisiologicamente, uma intensa resposta pró-inflamatória (NORMAN et al., 2007). Logo, poderia ser um fator de confusão, já que nosso interesse foi investigar a resposta inflamatória em face do parasita. Neste aspecto, gestantes com infecção ativa por *P. falciparum*, apresentaram acúmulo de eritrócitos infectados e hemozoína no tecido placentário, alterações placentárias e uma redução do peso dos recém-nascidos associados a um significativo aumento do número de monócitos na placenta. Em adição, grávidas infectadas tiveram uma elevada concentração de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, confirmando que a infecção induz uma resposta pró-inflamatória local, acompanhada de um perfil regulatório.

Figura 54 – Mecanismo proposto para a RCIU mediado pelos TLRs e pelos inflamassomas durante malária placentária.

PAMPs e DAMPs da infecção por plasmódio são reconhecidos por TLR4 e TLR9 presentes em monócitos/macrófagos e trofoblastos da placenta, levando a ativação do fator de transcrição NF-κB e, por conseguinte, expressão de citocinas inflamatórias como TNF-α, IFN-γ e pró-IL-1β. Em adição, hemozoína e DNA genômico do parasita ativam, respectivamente, os inflamassomas NLRP3 e AIM2, promovendo ativação da pró-Caspase-1 e clivagem da pró-IL-1β que posteriormente é liberada para o meio extracelular. Ao interagir com seu receptor, a IL-1β promove a expressão de mais citocinas pró-inflamatórias, além de inibir a expressão dos transportadores de nutriente SNAT1, SNAT2 e GLUT1, contribuindo para a restrição do crescimento intrauterino e consequente baixo peso ao nascer. Elevadas concentrações de IL-1β, TNF-α e IFN-γ na placenta também aumentam a resposta inflamatória local, causam dano no tecido e provocam reabsorções e abortos. Esse quadro pode ser revertido com a administração de Anakinra, um antagonista recombinante do receptor de IL-1.

Estes resultados suportam outras observações, onde uma intensa resposta inflamatória na placenta está associada à infecção por *P. falciparum* durante a gravidez (NMORSI et al., 2010; ROGERSON et al., 2003a; SALIH et al., 2011). Contudo, nesses estudos, a infecção e o processo inflamatório foram mais robustos que o constatado em nosso trabalho. A existência de diagnóstico e o tratamento primário, rápidos e bem estabelecidos em nossa área de estudo, associados à ocorrência de apenas uma ou duas infecções durante a gravidez, podem ter contribuído para essa diferença (BRASIL, 2005, 2010). Já em regiões africanas endêmicas para malária – objeto dos estudos anteriores – é frequente um diagnóstico e um tratamento tardios, além da ocorrência de múltiplas infecções durante a gestação, o que contribui para a severidade da doença (NOSTEN et al., 2004; STEKETEE et al., 2001).

Em conformidade com o aumento de IL-1 β mostramos que a infecção do *P. falciparum* induz a ativação de Caspase-1 no tecido placentário. Em adição, mostramos que extrato de eritrócitos parasitados com *P. falciparum* induz a ativação de Caspase-1 ativa e liberação de IL-1 β por trofoblastos da linhagem BeWo, reforçando a hipótese que a presença de componentes do parasito no tecido placentário pode promover a ativação de sinciciotrofoblasto contribuindo para o processo inflamatório local e patologia placentária. De fato, tem sido mostrado que trofoblastos são responsivos a diversos PAMPs e DAMPs (ABRAHAMS, 2008; MULLA et al., 2011), contudo, ainda não havia relatos científicos mostrando que componentes do *Plasmodium* podem induzir a ativação de Caspase-1 nesta célula. A ativação da Caspase-1 também pode estar ocorrendo nos monócitos presentes no infiltrado inflamatório, no entanto, são necessárias mais evidências que suportem a hipótese.

Considerando a evidente relação entre a infecção por *P. falciparum* e o estabelecimento de uma intensa resposta inflamatória placentária com ativação da Caspase-1, o passo seguinte foi investigar, usando um modelo experimental, a contribuição do inflamassoma nessa complicação da malária.

Recentemente nosso grupo estabeleceu um modelo experimental, no qual, camundongos Balb/c fêmeas infectadas *P. berghei* ANKA desenvolvem um quadro de malária placentária com características semelhante à infecção por *P. falciparum* (NERES et al., 2008). Todavia, para avaliar o envolvimento do inflamassoma e da

via de sinalização dos TLRs na malária placentária, foi necessária a validação de um novo modelo experimental para essa doença, visto que os camundongos nocaute utilizados possuíam fundo genético C57Bl/6. Em virtude disso, foi usada a cepa *P. berghei* NK65 que, em contraste com *P. berghei* ANKA, não induz malária cerebral em camundongos C57Bl/6, como evidenciado anteriormente.

Está bem estabelecido que para o desenvolvimento da lesão placentária é fundamental o sequestro do parasito na placenta. Em contraste a outros órgãos, o sequestro de eritrócitos parasitados com *P. falciparum* no tecido placentário ocorre seletivamente através da adesão da molécula PfEMP1 do eritrócitos infectados ao glicosaminoglicano CSA, altamente expresso na placenta (FRIED; DUFFY, 1996; ROWE; KYES, 2004). Entretanto, essa não é uma característica exclusiva de *P. falciparum*. Tem sido reportado que eritrócitos infectados com as espécies de plasmódio murino, *P. chabaudi* e *P. yoelii* também podem se acumular no tecido placentário (COX; SEMOFF; HOMMEL, 1987; PAVIA; NIEDERBUHL, 1991; POOVASSERY; MOORE, 2006). Acrescente-se que nosso grupo mostrou que *P. berghei* ANKA pode aderir ao tecido placentário de camundongos Balb/c via CSA, induzindo um processo inflamatório local e patologia placentária. Analogamente, mostramos que a cepa *P. berghei* NK65 também adere ao tecido placentário e à superfície de células da linhagem CHO-K1 expressando CSA, por mecanismo semelhante à variante ANKA, indicando que esse parasita, potencialmente, pode induzir patologia placentária.

No modelo proposto, placentas de grávidas infectadas com *P. berghei* NK65 apresentaram acentuada desorganização tecidual, depósito de fibrina, necrose e espessamento do sinciciotrofoblasto; alterações semelhantes às observadas na placenta de gestantes com infecção ativa por *P. falciparum*. Pelo menos, em parte, isso pode ser resultado de fibrose tecidual como consequência do processo de reparo estimulado em resposta à infecção (ODUOLA et al., 1986). Por outro lado, extensas áreas de necrose e de depósito de fibras de colágeno em placentas ocorrem, frequentemente, devido à infecção por *P. falciparum* (AHMED et al., 2014; SOUZA et al., 2013b). Cabe notar que a infecção induziu, de forma substancial, uma redução do espaço vascular, provável consequência do espessamento do sinciciotrofoblasto, fenômeno já evidenciado no modelo de Balb/c (NERES et al., 2008).

Em adição, placentas infectadas apresentaram uma baixa expressão do mRNA dos transportadores de aminoácido SNAT1 e SNAT2 e do transportador de glicose GLUT1. Estes transportadores são fundamentais para o adequado suprimento nutricional e determinantes para o crescimento do feto (LAGER; POWELL, 2012). A desregulação destes transportadores contribui diretamente para alterações no desenvolvimento fetal, a exemplo da restrição do crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer (GLAZIER et al., 1997; JANSSON et al., 2002). Essa correlação também já foi evidenciada na malária placentária. Em mulheres infectadas com *P. falciparum*, o baixo peso ao nascer está associado a uma menor expressão e a disfunção dos transportadores SNAT1 e SNAT2 presentes na placenta (BOEUF et al., 2013). Isto também é sugerido para a baixa expressão de GLUT1 no sincitiotrofoblasto de mulheres com malária placentária (CHANDRASIRI et al., 2014). Como consequência dessa insuficiência placentária, grávidas C57Bl/6 infectadas por *P. berghei* NK65^{GFP} tiveram uma redução acentuada do peso dos fetos ao nascerem e um aumento do número de reabsorções. Além disso, consistente com a infecção em humanos e em outros modelos experimentais (DUFFY, 2007; MARINHO et al., 2009; NERES et al., 2008), a gravidez promoveu maior suscetibilidade à infecção por *P. berghei* NK65, evidenciada pelo aumento da parasitemia em grávidas, quando comparadas às não grávidas, logo nos primeiros dias de infecção.

Tanto em humanos quanto em camundongos, já é bem estabelecido que a insuficiência placentária seja decorrente do processo inflamatório em resposta ao plasmódio. Em mulheres infectadas com *P. falciparum* tem sido mostrado um aumento da expressão de IL-1 β , IL-10 e TNF- α na placenta e que a expressão de TNF- α está correlacionada diretamente com a concentração de hemozoína no tecido placentário (MOORMANN et al., 1999). Além disso, o estudo associou a restrição do crescimento intrauterino aos altos níveis de TNF- α e IL-8. Por outro lado, ainda é controverso o papel do IFN- γ , ora associado aos problemas decorrentes da malária placentária, juntamente com o TNF- α ; ora tido como dispensável para a progressão da complexidade (FRIED et al., 1998; ROGERSON et al., 2003b). Ambas as citocinas também têm sido implicadas em abortos espontâneos em humanos (MARZI et al., 1996). Da mesma maneira, tem sido apontado que o aumento sistêmico de TNF- α , IFN- γ e IL-1 β está relacionado ao aumento de abortos em modelos murinos de malária placentária (POOVASSERY; MOORE, 2006, 2009).

Nessa direção, o aumento local e sistêmico das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-6 em nosso modelo experimental pode justificar a elevada taxa de reabsorções e baixo desenvolvimento fetal observado em grávidas infectadas com *P. berghei* NK65. O efeito embriotóxico do TNF- α e IFN- γ e altas concentrações também reforçam esses resultados (YUI et al., 1994). Convém ressaltar que esses dados corroboram com o observado nas gestantes com infecção ativa por *P. falciparum*, nas quais tivemos um significativo aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 no sangue placentário.

A produção de citocinas pró-inflamatórias em modelo murinos para a malária está frequentemente associada à ativação da via dos TLRs (FRANKLIN et al., 2009; KRISHNEGOWDA et al., 2005). No entanto, o significado da expressão de genes TLRs na malária ainda não é conclusivo. Recentemente, Sobota et al., (2016) propuseram o uso da expressão de genes TLRs em seres humanos como um possível candidato a biomarcador para a malária grave. No referido trabalho foi realizado um estudo de caso-controle para comparar malária não complicada com malária grave e foi verificado que em ambas as situações houve um aumento da expressão de genes das vias de sinalização dos TLRs e do complemento. Especificamente, para os TLRs, esses autores demonstraram uma suprarregulação de TLR2, TLR4 e TLR8. Em adição à expressão gênica, polimorfismos dos TLRs estão associados à susceptibilidade e patogênese da malária (SOBOTA et al., 2016). Além disso polimorfismos dos TLRs em mulheres grávidas também foram correlacionados com o aumento da susceptibilidade à malária placentária. (HAMANN et al., 2010; LEORATTI et al., 2008; MOCKENHAUPT et al., 2006).

Aqui nós mostramos que genes de TLR3, TLR4 e TLR9 são suprarregulados em placentas de camundongos infectadas com *P. berghei* NK65. Embora tenha ocorrido um aumento da expressão de TLR3, não há qualquer indicação de um ligante específico desse receptor derivado do plasmódio (GAZZINELLI et al., 2014; PARROCHE et al., 2007), sugerindo que este não seja importante para indução da resposta imune na malária. Por outro lado, evidenciamos que TLR2, TLR4 e TLR9 são responsivos ao parasita, induzindo ativação da via NF- κ B, fundamental para expressão de citocinas pró-inflamatória, incluindo a IL-1 β .

Cabe notar que este estudo destaca uma nítida correlação entre o baixo desenvolvimento fetal e a expressão de TLR4 ou TLR9. Consistente com essa observação, outros estudos têm apresentado implicações negativas dos TLRs sobre

a gravidez. A administração intraperitoneal de LPS, um dos mais bem conhecidos agonistas de TLR4, em ratas grávidas, aumentou as concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sangue materno e no fluido amniótico, bem como a expressão dos mRNAs no tecido placentário (GAYLE et al., 2004). O aumento dessas citocinas mediado por LPS tem sido acarretado maior incidência de parto pré-termo em camundongos, por um mecanismo dependente de TLR4 (HIRSCH; WANG, 2005; LI; KANG; LEI, 2010).

Além disso, Arce et al., (2012), usando um modelo de infecção sistêmica induzida por LPS de *Campylobacter rectus* em camundongos grávidas, demonstraram que a ativação de TLR4 causa baixo peso ao nascer. Sugere-se que esse mecanismo esteja correlacionado ao reconhecimento de GPI do *Plasmodium* por esse TLR (KRISHNEGOWDA et al., 2005). Outro importante mediador da sinalização induzida por GPI, o TLR2 também tem sido implicado na ocorrência de nascimentos pré-termo, porém, parece não ser relevante para a indução de resposta inflamatória no tecido placentário (ILIEVSKI; LU; HIRSCH, 2007). De fato, em nosso modelo, a ausência de TLR2 não reverteu a lesão placentária e o baixo desenvolvimento fetal. Apesar de ser comprovadamente responsivo a eritrócitos infectados com *P. berghei* NK65, a sua baixa expressão nas placentas de camundongos infectadas pode justificar sua não contribuição para o desenvolvimento da malária placentária.

Outro importante mediador da resposta inflamatória induzida por componentes do *Plasmodium*, o TLR9 também tem sido associado à ocorrência de nascimentos pré-termo e alta taxa de reabsorção embrionária durante a gravidez de camundongos *non obese diabetic* (NOD) (COBAN et al., 2005, 2010; FRANKLIN et al., 2009; LIN et al., 2014; SUN et al., 2013). Além disso, a montagem de uma resposta inflamatória sistêmica e a disfunção vascular, mediadas pela ativação TLR9, têm sido implicadas na ocorrência de pré-eclâmpsia, com elevação da pressão arterial e restrição do crescimento intrauterino (GOULOPOULOU et al., 2012).

A indução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-6, mediada por TLR4 e TLR9, é especialmente associada à ativação da via MyD88 (TAKEDA; AKIRA, 2005). Essa via é considerada como essencial para ativação da resposta imune em modelos experimentais de malária (FRANKLIN et al., 2009). Notavelmente, mostramos que a ausência da molécula adaptadora MyD88 reduziu o dano placentário e o baixo desenvolvimento fetal causados pela infecção, indicando

a participação das vias TLR4/MyD88 e TLR9/MyD88 na progressão da malária placentária. Em adição, demonstramos que a molécula adaptadora TRIF também está associada ao baixo desenvolvimento fetal em camundongos grávidas infectadas. Embora esta molécula também esteja envolvida na via de sinalização TLR4, promovendo a expressão de IFN do tipo I, ainda não está claro seu papel na malária (COBAN et al., 2007; LIEHL et al., 2014; TAKEDA; AKIRA, 2005).

Interessantemente, também verificamos uma suprarregulação de genes de NLRP3 e Caspase-1, na placenta de camundongos infectadas. Consistentes com esses resultados, Ataíde et al., (2014), utilizando um modelo de infecção por *P. chabaudi* AS também evidenciaram o aumento da expressão de genes de componentes dos inflamassomas em esplenócitos de camundongos infectados, especialmente Caspase-1. Adicionalmente e semelhante ao evidenciado em trofoblastos estimulados com extrato de eritrócitos parasitados com *P. falciparum*, a infecção murina induziu um aumento da ativação da Caspase-1 no tecido placentário, reforçando a elevação local de IL-1 β em camundongos C57Bl/6 com malária placentária e os resultados obtidos em placentas de gestantes infectadas com *P. falciparum*.

Em complemento, mostramos que grávidas deficientes de MyD88, Caspase-1, ASC, NLRP3 e AIM2, mas não de NLRC4, infectadas com *P. berghei* NK65, não apresentaram aumento de IL-1 β na placenta nem houve substancial redução do peso do feto nem aumento das reabsorções, como observado em grávidas WT. Com isso, nossos resultados indicam um papel central da IL-1 β nos mecanismos que desencadeiam a restrição do crescimento fetal e abortos, na malária placentária.

Vale enfatizar que, similar à MyD88^{-/-}, o peso dos fetos e a taxa de reabsorções de grávidas deficientes de Casp1/11, da molécula adaptadora ASC, e do receptor AIM2 tiveram menos alterações negativas que as WT. Além disso, foi evidenciada uma contribuição do receptor NLRP3 nos impactos negativos da malária placentária, porém, de forma menos substancial que em outras moléculas.

Nesse modelo, as lesões placentárias estão associadas a um acúmulo de eritrócitos infectados com *P. berghei* NK65 no tecido placentário, mesmo que em baixa concentração. Periodicamente esses eritrócitos são lisados, liberando merozoítos livres e componentes do parasito, a exemplo de hemozoína complexada com DNA. Como mostramos anteriormente, DNA genômico de *P. berghei* NK65 e hemozoína são capazes de induzir a produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais,

por mecanismo dependente do inflamassoma. Esse efeito também já foi observado em outros estudos (DOSTERT et al., 2009; GRIFFITH et al., 2009; KALANTARI et al., 2014; SHIO et al., 2009). Sendo o DNA do parasita, um potente ativador do inflamassoma AIM2, mesmo em baixas concentrações (KALANTARI et al., 2014), é justificável sua contribuição para o processo inflamatório placentário e consequente complicações durante a gravidez.

Por outro lado, a resposta inflamatória mediada pelo NLRP3 depende de altas concentrações de hemozoína (GRIFFITH et al., 2009). Como em nosso modelo, há um baixo acúmulo de hemozoína na placenta de camundongos com malária placentária (*dados não mostrados*), é aceitável que esse inflamassoma tenha uma contribuição menos significativa que o AIM2. Apesar de contribuir para o baixo peso dos fetos, os dados sugerem que NLRP3 não está relacionado à ocorrência de reabsorções e abortos.

Contudo, o inflamassoma NLRP3 tem sido mostrado essencial para a ocorrência de outras complicações durante a gravidez, não associadas à malária. Em um modelo de falha gestacional induzida por *Listeria monocytogenes*, foi evidenciado que a baixa sobrevivência de embriões depende da ativação do inflamassoma NLRP3 por essa bactéria, mas não de AIM2 nem de NLRC4 (LI et al., 2016). Esses resultados foram acompanhados por aumento sistêmico de IL-1 β , que, por sua vez, induziu a produção de TNF- α , MCP-1, IL-6 e IL-8 por trofoblastos murinos. Em adição, a indução IL-1 β , via ativação do inflamassoma NLRP3 por cristais de ácido úrico tem sido associada à ocorrência de pré-eclampsia (MULLA et al., 2011). Interessantemente, cristais de ácido úrico também podem se acumular em eritrócitos parasitados com plasmódio e, ao serem liberados durante a lise da célula, podem induzir uma intensa resposta inflamatória (ORENGO et al., 2008, 2009), contribuindo para o processo inflamatório durante a infecção.

Por fim, mostramos que, ao contrário dos camundongos WT com malária placentária, grávidas deficientes IL1R não apresentam relevantes alterações fetais, associadas a uma manutenção da expressão normal de mRNA dos transportadores de aminoácidos SNAT1 e SNAT2 e do transportador de glicose GLUT1, sugerindo que a baixa expressão desses receptores em camundongos com malária placentária está relacionada a uma ação efetora da IL-1 sobre seu receptor. Estes resultados são coerentes com o mostrado na malária placentária humana.

Boeuf et al., (2013), demonstraram que a restrição do crescimento fetal de recém-nascidos de mulheres com malária placentária está associado a uma baixa expressão e à atividade funcional dos transportadores SNAT1 e SNAT2, por um mecanismo dependente de altas concentrações de IL-1 β . Logo, é razoável propor que seu receptor tenha uma função essencial nesse processo. Nossos resultados reforçam esses achados, apontando o eixo IL-1 como mecanismo chave para a baixa expressão desses transportadores de nutrientes e, conseqüentemente, o baixo peso dos fetos.

De modo análogo, a inibição farmacológica do receptor com seu antagonista endógeno (IL1Ra) recombinante (Anakinra) previne o quadro de malária placentária, indicando o bloqueio dessa via como uma potencial estratégia terapêutica em mulheres com malária placentária. Ressalta-se que essa droga, por si, não alterou o desenvolvimento normal do feto nem trouxe complicações para a mãe. Além disso, esse fármaco já é usado para o tratamento de outras doenças inflamatórias durante a gravidez, o que reforça seu potencial uso em complicações causadas pela infecção por *Plasmodium spp* em mulheres grávidas, de forma segura para a gestante e o feto (BERGER et al., 2009; CHANG et al., 2014)

Em suma, nosso estudo ilustra, de forma inédita, o papel chave do eixo IL-1 e do inflamassoma na patogênese da malária placentária, aportando novas perspectivas terapêuticas para essa complicação, visando a modulação desse complexo multiproteico, da via de sinalização da IL-1 β ou ambas, concomitantemente ao uso de drogas antimaláricas.

4.3.6 Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- ✓ A infecção de gestantes por *P. falciparum* induz o aumento das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 no sangue placentário, associado à presença de eritrócitos parasitados, depósito de hemozoína, aumento do infiltrado inflamatório e alterações na placenta;
- ✓ O extrato de *P. falciparum* estimula a ativação de Caspase-1 e produção de IL-1 β por trofoblastos humanos da linhagem BeWo;

- ✓ Eritrócitos infectados com *P. berghei* NK65 são capazes de aderir ao tecido placentário via ligação ao CSA;
- ✓ Eritrócitos infectados com *P. berghei* NK65 induzem a ativação de TLR2, TLR4 e TLR9, *in vitro*;
- ✓ A infecção de camundongos C57Bl/6 com *P. berghei* NK65 induz o desenvolvimento de malária placentária, com característica disfunção placentária e baixo desenvolvimento fetal;
- ✓ A expressão de mRNA dos transportadores de nutrientes SNAT1, SNAT2 e GLUT1 está reduzida na placenta de camundongos com malária placentária;
- ✓ A malária placentária em camundongos está associada a um aumento local e sistêmico de IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IFN- γ e IL-6;
- ✓ A infecção por *P. berghei* NK65 suprarregulação gênica de *TLR3*, *TLR4*, *TLR9*, *NLRP3* e *Caspase-1*;
- ✓ A Caspase-1 é ativada na placenta de camundongos grávidas em resposta à infecção por *P. berghei* NK65;
- ✓ O baixo desenvolvimento fetal na malária placentária é decorrente das vias de sinalização TLR4/MyD88, TLR9/MyD88, TLR4/TRIF, dos inflamassomas AIM2 (AIM2-ASC-Caspase-1) e NLRP3 (NLRP3-ASC-Caspase-1) e do receptor de IL-1 (IL1R);
- ✓ IL1R contribuiu para a baixa expressão dos transportadores de nutrientes SNAT1, SNAT2 e GLUT1 associada à malária placentária;
- ✓ As grávidas C57Bl/6 infectadas com *P. berghei* NK65 tratadas com antagonista do receptor de IL1R (IL1Ra) não desenvolvem malária placentária.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Em conjunto, este trabalho traz uma grande contribuição para a compreensão da patogênese da malária grave mostrando uma clara associação entre a ativação da via MyD88 e dos inflamassomas pelo plasmódio e a progressão da SDRA associada à malária e da malária placentária.

Na SDRA-AM, esse processo é mediado pela via MyD88 e pelo inflamassoma AIM2, porém por um mecanismo independente de IL1R. Por outro lado, a progressão da malária placentária mostrou está associada à ativação do TLR4 e do TLR9 e formação do inflamassoma AIM2 e, em menor grau, do inflamassoma NLRP3, com consequente liberação de IL-1 β que, ao agir em seu receptor, presumivelmente, induz uma baixa expressão de transportadores de aminoácidos e glicose, promovendo o baixo peso ao nascer dos fetos.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAMMS, V. M. Pattern recognition at the maternal-fetal interface. **Immunological Investigations**, v. 37, n. 5, p. 427–447, 2008.
- ABRAHAMMS, V. M. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 88, n. 2, p. 112–117, 2011.
- ABRAHAMMS, V. M.; MOR, G. Toll-like Receptors and their Role in the Trophoblast. **Placenta**, v. 26, n. 7, p. 540–547, 2005.
- AHMED, M. A.; COX-SINGH, J. Plasmodium knowlesi – an emerging pathogen. **ISBT Science Series**, v. 10, p. 134–140, 2015.
- AHMED, R. et al. Placental infections with histologically confirmed Plasmodium falciparum are associated with adverse birth outcomes in India: a cross-sectional study. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 232, 2014.
- AKIRA, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 3, p. 637–642, 2003.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, n. 6857, p. 732–738, 2001.
- ALLEN, I. C. et al. NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF- κ B signaling. **Immunity**, v. 36, n. 5, p. 742–754, 2012.
- ALVAREZ, J. R.; AL-KHAN, A.; APUZZIO, J. J. Malaria in pregnancy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 4, p. 229–236, 2005.
- ANDRADE, B. B. B. et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9, p. 13, 2010.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

ANDRADE, W. A. et al. Combined Action of Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors and TLR11/TLR12 Heterodimers Imparts Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 1, p. 42–53, 2013.

ANDREWS, K. T. et al. Inhibition of Chondroitin-4-Sulfate-Specific Adhesion of *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes by Sulfated Polysaccharides. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4288–4294, 2005.

ANSTEY, N. M. et al. Pulmonary Manifestations of Uncomplicated *Falciparum* and *Vivax* Malaria: Cough, Small Airways Obstruction, Impaired Gas Transfer, and Increased Pulmonary Phagocytic Activity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1326–1334, 2002.

ANSTEY, N. M. et al. Lung Injury in *Vivax* Malaria : Pathophysiological Evidence for Pulmonary Vascular Sequestration and Posttreatment Alveolar- Capillary Inflammation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 4, p. 589–596, 2007.

ARCE, R. M. et al. Increased TLR4 expression in murine placentas after oral infection with periodontal pathogens. **Placenta**, v. 30, n. 2, p. 156–162, 2009.

ARCE, R. M. et al. Toll-like receptor 4 mediates intrauterine growth restriction after systemic *Campylobacter rectus* infection in mice. **Molecular Oral Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 373–381, 2012.

AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunological Reviews**, v. 223, p. 20–38, 2008.

ARMAH, H. et al. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 1, p. 123–131, 2005.

ASHKAR, A. A.; ROSENTHAL, K. L. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. **Current Molecular Medicine**, v. 2, n. 6, p. 545–556, 2002.

ATAIDE, M. A et al. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003885, 2014.

ATAÍDE, R. et al. Malaria in Pregnancy Interacts with and Alters the Angiogenic

Profiles of the Placenta. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003824, 2015.

BAPTISTA, F. G. et al. Accumulation of Plasmodium berghei-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 4033–4039, 2010.

BARBOZA, R. et al. MyD88 Signaling Is Directly Involved in the Development of Murine Placental Malaria. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 830–838, 2014.

BARTHOLOMEU, D. C. et al. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 1333–1344, 2008.

BARTOLONI, A.; ZAMMARCHI, L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, 2012.

BASTOS, K. R. B. et al. Impaired macrophage responses may contribute to exacerbation of blood-stage Plasmodium chabaudi chabaudi malaria in interleukin-12-deficient mice. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 22, n. 12, p. 1191–1199, 2002.

BAUERNFEIND, F. et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 5, p. 765–783, 2011.

BECKER, I. et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 65–74, 2003.

BEESON, J. G.; DUFFY, P. E. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 297, p. 187–227, 2005.

BELCHER, J. D. et al. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2451–2459, 2000.

BELCHER, J. D. et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell

activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 3, p. 377–390, 2014.

BERGER, C. T. et al. A patient's wish: anakinra in pregnancy. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 11, p. 1794–1795, 2009.

BERNABEU, M. et al. Severe adult malaria is associated with specific PfEMP1 adhesion types and high parasite biomass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 23, p. e3270-3279, 2016.

BERNARD, G. R. et al. Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. **Journal of Critical Care**, v. 9, n. 1, p. 72–81, 1994.

BOEUF, P. et al. Plasmodium falciparum malaria elicits inflammatory responses that dysregulate placental amino acid transport. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003153, 2013.

BOYDEN, E. D.; DIETRICH, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 240–244, 2006.

BRABIN, B. J. et al. The sick placenta-the role of malaria. **Placenta**, v. 25, n. 5, p. 359–378, 2004.

BRASIL. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 112 p.

BRASIL. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 35 p.

BRAY, R. S.; GARNHAM, P. C. The life-cycle of primate malaria parasites. **British Medical Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 117–122, 1982.

BROZ, P. et al. Caspase-11 increases susceptibility to Salmonella infection in the absence of caspase-1. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 288–291, 2012.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407–420, 2016.

BULMER, J. N. et al. Placental malaria. I. Pathological classification. **Histopathology**, v. 22, n. 3, p. 211–218, 1993.

CAMPOS, M. A. S. et al. Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 416–423, 2001.

CASE, C. L. et al. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 5, p. 1851–1856, 2013.

CHANDRASIRI, U. P. et al. Insight into the pathogenesis of fetal growth restriction in placental malaria: Decreased placental glucose transporter isoform 1 expression. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 10, p. 1663–1667, 2014.

CHANG, Z. et al. Anakinra use during pregnancy in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS). **Arthritis & Rheumatology**, v. 66, n. 11, p. 3227–3232, 2014.

CHAVARRÍA-SMITH, J.; VANCE, R. E. The NLRP1 inflammasomes. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 22–34, 2015.

CHENE, A. et al. Placental Cytokine and Chemokine Profiles Reflect Pregnancy Outcomes in Women Exposed to *Plasmodium falciparum* Infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3783–3789, 2014.

CHOW, J. C. et al. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10689–10692, 1999.

CHUA, C. L. L. et al. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 26–34, 2013.

CIRELLI, K. M. et al. Inflammasome Sensor NLRP1 Controls Rat Macrophage Susceptibility to *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003927, 2014.

COBAN, C. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 1, p.

19–25, 2005.

COBAN, C. et al. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. **International Immunology**, v. 19, n. 1, p. 67–79, 2007.

COBAN, C. et al. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host & Microbe**, v. 7, n. 1, p. 50–61, 2010.

CONROY, A. et al. C5a Enhances Dysregulated Inflammatory and Angiogenic Responses to Malaria In Vitro: Potential Implications for Placental Malaria. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. e4953, 2009.

CONROY, A. L. et al. Complement activation and the resulting placental vascular insufficiency drives fetal growth restriction associated with placental malaria. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 2, p. 215–226, 2013.

COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 113–114, 2001.

CORBETT, C. E. et al. Cytoadherence in human *falciparum* malaria as a cause of respiratory distress. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 112–120, 1989.

COUPER, K. N. et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000744, 2010.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

COX, J.; SEMOFF, S.; HOMMEL, M. *Plasmodium chabaudi*: a rodent malaria model for in-vivo and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs. **Parasite Immunology**, v. 9, n. 5, p. 543–561, 1987.

CRAMER, J. P. et al. MyD88/IL-18-dependent pathways rather than TLRs control early parasitaemia in non-lethal *Plasmodium yoelii* infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12, p. 1259–1265, 2008.

DALLAL, M. M.; CHANG, S. W. Evans blue dye in the assessment of permeability-

surface area product in perfused rat lungs. **Journal of Applied Physiology.**, v. 77, n. 2, p. 1030–1035, 1994.

DANESHVAR, C. et al. Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 852–860, 2009.

DE OCA, M. M.; ENGWERDA, C.; HAQUE, A. Plasmodium berghei ANKA (PbA) infection of C57BL/6J mice: A model of severe malaria. **Methods in Molecular Biology**, v. 1031, p. 203–213, 2013.

DENES, A; LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? **Cell Death & Disease**, v. 3, p. e338, 2012.

DENG, Y. et al. Toll-Like Receptor 4 Mediates Acute Lung Injury Induced by High Mobility Group Box-1. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64375, 2013.

DEROOST, K. et al. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 48, n. 5, p. 589–600, 2013.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **Journal of Endotoxin Research**, v. 10, n. 4, p. 201–222, 2004.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–550, 2009.

DINARELLO, C. A. et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 289, 2013.

DOMBROWSKI, Y. et al. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. **Science translational medicine**, v. 3, n. 82, p. 82ra38, 2011.

DOSTERT, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 674–677, 2008.

DOSTERT, C. et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6510, 2009.

DOWLING, J. K.; MANSELL, A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 5, p. e85, 2016.

DOYLE, S. et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. **Immunity**, v. 17, n. 3, p. 251–263, 2002.

DUARTE, M. I. S. et al. Ultrastructure of the lung in falciparum malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 1, p. 31–35, 1985.

DUFFY, P. E. Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. **Parasitology**, v. 134, p. 1877–1881, 2007.

DURAI, P.; GOVINDARAJ, R. G.; CHOI, S. Structure and dynamic behavior of Toll-like receptor 2 subfamily triggered by malarial glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum. **FEBS Journal**, v. 280, n. 23, p. 6196–6212, 2013.

DUTRA, F. F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 39, p. e4110–4118, 2014.

DUTRA, F. F.; BOZZA, M. T. Heme on innate immunity and inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 27, n. 5, p. 115, 2014.

EGAN, T. J. Haemozoin formation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 2, p. 127–136, 2008.

EL-ASSAAD, F. et al. Cytoadherence of plasmodium berghei-infected red blood cells to murine brain and lung microvascular endothelial cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 11, p. 3984–3991, 2013.

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

ERLEBACHER, A. Immunology of the Maternal-Fetal Interface. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 387–411, 2013.

FAUSTIN, B. et al. Reconstituted NALP1 Inflammasome Reveals Two-Step Mechanism of Caspase-1 Activation. **Molecular Cell**, v. 25, n. 5, p. 713–724, 2007.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–676, 2003.

FETTELSCHOSS, A. et al. Inflammasome activation and IL-1 β target IL-1 α for secretion as opposed to surface expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 44, p. 18055–18060, 2011.

FIGUEIREDO, R. T. et al. Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20221–20229, 2007.

FINGER, J. N. et al. Autolytic proteolysis within the function to find domain (FIIND) is required for NLRP1 inflammasome activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 30, p. 25030–25037, 2012.

FONAGER, J. et al. Reduced CD36-dependent tissue sequestration of Plasmodium-infected erythrocytes is detrimental to malaria parasite growth in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 1, p. 93–107, 2012.

FRANCHI, L. et al. Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 11, p. 3030–3039, 2007.

FRANCIS, S. E.; SULLIVAN, D. J.; GOLDBERG, D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 97–123, 1997.

FRANKE-FAYARD, B. et al. Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11468–11473, 2005.

FRANKLIN, B. S. et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-induced enhancement of toll-like receptor expression and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5789–5794, 2009.

FRANKLIN, B. S. et al. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 9, p. 3689–3694, 2011.

FRANKOVÁ, D.; ZIDEK, Z. IFN-gamma-induced TNF-alpha is a prerequisite for in vitro production of nitric oxide generated in murine peritoneal macrophages by IFN-gamma. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 3, p. 838–843, 1998.

FREYRE, A. et al. Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 3, p. 154–160, 2006.

FRIED, M. et al. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 5, p. 2523–2530, 1998.

FRIED, M.; DUFFY, P. E. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. **Science**, v. 272, n. 5267, p. 1502–1504, 1996.

GALINSKI, M. R.; MEYER, E. V. S.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*. Modern Strategies to Study a Persistent Parasite's Life Cycle. **Advances in Parasitology**, v. 81, p. 1–26, 2013.

GASSE, P. et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 3786–3799, 2007.

GASSE, P. et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 179, n. 10, p. 903–913, 2009.

GAY, N. J.; GANGLOFF, M. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 141–165, 2007.

GAYLE, D. A et al. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 6, p. R1024–R1029, 2004.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744–757, 2014.

GEDDES, K.; MAGALHÃES, J. G.; GIRARDIN, S. E. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 6, p. 465–

479, 2009.

GIRIBALDI, G. et al. Involvement of inflammatory chemokines in survival of human monocytes fed with malarial pigment. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4912–4921, 2010.

GLAZIER, J. D. et al. Association between the Activity of the System A Amino Acid Transporter in the Microvillous Plasma Membrane of the Human Placenta and Severity of Fetal Compromise in Intrauterine Growth Restriction. **Pediatric Research**, v. 42, n. 4, p. 514–519, 1997.

GOMES, A. P. et al. Severe Plasmodium falciparum malaria. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358–369, 2011.

GONÇALVES, V. M. et al. NLRP3 Controls Trypanosoma cruzi Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2469, 2013.

GOUGH, N. R. Pyroptosis mediator identified. **Science Signaling**, v. 8, n. 401, p. ec319, 2015.

GOULOPOULOU, S. et al. Toll-like receptor 9 activation: a novel mechanism linking placenta-derived mitochondrial DNA and vascular dysfunction in pre-eclampsia. **Clinical Science**, v. 123, n. 123, p. 429–435, 2012.

GOWDA, N. M.; WU, X.; GOWDA, D. C. TLR9 and MyD88 Are Crucial for the Development of Protective Immunity to Malaria. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 10, p. 5073–5085, 2012.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, p. 1–32, 2016.

GRIFFITH, J. W. et al. Toll-like receptor modulation of murine cerebral malaria is dependent on the genetic background of the host. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 10, p. 1553–1564, 2007.

GRIFFITH, J. W. et al. Pure Hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 8, p. 5208–5220, 2009.

GROSS, O. et al. Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 388–400, 2012.

GUILLOTT, L. et al. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: Evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 2712–2718, 2004.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 297–316, 2011.

HAGAR, J. A et al. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1250–1253, 2013.

HALDAR, K. et al. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annual Review of Pathology**, v. 2, p. 217–249, 2007.

HALLE, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 857–865, 2008.

HAMANN, L. et al. The toll-like receptor 1 variant S248N influences placental malaria. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 785–789, 2010.

HAMELMANN, E. et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, p. 766–75, 1997.

HARDER, J. et al. Activation of the Nlrp3 Inflammasome by Streptococcus pyogenes Requires Streptolysin O and NF- κ B Activation but Proceeds Independently of TLR Signaling and P2X7 Receptor. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5823–5829, 2009.

HASLER, T. et al. An improved microassay for Plasmodium falciparum cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 3, p. 332–347, 1993.

HAWKINS, P. N. et al. Spectrum of Clinical Features in Muckle-Wells Syndrome and

Response to Anakinra. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 2, p. 607–612, 2004.

HE, W. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Nature Publishing Group**, v. 25, n. 12, p. 1285–1298, 2015.

HEIL, F. et al. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1526–1529, 2003.

HIRSCH, E.; WANG, H. The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: Insights from the murine model. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 12, n. 3, p. 145–155, 2005.

HOFFMAN, H. M. et al. Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. **The Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1779–1785, 2004.

HONORATI, M. C.; CATTINI, L.; FACCHINI, A. IL-17, IL-1 β and TNF- α stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 12, n. 9, p. 683–691, 2004.

HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 847–856, 2008.

HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514–518, 2009.

HUANG, B. W.; PEARMAN, E.; KIM, C. C. Mouse Models of Uncomplicated and Fatal Malaria. **Bio-protocol**, v. 5, n. 13, p. 1–14, 2015.

HULDEN, L.; HULDEN, L. Activation of the hypnozoite: a part of Plasmodium vivax life cycle and survival. **Malaria Journal**, v. 10, p. 90, 2011.

HVIID, L. et al. Of mice and women: rodent models of placental malaria. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 8, p. 412–419, 2010.

ILIEVSKI, V.; LU, S.-J.; HIRSCH, E. Activation of toll-like receptors 2 or 3 and preterm delivery in the mouse. **Reproductive Sciences**, v. 14, n. 4, p. 315–320, 2007.

IMAI, Y. et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. **Cell**, v. 133, n. 2, p. 235–249, 2008.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394–397, 1997.

JANSE, C. J. et al. High efficiency transfection of Plasmodium berghei facilitates novel selection procedures. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 60–70, 2006.

JANSE, C. J.; VAN VIANEN, P. H. Flow Cytometry in Malaria Detection. **Methods in Cell Biology**, v. 42, p. 295–318, 1994.

JANSSON, T. et al. Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction. **Placenta**, v. 23, n. 5, p. 392–399, 2002.

JERU, I. et al. Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1614–1619, 2008.

JIN, C.; FLAVELL, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 5, p. 628–631, 2010.

JONES, H. D. et al. The NLRP3 Inflammasome Is Required for the Development of Hypoxemia in LPS/Mechanical Ventilation Acute Lung Injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 50, n. 2, p. 270–280, 2014.

JONES, H. N.; CROMBLEHOLME, T.; HABLI, M. Adenoviral-Mediated Placental Gene Transfer of IGF-1 Corrects Placental Insufficiency via Enhanced Placental Glucose Transport Mechanisms. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e74632, 2013.

JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 573–587, 2015.

JUNG, Y. D. et al. Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1 beta in human vascular smooth muscle cells via the P38 mitogen-activated protein

kinase pathway. **Angiogenesis**, v. 4, n. 2, p. 155–162, 2001.

KAHLENBERG, J. M.; DUBYAK, G. R. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 286, n. 5, p. C1100-1108, 2004.

KALANTARI, P. et al. Dual Engagement of the NLRP3 and AIM2 Inflammasomes by Plasmodium-Derived Hemozoin and DNA during Malaria. **Cell Reports**, v. 6, n. 1, p. 196–210, 2014.

KANNEGANTI, T.-D. et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 433–443, 2007.

KAVATHAS, P. B. et al. Nod1, but not the ASC inflammasome, contributes to induction of IL-1 β secretion in human trophoblasts after sensing of Chlamydia trachomatis. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 2, p. 235–243, 2013.

KAWASAKI, M. et al. Protection from Lethal Apoptosis in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice by a Caspase Inhibitor. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 2, p. 597–603, 2000.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117–121, 2011.

KAYAGAKI, N. et al. Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1246–1249, 2013.

KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666–671, 2015.

KELLER, M. et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell**, v. 132, n. 5, p. 818–831, 2008.

KHARE, S. et al. Inflammasomes and their activation. **Critical Reviews in Immunology**, v. 30, n. 5, p. 463–487, 2010.

KIRKLAND, T. N. et al. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 33, p. 24818–24823, 1993.

KOBLANSKY, A. A. et al. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 119–130, 2013.

KOCH, O. et al. IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 11, p. 1684–1687, 2002.

KORDES, M.; MATUSCHEWSKI, K.; HAFALLA, J. C. R. Caspase-1 activation of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 is dispensable for induction of experimental cerebral malaria. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3633–3641, 2011.

KORTMANN, J.; BRUBAKER, S. W.; MONACK, D. M. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 3, p. 815–819, 2015.

KOVAROVA, M. et al. NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 2006–2016, 2012.

KRAEMER, S. M.; SMITH, J. D. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 374–380, 2006.

KRISHNEGOWDA, G. et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: Cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8606–8616, 2005.

KUSINSKI, L. C. et al. eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 303, p. R86–R93, 2012.

LAGE, S. L. et al. Emerging Concepts about NAIP/NLRC4 Inflammasomes. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 309, 2014.

LAGE, S. L.; AMARANTE-MENDES, G. P.; BORTOLUCI, K. R. Evaluation of pyroptosis in macrophages using cytosolic delivery of purified flagellin. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 110–116, 2013.

LAGER, S.; POWELL, T. L. Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. **Journal of Pregnancy**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Review Immunology**, v. 13, n. 6, p. 397–411, 2013.

LAU, Y.-L. et al. Acute respiratory distress syndrome and acute renal failure from *Plasmodium ovale* infection with fatal outcome. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 389, 2013.

LAVSTSEN, T. et al. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. E1791–E1800, 2012.

LEORATTI, F. M. S. et al. Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 5, p. 772–780, 2008.

LI, L.; KANG, J.; LEI, W. Role of Toll-like receptor 4 in inflammation-induced preterm delivery. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 267–272, 2010.

LI, W. et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to *Listeria monocytogenes*-induced animal pregnancy failure. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 36, 2016.

LIEHL, P. et al. Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. **Nature medicine**, v. 20, n. 1, p. 47–53, 2014.

LIGHTFIELD, K. L. et al. Differential Requirements for NAIP5 in Activation of the NLRC4 Inflammasome. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 4, p. 1606–1614, 2011.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, 2013.

LIN, Y. et al. The Lipopolysaccharide-activated Toll-like Receptor (TLR)-4 Induces Synthesis of the Closely Related Receptor TLR-2 in Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p. 24255–24263, 2000.

LIN, Y. et al. Prevention of CpG-Induced Pregnancy Disruption by Adoptive Transfer

of In Vitro-Induced Regulatory T Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94702, 2014.

LOMAR, A. V et al. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 425–430, 2005.

LOMASK, M. Further exploration of the Penh parameter. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, p. 13–20, 2006.

LOPERA-MESA, T. M. et al. Plasma Uric Acid Levels Correlate with Inflammation and Disease Severity in Malian Children with Plasmodium falciparum Malaria. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e46424, 2012.

LOVELL, D. J.; BOWYER, S. L.; SOLINGER, A. M. Interleukin-1 blockade by anakinra improves clinical symptoms in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 4, p. 1283–1286, 2005.

LOZANO, F. et al. P. falciparum and P. malariae malaria complicated by pulmonary edema with disseminated intravascular coagulation. **La Presse Médicale**, v. 12, n. 47, p. 3004–3005, 1983.

LUCCHI, N. W. et al. Natural hemozoin stimulates syncytiotrophoblast to secrete chemokines and recruit peripheral blood mononuclear cells. **Placenta**, v. 32, n. 8, p. 579–585, 2011.

LUCCHI, N. W. et al. Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56677, 2013.

LUCCHI, N. W.; PETERSON, D. S.; MOORE, J. M. Immunologic activation of human syncytiotrophoblast by Plasmodium falciparum. **Malaria Journal**, v. 7, p. 42, 2008.

MAN, S. M.; KARKI, R.; KANNEGANTI, T. D. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 2, p. 269–280, 2016.

MARIATHASAN, S. et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 213–218, 2004.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228–232, 2006.

MARINHO, C. R. F. et al. Recrudescence of *Plasmodium berghei* from pregnant mice displays enhanced binding to the placenta and induces protection in multigravida. **PloS One**, v. 4, n. 5, p. e5630, 2009.

MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237–241, 2006.

MARTINON, F. et al. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 29, n. 3, p. 213–229, 2007.

MARZI, M. et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 106, n. 1, p. 127–133, 1996.

MATTHAY, M. A; ZEMANS, R. L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Diseases**, v. 6, p. 147–163, 2011.

MEDANA, I. M.; HUNT, N. H.; CHAUDHRI, G. Tumor necrosis factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. **The American Journal of Pathology**, v. 150, n. 4, p. 1473–1486, 1997.

MEDFORD, A. R. L. et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism and acute respiratory distress syndrome. **Thorax**, v. 60, n. 3, p. 244–248, 2005.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature reviews Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2001.

MÉNARD, R. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 701–712, 2013.

MENENDEZ, C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. **Parasitology Today**, v. 11, n. 5, p. 178–183, 1995.

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 2002.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–67, 2013.

MOCKENHAUPT, F. P. et al. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 1, p. 177–182, 2006.

MOORMANN, A M. et al. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 1987–1993, 1999.

MOTA, M. M. et al. Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141–144, 2001.

MUEHLENBACHS, A. et al. Hypertension and maternal-fetal conflict during placental malaria. **PLoS medicine**, v. 3, n. 11, p. e446, 2006.

MULLA, M. J. et al. Uric acid induces trophoblast IL-1 β production via the inflammasome: implications for the pathogenesis of preeclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 6, p. 542–548, 2011.

MUTHUSAMY, A. et al. Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes Adhere Both in the Intervillous Space and on the Villous Surface of Human Placenta by Binding to the Low-Sulfated Chondroitin Sulfate Proteoglycan Receptor. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 6, p. 2013–2025, 2004.

NAIK, R. S.; DAVIDSON, E. A.; CHANNE GOWDA, D. Developmental stage-specific biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in intraerythrocytic Plasmodium falciparum and its inhibition in a novel manner by mannosamine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p. 24506–24511, 2000.

NAING, C. et al. Is Plasmodium vivax Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3071, 2014.

NASR, A. et al. IFN-gamma and TNF associated with severe falciparum malaria infection in Saudi pregnant women. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 314, 2014.

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**, v. 3, n. 2, p. e1608, 2008.

NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. Circulating cytokines as mediators of fever. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31 Suppl 5, p. S178–S184, 2000.

NEWTON, C. R. J. C.; HIEN, T. T.; WHITE, N. Cerebral malaria. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 48, n. 10, p. 1004–1013, 2000.

NMORSI, O. et al. Pro-inflammatory cytokines profiles in Nigerian pregnant women infected with Plasmodium falciparum malaria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 9, p. 731–733, 2010.

NORMAN, J. E. et al. Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 7, n. 1, p. S1–S7, 2007.

NOSTEN, F. et al. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 9, p. 425–432, 2004.

O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453–460, 2013.

ODUOLA, A. M. J. et al. Plasmodium berghei: Histology, immunocytochemistry, and ultrastructure of the placenta in rodent malaria. **Experimental Parasitology**, v. 62, n. 2, p. 181–193, 1986.

OHASHI, J. et al. A functional polymorphism in the IL1B gene promoter, IL1B -31C>T, is not associated with cerebral malaria in Thailand. **Malaria Journal**, v. 4, n. 1, p. 38, 2005.

OLDENBURG, M. et al. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1111–1115, 2012.

OLIVEIRA, A. C. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi. **The Journal of Immunology**, v. 1735688, n. 9, p. 5688–5696, 2004.

ORENGO, J. M. et al. Plasmodium-induced inflammation by uric acid. **PLoS**

Pathogens, v. 4, n. 3, p. e1000013, 2008.

ORENGO, J. M. et al. Uric acid is a mediator of the *Plasmodium falciparum*-induced inflammatory response. **PloS One**, v. 4, n. 4, p. e5194, 2009.

ORTOLAN, L. et al. Predictive Criteria To Study the Pathogenesis of Malaria-1 Associated Ali/Ards in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–30, 2014.

PANDEY, S.; AGRAWAL, D. K. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 84, n. 4, p. 333–341, 2006.

PARDI, G.; MARCONI, A. M.; CETIN, I. Placental-fetal Interrelationship in IUGR Fetuses—A Review. **Placenta**, v. 23, n. A, p. S136–S141, 2002.

PARROCHE, P. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 6, p. 1919–1924, 2007.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 560, p. 11–18, 2005.

PASTERNAK, N. D.; DZIKOWSKI, R. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 7, p. 1463–1466, 2009.

PATTILLO, R. A. et al. Human hormone production in vitro. **Science**, v. 159, n. 3822, p. 1467–1469, 1968.

PAVIA, C. S.; NIEDERBUHL, C. J. Immunization and protection against malaria during murine pregnancy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 2, p. 176–182, 1991.

PEETERS, P. M. et al. Immune Homeostasis in Epithelial Cells: Evidence and Role of Inflammasome Signaling Reviewed. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

PEREIRA, K. R. B. **Estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na**

rescrudescência de malária experimental durante a gravidez. 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PEREIRA, M. S. F. et al. Activation of NLRC4 by Flagellated Bacteria Triggers Caspase-1-Dependent and -Independent Responses To Restrict *Legionella pneumophila* Replication in Macrophages and In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 12, p. 6447–6455, 2011.

PERKINS, D. J. et al. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1427–1442, 2011.

PETTERSSON, F. et al. Whole-body imaging of sequestration of *Plasmodium falciparum* in the rat. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7736–7746, 2005.

PICHYANGKUL, S. et al. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. **Journal of immunology**, v. 172, n. 8, p. 4926–4933, 2004.

PIGUET, P. F. et al. Role of CD40-CD40L in mouse severe malaria. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 2, p. 733–742, 2001.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998.

PONGPONRATN, E. et al. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human *falciparum* malaria: A pathological study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 2, p. 168–175, 1991.

POOVASSERY, J.; MOORE, J. M. Murine malaria infection induces fetal loss associated with accumulation of *Plasmodium chabaudi* AS-infected erythrocytes in the placenta. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2839–48, 2006.

POOVASSERY, J.; MOORE, J. M. Association of malaria-induced murine pregnancy failure with robust peripheral and placental cytokine responses. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 11, p. 4998–5006, 2009.

PRATO, M. et al. Phagocytosis of haemozoin (malarial pigment) enhances metalloproteinase-9 activity in human adherent monocytes: role of IL-1 β and 15-

HETE. **Malaria Journal**, v. 7, p. 157, 2008.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUES, C. D.; MOTA, M. M. The Relevance of Host Genes in Malaria. **Society for Experimental Biology**, v. 58, p. 47–91, 2007.

PUNYAGUPTA, S. et al. Acute pulmonary insufficiency in falciparum malaria: summary of 12 cases with evidence of disseminated intravascular coagulation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, n. 4, p. 551–559, 1974.

RANIERI, V. et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA – The Latest Medical Research, Reviews, and Guidelines**, v. 6736, n. 16, p. 15–23, 2010.

RAYAMAJHI, M. et al. Cutting Edge: Mouse NAIP1 Detects the Type III Secretion System Needle Protein. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 8, p. 3986–3989, 2013.

REIMER, T. et al. Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 3, p. 764–769, 2010.

RODRIGUES-DUARTE, L. et al. Distinct placental malaria pathology caused by different Plasmodium berghei lines that fail to induce cerebral malaria in the C57Bl/6 mouse. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 231, 2012.

ROGERSON, S. J. et al. Placental monocyte infiltrates in response to Plasmodium falciparum malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 1, p. 115–119, 2003a.

ROGERSON, S. J. et al. Placental Tumor Necrosis Factor Alpha but Not Gamma Interferon Is Associated with Placental Malaria and Low Birth Weight in Malawian Women. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 267–270, 2003b.

ROGERSON, S. J. et al. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 105–117, 2007.

ROGERSON, S. J.; MWAPASA, V.; MESHNICK, S. R. Malaria in Pregnancy: Linking

Immunity and Pathogenesis to Prevention. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6, p. 14–22, 2007.

ROUNIOJA, S. et al. Mechanism of acute fetal cardiovascular depression after maternal inflammatory challenge in mouse. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 6, p. 1585–1592, 2005.

ROWE, J. A; KYES, S. A. The role of Plasmodium falciparum var genes in malaria in pregnancy. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1011–1019, 2004.

ROWE, S. J. et al. Caspase-1-Deficient Mice Have Delayed Neutrophil Apoptosis and a Prolonged Inflammatory Response to Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6401–6407, 2002.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1685–1693, 2005.

RÜHL, S.; BROZ, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. **European journal of immunology**, v. 45, n. 10, p. 2927–2936, 2015.

SALIH, M. M. et al. Monocytes and macrophages and placental malaria infections in an area of unstable malaria transmission in eastern Sudan. **Diagnostic Pathology**, v. 6, n. 1, p. 83, 2011.

SAM-AGUDU, N. A. et al. TLR9 polymorphisms are associated with altered IFN-gamma levels in children with cerebral malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 548–555, 2010.

SCHATTGEN, S. A.; FITZGERALD, K. A. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 109–118, 2011.

SCHOFIELD, L. et al. Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of Plasmodium falciparum: prospects for the immunotherapy of severe malaria. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 617–626, 1993.

SCHOFIELD, L. et al. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin

expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kin. **Journal of Immunology**, v. 3, n. 156, p. 1886–1896, 1996.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 9, p. 722–735, 2005.

SCHOFIELD, L.; HACKETT, F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 1, p. 145–153, 1993.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.

SCHWANDNER, R. et al. Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17406–17409, 1999.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 660–665, 2015.

SHI, Y.; MUCSI, A. D.; NG, G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. **Immunological Reviews**, v. 233, n. 1, p. 203–217, 2010.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 11, p. 1777–1782, 1999.

SHIO, M. T. et al. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, p. e1000559, 2009.

SHIO, M. T. et al. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 12–13, p. 889–899, 2010.

SILVA, G. K. et al. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1 Response and Host Resistance to Trypanosoma cruzi Infection. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 6, p. 3373–3383, 2013.

SILVER, K. L. et al. Dysregulation of angiopoietins is associated with placental

malaria and low birth weight. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9481, 2010.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89–102, 2010.

SMITH, P. J. et al. A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 229, n. 1, p. 131–139, 1999.

SMOLEWSKI, P. et al. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. **Cytometry**, v. 44, n. 1, p. 73–82, 2001.

SOBOTA, R. S. et al. Expression of complement and toll-like receptor pathway genes is associated with malaria severity in Mali: a pilot case control study. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 150, 2016.

SOUZA, M. C. et al. Early and late acute lung injury and their association with distal organ damage in murine malaria. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 186, n. 1, p. 65–72, 2013a.

SOUZA, R. M. et al. Placental Histopathological Changes Associated with Plasmodium vivax Infection during Pregnancy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. e2071, 2013b.

SOUZA, R. M. **Alterações histopatológicas placentárias associadas à infecção por Plasmodium vivax em gestantes do Vale do Alto Juruá**. 2016. 219 f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

STEKETEE, R. et al. The burden of malaria in pregnancy in malaia endemic areas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 28–35, 2001.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 169–180, 2004.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.

SUGUITAN-JUNIOR, A. L. et al. Changes in the levels of chemokines and cytokines

in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 7, p. 1074–1082, 2003.

SULTAN, A. A. et al. Green fluorescent protein as a marker in *Plasmodium berghei* transformation. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2602–2606, 1999.

SUN, Y. et al. Differential effects of the CpG-toll-like receptor 9 axis on pregnancy outcome in nonobese diabetic mice and wild-type controls. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1759–1767, 2013.

SUZUKI, T. et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 8, p. e111, 2007.

TA, T. H. et al. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 68, 2014.

TACHADO, S. D. et al. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: Activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. **Medical Sciences**, v. 94, p. 4022–4027, 1997.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005.

TANAKA, T. et al. Induction of VEGF gene transcription by IL-1 beta is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 sites in cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32, n. 11, p. 1955–1967, 2000.

TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 158–175, 2012.

TAYLOR, W. R. J. et al. Respiratory manifestations of malaria. **Chest**, v. 142, n. 2, p. 492–505, 2012.

THAWANI, N. et al. *Plasmodium* Products Contribute to Severe Malarial Anemia by Inhibiting Erythropoietin-Induced Proliferation of Erythroid Precursors. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 1, p. 140–149, 2014.

THICKETT, D. R. et al. Vascular Endothelial Growth Factor May Contribute to

Increased Vascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, p. 1601–1605, 2001.

THONGSONG, B. et al. Inhibition of amino acid transport system a by interleukin-1beta in trophoblasts. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 12, n. 7, p. 495–503, 2005.

TOGBE, D. et al. Murine Cerebral Malaria Development Is Independent of Toll-Like Receptor Signaling. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1640–1648, 2007.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673–675, 1976.

TRAMPUZ, A. et al. Clinical review: Severe malaria. **Critical Care**, v. 7, n. 4, p. 315–323, 2003.

TUIKUE NDAM, N. G. et al. High level of var2csa transcription by Plasmodium falciparum isolated from the placenta. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 2, p. 331–335, 2005.

TURNER, G. D. 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. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 5, p. 1057–1069, 1994.

UBALEE, R. et al. Strong association of a tumor necrosis factor-alpha promoter allele with cerebral malaria in Myanmar. **Tissue Antigens**, v. 58, n. 6, p. 407–410, 2001.

UMBERS, A. J. et al. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 168–175, 2011a.

UMBERS, A. J. et al. Placental malaria-associated inflammation disturbs the insulin-like growth factor axis of fetal growth regulation. **The Journal of Infectious**

Diseases, v. 203, n. 4, p. 561–569, 2011b.

VALECHA, N. et al. Histopathology of Fatal Respiratory Distress Caused by Plasmodium vivax Malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 758–762, 2009.

VAN DEN STEEN, P. E. et al. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 9, p. 957–968, 2010.

VAN DEN STEEN, P. E. et al. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 346–358, 2013.

VAURE, C.; LIU, Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 316, 2014.

VLADIMER, G. I. et al. The NLRP12 Inflammasome Recognizes Yersinia pestis. **Immunity**, v. 37, p. 96–107, 2012.

WANG, L. et al. PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29874–29880, 2002.

WARNER, N.; NUNEZ, G. MyD88: A Critical Adaptor Protein in Innate Immunity Signal Transduction. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 3–4, 2013.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. **Science Signaling**, v. 3, n. 105, p. cm1, 2010.

WHITAKER, S. M. et al. Leishmania pifanoi Proteoglycolipid Complex P8 Induces Macrophage Cytokine Production through Toll-Like Receptor 4. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 2149–2156, 2008.

WHO. Severe and complicated malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84 Suppl 2, p. 1–65, 1990.

WHO. Severe falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94 Suppl 1, p. S1-90, 2000.

WHO. **World Malaria Report: 2014**. Geneva: WHO Press, 2014. 227 p.

WHO. **World Malaria Report: 2015**. Geneva: WHO Press, 2015a. 243 p

WHO. **Achieving the malaria MDG target: reversing the incidence of malaria 2000-2015**. Geneva: WHO Press, 2015b. 32 p.

WILLIAM, T. et al. Severe Plasmodium knowlesi malaria in a tertiary care hospital, Sabah, Malaysia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1248–1255, 2011.

WU, J. et al. Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3590–3599, 2013.

WU, W. et al. Immunomodulatory effects associated with a live vaccine against Leishmania major containing CpG oligodeoxynucleotides. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3238–32347, 2006.

WU, X. et al. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. **Journal of immunology**, v. 184, n. 8, p. 4338–48, 2010.

YANG, J. et al. Human NAIP and mouse NAIP1 recognize bacterial type III secretion needle protein for inflammasome activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 35, p. 14408–14413, 2013.

YAP, G. S.; STEVENSON, M. M. Blood transfusion alters the course and outcome of Plasmodium chabaudi AS infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 9, p. 3761–3765, 1994.

YAZDI, A. S.; DREXLER, S. K. Regulation of interleukin 1 α secretion by inflammasomes. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72 Suppl 2, p. ii96-ii99, 2013.

YOSHIMURA, A. et al. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 1, p. 1–5, 1999.

YUI, J. et al. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. **Placenta**, v. 15, n. 8, p. 819–835,

1994.

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 156–171, 2015.

ZANONI, I. et al. An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. **Science**, v. 3036, p. 1–9, 2016.

ZHANG, D. et al. A Toll-like Receptor That Prevents Infection by Uropathogenic Bacteria. **Science**, v. 303, p. 1522–1527, 2004.

ZHANG, Y. et al. TLR4 and TLR9 signals stimulate protective immunity against blood-stage Plasmodium yoelii infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 170, n. 92, p. 73–81, 2016.

ZHAO, Y. et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 596–600, 2011.

ZHU, J. et al. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of Plasmodium falciparum are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 205–211, 2011.