



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA



NATHÁLIA PEREIRA DA SILVA LEITE

**O RECEPTOR AXL E AS IMPLICAÇÕES NA
IMUNOPATOGÊNESE DA MALÁRIA EXPERIMENTAL NA INFECÇÃO POR
PLASMODIUM CHABAUDI (AS)**

Ribeirão Preto

2023

NATHÁLIA PEREIRA DA SILVA LEITE

**O RECEPTOR AXL E AS IMPLICAÇÕES NA
IMUNOPATOGÊNESE DA MALÁRIA EXPERIMENTAL NA INFECÇÃO POR
PLASMODIUM CHABAUDI (AS)**

Dissertação de mestrado a ser apresentada
ao Programa de Imunologia Básica e
Aplicada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada.

Versão corrigida. A versão original
encontra-se disponível tanto na Biblioteca
da Unidade que aloja o Programa, quanto
na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tostes
Gazzinelli

Co-orientadora: Dra. Kely Catarine
Matteucci

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Leite, Nathália Pereira da Silva

O receptor Axl e as implicações na imunopatogênese da malária experimental na infecção por *Plasmodium chabaudi* (AS)

80 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Gazzinelli, Ricardo Tostes

1. Malária. 2. Receptores TAM. 3. Eferocitose. 4. *Plasmodium chabaudi*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália Pereira da Silva Leite

O RECEPTOR AXL E AS IMPLICAÇÕES NA IMUNOPATOGENESE DA MALÁRIA
EXPERIMENTAL NA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM CHABAUDI* (AS)

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Imunologia Básica e Aplicada
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tostes
Gazzinelli

Co-orientadora: Dra. Kely Catarine
Matteucci

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (nº 2016/23618-8).

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli pela oportunidade e acolhimento em seu grupo de pesquisa e por toda a orientação e suporte durante esses anos. Foi um diferencial enorme em minha vida profissional fazer parte.

À Dra. Kely, pela orientação e pelas conversas e conselhos. Foi de imensa importância para o meu crescimento como cientista e essencial para o desenvolvimento desse projeto.

Ao prof. Dr. João Santana da Silva, por também me acolher aqui na Fiocruz em Ribeirão Preto e também por toda a orientação.

Ao prof. Dr. Diego Luís da Costa pela colaboração e auxílio no trabalho. Também agradeço aos alunos de seu laboratório, em especial ao André.

Aos meus colegas de laboratório e funcionários da Plataforma Bi-Institucional de Pesquisa em Medicina Translacional (USP/Fiocruz), Fiocruz Minas e CTVacinas por todo auxílio e suporte, que foram essenciais para execução deste trabalho. Em especial, agradeço à Dra. Thaís Rigoni e à Rebeca Ramos.

Ao programa de pós graduação de Imunologia Básica e Aplicada - docentes e funcionários - por tudo o que foi disponibilizado nesses anos para a minha formação. Em especial, um agradecimento à Ana Cristine.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPESP (nº 2016/23618-8) por todo financiamento disponibilizado para que este trabalho fosse desenvolvido.

E também, deixo agradecimentos às peças fundamentais em minha vida pessoal: minha família e meus amigos. O apoio e a presença nesses anos, são essenciais para mim. Obrigada por sempre me assistirem e torcerem por mim - alguns, mesmo que de longe - durante esse processo.

RESUMO

Leite, N.P.S. **O receptor Axl e as implicações na imunopatogênese da malária experimental na infecção por *Plasmodium chabaudi* (AS)**. 2023. 80 f. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O receptor Axl possui papel importante na inflamação e homeostase, atuando tanto na regulação de mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios, quanto na fagocitose de células apoptóticas, processo conhecido como eferocitose. Diante de infecções causadas por diferentes patógenos, a eferocitose mediada por Axl pode levar à distintas implicações nas respostas imunes e na patologia relacionada. A infecção por *Plasmodium* sp. - agente etiológico da malária - e tem grande impacto na mortalidade e morbidade em regiões tropicais e subtropicais. Devido à sua alta relevância na saúde pública, a imunopatogênese é amplamente investigada. Assim, o estudo visa a investigação e caracterização funcional e fenotípica dos mecanismos imunobiológicos que envolvem o receptor Axl e suas implicações na imunopatogênese da Malária, utilizando como modelo experimental a infecção em camundongos por *Plasmodium chabaudi* AS (*Pc*). Nossos dados mostram que a infecção por *Pc* induz a expressão dos receptores TAM e sua via de sinalização JAK/STAT no baço e fígado e, mais especificamente, do receptor Axl em monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻), células dendríticas convencionais (cDCs) (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) e células dendríticas derivadas de monócitos (MODCs) (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺). Este receptor foi identificado como mediador da eferocitose de hemácias infectadas (iRBCs). Na ausência desta via, foi observada uma diminuição na parasitemia e inflamação sistêmica no pico da infecção, em concomitância com uma maior frequência da população de cDCs e maior atividade de células T CD8⁺. Adicionalmente, no fígado há menor acúmulo de hemozoína e expressão de CD36, sugerindo menor fagocitose e sequestro de iRBCs. Desta forma, nossos resultados validam a relevância do papel de Axl na infecção por *Pc*, sendo este um dos mediadores de eferocitose de iRBCs e modulando a atividade de células T CD8⁺ e de sequestro no fígado.

Palavras chave: malária. *Plasmodium chabaudi*. receptores TAM. eferocitose.

ABSTRACT

Leite, N.P.S. **The Axl receptor and its implications in the immunopathogenesis of experimental malaria infection by *Plasmodium chabaudi* (AS)**. 2023. 80 f. Dissertation. Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

The Axl receptor plays an important role in inflammation and homeostasis, acting on the regulation of both anti-inflammatory and pro-inflammatory mediators, as well as in the phagocytosis of apoptotic cells, a process known as efferocytosis. In the context of infections caused by different pathogens, Axl-mediated efferocytosis can lead to distinct implications in immune responses and related pathology. Infection by *Plasmodium* sp. - the etiological agent of malaria - has a significant impact on mortality and morbidity in tropical and subtropical regions. Due to its high relevance to public health, the immunopathogenesis is widely investigated. Therefore, the study aims to investigate the functional and phenotypic characterization of the immunobiological mechanisms involving the Axl receptor and its implications in the immunopathogenesis of malaria, using the experimental model of *Plasmodium chabaudi* AS (*Pc*) infection in mice. Our data show that *Pc* infection induces the expression of TAM receptors and their JAK/STAT signaling pathway in the spleen and liver, and more specifically, of the Axl receptor in monocytes (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻), conventional dendritic cells (cDCs) (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻), and monocyte-derived dendritic cells (MODCs) (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺). Axl was identified as a mediator of efferocytosis of infected red blood cells (iRBCs). In the absence of this pathway, a decrease in parasitemia and systemic inflammation was observed at the peak of infection, along with a higher frequency of the cDC population and increased activity of CD8⁺ T cells. Additionally, in the liver there is a diminished accumulation of hemozoin and decreased expression of CD36, suggesting reduced phagocytosis and sequestration of iRBCs. Thus, our findings corroborate the significance of Axl's involvement in *Pc* infection, as it acts as one of the mediators of iRBC efferocytosis and influences the activity of CD8⁺ T cells, as well as sequestration in the liver.

Keywords: malaria. *Plasmodium chabaudi*. TAM receptors. efferocytosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dados de incidência de casos de malária no mundo em 2020.	13
Figura 2. Dados estimados de mortalidade de malária no mundo em 2020.	14
Figura 3. Ciclo biológico <i>Plasmodium sp.</i>	17
Figura 4. Respostas imunológicas na infecção por <i>Plasmodium sp.</i>	23
Figura 4. Representação da estrutura dos receptores TAM e seus ligantes. ...	26
Figura 5. Via de sinalização JAK/STAT mediada por receptores TAM em células do sistema imune.	28
Figura 6. A via de sinalização JAK/STAT é induzida durante a infecção por <i>Pc.</i>	39
Figura 7. O receptor Axl é ativado durante a infecção por <i>Pc</i> e regula a via de sinalização JAK/STAT.	42
Figura 8. A expressão do receptor Axl é induzida em populações de células dendríticas (cDCs e MO-DCs) e monócitos durante a infecção por <i>Pc.</i>	43
Figura 9. O perfil de expressão de Axl durante a infecção por <i>Pc</i> é mantido na ausência de Mertk.	44
Figura 10. Na ausência de Axl, os camundongos C57BL/6 apresentam menor parasitemia e lise de iRBCs em relação aos selvagens no pico da infecção por <i>Pc.</i>	45
Figura 11. Axl não interfere na perda de peso corporal e na hipotermia causada pela infecção por <i>Pc</i> em camundongos C57BL/6.	47
Figura 12. Os níveis de citocinas sistêmicas são reduzidos no pico da infecção por <i>Pc</i> na ausência do receptor Axl.	48
Figura 13. O receptor Axl medeia a eferocitose de iRBCs em MOs, MO-DCs e cDCs.	50
Figura 14. A frequência de células CD11b- CD11c+ MHCII+ aumenta na ausência do receptor Axl.	51
Figura 15. A ausência de Axl não tem influência na frequência e número absoluto de células nas populações T CD4+ na infecção por <i>Pc.</i>	53
Figura 16. O receptor Axl não altera a frequência e quantidade total de células B e a produção de IgG total anti- <i>Pc.</i>	54
Figura 17. A ausência de Axl não influencia a frequência, número absoluto e resposta de células NK durante a infecção por <i>Pc.</i>	55
Figura 18. A ausência de Axl não altera a frequência e número total de células T CD8+ durante a infecção por <i>Pc.</i>	56
Figura 19. A ausência de Axl aumenta a atividade de células T CD8+ durante a infecção por <i>Pc.</i>	57
Figura 20. Axl modula a expressão de CD36 e CD300lf no fígado durante a infecção por <i>Pc.</i>	59
Figura 21. Na ausência de Axl, há menor acúmulo de hemozoína no fígado ...	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	amônio-cloreto-potássio (ammonium-chloride-potassium)
APC	célula apresentadora de antígenos (antigen presenting cells)
Ca ²⁺	íon cálcio
CD3	cluster de diferenciação 3
CD4	cluster de diferenciação 4
CD4+	células T auxiliares CD4+
CD8	cluster de diferenciação 8
CD8+	células T citotóxicas CD8+
CD36	cluster de diferenciação CD36
CD44	cluster de diferenciação 44
CD62L	cluster de diferenciação 62 (L-selectina)
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
cDCs	células dendríticas convencionais (conventional dendritic cells)
CSP	proteína circunsporozoíta
CTLs	linfócitos T citotóxicos (cytotoxic T lymphocytes)
DAMPs	padrões moleculares associados ao dano (damage-associated molecular patterns)
DCs	células dendríticas (dendritic cells)
DENV	Dengue vírus
dpi	dias após a infecção
Gas6	fator de parada do crescimento 6 (Growth-arrest specific 6)
GSK	GlaxoSmithKline
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	interferon gama (interferon- γ)
IFN-I	interferon do tipo 1
IL-1 β	interleucina 1- β
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
iNOS	óxido nítrico sintase induzível (inducible nitric oxide synthase)
MAVS	sinalização antiviral mitocondrial (mitochondrial antiviral signalin)
MDA5	proteína associada à diferenciação do melanoma 5 (melanoma differentiation-associated protein 5)
MFI	mediana de intensidade de fluorescência (median fluorescence intensity)
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MIP-2	proteína inflamatória de macrófagos 2 (macrophage inflammatory protein 2)
MOs	monócitos
MO-DCs	células dendríticas derivadas de monócitos (monocyte-derived dendritic cells)
NK	células assassinas naturais (natural killer)
NKT	células T assassinas naturais (natural killer T-cells)

NLRP3	família de receptores semelhantes ao domínio nucleotídeo-binding, Contendo Domínio Pirina 3
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	padrões moleculares associados à patógenos (pathogen-associated molecular patterns)
Pc	<i>Plasmodium chabaudi</i>
PfEMP1	proteína de membrana do eritrócito de Plasmodium falciparum 1
PRRs	receptores de reconhecimento padrão (pattern recognition receptors)
PV	vacúolo parasitóforo (parasitophore vacuole)
PtdSer	fosfatidilserina (phosphatidylserine)
RTKs	receptores tirosina-quinase
RBC	hemácias (red blood cells)
RIG-1	gene induzível pelo ácido retinóico I
SARS-CoV2	coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda severa
SDRA	síndrome do desconforto respiratório agudo
SOCS1	supressor de sinalização de citocinas 1
SOCS3	supressor de sinalização de citocinas 3
STING	estimulador de genes de interferon (stimulator of interferon genes)
TAM	Tyro3, Axl e Mertk
Th1	célula T auxiliar 1 (T-helper 1)
TLR9	receptor do tipo Toll 9 (toll-like receptor 9)
TNF	fator de necrose tumoral (necrosis tumoral factor)
VCAM-1	molécula de adesão vascular 1
VLP	partículas similares à vírus (virus-like particles)
WRAIR	Walter Reed Army Institute of Research

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 MALÁRIA: CICLO BIOLÓGICO E SAÚDE PÚBLICA	13
1.2 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS E PATOGÊNESE DA MALÁRIA	19
1.3 MALÁRIA E MODELOS MURINOS	23
1.4 RECEPTORES TAM: IMUNOMODULAÇÃO E EFEROCITOSE	25
1.5 RECEPTOR AXL EM INFECÇÕES PARASITÁRIAS	28
2. JUSTIFICATIVA GERAL	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. METODOLOGIA	31
4.1 ANIMAIS, PARASITOS E INFECÇÃO	31
4.2 PARASITEMIA E ANÁLISE DE PARÂMETROS CLÍNICOS	32
4.3 RNA-SEQ E ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA	32
4.4 RT-PCR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	33
4.5 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE HEMOZOÍNA NO FÍGADO	34
4.6 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	34
4.7 ENSAIO DE EFEROCITOSE	36
4.8 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO PLASMA	37
4.9 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HEMOZOÍNA NO PLASMA	37
4.10 QUANTIFICAÇÃO DE AXL E MERTK SOLÚVEIS NO PLASMA POR ELISA	37
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE IGG TOTAL ANTI-PLASMODIUM CHABAUDI NO PLASMA POR ELISA	37
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS	39
5.1 A VIA DE SINALIZAÇÃO JAK/STAT MEDIADA POR AXL É INDUZIDA DURANTE A INFECÇÃO POR <i>Pc</i> NO BAÇO E NO FÍGADO	39
5.2 A EXPRESSÃO DO RECEPTOR AXL É INDUZIDA NAS PRINCIPAIS POPULAÇÕES DE CÉLULAS MIELOIDES FAGOCÍTICAS DURANTE A INFECÇÃO POR <i>Pc</i>	43
5.3 A SINALIZAÇÃO MEDIADA A PARTIR DO RECEPTOR AXL CONTRIBUI PARA O ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO POR <i>Pc</i> NAS RBCS	45
5.4 O RECEPTOR AXL MEDEIA A EFEROCITOSE DE IRBCS POR MOs, cDCs e MO-DCs	49
5.5 A AUSÊNCIA DE AXL LEVA À UM AUMENTO NA FREQUÊNCIA DE cDCs ESPLÊNICAS	51
5.6 A AUSÊNCIA DE AXL APRIMORA A ATIVIDADE DE CÉLULAS TCD8 ⁺ DURANTE A INFECÇÃO POR <i>Pc</i>	52
5.7 O RECEPTOR AXL CONTRIBUI PARA A ADESÃO E A FAGOCITOSE DE IRBCS NO FÍGADO	57
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA: CICLO BIOLÓGICO E SAÚDE PÚBLICA

A malária é uma doença infecciosa de grande significância no cenário socioeconômico global. Em termos de saúde pública, destaca-se como uma das principais ameaças à população, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Cerca de 250 milhões de casos e 600.000 mortes são reportados anualmente (**Figura 1 e 2**) (OMS, 2022). Os casos que evoluem para malária grave ocorrem em maior incidência em crianças e mulheres grávidas. Adicionalmente, dados epidemiológicos demonstram que a região do continente africano é mais vulnerável a malária, sendo responsável por 90% dos casos de óbito (OMS, 2022). De grande relevância também no Brasil, a malária é endêmica na região amazônica. Estados como Acre, Amazonas, Amapá, Mato Grosso, Maranhão, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins são considerados de grande risco e possuem quase totalidade de casos autóctones. Em 2021, foram notificados cerca de 139.000 casos no país e 60 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

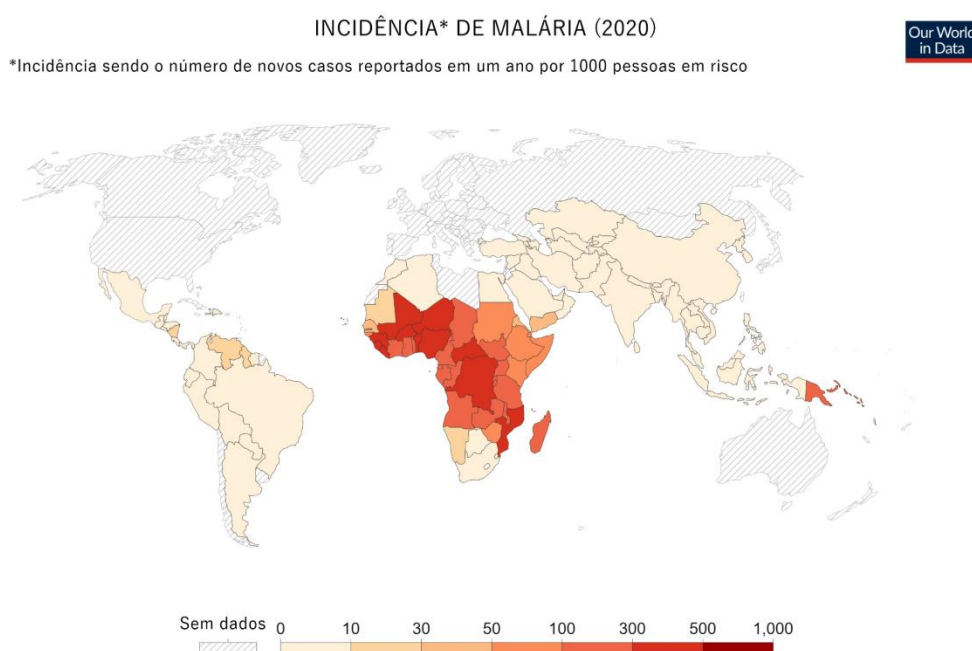


Figura 1. Dados de incidência de casos de malária (*P. falciparum*) no mundo em 2020. Representação gráfica de distribuição por país. O valor numérico está relacionado de acordo com o indicado pela escala de cores (0 - 1000) sendo a quantidade de casos reportadas a cada 1000 pessoas em áreas de região de risco. Adaptado de Our World In Data (2022) - Dados da OMS 2021.

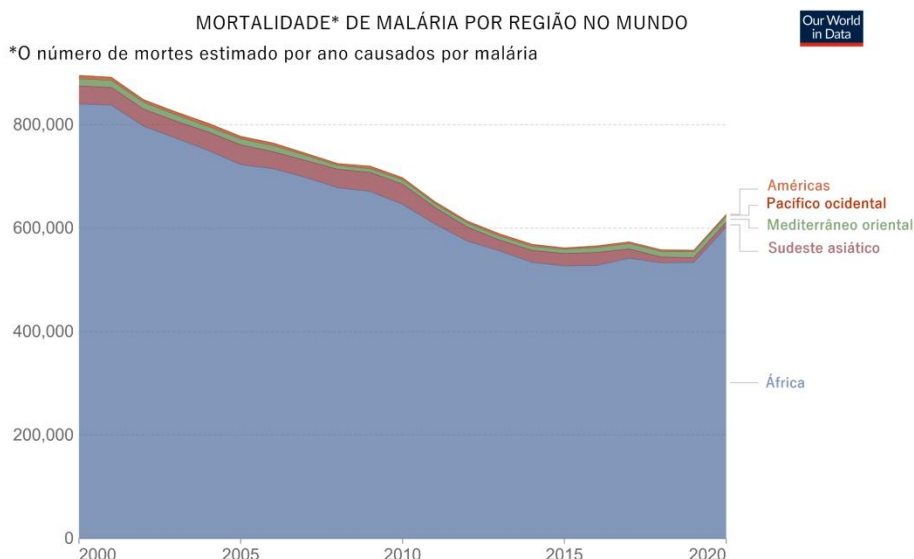


Figura 2. Dados estimados de mortalidade de malária (*P. falciparum*) no mundo em 2020.

Representação gráfica de distribuição por região do mundo (África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental, Sudeste Asiático). No eixo Y estão os valores de mortes e no eixo X estão os anos (2000 a 2020). O valor numérico está relacionado de acordo com a estimativa de mortes por ano causadas por malária em determinada região do mundo indicada, caracterizada por diferentes cores. Adaptado de Our World In Data (2022) - Dados da OMS 2021.

O estabelecimento da doença se dá por meio da infecção pelo protozoário gênero *Plasmodium* sp. do filo Apicomplexa em humanos - considerados hospedeiros intermediários - transmitido por fêmeas do mosquito vetor do gênero *Anopheles* sp, sendo estas hospedeiras definitivas (SATO, 2021). O agente etiológico *Plasmodium* sp. é representado por principalmente cinco espécies infectivas para humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (GETHING et al, 2016; SATO, 2021).

P. falciparum possui a maior contribuição nos dados de incidência e mortalidade, principalmente na África (GETHING et al, 2016; SATO, 2021). A distribuição geográfica heterogênea pode ser atribuída à alguns fatores como 1) características genéticas dos hospedeiros - como a ausência do antígeno Duffy na superfície das hemácias (RBCs do inglês “red blood cells”) em grande parte de indivíduos africanos e este por sua vez, auxilia na entrada de *P. vivax* nas células (PHILLIPS et al, 2017; MILLER et al, 1976), ainda que já reportados transmissão de casos independentes desta proteína (PUIJALON; MÉNARD, 2010); e 2) características biológicas do parasito - por exemplo, *P. falciparum* é mais sensível à

mudanças de temperatura, sendo *P. vivax* capaz de se manter em condições desfavoráveis devido à formas dormentes (hipnozoítos) que se mantêm por meses e até anos no fígado do hospedeiro (PHILLIPS et al, 2017; MIKOLAJCZAK et al, 2015). Casos de malária causados por *P. ovale* e *P. knowlesi* são reportados com números menos expressivos, principalmente no oeste da África e Ásia, respectivamente. No Brasil, a maioria dos casos autóctones reportados são causados por *P. vivax* e em 2021, estimou-se que 17% destes atribuídos à *P. falciparum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Ainda, o país já registrou casos autóctones e importados das espécies *P. malariae*, *P. ovale* e *P. simium* (OLIVEIRA-FERREIRA et al, 2010; LIMONGI et al, 2014; BRASIL et al, 2017; GRIGG; SNOUNOU, 2017).

O ciclo de vida do parasito dentro do hospedeiro e o desenvolvimento da doença são divididos em duas fases (**Figura 3**) (PHILLIPS et al., 2017; TALAPKO et al., 2019). A fase pré-eritrocítica é caracterizada no primeiro momento da infecção. Inicialmente, os mosquitos infectados - com exclusividade de fêmeas pelo comportamento hematofágico - injetam a forma do protozoário denominada de esporozoíto na pele de um hospedeiro vertebrado, pela saliva, contendo anticoagulante, durante o repasto sanguíneo. Em seguida, estes esporozoítos migram e infectam as células do fígado após o intervalo de 30 - 60 minutos (PHILLIPS et al., 2017). A invasão aos hepatócitos ocorre por meio de interações específicas mediante proteínas do parasito - como a proteína circunsporozoíta (CSP) - e do hospedeiro presente nas células. Eles passam por várias replicações - esquizogonia exo-eritrocítica - dentro dos hepatócitos, resultando em formas designadas de merozoítos (TUTEJA, 2007). Estes, por sua vez, são liberados na corrente sanguínea e são capazes de infectar as hemácias (RBCs, do inglês, *red blood cells*) - entrando na fase eritrocítica. A invasão às RBCs também ocorre por meio de interações específicas entre proteínas da superfície do parasito - por exemplo, a proteína 1 da membrana de eritrócitos de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1, do inglês, *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) e receptores na membrana das células - como o CD36 (do inglês, *cluster of differentiation 36*) (BACHMANN et al, 2022; PHILLIPS et al, 2017). Diferentes espécies de *Plasmodium* sp. podem invadir e se replicar em RBCs em estágios distintos - sejam RBCs maduras ou reticulócitos - e essa interação entre as proteínas de superfície e os receptores participa desta escolha na infecção (SRIVASTAVA et al, 2015; MC QUEEN; MCKENZIE, 2004).

Dentro das RBCs, as formas merozoítos de *Plasmodium* spp. passam por um ciclo de replicações assexuadas - esquizogonia eritrocítica (TUTEJA et al, 2007). O parasito modula a maquinaria celular para adquirir nutrientes necessários para seu desenvolvimento devido à sua natureza auxotrófica. A obtenção de aminoácidos essenciais é feita principalmente pela degradação da hemoglobina - proteína encontrada nas RBCs responsável pelo transporte de oxigênio. Neste processo, há a liberação do grupo heme livre - que é potencialmente tóxico ao parasito e por isto, ela é polimerizada em um cristal insolúvel denominado hemozoína (JANI et al, 2008; GAZZINELLI et al, 2014). Então, acontecem rapidamente as replicações, que culmina na lise dessas células, liberando mais merozoítos capazes de infectar outras RBCs. Uma menor fração dos merozoítos é comprometida - envolvendo genes como o fator de transcrição AP2-G - e se diferencia em gametócitos. Estes, por sua vez, se concentram nos capilares da pele e são transmitidos a um outro mosquito durante seu repasto sanguíneo. Assim, no intestino do vetor, os gametócitos (femininos e masculinos) amadurecem e há a formação do zigoto diploide - que se torna um oocisto (ANNAN et al, 2007). Esta última forma é móvel e se transporta do lúmen intestinal pelo epitélio - passando por novos ciclos de replicação e se desenvolvendo em esporozoítos que migram para as glândulas salivares. Assim, podendo serem novamente transmitidos a outros hospedeiros humanos, reiniciando o ciclo de infecção (DIMOPOULOS et al, 2002; TUTEJA et al, 2007).

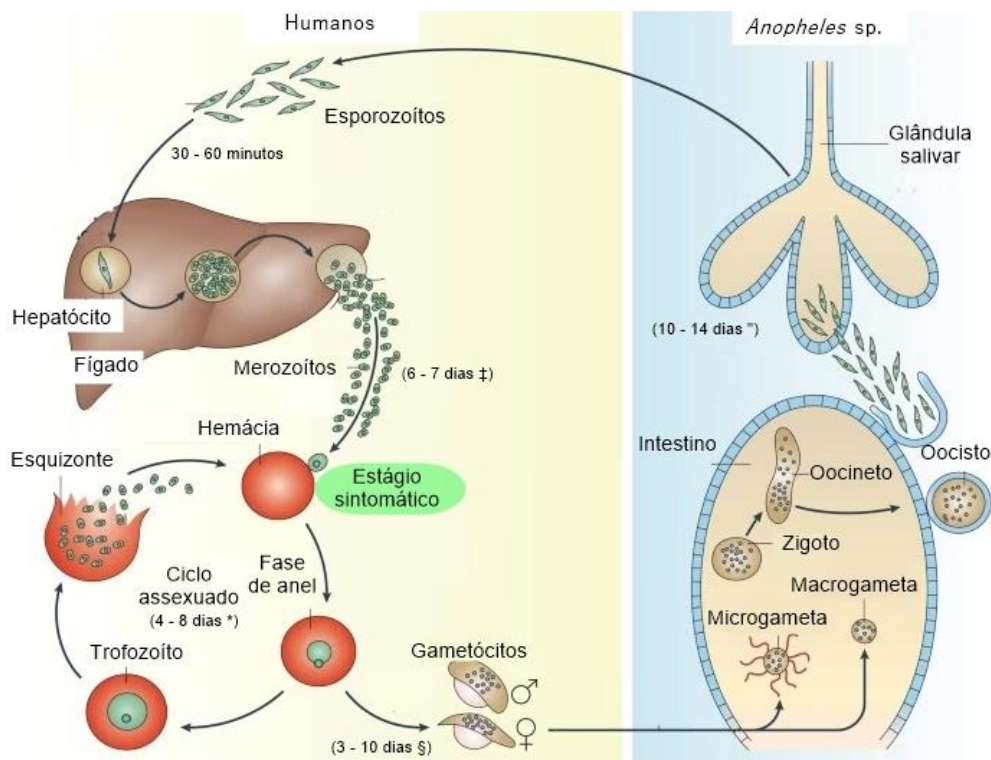


Figura 3. Ciclo biológico *Plasmodium* sp. O mosquito vetor do gênero *Anopheles* sp. transmite as formas de *Plasmodium* sp. de esporozoítos para a pele do humano hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Após 30-60 minutos, os esporozoítos migram o fígado e infectam hepatócitos. Após várias replicações, se distinguem em formas de merozoítos (‡ podem se diferenciar em hipnozoítos e demorar meses e anos para atingir o sangue) e são liberados na corrente sanguínea. Ali infectam hemácias e inicial o ciclo assexuado de reprodução (* corresponde ao surgimento dos sintomas clínicos). Adaptado de Phillips et al (2017).

Os sintomas clínicos envolvem principalmente febre alta, calafrios e dores de cabeça e muscular. De forma geral, a febre e os calafrios são sincronizados com os ciclos de infecção e ruptura das RBCs. O desenvolvimento da doença é dependente do parasito, da genética do hospedeiro, exposição à infecção e fatores socioeconômicos (GAZZINELLI et al, 2014; MILLER et al, 2013). A malária severa é caracterizada quando há evolução da doença - com complicações clínicas envolvendo acidose metabólica, anemia, comprometimento neurológico e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), por exemplo (GAZZINELLI et al, 2014; CDC, 2022; WHITE, 2022).

Tendo como alvo o parasito e a prevenção do estabelecimento da infecção, as estratégias combativas à doença se baseiam no âmbito terapêutico - com a utilização de medicamentos para o tratamento - e de imunização - com o desenvolvimento de

vacinas. Ainda que haja diretrizes de tratamento com drogas aprovadas específicas e dados sobre eficácia no controle do vetor, a OMS ressalta que há uma urgência nas estratégias combativas à doença. Mesmo depois de tantos anos sendo descrita e envolvendo pesquisas na área, apenas uma vacina foi aprovada para uso humano até o presente momento - a RTS,S/AS01 (RTS,S) (ou Mosquitrix) (OMS, 2022). Esse imunizante começou a ser desenvolvido em 1987 por uma colaboração entre a farmacêutica GlaxoSmithKline (GSK) e o instituto de pesquisa Walter Reed Army (WRAIR). Ele se baseia em uma *virus-like particle* (VLP) contendo epítomos imunodominantes de células B e T provenientes da proteína CSP de *P. falciparum* NF54. A vacina avançou para as fases finais de teste clínico a partir de 2009 e recebeu aprovação pela OMS em 2021 com eficácia de cerca de 30 - 40% em crianças (LAURENS, 2019; NADEEM et al, 2022; OMS, 2022).

Um outro aspecto a ser estudado e considerado neste contexto, é o controle do vetor da transmissão. Existem cerca de 40 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* sp. capazes de transmitir *Plasmodium* sp. para humano (NICOLETTI, 2020). No Brasil, há o destaque na transmissão pela espécie *A. darlingi* mas também apresenta outras descritas com importância epidemiológica como *A. albicansis*, *A. nuneztovari*, *A. triannulatus* e *A. braziliensis* (ALMEIDA, 2022; BAIA-DA-SILVA, 2019, OLIVEIRA-FERREIRA, 2010). Da mesma forma, as espécies vetores são abundantes e amplamente distribuídas ao redor do mundo - o que justifica a sua epidemiologia. No entanto, alguns fatores são limitantes para a transmissão e desenvolvimento do ciclo biológico do parasito, como a capacidade de transmissão de cada espécie e temperaturas adequadas (PHILLIPS et al, 2017; BAIA-DA-SILVA, 2019). O controle do vetor - assim como o desenvolvimento de drogas terapêuticas e de prevenção à infecção por *Plasmodium* sp - é um dos esforços somados das organizações de saúde pública para o controle da malária (CDC, 2022, OMS, 2022). Atualmente, as formas mais eficazes (BHATT et al, 2015) foram o uso de redes de proteção tratadas com inseticidas (e. g. piretróides) e pulverizações residuais intra-domiciliares (PRYCE et al, 2018; ZHOU et al, 2022). Ainda que abaixo dos objetivos esperados, essas intervenções já se mostraram eficazes no controle da doença, principalmente no continente africano (BHATT et al, 2015).

Com os números atuais de persistência expressiva de incidência e mortalidade - tendo impacto intrínseco de caráter socioeconômico e mais especificamente na saúde pública, ressalta-se a necessidade de vigilância, pesquisa e cooperação internacional para prevenção e controle da malária.

1.2 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS E PATOGÊNESE DA MALÁRIA

As respostas imunológicas à infecção ao *Plasmodium* sp. se iniciam logo após a entrada do parasito na derme. Muitos esporozoítos são eliminados por células fagocíticas residentes e/ou podem ser carregados até os linfonodos drenantes por vasos linfáticos para apresentação de antígenos. Estudos em modelos murinos com formas de esporozoítos adaptados mostraram que apenas uma parcela atinge a corrente sanguínea e o fígado (AMINO et al, 2006; MAC-DANIEL et al, 2014). Os locais de repasto sanguíneo são caracterizados por extravasamento de fluído e rápida infiltração de neutrófilos - relacionados à indução da degranulação de mastócitos presentes na pele, com a liberação de mediadores como histamina, triptase, TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*) e MIP-2 (do inglês, *macrophage inflammatory protein 2*). Em seguida, monócitos inflamatórios também são recrutados para o local. Ambos, neutrófilos e monócitos, são identificados na fagocitose dos esporozoítos neste local de entrada (DEMEURE et al, 2005).

Os esporozoítos que conseguem escapar da fagocitose, atravessam as células do hospedeiro e chegam a vasos sanguíneos e linfáticos e migram para o fígado - possuindo um tropismo exclusivo por hepatócitos (AMINO et al, 2006; GOSWANI et al, 2022). Dentro das células, há o estabelecimento de um vacúolo parasitóforo (PV, do inglês, *parasitophorous vacuole*) que auxilia na sobrevivência do parasito em relação à fagossomos (LIEHL et al, 2014). No PV, há esquizogonia exo-eritrocítica, e o parasito se diferencia em formas de merozoítos. Os hepatócitos possuem papel importante nas respostas imunológicas neste estágio, pois reconhecem o parasito por meio do reconhecimento de estruturas características identificáveis denominadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) por receptores especializados (PRRs, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) (LIEHL et al, 2013; LIEHL et al, 2014; GAZZINELLI et al, 2014). O RNA do *Plasmodium* sp. é reconhecido por receptores MDA5 (do inglês,

melanoma differentiation-associated protein 5) e leva à indução de interferon do tipo I (IFN-I, do inglês, *interferon type I*), que promove o recrutamento de células como células T *natural killer* (NKT, do inglês *natural killer T cells*) que contribui para a secreção de interferon-gama (IFN- γ , do inglês *interferon- γ*) (LIEHL et al, 2013; GAZZINELLI et al, 2014). Tanto IFN- γ quanto IFN-1 auxiliam no controle da replicação dos parasitos no fígado - visto que aprimoram a atividade fagocítica de células residentes (e. g. estimulando a síntese de intermediários reativos de nitrogênio) (BLANCHETTE et al, 2003; MILLER et al, 2014).

Após intensa replicação, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e então infectam as RBCs (iRBCs, do inglês, *infected red blood cells*). Dentro destas, ocorre a esquizogonia eritrocítica também em PVs, que culmina na lise destas células e que, por sua vez, liberam novos PAMPs (FUJIOKA; AIKAWA, 2002). As iRBCs ou o seu conteúdo intracelular liberado pela lise são fagocitadas por células como macrófagos e células dendríticas (DCs). Apesar das RBCs não expressarem moléculas de MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*), há o reconhecimento destas células quando infectadas como alvo de destruição. A superfície das iRBCs contém muitos antígenos na superfície que são codificados pelo parasito como PfEMP1 (PASTERNAK, DZIKOWSKI, 2009) e estas por sua vez, podem ser fagocitadas e os antígenos processados e apresentados pelas células fagocíticas via MHC (LUNDIE, 2011).

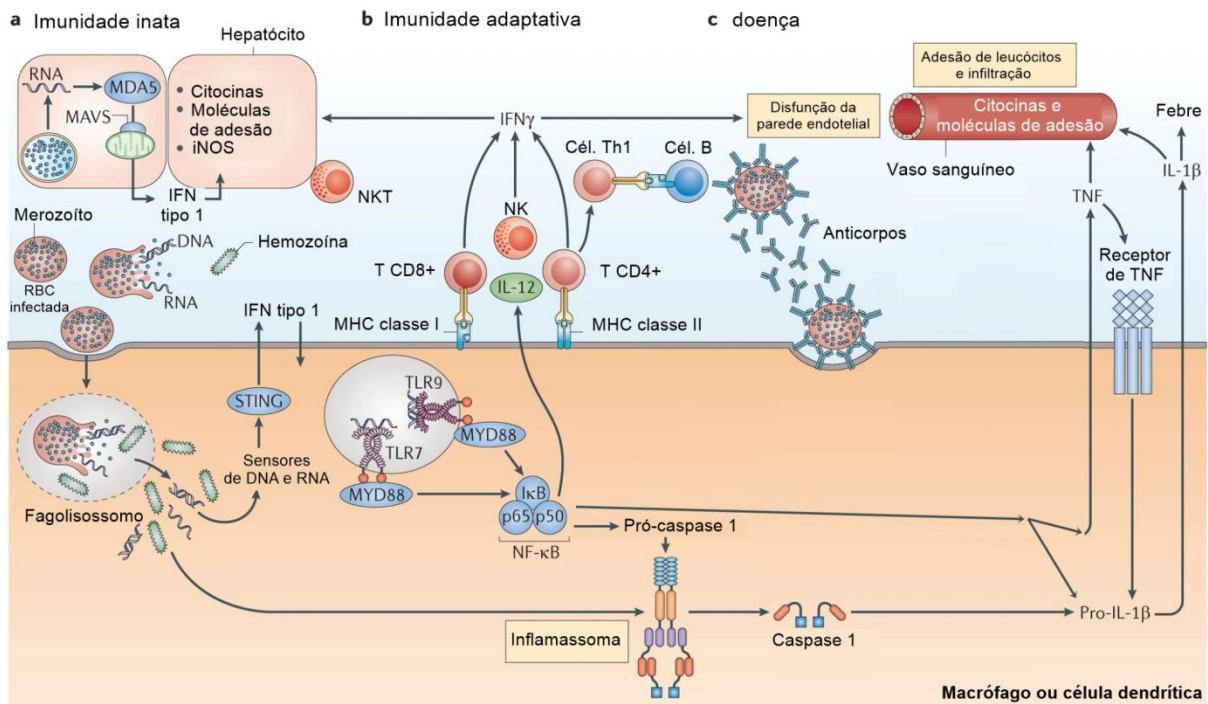
As iRBCs também aumenta, a expressão de fosfatidilserina (PtdSer, do inglês, *phosphatidylserine*) na porção externa da membrana plasmática, o que auxilia na remoção destas por intermédio de receptores específicos para estas moléculas presentes em fagócitos (SCHWARTZ et al, 1987; TOTINO et al, 2016). A lise das iRBCs culmina na liberação de PAMPs e também DAMPs (padrões moleculares associados ao dano, do inglês, *damage associated molecular patterns*) como hemozoína e glicosilfosfatidilinositol (GPI, do inglês, *glycosylphosphatidyinositol*) que são reconhecidos por PRRs. Na infecção por *Plasmodium* sp. os cristais de hemozoína são reconhecidos por PRRs do tipo TLR9 (do inglês, *Toll-like receptors 9*) e culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*) que induz genes inflamatórios - como a produção de citocinas como TNF, por exemplo. Também, podem ser reconhecidos por receptores NLRP3 (do inglês,

Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3) - induzindo o recrutamento de um complexo proteico oligomérico denominado inflamassoma. Quando NLRP3 é ativado, recruta a molécula adaptadora ASC e a protease pro-caspase-1 e a formação deste complexo culmina na clivagem da protease, sendo essa responsável por clivar uma forma precursora (pro-IL-1 β) da citocina interleucina 1- β (IL-1 β , do inglês *interleukin 1 β*), tornando-a ativa e levando à sua exportação. Portanto - tanto a fagocitose das iRBCs quanto de PAMPs e DAMPs liberados pela sua lise - são essenciais nas respostas imunes da fase eritrocítica. Esta fase é caracterizada pelo início dos sintomas - sendo estes associados aos principais eventos imunológicos deste estágio - majoritariamente relacionados à inflamação sistêmica causada pela grande quantidade de citocinas inflamatórias produzidas (e.g. TNF e IL-1 β). Especificamente, ambas citocinas são pirogênicas, e visto que a lise e a fagocitose das iRBCs leva à sua produção, esse processo é sincronizado com picos de elevação de temperatura corporal. Sendo a febre alta e calafrios cíclicos, os sintomas mais característicos da malária - denominados de paroxismos (RICHARDS et al, 1997; SHIO et al, 2009; GAZZINELLI et al, 2014; PERLMANN; TROYE-BLOMBERG, 2002; TUTEJA et al, 2017).

O processo de fagocitose descrito anteriormente ocorre principalmente no baço. Entretanto, o processamento de iRBCs pela fagocitose não é suficiente para explicar a eliminação do parasito, sendo necessário outros componentes para potencializar a resposta imunológica. A fagocitose por células da imunidade inata faz a comunicação com componentes da imunidade adaptativa. A apresentação de antígenos via MHC I e II para células T CD8⁺ e TCD4⁺, respectivamente (LUNDIE, 2011; GOSH; STUMHOFER, 2021). Genes inflamatórios induzidos por NF- κ B incluem a síntese de interleucina 12 (IL-12, do inglês *interleukin 12*) que estimula, por exemplo, células NK (do inglês, *natural killer*) a produzirem IFN- γ . Esta citocina auxilia na ativação e polarização de células T CD4⁺ em Th1 (do inglês, *T helper 1*). Esse subgrupo de células efetoras é eficiente em mecanismos de defesa contra infecções intracelulares (ABBAS et al, 2019). Respostas humorais T-dependentes são desenvolvidas por intermédio desta população, levando à ativação de células B produtoras de anticorpos específicos - que são importantes para o controle da infecção na fase eritrocítica. Essas células são responsáveis pelo desenvolvimento de proteção contra infecções subsequentes - visto que, além da manutenção de

populações de células T CD4+ efectoras de memória, também leva a ativação de células B de memória. As células T CD8+ também possuem contribuição, se diferenciando em CTLs (do inglês, *cytotoxic T lymphocytes*) e secretam IFN- γ e possuem atividade citotóxica em iRBCs por meio de seus grânulos intracelulares como granzima B e perforina (LUNDIE, 2011; GOSH; STUMHOFER, 2021; CHANDELE et al, 2010; IMAI et al, 2010; IMAI et al, 2015).

PAMPs e DAMPs junto com a produção de TNF e IL-1 β levam a um aumento na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais - sendo um processo central na patogênese durante a infecção por *Plasmodium* sp. (XIA et al, 1998; KIHARA et al, 2021; GAZZINELLI et al, 2014). Essas moléculas de adesão como CD36 (do inglês, *cluster of differentiation 36*), ICAM-1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*) e VCAM-1 (do inglês, *vascular adhesion molecule 1*) possuem afinidade com proteínas de superfície expressas em células infectadas - como PfEMP1 - e essa interação leva à um sequestro das mesmas ao endotélio (MOTA et al, 2000; ROWE et al, 2009). Diferentes órgãos e tecidos possuem aumento na expressão destas moléculas - como o endotélio vascular, cérebro, placenta e fígado - e por isto o acúmulo de parasitos podem ser identificados nesses locais (BRUGAT et al, 2013). Isto pode levar à disfunção nesses órgãos e nos vasos sanguíneos, devido à inflamação local e obstrução, respectivamente (BRUGAT et al, 2013; GAZZINELLI et al, 2014). Neste último caso, essa adesão é considerada também como um mecanismo de escape do patógeno visto que impede que as iRBCs sejam carregadas para o baço - onde seriam reconhecidas e eliminadas pelo sistema imunológico. A obstrução e inflamação local pode vir a se tornar sistêmica e contribui para os eventos fisiopatológicos observados - como a acidose metabólica e SRDA (ROWE et al, 2009; MILNER, 2017).



Nature Reviews | Immunology

Figura 4. Respostas imunológicas na infecção por *Plasmodium* sp. Os esporozoítos migram para os hepatócitos onde se replicam e se desenvolvem em merozoítos. O RNA desta forma é reconhecido por PRRs presentes nos hepatócitos como MDA5. Esse reconhecimento leva à indução de IFN-I que auxilia no controle dos parasitos no fígado com a produção de citocinas (e. g IFN-γ e o aprimoramento de fagócitos (e. g. produção de iNOS) por NKT. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, infectam RBCs e lisam estas células por suas replicações sucessivas. Assim, macrófagos e DCs fagocitam tanto as iRBCs quanto os PAMPs (e. g. hemozoína e ácidos nucleicos) liberados. Estes PAMPs são reconhecidos por PRRs como TLRs e ativam inflamassomas que ativam a sinalização via NF-κB. Assim, há a indução de IL-12 que induz células T CD4+, CD8+ e NK a produzirem IFN-γ (auxilia na diferenciação de células Th1 que por sua vez auxiliam células B a produzirem anticorpos específicos) e produção de IL-1β e TNF. Estas últimas são citocinas pirogênicas - levam à febre - e aumenta a expressão de moléculas de adesão, levando ao sequestro de parasitos nos vasos, podendo levar à disfunção da parede endotelial. MAVS: proteína de Sinalização Antiviral Mitocondrial (do inglês, *mitochondrial antiviral-signaling protein*). iNOS: óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*). STING: estimulador de genes de interferon (do inglês, *stimulator of interferon genes*). Adaptado de Gazzinelli et al (2014).

1.3 MALÁRIA E MODELOS MURINOS

Para o estudo da biologia da infecção por *Plasmodium* sp. e seus mecanismos, a utilização de espécies infectivas de modelos murinos é bastante estabelecida. *P. chabaudi*, *P. yoelli*, *P. bergheii* e *P. vinckei* são alguns exemplos amplamente empregados em pesquisa voltada para os aspectos imunológicos. Há uma sólida conservação evolutiva neste contexto, o que permite que seja possível aplicar esses

mesmos estudos aos hospedeiros humanos, ainda que existam algumas diferenças (TAYLOR-ROBINSON, 1995; RAMAPRASAD et al, 2021; OLATUNDE et al, 2022).

Uma das espécies mais utilizadas é a cepa *P. chabaudi* (AS) (*Pc*), que desencadeia eventos imunobiológicos similares como a indução de moléculas de adesão no endotélio e alta produção de citocinas inflamatórias como TNF (STEPHENS et al, 2012) - sendo não letal à camundongos como C57BL/6. Assim, no estudo atual, *Pc* foi escolhido como modelo de estudo para a caracterização da arquitetura e orquestra das respostas imunológicas descritas. *Pc* se desenvolve como uma infecção não letal em camundongos C57BL/6, atingindo o pico da parasitemia no 8º dia após a infecção (dpi, do inglês, *days post infection*). A concentração de iRBCs identificadas no sangue periférico a partir deste momento começa a decair, onde a infecção é totalmente desenvolvida próximo ao 20 dpi (STEPHENS et al, 2012; OLATUNDE et al, 2022; HIRAKO et al, 2022). Os animais desenvolvem sintomas clínicos característicos como alteração na temperatura corporal - no entanto, se configura como hipotermia ao invés de febre em humanos - e perda de peso corporal que são bastante expressivas no intervalo entre 6 e 10 dias após a administração dos parasitas nos camundongos (STEPHENS et al, 2012). Em um contexto de reinfecção por *Pc* nestes modelos, é observada uma resistência dos camundongos, com diminuição da parasitemia no sangue, resultante de uma resposta imune protetora gerada após a primeira infecção (CHESSMAN et al, 2006; JARRA; BROWN, 1985; STEPHENS, 2012).

A grande quantidade de TNF e interleucina 6 (IL-6, do inglês, *interleukin 6*) no sangue periférico destes animais também é observado, assim como em infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*. Neste modelo, há indução de moléculas de adesão, mas o sequestro se dá primordialmente no fígado (BRUGAT et al, 2013; STEPHENS et al, 2012; MOTA et al, 2000). Outra característica, é a estabelecida demonstração de que a infecção pode acontecer em diferentes estágios de desenvolvimento das RBCs - sem um tropismo muito específico por um determinado estágio como *P. yoelli* para reticulócitos (LEONG et al, 2022).

Em suma, os estudos utilizando *Plasmodium sp.* em modelos murinos permitem uma análise minuciosa das interações entre o parasita e o sistema

imunológico do hospedeiro, oferecendo *insights* valiosos sobre os mecanismos de resposta imune e a patogênese da malária.

1.4 RECEPTORES TAM: IMUNOMODULAÇÃO E EFEROCITOSE

Como descrito, a patogênese da malária está intimamente relacionada com suas respostas imunes inatas e adaptativas. A modulação destas respostas é dependente de uma gama de processos biológicos distintos mediados por diferentes receptores celulares e moléculas de sinalização ativadas durante a infecção. Os receptores TAM (representado por Tyro3, Axl e Mertk) são receptores tirosina quinase (RTKs, do inglês, *receptor tyrosine kinases*) que desempenham um papel importante na inflamação e na homeostase (LEMKE, 2013; LEMKE; ROTHLIN, 2008). As funções mais estudadas dos receptores TAM estão relacionadas à mediação da fagocitose homeostática/inflamatória de células apoptóticas - conhecida como eferocitose - e à regulação das respostas imunes inatas por indução de cascatas como a JAK/STAT (do inglês, *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*). Os três receptores compartilham semelhanças em termos de estrutura e vias de sinalização. Eles são compostos por uma porção extracelular com dois domínios semelhantes a imunoglobulinas e dois domínios do tipo III de fibronectina, e um domínio quinase citoplasmático conservado, bem caracterizado em RTKs (LEMKE, 2013; LEMKE; ROTHLIN, 2008; ZAGORSKA et al., 2014) (**Figura 4**).

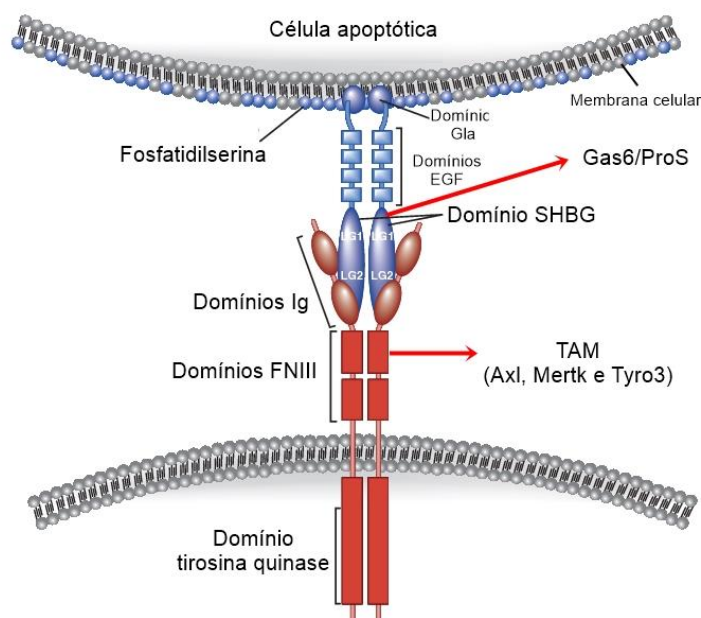


Figura 4. Representação da estrutura dos receptores TAM e seus ligantes. Os receptores TAM (em vermelho) são compostos por domínios intracelulares tirosina quinase e dois domínios FNIII e imunoglobulina extracelulares. Nestes últimos, ocorre a ligação com suas moléculas adaptadoras (em azul) Gas6 ou ProS é mediada pelo domínio SHBG. Gas6/ProS interagem com moléculas de PtdSer na membrana de células apoptóticas pelos domínios Gla. Adaptado de Lemke (2013).

Estes receptores são ativados por meio da interação com moléculas de PtdSer - que são expressas na superfície externa de células em processo de apoptose (LEMKE, 2013). Essa interação leva à fagocitose destas células, evitando que entrem em processo de necrose secundária e levando a um processo inflamatório pela liberação do seu conteúdo intracelular (e. g DAMPs) (RAZI et al, 2023; LEMKE, 2013). Esta interação é mediada por moléculas adaptadoras - Gas6 (do inglês, *Growth-arrest specific 6*) e ProS (do inglês, *Protein S*). que se ligam aos domínios Ig dos receptores TAM e à PtdSer pelo domínio Gla por uma ligação dependente de Ca^{2+} (LEW et al, 2014; VAN DER MEER et al, 2014). Ambas são proteínas dependentes de vitamina K sendo produzida por uma variedade de células em diferentes localizações como no fígado (apenas ProS) e coração, pulmão e rins (VAN DER MEER et al, 2014) - também estando presente em grande concentração na circulação sanguínea por participarem de cascatas de sinalização de coagulação (VAN DER MEER et al, 2014; PILLI et al, 2018; LAW et al, 2018). A afinidade destas moléculas com cada receptor TAM é variável. Gas6 é capaz de se ligar aos três receptores, com maior afinidade com Axl e ProS possui ligação apenas com Mertk e Tyro3 (BROWN et al, 2016; AXELROD et al, 2014).

A ativação desses receptores - por meio de sua interação com PtdSer e seus ligantes intermediários - leva à uma clivagem de seus domínios extracelulares por meio de enzimas como ADAM-17 e 10 (do inglês, a *disintegrin and metalloprotease 17 e 10*, respectivamente), liberando formas solúveis (sAxl e sMertk). Estas formas possuem grande afinidade pelos ligantes Gas6 e ProS, impedindo assim, que estes interajam com as formas transmembrânicas. Por meio deste mecanismo, é identificado uma forma de auto-regulação da ativação, como uma espécie de retroalimentação negativa (PAOLINO; PENNINGER, 2016; RANTA; KUMAR, 2020; LEW et al, 2014).

Nos macrófagos e células dendríticas, Axl e Mertk são os receptores mais relevantes na mediação da eferocitose e na modulação das respostas imunes por

meio da sinalização JAK/STAT (ROTHLIN et al., 2007) (**Figura 5**). Nessas células, os receptores TAM estão mecanisticamente e funcionalmente ligados ao receptor de interferon- α/β (IFNAR) e a sinalização JAK/STAT é dominante, inibindo a via PI3K/AKT (FUJIMORI et al., 2015; LEMKE, 2013). Esse mecanismo de sinalização é uma cascata pleiotrópica que ativa uma ampla gama de processos biológicos, como proliferação celular, diferenciação, apoptose e respostas inflamatórias (RAWLING et al., 2004). A ativação do complexo TAM-IFNAR leva à fosforilação da região citoplasmática e ativação de STAT1 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 1*). Essa molécula é um fator de transcrição e se desloca para o núcleo, promovendo a expressão de SOCS1 e SOCS3 (do inglês, *suppressor of cytokine signaling 1 e 3*, respectivamente) - ambas são proteínas inibitórias de citocinas. Essa sinalização modula as respostas imunes, inibindo, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias e vias de sinalização do TLR (ROTHLIN et al, 2007).

Além das células imunes mielóides, a expressão dos receptores TAM é descrita em diversos outros tecidos como células endoteliais vasculares, e células de Sertoli (LEMKE, 2013; LEW et al., 2014). Apesar de sua similaridade estrutural e funcional, eles podem ter mais ou menos relevância e estar presentes ou ausentes dependendo do tipo de célula/tecido em situações de saúde e doença (AXELROD; PIENTA, 2014). Além disso, a sinalização da via pode variar, levando a diferenças nos resultados biológicos. Estes receptores - ainda que co-expressos em muitos tipos celulares - são ativados de forma diferencial. Zagorska e colaboradores (2014) e descreveram que a expressão de Mertk é regulada positivamente com agentes imunossupressores e anti-inflamatórios e Axl, por sua vez, com agentes pró-inflamatórios. Ligantes de TLR3, TLR4, RIG-1 e as citocinas TNF e IFN-I levaram a um aumento na expressão deste receptor. Assim, conclui-se que ambos receptores são ativados em contextos distintos - sendo Axl mediando a sinalização e a eferocitose durante a inflamação e Mertk durante a homeostase. Embora alguns estudos (LI et al, 2019; CHAVES et al, 2020) também já descreveram o papel deste receptor no contexto de mediação da sinalização e eferocitose em contexto inflamatório. Portanto, os receptores TAM podem estar envolvidos em processos biológicos imunes que levam a diferentes resultados, dependendo do receptor, tipo de célula e ambiente (LEMKE, 2013; AXELROD; PIENTA, 2014; ZAGORSKA et al., 2014).

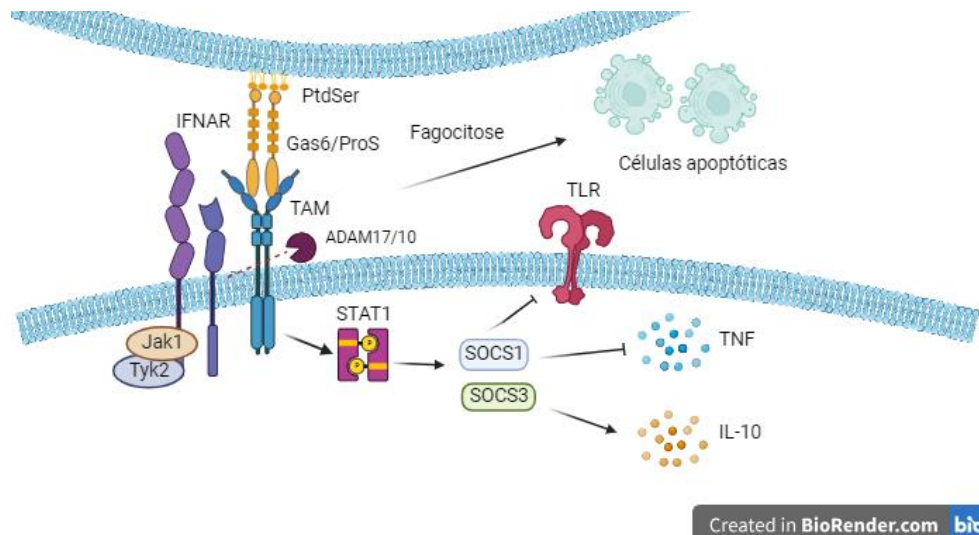


Figura 5. Via de sinalização JAK/STAT mediada por receptores TAM em células do sistema imune. Os receptores TAM se ligam a moléculas de PtdSer através de seus ligantes (Gas6/ProS). Estes receptores estão localizados em conjunto com os receptores IFNAR nas células do sistema imune. A ativação leva a fosforilação de STAT1, induzindo a expressão das proteínas SOCS1 e SOCS3 que inibem a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF) e induzem anti-inflamatórias (IL-10). Criado no BioRender.

1.5 RECEPTOR AXL EM INFECÇÕES PARASITÁRIAS

Os receptores Axl e Merck são de grande relevância no contexto de regulação das respostas imunológicas por atuarem modulando-as por vias de sinalização intrínsecas e pela mediação da fagocitose de células apoptóticas. Por isso, os estudos com os receptores TAM se acumulam principalmente no contexto de doenças autoimunes e câncer (PAOLINO; PENNINGER, 2016; WIUM et al, 2018). Mais recentemente, Axl também foi descrito como mediador da invasão de células por vírus como Zika, DENV e SARS-CoV2 (XIE et al, 2021; WANG et al, 2021).

No entanto, no contexto de doenças parasitárias, são pouco estudados (BOSURGI; ROTHLIN, 2021; LEMKE, 2013). Na infecção por *Trypanosoma cruzi* em modelos murinos, o patógeno induz a apoptose de células T - essenciais nas respostas imunes desenvolvidas e que atuam no controle da carga parasitária. Assim, inibidores da apoptose e eferocitose atuam como potenciais terapêuticos neste contexto (DECOTE-RICARDO et al, 2017; RIGONI et al, 2022). Rigoni e colaboradores (2022) demonstraram que a ausência de Axl altera negativamente a eferocitose destas células durante a infecção por *T. cruzi*, aumentam respostas de macrófagos M1 induzidas por células T como maior produção de óxido nítrico. Além disso, camundongos nocautes para o gene Axl (Axl ^{-/-}) apresentam menos fibrose e

inflamação cardíaca (RIGONI et al., 2022). Parasitos também podem invadir células e induzir a eferocitose em um mecanismo denominado "cavalo de tróia". Nesse caso, eles se beneficiam ao aumentar a fagocitose de células infectadas, levando à sua expansão no organismo. Na infecção por *Leishmania major*, os parasitos dentro dos neutrófilos induzem à apoptose destas células, levando à sua fagocitose e transporte para macrófagos dérmicos. Esse mecanismo depende de Axl e Mertk - e nesse sentido, em camundongos Axl -/- Mertk -/- , a carga parasitária é reduzida (CHAVES et al., 2020)

No entanto, o papel de Axl e Mertk na malária ainda não foi estabelecido. Durante a infecção por *Plasmodium* sp., as RBCs e iRBCs sofrem mudanças conformacionais e fenotípicas. Uma dessas alterações é o aumento da expressão de PtdSer na porção externa da membrana destas células (SCHWARTZ et al, 1987; TOTINO et al, 2016) e indução de morte celular nessas células. Visto que as RBCs são distintas - por não possuírem núcleo, o processo de morte e a expressão de PtdSer também diferem em alguns aspectos da apoptose clássica em células nucleadas. Neste caso, denomina-se eriptose e sua indução é bastante caracterizada neste contexto de infecção (TOTINO et al, 2016). Tanto RBCs quanto - em maior proporção - iRBCs entram em eriptose, aumentando a expressão de PtdSer. Este processo é induzido pelo aumento de fatores pró-apoptóticos como sFasL, hematina, indução de IgG anti-RBCs e estresse oxidativo ocasionados pela infecção. Também, fatores anti-apoptóticos como vitamina E e eritropoietina são diminuídos (TOTINO et al, 2016). Essa expressão aumentada de PtdSer contribui para a fagocitose das iRBCs via receptores de eferocitose como CD36, Tim-4 e CD300lf (BOSURGI; ROTHLIN, 2021; TOTINO et al, 2016; KESWANI et al, 2019; PATEL et al, 2004; IMAI et al, 2015).

Ainda que estes receptores de eferocitose estejam descritos como mediadores da fagocitose de iRBCs via PtdSer, Bosurgi e Rothlin (2021) ressaltam que outros receptores provavelmente devam estar envolvidos nessa função. Por exemplo, Tim-4 é um receptor que não possui cauda de sinalização citoplasmática e a sua mediação na eferocitose de iRBCs provavelmente é dependente de outros receptores. A colaboração entre Tim-4 e Mertk, por exemplo, já foi descrita no aprimoramento neste papel (MOON et al, 2020). Portanto, estes receptores - tanto pela modulação

intrínseca das respostas imunes pela via de sinalização quanto pela eferocitose de iRBCs - podem estar associados aos mecanismos imunobiológicos durante a infecção por *Plasmodium* sp. O estudo atual identificou e caracterizou as implicações da sinalização e da eferocitose mediada pelo receptor Axl no desenvolvimento da infecção por *Pc* e das respostas imunológicas neste contexto.

2. JUSTIFICATIVA GERAL

A malária é responsável por números expressivos de mortes anualmente e as complicações relacionadas à doença são de grande relevância em termos de comprometimento da saúde individual e coletiva. A maioria da população afetada está presente em locais considerados de vulnerabilidade social - onde os problemas socioeconômicos decorrentes são extremamente urgentes (OMS, 2022). A demanda no controle da malária é crescente, visto que há preocupações emergentes em relação ao rápido crescimento populacional em áreas hiperendêmicas, resistência do vetor à inseticidas e do parasito à drogas terapêuticas e pouca disponibilidade de vacinas eficazes (COHEN et al, 2022). Portanto, estratégias coletivas em diferentes áreas (e. g. pesquisa com novos agentes terapêuticos e imunizantes, pesquisas ecológicas) e que visem à longo prazo a erradicação da doença devem ser fundamentadas e estarem em constante desenvolvimento.

O conhecimento da interação hospedeiro-patógeno é essencial para o desenvolvimento de estratégias biofarmacêuticas para prevenir e/ou tratar a Malária. A patogênese é atribuída principalmente às respostas imunes (por exemplo, liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF) e eventos fisiológicos alterados (por exemplo, ruptura das iRBCs) levando a inflamação sistêmica, acidose metabólica e anemia (GAZZINELLI et al., 2014; GOSH; STUMHOFER et al., 2021; PHILLIPS et al., 2017; TUTEJA, 2007). Logo, às respostas imunológicas e fisiológicas à infecção por *Plasmodium* sp. são cruciais para os desfechos clínicos da doença, influenciando a sua progressão para formas graves. Diversas vias de sinalização estão envolvidas neste contexto durante a infecção e muitas delas ainda são desconhecidas - assim como as medidas pelo receptor Axl. Este, pertencente à família dos receptores TAM - medeia a eferocitose e é considerado imunomodulador por sua sinalização intrínseca relacionada aos processos inflamatórios. Visto que essas principais funções descritas estão intimamente relacionadas com a patogênese e a resolução

da inflamação em contexto infeccioso, a hipótese principal do estudo se baseia na prerrogativa que os receptores TAM - principalmente os que estão associados ao sistema imune Axl e Mertk - medeiam mecanismos imunobiológicos que contribuem nos processos de imunopatogênese da infecção por *Pc*. Sendo assim, de enorme importância a caracterização da influência destes receptores nas principais respostas imunes inatas e adaptativas, cinética de infecção do parasito e patogênese associada.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e caracterizar fenotipicamente e funcionalmente os mecanismos biológicos envolvendo o receptor Axl e suas consequências na imunopatogênese da Malária utilizando a infecção por *Pc* em camundongos C57BL/6 como modelo experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentro do presente estudo, os objetivos específicos são:

1. Avaliar a expressão do receptor Axl e sua sinalização em células do sistema imunológico durante a infecção por *Pc*;
2. Caracterizar o envolvimento e a relevância do receptor Axl durante as respostas imunes inatas e adaptativas diante da infecção por *Pc*;
3. Identificar o impacto da sinalização mediada por Axl no desenvolvimento da infecção por *Pc* e no desfecho patológico;
4. Avaliar o envolvimento do receptor Axl na mediação da eferocitose de iRBCs.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS, PARASITOS E INFECÇÃO

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos machos e fêmeas com idade entre 6 e 12 semanas. As linhagens utilizadas foram C57BL/6, Axl ^{-/-} e Mertk ^{-/-}. Os animais C57BL/6 foram fornecidos pelo Biotério Geral da Universidade de São Paulo (*campus* de Ribeirão Preto), Axl ^{-/-} e Mertk ^{-/-} pelo Centro de Criação de

Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram mantidos no Biotério da Plataforma Bi-Institucional de Pesquisa em Medicina Translacional Fiocruz/USP com suprimento de água e alimento à vontade, temperatura constante de 25° C e em micro-isoladores coletivos autoclavados.

No estudo, foi utilizada a cepa *Plasmodium chabaudi* (AS) e a infecção consistiu na administração via intraperitoneal (i.p) de 1×10^5 iRBCs por animal. O armazenamento dos parasitos foi feito por meio da conservação em nitrogênio líquido e o descongelamento e a manutenção foi feita em camundongos C57BL/6 onde havia passagem das hemácias infectadas para outro animal a cada 8 dias.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 094/2020.

4.2 PARASITEMIA E ANÁLISE DE PARÂMETROS CLÍNICOS

A parasitemia no sangue foi avaliada por esfregaços sanguíneos e coloração hematológica por panótico rápido (NewProv - cat. PA205). A porcentagem de iRBCs foi determinada a partir da contagem do número de iRBCs e o total de RBCs em um microscópio de luz.

A temperatura corporal foi medida pelo reto com a utilização de um termômetro digital. A avaliação do peso corporal foi feita por medições em uma balança semi-analítica e a porcentagem de perda calculada em relação ao peso inicial, no dia 0 da infecção por *Pc*.

4.3 RNA-SEQ E ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

As amostras foram coletadas de acordo com os dados obtidos de nosso grupo de pesquisa. O RNA-seq foi avaliado em amostras de fígado e baço (n = 3) de camundongos C56BL/6 infectados e não infectados com *Pc* no 8 dpi. No fígado, as amostras foram coletadas em diferentes momentos do dia: 0h, 6h, 12h e 18h. As bibliotecas de RNA-seq foram construídas usando o Kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina) seguindo as instruções do fabricante. As moléculas de RNAm contendo poli-A foram purificadas usando *beads* magnéticas com oligo poli-T usando cátions divalentes. Os fragmentos foram transcritos em DNA complementar (cDNA) (primeira

e segunda fita) usando a Transcriptase Reversa SuperScript II (Invitrogen), Polimerase I e RNase H. Os fragmentos de cDNA foram purificados e enriquecidos por PCR usando primers de extremidades pareadas (Illumina) (15 ciclos) para obter uma biblioteca de cDNA final. A qualidade dessa biblioteca foi verificada por análise de fragmentação (Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer) e submetida a sequenciamento no Illumina NextSeq 500 (Bauer Core Facility, Universidade Harvard).

Para as análises, foi calculado uma média de expressão de todos os pontos coletados. Foram considerados o valor de *fold-change* (mudança na expressão gênica) dos camundongos controle e infectados e analisados estatisticamente com teste T para a obtenção do valor-p. A disponibilidade de dados e materiais: número de acesso GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE109908>) é GEO: GSE109908.

4.4 RT-PCR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para análise de transcritos gênicos, o RNAm foi extraído de lisados de fígado de camundongos C57BL/6 e *Axl*^{-/-} não infectados e infectados por *Pc* utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, cat. Z3105) seguindo as instruções do fabricante. A partir do RNAm extraído, o cDNA foi sintetizado com a transcriptase reversa GoScript™ (Promega, cat. A2791) também seguindo as instruções do fabricante.

As amostras de cDNA foram utilizadas para a reação de RT-PCR usando o kit de master mix SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermofisher, cat. 4309155), seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica foi realizada no sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 3 (Thermofisher Scientific) e foi apresentada como mudança relativa em relação ao grupo de controle e normalizada com o *housekeeping* gene B2M (F GGGTGGAACTGTGTTACGTAG, R: TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC).

Essas amostras foram quantificadas em relação à expressão dos genes CD300IF (F: GATGCTGGCATTACTGGTGTGG, R: GGTTGTCACTGTGAAGATGGTGG), CD36 (F: GGACATTGAGATTCTTTTCCTCTG, R: GCAAAGGCATTGGCTGGAAGAAC), Icam1 (F: TGATGCTCAGGTATCCATCCA, R: CACAGTTCTCAAAGCACAGCG), Vcam1 (F: GCTATGAGGATGGAAGACTCTGG, R:

AACTCTTGGCAAACATTAGGTGT), Socs1 (F: AGTCGCCAACGGAAGCTGCTT, R: GTAGTGCTCCAGCAGCTCGAAA), Socs3 (F: GGACCAAGAACCTACGCATCCA, R: CACCAGCTTGAGTACACAGTCG), Stat1 (F: GCCTCTCATTGTCACCGAAGAA, R: TGGCTGACGTTGGAGATCACCA), Adam17 (F: TGTGAGCGGTGACCACGAGAAT, R: TTCATCCACCCTGGAGTTGCCA), Adam10 (F: TGCACCTGTGCCAGCTCTGATG, R: GATAGTCCGACCACTGAACTGC).

4.5 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO DE HEMOZOÍNA NO FÍGADO

Amostras de fígados de camundongos C57BL/6 e *Axl*^{-/-} não infectados infectados por *Pc* foram coletados no 6, 8 e 10 dpi e fixados em tampão PBS1x formalina (10%) pH = 7,2 por 24 horas em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram adicionadas à solução de etanol 70% e mantidas até o processamento. Em seguida, seguiram-se etapas de desidratação e clarificação utilizando álcool 80% (30 minutos), álcool 90% (30 minutos), álcool absoluto (4 sequências de 30 minutos), xilol (2 sequências de 30 minutos e 1 de 60 minutos). As amostras foram então incorporadas em parafina, seccionadas em 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina (HE). A análise histopatológica foi conduzida no microscópio de luz Olympus BX53 equipado com a câmera Olympus DP74.

Para a quantificação de hemozoína presente nas lâminas coradas por HE, a metodologia seguida foi uma adaptação de Frita e colaboradores, 2012. Houve a identificação do pigmento a partir da seleção de pixels correspondentes à coloração marrom característica nas imagens (n = 5) de cada amostra de tecido. A medida realizada foi feita pelo software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc) e expresso em porcentagem (%) da área total (número total de pixels).

4.6 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Amostras de baço e fígado foram obtidas de camundongos C57BL/6 e *Axl*^{-/-} não infectados e infectados por *Pc*. Para as análises dos esplenócitos, as amostras de baço foram maceradas em um filtro Cell Strainer (Corning, cat. 431752) de 100 µm e lavadas com tampão ACK (0,15 M NH₄Cl, 0,01M KHCO₃ e 0,0001 M de EDTA dissódico) para a lise das hemácias presentes. Ao final, as células foram

ressuspendidas e mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, cat. 11875119) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Já as amostras de fígado foram fragmentadas com tesoura histológica e em seguida incubadas com 5 mg de colagenase (Sigma-Aldrich, cat. C2139-1G)/órgão a 37°C por 30 minutos. Após este período, as amostras foram maceradas em um filtro Cell Strainer (Corning, cat. 431752) e 100 µm, adicionadas à 20 mL de Percoll 40% (Percoll 100% (9:1 Percoll (Cytiva, cat. 17089101): PBS 10x) e PBS 1x) e submetidas à centrifugação por 30 minutos, 25° C, sem aceleração e freio. Os leucócitos foram separados dos hepatócitos (são depositados ao fundo do tubo) e em seguida são lavados com tampão ACK para a remoção das hemácias. Por fim, as células também foram ressuspendidas e mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, cat. 11875119) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A concentração celular de ambas as amostras foi verificada por análise na câmara de Neubauer.

Para a marcação de anticorpos para análise em citômetro de fluxo, inicialmente as células foram coradas com Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (BV510, Biolegend, cat. 423101) para a análise da viabilidade celular por 15 minutos na temperatura ambiente, protegido da luz. Logo após as células foram incubadas com o anticorpo anti-mouse CD16/CD32 (Invitrogen, cat. 14-0161-82) por 20 minutos à 4° C, a fim de evitar possíveis ligações inespecíficas dos anticorpos ao receptor Fc presente nos leucócitos. Em seguida, foram utilizados os anticorpos específicos para a caracterização das populações celulares de linhagem mieloide e linfoide: CD11b (APC-Cy7, clone: M1/70, Biolegend, cat. 101226, 1:100), CD11c (AF-700, clone: N4168, Biolegend, cat. 117320, 1:100), CD11c (Pe-cy7, clone: N418, Biolegend, cat. 117318, 1:200), F4/80 (APC, clone: BM8, Biolegend, cat. 123116, 1:200), F4/80 (BB700, clone: T45-2342, BD, cat. 746070, 1:200), CD209 (AF-488, clone: MMD3, cat.), CD209 (BV786, clone: 5H10, BD cat. 741023, 1:200) Ly6c (PERCP, clone: HK1.4, Biolegend, cat. 128028 1:200), Ly6c (BV711, clone: HK1.4, Biolegend, cat. 128037, 1:200), Ly6g (FITC, clone: 1A8, Biolegend, cat. 127606, 1:200), Ly6g (PE, clone: 1A8, Biolegend, cat. 127608, 1:200), NK1.1 (BV711, clone: PK136, Biolegend, cat. 108745, 1:200), Axl (APC, clone MAXL8DS, Thermofisher, cat. 17-1084-82, 1:100), IA/IE (PB, clone: M5/114.15.2, Biolegend, cat. 107620, 1:200), IA/IE (AF-488, clone: M5/114.15.2, Biolegend, cat. 107616, 1:200), TNF (APC, clone: MP6-XT22, Biolegend, cat. 506308, 1:100), CD45 (Pe-cy7, clone: 30-F11, BD, cat. 552848, 1:100), Tim-4 (Pe-cy7, clone: RMT4-54, Biolegend, 130010, 1:200), CD8a (BV421,

clone: 53-6.7, Biolegend, cat. 100737, 1:100), CD4 (BV605, clone: RM4-5, Biolegend, cat. 100548), TCR β (APC-cy7, cat.), CD19 (BV421, clone: 6D5, Biolegend, cat. 115538, 1:200), CD44 (PERCP/Cy5.5, clone: IM7, Biolegend, cat. 103032., 1:200), CD62L (FITC, clone: MEL-14, Biolegend, cat. 104406, 1:200), Granzima B (AF-647, clone: GB11, Biolegend, cat. IC18341A, 1:100), Perforina (PE-Dazzle 594, clone: S16009A, Biolegend, cat. 154316, 1:100), Tbet (PE, clone: 4B10, Invitrogen, cat. 12-5825-82, 1:100), por 30 minutos a 4°C. Para as marcações com anticorpos de moléculas intracelulares e intranucleares, as células foram fixadas e permeabilizadas com o kit True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, cat. 424401). Todos os anticorpos foram titulados previamente à utilização para a obtenção da concentração ideal em cada tipo de amostra (baço e fígado) e citômetro de fluxo.

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSymphony™ A1 e A5 e analisadas no software FlowJo™ v10 (BD Biosciences). No software, todas as amostras passaram pelo controle de qualidade utilizando o plugin flowAI (GIANNI MONACO et al, 2016). A seleção das populações com determinados marcadores seguiu a partir da exclusão inicial de *doublets* (FSC-H x FSC-A) e células mortas (positivas para o marcador de viabilidade).

4.7 ENSAIO DE EFEROCITOSE

Para o ensaio de eferocitose, amostras de baço de camundongos C57BL/6 e Axl^{-/-} infectados e não infectados no 8 dpi foram processadas como descrito anteriormente. Os esplenócitos obtidos (2×10^6 /poço) foram incubados em uma placa de 96 poços por 1 hora à 37° C e 5% CO₂ com iRBCs (proporção de 1:1). Para a obtenção de iRBCs purificadas, o sangue total de camundongos C57BL/6 infectados com *Pc* foi adicionado à uma solução de 5 mL de Percoll 74% (Percoll 100% (9:1 Percoll (Cytiva, cat. 17089101): PBS 10x) e PBS 1x) e submetidos à centrifugação por 2500g, 30 minutos, 25° C sem aceleração e sem freio em tubos cônicos de centrifugação de 15 mL. As iRBCs formam um anel na parte superior do tubo e estas foram retiradas e a pureza foi confirmada por esfregaço sanguíneo seguido de coloração hematológica por panótico rápido. Foram utilizadas iRBCs com pureza total ou maior que 70%. As iRBCs foram coradas previamente à incubação com CellTracker™ (Invitrogen, cat. C34552) seguindo as instruções do fabricante. Para a confirmação do perfil apoptótico das iRBCs, alíquotas foram retiradas e marcadas

com Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (Biolegend, cat. 423101) e Anexina V (Cy5, BD, cat. 559934) na concentração de 1:50 em tampão de anexina 1x (10x: HEPES 0,1 M, NaCl 1,4M, CaCl₂ 2,5 M, pH = 7,4)) por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com tampão ACK para remover as iRBCs não fagocitadas e marcadas com anticorpos de superfície para a caracterização das células seguindo o protocolo anteriormente descrito. As amostras foram adquiridas no Analisador de Células BD FACSymphony™ A1 e analisadas no Software FlowJo™ (BD Biosciences). A eferocitose foi analisada observando as determinadas populações celulares com seus respectivos marcadores sendo positivas também para a fluorescência exibida pelas iRBCs coradas.

4.8 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO PLASMA

Os níveis de IL-6, TNF, IL-10, IFN- γ e CCL2 foram avaliados no plasma de camundongos C57BL/6 e Axl \pm não infectados e infectados por *Pc* usando o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation (BD, cat. 552364) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no citômetro BD™ Accuri C6 Plus e analisadas no software FCAP Array™.

4.9 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HEMOZOÍNA NO PLASMA

A quantificação de hemozoína no plasma de camundongos e Axl \pm não infectados e infectados por *Pc* foi feita a partir da detecção do grupo heme livre pelo kit Heme Assay (Sigma-Aldrich, cat. MAK316) seguindo as instruções do fabricante.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE AXL E MERTK SOLÚVEIS NO PLASMA POR ELISA

A quantificação de sAxl e sMertk no plasma foi feita por ELISA utilizando o kit Mouse Axl DuoSet (R&D, cat. DY854) e Mouse Mert DuoSet (R&d, cat. DY591) seguindo as instruções do fabricante.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE IGG TOTAL ANTI-PLASMODIUM CHABAUDI NO PLASMA POR ELISA

Para a quantificação de IgG total específico para *Pc*, utilizou-se da técnica de ELISA direto. Inicialmente, houve a purificação de extrato de *Pc* para a obtenção de antígenos. O protocolo seguido foi adaptado de Mota et al (1998) e Muxel (2011). O sangue de camundongos C57BL/6 infectados com *Pc* foi coletado no 8 dpi em tubos heparinizados e houve a purificação de iRBCs utilizando de centrifugação com Percoll 74% (2500g, 30 minutos, temperatura ambiente, sem freio e aceleração). As iRBCs foram lavadas com PBS 1x e em seguida foram incubadas com solução de saponina (0,05% saponina em PBS1x) por 7 minutos à 37° C. As amostras foram submetidas à centrifugação e o sedimento foi lavado com PBS 1x. Em sequência, foi adicionado 100 uL de solução de Triton X-100 (1% Triton X-100, 5 mM EDTA e 100 mM Tris-HCl, pH = 8,0) por 5 minutos em temperatura ambiente. Uma nova centrifugação em rotação máxima (14.000 g) por 10 minutos à 4° C foi realizada e o sobrenadante foi quantificado utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay Kits (cat. 23225) seguindo as instruções do fabricante.

O extrato de *Pc* obtido foi utilizado para fazer a sensibilização de placas de alta afinidade específicas para ELISA na concentração de 8 µg/mL por 16 horas à 4° C. As placas foram lavadas com solução de PBS-T (0,05% Tween 20 em PBS 1x) e bloqueadas com solução de PBS-BSA (2% BSA em PBS 1x) por 2 horas à 37° C. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS-T e foi adicionado 50 µL de amostra de soro diluída (1:10 e 1:50) por 1 hora à 37°C. A seguir, houve uma nova lavagem em PBS-T e foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG total (Southern Biotech, cat. 1030-07) (1:5000) por 1 hora à 37° C. As placas foram lavadas com PBS-T e foi adicionado 100 uL de solução de substrato TMB (Biolegend, cat. 42101) e incubado por 20-25 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Logo após, foi adicionado 50 µL de solução de parada (1:20 H₂SO₄ em água destilada). O resultado foi analisado por meio da medição espectrofotométrica à 450 nm.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas e os gráficos representativos foram realizados no software GraphPad Prism 8. As comparações entre os grupos foram analisadas utilizando o teste one-way ANOVA, two-way ANOVA e teste t Student dependendo da distribuição dos dados. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com um valor-p inferior a 0,05 ($p < 0,05$) e foram representadas nos

gráficos pelo símbolo * ou ns (não significativo). Os desvios padrão também foram representados em cada gráfico.

5. RESULTADOS

5.1 A VIA DE SINALIZAÇÃO JAK/STAT MEDIADA POR AXL É INDUZIDA DURANTE A INFECÇÃO POR *Pc* NO BAÇO E NO FÍGADO

Inicialmente, avaliamos se durante a infecção por *Pc*, há a ativação da sinalização JAK/STAT induzida pelos receptores TAM. Para isto, foi realizada uma análise da variação da transcrição de genes relacionados à esta via por RNAseq durante o pico da infecção por *Pc* (8 dpi) no baço e no fígado - órgãos centrais nas respostas imunes neste contexto (**Figura 6**).

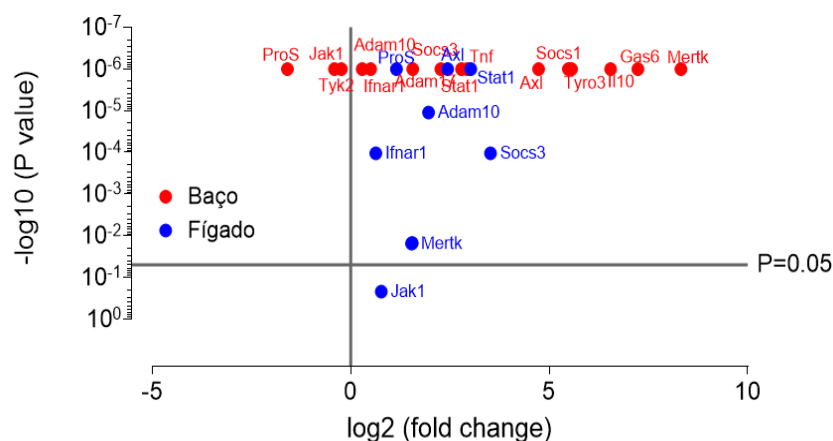


Figura 6. A via de sinalização JAK/STAT é induzida durante a infecção por *Pc*. A. Expressão de RNAm dos receptores TAM e seus genes associados na via de sinalização JAK/STAT no fígado total (azul) e no baço total (vermelho) em camundongos C57BL/6 não infectados e infectados com *Pc*. Os camundongos foram infectados com 10⁵ iRBCs/animal via intraperitoneal e as amostras foram coletadas no 8 dpi. Disponibilidade dos dados de RNAseq: GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE109908>), número de acesso GEO: GSE109908. O eixo Y representa -log10 do valor de P resultante de teste-T de variação da expressão gênica entre os grupos controle e infectado, e o eixo X representa o log2 dos valores de *fold change* resultantes da razão entre a expressão gênica dos grupos infectado/controle.

Há uma regulação positiva de Axl, Mertk e Tyro3 no baço e no fígado em resposta à infecção por *Pc* (**Figura 6**). Uma vez ativados, os receptores TAM iniciam uma cascata de sinalização que culmina na fosforilação do STAT1 e de seus domínios citoplasmáticos, induzindo a transcrição das proteínas SOCS1 e SOCS3 - que também são reguladas positivamente no contexto da infecção (**Figura 6**).

Essa ativação também altera a sinalização de citocinas, como de IFN-I mediado por IFNAR, causando sua inibição. Embora haja um aumento na transcrição gênica desse receptor no fígado e no baço, JAK1 e Tyk2 estão regulados negativamente. Essas moléculas são recrutadas pelo IFNAR ativado e, em seguida, são fosforiladas e ativam sua via de sinalização (KLINE; KITAGAKI, 2006). Uma vez que a ativação dos receptores TAM inibe a sinalização do IFNAR, a regulação negativa de JAK1 e Tyk2 e a regulação positiva de STAT1, SOCS1 e SOCS3 sugerem a ativação de JAK/STAT durante a infecção por *Pc* (**Figura 6**).

Gas6 e ProS são os ligantes mais caracterizados dos receptores TAM e são capazes de mediar sua ligação às moléculas de PtdSer (LEMKE, 2013). Como mencionado anteriormente, esses receptores possuem padrões distintos e dinâmicos de ligação e ativação por essas moléculas, interagindo de maneira única, dependendo do tipo celular, disponibilidade do ligante e sua afinidade (LEMKE; ROTHLIN, 2008; LEMKE, 2013; TSOU et al, 2014). A expressão gênica de Gas6 é mais pronunciada durante a ativação dessa sinalização, especialmente no baço (**Figura 6**).

As citocinas como TNF e IL-10 também fazem parte da imunomodulação mediada pela ativação dos receptores TAM, uma vez que foi descrita a inibição de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, e a indução de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, através da regulação positiva de SOCS1 e SOCS3 (SHIBATA et al, 2022; BURSTYN-COHEN; MAIMON, 2019). No entanto, ambas as citocinas são aumentadas em ambos os órgãos, especialmente TNF. Durante a infecção por *Plasmodium sp.*, o aumento da produção de ambas as citocinas é caracterizado, pois estão relacionadas à patogênese e resolução da inflamação da doença (GRAU et al, 1989; KUMAR et al, 2018). Embora essa sinalização induza SOCS1 e SOCS3, a transcrição dos genes do TNF e IL-10 não é estritamente regulada por essas vias e não é afetada por essa ativação no baço e no fígado (**Figura 6**).

A observação do aumento da transcrição de ADAM17 e ADAM10 (**Figura 6**) também é um indicativo da indução da via JAK/STAT mediada por receptores TAM. Essas proteínas são responsáveis pela clivagem dos domínios extracelulares dos receptores TAM após sua ativação, liberando porções solúveis (por exemplo, sAXL e sMertk) com alta afinidade pelos ligantes (Gas6 e Pros). Essas porções solúveis competem com as formas membranares dos receptores TAM, controlando sua

sinalização (RANTA; KUMAR, 2020). A concentração destas formas solúveis no plasma é utilizado como um biomarcador da sinalização por estes receptores - visto que seu aumento se relaciona com uma alça de retroalimentação negativa estimulada durante a ativação (RANTA; KUMAR, 2020).

Portanto, para identificar a ativação destes diferentes receptores TAM - estreitando a análise para os principais receptores vinculados ao sistema imune Axl e Mertk - o próximo passo foi quantificar a forma solúvel destes receptores no plasma de grupos de camundongos C57BL/6 não infectados e infectados com *Pc* (**Figura 7A e B**, respectivamente). Ainda, foi incluído na análise, grupos de animais Axl ^{-/-} e Mertk ^{-/-} para investigar a relação entre ambos - visto que possuem papéis sobrepostos, ainda que descritos em contextos diferentes. Há um aumento significativo de sAxl no plasma de animais C57BL/6 e Mertk ^{-/-} infectados em relação aos grupos controle (**Figura 7A**). Não há alteração significativa de sMertk entre os grupos selvagens controle e infectado (**Figura 7B**). No entanto, há um aumento desta forma solúvel na ausência de Axl (**Figura 7B**).

Visto que essa via é pleiotrópica, sendo induzida por diferentes estímulos inflamatórios (RAWLING et al, 2004) e os genes dos três receptores estão regulados positivamente durante a infecção - houve uma investigação a fim de identificar qual a contribuição de Axl para o fenótipo observado. Para isto, avaliamos a transcrição das principais moléculas induzidas nesta via - STAT1, SOCS1 e SOCS3 - no fígado de animais Axl ^{-/-} (**Figura 7C**). Na ausência do receptor Axl, há uma diminuição na indução da transcrição de RNAm dessas moléculas (**Figura 7C**). Portanto, a regulação positiva observada da via de sinalização JAK/STAT durante a infecção por *Pc* é induzida pelo receptor Axl.

A. sAxl - plasma

B. sMertk - plasma



Figura 7. O receptor Axl é ativado durante a infecção por *Pc* e regula a via de sinalização JAK/STAT. **A.** Quantificação de Mertk solúvel (sMertk) no plasma. O eixo Y representa os valores de concentração (pg/mL) e o eixo X representa os grupos de camundongos (barras cinzas - grupo controle C57BL/6, barras vermelhas - C57BL/6 infectado com *Pc*, barras amarelas - grupo Mertk -/- controle e barras roxas - Mertk -/- infectado com *Pc*) **B.** Quantificação de Mertk solúvel (sMertk) no plasma. O eixo Y representa os valores de concentração (pg/mL) e o eixo X representa os grupos de camundongos (barras cinzas - grupo controle C57BL/6, barras vermelhas - C57BL/6 infectado com *Pc*, barras azuis - grupo Axl -/- controle e barras verdes - Axl -/- infectado com *Pc*). **C.** Expressão relativa de genes ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) por RT-qPCR de Stat1, Socs1 e Socs3. O eixo Y representa os valores $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ e o eixo X representa os grupos de camundongos (barras cinzas - grupo controle C57BL/6, barras vermelhas - C57BL/6 infectado com *Pc*, barras azuis - grupo Axl -/- controle e barras verdes - Axl -/- infectado com *Pc*) (*, ** e *** = $p < 0,05$; ns = não significativo). Representativos de dois experimentos independentes.

Portanto, nossos dados demonstram que durante a infecção por *Pc*, há um aumento da expressão gênica dos receptores TAM e de moléculas envolvidas na via de sinalização JAK/STAT durante a infecção por *Pc* no baço e no fígado. Ainda, identificamos um aumento de sAxl no plasma, sinalizando a ativação deste receptor neste contexto e este, por sua vez, induz a regulação positiva observada da via JAK/STAT.

5.2 A EXPRESSÃO DO RECEPTOR AXL É INDUZIDA NAS PRINCIPAIS POPULAÇÕES DE CÉLULAS MIELOIDES FAGOCÍTICAS DURANTE A INFECÇÃO POR *Pc*

Uma vez que a sinalização JAK/STAT por Axl é ativada no baço e no fígado - e é bem conhecido que está principalmente associada às células mielóides - a segunda questão levantada foi se essa ativação era observada em populações específicas dentro da linhagem mielóide. A expressão de Axl foi analisada em populações de células mielóides fagocíticas envolvidas nas respostas imunes ao *Plasmodium* sp. dentro do baço: monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻), células dendríticas convencionais (cDCs) (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) e células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs) (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺) de camundongos C57BL/6 infectados com *Pc* (8 dpi) (**Figura 8**).

Em todas as populações de células da linhagem mielóide observadas - monócitos, células dendríticas (MO-DCs e cDCs e neutrófilos) - houve um aumento na expressão do receptor Axl durante a infecção, com diferença significativa em relação aos grupos de controle (**Figura 8**). As MODCs possuíram a maior alteração na mediana de intensidade fluorescência (MFI, do inglês *median fluorescence intensity*) após a infecção com *Pc* entre as populações observadas, aumentando drasticamente (**Figura 8B e F**).

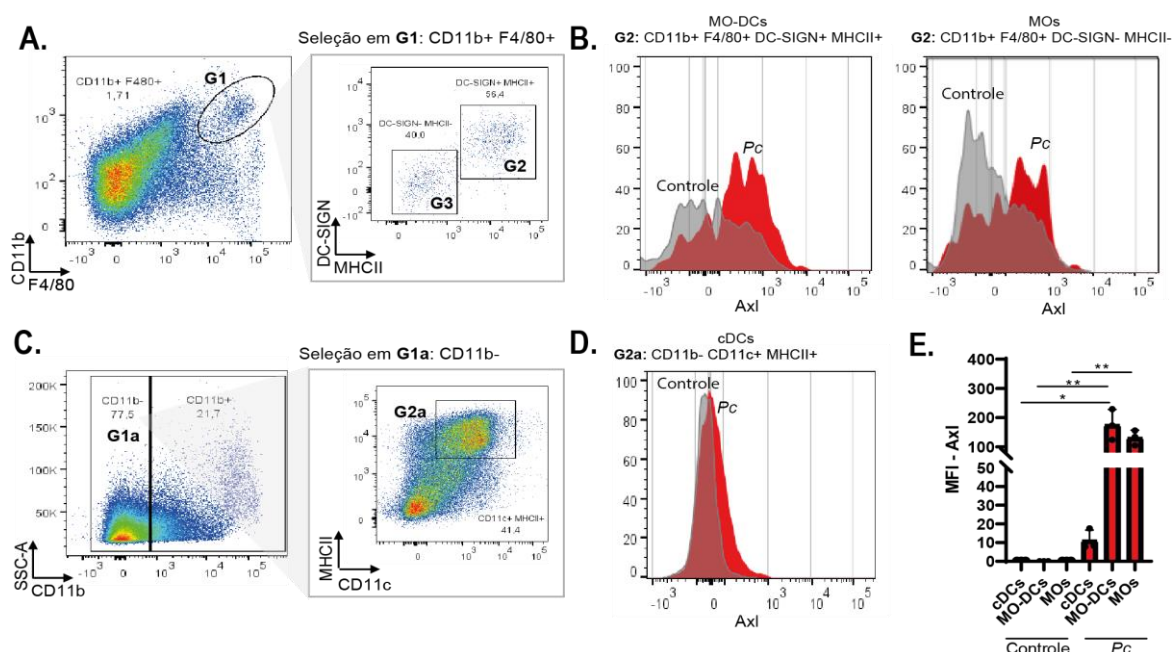


Figura 8. A expressão do receptor Axl é induzida em populações de células dendríticas (cDCs e MO-DCs) e monócitos durante a infecção por *Pc*. **A.** Estratégia de seleção de populações

celulares. As células foram primeiramente selecionadas como CD11b⁺ F4/80⁺ e depois como DC-SIGN⁺ e MHCII⁺ para a identificação de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos, respectivamente. **B - C** Histogramas representativos (n=3) da expressão de Axl nas células CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁺ MHCII⁺ (MO-DCs) e CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ MHCII⁻ (MOs), respectivamente. A cor cinza representa o grupo de controle (não infectado) e a cor vermelha representa os camundongos infectados com *Pc*. **D**. Estratégia de seleção de populações celulares. As células também foram selecionadas como CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ (cDCs) para identificar células dendríticas convencionais. **E**. Histogramas representativos (n=3) da expressão de Axl nas células CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺. A cor cinza representa o grupo de controle (não infectado) e a cor vermelha representa os camundongos infectados com *Pc*. **F**. Mediana de fluorescência (MFI) da expressão de Axl. As barras cinzas representam o grupo de controle (camundongos C57BL/6 não infectados) e as barras vermelhas representam os camundongos infectados com *Pc* (C57BL/6 *Pc*). (*, ** = p < 0,05). Representativo de três experimentos independentes.

Para avaliar se o aumento da expressão de Axl, assim como a sua ativação (**Figura 6A**), é independente de *Mertk*, essa mesma variação foi analisada em animais *Mertk*^{-/-} (**Figura 9**). Na ausência do receptor *Mertk*, o Axl ainda é induzido durante a infecção por *Pc* em todas as populações de células fagocíticas (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ MHCII⁻, CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁺ MHCII⁺ e CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺) (**Figura 9A, B e C**).

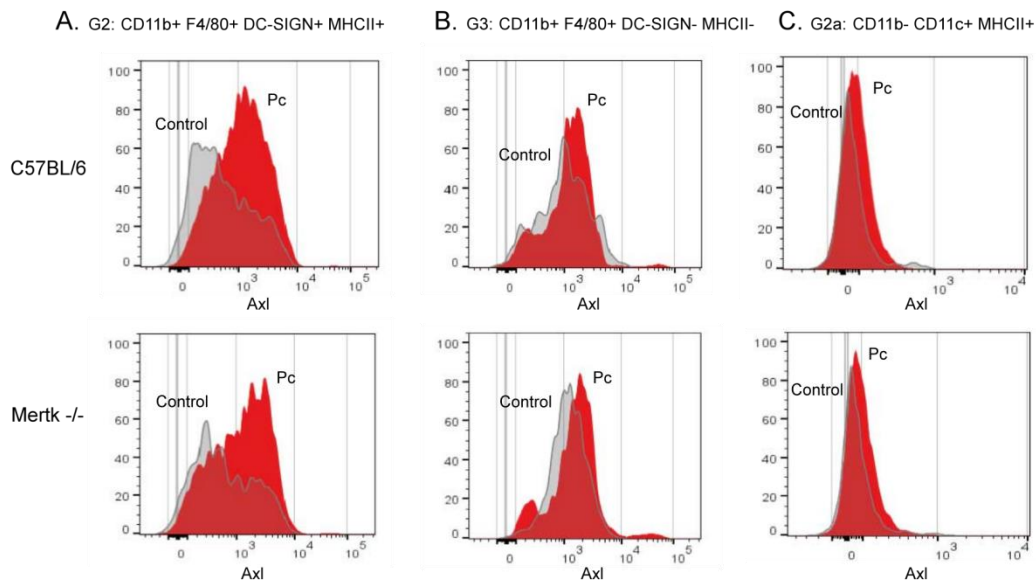


Figura 9. O perfil de expressão de Axl durante a infecção por *Pc* é mantido na ausência de *Mertk*. **A - C**. Histograma representativo (n=4) da expressão de Axl nas populações **(A)** CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁺ MHCII⁺, **(B)** CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ MHCII⁻, **(C)** CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺. A cor cinza representa o grupo de controle (não infectado) e a cor vermelha representa os camundongos infectados com *Pc*. Os gráficos superiores correspondem à animais C57BL/6 e inferiores à *Mertk*^{-/-}. Representativo de dois experimentos independentes.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a infecção por *Pc* regula positivamente a expressão de Axl em MO-DCs (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁺ MHCII⁺), MOs (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ MHCII⁻) e cDCs (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺) e este aumento é mantido mesmo na ausência do receptor Mertk.

5.3 A SINALIZAÇÃO MEDIADA A PARTIR DO RECEPTOR AXL CONTRIBUI PARA O ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO POR *Pc* NAS RBCS

Como descrito anteriormente, o receptor Axl medeia a sinalização JAK/STAT especialmente nos monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻), cDCs (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) e MODCs (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺) no baço e no fígado durante a infecção pelo *Pc*. Visto que há a indução desta via, nosso próximo passo foi avaliar o papel dela frente a esta infecção.

Para isto, foram analisados o peso corporal, a temperatura retal e a parasitemia no sangue foram analisados em camundongos C57BL/6 e Axl^{-/-} até a resolução da inflamação (ou seja, diminuição total de parasitos no sangue) (**Figura 10 e 11**).

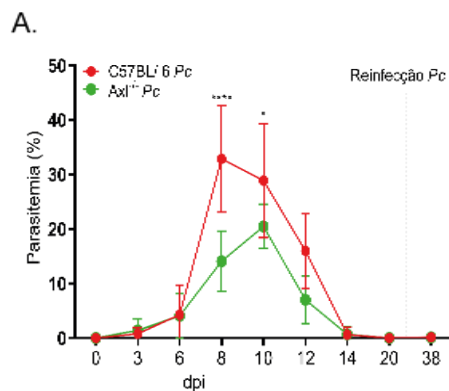


Figura 10. Na ausência de Axl, os camundongos C57BL/6 apresentam menor parasitemia e lise de iRBCs em relação aos selvagens no pico da infecção por *Pc*. **A.** Cinética de infecção com *Pc* em C57BL/6 (linha vermelha) e camundongos Axl^{-/-} (linha verde) durante 20 dias. O eixo Y representa a parasitemia (%) no sangue e o eixo X representa os dias após a infecção (dpi). A linha pontilhada indica uma reinfecção realizada após 30 dpi. Representativo de 6 experimentos independentes. **B.** Foto ilustrativa do plasma de animais controle e infectados com *Pc* dos grupos C57BL/6 e Axl^{-/-}. **C.** Quantificação de grupo heme livre no plasma. O eixo Y representa a concentração de heme livre (μM) e o eixo X representa os grupos (barras cinzas - grupo controle C57BL/6, barras vermelhas - C57BL/6 infectado com *Pc*, barras azuis - grupo controle Axl^{-/-} controle, barras verdes - Axl^{-/-} infectado com *Pc*). Representativo de quatro experimentos independentes.

Os camundongos selvagens apresentaram o pico de parasitemia no 8 dpi, com 30-40% de iRBCs. No entanto, os camundongos Axl^{-/-} apresentaram 15-25% de iRBCs no mesmo período. No 10 dpi, os camundongos nocautes também

apresentaram diferença significativa na parasitemia, com níveis mais baixos (**Figura 10A e B**).

Realizamos também uma segunda infecção após 30 dpi, a fim de investigar possíveis alterações na cinética de reinfecção de *Pc* em comparação aos camundongos do tipo selvagem. Mais especificamente, a intenção era avaliar possíveis alterações na indução de respostas imunes adaptativas relacionadas à memória. No entanto, não houve diferença significativa na indução de células de memória após a infecção por *Pc*. Em ambos os grupos - C57BL/6 e *Axl*^{-/-}, os camundongos apresentaram resistência à reinfecção (**Figura 10A**).

A replicação intensa dos merozoítos dentro das RBCs leva à lise destas células e a liberação de seus componentes - como do grupo heme livre, proveniente da metabolização da hemoglobina pelo *Plasmodium* sp. (RAPIDO, 2017; SCOVINO et al, 2022). O plasma de animais infectados com *Pc* - principalmente no 8 dpi - possui coloração avermelhada e grande concentração de grupo heme. Logo, a sua quantificação é também uma maneira de avaliar a densidade parasitária. No 8 dpi, verificamos que na ausência de *Axl*, os animais possuem uma menor concentração de heme no plasma, que pode ser observado macroscopicamente - com uma coloração avermelhada menos expressiva (**Figura 10B e C**).

No entanto, essas diferenças não foram observadas no desenvolvimento dos principais sintomas clínicos, como perda crescente de peso corporal e hipotermia, até o pico da parasitemia. Nos dois grupos infectados, os animais apresentaram o mesmo fenótipo em relação a esses parâmetros (**Figura 11A e B**). Os níveis mais baixos de parasitemia em camundongos *Axl*^{-/-} não se correlacionaram com perda de peso corporal e hipotermia no 8 e 10 dpi.

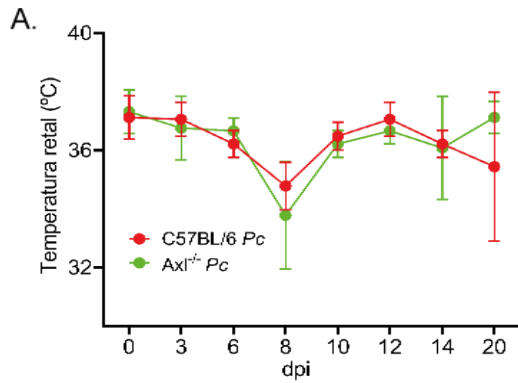


Figura 11. Axl não interfere na perda de peso corporal e na hipotermia causada pela infecção por *Pc* em camundongos C57BL/6. A. Temperatura retal de camundongos C57BL/6 (linha vermelha) e Axl^{-/-} (linha verde) durante 20 dpi com *Pc*. O eixo Y representa a temperatura retal (°C) e o eixo X representa os dias após a infecção (dpi). **B.** Perda de peso corporal de camundongos C57BL/6 (linha vermelha) e Axl^{-/-} (linha verde) durante 20 dpi com *Pc*. O eixo Y representa o peso corporal (% em relação ao primeiro dia de infecção) e o eixo X representa os dias após a infecção (dpi). Representativo de três experimentos independentes.

Para avaliar o impacto na inflamação sistêmica também foi realizada a quantificação de citocinas no plasma. Já foi demonstrado que níveis elevados de TNF, IL-6 e IL-10 podem estar correlacionados com uma forma mais grave de malária. Essas diferentes citocinas podem apresentar diferentes padrões de imunorregulação e contribuições diferenciais diante de uma resposta inflamatória (RODRIGUES-DASILVA et al., 2014; WILAIRATANA et al., 2022). A concentração plasmática das principais citocinas inflamatórias - TNF, IL-10, IL-6, CCL2 e IFN- γ - foram avaliadas em camundongos Axl^{-/-} nos dias 6, 8 e 10 após a infecção (**Figura 12**).

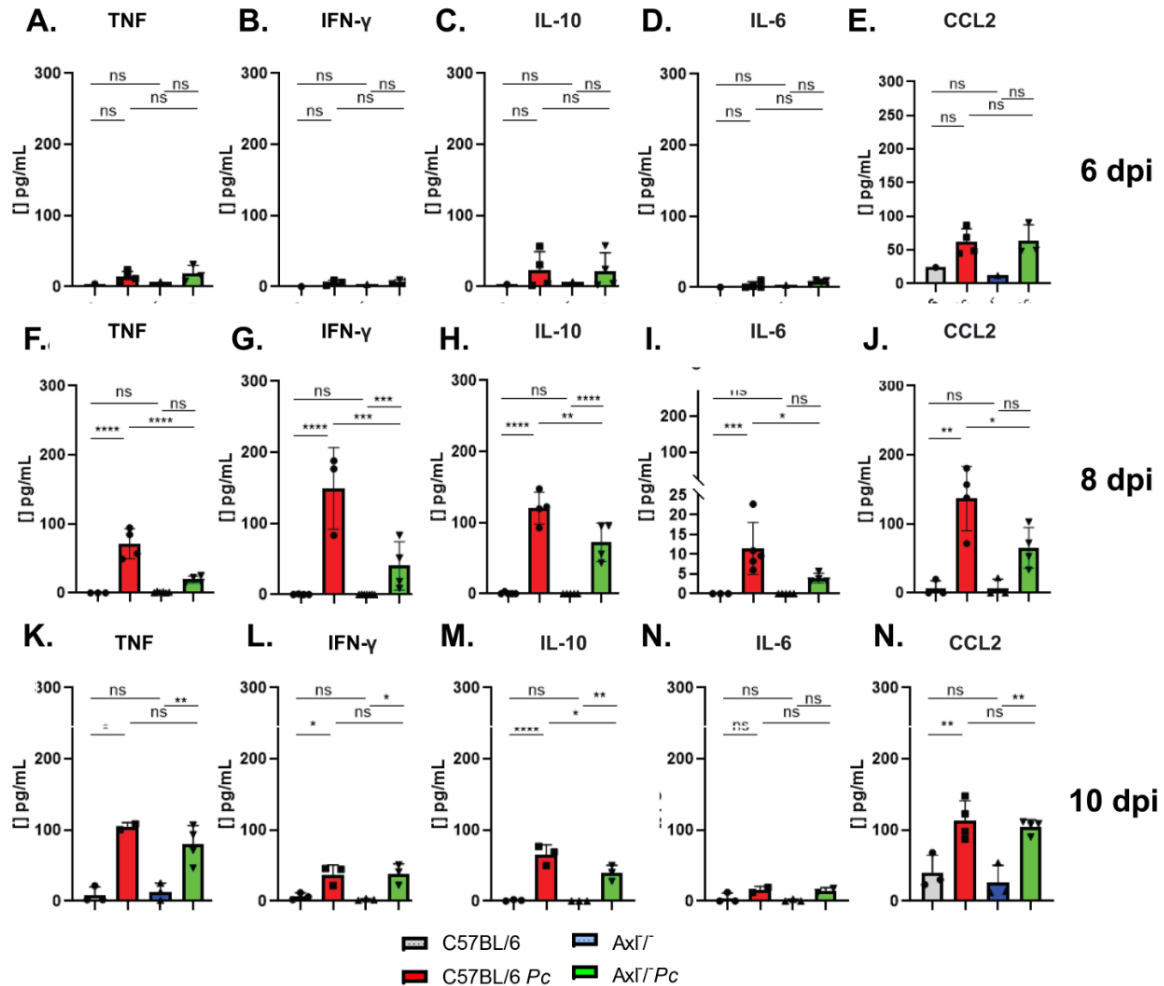


Figura 12. Os níveis de citocinas sistêmicas são reduzidos no pico da infecção por *Pc* na ausência do receptor *Axl*. A - N. Concentração de citocinas plasmáticas. O eixo Y representa a concentração no plasma (pg/mL) e o eixo X representa os grupos (Barras cinzas - C57BL/6, barras vermelhas - C57BL/6 *Pc*, barras azuis - *Axl*^{-/-} e barras verdes - *Axl*^{-/-} *Pc*). As citocinas analisadas foram TNF, IL-10, IFN- γ , CCL2 e IL-6, respectivamente. A - E. 6^o dpi. F - J. 8^o dpi. K - N. 10^o dpi. (*, **, ***, **** = $p < 0,05$; ns = não significativo). Representativo de dois experimentos independentes.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de citocinas inflamatórias sistêmicas nos dias 6 (Figura 12A à E) e 10 (Figura 12K - e N) após a infecção em ambos os grupos. No entanto, na ausência do receptor *Axl*, ocorre uma diminuição significativa nos níveis de TNF, IL-10, IL-6, CCL2 e IFN- γ no 8 dpi (Figura 12F à J).

Com esses dados podemos concluir que os camundongos *Axl*^{-/-} apresentam menor parasitemia no pico da infecção por *Pc* mas ainda são afetados pela perda de peso corporal e hipotermia da mesma maneira que o grupo selvagem. O controle da parasitemia no 8 dpi refletiu em níveis reduzidos de citocinas inflamatórias no plasma em *Axl*^{-/-}.

5.4 O RECEPTOR AXL MEDEIA A EFEROCITOSE DE IRBCS POR MOs, cDCs e MO-DCs

Uma vez que o receptor Axl é regulado positivamente em células fagocíticas diante da infecção por *Pc* e camundongos *Axl*^{-/-} e *Mertk*^{-/-} possuem menor parasitemia no pico da infecção houve uma investigação a fim de caracterização a mediação da fagocitose de iRBCs por estes receptores - e se possivelmente teria relação com o fenótipo observado. Essa prerrogativa se baseia na afirmação de que a eferocitose pode ser benéfica ou prejudicial ao hospedeiro, dependendo do patógeno (BOSURGI; ROTHLIN, 2021). As iRBCs expressam PtdSer na porção externa da membrana celular e por isso, podem ser fagocitadas por receptores de eferocitose (BOULET et al, 2018; EDA; SHERMAN, 2002). Para isto, esplenócitos de camundongos C57BL/6 e *Axl*^{-/-} foram incubados com iRBCs previamente marcadas com CellTracker. Antes da incubação, amostras de iRBCs foram marcadas com Anexina-V para confirmar a expressão de PtdSer (**Figura 13A e B**).

A eferocitose de iRBCs foi determinada pela avaliação das populações que expressam Axl (**Figura 8**) de monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻), cDCs (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) e MODCs (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺) positivas para o marcador das iRBCs (**Figura 13C à E**).

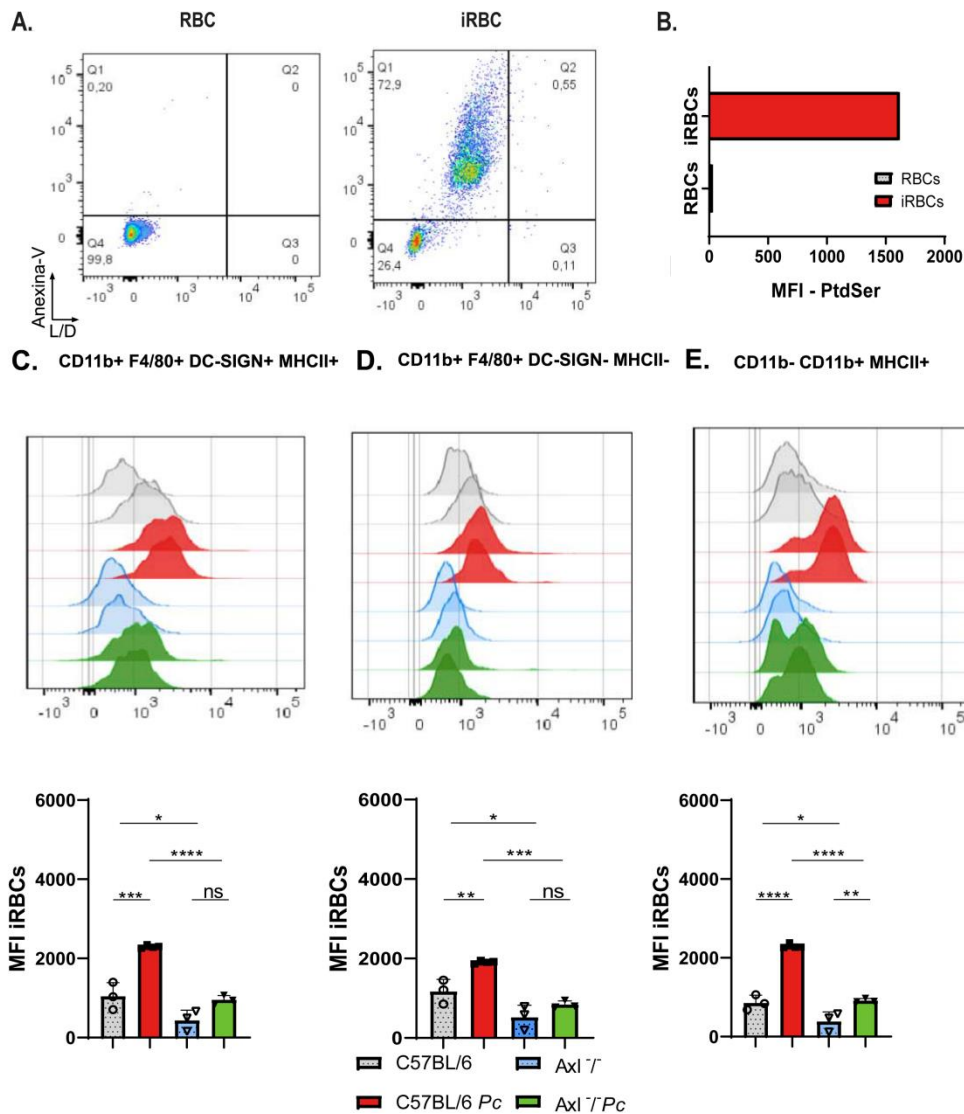


Figura 13. O receptor Axl medeia a fagocitose de iRBCs em MOs, MO-DCs e cDCs. A. Dotplot representativo da confirmação da exposição de PtdSer (Anexina-V+) em RBCs controle e iRBCs. **B.** MFI de Anexina-V em RBCs controle e iRBC. O eixo Y representa os valores de MFI e o eixo X representa os grupos (barras cinzas - RBCs e barras vermelhas - iRBCs). **C - E.** Histogramas representativos das populações celulares selecionadas CD11b+ F4/80+ DC-SIGN+ MHCII+, CD11b+ F4/80+ DC-SIGN- MHCII- e CD11b- CD11c+ MHCII+, respectivamente, expressando o marcador usado em iRBC (Cell Tracker). Embaixo, os respectivos gráficos da MFI do marcador de iRBCs em cada população correspondente acima (* = $p < 0,05$; ns = não significativo). Representativo de dois experimentos independentes.

Em todas as populações celulares analisadas (**Figura 13C - E**), foi identificado um aumento na fagocitose de iRBCs por células provenientes de camundongos infectados com *Pc*. No entanto, as células de animais *Axl*^{-/-} - ainda que infectados - não apresentaram aumento significativo na fagocitose de iRBCs, mantendo-se similar à seu nível basal nos animais controle (**Figura 13C - E**).

Portanto, esses resultados demonstram que na ausência de Axl, a eferocitose de iRBCs por monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ MHCII⁻), cDCs (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) e MO-DCs (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺) é diminuída quando comparado aos selvagens.

5.5 A AUSÊNCIA DE AXL LEVA À UM AUMENTO NA FREQUÊNCIA DE cDCs ESPLÊNICAS

Os camundongos Axl^{-/-} apresentam menores níveis de parasitemia e menor lise de iRBCs no 8 dpi, assim como menores níveis de citocinas inflamatórias plasmáticas. Para investigar a modulação da resposta imunológica atrelada à este receptor frente à este fenótipo de melhor controle no pico da infecção, inicialmente, foi realizada uma caracterização quantitativa e qualitativa de populações de células mielóides fagocíticas envolvidas nas respostas imunes à infecção por *Pc* como os monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻), cDCs (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) e MODCs (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺) em relação à frequência em células vivas totais e número total por órgão (**Figura 14**) nos animais Axl^{-/-}.

A.

B.

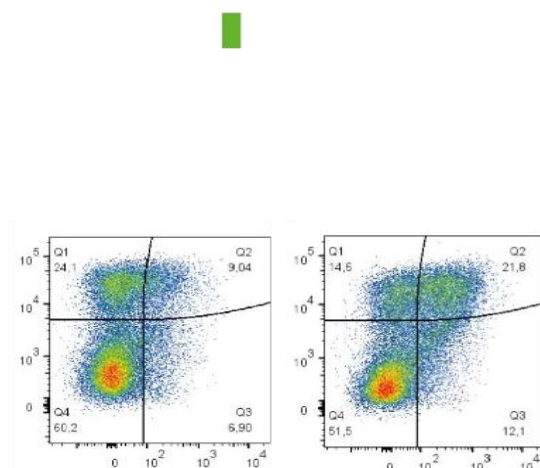


Figura 14. A frequência de células CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ aumenta na ausência do receptor Axl. A. Frequência em células vivas e número total de células CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ MHCII⁺ por baço. O eixo Y representa a frequência em células vivas (%) e o eixo X representa os grupos (Barras cinzas - C57BL/6, barras vermelhas - C57BL/6 *Pc*, barras azuis - Axl^{-/-} e barras verdes - Axl^{-/-} *Pc*).

B. Frequência em células vivas e número total de células CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ por baço. O eixo Y representa a frequência em células vivas (%) e o eixo X representa os grupos (Barras cinzas - C57BL/6, barras vermelhas - C57BL/6 *Pc*, barras azuis - Axl^{-/-} e barras verdes - Axl^{-/-} *Pc*). **C.** Dotplot representativo das populações de cDCs (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺) em camundongos C57BL/6 e Axl^{-/-} infectados com *Pc*. **D.** Frequência em células vivas e número total de células CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ por baço. O eixo Y representa a frequência em células vivas (%) e o eixo X representa os grupos (Barras cinzas - C57BL/6, barras vermelhas - C57BL/6 *Pc*, barras azuis - Axl^{-/-} e barras verdes - Axl^{-/-} *Pc*). CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺. (*, ** = p < 0,05; ns = não significativo). Representativo de três experimentos independentes.

Em camundongos Axl^{-/-} infectados houve um aumento significativo na frequência de cDCs (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) em relação à C57BL/6 infectados (**Figura 14C e D**). No entanto, não houve diferença significativa entre as populações de camundongos infectados C57BL/6 e Axl^{-/-} em relação ao número total destas células no baço (**Figura 14C**). As populações de monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻ MHCII⁻) e MO-DCs (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁺ MHCII⁺) entre os grupos infectados não sofreram alterações significativas em relação à frequência ou número absoluto (**Figura 14A e B**)

Desta forma, os resultados de imunofenotipagem em relação à linhagem mielóide demonstram que Axl modula a frequência de cDCs durante a infecção por *Pc* no 8 dpi.

5.6 A AUSÊNCIA DE AXL APRIMORA A ATIVIDADE DE CÉLULAS TCD8⁺ DURANTE A INFECÇÃO POR *Pc*

Os receptores TAM são descritos na interface entre o sistema imune inato e adaptativo (PAOLINO; PENNINGER, 2016). Apesar da diminuta expressão destes receptores em células da linhagem linfóide, eles estão envolvidos nas interações entre células T e células apresentadoras de antígeno (APCs). A infecção por *Plasmodium* sp. está associada a respostas de células T - especialmente as células T Th1 e CTLs, células B e NK. (CHANDELE et al, 2010; GOSH; STUMHOFER et al, 2021; OPATA et al, 2018).

Deste modo, investigamos a frequência e a quantidade das populações de células B (CD19⁺ TCRβ⁻), células T CD4⁺ (TCRβ⁺ CD4⁺, TCRβ⁺ CD4⁺ CD44⁺, TCRβ⁺ CD4⁺ CD62L⁺ e TCRβ⁺ CD4⁺ Tbet⁺) e CD8⁺ (TCRβ⁺ CD8⁺, TCRβ⁺ CD8⁺ CD44⁺, TCRβ⁺ CD8⁺ CD62L⁺, TCRβ⁺ CD8⁺ Tbet⁺ e TCRβ⁺ CD8⁺ GranzimaB⁺) e NK (NK1.1⁺, NK1.1⁺ GranzimaB⁺, NK1.1⁺ Perforina⁺) nos esplenócitos em 8 dpi (**Figura 15, 16, 17, 18 e 19**).

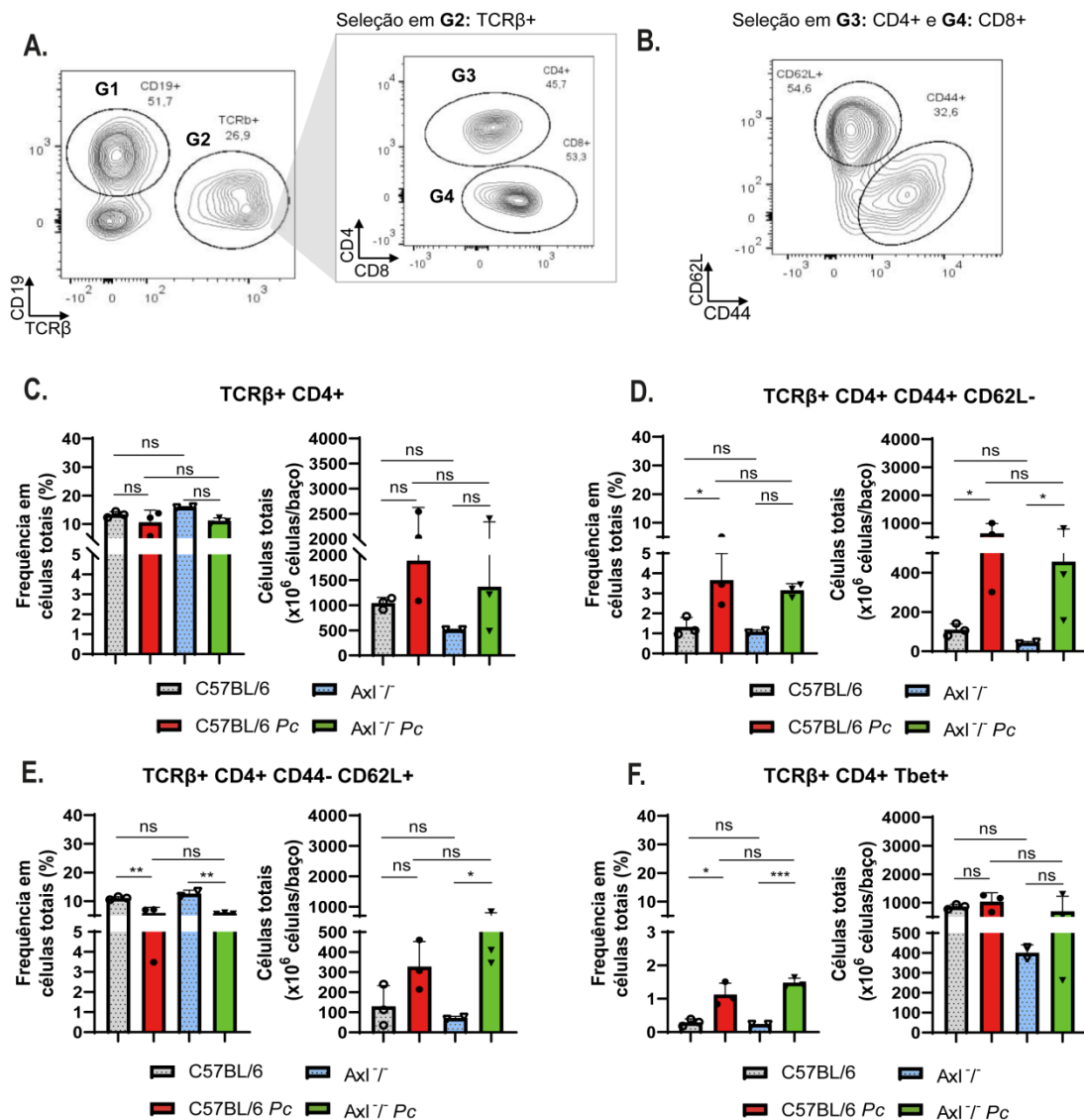


Figura 15. A ausência de Axl não tem influência na frequência e número absoluto de células nas populações T CD4+ na infecção por Pc. A e B. Estratégia de gate para a identificação das populações de células T e B. Primeiro, as células foram divididas em TCRβ+ e CD19+. Em seguida, no gate de TCRβ+, as células foram divididas em CD4+ e CD8+ e, posteriormente, em CD44+ ou CD62L+. **C - F.** Frequência e número absoluto das populações de células T CD4+. O eixo Y representa a frequência em células vivas totais (%) e número total (x10⁶ células/baço) e o eixo X e as barras representam os grupos de animais analisados (Cinza - C57BL/6; Vermelho - C57BL/6 infectado com Pc; Azul - Axl^{-/-}; Verde - Axl^{-/-} infectado com Pc). **C.** TCRβ+ CD4+. **D.** TCRβ+ CD4+ CD44+ CD62L-. **E.** TCRβ+ CD4+ CD44- CD62L+. **F.** TCRβ+ CD4+ Tbet+. (*, e ** = p < 0,005, ns = não significativo). Representativo de dois experimentos independentes.

A infecção por Pc em camundongos WT e Axl^{-/-} não induziu respostas diferentes nas diferentes populações de células T CD4+ no pico da infecção (**Figura 15C - F**). CD44 e CD62L são marcadores-chave para a ativação das células T, onde fenótipo *naive* é caracterizado por CD44^{low/neg} CD62L^{high} e o efetor por CD44^{high}

CD62L^{low/neg}. Essas células são ativadas e se diferenciam em células T efetoras após estimulação antigênica (YOUNGBLOOD; HALE; AHMED, 2013). Como esperado, há uma mudança entre as células T que expressam essas moléculas após a infecção, mas não há diferença entre os dois grupos infectados em relação à frequência e número absoluto (**Figura 15C - F**).

As populações destas células também foram analisadas de forma qualitativa, em relação às respostas mediadas por elas, como representado pela expressão do fator de transcrição T-bet em células T CD4⁺ (**Figura 15F**) com o intuito de caracterizar os mecanismos da imunidade adaptativa que possam contribuir para a diminuição de iRBC em camundongos *Axl*^{-/-}. T-bet é um fator de transcrição usado como marcador para identificar respostas Th1 - controlando as funções efetoras das células CD4⁺ - e também desempenha esse papel nas células CD8⁺ (SULLIVAN et al, 2003). As respostas Th1 são essenciais no controle da infecção por *Plasmodium* sp. (GOSH; STUMHOFER et al, 2021). Entretanto, não houve diferenças significativas na frequência ou número total desta população entre durante a infecção na ausência do receptor *Axl* (**Figura 15F**).

As células B e a produção de anticorpos IgG específicos anti-*Pc* também foram analisadas para a caracterização destas respostas, visto que estas contribuem para o controle durante a fase eritrocítica (WEINBAUM et al, 1976; GOSH; STUMHOFER, 2021). Todavia, foi observado que o receptor *Axl* não altera a produção de IgG total anti-*Pc* entre os grupos infectados e nem quantitativamente células B (CD19⁺ TCRβ⁻) (**Figura 16A e B**).

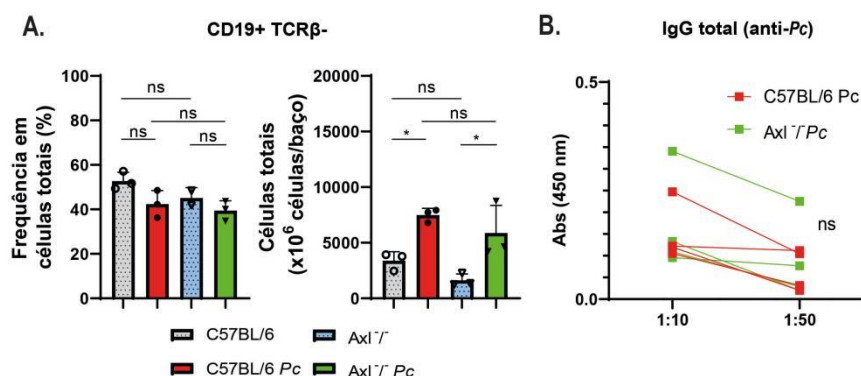


Figura 16. O receptor *Axl* não altera a frequência e quantidade total de células B e a produção de IgG total anti-*Pc*. **A.** Frequência e número absoluto das populações de células B (CD19⁺ TCRβ⁻). O eixo Y representa a frequência em células vivas totais (%) e número total (x10⁶ células/baço) e o eixo X e as barras representam os grupos de animais analisados (cinza - C57BL/6; vermelho - C57BL/6 infectado com *Pc*; azul - *Axl*^{-/-}, verde - *Axl*^{-/-} infectado com *Pc*). **B.** Produção de IgG total anti-*Pc* em

camundongos C57BL/6 e *Axl*^{-/-} infectados por *Pc* no 8 dpi. O eixo Y representa a absorvância em 450 nm e o eixo X representa as diferentes diluições (1:10 e 1:50) do plasma (* = p > 0,005, ns = não significativo). Representativo de dois experimentos independentes.

As células NK participam ativamente das respostas imunes mediadas durante a fase eritrocítica e sua ativação é ligada à sinalização de *Axl* (GAZZINELLI et al, 2014; STEVENSON; RILEY, 2004; AXELROD et al, 2014) e também foi incluída na análise. Além da frequência e do número absoluto de células, a produção de perforina e granzima B, grânulos líticos citoplasmáticos que medeiam a atividade citotóxica destas células, foi caracterizado. Contudo, a população de células NK também não foi afetada pela ausência de *Axl*, se mantendo similar aos camundongos selvagens (Figura 17).

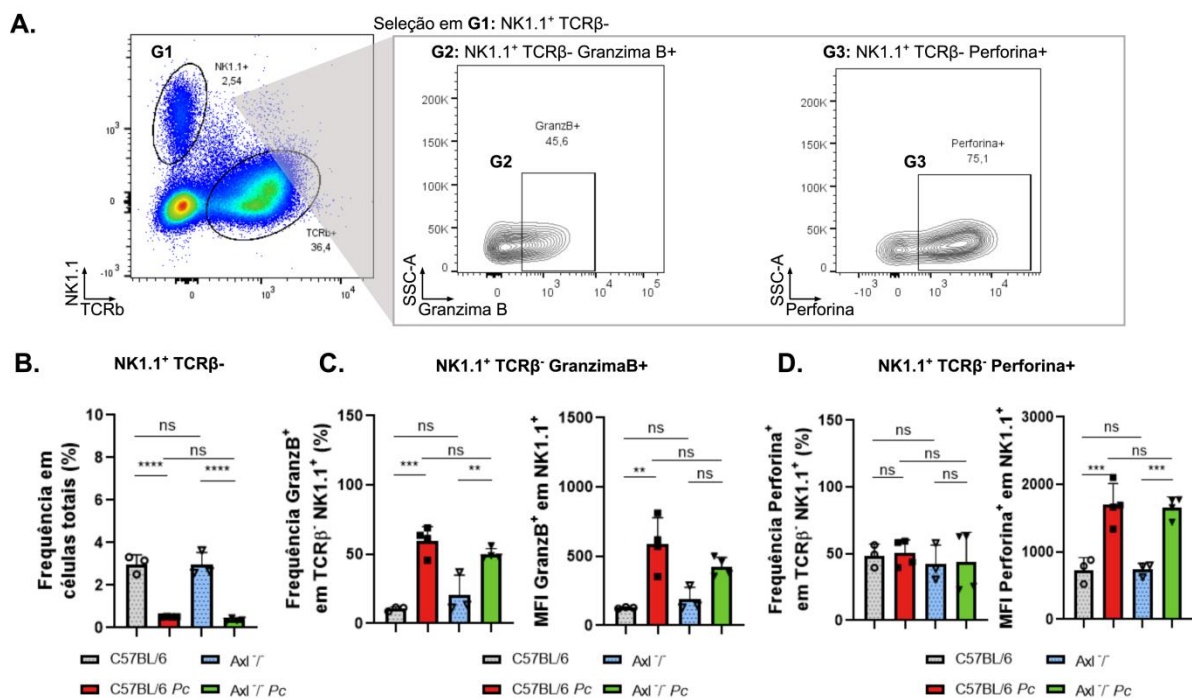


Figura 17. A ausência de *Axl* não influencia a frequência, número absoluto e resposta de células NK durante a infecção por *Pc*. **A.** Estratégia de gate para a identificação de populações de célula NK. Inicialmente, as células foram selecionadas dentro do gate de TCRβ⁻ NK1.1⁺ e depois selecionadas em Granzima B⁺ ou Perforina⁺. **B.** Frequência de células TCRβ⁻ NK1.1⁺ entre células vivas totais. O eixo Y representa a frequência em células vivas totais (%) e o eixo X e as barras representam os grupos de animais analisados (cinza - C57BL/6; vermelho - C57BL/6 infectado com *Pc*; azul - *Axl*^{-/-}; verde - *Axl*^{-/-} infectado com *Pc*). **C** e **D.** Frequência de células Granzima B⁺ ou Perforina⁺ dentro de TCRβ⁻ NK1.1⁺ e seus respectivos MFI.. O eixo Y representa a frequência em células TCRβ⁻ NK1.1⁺ (%) e MFI o eixo X e as barras representam os grupos de animais analisados (cinza - C57BL/6; vermelho - C57BL/6 infectado com *Pc*; azul - *Axl*^{-/-}; verde - *Axl*^{-/-} infectado com *Pc*). (*, **, *** e **** = p < 0,005, ns = não significativo).

Em relação às populações de células T CD8+, não houve diferenças na frequência e número absoluto do total (TCRβ+ CD8+) e exibindo os marcadores de ativação TCRβ+ CD8+ TCRβ+ CD8+ e TCRβ+ CD8+ CD44- CD62L- (**Figura 18A - C**). No entanto, quando analisado a atividade destas células por meio do fator de transcrição T-bet há um aumento na ausência de Axl (**Figura 18D**), concatenando com os dados da produção de granzima B e perforina neste grupo, que também é aumentado (**Figura 19B e D**, respectivamente). As células T CD8+ (CTLs) assim como NK, atuam na eliminação de patógenos por meio da exocitose de granzima B e a perforina (LORD et al, 2003) e sua produção é induzida por T-bet (CHATTOPADHYAY et al, 2009).

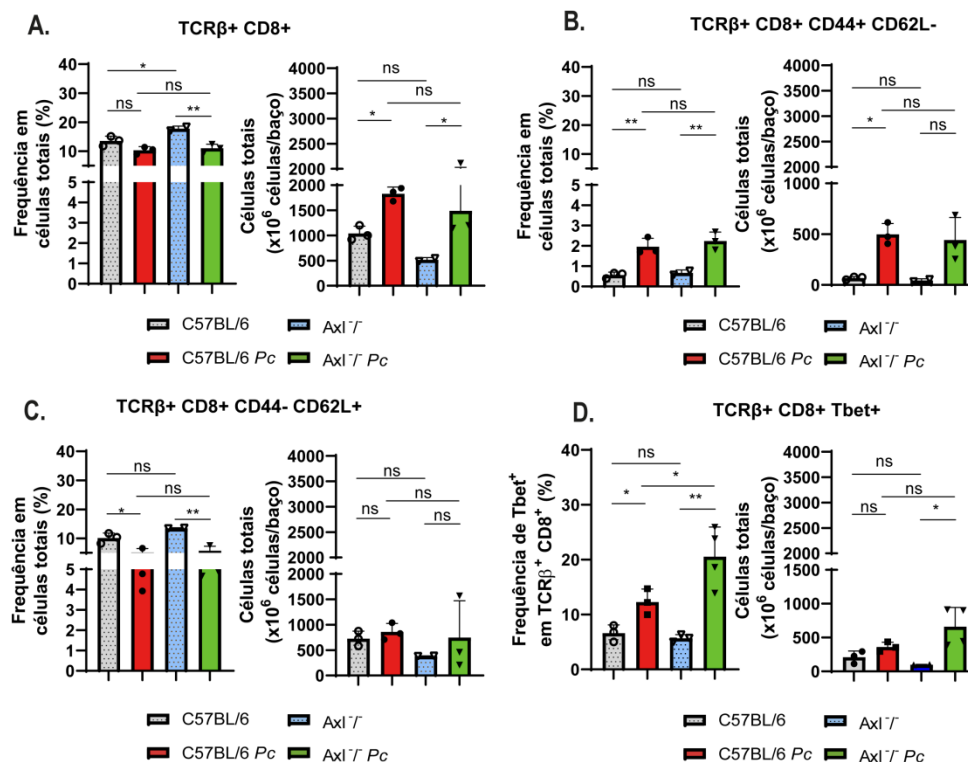


Figura 18. A ausência de Axl não altera a frequência e número total de células T CD8+ durante a infecção por Pc. A - D. Frequência de células e número total de células por baço. (A) TCRβ+ CD8+, (B) TCRβ+ CD8+ CD44+ CD62L-, (C) TCRβ+ CD8+ CD44- CD62L+, (D) TCRβ+ CD8+ Tbet+. O eixo Y representa a frequência da população nas células totais (%) ou o número total por baço (x10⁶). O eixo X e as barras representam os grupos de animais analisados (Cinza - C57BL/6; Vermelho - C57BL/6 infectado com Pc; Azul - Axl^{-/-}; Verde - Axl^{-/-} infectado com Pc.) (* e ** = p < 0,005, ns = não significativo). Representativo de dois experimentos independentes.

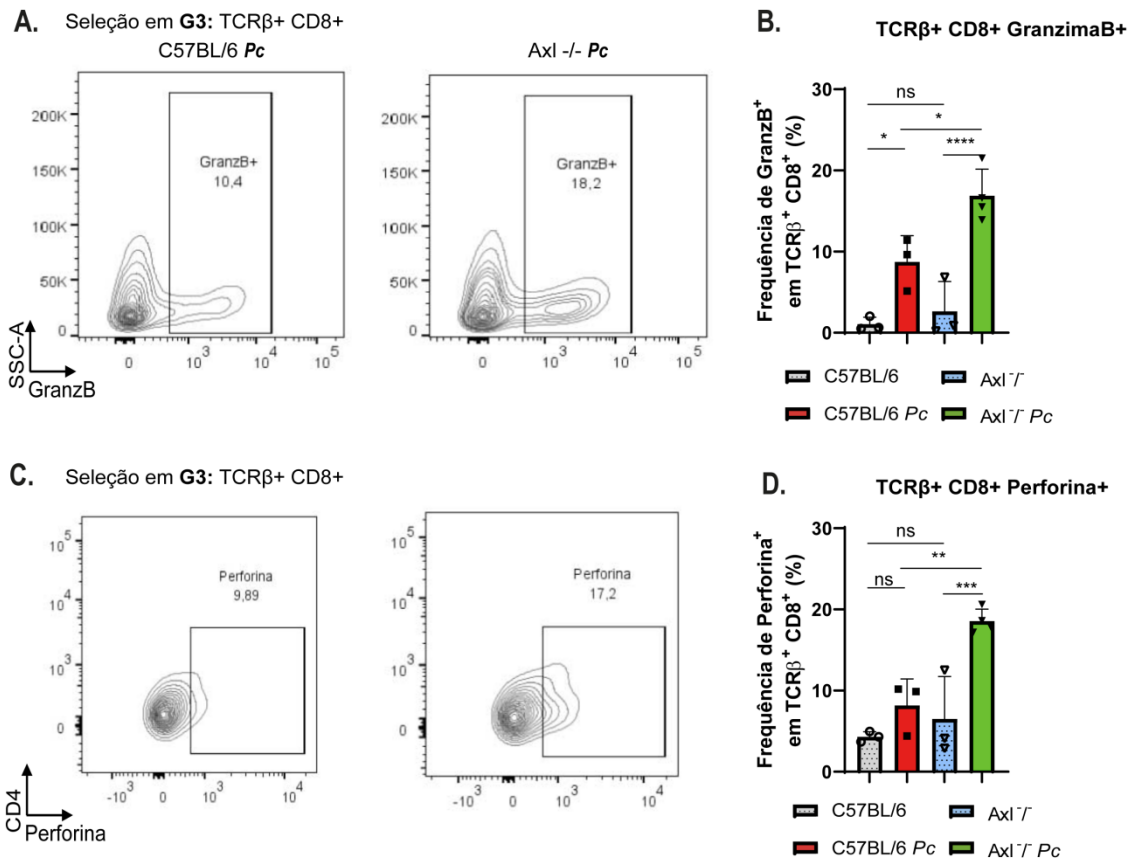


Figura 19. A ausência de Axl aumenta a atividade de células T CD8+ durante a infecção por *Pc*. **A.** Dotplot representativo de células GranzimaB+ dentro da população TCRβ+ CD8+ nos grupos infectados com *Pc* C57BL/6 e Axl^{-/-}. **B.** Frequência de células GranzimaB+ em TCRβ+ CD8+ O eixo Y representa a frequência de Tbet+ em células TCRβ+ CD8+ (%) e o eixo X e as barras representam os grupos de animais analisados (Cinza - C57BL/6; Vermelho - C57BL/6 infectado com *Pc*; Azul - Axl^{-/-}; Verde - Axl^{-/-} infectado com *Pc*). **C.** Dotplot representativo de células Perforina+ dentro da população TCRβ+ CD8+ nos grupos infectados com *Pc* C57BL/6 e Axl^{-/-}. **D.** Frequência de células Granzima B+ dentro de TCRβ+ CD8+ O eixo Y representa a frequência de Perforina+ em TCRβ+ CD8+ (%) e MFI o eixo X e as barras representam os grupos de animais analisados (Cinza - C57BL/6; Vermelho - C57BL/6 infectado com *Pc*; Azul - Axl^{-/-}; Verde - Axl^{-/-} infectado com *Pc*). (*, ** e **** = p < 0,005, ns = não significativo).

A caracterização das populações de células linfoides permitiram inferir que a ausência de Axl tem impacto direto nas respostas por células T CD8+, visto que pode ser observado um aumento nas populações de células ativadas (T CD8+ Tbet+) e CTLs (TCRβ+ CD8+ GranzimaB+) mas não de células T CD4+, B ou NK.

5.7 O RECEPTOR AXL CONTRIBUI PARA A ADESÃO E A FAGOCITOSE DE IRBCS NO FÍGADO

O fígado também é um órgão importante durante a infecção por *Pc*. Ainda que os modelos murinos representam apenas a fase eritrocítica, este órgão é extremamente vascularizado e há interação entre as iRBCs e populações celulares e moléculas neste local. Ainda, é um dos principais locais de acúmulo de iRBC e hemozoína, levando à inflamação hepática (DEROOST et al, 2014; HIRAKO et al, 2022; MOTA et al, 2000; BRUGAT et al, 2013).

Neste sentido, também avaliamos a contribuição da sinalização de Axl no fígado. Como notado a nível de transcrição gênica, Axl também é regulado positivamente nesse órgão, assim como a via JAK/STAT mediada por ele (**Figura 6 e 7**).

O processo de eferocitose é mediado por vários receptores presentes nas células fagocíticas que são capazes de se ligar efetivamente à PtdSer. As características de ligação e a via de sinalização desses receptores são bastante variadas. Os fagócitos profissionais frequentemente expressam concomitantemente diferentes receptores de eferocitose, variando de acordo com o tipo celular, localização e estímulos. A cooperação, sinergia e redundância funcional entre esses receptores são bem caracterizadas em vários representantes. Devido a esse fato, também é importante avaliar as implicações de outros receptores de eferocitose envolvidos durante a infecção por *Pc*. CD36, CD300lf e Tim-4 são receptores de eferocitose que têm um papel descrito durante a Malária (MCGILVRAY et al, 2000; KESWANI et al, 2020; IMAI et al, 2015).

Ainda, CD36 é uma importante molécula de adesão que possui essa função estritamente ligada à imunopatogênese da Malária (SERGHIDES et al, 2003; BACHMAN et al, 2022). Por esse motivo, foi investigada a expressão desses três receptores. Além disso, uma vez que a indução da expressão de moléculas de adesão é extremamente importante durante a infecção por *Plasmodium* sp. e a fosforilação do receptor TAM é descrita regulando positivamente VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais (VAN DER MEER et al, 2014), essas moléculas também foram incluídas na análise (**Figura 20**).

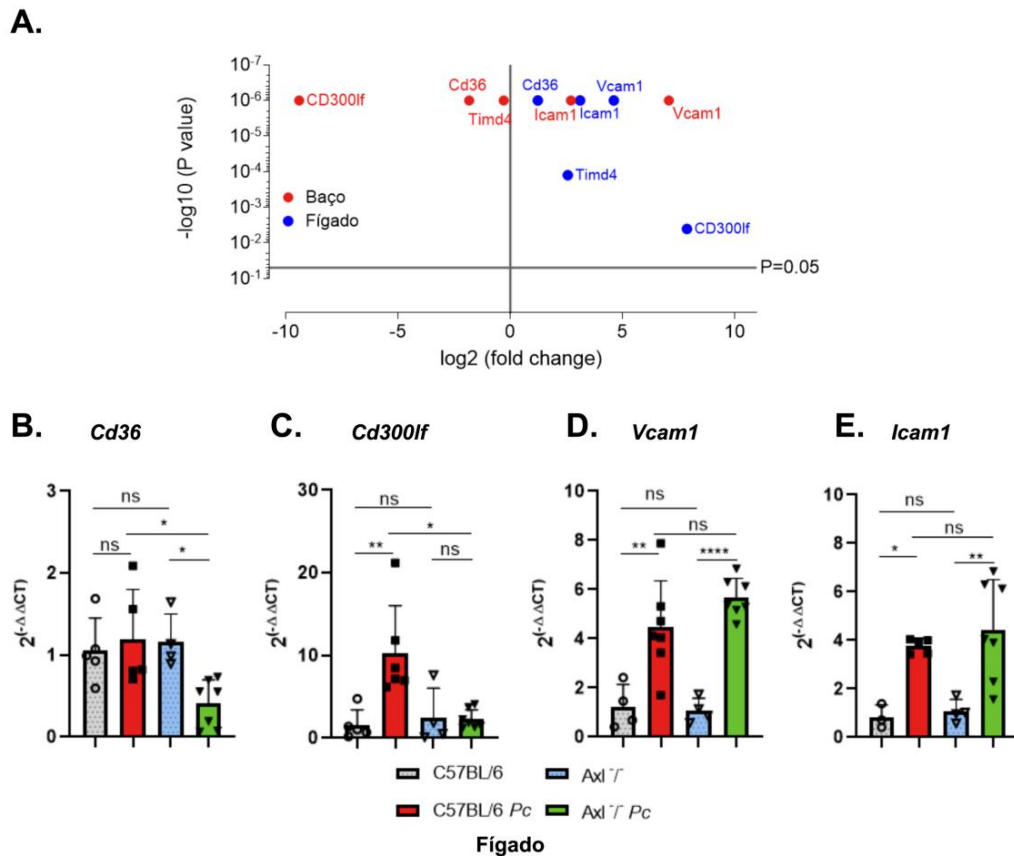


Figura 20. Axl modula a expressão de CD36 e CD300lf no fígado durante a infecção por *Pc*. A. Expressão de RNAm de Cd36, CD300lf, Tim4, Vcam1 e Icam1 no fígado total (azul) e no baço total (vermelho) em camundongos C57BL/6 não infectados e infectados com *Pc*. Os camundongos foram infectados com 105 iRBCs/camundongo via i.p e as amostras foram coletadas em 8 dpi. Disponibilidade dos dados de RNAseq: GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE109908>) com número de acesso GEO: GSE109908. O eixo y representa $-\log_{10}$ do valor de P resultante de múltiplos testes T de variação da expressão gênica entre os grupos controle e infectados, e o eixo x representa \log_2 dos valores de fold change resultantes da razão da expressão gênica dos grupos infectados/controle. **B - E.** Expressão relativa de Cd36, CD300lf, Vcam1 e Icam1, respectivamente, no fígado. O eixo Y representa a expressão relativa do gene ($2^{-\Delta\Delta CT}$) e o eixo X representa os grupos (cinza- C57BL/6, vermelho - C57BL/6 *Pc*, azul - Axl^{-/-} e verde - Axl^{-/-} *Pc*) (*, ** = $p < 0,05$; ns = não significativo).

Observou-se que, durante a infecção por *Pc*, o padrão de expressão dessas moléculas no baço e no fígado é diferente em 8 dpi (**Figura 20A**). No fígado, todas essas moléculas são induzidas durante a infecção, mas CD36, CD300lf e Tim-4 não são induzidos no baço de animais controle (**Figura 20A**). Para investigar se a indução dessas moléculas no fígado está relacionada ao receptor Axl, observou-se a expressão de RNAm no fígado de camundongos Axl^{-/-}. CD36 e CD300lf foram significativamente diminuídos na ausência desse receptor (**Figura 20B e C**,

respectivamente). Não foram observadas alterações significativas na transcrição de genes de *Vcam1* e *Icam1* entre os grupos de animais infectados (**Figura 20D e E**).

Visto que houve alteração da expressão de CD36 - molécula descrita como a principal responsável pela adesão, sequestro e fagocitose e iRBCs no fígado (BACHMANN et al, 2022; MOTA et al, 2000; BRUGAT et al, 2013) na ausência de *Axl*, foi realizada uma análise histopatológica e uma quantificação do acúmulo do pigmento de hemozoína neste local no pico da infecção. A hemozoína é observada principalmente dentro de fagócitos como as células de Kupffer e contribui para a inflamação local (HIRAKO et al, 2022) (**Figura 21**). Em concordância com a diminuição de CD36, há uma diminuição da presença de hemozoína no fígado destes animais (**Figura 21A e B**).

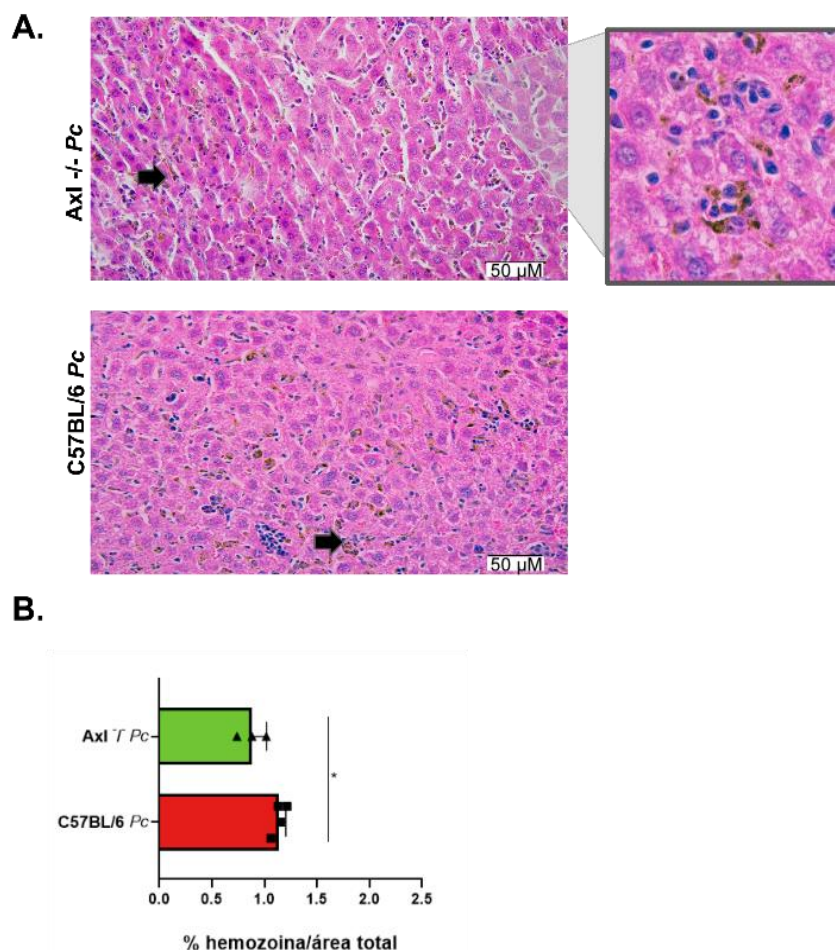


Figura 21. Na ausência de *Axl*, há menor acúmulo de hemozoína no fígado. A. Microscopia de luz (aumento de 40x) de lâminas de tecido do fígado coradas com HE no 8pi com *Pc* em animais *C57BL/6* e *Axl*^{-/-}. As setas pretas representam a hemozoína no tecido (em destaque no aumento de 100x). **B.** Área da lâmina histológica ocupada por hemozoína em relação ao campo total (%). O eixo X representa a porção de hemozoína (%) quantificada por pixels no software Image Pro sob a área total de tecido.

O eixo Y representa os grupos sendo C57BL/6 *Pc* representado em vermelho e Axl -/- *Pc* em verde. (* = $p < 0,005$). Representativo de dois experimentos independentes.

Esses resultados demonstram que a sinalização mediada pelo receptor Axl durante a infecção por *Pc* influencia a indução de CD36 e que sugere uma menor fagocitose/adesão das iRBCs neste local.

6. DISCUSSÃO

Os receptores TAM possuem funções extremamente relevantes para a modulação da resposta imune, atuando na eferocitose e induzindo uma via de sinalização que desencadeia mediadores pró e anti-inflamatórios. Devido a esses mecanismos, já foram descritos como papel fundamental nas respostas imunes e na patogênese de infecções por protozoários como *T. cruzi* e *L. major* (RIGONI et al, 2022; CHAVES et al, 2020). No entanto, durante a infecção por *Plasmodium* sp., nenhum estudo havia descrito a sua relação. No atual estudo, é demonstrado que a ausência de Axl há maior ativação de células T CD8+ citotóxicas que auxiliam na eliminação das iRBCs de forma mais eficiente levando à uma menor parasitemia no sangue periférico com consequente diminuição da lise destas células e liberação de hemozoína, levando à uma atenuação na inflamação sistêmica no pico da infecção. Ainda, constatou-se que parte da eferocitose de iRBCs é mediada por Axl.

A assinatura gênica característica da via JAK/STAT se demonstra expressiva na condição de infecção comparado ao controle em camundongos C57BL/6 - assim, estes sendo regulados positivamente - tanto no baço quanto no fígado. Estes órgãos possuem papel central nas respostas imunes da infecção por *Pc* (STEPHENS et al 2012; GOSH; STUMHOFER et al, 2021) - concentrando predominantemente as células que são responsáveis no controle da fase eritrocítica e associadas à patogênese. Confirmando a contribuição do receptor Axl na ativação desta via, foi observado que há uma menor transcrição gênica de *Stat1* e *Socs1* em animais Axl -/-. Portanto, em nossos resultados, foi identificado que a indução observada desta via de sinalização é mediada por receptores TAM - especificamente por Axl.

Durante a infecção, observou-se um aumento de sAxl mas não de sMertk. Ainda, em animais Mertk $-/-$, sAxl também é elevado na condição de infectado. Curiosamente, em animais Axl $-/-$, a infecção altera o fenótipo observado e leva à um aumento de sMertk. Isto sugere que Axl está sendo ativado durante a infecção mas não Mertk. Zagorska e colaboradores (2014) descreveram o receptor Axl com um papel dominante na sinalização JAK/STAT durante condições inflamatórias em relação ao Mertk, que medeia principalmente essa via durante a homeostase e em condições de imunossupressão. A regulação positiva da expressão desse receptor está correlacionada com estímulos anti-inflamatórios, como o fármaco dexametasona (WANKE et al, 2021; ZAGORSKA et al, 2014). No entanto, também sugere-se que na ausência de Axl, Mertk seja enfim ativado. Apesar de haver diferenças significativas em sua atividade dependendo do local do tecido, condições inflamatórias e outros fatores, os receptores TAM e outros receptores de eferocitose são conhecidos por seu papel redundante e cooperativo na remoção de células apoptóticas (JOHANN et al, 2006) e podem ter papel compensatório na ausência do outro.

Como JAK/STAT é a via preferencialmente ativada por Axl quando expresso em células mielóides, buscou-se caracterizar a variação da expressão deste receptor em populações celulares desta linhagem que possuem papel importante nas respostas imunes inatas à malária na fase eritrocítica como monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻), células dendríticas convencionais (cDCs) (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) e células dendríticas derivadas de monócitos (MODCs) (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺) esplênicas. A expressão de Axl em populações de células dendríticas e monócitos já foi descrita em diferentes estudos, como elencado na revisão por Lemke e Rothlin (2008) - mas possíveis alterações nos níveis basais ainda não haviam sido descritos durante a infecção por *Plasmodium* sp.

Nas três populações, a infecção por *Pc* regulou positivamente a expressão de Axl. Hirako e colaboradores (2016) propuseram que durante a infecção por *P. bergheii* ANKA, monócitos se diferenciam em células dendríticas - MO-DCs por meio de estímulos como sinalização TLR e citocinas. Estas foram caracterizadas pelos autores com alta capacidade fagocítica e recrutamento e ativação para células T CD8⁺ (HIRAKO et al, 2016) no cérebro, contribuindo para a patogênese nesse modelo com inflamação neurológica aumentada. Já as cDCs, foram descritas em sua eficiência na apresentação de antígenos a células T CD4⁺ e T CD8⁺ no contexto da infecção por *Plasmodium* sp. (AMORIM et al, 2016). A ativação de células T CD4⁺ é

importante em sua ativação polarizada de forma específica à tornar-se eficaz à eliminação do parasito intracelular e de células T CD8+ que induzem à morte das células infectadas (ABBAS et al, 2019; AMORIM et al, 2016).

Diferentes estudos já apresentaram que Axl desempenha um papel importante na ativação da sinalização JAK/STAT induzida por estímulos inflamatórios, como por ativação de TLR e do agonista do gene induzível pelo ácido retinóico I (RIG-1) e citocinas (por exemplo, TNF e IFN-1) (FLINT et al, 2022; ZAGORSKA et al, 2014). A ativação de diferentes receptores TLR é observada durante a infecção por *Plasmodium* sp. levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF (GAZZINELLI et al, 2014) - portanto fornecendo estímulos necessários à indução da expressão de Axl.

Então, com a regulação positiva e a ativação de Axl em monócitos, MODCs e cDCs esplênicas durante a infecção por *Pc*, construiu-se a hipótese de que este receptor estivesse relacionado aos seus mecanismos de resposta imune e possivelmente no desenvolvimento da infecção. Surpreendentemente, em camundongos Axl^{-/-}, a parasitemia no pico da infecção (8 dpi) e grupo heme livre no plasma foi significativamente reduzida comparada aos animais selvagens. Neste momento também, as principais citocinas inflamatórias como IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ e a quimiocina CCL2, aparecem em concentrações reduzidas - o que pode ser um reflexo da menor parasitemia e heme (DALKO et al, 2015). Os níveis de parasitemia e de grupo heme no plasma são proporcionalmente associados a casos mais graves de malária e piora dos sintomas (DALKO et al, 2015; TANGPUKDEE et al, 2012; CHIPWAZA et al, 2020). No entanto, isso não foi suficiente para evitar a perda de peso e hipotermia nestes animais e neste caso, essa associação direta não foi observada.

A contribuição de Axl para a menor parasitemia e lise de iRBCs foi avaliada em relação às suas funções principais já descritas 1) alterações nas respostas imunes por cascatas de sinalização que alteram mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios; e a 2) eferocitose. E em ambos os aspectos, identificamos alterações interessantes.

Em relação às respostas imunes, na ausência de Axl, há maior frequência de cDCs no baço dos animais infectados. É conhecido que a infecção por *Plasmodium* sp. leva à uma modulação nas DCs - alterando as respostas de células T mediadas por estas. RBCs infectadas por *P. yoelli* já foram identificadas como capazes de inibir

o amadurecimento de DCs mediante à ligantes para receptores TLR (ORENGO et al, 2008; BETTIOL et al, 2010). Orengo e colaboradores (2008) descrevem o mecanismo vinculado à liberação de fatores solúveis por estas células - ainda que não identificados. Ainda, Ribeiro-Gomes e colaboradores (2015) descreveram a inibição do amadurecimento de DCs e da sua função como APC de forma dependente da sinalização por Mertk. A regulação negativa de funções da resposta imune inata destes foram evidenciadas (LEMKE; BURSTYN-COHEN, 2010; ROTHLIN et al, 2007) - visto que a via JAK/STAT inibe a sinalização via TLR (XU et al, 2021; COTTALORDA et al, 2006). Neste contexto, é descrito que neutrófilos infectados por *L. major* são capturados por DCs e nelas, o receptor Mertk transduz sinais inibitórios ao desenvolvimento de DCs e a sua função de apresentação cruzada de antígenos (RIBEIRO-GOMES, 2015). Assim, é possível que a diferença frequência de cDCs observado esteja ligado à inibição por sinalização mediada por Axl propriamente dita ou pelo maior número de iRBCs em camundongos selvagens.

Estas populações são caracterizadas pela eficiência na apresentação de antígenos a células T CD4+ via MHC-II mas estão principalmente associadas à apresentação via MHC-I para células T CD8+ (BELZ et al, 2009). Lundie e colaboradores (2008) descreveram que a apresentação para estas células é dependente de populações de cDCs durante a infecção por *P. bergheii*. Compativelmente, foi observado uma maior ativação de células T CD8+ nestes animais - representado por maior expressão de T-bet e produção de granzima B e perforina.

As células T CD8+ são ativadas a partir da ligação de seus receptores TCR presentes na membrana e MHC-I nas células infectadas (ou por apresentação cruzada em APCs), além da interação entre os co-estimuladores entre ambas as células como, por exemplo, CD28 e CD86 (ABBAS et al, 2019). Lundie e colaboradores descreveram há a indução de respostas T CD8+ específicas às fases eritrocíticas da malária sendo mediadas por apresentação cruzada por cDCs em infecção por *P. bergheii* - mesmo que iRBCs não apresente seus antígenos para estas células pela ausência de MHC-I. Essa ligação leva à uma transdução de sinal que ativa genes específicos - por meio de fatores de transcrição como T-bet. Este, está relacionado com o comprometimento e a função efetora de células T CD4+ voltado à um perfil Th1 e também em células CD8+, controlando a produção de citocinas e as suas funções efetoras (SULLIVAN et al, 2003). Quando ativadas, essas células

proliferam e diferenciam-se em CTLs. As CTLs, por sua vez, podem mediar a morte das células infectadas por possuírem vesículas com grânulos citoplasmáticos como perforina e granzimas - que medeiam essa função (ABBAS et al, 2019; PENNOCK et al, 2013).

As perforinas e as granzimas são exocitadas das CTLs às células alvos. As perforinas se ligam à fosfolipídios da membrana se polimerizam - formando poros que permitem o influxo e o efluxo de íons e polipeptídeos. Assim, há um desbalanço homeostático nas células que compromete a integridade da membrana plasmática e da célula propriamente dita - levando à cascatas de sinalização pró-apoptóticas. Ainda, facilitam a entrada de granzimas - estas clivam resíduos específicos de aspartato nas proteínas das células alvo - levando também à apoptose das células (independente e também dependente de caspases) (OSIŃSKA et al, 2014; VELOTTI et al, 2020; TRAPANI; SMYTH, 2002).

O aumento de células T CD8⁺ expressando T-bet, granzima B e perforina já foi reportado durante a infecção por *Plasmodium* sp. em humanos (BUREL et al, 2016) e camundongos (CHANDELE et al, 2011; JUNQUEIRA et al, 2018). Este fenótipo - amplificado em *Axl*^{-/-}, pode explicar o melhor controle na parasitemia observado no pico da infecção destes animais. Com maior apresentação cruzada de antígenos das iRBCs e consequente ativação de CTLs, estas podem mediar a morte das células infectadas. O potencial de destruição de *Plasmodium* sp. pela granzima B e perforina já foi reportado em estudos *in vitro* (KAPELSZKI et al, 2014; HERNÁNDEZ-CASTAÑEDA et al; 2020) e *in vivo* (JUNQUEIRA et al, 2018).

Alternativamente, Imai e colaboradores (2015) descreveram que a atividade citotóxica destas células contribuem para o controle e a proteção da fase eritrocítica da infecção por *P. yoelli* de uma forma indireta. Em animais com células T CD8⁺ depletados, a parasitemia é maior comparado à grupos controles (IMAI et al, 2018). Este mecanismo foi descrito vinculado ao aumento na expressão de Fas na membrana de iRBCs. A morte celular pode ocorrer por via extrínseca - quando há interações entre receptores de morte celular e seus ligantes. Fas é um destes receptores, sendo expresso constitutivamente na maioria das células e quando se liga à FasL, pode redirecionar a célula à apoptose. Neste caso, a via Fas/FasL aumenta a expressão de PtdSer na membrana das células - como nas iRBCs. As células T CD8⁺ ativadas regulam positivamente a expressão de FasL e podem interagir com Fas presente na membrana das RBCs, levando a um aumento na expressão de

PtdSer. O aumento da expressão de PtdSer contribui para a rápida remoção de iRBCs por macrófagos presentes no baço. Estudos anteriores deste mesmo grupo, também comprovaram a colaboração entre células T CD8⁺ e macrófagos no controle da infecção por *Plasmodium* sp. por aumentar a sua capacidade fagocítica e neste em questão, apresenta a contribuição para aumento da susceptibilidade da fagocitose e eliminação de iRBCs pelo aumento de PtdSer (IMAI et al, 2010; IMAI et al, 2015).

Outra função importante avaliada no estudo, foi no contexto da eferocitose. A infecção por *Plasmodium* sp. leva à exposição de PtdSer em RBCs e iRBCs, contribuindo para a fagocitose destas células por intermédio de receptores de eferocitose como CD36 e Tim-4 (BOSURGI; ROTHLIN, 2021; TOTINO et al, 2016; KESWANI et al, 2019; PATEL et al, 2004; IMAI et al, 2015). Os esplenócitos de camundongos *Axl*^{-/-} infectados por *Pc* apresentaram defeito na fagocitose de iRBCs *in vitro* em comparação com os animais selvagens. Este resultado é interessante, visto que até o presente momento, *Axl* não havia sido descrito como um mediador da fagocitose de iRBCs durante a infecção por *Plasmodium* sp.

Essa alteração também pode levar à construção de hipóteses em sua contribuição no controle da parasitemia observado no pico da infecção. Deve ser considerado que a eferocitose pode ter caráter prejudicial ao hospedeiro dependendo da infecção (BOSURGI; ROTHLIN, 2021). Já foi relatado que *Pc* é capaz de infectar e persistir dentro de populações de DCs como CD317⁺ no baço por meio da fagocitose de iRBCs. Nestas células, foi identificado a multiplicação e a liberação de novas formas infectivas - atuando como reservatório de infecção (WYKES et al, 2011). A refratariedade à infecção por RBCs apoptóticas também pode ser levado em consideração no fenótipo observado. Totino e colaboradores demonstraram que RBCs apoptóticas são significativamente menos suscetíveis à infecção por *P. falciparum*. Isso se deve às mudanças estruturais e conformacionais na superfície das células e em sem citoesqueleto (TOTINO et al, 2011). Na ausência de eferocitose, pode haver um acúmulo de RBCs apoptóticas que impede novos ciclos de infecção pelos merozoítos, diminuindo a carga parasitária observada no sangue periférico - contribuindo para o fenótipo observado.

Além das respostas imunológicas observadas no baço - que representa um recorte de um ponto de vista sistêmico pela sua função - também foram identificadas alterações no fígado durante a infecção por *Pc*. *Axl* é regulado positivamente nesse

órgão, assim como a via JAK/STAT mediada por ele. Em sua ausência, foi verificado uma transcrição menor de *Cd36*. É sabido que há um intenso sequestro de iRBCs no local mediante a infecção por *Pc* e CD36 é o receptor de maior contribuição na adesão e fagocitose destas células (BACHMANN et al, 2022; MORTA et al, 2000). Essa diminuição na indução da expressão de *Cd36* sugere menor adesão e/ou fagocitose das iRBCs neste órgão - o que concatena com os dados da presença de menor acúmulo de hemozoína neste local - visto que este é observado principalmente no interior das populações fagocíticas como as células de Kupffer (HIRAKO et al, 2022).

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo concluem que o receptor Axl e a sua via JAK/STAT em monócitos (CD11b⁺ F4/80⁺ DC-SIGN⁻), células dendríticas convencionais (cDCs) (CD11b⁻ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁻) e células dendríticas derivadas de monócitos (MODCs) (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC-SIGN⁺) é ativado durante a infecção por *Pc*. Na ausência desta sinalização, há um aumento no recrutamento de cDCs no baço o que sugere maior apresentação de antígenos a células T CD8⁺, visto que é observando um aumento na sua atividade citotóxica no pico da infecção. Neste momento também, a parasitemia no sangue periférico é reduzida - apresentando maior destruição das iRBCs. De forma inédita, o estudo também apresenta Axl como um mediador na eferocitose de iRBCs. A ausência deste processo também pode estar contribuindo com o fenótipo observado. Localmente no fígado, há menor acúmulo de hemozoína e expressão de CD36, o que sugere menor fagocitose e sequestro de iRBCs - o que também pode haver contribuição da ausência da eferocitose também por Axl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. H.. **Imunologia celular e molecular**. 9 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019, 565 p.

ALOUT, H.; LABBÉ, P.; CHANDRE, F.; COHUET, A.. Malaria Vector Control Still Matters despite Insecticide Resistance. **Trends In Parasitology**, v. 33, n. 8, p. 610-618, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.006>.

ALMEIDA, N. C. V.; LOUZADA, J.; NEVES, M. S. A. S.; CARVALHO, T. M.; CASTRO-ALVES, J.; SILVA-DO-NASCIMENTO, T. F.; ESCALANTE, A. A.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.. Larval habitats, species composition and distribution of malaria vectors in regions with autochthonous and imported malaria in Roraima state, Brazil. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, p. 1-2, 14 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-021-04033-1>.

AMORIM, K. N. S.; CHAGAS, D. C. G.; SULCZEWSKI, F. B.; BOSCARDIN, Silvia B.. Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. **Journal Of Immunology Research**, v. 2016, p. 1-11, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2926436>.

AXELROD, H.; PIENTA, K. J.. Axl as a mediator of cellular growth and survival. **Oncotarget**, v. 5, n. 19, p. 8818-8852, 15 out. 2014. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2422>.

BACHMANN, A.; METWALLY, N. G.; ALLWEIER, J.; CRONSHAGEN, J.; TAULER, M. P. M.; MURK, A.; ROTH, L. K.; TORABI, H.; WU, Y.; GUTSMANN, T. CD36—A Host Receptor Necessary for Malaria Parasites to Establish and Maintain Infection. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2356, 29 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10122356>

BAIA-DA-SILVA, D. C.; BRITO-SOUSA, J. D.; RODOVALHO, S. R.; PETERKA, C.; MORESCO, G.; LAPOUBLE, O. M. M.; MELO, G. C.; SAMPAIO, V. S.; ALECRIM, M. G. C.; PIMENTA, P. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0542-2018>.

BENELLI, G.; BEIER, J. C.. Current vector control challenges in the fight against malaria. **Acta Tropica**, v. 174, p. 91-96, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.028>.

BHATT, S.; WEISS, D. J.; CAMERON, E.; BISANZIO, D.; MAPPIN, B.; DALRYMPLE, U.; BATTLE, K. E.; MOYES, C. L.; HENRY, A.; ECKHOFF, P. A.. The effect of malaria control on Plasmodium falciparum in Africa between 2000 and 2015. **Nature**, v. 526, n. 7572, p. 207-211, 16 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15535>.

BLANCHETTE, J.; JARAMILLO, M.; OLIVIER, M.. Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. **Immunology**, v. 108, n. 4, p. 513-522, abr. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01620.x>.

BOSURGI, L.; ROTHLIN, C. V.. Management of cell death in parasitic infections. **Seminars In Immunopathology**, v. 43, n. 4, p. 481-492, 19 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-021-00875-8>.

BOULET, C.; DOERIG, C. D.; CARVALHO, T. G.. Manipulating Eryptosis of Human Red Blood Cells: a novel antimalarial strategy?. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 1-1, 30 nov. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2018.00419>.

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; BIANCO JÚNIOR, C.; SILVA, S.; AREAS, A. L. L.; PELAJO-MACHADO, M.; ALVARENGA, D. A. M.; SANTELLI, A. C. F. S.. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. 1038-1046, out. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x\(17\)30333-9](http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x(17)30333-9).

BROWN, M.; BLACK, J. R M; SHARMA, R.; STEBBING, J.; PINATO, D. J. Gene of the month: axl. *Journal Of Clinical Pathology*, . v. 69, n. 5, p. 391-397, 7 mar. 2016. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2016-203629>.

BRUGAT, T.; CUNNINGHAM, D.; SODENKAMP, J.; COOMES, S.; WILSON, M.; SPENCE, P. J.; JARRA, W.; THOMPSON, J.; SCUDAMORE, C.; LANGHORNE, J. Sequestration and histopathology in Plasmodium chabaudi malaria are influenced by the immune response in an organ- specific manner. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 687-700, 30 set. 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12212>.

BUREL, J. G.; APTE, S. H.; MCCARTHY, J. S.; DOOLAN, D. L.. Plasmodium vivax but Not Plasmodium falciparum Blood-Stage Infection in Humans Is Associated with the Expansion of a CD8+ T Cell Population with Cytotoxic Potential. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1, 8 dez. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005031>.

BYKERSMA, A. The New Zoonotic Malaria: plasmodium cynomolgi. **Tropical Medicine And Infectious Disease**, v. 6, n. 2, p. 46, 5 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed6020046>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **About Malaria**. CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>. Acesso em: 05 jul., 2023.

CHANDELE, A.; MUKERJEE, P.; DAS, G.; AHMED, R.; CHAUHAN, V. S.. Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with Plasmodium yoelii. **Immunology**, v. 132, n. 2, p. 273-286, 29 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03363.x>.

CHATTOPADHYAY, P. K; BETTS, M. R; A PRICE, D.; GOSTICK, E.; HORTON, H.; ROEDERER, M.; ROSA, S. C.. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright cd57 expression. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 1, p. 88-97, 26 set. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0208107>.

CHAVES, M. M.; LEE, S. H.; KAMENYEVA, O.; GHOSH, K.; PETERS, N. C.; SACKS, D. The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of Leishmania major infection transmitted by

sand fly bite. **Plos Pathogens**, v. 16, n. 11, 2 nov. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008674>

COHEN, J. M.; OKUMU, F.; MOONEN, B. The fight against malaria: Diminishing gains and growing challenges. **Science Translational Medicine**. v. 14, n. 651, jun. 2022. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.abn3256>

COHUET, A.; HARRIS, C.; ROBERT, V.; FONTENILLE, D.. Evolutionary forces on Anopheles: what makes a malaria vector?. **Trends In Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 130-136, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2009.12.001>.

CHIPWAZA, B.; SUMAYE, R. D.. High malaria parasitemia among outpatient febrile children in low endemic area, East-Central Tanzania in 2013. **Bmc Research Notes**, v. 13, n. 1, p. 1-2, 24 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-020-05092-4>.

DECOTE-RICARDO, D.; NUNES, M. P.; MORROT, A.; FREIRE-DE-LIMA, Celio G.. Implication of Apoptosis for the Pathogenesis of Trypanosoma cruzi Infection. **Frontiers In Immunology**, v. 81, n. 1, p. 1, 9 maio 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00518>.

DIMOPOULOS, G.; KAFATOS, F. C.; WATERS, A. P.; SINDEN, R.. Malaria Parasites and the Anopheles Mosquito. **Chemical Immunology And Allergy**, p. 27-49, 2002. KARGER. <http://dx.doi.org/10.1159/000058838>.

EDA, S.; SHERMAN, I. Cytoadherence of Malaria-Infected Red Blood Cells Involves Exposure of Phosphatidylserine. **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 12, n. 5-6, p. 373-384, 2002. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000067908>.

FRITA, R.; CARAPAU, D.; MOTA, M. M.; HÄNSCHEID, T. In Vivo Hemozoin Kinetics after Clearance of Plasmodium berghei Infection in Mice. **Malaria Research And Treatment**, v. 2012, p. 1-9, 11 abr. 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/373086>.

FUJIMORI, T.; GRABIEC, A. M.; KAUR, M.; BELL, T. J.; FUJINO, N.; COOK, P. C.; SVEDBERG, F. R.; MACDONALD, A.; MACIEWICZ, R.; SINGH, D. The Axl receptor tyrosine kinase is a discriminator of macrophage function in the inflamed lung. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 5, p. 1021-1030, 21 jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2014.129>

GAZZINELLI, R. T.; KALANTARI, P.; FITZGERALD, K. A.; GOLENBOCK, D. T.. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744-757, 17 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3742>

GETHING, P. W.; CASEY, D. C.; WEISS, D. J.; BISANZIO, D; BHATT, S.; CAMERON, E.; BATTLE, K. E.; DALRYMPLE, U.; ROZIER, J.; RAO, Puja C.. Mapping Plasmodium falciparum Mortality in Africa between 1990 and 2015. **New England Journal Of Medicine**, v. 375, n. 25, p. 2435-2445, 22 dez. 2016. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1606701>.

GRIGG, M. J; SNOUNOU, G. Plasmodium simium: a brazilian focus of anthropozoonotic vivax malaria?. *The Lancet Global Health*, v. 5, n. 10, p. 961-962, out. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x\(17\)30343-1](http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x(17)30343-1).

HERNÁNDEZ-CASTAÑEDA, M. A.; HAPP, K.; CATTALANI, F.; WALLIMANN, A.; BLANCHARD, M.; FELLAY, I.; SCOLARI, B.; LANNES, N.; MBAGWU, S.; FELLAY, B. $\gamma\delta$ T Cells Kill Plasmodium falciparum in a Granzyme- and Granulysin-Dependent Mechanism during the Late Blood Stage. **The Journal Of Immunology**, v. 204, n. 7, p. 1798-1809, 1 abr. 2020. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1900725>.

IMAI, T.; ISHIDA, H.; SUZUE, K.; TANIGUCHI, T.; OKADA, H.; SHIMOKAWA, C.; HISAEDA, H. Cytotoxic activities of CD8+ T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. **Elife**, v. 4, n. 1, 11 mar. 2015. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.04232>.

JANI, D.I; NAGARKATTI, R.; BEATTY, W.; ANGEL, R.; SLEBODNICK, Carla; ANDERSEN, J.; KUMAR, S.; RATHORE, D. HDP—A Novel Heme Detoxification Protein from the Malaria Parasite. **Plos Pathogens**, . v. 4, n. 4, p. 1-2, 25 abr. 2008. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000053>.

JOHANN, A M; VON KNETHEN, A; LINDEMANN, D; BRÜNE, B. Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and attenuates the oxidative burst. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 9, p. 1533-1540, 9 dez. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401832>.

JUNQUEIRA, C.; BARBOSA, C. R. R.; COSTA, P. A. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CASTRO, G.; SANTARA, S. S.; BARBOSA, R. P.; DOTIWALA, F.; PEREIRA, D. B.; ANTONELLI, L. R. LIEBERMAN, J. GAZZINELLI, R. T. Cytotoxic CD8+ T cells recognize and kill Plasmodium vivax–infected reticulocytes. **Nature Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1330-1336, 23 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0117-4>.

KAPELSKI, Stephanie; ALMEIDA, Melanie de; FISCHER, Rainer; BARTH, Stefan; FENDEL, Rolf. Antimalarial Activity of Granzyme B and Its Targeted Delivery by a Granzyme B–Single-Chain Fv Fusion Protein. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 669-672, jan. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.04190-14>.

KESWANI, T.; ROLAND, J.; HERBERT, F.; DELCROIX-GENETE, D.; ROY, H. B.; GAAYEB, L.; CAZENAVE, P.; PIED, S.. Expression of CD300lf by microglia contributes to resistance to cerebral malaria by impeding the neuroinflammation. **Genes & Immunity**, v. 21, n. 1, p. 45-62, 10 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41435-019-0085-9>.

KIHARA, T.; TORIUCHI, K.; AOKI, H.; KAKITA, H.; YAMADA, Y.; AOYAMA, M. Interleukin-1 β enhances cell adhesion in human endothelial cells via microRNA-1914–5p suppression. **Biochemistry And Biophysics Reports**, v. 27, p. 101046, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101046>.

LAURENS, M. B.. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 16, n. 3, p. 480-489, 22 out. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>.

LAW, L. A.; GRAHAM, D. K.; PAOLA, J.; BRANCHFORD, B. R.. GAS6/TAM Pathway Signaling in Hemostasis and Thrombosis. *Frontiers In Medicine*, v. 5, n. 1, p. 1-1, 9 maio 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2018.00137>.

LEMKE, G.. Biology of the TAM Receptors. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 5, n. 11, 1 nov. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a009076>.

LEMKE, G.; ROTHLIN, C. V.. Immunobiology of the TAM receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 327-336, maio 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2303>.

LEONG, Y. W.; RUSSELL, B.; MALLERET, B.; RÉNIA, L.. Erythrocyte tropism of malarial parasites: the reticulocyte appeal. **Frontiers In Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1, 26 out. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.1022828>.

LEW, E. D; OH, J.; BURROLA, P. G; LAX, I.; ZAGÓRSKA, A.; TRAVÉS, P. G; SCHLESSINGER, J.; LEMKE, G.. Differential TAM receptor–ligand–phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife*, v. 3, n. 1, p. 1-2, 29 set. 2014. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.03385>.

LI, Y.; WITTCHEIN, E. S.; MONAGHAN-BENSON, E.; HAHN, C.; EARP, H. S.; DOERSCHUK, C. M.; BURRIDGE, K.. The role of endothelial MERTK during the inflammatory response in lungs. **Plos One**, . v. 14, n. 12, p. 1, 5 dez. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0225051>.

LIMONGI, J. E.; COSTA, D. C.; CARVALHO, L. H.; LOPES, I. S.; SILVA, A. A.; FERREIRA, M. S. Plasmodium ovale malaria in Brazil: report of an imported case with a prolonged incubation period. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, v. 8, n. 04, p. 554-557, 15 abr. 2014. Journal of Infection in Developing Countries. <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.4037>.

LORD, S. J.; RAJOTTE, R. V.; KORBUTT, G. S.; BLEACKLEY, R. C.. Granzyme B: a natural born killer. **Immunological Reviews**, v. 193, n. 1, p. 31-38, 12 maio 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00044.x>.

LUNDIE, R. J. Antigen presentation in immunity to murine malaria. **Current Opinion In Immunology**, v. 23, n. 1, p. 119-123, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.09.006>.

LUNDIE, R. J.; KONING-WARD, T. F. de; DAVEY, G. M.; NIE, C. Q.; HANSEN, D. S.; LAU, L. S.; MINTER, J. D.; BELZ, G. T.; SCHOFIELD, L.; CARBONE, F. R.. Blood-stage Plasmodium infection induces CD8 + T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8α + dendritic cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 38, p. 14509-14514, 23 set. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806727105>.

MCGILVRAY, I. D.; SERGHIDES, L.; KAPUS, A.; ROTSTEIN, O. D.; KAIN, K. C.. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for cd36 in malarial clearance. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3231-3240, 1 nov. 2000. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v96.9.3231>.

MCQUEEN, P. G.; MCKENZIE, F. E.. Age-structured red blood cell susceptibility and the dynamics of malaria infections. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 101, n. 24, p. 9161-9166, 3 jun. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308256101>

MOON, B.; LEE, J.; LEE, S.; MIN, C.; MOON, H.; KIM, D.; YANG, S.; MOON, H.; JEON, J.; JOO, Y.. Mertk Interacts with Tim-4 to Enhance Tim-4-Mediated Efferocytosis. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1625, 6 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9071625>.

MIKOLAJCZAK, S. A.; VAUGHAN, A. M.; KANGWANRANGSAN, N.; ROOBSONG, W.; FISHBAUGHER, M.; YIMAMNUAYCHOK, N.; REZAKHANI, N.; LAKSHMANAN, V.; SINGH, N.; KAUSHANSKY, A. Plasmodium vivax Liver Stage Development and Hypnozoite Persistence in Human Liver-Chimeric Mice. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 4, p. 526-535, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.011>.

MILLER, L. H; ACKERMAN, H. C; SU, X.; WELLEMS, T.. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156-167, fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3073>.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNISS, M. H.. The Resistance Factor to Plasmodium vivax in Blacks. **New England Journal Of Medicine**, v. 295, n. 6, p. 302-304, 5 ago. 1976. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm197608052950602>.

MILLER, J. L.; SACK, B. K.; BALDWIN, M.; VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H.I.. Interferon-Mediated Innate Immune Responses against Malaria Parasite Liver Stages. **Cell Reports**, v. 7, n. 2, p. 436-447, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.018>.

MILNER, D. A.. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 8, n. 1, p. 025569-2, 22 maio 2017. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Malária: o que é, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>. Acesso em: 07 jul. 2023.

MONACO, G.; CHEN, H.; POIDINGER, M.; CHEN, J.; MAGALHÃES, J. P.; LARBI, A.. FlowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 16, p. 2473-2480, 10 abr. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btw191>.

MOTA, M. M.; BROWN, K. N.; HOLDER, A. A.; JARRA, W. Acute Plasmodium chabaudi chabaudi Malaria Infection Induces Antibodies Which Bind to the Surfaces of Parasitized Erythrocytes and Promote Their Phagocytosis by Macrophages In Vitro. *Infection And Immunity*, v. 66, n. 9, p. 4080-4086, set. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.66.9.4080-4086.1998>.

MUXEL, S. M. Papel das células T convencionais e não-convencionais do baço durante a infecção pelo Plasmodium chabaudi AS. 2011. 116 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-12082011-110633/pt-br.php>. Acesso em: 07 jul. 2023.

NADEEM, A. Y.; SHEHZAD, A.; ISLAM, S. U.; AL-SUHAIMI, E. A.; LEE, Y. S. Mosquirix™ RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy. *Vaccines*, v. 10, n. 5, p. 713, 30 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines10050713>.

NICOLETTI, M.. Three scenarios in insect-borne diseases. *Insect-Borne Diseases In The 21St Century*, p. 99-251, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-818706-7.00005-x>.

OLATUNDE, A. C.; CORNWALL, D. H.; ROEDEL, M.; LAMB, T. J.. Mouse Models for Unravelling Immunology of Blood Stage Malaria. *Vaccines*, v. 10, n. 9, p. 1525, 14 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines10091525>.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B., TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, v. 9, n. 115, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-115>

OSIŃSKA, I.; POPKO, K.; DEMKOW, U. Perforin: an important player in immune response. *Central European Journal Of Immunology*, v. 1, p. 109-115, 2014. Termedia Sp. z.o.o.. <http://dx.doi.org/10.5114/ceji.2014.42135>.

PASTERNAK, N. D.; DZIKOWSKI, R. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite plasmodium falciparum. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, v. 41, n. 7, p. 1463-1466, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2008.12.012>.

PATEL, S. N.; SERGHIDES, L.; SMITH, Todd G.; FEBBRAIO, M.; SILVERSTEIN, R. L.; KURTZ, T. W.; PRAVENEK, M.; KAIN, K. C.. CD36 Mediates the Phagocytosis of Plasmodium falciparum–Infected Erythrocytes by Rodent Macrophages. *The Journal Of Infectious Diseases*, v. 189, n. 2, p. 204-213, 15 jan. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/380764>.

PENNOCK, N. D.; WHITE, J. T.; CROSS, E. W.; CHENEY, E. E.; TAMBURINI, B. A.; KEDL, R. M.. T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advances In Physiology Education*, v. 37, n. 4, p. 273-283, dez. 2013. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/advan.00066.2013>.

PERLMANN, P.; TROYE-BLOMBERG, M.. Malaria and the Immune System in Humans. **Chemical Immunology And Allergy**, p. 229-242, 2002. KARGER. <http://dx.doi.org/10.1159/000058846>.

PRYCE, J.; RICHARDSON, M.; LENGELER, C.. Insecticide-treated nets for preventing malaria. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, 6 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd000363.pub3>.

RAMAPRASAD, A.; KLAUS, S.; DOUVROPOULOU, O.; CULLETON, R.; PAIN, A.. Plasmodium vinckei genomes provide insights into the pan-genome and evolution of rodent malaria parasites. **Bmc Biology**, v. 19, n. 1, 23 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-021-00995-5>.

RAPIDO, F. The potential adverse effects of haemolysis. **Blood Transfusion**, v. 2, n. 1, p. 1-2, 2017. Edizioni SIMTI. <http://dx.doi.org/10.2450/2017.0311-1>

RAZI, S.; KHOJINI, J. Y.; KARGARIJAM, F.; PANAHI, S.; TAHERSHAMSI, Z.; TAJBAKHS, A.; GHEIBIHAYAT, S. M.. Macrophage efferocytosis in health and disease. **Cell Biochemistry And Function**, v. 41, n. 2, p. 152-165, 16 fev. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.3780>.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A.. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal Of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1281-1283, 15 mar. 2004. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00963>.

RIBEIRO-GOMES, F L; A ROMANO,; LEE, S; ROFFê, E; PETERS, N C; DEBRABANT,; SACKS, D. Apoptotic cell clearance of Leishmania major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8+ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 12, p. 1, 10 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.351>.

RICHARDS, A. L.. Tumour Necrosis Factor and Associated Cytokines in the host's response to malaria. **International Journal For Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1251-1263, out. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00122-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00122-7).

RIGONI, T. S.; VELLOZO, N. S.; GUIMARÃES-PINTO, K.; CABRAL-PICCIN, M.; FABIANO-COELHO, L.; MATOS-SILVA, T. C.; FILARDY, A. A.; TAKIYA, C.M.; LOPES, M. F.. Axl receptor induces efferocytosis, dampens M1 macrophage responses and promotes heart pathology in Trypanosoma cruzi infection. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, 29 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-022-04401-w>.

ROTHLIN, C. V.; GHOSH, S.; ZUNIGA, E. I.; OLDSTONE, M. B.A.; LEMKE, G.. TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1124-1136, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.034>.

ROWE, J. A.; CLAESSENS, A.; CORRIGAN, R. A.; ARMAN, M. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Expert Reviews In Molecular Medicine**, v. 11, n. 1, p.

1-2, maio 2009. Cambridge University Press (CUP).
<http://dx.doi.org/10.1017/s1462399409001082>

SABBATANI, S.; FIORINO, S.; MANFREDI, R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern?. **Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 299-309, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s1413-86702010000300019>.

SATO, S.. Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *Journal Of Physiological Anthropology*, v. 40, n. 1, p. 1-2, 7 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>.

SCHWARTZ, R.; OLSON, J.; RAVENTOS-SUAREZ, C; YEE, M; HEATH, R.; LUBIN, B; NAGEL, R.. Altered plasma membrane phospholipid organization in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood*, v. 69, n. 2, p. 401-407, 1 fev. 1987. American Society of Hematology.
<http://dx.doi.org/10.1182/blood.v69.2.401.401>.

SCOVINO, A. M.; TOTINO, P. R. R.; MORROT, A.. Eryptosis as a New Insight in Malaria Pathogenesis. **Frontiers In Immunology**, v. 13, 13 maio 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.855795>.

SEITZ, H. M.; CAMENISCH, T. D.; LEMKE, G.; EARP, H. S.; MATSUSHIMA, G.K.. Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells. **The Journal Of Immunology**, v. 178, n. 9, p. 5635-5642, 1 maio 2007. The American Association of Immunologists.
<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5635>.

SERGHIDES, L.; SMITH, T. G.; PATEL, S. N.; KAIN, K. C.. CD36 and malaria: friends or foes?. **Trends In Parasitology**, v. 19, n. 10, p. 461-469, out. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2003.08.006>.

SHIO, M. T.; EISENBARTH, S. C.; SAVARIA, M.; VINET, A. F.; BELLEMARE, M.; HARDER, K. W.; SUTTERWALA, F. S.; BOHLE, D. S.; DESCOTEAUX, A.; FLAVELL, R. A.. Malarial Hemozoin Activates the NLRP3 Inflammasome through Lyn and Syk Kinases. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 8, p. 1, 21 ago. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000559>.

SRIVASTAVA, A.; CREEK, D. J.; EVANS, K. J.; SOUZA, D.; SCHOFIELD, L.; MÜLLER, S.; BARRETT, M. P.; MCCONVILLE, M. J.; WATERS, A. P.. Host Reticulocytes Provide Metabolic Reservoirs That Can Be Exploited by Malaria Parasites. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 6, 4 jun. 2015. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004882>.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M.. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 169-180, mar. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1311>.

SULLIVAN, B. M.; JUEDES, A.; SZABO, S. J.; VON HERRATH, M.; GLIMCHER, L. H.. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet.

Proceedings Of The National Academy Of Sciences, v. 100, n. 26, p. 15818-15823, 12 dez. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2636938100>.

TALAPKO J.; SKRLEC, I; ALEBIĆ, T.; JUKIĆ, M.; VČEV, A. Malaria: the past and the present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, p. 179, 21 jun. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7060179>.

TANGPUKDEE, N.; KRUDSOOD, S.; KANO, S.; WILAIRATANA, P.. Falciparum malaria parasitemia index for predicting severe malaria. **International Journal Of Laboratory Hematology**, v. 34, n. 3, p. 320-327, 4 jan. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-553x.2011.01398.x>.

TAYLOR-ROBINSON, A.W.. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. **Parasitology Today**, v. 11, n. 9, p. 334-342, set. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80186-3](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(95)80186-3).

TOTINO, P. R. R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.. Evidencing the Role of Erythrocytic Apoptosis in Malarial Anemia. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 9 dez. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2016.00176>.

TOTINO, P. R. R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.. Refractoriness of Erythrocytic Red Blood Cells to Plasmodium falciparum Infection: a putative host defense mechanism limiting parasitaemia. **Plos One**, v. 6, n. 10, p. 1, 21 out. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026575>.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J.. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 735-747, 1 out. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri911>.

TUTEJA, R.. Malaria – an overview. **Febs Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 30 ago. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x>

VAN DER MEER, J. H. M.; POLL, T. D.; VEER, C. T. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. **Blood**, v. 123, n. 16, p. 2460-2469, 17 abr. 2014. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-09-528752>.

XIA, P.; GAMBLE, J. R.; RYE, K.; WANG, L.; HII, C. S. T.; COCKERILL, P.; KHEW-GOODALL, Y.; BERT, A. G.; BARTER, P. J.; VADAS, M. A.. Tumor necrosis factor- α induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 95, n. 24, p. 14196-14201, 24 nov. 1998. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.24.14196>.

XIE, S.; ZHANG, H.; LIANG, Z.; YANG, X.; CAO, R.. AXL, an Important Host Factor for DENV and ZIKV Replication. **Frontiers In Cellular And Infection**

Microbiology, v. 11, n. 1, p. 1-2, 22 mar. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.575346>.

WANG, S.; QIU, Z.; HOU, Y.; DENG, X.; XU, W.; ZHENG, T.; WU, Peihan; XIE, S.; BIAN, W.; ZHANG, C. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. **Cell Research**, v. 31, n. 2, p. 126-140, 8 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-020-00460-y>.

WANKE, F.; GUTBIER, S.; RÜMMELIN, A.; STEINBERG, M.; HUGHES, L. D.; KOENEN, M.; KOMUCZKI, J.; REGAN-KOMITO, D.; WAGAGE, S.; HESSELMANN, J. Ligand-dependent kinase activity of MERTK drives efferocytosis in human iPSC-derived macrophages. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 6, 25 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-021-03770-0>.

WEINBAUM F, EVANS C. B., TIGELAAR, R. E. Immunity to Plasmodium Berghei yoelii in mice. I. The course of infection in T cell and B cell deficient mice. **J Immunol**. p. 1999 - 2005, 1976.

WIUM, M.; PACCEZ, J.; ZERBINI, L.. The Dual Role of TAM Receptors in Autoimmune Diseases and Cancer: an overview. **Cells**, v. 7, n. 10, p. 166, 12 out. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells7100166>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Malaria**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Acesso em: 20 jan. 2023.

WHITE, N. J.. Severe malaria. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, 6 out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-022-04301-8>.

WHITE, N. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T. T.; FAIZ, M. Abul; MOKUOLU, O.; DONDORP, A. M. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723-735, fev. 2014. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60024-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60024-0).

WYKES, M. N.; KAY, J. G.; MANDERSON, A.; LIU, X. Q.; BROWN, D. L.; RICHARD, D. J.; WIPASA, J.; JIANG, S. H.; JONES, M. K.; JANSE, C. J.. Rodent blood-stage Plasmodium survive in dendritic cells that infect naive mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 27, p. 11205-11210, 20 jun. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1108579108>.

YEO, C. J. J.; FEARON, D. T.. T-bet-mediated differentiation of the activated CD8+ T cell. **European Journal Of Immunology**, v. 41, n. 1, p. 60-66, 9 dez. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201040873>.

YOUNGBLOOD, B.; HALE, J. S.; AHMED, R. T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. **Immunology**, v. 139, n. 3, p. 277-284, 13 jun. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12074>.

ZAGÓRSKA, A.; TRAVÉS, P. G.; LEW, E. D.; DRANSFIELD, I.; LEMKE, G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. **Nature Immunology**, v. 15,

n. 10, p. 920-928, 7 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/ni.2986>.

ZHOU, Y.; ZHANG, W.; TEMBO, E.; XIE, M.; ZHANG, S.; WANG, X.; WEI, T.; FENG, X.; ZHANG, Y.; DU, J.. Effectiveness of indoor residual spraying on malaria control: a systematic review and meta-analysis. **Infectious Diseases Of Poverty**, v. 11, n. 1, p. 2-3, 23 jul. 2022. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s40249-022-01005-8>