Leandro Gustavo da Silva

**Papel dos Receptores do Tipo Toll (TLRs) na
Imunopatogênese da Malária Associada à Gravidez**

**Dissertação 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 Mestre em
Ciências**

SÃO PAULO

2011

Leandro Gustavo da Silva

**Papel dos Receptores do Tipo Toll (TLRs) na
Imunopatogênese da Malária Associada à Gravidez**

**Dissertação 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
Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno Hospedeiro**

**Orientador: Dr. Claudio Romero Farias
Marinho**

Versão original

SÃO PAULO

2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Leandro Gustavo da.

Papel dos receptores do Tipo Toll (TLRs) na imunopatogênese da malária associada à gravidez / Leandro Gustavo da Silva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Claudio Romero Farias Marinho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Malária placentária.

Versão do título para o inglês: The role of Toll Like Receptors (TLRs) in the immunopathogenesis of pregnancy associated malaria

Descritores: 1. Malária 2. Gravidez 3. Receptores do tipo Toll 4. MyD88 5. *Plasmodium* 6. Malária placentária I. Marinho, Claudio Romero Farias II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0186/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leandro Gustavo da Silva.

Título da Dissertação: Papel dos receptores do Tipo Toll (TLRs) na
imunopatogênese da malária associada à gravidez.

Orientador(a): Claudio Romero Farias Marinho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:

**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 **002** nas fls. **82** 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 de receptores do tipo Toll (TLRs) na imunopatogênese da malária associada à gravidez** do qual participou(aram) o(s) alunos **Leandro Gustavo da Silva e os pesquisadores José Maria Alvarez Mosig, Sabrina Epiphanyo**, 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 **02.03.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 02 de março de 2010.

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

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais e à minha tia madrinha

A todos os camundongos utilizados

Agradecimentos

Aos meus familiares (Maria Dalva de Barros Silva (Mãe), Rubens da Silva (Pai), Ricardo Augusto da Silva (irmão) e Maria Pascoalina (Madrinha) por todo o apoio e sacrifício em meu favor.

Ao Professor Claudio Romero Farias Marinho por todos os ensinamentos e pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À Professora Sabrina Epiphany por toda ajuda e ensinamentos.

Aos professores José Maria Alvarez Mosig e Maria Regina D'Império Lima e a todos dos seus laboratórios pelo acolhimento e ajuda na minha chegada. Em especial ao Rogério Silva e a Meire.

À Keitty Raquel Benevides Pereira e Rodrigo Medeiros de Souza por toda a ajuda na preparação e análise dos experimentos, na coleta de esfregaços nos fim de semana, na formatação, na escrita e por dispensar sábados de folga para me ajudar, devo muito a vocês.

Ao Renato Barboza pela grande ajuda nas revisões, sugestões e experimentos para a composição deste trabalho.

Aos amigos do biotério Sandra Alexandre, Daniela, Juliana e Luís pela amizade, pelo fornecimento de animais e pela ajuda e compreensão na realização de experimentos.

Ao Marcio Yamamoto pelas dicas e ajuda na realização dos PCRs.

A todos os participantes do XV Seminário Laveran & Deane sobre malária pelas dicas e sugestões para o projeto em especial aos meus tutores (Marcel Hommel e Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda), por todas as amizades os bons momentos vividos.

A professora Silvia Maria Di Santi pela belíssima e emocionante declaração sobre ciência que tanto me motivou.

A Michele Klein Sercundes e Luana Ortolan pela ajuda com qRT-PCR coleta de esfregaços nos fins de semana, pela sua amizade.

A todos os amigos que fiz durante esse período, pelos bons momentos que passamos juntos e por toda a ajuda de forma direta ou indireta que me proporcionaram.

É preciso aprender a ser coerente.
De nada adianta o discurso competente
se a ação pedagógica é impermeável à mudanças.
(P. Freire)

O espelho reflete certo; não erra porque não pensa.
Pensar é essencialmente errar.
(F. Pessoa)

DA SILVA, L. G. **Papel dos receptores do tipo Toll (TLRs) na imunopatogênese da malária associada à gravidez.** 2011. 93 f., [Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A malária associada à gravidez é caracterizada por uma série de complicações tanto para a mãe quanto para o feto, tais como anemia, retardo do crescimento intra-uterino, aumento de abortos e baixo peso dos recém-nascidos ao nascer. Foi recentemente descrito que membros da família dos Toll Like Receptors (TLR), como TLR2, TLR4 e TLR9, podem reconhecer componentes presentes no *Plasmodium sp.* Em comum estes receptores sinalizam via molécula adaptadora MyD88. Entretanto existem poucos dados a respeito do papel dos TLR na malária placentária. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o papel dos receptores do tipo TLR- 2, 4, 9 e da molécula adaptadora MyD88 na malária placentária. Inicialmente nos demonstramos que a associação de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP} reproduz algumas alterações patológicas da malária placentária humana mostrando-se adequada para este estudo. Na infecção de fêmeas C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} grávidas e não grávidas, a linhagem MyD88^{-/-} foi a que apresentou os maiores níveis de parasitemia. Surpreendentemente, fêmeas MyD88^{-/-} apresentaram níveis de sobrevivência maiores que o controle. Em placentas provenientes de fêmeas MyD88^{-/-} infectadas não foram observadas diminuição do espaço vascular quando comparadas com fêmeas C57BL/6 e MyD88^{-/-} não infectadas. O mesmo não foi observado nos animais TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-}. Além disso, as fêmeas MyD88^{-/-} apresentaram maior índice de cuidado parental em relação as outras linhagens. Com relação a expressão dos genes pró inflamatórios, enquanto que animais C57BL/6 infectados apresentaram um aumento do mRNA de IL1- β e IL-6 na placenta, os MyD88^{-/-} apresentaram valores similares aos controles. Em conjunto, estes resultados sugerem que a sinalização via MyD88 é importante para o desenvolvimento da malária placentaria e esta pode estar relacionada com a resposta inflamatória exacerbada induzida pelo parasita.

Palavras chave: Malária. Gravidez. Receptores do tipo Toll (TLR). Placenta. *P. berghei*.

DA SILVA, L. G. **The role of Toll like receptors (TLRs) in the immunopathogenesis of pregnancy associated malaria.** 2011. 93 f., [Master Thesis (Biology of Host-Pathogen Relationship)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Pregnancy associated malaria is characterized by a series of complications for both mother and the fetus, such as anemia, intrauterine growth retardation, increased miscarriages and low birth weight of newborns. It was recently reported that members of the family of Toll Like Receptors (TLR) such as TLR2, TLR4 and TLR9 may recognize components present in *Plasmodium sp.* In common these receptors signal through the adapter molecule MyD88. However there are few data about the role of TLR in placental malaria. The objective of this work was to study the role of receptors for TLR-2, 4, 9 and MyD88 adapter molecule in placental malaria. Initially, we demonstrated that the association of mice of C57BL/6 infected with *P. berghei* NK65^{GFP} 10⁵ PE reproduces certain pathological changes of human placental malaria showed to be adequate for this study. In the infection of female C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} and MyD88^{-/-} pregnant and not pregnant, the lineage MyD88^{-/-} showed the highest levels of parasitemia. Surprisingly, female MyD88^{-/-} had higher survival rates than control though. In placentas from MyD88^{-/-} infected females were not observed decrease in the vascular space when compared with C57BL/6 and MyD88^{-/-} uninfected female. The same was not observed in animals TLR2^{-/-} and TLR9^{-/-}. In addition, females MyD88^{-/-} had higher rates of parental care in relation to other strains. Regarding the expression of pro-inflammatory genes, whereas animals C57BL/6 infected showed an increase in mRNA for IL1- β and IL-6 in the placenta, the MyD88^{-/-} showed similar values to controls. Together, these results suggest that signaling through MyD88 is important for the development of placental malaria and this may be related to the exacerbated inflammatory response induced by the parasite.

Keywords: Malaria. Pregnancy. Toll like receptors (TLR). Placenta. *P. berghei*.

Figura 1- Áreas sob risco de transmissão por malária	24
Figura 2- Áreas sob risco de infecção por malária	25
Figura 3- Ciclo biológico do plasmódio	26
Figura 4- Sequestro de eritrócitos parasitados na placenta	30
Figura 5- Receptores do tipo Toll e a imunidade inata	33
Figura 6- Protocolo experimental com uso de parasitas GFP	44
Figura 7- Suscetibilidade de fêmeas não grávidas frente a diferentes cepas de <i>Plasmodium sp.</i>	51
Figura 8- Hemorragia cerebral em animais infectados com <i>Plasmodium</i> <i>berghei</i> ANKA ^{GFP}	52
Figura 9- Redução do espaço vascular em gestantes infectadas com diferentes linhagens e inóculos de <i>Plasmodium sp.</i>	55
Figura 10- Aumento da suscetibilidade de fêmeas gestantes C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i> NK65 ^{GFP}	56
Figura 11- Ensaio de inibição da adesão de eritrócitos parasitados com <i>P.</i> <i>berghei</i> NK65 ^{GFP} a células CHO-K1	57
Figura 12- Influência dos TLRs e da molécula adaptadora MyD88 na infecção com <i>P. berghei</i> NK65 ^{GFP}	58
Figura 13- Influência da gestação nos níveis de parasitemia em animais deficientes para a expressão de TLRs	60

Figura 14- Influência dos TLRs e da molécula adaptadora MyD88 na infecção com <i>P. berghei</i> NK65 ^{GFP} em grávidas	61
Figura 15- Avaliação do espessamento do sincíotrofoblasto em animais infectados com <i>P. berghei</i> NK65 ^{GFP}	63
Figura 16- Comparação entre espaço vascular placentário e níveis de parasitemia de animais C57BL/6 e MyD88 ^{-/-}	64
Figura 17- Cuidado parental da progênie	65
Figura 18- Expressão Relativa de IL1- β e IL-6 em placentas de fêmeas C57BL/6 e MyD88 ^{-/-}	66

Tabela 1- Resultado da gestação de animais infectados com diferentes linhagens de plasmódio	53
--	-----------

Tabela 2- Resultado da gestação de animais C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} após a infecção com <i>P. berghei</i> NK65^{GFP}	62
--	-----------

CD	Cluster of differentiation
cDNA	Ácidos Desoxirribonucleico Complementar
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary K1
COBEA	Comissão Brasileira de Experimentação Animal
CO ₂	Dióxido de Carbono
CSA	Condroitina Sulfato A
CSB	Condroitina Sulfato B
EP	Eritrócitos Parasitados
g	Gramas
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEK	Human Embryonic Kidney Cells
H&E	Hematoxilina e Eosina
ICAM1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-1R	Receptor de IL-1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
IPA	Incidência Parasitária Anual
i.v.	Via Intravenosa
LPS	Lipopolissacarídeo
Mal	MyD88-Adapter-Like Protein
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88
N ₂	Nitrogênio
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
PAM	Pregnancy Associated Malaria
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PfEMP1	Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1
p.i.	Pós Infecção
PM	Placental Malaria
PRR	Pathern Recognition Receptors
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription PCR
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

SARM	Sterile α - and Armadillo-Motif-Containing Protein
SFB	Soro Fetal Bovino
Th1	T helper-1
Th2	T helper-2
TICAM-1	Toll-like Receptor <i>Adaptor</i> Molecule 1
TICAM-2	Toll-like Receptor <i>Adaptor</i> Molecule 2
TIRAP	Toll–interleukin 1 receptor (TIR) domain–containing adapter protein
TLR	Toll-like Receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAM	TRIF-related <i>adaptor</i> molecule
TRIF	Toll/IL-1R (TIR) Domain-Containing Adapter Inducing Interferon
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
WHO	World Health Organization

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	A MALÁRIA ASSOCIADA À GRAVIDEZ (PAM)	27
1.2	OS RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLR)	31
1.3	OS RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLR) E A MALÁRIA	32
1.4	OS RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLR) E A PAM.....	36
2	OBJETIVOS	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	ANIMAIS E PARASITAS	43
3.2	SINCRONIZAÇÃO DE PARASITAS	43
3.3	MONITORAMENTO DA GRAVIDEZ.....	45
3.4	INFECÇÃO DURANTE A GRAVIDEZ	45
3.5	MONITORAMENTO DE FETOS NEONATOS	45
3.6	COLETA DE PLACENTAS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	46
3.7	EXPRESSÃO GÊNICA ESPECÍFICA POR MEIO DE qRT-PCR	46
3.8	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	47
3.9	ENSAIOS DE ADESÃO	47
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4	RESULTADOS	49
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	79

A malária é uma doença parasitária grave que acomete cerca de 225 milhões de indivíduos a cada ano (WHO, 2010). Causada por protozoários do gênero *Plasmodium sp.*, ela é transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles sp.* No início do século XX, cerca de 178 países eram endêmicos para esta doença. Embora desde o ano de 1945 o número de países que apresentaram casos de malária tenha diminuído, ainda hoje esta doença coloca em risco cerca de 50% da população mundial (**Fig. 1**) (FEACHEM et al., 2010).

Dados do relatório mundial sobre malária publicado em 2010 prevêm nos próximos 25 anos um gasto anual com prevenção e tratamento de casos de malária de cerca de 5 bilhões de dólares entre 2010 e 2015 e de 4,75 bilhões de dólares entre 2020 e 2025, fazendo com que esta doença seja um sério problema para a saúde pública mundial (WHO, 2010).

Figura 1- Áreas sob risco de transmissão por malária

Ilustração mostrando a distribuição das áreas com risco de transmissão de malária no mundo. Evidenciando a ocorrência concentrada principalmente na região tropical (modificado de (WHO, 2010).

No Brasil, em 2009, o número de casos registrados foi superior a 300.000 pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), sendo que a maioria dos casos ocorreu na região amazônica (**Fig. 2**). Embora as políticas públicas de controle da malária no Brasil ainda não sejam as ideais, os investimentos vêm crescendo desde 2000

chegando a cerca de 100 milhões de dólares entre 2007 e 2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 2- Áreas sob risco de infecção por malária

Distribuição das áreas com risco de transmissão de malária no Brasil com base na incidência parasitária anual (IPA). Evidenciando a ocorrência concentrada principalmente na região amazônica (modificado de (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Atualmente são descritas cinco espécies de *Plasmodium* que infectam humanos: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. O ciclo de vida do plasmódio inicia-se quando parasitas na forma de esporozoítos são inoculados na pele do ser humano pela picada do mosquito vetor. Os esporozoítos atingem o fígado e invadem os hepatócitos e multiplicam-se dando origem a milhares de merozoítos, os quais são liberados dos hepatócitos e caem na circulação sanguínea, invadindo as hemácias e dando início à segunda fase do ciclo, chamada de esquizogonia sanguínea. O desenvolvimento do parasita nas células do fígado dura de uma a duas semanas dependendo da espécie e os primeiros sintomas da doença somente irão aparecer na fase sanguínea. Em determinadas espécies como o *P. vivax* e o *P. ovale*, algumas formas podem ficar em estado de latência no hepatócito, sendo chamados de hipnozoítos (do grego hipnos, sono). Essas formas levam à

recaídas da doença após períodos de incubação, que em geral é de seis meses. Os merozoítos formados na fase sanguínea rompem a hemácia e invadem outras, sofrendo vários ciclos de multiplicação eritrocitária. O ciclo eritrocitário pode durar 48 ou 72 horas dependendo da espécie de parasita em questão. Alguns merozoítos diferenciam-se em gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas) após vários ciclos eritrocitários. Numa nova picada, os gametas serão ingeridos pelo mosquito e neste irão fecundar-se dando origem às formas de esporozoítos que irão continuar o ciclo (**Fig. 3**) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 3- Ciclo biológico da malária

Parasitas na forma de esporozoítos são inoculados na pele do ser humano pela picada do mosquito vetor. Os parasitas seguem para o fígado onde geram a fase hepática da doença de onde saem para dar origem à fase sanguínea onde se observa o quadro sintomatológico (CROMPTON et al., 2010).

Em humanos, o período de incubação da malária, que corresponde à fase hepática, pode durar de 7 a 14 dias. Após este período, dá-se a fase sanguínea da doença, quando surgem os sintomas. Os principais sintomas são: calafrios, sudorese e febre, que pode chegar a mais de 40 °C. É importante notar que a febre causada pela malária está relacionada com o momento de rompimento das hemácias pelo parasita e também com a espécie do mesmo. O *P. vivax*, *P. ovale* e o *P. falciparum*, por exemplo, tem um ciclo de 48 horas dentro das hemácias depois das quais ocorre o rompimento das mesmas dando origem ao nome febre terçã (que ocorre de três em três dias), enquanto que o *P. malarie* tem um ciclo de 72 horas e da origem a febre quartã (COLLINS, JEFFERY, 2005, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Além dos sintomas citados acima, que correspondem a um quadro de malária não complicada, pode ocorrer um agravamento do quadro infeccioso, com surgimento de hemorragia, convulsão, edema pulmonar, dentre outros, levando a quadros de malária severa. Diversos fatores como a espécie e quantidade de parasitas circulantes e o grau de imunidade do hospedeiro podem influenciar no quadro clínico da malária. Os grupos com manifestações mais severas são as gestantes, crianças e primoinfectados. Na malária os quadros mais severos ocorrem em infecções pelo *P. falciparum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Dado que a malária é uma doença parasitária transmitida por vetor invertebrado, tão importante quanto à presença e distribuição do parasita no mundo, também é importante a localização do vetor. Os vetores da malária pertencem ao gênero *Anopheles* sp. Existem diversas espécies distribuídas pelo mundo, de modo que cada país/região apresenta uma ou mais espécies dominantes na infecção do ser humano. No Brasil o principal vetor da malária é o *A. darlingi* e na África *A. gambiae*, *A. funestus* e *A. arabienses* (KISZEWSKI et al., 2004).

1.1 A MALÁRIA ASSOCIADA À GRAVIDEZ (PAM)

Mulheres grávidas constituem um dos principais grupos de risco para malária. Anualmente cerca de 125 milhões de mulheres tornam-se grávidas em áreas de transmissão de *P. falciparum* e/ou *P. vivax* (DELLICOUR et al., 2010) e, estão expostas a infecção e ao risco de desenvolvimento de malária placentária (PM). Esta

complicação é provocada principalmente pelo *P. falciparum*. Com relação às infecções por *P. vivax*, embora existam poucos estudos até o momento, sabe-se que esta espécie causa uma menor severidade da doença (NOSTEN et al., 1999).

A malária placentária pode ocasionar diversas alterações clínicas e seu impacto na gestação pode variar de acordo com o nível de endemicidade (LUXEMBURGER et al., 1997, DESAI et al., 2007). Em áreas de baixa endemicidade, onde não há a ocorrência da pré imunidade contra a malária, devido à baixa taxa de exposição ao parasita, as pessoas podem apresentar quadros severos da doença com risco de evoluir para óbito (LUXEMBURGER et al., 1997, WHO, 2004). Nessas áreas, a infecção de gestantes é particularmente preocupante, e pode culminar com desenvolvimento de malária severa, que por vezes, leva ao óbito (NOSTEN et al., 1991, WHO, 2004).

Já, em áreas com alta endemicidade os indivíduos adquirem uma pré-imunidade contra o plasmódio, que é mantida pela exposição frequente ao parasita. Com isso, nestas áreas, a infecção pode se tornar assintomática (DESAI et al., 2007). Entretanto, ao contrário do que acontece com a maioria da população que vive em áreas de alta endemicidade, mulheres grávidas tornam-se mais susceptíveis, podendo apresentar níveis de parasitemia detectáveis com maior frequência (WHO, 2000). Contudo, a ocorrência de malária severa não é comum e a infecção pode ter um curso assintomático e não ser detectada ou ocasionar sintomas leves (DIAGNE et al., 1997). Mas apesar da pouca gravidade aparente, pode ocorrer um intenso processo inflamatório placenta, que associado a anemia severa, pode gerar neonatos com baixo peso ao nascimento (DORMAN, SHULMAN, 2000).

Os principais impactos que podem ser observados sobre os fetos são aumento do índice abortos, nascimentos prematuros e também retardo do crescimento intra-uterino, que tem como consequência direta o baixo peso ao nascer (MENENDEZ, 1995). O baixo peso ao nascer está intimamente relacionado com a malária placentária, sendo que para um aumento de aproximadamente 10% nos casos de malária placentária pode ocorrer um aumento de 9% na prevalência de baixo peso ao nascer (BRABIN et al., 2004).

Este quadro é observado tanto em infecções por *P. falciparum* quanto por *P. vivax* (NOSTEN et al., 1999, KALILANI et al., 2010) e também em mulheres primigrávidas e multigrávidas, sendo que a sua prevalência é maior em primigrávidas (KALILANI et al., 2010). A redução do peso ao nascer pode estar associada a diferentes fatores como, presença de parasitas detectáveis no sangue (ROGERSON et al., 2003), diminuição no transporte de aminoácidos (REGNAULT et al., 2002), disfunção placentária associada à hipoxia fetal (ROGERSON et al., 2007) e ainda a uma alteração da hemodinâmica útero-placentária (DORMAN et al., 2002).

Outro fator que influencia a susceptibilidade a malária placentária é a frequência de paridade. Mulheres multíparas apresentam uma menor prevalência da doença, com diminuição das alterações patológicas, quando comparadas com as primíparas (ISMAIL et al., 2000). Isso ocorre porque na infecção por *P. falciparum* alguns EP expressam na sua membrana uma variante da proteína PfEMP1, codificada pelo alelo *var2csa*, que é produzida por sub populações do parasita. Essa variante da proteína tem grande afinidade pelo receptor Condroitina Sulfato A (CSA) que é expresso em altos níveis na placenta. A interação entre a PfEMP1 e o CSA leva ao sequestro de EP fazendo com que estes aumentem em número na placenta **(Fig.3)** (GAMAIN et al., 2002).

Como o CSA é expresso principalmente na placenta, que é um órgão temporário, surgindo apenas durante a gestação, é nesse período que as sub-populações de parasita que expressam a variante PfEMP1 (*var2csa*) podem se multiplicar, sofrendo o sequestro na placenta e possivelmente evitando sua destruição no baço. É também nesse período que o sistema imune pode gerar uma resposta específica contra essa variante, devido a sua presença no organismo. Assim, mulheres multíparas, que foram infectadas durante a primeira gravidez, são capazes de gerar uma resposta imune mais efetiva contra o plasmódio, com maiores títulos de anticorpos específicos devido a exposição prévia à essa variante do parasita (STAALSOE et al., 2004). A geração de uma resposta imune específica pode atenuar significativamente a patologia decorrente da malária placentária (ROGERSON et al., 2007).

É interessante notar que, ao contrário de outros órgãos em que os EP se aderem na parede de vasos vasculares, na placenta ocorre a ligação de destes na

parede do sincíotrofoblasto e também nos espaços intervilares (**Fig.4**) (ANDREWS, LANZER, 2002). Isso ocorre porque o sincíotrofoblasto expressa CSA e também porque existe CSA nos espaços intervilares da placenta (ACHUR et al., 2000).

Figura 4- Sequestro de eritrócitos parasitados na placenta

Mulheres grávidas principalmente as primigrávidas apresentam altos níveis de sequestro de EP na placenta que não são reconhecidos por anticorpos existentes antes da gravidez. Isso ocorre porque na placenta os EP ligam-se ao CSA através de uma variante da PfEMP-1 utilizando o domínio DBLγ enquanto que no endotélio da microvasculatura a ligação é feita por meio do CD36 utilizando o domínio CIDR1 (GAMAIN et al., 2002).

O sequestro dos EP leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório que varia em uma escala entre presença de poucos monócitos pigmentados até uma intervilosite com infiltrado massivo de células mononucleares no espaço intervilar (MUEHLENBACHS et al., 2010). O infiltrado inflamatório é a alteração mais comum em placentas infectadas, acontecendo com maior frequência nos casos de infecção crônica (ISMAIL et al., 2000). A intervilosite também está associada com o baixo peso ao nascer, sendo este mais frequente e severo na intervilosite crônica (ORDI et al., 1998). Em decorrência da infecção, as células mononucleares maternas e do sincíotrofoblasto liberam quimiocinas que favorecem o recrutamento de monócitos (ROGERSON, BOEUF, 2007, LUCCHI et al., 2008) e a consequente liberação de

citocinas pode levar a formação de depósitos de fibrina na placenta (UMBERS et al., 2011). Outras alterações que acontecem na placenta são o espessamento da membrana basal do sincíotrofoblasto, o aumento da formação de nós sinciciais e necrose (ISMAIL et al., 2000).

Na placenta, o pigmento malárico (hemozoína) está presente em eritrócitos infectados, monócitos/macrófagos e nos depósitos de fibrina presentes nos espaços intervillares (ROGERSON et al., 2003, MUEHLENBACHS et al., 2010). Os depósitos de pigmento são mais frequentes em infecções crônicas e passadas que em infecções agudas (ISMAIL et al., 2000) e no caso da malária placentária, estes depósitos estão relacionados com o baixo peso ao nascer (MUEHLENBACHS et al., 2010).

1.2 OS RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLR)

Os receptores do tipo Toll (do inglês Toll-like Receptors, TLR) formam uma família de receptores que reconhecem padrões moleculares (PRR, do inglês "Pattern Recognition Receptors"), frequentemente associados aos agentes infecciosos (KAWAI, AKIRA, 2011). O estudo dos TLR tem permitido grandes avanços na compreensão dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente à invasão por diferentes microorganismos. Estes receptores pertencem a uma família de proteínas transmembrânicas do tipo I, caracterizadas por uma porção citoplasmática semelhante a do receptor de IL-1 (IL-1R), e uma porção extracelular rica em repetições de leucina e são responsáveis pelo reconhecimento de PRR, frequentemente associados aos agentes infecciosos (KAWAI, AKIRA, 2011).

Até o momento foram descritos cerca de onze membros da família dos TLR (TLR1-11), os TLRs 1-9 são preservados no homem e camundongo, já o TLR10 é funcional apenas em humanos e o TLR11 apenas em camundongos. Quanto a sua localização, os TLRs 1, 2, 4, 5, 6, e 10 são extracelulares enquanto que os TLRs 3, 7, 8 e 9 são intracelulares situados em endossomas (KAWAI, AKIRA, 2011).

O TLR2 reconhece componentes microbianos como, por exemplo, o peptídeoglicano de bactérias gram-positivas, o glicosilfosfatidilinositol de *T. cruzi* e o zymosan de fungos (SCHWANDNER et al., 1999, UNDERHILL et al., 1999, CAMPOS et al., 2001). A sua capacidade de reconhecer várias moléculas se deve

ao fato de que ele forma dímeros com o TLR1 ou TLR6 para o reconhecimento de seus ligantes e cada dímero reconhece ligantes diferentes, sendo que, o TLR1/2 pode reconhecer lipopeptídeos triacetilados e o TLR6/2 lipopeptídeos diacetilados (TAKEUCHI et al., 2001, TAKEUCHI et al., 2002).

O reconhecimento de RNA de dupla fita, que é produzido em diversas infecções virais, é feito pelo TLR3 apresentando desta forma uma grande importância na resposta à infecções virais (ALEXOPOULOU et al., 2001). Já molécula de lipopolisacarídeo (LPS) é reconhecida principalmente pelo TLR4 (HOSHINO et al., 1999). O TLR5 tem como ligante a flagelina, que é um componente do flagelo de bactérias, e pode ter importância na resposta antimicrobiana em mucosas (GEWIRTZ et al., 2001). Os TLRs 7 e 8 reconhecem RNA de fita simples ricos em guanosina ou uridina e também são importantes na resposta à infecções virais (HEIL et al., 2004). O TLR9 reconhece DNA não metilado rico em CpG, que é comum em bactérias e vírus, desempenhando um papel na resposta contra esses agentes (HEMMI et al., 2000, TABETA et al., 2004).

A sinalização via TLR envolve uma complexa cascata e eventos intracelulares. Cinco proteínas adaptadoras foram descritas até o momento: MyD88, Mal (TIRAP), TRIF (TICAM-1), TRAM (TICAM-2) e SARM (O'NEILL, BOWIE, 2007). Com exceção do TLR3, todos os demais TLRs e IL-1R recrutam a proteína adaptadora MyD88. Enquanto o recrutamento de MyD88 após a ativação de TLR2 e TLR4 necessita obrigatoriamente de Mal, outros TLRs e IL-1R são independentes dessa molécula adaptadora (KAGAN, MEDZHITOV, 2006). Alternativamente, TLR4 pode também iniciar uma cascata de sinalização independente de Mal/MyD88 por meio do recrutamento de TRAM e TRIF (YAMAMOTO et al., 2003).

1.3 OS RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLR) E A MALÁRIA

Diferentes componentes do plasmódio estão relacionados à ativação dos TLRs. Glicolípídios ancoradores de proteínas como o Glicosilfosfatidilinositol (GPI) purificados de culturas de *P. falciparum* são reconhecidos por TLR2 e menos extensivamente por TLR4 (KRISHNEGOWDA et al., 2005). Os GPIs diferem na sua estrutura entre diferentes organismos e são abundantes em protozoários patogênicos onde possuem a capacidade imuno-estimulatória (FERGUSON et al.,

1999). Além de induzir uma resposta pró-inflamatória, os GPIs também fazem a importante função de estimular uma resposta imune adaptativa mediada por células e também à produção de anticorpos GPI específicos (ROPERT, GAZZINELLI, 2000).

Figura 5- Receptores do tipo Toll e a imunidade inata

Receptores do tipo Toll (TLRs) reconhecem uma variedade de padrões moleculares associados (PAMPs). O reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS) por TLR4 é auxiliada por duas proteínas acessórias: CD14 e MD-2. TLR2 reconhece uma ampla gama de ligantes estruturalmente independentes e em combinação com outros TLRs, incluindo TLR1 e TLR6. TLR3 está envolvido no reconhecimento de dupla fita (dsRNA). TLR5 é específico para flagelina bacteriana, enquanto TLR9 é um receptor para motivos de CpG não metilados, que são abundantes no DNA bacteriano. G⁺, Gram-positivos; G⁻, Gram-negativos; GPI, glicofosfoinositol; RSV, vírus sincicial respiratório (MEDZHITOV, 2001).

No plasmódio, GPIs são bem conservados e sua expressão é estágio específica, sendo expressos unicamente entre as fases de trofozoíto intermediário e maduro (NAIK et al., 2000). GPIs são importantes para sobrevivência do parasita, já que são essenciais para invasão dos eritrócitos e por isso, o reconhecimento rápido pelos receptores da imunidade inata contribui para uma resposta efetiva contra o parasita (NAIK et al., 2003). Na malária severa, a ativação de TLR por GPI induz a secreção pelos macrófagos de TNF- α , IL-1 e óxido nítrico (NO) e está relacionada com patogênese da infecção. Além disso, foi verificado que GPIs também aumenta

da expressão de ICAM-1, VCAM-1 e Selectina-E (SCHOFIELD, HACKETT, 1993, SCHOFIELD et al., 1996).

Apesar do TLR2 ser o principal receptor do tipo Toll no reconhecimento do GPI, é importante lembrar que para o reconhecimento do seu ligante ele deve formar dímeros com o TLR1 ou TLR6. Dependendo do dímero formado com o TLR2, as moléculas que são reconhecidas podem ser de diferentes níveis de acetilação. O dímero TLR1/2, por exemplo, reconhece moléculas com maiores níveis de acetilação que o dímero TLR2/6. Nesse sentido, Krishnegowda *et al.* mostrou que o dímero TLR1/2 é mais eficaz no reconhecimento do GPI. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que a alteração do GPI com a retirada de metade do ácido graxo sn-2 faz com que o dímero TLR2/6 se tornasse o mais hábil no seu reconhecimento (KRISHNEGOWDA et al., 2005).

Outro importante componente do plasmódio que ativa TLR é a hemozoína (PARROCHE et al., 2007). A hemozoína, um sub produto da detoxificação do heme pelo parasita, é capaz de ativar TLR9 e desempenhar funções pró-inflamatórias induzindo a produção de citocinas e quimiocinas como IL-6, TNF- α , IL-12, MCP-1 e IL-8 (HEMMI et al., 2000, TAKESHITA et al., 2001). Recentemente, Franklin e colaboradores demonstraram que TLR9 associado com a proteína adaptadora MyD88 são essenciais para iniciar uma resposta mediada por IL-12 e IFN- γ que resulta no rápido aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias na malária aguda (FRANKLIN et al., 2009). Trabalhos divergem quanto a capacidade de a hemozoína ativar o TLR9 diretamente. Alguns autores defendem a idéia que a ativação do TLR9 é resultado da contaminação da hemozoína por material genético do parasita (COBAN et al., 2005, PARROCHE et al., 2007). No entanto, um trabalho elegante do grupo de Shizuo Akira mostrou recentemente que a hemozoína é capaz de ativar o TLR9 diretamente (COBAN et al., COBAN et al., 2010).

Nos últimos anos, o estudo dos TLRs na malária vem crescendo (KRISHNEGOWDA et al., 2005, COBAN et al., 2007, FRANKLIN et al., 2009). Os polimorfismos presentes nos TLRs podem ter grande importância na eficiência do reconhecimento do seu ligante e desencadeamento de uma resposta adequada. Nesse sentido, Mockenhaupt, e et al. (2006) transfectaram células HEK com o mutante de TLR2, encontrado em uma criança que apresentava um quadro de

malária severa, e verificaram que, uma simples troca de uma leucina por uma prolina em uma região altamente preservada do receptor prejudica a sua capacidade de reconhecimento.

Crianças com quadro de malária severa apresentam frequências mais elevadas das mutações Asp299Gly e Thr399Ile do TLR4 quando comparadas com crianças assintomáticas e saudáveis. Estes dados sugerem que polimorfismos no TLR4 desempenham um papel importante na susceptibilidade à malária severa (MOCKENHAUPT et al., 2006). Com relação aos polimorfismos de TLR9, trabalhos mostram resultados diferentes. O grupo de Mockenhaupt estudando crianças com malária severa não encontrou relação entre os polimorfismos do TLR9 e a infecção. No entanto, Sam-Agudu e colaboradores verificaram uma relação entre polimorfismos do TLR9 e os níveis de IFN- γ durante a infecção em crianças com malária cerebral (SAM-AGUDU et al., MOCKENHAUPT et al., 2006). Nestes casos, cabe ressaltar que as correlações foram realizadas em condições diferentes. Outras relações entre polimorfismos e TLR também foram vistas entre o TLR1 (I602S) e o TLR6 (249P) em casos de malária não severa. Os estudos mostram que heterozigose de I602S é mais comum em indivíduos com malária leve que em indivíduos assintomáticos e a homozigose de 249P maior no grupo assintomático (LEORATTI et al., 2008).

Modelos murinos constituem uma boa ferramenta para o estudo da importância dos TLRs na malária. Nesse sentido, estudos com animais deficientes na proteína adaptadora MyD88 mostram uma associação entre o desenvolvimento de malária cerebral e esta molécula. Assim, camundongos MyD88^{-/-} infectados com *P. berghei* ANKA têm uma maior sobrevivência que camundongos da linhagem C57BL/6 selvagem, ultrapassando a janela de ocorrência da malária e morrendo de hiperparasitemia. Entretanto, não ocorreram diferenças nos níveis de parasitemia e hemoglobina entre os grupos na primeira semana de infecção. Já a quantidade das células T CD4⁺, T CD8⁺, CD11c⁺ e NK1.1⁺ foi maior em animais C57BL/6 e nos TLRs 2^{-/-} e 9^{-/-}, mas não nos TLRs 4^{-/-}, 5^{-/-} e 7^{-/-}. Assim TLRs 2 e 9 foram considerados importantes para a patogênese da malária cerebral, pois animais nocaute para estes TLRs também apresentaram maior sobrevivência em relação ao grupo C57BL/6 (COBAN et al., 2007).

Estudo realizado por Togbe *et al.* encontrou uma relação direta entre a diminuição da produção de TNF- α e IL-6 em macrófagos provenientes de animais nocaute MyD88^{-/-} e de TNF- α em macrófagos provenientes de animais nocaute TLR9^{-/-} quando estimulados com EP com *P. berghei* ANKA. Mas apesar desses resultados, os autores não encontraram relação entre o surgimento de malária cerebral e a ausência dos TLR1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 e nem das proteínas adaptadoras MyD88, TIRAP e TRIF. Estes animais não apresentaram diferença na sobrevivência quando comparados com os controles C57BL/6 (TOGBE *et al.*, 2007).

Franklin e colaboradores por sua vez, mostraram que a droga E6446, um antagonista de TLR ativados por ácidos nucleicos, diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias e consegue inibir o surgimento de malária cerebral em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA. E também que camundongos deficientes na expressão dos TLR 3, 7 e 9 apresentam uma resposta similar aos tratados com a droga, apontando assim para a importância desses TLRs na malária cerebral (FRANKLIN *et al.*, 2011).

A diversidade de resultados sobre a função dos TLR na malária murina mostra a complexidade de se trabalhar com modelo animal, já que a vários fatores como o inóculo, idade e fundo genéticos dos animais podem interferir nos resultados.

1.4 OS RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLR) E A PAM

Durante a gravidez são observadas diversas alterações no corpo materno para a aceitação e desenvolvimento do feto, sendo também observadas alterações no padrão imunológico nesse período (THELLIN *et al.*, 2000, TROWSDALE, BETZ, 2006). A resposta imune durante a gravidez varia entre a resposta Th1, importante para implantação do feto e durante o momento do parto, e uma resposta Th2, propícia para manutenção da gestação. No entanto, em caso de infecções, a alteração no perfil imune na gravidez para Th1 (FRIED *et al.*, 1998), juntamente com a produção de citocinas pró inflamatórias por células mononucleares maternas (ABRAMS *et al.*, 2003, CHAISAVANEYAKORN *et al.*, 2005) e do sinciciotrofoblasto (CHAISAVANEYAKORN *et al.*, 2005, MA *et al.*, 2006), pode levar a casos de

abortos, nascimentos prematuros e complicações maternas (POOVASSERY, MOORE, 2006).

No caso da malária placentária, foi observado um aumento na produção de citocinas e quimiocinas como TNF- α (MOORMANN et al., 1999, ROGERSON et al., 2003), IFN- γ (MOORE et al., 1999), IL-1 β (MOORMANN et al., 1999) e IL-2 (FRIED et al., 1998) MCP-1, MIP-1 α e MIP-1 β (SUGUITAN et al., 2003). Assim, infecções durante a gravidez podem afetar o equilíbrio imunológico entre mãe e feto, o que pode desencadear sérios riscos para ambos (GONCALVES et al., 2002, ROMERO et al., 2003).

O rápido reconhecimento de patógenos na placenta e o desencadeamento de uma resposta imune protetora nesse período crítico são essenciais para uma resposta efetiva contra a infecção. Nesse sentido, foi mostrado que placentas humanas expressam RNA mensageiro para os TLRs 1-10 (CHUANG, ULEVITCH, 2000, ZAREMBER, GODOWSKI, 2002), no entanto apenas a presença de proteínas dos TLRs 2 e 4 foram até o momento encontradas (MITSUNARI et al., 2006). A placenta murina expressa os TLR, sendo que essa expressão se altera durante a gestação e que, particularmente no caso do TLR4, observa-se uma diminuição de sua expressão após a metade da gestação (GONZALEZ et al., 2007).

A expressão de TLR na placenta também está relacionada às condições patológicas. Assim, foi mostrado que macrófagos residentes de placenta (células de Hofbauer) apresentaram aumento na expressão de TLR4 e que este aumento está diretamente relacionado com nascimentos prematuros associados a córioamnioidite. Em placentas a termo, foi verificado um aumento na expressão de TLR2 nas células de Hofbauer (KUMAZAKI et al., 2004, MA et al., 2007). Além disso, a distribuição dos TLRs 2 e 4 pela placenta não é homogênea, sendo demonstrado que miofibroblastos da placenta expressam TLR4 enquanto células do trofoblasto apresentam predominantemente TLR2 (MA et al., 2007).

Da mesma forma que polimorfismo de TLR é importante na malária severa e cerebral, estudos têm mostrado correlações entre alguns polimorfismos e o desenvolvimento de malária placentária. Um estudo com mulheres grávidas de Ghana demonstrou que polimorfismos dos genes para TLR4 e TLR9 influenciam a suscetibilidade à malária (MOCKENHAUPT et al., 2006). Nesse estudo, mulheres

com a mutação Asp299Gly do TLR4 apresentaram uma frequência de anemia 5 vezes maior em relação ao alelo selvagem, sendo o efeito nos níveis de hemoglobina maiores em mulheres com esse polimorfismo. Neste mesmo estudo, foi evidenciado que essa mutação, juntamente com a TLR9 T-1486C, provocou uma piora na manifestação da infecção com *P. falciparum* e um aumento do risco de baixo peso ao nascer na ordem de seis vezes.

Desta forma, foi demonstrado que polimorfismos nos TLR4 e TLR9 estão associados com aumento de morbidade em gestantes infectadas (MOCKENHAUPT et al., 2006). Por outro lado, Hamann e colaboradores demonstraram que TLR1 também se relaciona com a malária placentária. Assim, o polimorfismo S248N no TLR1 em heterozigose, parece ter uma relação direta com a susceptibilidade à infecção pelo *P. falciparum*, bem como ao risco de anemia, que foi três vezes maior em mulheres com hemozoína na placenta, quando comparadas com mulheres portadoras do alelo selvagem (HAMANN et al., 2010).

Embora a participação de TLRs na patogênese da malária permaneça ainda controversa, não se descarta a possibilidade de que estes receptores sejam determinantes na evolução da doença (ERDMAN et al., 2008), uma vez que receptores TLR-2, 4, 9 estão envolvidos na ativação de monócitos/macrófagos, promoção de resposta Th1 e inibição da resposta Th2, assim como no aumento da permeabilidade vascular e hemorragias em doenças causadas por outros patógenos (JIANG et al., 2006).

Apesar de nos últimos anos, muitos estudos terem definido as manifestações clínicas da PAM, os mecanismos celulares e moleculares que conduzem à patologia ainda permanecem obscuros. Uma possível explicação para tal desconhecimento é que os estudos em seres humanos, embora sejam essenciais, não são suficientes, devido às limitações óbvias intrínsecas aos sistemas experimentais humanos e à acessibilidade ao material biológico nos diferentes estágios da gestação. Deste modo, os modelos animais oferecem a possibilidade de estudo dos mecanismos imunopatológicos envolvidos em condições experimentais definidas e controladas.

O modelo experimental murino de infecção pelo plasmódio vem sendo utilizado pelo nosso grupo de pesquisa no estudo das populações e mediadores imunológicos associados à PAM, assim como na análise dos fatores que propiciam o

estabelecimento das lesões placentárias (NERES et al., 2008, MARINHO et al., 2009). Desta forma, o modelo murino nos permite estudar os mecanismos da imunidade inata envolvidos na PAM em um sistema experimental que representa um modelo animal para a doença humana.

Assim, face ao quase completo desconhecimento dos elementos da resposta imune inata determinantes das lesões placentárias associada à malária durante a gravidez, o presente trabalho teve como objetivo final investigar a participação dos receptores TLRs na patogênese da malária placentária.

O presente trabalho teve como objetivo central estudar o papel dos receptores inatos TLR2, 4, 9 e da proteína adaptadora MyD88 na malária associada à gravidez. Assim, pretende-se por meio da análise de diferentes parâmetros:

(i) estabelecer um novo modelo murino para o estudo da malária placentária utilizando camundongos C57BL6

(ii) estudar as alterações morfológicas nas placentas de animais normais e deficientes para TLRs infectados por *P. berghei* durante a gestação.

(iii) avaliar o papel de TLRs, individualmente, na indução da expressão de genes para citocinas inflamatórias em placentas de animais infectados.

(iv) analisar o impacto da infecção malárica no desenvolvimento fetal e neonatal em diferentes linhagens de camundongos TLRs deficientes.

3.1 ANIMAIS E PARASITAS

Camundongos C57BL/6 e animais deficientes para TLR 2, 4, 9 e MyD88 foram criados e mantidos em alojamento convencional e alimentados com dieta regular. Todos os procedimentos estão de acordo com o regulamento nacional de bem estar e experimentação animal, autorizados pela Comissão Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (Protocolo registrado sob nº 015 nas fls.82 do livro 02 para o uso de animais para experimentação).

Para as infecções utilizamos fêmeas adultas, entre 8-10 semanas de idade. Utilizamos as linhagens de plasmódio murino *P. berghei* ANKA, *P. berghei* NK65 e *P. yoelli* 17XL expressando proteína fluorescente verde (GFP) constitutivamente. Os camundongos foram infectados via intravenosa (i.v.) com diferentes inóculos de estoques congelados obtidos após a passagem em fêmeas C57BL/6 (**Fig. 6A**). O congelamento foi feito quando a parasitemia estava em aproximadamente 5%. As parasitemias foram avaliadas por esfregaço sanguíneo corado com Giemsa e/ou por citometria de fluxo como descrito por Jasen e colaboradores (JANSE, VAN VIANEN, 1994).

A expressão do GFP nas diferentes linhagens de plasmódio foi analisada comparando-se os valores de parasitemia obtidos por esfregaço sanguíneo corado com Giemsa e citometria de fluxo, em que se consideraram infectados os eritrócitos além da linha delimitada pelo controle (**Fig. 6B**). Testes de correlação foram realizados com todas as linhagens de parasita GFP para confirmar a semelhança entre os resultados obtidos na citometria com aqueles observados nos esfregaço sanguíneo (**Fig. 6C**).

3.2 SINCRONIZAÇÃO DE PARASITAS

Eritrócitos parasitados foram coletados de animais infectados com aproximadamente 30% de parasitemia, por punção cardíaca e colocados em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB). Para obter formas maduras dos parasitas (trofozoítas e esquizontes), EP com *P. berghei* NK65^{GFP} foram sincronizados com descrito anteriormente (Jansen et al. 2006c).

Resumidamente, os parasitas foram mantidos *in vitro* a 37 °C por 18h em atmosfera contendo 5% de CO₂, 85% de N₂ e 10% de O₂. Os eritrócitos foram, então, enriquecidos por separação em coluna magnética (MAC BEADS, Miltenyi Biotec, USA), resultando em populações celulares com cerca de 95% de EP.

Figura 6- Protocolo experimental com uso de parasitas GFP

(A) Fêmeas C57BL/6 foram infectadas i.v. com diferentes inóculo de plasmódio no 13^o dia de gestação. Foi realizada cesariana em parte das fêmeas grávidas no 19^o dia de gestação para estudos da patologia placentária, enquanto que outras fêmeas prosseguiram com a gestação até o parto para a verificação dos efeitos da infecção no desenvolvimento dos neonatos. **(B)** Quantificação da porcentagem de eritrócitos infectados positivos para GFP realizada por citometria de fluxo. **(C)** Análise de correlação entre os valores de parasitemia de esfregaço sanguíneo e citometria de fluxo dos parasitas utilizados.

3.3 MONITORAMENTO DA GRAVIDEZ

Para a obtenção de grávidas, duas fêmeas foram mantidas com um macho de mesma linhagem por um período não superior a 24 horas. Após este período os machos foram retirados da gaiola. A detecção de tampão vaginal e a quantificação do peso corporal foram usados conjuntamente para monitorar o tempo de gestação, como previamente descrito por Freyre e colaboradores (FREYRE et al., 2006). O dia de detecção do tampão vaginal foi considerado dia gestacional 1 (G1). A gravidez foi confirmada entre G10 e G13 quando os animais apresentaram um aumento médio de peso de 3-4 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. Foi realizada cesárea em parte das fêmeas grávidas (G19) para estudos da patologia placentária, enquanto que outras fêmeas prosseguiram com a gestação. No parto, o número e o peso dos neonatos foram registrados. O peso e o desenvolvimento dos neonatos foram acompanhados até o dia 30 após nascimento. Fêmeas grávidas não infectadas foram utilizadas como controles.

3.4 INFECÇÃO DURANTE A GRAVIDEZ

As gestantes foram infectadas via intravenosa (i.v.) em G13 com 10^5 , 10^6 ou 5×10^5 EP, e a parasitemia foi avaliada diariamente (**Fig. 5A**). Esta data de infecção foi escolhida por ser o tempo mínimo no qual se pode infectar uma fêmea, pois em experiências anteriores, observamos a interrupção precoce da gravidez. As fêmeas grávidas foram submetidas a uma cesárea em G19 e as placentas foram coletadas para análise histopatológica e para extração de RNA. Em todas as experiências fêmeas não grávidas foram infectadas do mesmo modo e utilizadas como controle.

3.5 MONITORAMENTO DE FETOS NEONATOS

Após a cesárea o peso, o número de neonatos e as reabsorções foram analisados assim como a frequência de abortos. Reabsorções, que correspondem aos fetos que morreram antes de completar a vascularização da placenta foram identificadas como pequenas implantações no útero, onde o feto e placenta não são discerníveis. O número de fetos viáveis foi quantificado após a sua retirada do saco

amniótico, para tanto, os fetos foram pressionados com pinça e a presença de movimentos indicou viabilidade dos fetos. Fetos que não apresentaram reação foram considerados como abortos. Os fetos viáveis foram sacrificados combinando hipotermia e narcose por CO₂. O número e o peso dos neonatos foram registrado após o parto, quando as gestantes chegaram ao final da gravidez. O número de neonatos por fêmea foi quantificado diariamente para a avaliação do cuidado parental entre fêmeas infectadas de diferentes linhagens.

3.6 COLETA DE PLACENTAS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As placentas de fêmeas grávidas infectadas e não infectadas foram tratadas de modo similar. As placentas foram seccionadas em duas metades, uma foi fixada em paraformaldeído 1,6% com 20% de sacarose para processamento e a outra metade foi coletada para extração de RNA e armazenada em Trizol. Cortes não consecutivos embebidos em parafina foram corados com hematoxilina-eosina (H&E). As lâminas foram examinadas em um microscópio de luz convencional Zeiss (Axio imager M2) acoplado a uma câmera Zeiss (Axio Cam HRc).

3.7 EXPRESSÃO GÊNICA ESPECÍFICA POR MEIO DE qRT-PCR

Para realização dos ensaios de qRT-PCR, metade das placentas de cada fêmea foi congelada em nitrogênio líquido, macerada e armazenada em Trizol a -80°C até a data de processamento. O RNA total de placentas de cada fêmea foi obtido utilizando o Kit RNeasy Mini[®] (Quiagen) seguindo o protocolo do fabricante para tecidos animais “Animal Cell 1”. Um micrograma de RNA total foi convertido em cDNA (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit[®], Roche) usando primers em hexâmeros randômicos. A expressão gênica relativa foi quantificada por qRT-PCR utilizando-se o ensaio Taqman[®] (Applied Biosystems) com sondas específicas para os IL1- β (Mm01336189_m1) e IL-6 (Mm00446190_m1). Todos os resultados foram normalizados de acordo com a expressão do gene constitutivo HPRT e o método quantitativo utilizado foi o $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As análises histológicas e morfométricas das placentas foram realizadas como descrito previamente por Neres e colaboradores (NERES et al., 2008). Em resumo, realizamos a quantificação do espaço vascular de secções de placenta coradas com H&E. Em cada secção, três regiões dos espaços intervilares foram selecionadas randomicamente e imagens (aumento de 200x) foram adquiridas, utilizando-se uma câmera colorida Zeiss (Axio Cam HRc) conectada a um microscópio de luz Zeiss (Axio imager M2). Para a análise morfométrica foi utilizado o programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Resumidamente, depois da aquisição das imagens, foi estipulado um limite de cores às imagens de modo a cobrir as áreas correspondentes ao espaço vascular. A porcentagem das áreas cobertas foi calculada pela razão entre o número de pixels cobertos na área definida pelo limite e o total de número de pixels da imagem. A área vascular de cada placenta foi estimada pela análise de dois cortes não consecutivos. Os resultados apresentados correspondem a fêmeas grávidas individuais e representam um resultado médio entre 3 - 9 placentas por fêmea.

3.9 ENSAIOS DE ADESÃO

Para realização dos ensaios de adesão de EP com *P. berghei* NK65^{GFP} à células CHO-K1, inicialmente 6×10^5 eritrócitos enriquecidos e sincronizados foram incubados com células CHO-K1 aderidas em monocamada por 1h a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para os ensaios de inibição com CSA e CSB, após a primeira incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagem e as aderentes foram re-incubadas por 20 minutos em presença de doses crescentes de CSA ou CSB. Após, novo ciclo de lavagem e, então, as culturas foram fixadas e coradas com kit de coloração para diferencial hematológico (Instant-Prov, New-Prov, Brasil). Para obter o percentual de células aderidas, foram contados 10 campos randomicamente selecionados e foi feita a relação entre células CHO-K1 pelos EP aderidos a elas.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando-se os testes ANOVA, Log-rank e Teste T de Student aplicados de acordo com cada situação como citado nas legendas das figuras.

Nos últimos anos muitos estudos têm caracterizado as manifestações clínicas da PAM, no entanto os mecanismos celulares e moleculares que conduzem à patologia ainda permanecem obscuros. Parte deste problema deve-se às limitações óbvias intrínsecas aos sistemas experimentais humanos e à acessibilidade ao material biológico nos diferentes estágios da gestação. Nesse sentido, nosso grupo desenvolveu modelos murinos para o estudo da PAM utilizando camundongos da linhagem BALB/c infectados com o *P. berghei* ANKA^{GFP} (NERES et al., 2008, MARINHO et al., 2009).

Como objetivo deste trabalho era avaliar a participação dos TLR no desenvolvimento da PAM e os animais deficientes em TLR2, 4, 9 e na molécula adaptadora MyD88 utilizados possuem fundo genético do C57BL/6, foi necessário uma adaptação do modelo para esta linhagem. Nesse sentido, o primeiro passo foi avaliar se nesta nova situação os animais desenvolveriam malária placentária (PM).

Inicialmente, para a escolha do parasita mais adequado a ser utilizado, animais C57BL/6 foram infectados com as seguintes linhagens de plasmódio: *P. berghei* ANKA^{GFP}, *P. berghei* NK65^{GFP} ou *P. yoelli* 17XL^{GFP}.

Antes do início dos experimentos com fêmeas grávidas, foi analisado o impacto da infecção pelas diferentes linhagens de plasmódio em fêmeas não grávidas, uma vez que resultados como uma alta mortalidade no princípio da infecção e/ou uma baixa virulência poderiam interferir negativamente na realização do trabalho. Tendo em vista que o tempo de infecção até a cesárea e o nascimento é de 6 e 8 dias, uma alta mortalidade no início da infecção impede a coleta de placentas e/ou nascimento dos neonatos, inviabilizando o estudo. Já, um parasita com baixa virulência não desenvolveria níveis de parasitemia suficientes para provocar alterações patológicas na placenta.

A **figura 7A** mostra que a infecção com *P. berghei* ANKA^{GFP} leva a uma parasitemia em torno de 10% no dia 12 de infecção, enquanto que o *P. yoelli* 17XL^{GFP} controla a parasitemia por volta do dia 20 da infecção. Já *P. berghei* NK65^{GFP} apresenta um pico de parasitemia de 50% em torno do 30º dia. Em relação à sobrevivência foi verificado que o *P. yoelli* 17XL^{GFP} apresenta 25% de morte,

enquanto que o *P. berghei* ANKA^{GFP} e *P. berghei* NK65^{GFP} apresentam 100% de morte nos dias 12 e 29 de infecção, respectivamente (**Fig. 7B**).

Figura 7- Suscetibilidade de fêmeas não grávidas frente a diferentes cepas de *Plasmodium* sp.

Fêmeas C57BL/6 foram infectadas i.v. com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP} ou 10^5 EP com *P. berghei* ANKA^{GFP} ou 10^6 EP com *P. yoelii* 17XL^{GFP}. **(A)** Curva de parasitemia. Os valores correspondem à média aritmética de cada grupo $\pm$ desvio padrão. **(B)** Curva de sobrevivência. O retângulo em cinza corresponde o período em que 90% dos animais infectados com *P. berghei* ANKA^{GFP} desenvolveram malária cerebral. Número de animais em cada grupo: *P. berghei* ANKA^{GFP} = 7; *P. berghei* NK65^{GFP} = 10; *P. yoelii* 17XL^{GFP} = 4 (Log-rank Test $P = 0,001$).

Quando realizada a necropsia nestes animais, foi verificada a ocorrência de hemorragia na calota craniana apenas nos animais infectados com *P. berghei* ANKA^{GFP} (**Fig. 8**). Além disso, os animais infectados com *P. berghei* ANKA^{GFP} apresentaram déficit motor que evoluiu para paralisia das patas posteriores e

anteriores (dados não mostrados). Estas manifestações em animais C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA são compatíveis com o quadro de malária cerebral.

Figura 8- Hemorragia cerebral em animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA^{GFP}

Fêmeas C57BL/6 foram infectadas i.v. com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP} ou 10^5 EP com *P. berghei* ANKA^{GFP} ou 10^6 EP com *P. yoelii* 17XL^{GFP}. Observa-se no crânio áreas de hemorragia unicamente no animal infectado com *P. berghei* ANKA^{GFP}. As imagens são representativas de quatro animais em duas experiências independentes.

Após realizar adaptações de inóculos e cepas de parasitas utilizando fêmeas não grávidas, o próximo passo foi repetir estes experimentos em fêmeas grávidas. Para tanto, após verificar a gravidez (como descrito em Material & Métodos), as fêmeas foram infectadas com, *P. berghei* NK65^{GFP} ou *P. yoelii* 17XL^{GFP} para avaliar as diferenças no impacto da infecção por esses parasitas durante esse período.

Na **tabela 1** demonstra que as fêmeas grávidas infectadas com *P. berghei* NK65^{GFP} (inóculo de 10^5 EP/animal) apresentaram os melhores índices de viabilidade e peso dos fetos com uma média de 5,6 fetos viáveis por fêmea, apresentando valores semelhantes aos animais não infectados que tiveram uma média de 7,7. Entretanto os outros inóculos apresentaram índices de viabilidade que variam de 0 a 4,5 neonatos por fêmea. Quanto ao número de reabsorções, dois inóculos (*P. yoelii* 17XL^{GFP} 10^6 EP e *P. berghei* NK65^{GFP} 10^6 EP) não apresentaram nenhuma ocorrência, os três grupos restantes tiveram médias de reabsorções que variaram de 0,7 no grupo controle a 1,7 no inóculo *P. berghei* ANKA^{GFP} 10^6 EP. Com exceção do inóculo *P. yoelii* 17XL^{GFP} 5×10^5 EP, todos os outros tiveram abortos sendo que o grupo controle com a menor taxa (0,2 abortos por fêmea) e o inóculo *P. yoelii* 17XL^{GFP} 10^6 EP com 100% de aborto (8 abortos por fêmea). Em relação ao peso dos fetos os dois inóculos que mais se aproximaram do controle (média de 1,4g) foram o *P. yoelii* 17XL^{GFP} 5×10^5 EP (média de 1,1g) e o *P. berghei* NK65^{GFP} 10^5 EP (média de 1,2g).

Tabela 1- Resultado da gestação de animais infectados com diferentes linhagens de plasmódio ^(a)

Linhagem	Inóculo	No. de grávidas ^(b)	Peso dos fetos (g) ^(c)	No. de abortos ^(c)	No. de reabsorções ^(c)	No. fetos viáveis ^(c)
<i>P. berghei</i> ANKA ^{GFP}	1×10^6 EP	6	0,6	2,4	1,7	3,7
<i>P. yoelii</i> 17XL ^{GFP}	1×10^6 EP	2	-	8,0	0,0	0,0
<i>P. yoelii</i> 17XL ^{GFP}	5×10^5 EP	2	1,1	0,0	1,0	4,5
<i>P. berghei</i> NK65 ^{GFP}	1×10^6 EP	4	0,9	5,0	0,0	1,8
<i>P. berghei</i> NK65 ^{GFP}	1×10^5 EP	8	1,2	1,8	0,8	5,6
Não infectados	-	9	1,4	0,2	0,7	7,7

^(a) Gestantes C57BL/6 foram infectadas i.v. no 13º dia de gestação.

^(b) Eutanásia no 19º dia de gestação.

^(c) Valor médio.

Os níveis de parasitemia causados pela infecção com os inóculos *P. yoelii* 17XL^{GFP} 5×10^5 EP e *P. berghei* NK65^{GFP} 10^6 EP no dia da cesárea foram em torno de 15% seguidos pelo *P. yoelii* 17XL^{GFP} 10^6 EP com 10% e pelo *P. berghei* NK65^{GFP} 10^5 (**Fig.9A**). Além disso, estes animais apresentaram uma diminuição da área vascular placentária quando comparados com os animais controle (**Fig. 9B e C**). Em

relação à infecção com *P. berghei* NK65^{GFP} 10⁶ EP e *P. yoelii* 17XL^{GFP} 5x10⁵ EP, embora tenham apresentado diminuição da área vascular, estes grupos apresentam baixa viabilidade dos fetos quando comparados com os animais controles (**Fig. 9 e Tab. 1**). E ainda, como os animais infectados com *P. yoelii* 17XL^{GFP} 10⁶ EP apresentaram 100% de aborto, não foi possível realizar outras análises nesse grupo (**Tab. 1**). Com base nestes resultados, para a sequência deste projeto, a linhagem *P. berghei* NK65^{GFP} com o inóculo de 10⁵ EP foi escolhida por ser a mais adequada, não acarretando no surgimento de malária cerebral e nem num alto número de abortos e reabsorções. Estas condições são essenciais para que grávidas infectadas cheguem ao fim da gestação e também para que se consiga a obtenção de um maior número de neonatos.

Após a escolha do parasita e inóculo, a próxima etapa foi comparar a curva de parasitemia e sobrevivência entre fêmeas C57BL/6 grávidas e não grávidas. Esta etapa foi realizada para comparação das diferenças do curso da infecção entre estes dois estados uma vez que a gravidez pode levar a uma maior susceptibilidade a infecção tanto em humanos quanto em camundongos.

A **figura 10A** mostra que as fêmeas grávidas apresentaram uma maior parasitemia até o 8º dia pós-infecção (p.i.), data em que ocorre o parto, quando comparadas com as não grávidas. As fêmeas grávidas também apresentaram uma menor taxa de sobrevivência, sendo que estes animais tiveram 100% de óbito no 15º dia pós-infecção (**Fig. 10B**).

Uma vez que um dos principais acontecimentos na malária placentária é o sequestro de eritrócitos parasitados na placenta através da adesão às moléculas de CSA expressas nesse órgão, foi realizado um ensaio de adesão de eritrócitos parasitados em células de ovário de Hamster chinês (Chinese Hamster Ovary, CHO) da linhagem K1, que expressam CSA para saber se, assim como no *P. falciparum* e o *P. berghei* ANKA (GAMAIN et al., 2002, NERES et al., 2008), eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 aderem-se ao CSA o que provocaria o seu sequestro na placenta. Os dados mostram que eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 se ligam ao CSA expresso pelas células CHO e que o tratamento com CSA, mas não com CSB, inibe de forma dose dependente essa ligação indicando que ela é mediada pelo CSA e que sua adição aos eritrócitos parasitados faz com

Figura 9- Redução do espaço vascular em gestantes infectadas com diferentes linhagens e inóculos de *Plasmodium* sp.

A

B

C

(A) Fêmeas C57BL/6 foram infectadas em G13 via intravenosa com 10^6 EP com *P. yoelii* 17XL^{GFP}, 5×10^5 EP com *P. yoelii* 17XL^{GFP}, 10^6 EP com *P. berghei* NK65^{GFP} ou 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP} e sacrificados no 19º dia de gestação. Os valores correspondem à média aritmética de cada grupo $\pm$ desvio padrão. O retângulo em cinza corresponde ao dia da cesariana (G19) **(B)** Observa-se a redução da área vascular nos animais infectados quando comparados com o animal controle não infectados. Barra de escala, 50 μ m. **(C)** As áreas sinusoidais da placenta foram quantificadas em relação à área total da placenta utilizando-se um método automatizado de avaliação morfométrica, como descrito em Materiais & métodos (Teste One Way ANOVA, *** $P < 0,001$ em relação ao controle). Número de animais em cada grupo: Controle = 6, *P. yoelii* 17XL^{GFP} 5×10^5 EP = 2; *P. berghei* NK65^{GFP} 10^6 EP = 4; *P. berghei* NK65^{GFP} 10^5 EP = 8. Obs: A patologia dos animais *P. yoelii* 17XL^{GFP} infectados 10^6 EP não poder ser avaliada, uma vez que todas as gestantes abortaram antes de G19.

Figura 10- Aumento da suscetibilidade de fêmeas gestantes C57BL/6 infectadas com *P. berghei* NK65^{GFP}

Fêmeas gestantes C57BL/6 foram infectadas no 13º dia de gestação i.v. com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. Fêmeas não grávidas foram simultaneamente infectadas com mesmo inóculo **(A)** Curva de parasitemia. Os valores correspondem à média aritmética de cada grupo $\pm$ desvio padrão. **(B)** Curva de sobrevivência (***) Log-rank Test $P = 0,001$) mostrando que gestantes infectadas são mais suscetíveis a infecção. O retângulo em cinza corresponde ao último dia de gestação (G21). Número de animais em cada grupo: Grávidas= 10, Não grávidas= 10.

que a proteína ligante de CSA expressa na membrana do eritrócito infectado se ligue ao CSA livre impedindo sua ligação ao CSA expresso pelas CHO **(Fig. 11)**.

Figura 11- Ensaio de inibição da adesão de eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65^{GFP} a células CHO-K1

Eritrócitos parasitados e sincronizados foram incubados com células CHO-K1 aderidas por 1h a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para os ensaios de inibição com CSA e CSB, após a primeira incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagem e as aderentes foram re-incubadas por 20 minutos em presença de doses crescentes de CSA ou CSB. Observa-se uma diminuição dose dependente da adesão com a adição de CSA. Os valores correspondem à média aritmética de cada grupo $\pm$ erro padrão (Teste Two Way Anova, ** P =0,01, *** P =0,001 em relação ao CSB de mesma concentração).

Para avaliar a influência dos TLR no curso da parasitemia e sobrevivência, animais deficientes na expressão de TLR2 (TLR2^{-/-}), 4 (TLR4^{-/-}) e 9 (TLR9^{-/-}), juntamente com animais deficientes na molécula adaptadora MyD88 (MyD88^{-/-}), não grávidos foram infectados com *P. berghei* NK65^{GFP}. Os resultados apresentados na **figura 12A** mostram que fêmeas MyD88^{-/-} e TLR9^{-/-} apresentaram os maiores picos de parasitemia quando comparados com as outras linhagens. Já, as fêmeas C57BL/6 e as TLR2^{-/-} apresentaram um pico de parasitemia semelhante, por volta de 60% de EP no dia 25 p.i., enquanto que as fêmeas TLR4^{-/-} apresentaram picos de parasitemia por volta de 50% de EP (**Fig. 12A**). Em relação ao índice de

sobrevivência, embora nenhuma linhagem seja capaz de controlar a infecção, as fêmeas *MyD88*^{-/-} foram as que apresentaram maior resistência a infecção (**Fig. 12B**).

Figura 12- Influência dos TLRs e da molécula adaptadora *MyD88* na infecção com *P. berghei* NK65^{GFP}

Fêmeas C57BL/6, *MyD88*^{-/-}, TLR-2^{-/-}, 4^{-/-} e 9^{-/-} foram infectadas i.v. com 10⁵ EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. **(A)** Curva de parasitemia. Os valores correspondem à média aritmética de cada grupo $\pm$ desvio padrão. **(B)** Curva de sobrevivência (Log-rank Test, ***P* < 0,01 em relação ao grupo C57BL/6) mostrando que os animais C57BL/6 são mais suscetíveis a infecção quando comparados com os animais *MyD88*^{-/-}. Número de animais em cada grupo: C57BL/6= 10, TLR2^{-/-}= 6, TLR4^{-/-}= 5, TLR9^{-/-}= 9, *MyD88*^{-/-}= 8

Em continuidade aos experimentos com os animais deficientes, foram iniciados experimentos com fêmeas grávidas das linhagens TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} e seu controle o C57BL/6. Quando comparadas fêmeas grávidas e não grávidas observa-se o aumento da parasitemia numa progressão crescente em ambos os grupos (**Fig. 13A**), sendo que no dia 6 p.i. (data da cesárea), verifica-se uma discrepância entre os grupos de fêmeas grávidas quando comparadas com as não grávidas, como evidenciado na **figura 13B**. Cabe ressaltar, que com exceção de fêmeas TLR2^{-/-}, não foram observadas diferenças entre as parasitemias de fêmeas grávidas TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} quando comparadas com fêmeas grávidas controle C57BL/6 (**Fig. 13B**).

Fêmeas MyD88^{-/-} e TLR9^{-/-} apresentaram os maiores picos de parasitemia quando comparados com as outras linhagens. Já, as fêmeas C57BL/6 e as TLR2^{-/-} apresentaram um pico de parasitemia semelhante, por volta de 40 e 50% de EP no dia 25 p.i. (**Fig. 14A**). Em relação ao índice de sobrevivência, embora exista uma tendência de maior sobrevivência das linhagens nocaute em relação aos animais C57BL/6, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (**Fig. 14B**). Assim avaliando-se o curso da infecção em grávidas obtiveram-se resultados similares aos obtidos em fêmeas não grávidas.

Quando avaliado o índice de viabilidade fetal, as fêmeas TLR2^{-/-} e MyD88^{-/-} infectadas tiveram maior número de fetos viáveis que os seus respectivos controles (TLR2^{-/-INF} = 7,9; TLR2^{-/-} = 5,3, MyD88^{-/-INF} 6,6; e MyD88^{-/-} 4,7). A linhagem TLR9^{-/-} não apresentou diferenças entre o número de fetos viáveis (TLR9^{-/-} = 7,8 vs. TLR9^{-/-INF} = 7,7), já a C57BL/6 teve menor número de fetos no grupo infectado (C57BL/6 = 7,7 vs. C57BL/6^{INF} = 5,4). Todos os grupos apresentaram reabsorções, os índices variaram de 0,4 (TLR2^{-/-INF}) a 2 reabsorções por fêmea (MyD88^{-/-}). Apenas os grupos MyD88^{-/-}, C57BL/6 e C57BL/6^{INF} tiveram abortos sendo os maiores índices do grupo C57BL/6^{INF} (1,3 abortos por fêmeas). Os pesos dos fetos apresentaram pouca variação sendo a menor média 1,1g (TLR9^{-/-}) e a maior 1,4 (C57BL/6) (**Tab. 2**).

Figura 13 - Influência da gestação nos níveis de parasitemia em animais deficientes para a expressão de TLRs

Camundongos gestantes C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} foram infectados no 13º dia de gestação i.v. com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. **(A)** Curva de parasitemia. Os valores correspondem à média aritmética de cada grupo $\pm$ desvio padrão. **(B)** Níveis de parasitemia no dia 6 pós infecção quando os animais foram sacrificados (19º dia de gestação). (Two way anova, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ em relação às fêmeas não grávidas. # $P < 0,05$ em relação às fêmeas C57BL/6 grávidas). Número de animais em cada grupo: C57BL/6 grávidas $n = 10$, TLR2^{-/-} grávidas = 10, TLR9^{-/-} grávidas = 10, MyD88^{-/-} grávidas = 10, C57BL/6 não grávidas $n = 10$, TLR2^{-/-} não grávidas = 6, TLR9^{-/-} não grávidas = 9, MyD88^{-/-} não grávidas = 6.

Figura 14 - Influência dos TLRs e da molécula adaptadora MyD88 na infecção com *P. berghei* NK65^{GFP} em grávidas

Fêmeas C57BL/6, MyD88^{-/-}, TLR 2^{-/-} e 9^{-/-} foram infectadas durante a gravidez i.v. com 10⁵ EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. **(A)** Curva de parasitemia. Os valores correspondem à média aritmética de cada grupo $\pm$ desvio padrão. **(B)** Curva de sobrevivência (Log-rank Test). Número de animais em cada grupo: C57BL/6= 6, TLR2= 7, TLR9= 10, MyD88= 9.

Tabela 2 - Resultado da gestação de animais C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} após a infecção com *P. berghei* NK65^{GFP} (a)

Linhagem	No. de grávidas ^(b)	Peso dos fetos (g) ^(c)	No. de abortos ^(c)	No. de reabsorções ^(c)	No. de fetos viáveis ^(c)
TLR-2 ^{-/-} INF	11	1,2	0,0	0,4	7,9
TLR-2 ^{-/-} (d)	3	1,2	0,0	0,7	5,3
TLR-9 ^{-/-} INF	10	1,2	0,0	0,5	7,7
TLR-9 ^{-/-} (d)	5	1,1	0,0	1,4	7,8
MyD88 ^{-/-} INF	7	1,2	0,0	0,9	6,6
MyD88 ^{-/-} (d)	3	1,2	0,3	2,0	4,7
C57BL/6 INF	11	1,1	1,3	0,9	5,4
C57BL/6 (d)	9	1,4	0,2	0,7	7,7

(a) Gestantes foram infectadas i.v. com 10⁵ EP no 13º de gestação.

(b) Eutanásia no 19º de gestação.

(c) Valor médio.

(d) Animais controle não infectados.

Com o intuito de saber se a infecção leva a alterações patológicas nas placentas das linhagens em estudo, a porcentagem de espaço vascular das mesmas foi mensurada através de morfometria. A análise morfométrica foi realizada em placentas de fêmeas C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} controles e infectadas. Placentas das fêmeas C57BL/6, TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} infectadas apresentaram uma diminuição do espaço vascular intervilo, com 39,43%, 40,99% e 42,24% de espaço vascular respectivamente, enquanto que as fêmeas C57BL/6 controle tiveram uma média de 48,38% de espaço vascular. Já as fêmeas MyD88^{-/-} infectadas não apresentaram diferença estatística em relação ao controle C57BL/6 e MyD88^{-/-} não infectado apresentando 48,17% de espaço vascular (**Fig.15**).

Figura 15 - Avaliação do espessamento do sinciotrofoblasto em animais infectados com *P. berghei* NK65^{GFP}

Fêmeas foram infectadas i.v. em G13 com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. Áreas sinusoidais da placenta foram quantificadas em relação à área total da placenta utilizando-se um método automatizado de avaliação morfométrica. Número de animais em cada grupo: C57BL/6= 5; C57BL/6 infectado= 8; TLR2^{-/-}= 3; TLR2^{-/-} infectado= 6; TLR9^{-/-}= 5, TLR9^{-/-} infectado= 5, MyD88^{-/-}= 3; MyD88^{-/-} infectado= 5. (Teste One Way ANOVA)

Ainda com o intuito de relacionar dados da infecção com alterações patológicas verificou-se que ao contrário dos animais C57BL/6 que tem uma relação direta entre níveis de parasitemia e diminuição do espaço vascular onde animais que apresentaram parasitemia apresentaram também diminuição do espaço vascular, animais MyD88^{-/-} infectados. Entretanto, não apresentaram tal correlação, exibindo porcentagens de espaço vascular com os mesmos índices que animais não infectados independentemente dos níveis de parasitemia exibidos (**Fig. 16**).

Para saber qual a influência da infecção no cuidado com a prole das linhagens utilizadas, foi feito o acompanhamento do cuidado parental de fêmeas

infectadas. Fêmeas infectadas foram acompanhadas após o parto e o seu número de neonatos foi mensurado diariamente. Fêmeas MyD88 infectadas tiveram maior

Figura 16 - Comparação entre espaço vascular placentário e níveis de parasitemia de animais C57BL/6 e MyD88^{-/-}

(A) Área do espaço vascular *versus* a parasitemia em fêmeas C57BL/6 e MyD88^{-/-} infectadas i.v. durante a gravidez com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. A linha negra representa a média de espaço vascular das placentas de fêmeas controles. **(B-E)** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de placentas corados em H&E de fêmeas grávidas de C57BL/6 **(B-D)** e MyD88^{-/-} **(C-E)**. As setas mostram eritrócitos parasitados aderidos às placentas. **B-C**, barra de escala = 15 μ m; **D-E**, barra de escala = 10 μ m. Número de animais em cada grupo: C57BL/6 = 5, C57BL/6 infectado = 5, MyD88 = 3, MyD88 infectado = 5.

cuidado com prole, embora nenhum neonato tenha sobrevivido até a fase adulta, a sua curva de sobrevivência se estendeu até o 23º dia de vida, enquanto que as demais linhagens não apresentaram curvas superiores ao 15º dia de vida (**Fig. 17**).

Figura 17 - Cuidado parental da progênie

Fêmeas C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} grávidas foram infectadas no 13º dia de gravidez com 10⁵ EP, i.v. Depois do parto o número de neonatos foi acompanhado diariamente para elaboração de uma curva de sobrevivência (Log-rank Test ***P < 0,001 em relação à linhagem C57BL/6). Número de neonatos em cada grupo: C57BL/6 = 28, TLR2^{-/-} = 39, TLR9^{-/-} = 69, MyD88^{-/-} = 35.

Tendo em vista que diferentemente das outras linhagens, além de apresentarem maior cuidado parental, animais MyD88^{-/-} infectados não apresentaram diminuição do espaço vascular placentário. O próximo passo foi avaliar através de PCR em tempo real, as expressões dos mRNAs das citocinas pró inflamatórias IL1-β e IL-6 em placentas de animais C57BL/6 e MyD88^{-/-} controles e infectados para saber se os resultados obtidos com a linhagem MyD88^{-/-} têm alguma relação com a expressão de citocinas. A análise dos dados mostra que animais C57BL/6 infectados apresentaram os maiores níveis de expressão de IL1-β e de IL-6, enquanto que os MyD88^{-/-} infectados apresentaram resultados semelhantes aos controles (**Fig. 18**).

Figura 18 - Expressão Relativa de IL1- β e IL-6 em placentas de fêmeas C57BL/6 e MyD88^{-/-}

Fêmeas foram infectadas i.v. em G13 com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. Camundongos C57BL/6 infectados apresentaram maior expressão de IL-1 β (**A**) e IL-6 (**B**). A expressão dos genes para as citocinas IL1- β e IL-6 em placentas de animais C57BL/6 e MyD88^{-/-} controles e infectados foi normalizada pelo HPRT e quantificada utilizando-se o método $\Delta\Delta$ CT (Housekeeping gene HPRT). Os valores correspondem à média aritmética de cada grupo $\pm$ desvio padrão. Os dados são representativos de duas experiências independentes com duplicatas para cada condição.

Infecções por plasmódio durante a gravidez podem levar a várias complicações, dentre elas o desenvolvimento de um quadro inflamatório no tecido placentário decorrente do sequestro de eritrócitos infectados. Embora, as manifestações clínicas tenham sido descritas, os mecanismos que levam a este quadro ainda não estão bem esclarecidos. Nesse sentido, este trabalho utilizou um modelo murino com o objetivo de avaliar a participação dos TLR-2, 4 e 9, bem como da proteína adaptadora MyD88 no desenvolvimento da malária placentária. Para tanto, fêmeas grávidas deficientes na expressão dos TLR2, 4 e 9 e da molécula adaptadora MyD88 foram utilizadas.

Modelos de malária placentária anteriormente descritos pelo nosso grupo usaram a associação *Plasmodium berghei* ANKA^{GFP} e camundongos BALB/c (NERES et al., 2008, MARINHO et al., 2009). Como nós necessitávamos utilizar camundongos nocaute, cujo fundo genético é proveniente da linhagem C57BL/6, foram realizados experimentos para determinar a melhor associação parasita-hospedeiro para reproduzir algumas das características observadas na PAM.

Os resultados obtidos com a infecção de fêmeas C57BL/6 não grávidas com diferentes cepas do parasita demonstraram que o *P. berghei* ANKA^{GFP} era inviável para o trabalho. Devido à mortalidade precoce, associada à paralisia de membros e hemorragia na calota craniana. Os achados observados na infecção com *P. berghei* ANKA correspondem a um quadro de malária cerebral. A ocorrência de malária cerebral em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA é citada em diversos trabalhos e ocorre mesmo com a utilização de diferentes quantidades de parasita, mostrando a alta susceptibilidade dessa linhagem a este plasmódio (CURFS et al., 1992, JENNINGS et al., 1998). Diferentes estudos demonstraram que a malária cerebral leva a uma mortalidade de quase 100% dos camundongos da linhagem C57BL/6 em torno do 7º dia de infecção, onde se considera a janela para ocorrência desta síndrome (FAUCONNIER et al., 2010, HAQUE et al., 2010).

Desta forma nossos dados indicam que existe uma sobreposição temporal entre a janela de ocorrência de malária cerebral (que acontece por volta dos dias 7 e 10 p.i. (LEPENIES et al., 2008, HAQUE et al., 2010) e as datas de cesárea e parto (que acontecem nos dias 6 (G19) e 8 (G21) p.i., respectivamente). Essa

sobreposição dificulta a análise dos resultados, uma vez que, a taxa de mortalidade provocada pela malária cerebral chegou a 100% no dia 12 p.i. Assim, a obtenção de gestantes que resistissem à infecção até a data da cesárea ou parto foi praticamente inviável.

Em camundongos, a infecção materna está entre as causas da ocorrência de canibalismo (HARKNESS, WAGNER, 1993). Dessa forma, outra variante que pode ser considerada é o impacto que a malária cerebral teria sobre o cuidado parental das fêmeas. Já que todas as fêmeas infectadas em diferentes datas após o parto cometeram canibalismo ou deixaram seus filhotes morrerem. Assim uma fêmea com malária cerebral que sobrevivesse até o parto poderia ter o seu cuidado parental prejudicado devido à severidade da mesma, o que aumentaria a mortalidade dos neonatos em relação às fêmeas sem malária cerebral.

Além disso, outros parâmetros analisados como o número de abortos, reabsorções e fetos viáveis, também podem ser alterados. Assim, há um prejuízo no discernimento entre os eventos locais e sistêmicos que foram ou não provocados pela malária cerebral. Desta forma, foi evidenciada a necessidade da utilização de outra linhagem de parasita. Para tanto foram realizados testes para a escolha de uma nova linhagem de parasita, sendo que foram testados os parasitas *P. berghei* NK65^{GFP} e *P. yoelli* 17XL^{GFP}.

A progressão da curva de sobrevivência para além da janela de malária cerebral apresentada pelos parasitas *P. berghei* NK65^{GFP} e *P. yoelli* 17XL^{GFP} somada à ausência do déficit motor e hemorragia na calota craniana mostrou que os mesmos não provocaram malária cerebral. Assim como já demonstrado em outros estudos em que a infecção com *P. berghei* NK65^{GFP} ou *P. yoelli* 17XL^{GFP} levam a uma curva de mortalidade que ultrapassa o 10º dia de infecção, podendo chegar até 28º dia p.i., em camundongos infectados com *P. berghei* NK65 (PAGE et al., 2005, VAN DEN STEEN et al., 2010).

Entretanto existem resultados controversos quanto à curva de mortalidade causada pelo *P. yoelli* 17XL^{GFP} que poderiam inviabilizar sua utilização no trabalho. Embora Page e colaboradores ao utilizar camundongos C57BL/6 infectados com 10⁵ EP de *P. yoelli* 17XL^{GFP} tenha encontrado uma taxa de sobrevivência de 40% no dia 10 p.i. e que se estendia além do dia 14 p.i. O grupo de Imai ao infectar

camundongos C57BL/6 com 25×10^3 EP de *P. yoelli* 17XL obteve uma curva de mortalidade que se estendia do dia 5 ao dia 9 p.i., com todos os animais morrendo até esta data (PAGE et al., 2005, IMAI et al., 2010).

Os níveis de mortalidade obtidos com *P. yoelli* 17XL^{GFP} neste estudo não condizem com os trabalhos citados anteriormente. Nossos experimentos mostram que a infecção se mostrou mais branda indicando que a cepa de *P. yoelli* 17XL^{GFP} utilizada pode ter sofrido uma perda de virulência e os dados produzidos a partir da sua utilização teriam a sua reprodutibilidade afetada. Um dos motivos para a perda de virulência pode ter sido inserção do gene da GFP no genoma do *P. yoelli* 17XL. Visto que a inserção de um gene estranho pode acarretar alterações nos mecanismos de regulação de outros genes, e desta forma produzir fenótipos diferentes. Em 2001, Mota e colaboradores observaram que *P. yoelli* 17X transfectados com GFP tiveram um aumento no tempo de desenvolvimento do parasita entre a fase hepática e a sanguínea (MOTA et al., 2001).

Em relação ao *P. berghei* NK65, Van Den Steen e colaboradores utilizando um inóculo de 10^4 EP mostraram que embora a curva de mortalidade causada por esse parasita se inicie no dia 6 p.i., ela pode se estender até o 29º dia de infecção sendo que cerca de 80% dos animais infectados sobrevivem após o 10º dia p.i. (VAN DEN STEEN et al., 2010). Lacerda-Queiroz e colaboradores utilizando um inóculo maior (10^6 EP) também obtiveram uma curva de mortalidade com início no dia 6 p.i. Contudo os níveis de mortalidade foram de 100% no 10º dia p.i., sendo que o aumento na mortalidade pode ser devido à utilização de parasitas provindos de animais infectados e não de estoques congelados para as infecções, o que pode fazer com estes parasitas estejam mais ativos, assim como também lhes assegura maior viabilidade, uma vez que não passam pelo processo de congelamento e descongelamento (LACERDA-QUEIROZ et al., 2011). Assim, de acordo com os trabalhos encontrados na literatura, a infecção com *P. berghei* NK65 tem curvas de parasitemia e sobrevivência que se assemelham aos resultados obtidos neste estudo.

Permitir que as gestantes sobrevivessem mais que oito dias pós infecção foi uma condição fundamental para o nosso estudo, para que o parto ocorresse de

maneira satisfatória. Além disso, esta condição permite o acompanhamento do cuidado parental, por um período próximo a data de desmame.

Assim, uma vez que os dois inóculos permitiram uma sobrevivência superior ao 21º de infecção, ambos os parasitas foram utilizados em testes com gestantes C57BL/6. Em experimentos realizados com gestantes a sobrevivência chegou a 6 dias p.i., quando foi realizada a cesárea (G19). Assim como em fêmeas não grávidas, também não foi identificada ocorrência de malária cerebral (dados não mostrados). Desta forma, a utilização dos parasitas *P. yoelli* 17XL^{GFP} e *P. berghei* NK65^{GFP} não foi descartada.

Na etapa seguinte, a comparação dos dados obtidos durante a gravidez fez com que dois dos inóculos fossem descartados por provocarem um elevado número de abortos sendo estes, o *P. yoelli* 17XL^{GFP} infectados com 10⁶ EP e o *P. berghei* NK65^{GFP} infectados com 10⁶ EP. A ocorrência de abortos durante a infecção pelo plasmódio pode estar relacionada com a resposta inflamatória tanto local quanto sistêmica em fêmeas grávidas, (POOVASSERY, MOORE, 2009).

Poovassery e colaboradores, utilizando camundongos deficientes na expressão de INF- γ (INF- $\gamma^{-/-}$) e como controle C57BL/6 infectados com *P. chabaudi* AS, observou que animais INF- $\gamma^{-/-}$ embora desenvolvessem uma forma mais severa da doença, com maiores níveis de parasitemia, perda de peso e anemia, tinham níveis de perda fetal semelhantes a um controle não infectado. O TNF também pareceu ser importante para a interrupção da gravidez, uma vez que, seu nível estava aumentado na placenta de animais C57BL/6. E ainda a sua neutralização com anticorpos anti-TNF levou a preservação dos embriões e da estrutura placentária. Este estudo demonstrou que, embora estas citocinas sejam fundamentais para no controle da infecção, por outro lado, elas podem induzir uma resposta inflamatória prejudicial para o desenvolvimento dos embriões (POOVASSERY et al., 2009).

Portanto as associações *P. yoelli* 17XL^{GFP} infectados com 10⁶ EP e o *P. berghei* NK65^{GFP} infectados com 10⁶ EP foram consideradas inadequadas para a continuação do estudo, por impedir completa ou parcialmente o prosseguimento da gravidez, e conseqüentemente, diminuir o número de placentas e de neonatos para estudos de cuidado parental.

O espessamento do sinciciotrofoblasto é uma alteração na morfologia da placenta frequentemente observada em gestantes humanas e em modelos animais (HVIID et al., 2010). Esta alteração diminui o espaço vascular, e consequentemente, a área disponível para trocas gasosas e de nutrientes, resultando principalmente em riscos para os fetos (BRABIN et al., 2004). Assim, placentas de animais infectados com os dois inóculos restantes (*P. berghei* NK65^{GFP} 10⁵ EP e *P. yoelli* 17XL^{GFP} 5x10⁵ EP) foram submetidas a uma análise morfométrica para a quantificação da área vascular. Esta metodologia esta baseada no princípio de que a redução dos espaços vasculares é inversamente proporcional ao espessamento do sinciciotrofoblasto.

Em nosso estudo o espessamento do sinciciotrofoblasto nos inóculos testados pode ser causado pela resposta inflamatória local que ocorre na placenta contra o parasita. Estes resultados corroboram com estudos realizados em gestantes de áreas endêmicas do continente africano. Assim, placentas humanas infectadas com *Plasmodium falciparum* apresentam um infiltrado inflamatório constituído principalmente de monócitos, juntamente com uma maior expressão de citocinas pró inflamatórias e quimiocinas associadas ao espessamento da membrana basal do sinciciotrofoblasto (FRIED et al., 1998, SUGUITAN et al., 2003). O aumento do espessamento compromete a fisiologia da placenta, ao diminuir o espaço vascular e consequentemente a área de trocas de gases e nutrientes entre a mãe e o feto (ISMAIL et al., 2000).

Apesar de ambos os inóculos *P. yoelli* 17XL^{GFP} 5x10⁵ EP e o *P. berghei* NK65^{GFP} 10⁵ EP terem provocado espessamento do sinciciotrofoblasto, o segundo foi escolhido pelo fato de apresentar maior número de fetos viáveis, além de uma curva de parasitemia e mortalidade condizente com a literatura. Também pensando na reprodutibilidade deste estudo, levamos em conta, a possibilidade de trabalhar com um parasita da mesma espécie utilizada em outros modelos de malária placentária já descritos (VAN ZON, ELING, 1980, NERES et al., 2008, MARINHO et al., 2009). Por esses motivos, o inóculo escolhido para a continuidade do projeto foi de 10⁵ EP como *P. berghei* NK65^{GFP}.

A maior mortalidade de fêmeas grávidas devido a infecção por *P. berghei* NK65^{GFP} confirma a hipótese de que as alterações fisiológicas provocadas pela gravidez aumentam a susceptibilidade à infecção como já demonstrado em trabalhos

publicados anteriormente (VAN ZON, ELING, 1980, POOVASSERY, MOORE, 2006, NERES et al., 2008, MARINHO et al., 2009). Durante a gravidez ocorrem alterações que levam a imunossupressão evitando assim a rejeição do feto (THELLIN et al., 2000). Paralelamente durante a malária placentária também ocorre o sequestro de eritrócitos parasitados na placenta (ANDREWS, LANZER, 2002). A associação desses acontecimentos pode acarretar na maior severidade da infecção durante a gravidez. Entretanto, a contribuição de cada um destes componentes ainda necessita ser compreendida.

Como já demonstrado, o sequestro de eritrócitos parasitados na placenta é feito através da ligação de uma variante da PfEMP1 produzida pelo *P. falciparum* e exportada para a membrana do eritrócito parasitado. Essa variante da proteína se liga a Condroitina Sulfato A que é expressa em altas concentrações na placenta humana (ANDREWS, LANZER, 2002).

Embora anteriormente nosso grupo já tenha demonstrado que o sequestro do *P. berghei* ANKA na placenta de camundongos BALB/c é mediado pelo CSA (NERES et al., 2008), até o momento não existe nenhum dado na literatura que indique que *P. berghei* NK65 comporte-se da mesma maneira. Neste estudo, esta é uma condição *sine qua non*, uma vez que, a patologia humana é mediada unicamente pelas formas do parasita que expressão uma variante da PfEMP1.

Para verificar se *P. berghei* NK65 pode ser sequestrado na placenta, realizamos ensaios de adesão com células CHO K1 (que expressam CSA) e EP com *P. berghei* NK65^{GFP}. A obtenção de dados que mostram a adesão de EP em células CHO K1, é um forte indicativo de que essa linhagem pode possuir algum componente com função análoga à PfEMP1 e que as lesões observadas na placenta podem ser decorrentes do sequestro de EP. A ocorrência de sequestro reforça a escolha desse parasita e produz um modelo em que ocorrem eventos similares aos observados na malária placentária humana.

Em experimentos com fêmeas não grávidas, o aumento da resistência à infecção com uma sobrevivência prolongada dos animais MyD88^{-/-} indica que essa molécula adaptadora desempenha uma importante função na resposta ao parasita. Assim como demonstrado em outro estudo utilizando o modelo murino de malária cerebral (GRIFFITH et al., 2007). Se por um lado os animais MyD88^{-/-} tem maiores

níveis de carga parasitária, por outro estes possuem claramente a maior sobrevida, indicando indiretamente que o processo inflamatório neste grupo é menor.

Este resultado é mais um indício do papel dos TLRs na infecção já que a MyD88 é a principal proteína adaptadora utilizada por todos os TLRs, com exceção do TLR3 (YAMAMOTO et al., 2003, O'NEILL, BOWIE, 2007). Corroborando com estes dados, a proteína MyD88 tem se mostrado importante na infecção malárica em outros trabalhos (COBAN et al., 2007, CRAMER et al., 2008). No estudo de Coban e colaboradores, camundongos MyD88^{-/-} infectados com *P. berghei* ANKA apresentaram maiores níveis de parasitemia e sobrevivência, juntamente com uma diminuição das alterações patológicas provocadas pela malária cerebral. Entretanto os animais TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} também tiveram resultados relevantes demonstrando que estes receptores podem ser importantes na malária cerebral (COBAN et al., 2007).

Cramer e colaboradores demonstraram que na infecção de animais deficientes com fundo genético C57BL/6 por *P. yoelii* NL o MyD88 e IL18 são importantes no controle da malária de forma sistêmica, uma vez que, os animais MyD88^{-/-} e IL18^{-/-} apresentaram maiores níveis de parasitemia. Além disso, animais MyD88^{-/-} tiveram uma diminuição nos níveis de IL12p40 do soro o que indica que a produção de IL12 pode ser MyD88 dependente, o que reforça a sua importância. Entretanto, não encontraram diferenças na infecção de animais TLR2/4/9^{-/-} (CRAMER et al., 2008). Estudando a malária cerebral Togbe e colaboradores não encontraram nenhuma relação entre TLR2, 4, 9 ou MyD88 e a resposta a infecção utilizando o *P. berghei* ANKA. Camundongos C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} infectados não apresentaram diferenças com relação a sua curva de sobrevivência. E todas as linhagens chegaram a 100% de mortalidade no 9º dia de infecção. Com relação à permeabilidade vascular e as alterações patológicas do cérebro animais C57BL/6 e MyD88^{-/-} não tiveram diferenças entre si. Apesar destes resultados, este mesmo autor observou que produção de TNF “*in vitro*” é MyD88 e TLR9 dependente (TOGBE et al., 2007). Em conjunto estes dados indicam que estes receptores podem estar envolvidos na fisiopatologia da doença.

Nossos resultados demonstram que diferenças na parasitemia entre fêmeas grávidas e não grávidas ocorreram em todas as linhagens. Experimentos para o

acompanhamento da parasitemia por um maior espaço de tempo foram realizados e mostraram que fêmeas MyD88^{-/-} infectadas durante a gravidez apresentaram maiores níveis de parasitemia que as outras linhagens. No trabalho de Coban e colaboradores que utilizaram o modelo murino de malária cerebral com o parasita *P. berghei* ANKA, animais MyD88^{-/-} também apresentaram maiores índices de parasitemia e sobrevivência. Contrariando Togbe et al. estes animais também apresentaram uma diminuição nas alterações histopatológicas no cérebro. Cerca de 50% dos MyD88^{-/-} não morreram de malária cerebral, enquanto que em relação aos animais C57BL/6 esse número foi de apenas 10% (COBAN et al., 2007, TOGBE et al., 2007).

Além do aumento da parasitemia observado nas fêmeas MyD88^{-/-}, foi importante saber se, ocorriam também diferenças nos níveis de lesão placentária. Assim verificamos que placentas de fêmeas MyD88^{-/-} infectadas não apresentaram diminuição do espaço vascular, e tal fato é um importante dado que indica que a ausência desta proteína leva a uma diminuição da resposta inflamatória. Neste sentido, se por um lado a ausência de MyD88 determina maiores níveis de parasitemia, por outro, diminui o processo inflamatório sistêmico e local.

Após o parto a ausência da proteína adaptadora MyD88 também se mostrou importante, uma vez que foi constatado um maior cuidado parental unicamente nas fêmeas MyD88^{-/-}. Estas fêmeas além de não cometerem canibalismo continuam normalmente a amamentar os seus neonatos, os quais sobreviveram até uma idade próxima ao desmame. Este resultado foi surpreendente, tendo em vista que devido a sua incapacidade de cuidar da prole, fêmeas infectadas normalmente tendem a cometer canibalismo (HARKNESS, WAGNER, 1993). Em conjunto este resultado apontam para um menor impacto da infecção em animais MyD88^{-/-}, embora os níveis de parasitemia sejam iguais ou maiores aos das outras linhagens.

Os resultados obtidos com as gestantes MyD88^{-/-} infectadas não apresentaram correlação com a média do número de fetos viáveis. As médias de reabsorções também mostraram uma distribuição aleatória entre todos os grupos, sem correlação com níveis de parasitemia ou lesão placentária. O número de abortos foi a única variante que se mostrou aumentada unicamente em animais C57BL/6 infectados. Contudo, animais C57BL/6 e MyD88^{-/-} controles, embora em

menor proporção, também tiveram ocorrência de abortos. Neste trabalho não foram encontradas correlações entre o número de fetos viáveis, número de reabsorções, número de abortos e peso dos fetos. Isso pode ser devido à baixa severidade da infecção por *P. berghei* NK65^{GFP} quando comparado ao *P. berghei* ANKA^{GFP}. Ressalta-se que carga parasitária nos primeiros seis dias de infecção utilizando o *P. berghei* ANKA^{GFP} é dez vezes maior que aquela observada nas infecções com *P. berghei* NK65^{GFP} (NERES et al., 2008). Este fato pode implicar no aparecimento de lesões tardias na placenta, que acabam não impactando de forma precoce o desenvolvimento fetal, sendo desse modo uma variação inerente ao modelo.

A ausência de espessamento na linhagem MyD88^{-/-} indica que existe uma resposta inflamatória mais branda ou ausente nessa linhagem. Por isso foram realizados experimentos no sentido de observar o perfil imunológico de animais C57BL/6 e MyD88^{-/-}. A análise da expressão do mRNA das citocinas IL1-β e IL-6 mostra que houve um aumento em cerca de 40 e 5 vezes, respectivamente, em placentas de fêmeas C57BL/6 infectadas em relação ao controle, sendo o grupo com maior expressão dessas citocinas. Esses dados confirmam a hipótese de que as alterações encontradas em placentas de fêmeas MyD88^{-/-} tem relação com uma resposta inflamatória local deficiente, que tem como consequência direta, um menor espessamento do sinciciotrofoblasto.

Em conjunto nossos dados demonstram que camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* NK65^{GFP} podem ser utilizados como um bom modelo animal para o estudo da malária placentária. Este modelo reproduz algumas das características observadas na malária placentária humana, como espessamento do sinciciotrofoblasto e a ligação de eritrócitos parasitados ao CSA. Além disso, também foi demonstrado que a proteína adaptadora MyD88 desempenha um importante papel no processo inflamatório relacionado com a malária placentária. Desta forma, esta proteína adaptadora está envolvida com uma série de modificações como, espessamento do sinciciotrofoblasto, alterações no cuidado parental pós natal e aumento da expressão genes pró inflamatórios como IL1-β e IL-6.

Os resultados obtidos nesse trabalho trazem contribuições para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da malária placentária. Dessa forma, as principais conclusões obtidas foram:

- A associação de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com 10^5 EP com *P. berghei* NK65^{GFP} reproduz algumas alterações patológicas da malária placentária humana e, portanto mostrou-se adequada para o estudo da malária placentária em camundongos dessa linhagem.
- Assim como ocorre na malária placentária causada por *P. falciparum*, eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65 aderem-se ao receptor Condroitina Sulfato A.
- A proteína adaptadora MyD88 mostrou-se importante na malária placentária influenciando na diminuição do espaço vascular placentário, no cuidado parental, na expressão de genes codificantes para citocinas pró inflamatórias IL1- β e IL-6.

ABRAMS, E.T.; BROWN, H.; CHENSUE, S.W.; TURNER, G.D.; TADESSE, E.; LEMA, V.M.; MOLYNEUX, M.E.; ROCHFORD, R.; MESHNICK, S.R.; ROGERSON, S.J. Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression. **J. Immunol.**, v. 170, p. 2759-2764, 2003..

ACHUR, R.N.; VALIYAVEETIL, M.; ALKHALIL, A.; OCKENHOUSE, C.F.; GOWDA, D.C. Characterization of proteoglycans of human placenta and identification of unique chondroitin sulfate proteoglycans of the intervillous spaces that mediate the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to the placenta. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 40344-40356, 2000.

ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A.C.; MEDZHITOV, R.; FLAVELL, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, p. 732-738, 2001.

ANDREWS, K.T., LANZER, M. Maternal malaria: Plasmodium falciparum sequestration in the placenta. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 715-723, 2002.

BRABIN, B.J.; ROMAGOSA, C.; ABDEL GALIL, S.; MENENDEZ, C.; VERHOEFF, F.H.; MCGREADY, R.; FLETCHER, K.A.; OWENS, S.; D'ALESSANDRO, U.; NOSTEN, F.; FISCHER, P.R.; ORDI, J. The sick placenta-the role of malaria. **Placenta.**, v. 25, p. 359-378, 2004.

CAMPOS, M.A.; ALMEIDA, I.C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E.P.; PROCOPIO, D.O.; TRAVASSOS, L.R.; SMITH, J.A.; GOLENBOCK, D.T.; GAZZINELLI, R.T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol.**, v. 167, p. 416-423, 2001.

CHSAVANEEYAKORN, S.; LUCCHI, N.; ABRAMOWSKY, C.; OTHORO, C.; CHAIYAROJ, S.C.; SHI, Y.P.; NAHLEN, B.L.; PETERSON, D.S.; MOORE, J.M.; UDHAYAKUMAR, V. Immunohistological characterization of macrophage migration inhibitory factor expression in Plasmodium falciparum-infected placentas. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 3287-3293, 2005.

CHUANG, T.H., ULEVITCH, R.J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 11, p. 372-378, 2000.

COBAN, C.; IGARI, Y.; YAGI, M.; REIMER, T.; KOYAMA, S.; AOSHI, T.; OHATA, K.; TSUKUI, T.; TAKESHITA, F.; SAKURAI, K.; IKEGAMI, T.; NAKAGAWA, A.; HORII, T.; NUNEZ, G.; ISHII, K.J.; AKIRA, S. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host Microbe**, v. 7, p. 50-61, 2010.

COBAN, C.; ISHII, K.J.; KAWAI, T.; HEMMI, H.; SATO, S.; UEMATSU, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEUCHI, O.; ITAGAKI, S.; KUMAR, N.; HORII, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 19-25, 2005.

COBAN, C.; ISHII, K.J.; UEMATSU, S.; ARISUE, N.; SATO, S.; YAMAMOTO, M.; KAWAI, T.; TAKEUCHI, O.; HISAEDA, H.; HORII, T.; AKIRA, S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. **Int. Immunol.**, v. 19, p. 67-79, 2007.

COBAN, C.; IGARI, Y.; YAGI, M.; REIMER, T.; KOYAMA, S.; AOSHI, T.; OHATA, K.; TSUKUI, T.; TAKESHITA, F.; SAKURAI, K.; IKEGAMI, T.; NAKAGAWA, A.; HORII, T.; NUNEZ, G.; ISHII, K.J.; AKIRA, S. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host Microbe**, v.7, p. 50-61, 2010.

COLLINS, W.E., JEFFERY, G.M. *Plasmodium ovale*: parasite and disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 570-581, 2005.

CRAMER, J.P.; LEPENIES, B.; KAMENA, F.; HOLSCHER, C.; FREUDENBERG, M.A.; BURCHARD, G.D.; WAGNER, H.; KIRSCHNING, C.J.; LIU, X.; SEEBERGER, P.H.; JACOBS, T. MyD88/IL-18-dependent pathways rather than TLRs control early parasitaemia in non-lethal *Plasmodium yoelii* infection. **Microbes Infect.**, v. 10, p. 1259-1265, 2008.

CROMPTON, P.D.; PIERCE, S.K.; MILLER, L.H. Advances and challenges in malaria vaccine development. **J. Clin. Invest.**, v. 120, p. 4168-4178, 2010.

CURFS, J.H.; HERMSEN, C.C.; MEUWISSEN, J.H.; ELING, W.M. Immunization against cerebral pathology in Plasmodium berghei-infected mice. **Parasitology**, v. 105 (Pt 1), p. 7-14, 1992.

DELLICOUR, S.; TATEM, A.J.; GUERRA, C.A.; SNOW, R.W.; TER KUILE, F.O. Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. **PLoS**, v. 7, p. e1000221, 2010.

DESAI, M.; TER KUILE, F.O.; NOSTEN, F.; MCGREADY, R.; ASAMOA, K.; BRABIN, B.; NEWMAN, R.D. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, p. 93-104, 2007.

DIAGNE, N.; ROGIER, C.; CISSE, B.; TRAPE, J.F. Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, p. 166-170, 1997.

DORMAN, E., SHULMAN, C. Malaria in pregnancy. **Current Obstetrics & Gynaecology**, v. 10, p. 183-189, 2000.

DORMAN, E.K.; SHULMAN, C.E.; KINGDOM, J.; BULMER, J.N.; MWENDWA, J.; PESHU, N.; MARSH, K. Impaired uteroplacental blood flow in pregnancies complicated by falciparum malaria. **Ultrasound Obstet. Gynecol.**, v. 19, p. 165-170, 2002.

ERDMAN, L.K.; FINNEY, C.A.; LILES, W.C.; KAIN, K.C. Inflammatory pathways in malaria infection: TLRs share the stage with other components of innate immunity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 162, p. 105-111, 2008.

FAUCONNIER, M.; BOURIGAULT, M.L.; MEME, S.; SZEREMETA, F.; PALOMO, J.; DANNEELS, A.; CHARRON, S.; FICK, L.; JACOBS, M.; BELOEIL, J.C.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V.F. Protein kinase C-theta is required for development of experimental cerebral malaria. **Am. J. Pathol.**, v. 178, p. 212-221, 2010.

FEACHEM, R.G.; PHILLIPS, A.A.; HWANG, J.; COTTER, C.; WIELGOSZ, B.; GREENWOOD, B.M.; SABOT, O.; RODRIGUEZ, M.H.; ABEYASINGHE, R.R.; GHEBREYESUS, T.A.; SNOW, R.W. Shrinking the malaria map: progress and prospects. **Lancet**, v. 376, p. 1566-1578, 2010.

FERGUSON, M.A.; BRIMACOMBE, J.S.; BROWN, J.R.; CROSSMAN, A.; DIX, A.; FIELD, R.A.; GUTHER, M.L.; MILNE, K.G.; SHARMA, D.K.; SMITH, T.K. The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1455, p. 327-340, 1999.

FRANKLIN, B.S.; RODRIGUES, S.O.; ANTONELLI, L.R.; OLIVEIRA, R.V.; GONCALVES, A.M.; SALES-JUNIOR, P.A.; VALENTE, E.P.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; ROPERT, C.; GOLENBOCK, D.T.; GAZZINELLI, R.T. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 881-890, 2007.

FRANKLIN, B.S.; PARROCHE, P.; ATAIDE, M.A.; LAUW, F.; ROPERT, C.; DE OLIVEIRA, R.B.; PEREIRA, D.; TADA, M.S.; NOGUEIRA, P.; DA SILVA, L.H.; BJORKBACKA, H.; GOLENBOCK, D.T.; GAZZINELLI, R.T. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, p. 5789-5794, 2009.

FRANKLIN, B.S.; ISHIZAKA, S.T.; LAMPHIER, M.; GUSOVSKY, F.; HANSEN, H.; ROSE, J.; ZHENG, W.; ATAIDE, M.A.; DE OLIVEIRA, R.B.; GOLENBOCK, D.T.; GAZZINELLI, R.T. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 108, p. 3689-3694, 2011.

FREYRE, A.; FALCON, J.; MENDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA, L.; GONZALEZ, M. Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. **Exp. Parasitol.**, v. 113, p. 154-160, 2006.

FRIED, M.; MUGA, R.O.; MISORE, A.O.; DUFFY, P.E. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. **J. Immunol.**, v. 160, p. 2523-2530, 1998.

GAMAIN, B.; GRATEPANCHE, S.; MILLER, L.H.; BARUCH, D.I. Molecular basis for the dichotomy in *Plasmodium falciparum* adhesion to CD36 and chondroitin sulfate A. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p. 10020-10024, 2002.

GEWIRTZ, A.T.; NAVAS, T.A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P.J.; MADARA, J.L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1882-1885, 2001.

GONCALVES, L.F.; CHAIWORAPONGSA, T.; ROMERO, R. Intrauterine infection and prematurity. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, v. 8, p. 3-13, 2002.

GONZALEZ, J.M.; XU, H.; OFORI, E.; ELOVITZ, M.A. Toll-like receptors in the uterus, cervix, and placenta: is pregnancy an immunosuppressed state? **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 197, p. 291-296, 2007.

GRIFFITH, J.W.; O'CONNOR, C.; BERNARD, K.; TOWN, T.; GOLDSTEIN, D.R.; BUCALA, R. Toll-like receptor modulation of murine cerebral malaria is dependent on the genetic background of the host. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p. 1553-1564, 2007.

HAMANN, L.; BEDU-ADDU, G.; EGGELE, T.A.; SCHUMANN, R.R.; MOCKENHAUPT, F.P. The toll-like receptor 1 variant S248N influences placental malaria. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, p. 785-789, 2010.

HAQUE, A.; BEST, S.E.; AMANTE, F.H.; MUSTAFAH, S.; DESBARRIERES, L.; DE LABASTIDA, F.; SPARWASSER, T.; HILL, G.R.; ENGWERDA, C.R. CD4⁺ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. **PLoS**, v. 6, p. e1001221, 2010.

HARKNESS, J.E., WAGNER, J.E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. 3^o edição, São Paulo, Roca, 1993, cap. 4, p. 103.

HEIL, F.; HEMMI, H.; HOCHREIN, H.; AMPENBERGER, F.; KIRSCHNING, C.; AKIRA, S.; LIPFORD, G.; WAGNER, H.; BAUER, S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, v. 303 p. 1526-1529 2004.

HEMMI, H.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KAISHO, T.; SATO, S.; SANJO, H.; MATSUMOTO, M.; HOSHINO, K.; WAGNER, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature.**, v. 408, p. 740-745, 2000.

HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **J. Immunol.**, v. 162, p. 3749-3752, 1999.

HVIID, L.; MARINHO, C.R.; STAALSOE, T.; PENHA-GONCALVES, C. Of mice and women: rodent models of placental malaria. **Trends Parasitol.**, v. 26, p. 412-419, 2010.

IMAI, T.; SHEN, J.; CHOU, B.; DUAN, X.; TU, L.; TETSUTANI, K.; MORIYA, C.; ISHIDA, H.; HAMANO, S.; SHIMOKAWA, C.; HISAEDA, H.; HIMENO, K. Involvement of CD8⁺ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, p. 1053-1061, 2010.

ISMAIL, M.R.; ORDI, J.; MENENDEZ, C.; VENTURA, P.J.; APONTE, J.J.; KAHIGWA, E.; HIRT, R.; CARDESA, A.; ALONSO, P.L. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. **Hum. Pathol.**, v. 31, p. 85-93, 2000.

JANSE, C.J., VAN VIANEN, P.H. Flow cytometry in malaria detection. **Methods Cell Biol.**, v. 42, p. 295-318, 1994.

JENNINGS, V.M.; LAL, A.A.; HUNTER, R.L. Evidence for multiple pathologic and protective mechanisms of murine cerebral malaria. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5972-5979, 1998.

JIANG, D.; LIANG, J.; LI, Y.; NOBLE, P.W. The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury. **Cell Res.**, v. 16, p. 693-701, 2006.

KAGAN, J.C., MEDZHITOV, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. **Cell**, v. 125, p. 943-955, 2006.

KALILANI, L.; MOFOLO, I.; CHAPONDA, M.; ROGERSON, S.J.; MESHNICK, S.R. (2010). The effect of timing and frequency of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy on the risk of low birth weight and maternal anemia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, p. 416-422, 2010 Mar.

KAWAI, T., AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity.**, v. 34, p. 637-650, 2011.

KISZEWSKI, A.; MELLINGER, A.; SPIELMAN, A.; MALANEY, P.; SACHS, S.E.; SACHS, J. A global index representing the stability of malaria transmission. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 486-498, 2004.

KRISHNEGOWDA, G.; HAJJAR, A.M.; ZHU, J.; DOUGLASS, E.J.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; WOODS, A.S.; GOWDA, D.C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 8606-8616, 2005.

KUMAZAKI, K.; NAKAYAMA, M.; YANAGIHARA, I.; SUEHARA, N.; WADA, Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. **Hum. Pathol.**, v. 35, p. 47-54, 2004.

LACERDA-QUEIROZ, N.; LIMA, O.C.; CARNEIRO, C.M.; VILELA, M.C.; TEIXEIRA, A.L.; CARVALHO, A.T.; ARAUJO, M.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; BRAGA, E.M.; CARVALHO-TAVARES, J. *Plasmodium berghei* NK65 induces cerebral leukocyte recruitment in vivo: An intravital microscopic study. **Acta. Trop.**, v. 120, p. 31-39, 2011 Jun.

LEORATTI, F.M.; FARIAS, L.; ALVES, F.P.; SUAREZ-MUTIS, M.C.; COURA, J.R.; KALIL, J.; CAMARGO, E.P.; MORAES, S.L.; RAMASAWMY, R. Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. **J. Infect Dis.**, v. 198, p. 772-780, 2008.

LEPENIES, B.; CRAMER, J.P.; BURCHARD, G.D.; WAGNER, H.; KIRSCHNING, C.J.; JACOBS, T. Induction of experimental cerebral malaria is independent of TLR2/4/9. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 197, p. 39-44, 2008 Aug.

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

LUXEMBURGER, C.; RICCI, F.; NOSTEN, F.; RAIMOND, D.; BATHET, S.; WHITE, N.J. The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, p. 256-262, 1997.

MA, Y.; MOR, G.; ABRAHAMS, V.M.; BUHIMSCHI, I.A.; BUHIMSCHI, C.S.; GULLER, S. Alterations in syncytiotrophoblast cytokine expression following treatment with lipopolysaccharide. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 55, p. 12-18, 2006.

MA, Y.; KRIKUN, G.; ABRAHAMS, V.M.; MOR, G.; GULLER, S. Cell type-specific expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. **Placenta**, v. 28, p. 1024-1031, 2007 Jun.

MARINHO, C.R.; NERES, R.; EPIPHANIO, S.; GONCALVES, L.A.; CATARINO, M.B.; PENHA-GONCALVES, C. Recrudescence Plasmodium berghei from pregnant mice displays enhanced binding to the placenta and induces protection in multigravida. **PLoS ONE**, v. 4, p. e5630, 2009.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 135-145, 2001.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S.D.V.E.S. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. **Ministério da Saúde**, 2010.

MITSUNARI, M.; YOSHIDA, S.; SHOJI, T.; TSUKIHARA, S.; IWABE, T.; HARADA, T.; TERAOKA, N. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. **J. Reprod. Immunol.**, v. 72, p. 46-59, 2006 Apr.

MOCKENHAUPT, F.P.; CRAMER, J.P.; HAMANN, L.; STEGEMANN, M.S.; ECKERT, J.; OH, N.R.; OTCHWEMAH, R.N.; DIETZ, E.; EHRHARDT, S.; SCHRODER, N.W.; BIENZLE, U.; SCHUMANN, R.R. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, p. 177-182, 2006.

MOCKENHAUPT, F.P.; HAMANN, L.; VON GAERTNER, C.; BEDU-ADDU, G.; VON KLEINSORGEN, C.; SCHUMANN, R.R.; BIENZLE, U. Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. **J. Infect. Dis.**, v. 194, p. 184-188, 2006 Jun.

MOORE, J.M.; NAHLEN, B.L.; MISORE, A.; LAL, A.A.; UDHAYAKUMAR, V. Immunity to placental malaria. I. Elevated production of interferon-gamma by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 1218-1225, 1999.

MOORMANN, A.M.; SULLIVAN, A.D.; ROCHFORD, R.A.; CHENSUE, S.W.; BOCK, P.J.; NYIRENDA, T.; MESHNICK, S.R. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1987-1993, 1999.

MOTA, M.M.; THATHY, V.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V. Gene targeting in the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 113, p. 271-278, 2001.

MUEHLENBACHS, A.; FRIED, M.; MCGREADY, R.; HARRINGTON, W.E.; MUTABINGWA, T.K.; NOSTEN, F.; DUFFY, P.E. A novel histological grading scheme for placental malaria applied in areas of high and low malaria transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 202, p. 1608-1616, 2010.

NAIK, R.S.; DAVIDSON, E.A.; GOWDA, D.C. Developmental stage-specific biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and its inhibition in a novel manner by mannosamine. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 24506-24511, 2000.

NAIK, R.S.; KRISHNEGOWDA, G.; GOWDA, D.C. Glucosamine inhibits inositol acylation of the glycosylphosphatidylinositol anchors in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 2036-2042, 2003.

NERES, R.; MARINHO, C.R.; GONCALVES, L.A.; CATARINO, M.B.; PENHA-GONCALVES, C. Pregnancy outcome and placenta pathology in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. **PLoS ONE**, v. 3, p. e1608, 2008.

NOSTEN, F.; TER KUILE, F.; MAELANKIRRI, L.; DECLUDT, B.; WHITE, N.J. Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 424-429, 1991.

NOSTEN, F.; MCGREADY, R.; SIMPSON, J.A.; THWAI, K.L.; BALKAN, S.; CHO, T.; HKIRIJAROEN, L.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. **Lancet**, v. 354, p. 546-549, 1999.

O'NEILL, L.A.; BOWIE, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 353-364, 2007.

ORDI, J.; ISMAIL, M.R.; VENTURA, P.J.; KAHIGWA, E.; HIRT, R.; CARDESA, A.; ALONSO, P.L.; MENENDEZ, C. Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 22, p. 1006-1011, 1998.

PAGE, K.R.; JEDLICKA, A.E.; FAKHERI, B.; NOLAND, G.S.; KESAVAN, A.K.; SCOTT, A.L.; KUMAR, N.; MANABE, Y.C. Mycobacterium-induced potentiation of type 1 immune responses and protection against malaria are host specific. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 8369-8380, 2005.

PARROCHE, P.; LAUW, F.N.; GOUTAGNY, N.; LATZ, E.; MONKS, B.G.; VISINTIN, A.; HALMEN, K.A.; LAMPHIER, M.; OLIVIER, M.; BARTHOLOMEU, D.C.; GAZZINELLI, R.T.; GOLENBOCK, D.T. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, p. 1919-1924, 2007 Jan.

POOVASSERY, J., MOORE, J.M. Murine malaria infection induces fetal loss associated with accumulation of *Plasmodium chabaudi* AS-infected erythrocytes in the placenta. **Infect Immun.**, v. 74, p. 2839-2848, 2006.

POOVASSERY, J., MOORE, J.M. Association of malaria-induced murine pregnancy failure with robust peripheral and placental cytokine responses. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 4998-5006, 2009 Aug.

POOVASSERY, J.S.; SARR, D.; SMITH, G.; NAGY, T.; MOORE, J.M. Malaria-induced murine pregnancy failure: distinct roles for IFN-gamma and TNF. **J. Immunol.**, v. 183, p. 5342-5349 2009 Sep.

REGNAULT, T.R.; DE VRIJER, B.; BATTAGLIA, F.C. Transport and metabolism of amino acids in placenta. **Endocrine**, v. 19, p. 23-41, 2002.

ROGERSON, S.J.; BROWN, H.C.; POLLINA, E.; ABRAMS, E.T.; TADESSE, E.; LEMA, V.M.; MOLYNEUX, M.E. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 267-270, 2003.

ROGERSON, S.J.; MKUNDIKA, P.; KANJALA, M.K. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria at delivery: comparison of blood film preparation methods and of blood films with histology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p 1370-1374, 2003.

ROGERSON, S.J.; POLLINA, E.; GETACHEW, A.; TADESSE, E.; LEMA, V.M.; MOLYNEUX, M.E. Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 68, p 115-119, 2003.

ROGERSON, S.J., BOEUF, P. New approaches to pathogenesis of malaria in pregnancy. **Parasitology**, v. 134, p. 1883-1893, 2007.

ROGERSON, S.J.; HVIID, L.; DUFFY, P.E.; LEKE, R.F.; TAYLOR, D.W. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, p 105-117, 2007.

ROMERO, R.; CHAIWORAPONGSA, T.; ESPINOZA, J. Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. **J. Nutr.**, v. 133, p. 1668S-1673S, 2003.

ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, p. 395-403, 2000.

SAM-AGUDU, N.A.; GREENE, J.A.; OPOKA, R.O.; KAZURA, J.W.; BOIVIN, M.J.; ZIMMERMAN, P.A.; RIEDESEL, M.A.; BERGEMANN, T.L.; SCHIMMENTI, L.A.; JOHN, C.C. TLR9 polymorphisms are associated with altered IFN-gamma levels in children with cerebral malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p 548-555, 2010.

SCHOFIELD, L., HACKETT, F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 145-153, 1993.

SCHOFIELD, L.; NOVAKOVIC, S.; GEROLD, P.; SCHWARZ, R.T.; MCCONVILLE, M.J.; TACHADO, S.D. 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 kinase-dependent signal transduction. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1886-1896, 1996.

SCHWANDNER, R.; DZIARSKI, R.; WESCHE, H.; ROTHE, M.; KIRSCHNING, C.J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 17406-17409, 1999.

STAALSOE, T.; SHULMAN, C.E.; BULMER, J.N.; KAWUONDO, K.; MARSH, K.; HVIID, L. Variant surface antigen-specific IgG and protection against clinical consequences of pregnancy-associated Plasmodium falciparum malaria. **Lancet**, v. 363, p. 283-289, 2004.

SUGUITAN, A.L., JR.; LEKE, R.G.; FOU DA, G.; ZHOU, A.; THUITA, L.; METENOU, S.; FOGAKO, J.; MEGNEKOU, R.; TAYLOR, D.W. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1074-1082, 2003.

TABETA, K.; GEORGEL, P.; JANSSEN, E.; DU, X.; HOEBE, K.; CROZAT, K.; MUDD, S.; SHAMEL, L.; SOVATH, S.; GOODE, J.; ALEXOPOULOU, L.; FLAVELL, R.A.; BEUTLER, B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, p. 3516-3521, 2004.

TAKESHITA, S.; TAKESHITA, F.; HADDAD, D.E.; JANABI, N.; KLINMAN, D.M. Activation of microglia and astrocytes by CpG oligodeoxynucleotides. **Neuroreport**, v. 12, p. 3029-3032, 2001.

TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; MUHLRADT, P.F.; MORR, M.; RADOLF, J.D.; ZYCHLINSKY, A.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. **Int. Immunol.**, v. 13, p. 933-940, 2001.

TAKEUCHI, O.; SATO, S.; HORIUCHI, T.; HOSHINO, K.; TAKEDA, K.; DONG, Z.; MODLIN, R.L.; AKIRA, S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **J. Immunol.**, v. 169, p. 10-14, 2002.

THELLIN, O.; COUMANS, B.; ZORZI, W.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 731-737, 2000.

TOGBE, D.; SCHOFIELD, L.; GRAU, G.E.; SCHNYDER, B.; BOISSAY, V.; CHARRON, S.; ROSE, S.; BEUTLER, B.; QUESNIAUX, V.F.; RYFFEL, B. Murine cerebral malaria development is independent of toll-like receptor signaling. **Am. J. Pathol.**, v. 170, p. 1640-1648, 2007.

TROWSDALE, J., BETZ, A.G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 241-246, 2006.

UMBERS, A.J.; AITKEN, E.H.; ROGERSON, S.J. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. **Trends Parasitol.**, v. 27, p. 168-175, 2011.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.; HAJJAR, A.M.; STEVENS, A.; WILSON, C.B.; BASSETTI, M.; ADEREM, A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, p. 811-815, 1999.

VAN DEN STEEN, P.E.; GEURTS, N.; DEROST, K.; VAN AELST, I.; VERHENNE, S.; HEREMANS, H.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 181, p. 957-968, 2010.

VAN ZON, A.A., ELING, W.M. Pregnancy associated recrudescence in murine malaria (*Plasmodium berghei*). **Tropenmed. Parasitol.**, v. 31, p. 402-408, 1980.

VAN ZON, A.A., ELING, W.M. Depressed malarial immunity in pregnant mice. **Infect. Immun.**, v. 28, p. 630-632, 1980.

WHO. Severe falciparum malaria. World Health Organization. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, p. S1-90, 2000.

WHO. (2004). A strategic framework for malaria prevention and control during pregnancy in the African region. Brazzaville. **WHO Regional Office for Africa**. Available from: www.cdc.gov/malaria/pdf/strategic_framework_mip_04.pdf [Accessed May 20, 2009].

WHO. World malaria report 2010. **World Health Organization**, p. 238, 2010.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; UEMATSU, S.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 1144-1150, 2003.

ZAREMBER, K.A., GODOWSKI, P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. **J. Immunol.**, v. 168, p. 554-561, 2002.