DOUGLAS DE SOUSA COSTA

PAPEL DA AUTOFAGIA NA MODULAÇÃO DA IMUNOPATOGÊNESE DA MALÁRIA PLACENTÁRIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2018

DOUGLAS DE SOUSA COSTA

PAPEL DA AUTOFAGIA NA MODULAÇÃO DA IMUNOPATOGÊNESE DA MALÁRIA PLACENTÁRIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Sousa Costa, Douglas
Papel da autofagia na modulação da imunopatogênese da malária placentária / Douglas de Sousa Costa; orientador Cláudio Romero Farias Marinho. -- São Paulo, 2018.
98 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plasmodium berghei. 2. Placenta. 3. Malária gestacional. 4. Inflamação. 5. Autofagia. I. Romero Farias Marinho, Cláudio, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Douglas de Sousa Costa

Título da Dissertação: Associação da Autofagia na Modulação da Imunopatogênese da Malária Placentária

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho.

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

( ) Aprovado **( ) Reprovado**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Papel da Autofagia na Modulação da Imunopatogênese da Malária Placentária***", registrado sob o protocolo nº ***32/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***14/04/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Claudio Romero Farias Marinho***
- Departamento: *Parasitologia*
- Membros da Equipe: *Douglas de Sousa Costa (Pós-graduando), Oscar Javier Murillo Gómes (Pós-graduando), Flávia Afonso Lima (Pós-doutorando), Carla Letícia dos Santos Bandeira (Pós-doutorando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, relatório final de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/index.php?option=com_content&view=article&id=702. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Role of Autophagy in the modulation of the Immunopathogenesis of Placental Malaria***", protocol nº ***32/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***4/14/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Claudio Romero Farias Marinho***
- Team members: *Douglas de Sousa Costa (Graduate Student), Oscar Javier Murillo Gómes (Graduate Student), Flávia Afonso Lima (Postdoctoral Researcher), Carla Letícia dos Santos Bandeira (Postdoctoral Researcher)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57bl/6*	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*6*
	C57bl/6	*Fêmae/female*	*8 semanas/weeks*	*100*

São Paulo, 20 de abril de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Primeiramente a Deus, que até aqui me sustentou.
À minha mãe, que sempre foi a maior influenciadora das minhas conquistas.
E a mim mesmo que, sem dedicação e esforço, não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que me concedeu.

À minha mãe, que foi a pessoa que mais me deu apoio em todos os meus projetos. Acreditou em mim, no meu potencial, e sempre me ajudou da melhor maneira possível.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho que me aceitou em seu laboratório. Muito obrigado pela orientação e todos os ensinamentos nesses dois anos do mestrado, que muito contribuiu para o meu crescimento científico e profissional.

Um muito obrigado a Profª. Drª. Sabrina Epiphanio e todo o seu grupo pela colaboração, companheirismo e aprendizado.

A Profª. Drª. Estela Bevilacqua e ao Prof. Dr. Mauro Cortez por terem aberto as portas de seus laboratórios para realização de parte do meu trabalho.

À minha coorientadora Drª Carla Letícia dos Santos Bandeira. Muito obrigado por todos os conselhos, as muitas horas dedicadas as dezenas de western blotting que fizemos juntos, pela companhia até altas horas no laboratório e ter que chegar no laboratório até mesmo antes do nascer do sol para me auxiliar com os experimentos; pelas chamadas de atenção, pelo carinho e paciência em me ensinar todas as técnicas que aprendi, não tenho como agradecer tudo que você passou para mim.

A Drª Flávia Afonso Lima que me acompanhou e auxiliou nos meus primeiros experimentos. Muito obrigado por todos os conselhos e companheirismo.

À minha amiga e técnica do laboratório Erika Machado. Muito obrigado pelo aprendizado de vida, de técnica, de ética e profissionalismo que você passou para mim.

Aos colegas do laboratório (LIPE): André Barateiro, Aramys Reis, Jamille Dombrowski, Marcelo Pereira, Natércia Silva, Oscar Murillo e Stefan Walbaum. Muito obrigado pela colaboração, aprendizado e companheirismo nesse período. Sem os quais não teria conseguido concluir este trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro e todo seu corpo de funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-II/USP).

As agências de fomento CNPq pelo financiamento da minha bolsa, e FAPESP pelo financiamento do meu projeto. Sem as quais não seria possível realizar este projeto.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Costa, DS. **Papel da Autofagia na Modulação da Imunopatogênese da Malária Placentária.** [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2018

A malária compreende um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade, afetando milhões de pessoas ao redor do globo, incluindo mulheres em idade reprodutiva. Todos os anos, pelo menos 125 milhões de gestantes encontram-se expostas à doença, a qual é associada a um elevado risco de morte para a mãe e para o feto. A malária placentária é caracterizada pelo sequestro de parasitos na placenta, contribuindo para o desenvolvimento de anemia materna, restrição do crescimento intrauterino e diminuição da viabilidade fetal. Nesse cenário, a disrupção da homeostase no ambiente placentário tem um papel crucial, e processos que visam sua recuperação são ativados. A autofagia consiste em um desses processos e é fundamental para a sobrevivência da célula em situações de estresse. Ela regula a homeostase citoplasmática, e também está envolvida na resposta a doenças infecciosas e na modulação do sistema imunológico. Por outro lado, é sabido que existem várias moléculas de sinalização relacionadas ao sistema imune que regulam a autofagia nos mais diversos tipos celulares, como por exemplo, nas células trofoblásticas. Na placenta estes mecanismos de sinalização têm uma função importante na adaptação destas células a insultos de conhecido efeito deletério para gravidez. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a participação da autofagia na patogenia da malária placentária, utilizando para isso um modelo murino de infecção. Neste contexto, foram utilizadas fêmeas C57Bl/6 prenhes infectadas por *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} no 13º dia de prenhez. Posteriormente, os fetos foram retirados e pesados, e as placentas foram isoladas para análises histopatológicas. Além disso, foram realizadas quantificações por *western blotting* dos marcadores de indução e fluxo da via autofágica. Os achados do presente trabalho indicam que a infecção nas fêmeas prenhes induziu o baixo peso na prole e contribuiu para importantes modificações histológicas na placenta. Além disso, foi observada uma diminuição da região do espongiotrofoblasto associada a um aumento do labirinto, além de um significativo espessamento das barreiras interhemais. Por extensão, foi detectada uma redução na expressão do transportador de aminoácidos Slc16A3. Observou-se ainda, em placentas de animais infectados, um aumento na indução da autofagia, caracterizado pela maior expressão de Beclin-1. Acompanhando estas observações, verificou-se também uma redução dos níveis de LC3-II, suportando a hipótese de um fluxo autofágico ativo no contexto da infecção. Esses resultados sugerem um aumento do fluxo autofágico durante a malária placentária murina, propiciando novas perspectivas para o estudo desse processo biológico na infecção causada por *Plasmodium* spp. Além disso, nossos dados apontam para a importância de novos estudos envolvendo as adaptações placentárias na busca de tratamentos alternativos para a malária gestacional.

Palavras-chave: *Plasmodium berghei*. Autofagia. Inflamação. Placenta. Malária placentária. Malária gestacional.

ABSTRACT

Costa, DS. **Role Autophagy in the Modulation of Immunopathogenesis of Placental Malaria.** [Dissertation (Master in Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2018

Malaria is one of the most important public health problems worldwide. Annually, at least 125 million pregnant women are at risk of developing malaria, which is associated to increased maternal and fetal mortality. Consequently, these women may develop placental malaria, which is characterized by the sequestration of the parasite inside the placenta, contributing to maternal anemia, intrauterine growth restriction and decreased fetal viability. Autophagy is a key process for cell survival, being a regulator of cytoplasmic homeostasis, being involved in infectious diseases, neurodegenerative diseases and cancer, playing also a role in the development of the embryo and in the modulation of the immune system. It is known that several signaling molecules related to the immune system regulate autophagy in a great majority of cells, as it occur in trophoblasts, in which this signaling mechanisms have a pivotal role in their adaptation to several factors that may bring deleterious consequences to pregnancy. Thus, this work aimed to study the participation of autophagy in the pathogenesis of placental malaria. In this context, we have used a murine model of infection, which consists of an infection of C57Bl/6 pregnant mice at gestational day 13 with the parasite *Plasmodium berghei* NK65^{GFP}. At gestational day 19, placentas were isolated for histopathological analysis and protein quantification of induction (ULK-1 and Beclin-1) and flux (LC3) markers for autophagy by western blotting. Our findings have shown that infection of pregnant mice lead to reduced fetal weight and contributed to important histologic changes in the placenta. Additionally, we have observed a decrease in the spongiotrophoblast region, which was associated to an increase of the labyrinth region, as well as an augmented thickening of the interhaemal barriers. In parallel, we have also observed a reduction in the expression of the amino acid transporter Slc16A3. Strikingly, we have shown that there is an increased induction of autophagy in placentas from infected mice, characterized by the augmented expression of Beclin-1. In accordance, we have also observed a reduction of LC3-II levels concomitantly supporting the existence of an active autophagic flux in the context of infection. Altogether, our results suggest that autophagy is enhanced during murine placental malaria opening new perspectives for the study of this biological process during the infection caused by *Plasmodium* spp., additionally encouraging the development of new studies and methodologies for the treatment of placental malaria.

Key words: *Plasmodium berghei*. Autophagy. Inflammation. Placenta. Placental malaria. Gestational malaria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Países endêmicos para a malária 23
Figura 2 – Notificações de casos de malária na Região Amazônica 24
Figura 3 – Mapa de risco da malária por município de infecção no Brasil 25
Figura 4 – Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado e no mosquito anofelino 28
Figura 5 – Ligação de eritrócitos parasitados na microvasculatura e nas vilosidades placentárias.....33
Figura 6 – Desenvolvimento da placenta murina 36
Figura 7 – Representação esquemática da via autofágica 41
Figura 8 – Maior suscetibilidade à infecção das fêmeas prenhes 60
Figura 9 – Validação do modelo de malária placentária 62
Figura 10 – Caracterização da estrutura placentária na malária gestacional 63
Figura 11 - Alteração do transportador Slc16A3 no tecido placentário devido à infecção com *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} 65
Figura 12 - Imunolocalização da proteína CD31 66
Figura 13 – Caracterização do perfil inflamatório local e sistêmico.....67
Figura 14 – Modulação da autofagia pela presença do parasito.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos utilizados na imunoistoquímica 54
Tabela 2 – Especificações dos anticorpos e das condições aplicadas ao *Western Blotting*.....57
Tabela 3 – Caracterização do modelo obtido a partir da cesárea 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	*AMP-activated protein kinase* (proteína quinase ativa adenosina monofosfato)
Atg	*Autophagy-related genes* (genes relacionados à autofagia)
Atg3	*Autophagy-related genes* 3
Atg4	*Autophagy-related genes* 4
Atg5	*Autophagy-related genes* 5
Atg7	*Autophagy-related genes* 7
Atg9	*Autophagy-related genes* 9
Atg10	*Autophagy-related genes* 10
Atg12	*Autophagy-related genes* 12
Atg14L	*Autophagy-related genes* 14
Atg16	*Autophagy-related genes* 16
BCA	*Bicinchoninic acid*
BCL2	*B-cell lymphoma 2*
Beclin-1	*Coiled-coil Moesin-like BCL2-interacting Protein*
BSA	*Bovine serum albumin*
CBA	*Cytometric beads array (conjunto de pérolas de citometria)*
CCL2/MCP-1	*Chemokine (C-C motif) ligand 2/ Monocyte chemoattractant protein 1*
CCL3/MIP-1α	*Macrophage inflammatory protein-1 alpha*
CD31	*Cluster of differentiation* 31 (grupo de diferenciação 31)
CD36	*Cluster of differentiation* 36
CIRD	*Cysteine-rich interdomain region*
CIRD1	*Cysteine-rich interdomain region* 1
CSA	*Chondroitin sulfate A* (sulfato de condroítina A)
DAB	*3, 3'-diaminobenzidine*
DAPK	*Death-associated protein kinase*
DBL	*Duffy-binding-like*
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

E1	*E1-like enzyme*
E2	*E2-like enzyme*
E3	*E3-like enzyme*
ECL	*Enhanced chemiluminescence*
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid*
EP	Eritrócitos parasitados
FIP200	*Focal adhesion kinase (FAK) family interacting protein of 200 kD*
GFP	*Green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)
GTP	*Guanosine-5'-triphosphate* (trifosfato de guanosina)
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
HRP	*Horseradish Peroxidase*
Hsc70	*Heat shock cognate 71 kDa protein*
IFN-γ	*Interferon gamma*
IGF-2	*Insulin-like growth factor* 2 (fator de crescimento insulínico tipo 2)
IgG	Imunoglobulina G
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IPA	Índice Parasitário Anual
IV	Intravenosa
JNK	*c-Jun N-terminal kinase*
KERFQ	*Pentapeptide motif*
LAMP-1	*Lysosome-associated membrane protein type 1*
LAMP-2A	*Lysosome-associated membrane protein type 2A*
LAMP-2	*Lysosome-associated membrane protein type 2*
LAP	*LC3-associated phagocytosis* (LC3 associado à fagocitose)
LC3	*Microtubule-associated protein light chain 3*

MP	Malária Placentária
mTORC-1	*Mammalian target of rapamycin complex 1*
MyD88	*Myeloid differentiation primary response 88*
Na_3VO_4	Ortovanadato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NBR1	*Neighbor of BRCA1 gene 1 protein*
NDP52	*Calcium binding and coiled-coil domain 2*
NK	*Natural killer* (exterminadoras naturais)
NLRP3	*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
NOX2	*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase2*
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
P62/SQSTM1	*Ubiquitin-binding protein p62/Sequestosome-1*
PAS	*Phagophore assembly site* (local de formação do fagóforo)
PBS	*Phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)
PE	*Phosphatidylethanolamine*
PECAM 1	*Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule* 1 (molécula de adesão celular plaqueta/endotélio 1)
PfEMP1	*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (proteína de membrana do eritrócito 1 de P. falciparum)*
PI3K	*Phosphoinositide 3-kinase*
PMSF	*Phenylmethanesulfonyl fluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride*
PVDF	*Polyvinylidene difluoride*
RAB7	*Ras-related protein rab-7*
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*
SFB	Soro fetal bovino
Slc16A3	*Solute Carrier Family* 16 *Member* 3 (*monocarboxylic acid*

	transporters)
T.A.	Temperatura ambiente
TbpA	*Trophoblast specific protein alpha*
TBS-T	*Tris-buffered saline tween 20*
Th1	*T helper 1* (T auxiliar 1)
Th2	*T helper 2* (T auxiliar 2)
TLR	*Toll-like receptor* (receptores tipo Toll)
TLR4	*Toll-like receptor* 4
TNF-α	*Tumor necrosis factor α* (fator de necrose tumoral α)
TRIF	*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*
TRIS-HCl	*Tris hydrochloride*
ULK-1	*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*
UVRAG	*UV Radiation Resistance Associated*
VAR2CSA	*Gen var2 chondroitin sulfate A*
Vps34	*Vacuolar protein sorting 34*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
   1.0. Malária: uma breve revisão histórica 20
   1.1. Epidemiologia da malária 22
   1.2. Ciclo de vida do parasito 25
   1.3. Malária grave 28
   1.4. Malária durante a gravidez 29
   1.5. Malária placentária 30
   1.6. Placenta 34
   1.7. Autofagia 37
   1.8. Autofagia no desenvolvimento 41
   1.9. Autofagia e inflamação 43
2. OBJETIVOS 47
   2.0. Objetivo geral 48
   2.1. Objetivos específicos 48
3. MATERIAIS E MÉTODOS 49
   3.0. Procedências 50
   3.1. Animais e parasitas 50
   3.2. Monitoramento da prenhez 51
   3.3. Infecção e avaliação da parasitemia 51
   3.4. Tratamento com cloroquina 52
   3.5. Coleta das placentas 52
   3.6. Processamento histológico 52
   3.7. Reações colorimétricas e de imunolocalização 53
   3.8. Morfometria 54
      3.8.1. Avaliação da estrutura placentária 54
      3.8.2. Espessura da membrana interhemal 54
      3.8.3. Quantificação do marcador Slc16A3 55
   3.9. Análise da expressão proteica por *Western Blotting* 55
   3.10. Quantificação de citocinas 57
   3.11. Análises estatísticas 58
4. RESULTADOS 59

4.0. Caracterização do modelo murino de malária placentária 60
4.1. Análise da estrutura placentária 62
4.2. Quantificação do transportador Slc16A3 na placenta 64
4.3. Verificação do perfil de marcadores inflamatórios 64
4.4. Verificação do perfil da via autofágica 66
5. DISCUSSÃO 69
6. CONCLUSÃO 79
REFERÊNCIAS 81

1. INTRODUÇÃO

1.0. Malária: uma breve revisão histórica

A malária tem acompanhado a humanidade praticamente por toda a sua história(1), provavelmente apresentando maior influência nas populações humanas do que qualquer outra doença infecciosa. As primeiras referências históricas em relação aos sintomas peculiares da doença foram descritas na China há aproximadamente 5.000 anos, pelo imperador Huang Ti no seu estudo médico, *Nei Ching* (A Lei da Medicina)(1,2). Já a descrição detalhada dos tipos de febres associados à malária e do aumento do baço nos pacientes, remete ao século V a.C., foi realizada pelo grego Hipócrates. O nome malária provém de *mal aire* (mau ar, em italiano), pois se acreditava que os sintomas inerentes à enfermidade eram devido aos locais com ar insalubre. Somente após as descobertas de Louis Pasteur sobre a teoria dos germes, tornou-se mais aceita a hipótese de que a doença poderia ser causada a partir de infecções microbianas(1).

O agente causador da malária foi descoberto por Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), no final do século XIX(3). Laveran era um médico que serviu ao exército francês durante o período da guerra Franco-Prussiana, quando a infecção foi responsável por dizimar milhares de soldados. Seus estudos clínico-patológicos e também dos aspectos anatômicos da doença forneceram dados minuciosos acerca da histologia da malária cerebral. A observação da presença do parasito nos órgãos e no sangue dos seus pacientes propiciou a descoberta de dois estágios da doença, chamadas de malária grave e crônica; nas quais o único elemento em comum era a presença de grânulos escuros com movimentos ameboides, por isso denominados *Oscillaria malariae*. Atualmente, é sabido que esses grânulos referem-se à hemozoína, o produto da digestão da hemoglobina pelo parasito(1,4).

Diferindo de Laveran, que acreditava na existência de apenas uma espécie do parasito, denominado *Oscillaria malariae,* Camillo Golgi encontrou duas formas da doença: uma com periodicidade terçã (ciclo de 48 horas) e outra com periodicidade quartã (ciclo de 72 horas). Suas observações demonstraram que não só essas formas distintas produziam quantidades diferentes de merozoítos, como também a febre tinha ocorrência simultânea com a ruptura e liberação destes merozoítos na corrente sanguínea. Apenas alguns anos mais tarde, os cientistas italianos Giovanni

Batista Grassi e Raimondo Filetti adotaram pela primeira vez os nomes *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae,* para dois dos parasitos que afetam os seres humanos, enquanto o parasito da malária terçã maligna foi nomeado como *Plasmodium falciparum* pelo cientista norte-americano William H. Welch(1,4,5).

Identificados os parasitos causadores da doença, iniciava-se o questionamento de como estes infectariam os seres humanos, Laveran e Mason levantaram a hipótese de que os mosquitos eram os agentes disseminadores da malária, a qual foi validada, em 1897, por Ronald Ross. Enquanto examinava o tecido digestório de um mosquito anofelino que havia se alimentado de um paciente com malária, Ronald Ross encontrou o parasito, provando o papel do mosquito *Anopheles* na transmissão da malária para seres humanos. Ross continuou os seus estudos usando como modelo experimental a malária em aves e, em 1898, demonstrou que os mosquitos poderiam ser vetores para o plasmódio aviário. Posteriormente, o referido pesquisador evidenciou que os parasitos poderiam desenvolver-se no mosquito e migrar para as glândulas salivares destes, possibilitando a reinfecção de outras aves picadas. Mais tarde, os cientistas Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Giovanni Batista Grassi conseguiram demonstrar o ciclo de vida completo de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae,* usando mosquitos (da espécie *Anopheles claviger*) que se alimentaram do sangue de pacientes com malária e, em seguida, foram utilizados para picar outros pacientes saudáveis, os quais, semanas depois, também desenvolveram malária(1,2,6).

Após a descoberta do vetor do parasito causador da malária e a compreensão do seu ciclo de vida, muitas medidas foram tomadas para tentar erradicar a doença do mundo. O fato da doença ter dizimado um grande número de soldados nas duas grandes guerras e de representar um importante empecilho na expansão territorialista das nações europeias nas regiões tropicais, vários países uniram-se para desenvolver medidas profiláticas e drogas antimaláricas(7).

A malária foi essencial para o desenvolvimento cientifico em relação ao uso de drogas sintéticas, sendo a doença mais estudada em meados do século XX(7). Nas décadas de 50 e 60, a Organização Mundial da Saúde (OMS) liderou um programa de erradicação da malária e, entre muitas drogas testadas, a cloroquina foi a que se mostrou mais eficiente na tentativa de combater a doença. No entanto, ao mesmo tempo em que havia urgência na erradicação da doença, houve também o

uso indiscriminado da cloroquina. Isto favoreceu a seleção de cepas do parasito resistentes à droga, o que comprometeu a estratégia de erradicação da doença e aumentou a necessidade do desenvolvimento de novas drogas mais potentes(8).

Atualmente, várias organizações estão à procura de uma vacina que, em conjunto com métodos já eficientes de intervenção, poderá no futuro controlar e até mesmo erradicar a malária no mundo(9).

1.1. Epidemiologia da malária

Transmitida pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* spp., o parasito intracelular obrigatório do gênero *Plasmodium* spp. é o agente causador da malária em diversas espécies de mamíferos, aves e répteis(10). Existem aproxidamente, 25 espécies de anofelinos conhecidas por serem bons vetores efetivos da malária, possuem rápida geração de descendentes e são resistentes às mudanças climáticas e ambientais, sendo capazes de sobreviver em ambientes tropicais e com abundante densidade populacional, assim, favorecendo a disseminação do parasito(11).

Dentre as muitas espécies do parasito, as que são conhecidas por infectarem os seres humanos são: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium cynomolgi*(12,13). A malária causada por *P. falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença acarretando as maiores taxas de mortalidade, principalmente no continente africano(14).

Considerada como um grave problema de saúde pública, a malária assola milhões de pessoas, afetando, sobretudo, as populações pobres residentes em áreas tropicais e subtropicais(14). Segundo o relatório disponibilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016, houve aproximadamente 216 milhões de casos em todo o planeta, e cerca de 445 mil mortes foram registradas. De todos esses casos, cerca de 90% ocorreram no continente africano; seguido de 7% dos relatos ocorridos no sudeste asiático e 2% na região leste do mediterrâneo **(Fig. 1)**(15).

Apesar da redução no número de casos, entre 2014 e 2016, ocorreu um substancial aumento da doença na América do Sul (Brasil e Venezuela,

principalmente). Hoje em dia quase metade da população mundial (3,3 bilhões de pessoas) reside em áreas de risco de transmissão da malária. Os países africanos (região subsaariana) são os principais em taxas de mortalidade, com a República Democrática do Congo e Nigéria retratando 35% do total de mortes causadas pela doença em todo o mundo. A redução da incidência de malária tem sido letárgica nessas regiões, em relação a outros países(15,16).

Figura 1 – Países endêmicos para a malária

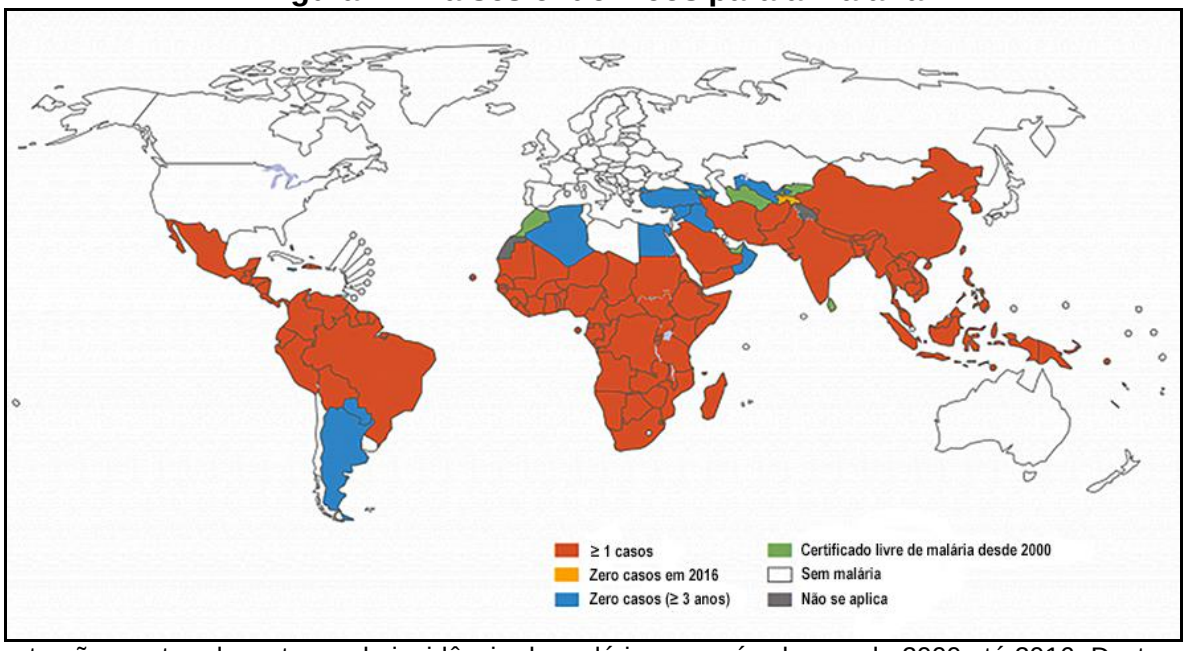


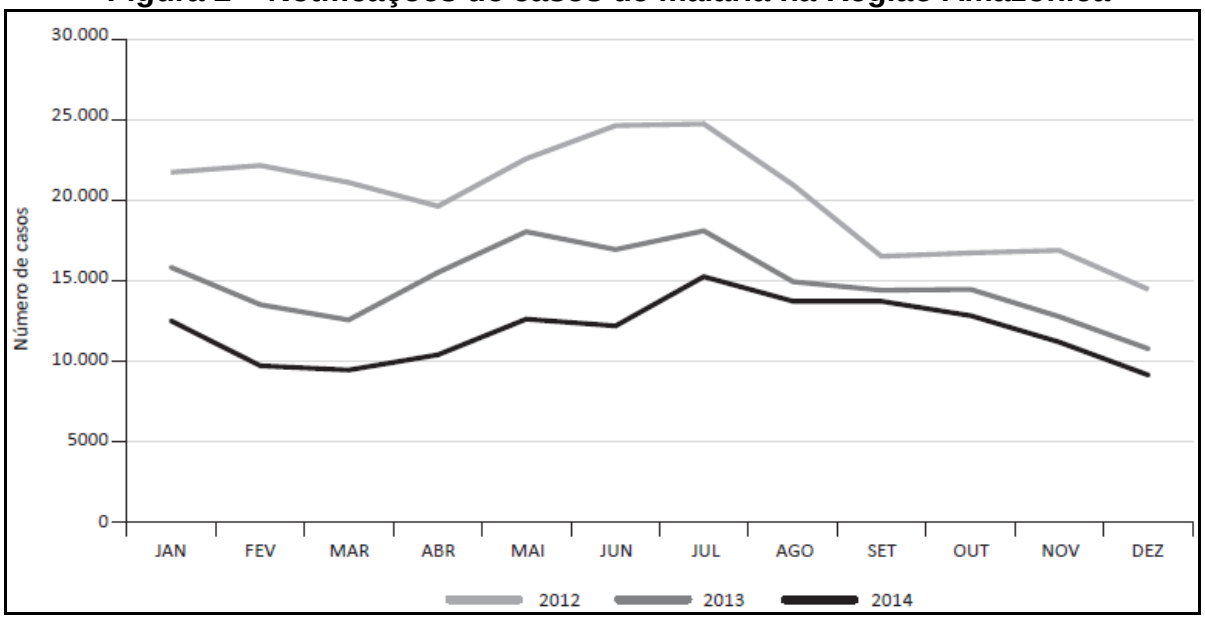
Ilustração mostrando as taxas de incidência de malária, por país, do ano de 2000 até 2016. Destaca-se o grande número de países que estão em risco de transmissão para doença (modificado de WHO, 2017)(15).

Na América do Sul, a malária acomete mais de um milhão de pessoas anualmente nos países situados na Região Amazônica (17). No Brasil, cerca de 45% dos casos ocorrem nos estados do Acre e Amazonas(15) e, segundo a OMS, em 2016, o país concentrava 18% dos casos de malária em relação aos outros países das Américas. Das seis espécies já conhecidas por causarem malária em seres humanos, no Brasil três delas estão associadas a casos autóctones, incluindo: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*. Os casos de infecção por *P. vivax* são prevalentes no Brasil, seguidas por *P. falciparum*, com respectivamente 84% e 16% das notificações em 2014, e 99% dos casos de malária em todo país concentram-se na Região Amazônica(15,17,18).

A Amazônia legal, formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, concentra a maioria

dos relatos de malária e é considerada uma região endêmica no país. Dados do Ministério da Saúde mostram que, em 2014, 143.552 casos foram notificados nesta região. O Estado do Amazonas contribui com o maior número de ocorrências (47%), seguido pelo Estado do Acre (22%), estado que mais notifica casos de malária por *P. falciparum* (42%) **(Fig. 2)**(18).

Figura 2 – Notificações de casos de malária na Região Amazônica

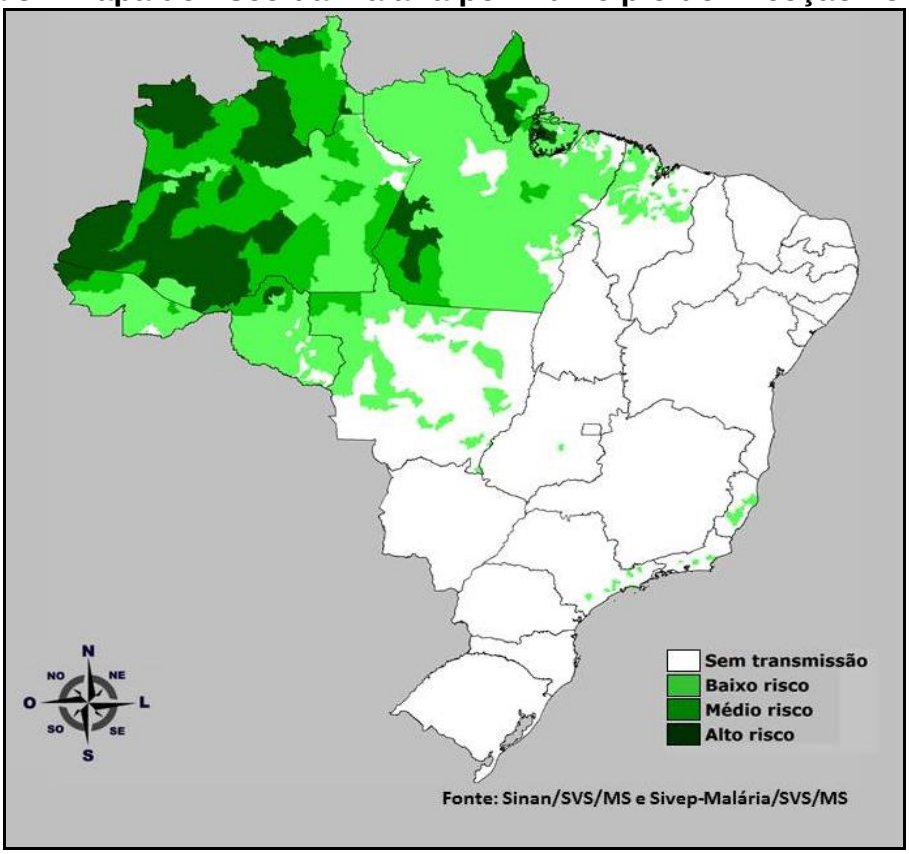


Casos de malária na Região Amazônica, entre os anos de 2012 a 2014 (modificado de Ministério da Saúde 2016)(18).

No Brasil, o Ministério da Saúde criou o índice de Incidência Parasitária Anual (IPA), que classifica as áreas de transmissão em alta (≥50), média (<50 e ≥10), e baixa endemicidade (<10), conforme o número de casos por mil habitantes, como exemplificado no mapa **(Fig. 3)**. Trata-se de um índice essencial para investigar as variações populacionais, geográficas e temporais na disposição dos casos de malária, sendo importante para os processos de planejamento e controle da malária no Brasil, em face da expansão territorial pelo ser humano(18).

As condições ambientais, como a periodicidade das chuvas e temperatura, associadas às características socioeconômicas e aos diferentes fatores antrópicos, como a migração da população rural para o meio urbano e a intensa exploração da vegetação, elevam as chances de infecção por plasmódio e são responsáveis pelos níveis epidêmicos da doença na região(17,19).

Figura 3 – Mapa de risco da malária por município de infecção no Brasil



Distribuição das áreas com risco de transmissão de malária no Brasil com base na Incidência Parasitária Anual (IPA). Com destaque para a Região Amazônica com o maior risco de transmissão no país. (Modificado de Ministério da Saúde 2016).

1.2. Ciclo de vida do parasito

O *Plasmodium* spp. é um protozoário que possui um ciclo de vida complexo, envolvendo vetores invertebrados, os mosquitos da família Culicidae, e hospedeiros vertebrados. Os mosquitos são conhecidos por serem excelentes transmissores de doenças humanas, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as variações climáticas se mantêm constantes(20). No Brasil, o principal vetor da malária é da espécie *Anopheles darlingi*, uma espécie antropofílica (por preferencialmente alimentar-se de sangue humano) que possui periodicidade noturna, com picos crepusculares(21). Quando a fêmea do mosquito faz o repasto sanguíneo, em um hospedeiro infectado com o plasmódio, basta apenas um gametócito feminino e um gametócito masculino viáveis e totalmente desenvolvidos para que o mosquito dê continuidade ao ciclo do parasito(20).

Os gametócitos alcançam o lúmen posterior do intestino médio da fêmea, único ambiente no organismo do mosquito para armazenamento, digestão e

absorção do sangue. Neste ambiente termina a fase sexuada do ciclo: os gametócitos modificam-se rapidamente em microgametas extracelulares móveis (masculinos) e macrogametas fixos (femininos), fundem-se e ocorre a formação do zigoto. Após a meiose, o zigoto diferencia-se em uma forma de alta mobilidade deslizante, chamado de oocineto. A partir da ruptura da matriz peritrófica circundante (membrana da parede do intestino de insetos), os oocinetos são capazes de penetrarem no epitélio do intestino médio do mosquito. Em seguida, esses oocinetos fixam-se sob a lâmina basal da face ectoperitrófica da parede do intestino, tornando possível sua transformação em oocistos (estágio esférico fixo). Estes oocistos passam por um processo de esporogonia, no qual múltiplas replicações mitóticas geram milhares de esporozoítos haploides, os quais são liberados com a ruptura do oocisto. Nesse estágio, os esporozoítos percorrem toda a cavidade corporal do mosquito através da hemolinfa, até alcançarem a lâmina basal, que rodeia as glândulas salivares, e atingirem as células acinares produtoras de saliva. Dessa forma, os esporozoítos acumulam-se nas cavidades salivares, sendo capazes de locomoverem-se até os estreitos canais salivares que se conectam à tromba. Assim, os esporozoítos estão prontos para serem inoculados na derme do hospedeiro intermediário vertebrado, no próximo repasto sanguíneo do *Anopheles* spp. **(Fig.4)**(10,22–25).

Após inoculados, os esporozoítos podem migrar rapidamente entre as camadas da pele até atingir os capilares(24). Assim, os parasitas alcançam a corrente sanguínea e chegam até o fígado onde se diferenciam e continuam o seu ciclo biológico. Aqueles que não conseguem ter mobilidade suficiente e permanecem na pele são destruídos pela resposta imune inata do hospedeiro(26).

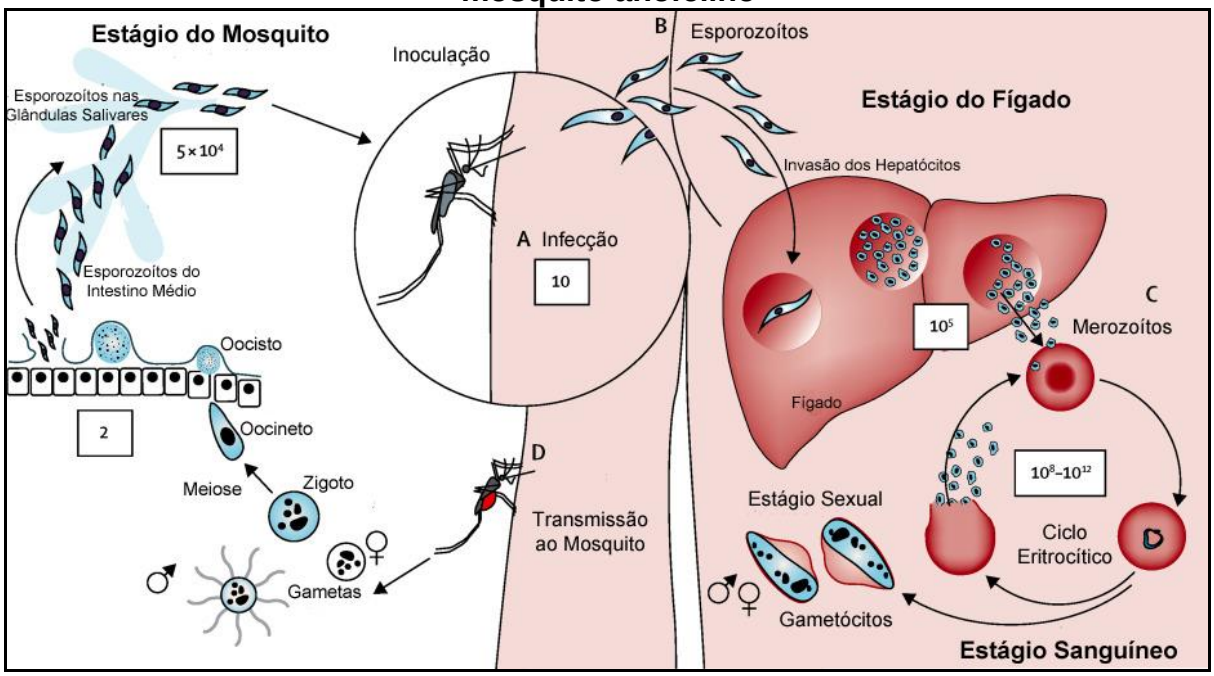
Após infectar os hepatócitos, os esporozoítos começam um período de reprodução assexuada (conhecido como esquizogonia tecidual ou merogonia intra-hepática) e desenvolvem-se em esquizontes, contendo milhares de merozoítos. Os hepatócitos tumefeitos rompem-se e libertam os merozoítos para a corrente sanguínea. Diferente do que ocorre com *P. falciparum*, o *P. vivax* possui a particularidade de estacionar no estágio hepático sob a forma denominada de hipnozoíto e, nessa forma, pode permanecer em estado de latência, ou seja, retornar após semanas, meses ou até mesmo anos. Portanto, o hospedeiro pode

voltar a ter a infecção mesmo após o tratamento, devido à reativação dos hipnozoítos(27).

O estágio seguinte ao trofozoíto denomina-se esquizonte intra-eritrocítico, fase caracterizada pela multiplicação do parasita no interior da hemácia e pela intensa síntese de moléculas de extrema importância para a invasão de novos eritrócitos. Essa fase é seguida pelo surgimento de vários pontos de origem de formação de merozoítos. Com a hemoglobina do eritrócito tendo sido quase toda consumida pelo parasita ocorre o aumento do pigmento malárico (hemozoína), que em excesso pode ser prejudicial para o parasito. Após o desenvolvimento final dos novos merozoítos, a membrana do eritrócito e a membrana do vacúolo parasitóforo rompem-se, provavelmente por um processo dependente de proteases e, dessa maneira, os novos merozoítos estão prontos para infectar novos eritrócitos na corrente sanguínea(28,29).

Na fase eritrocítica, os merozoítos invadem as hemácias e replicam-se dentro destas. Esses ciclos de replicação são sincronizados nas espécies *P. falciparum* e *P. vivax,* durando aproximadamente 48 horas. É nesse estágio do ciclo biológico do parasito que surgem os sintomas da doença(27). Os principais sintomas são: sudorese, calafrios e febre, que pode passar dos 40ºC. Convém salientar que o estado febril do indivíduo está relacionado com o período de horas que o parasito leva para romper as hemácias parasitadas.

Figura 4 – Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado e no mosquito anofelino



O ciclo de vida do Plasmodium spp. pode ser dividido em duas fases: a replicação assexuada no hospedeiro humano e sexuada no mosquito vetor. O ciclo se inicia com a inoculação de esporozoítos na pele do hospedeiro humano **(A, amplificado)**. Esses esporozoítos entram na corrente sanguínea e circulam para o fígado, onde invadem ativamente os hepatócitos **(B)**; dentro dos hepatócitos, cada esporozoíto replica-se assexuadamente. Após cerca de uma semana, os esquizontes do fígado rompem-se, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea que vão invadir os eritrócitos e iniciar o ciclo eritrocítico **(C)**. A doença desencadeia sua manifestação clínica quando o número total de parasitas assexuados na circulação atinge aproximadamente 10^8. Alguns parasitas desenvolvem-se em formas sexuais (gametócitos). No momento do repasto sanguíneo de um mosquito anofelino, os gametócitos são capturados **(D),** e reproduzem-se sexuadamente formando um zigoto que se diferencia em um oocineto móvel. Este atravessa a parede do intestino médio para depois formar um oocisto. O oocisto rompe-se e libera os esporozoítos, que migram para as glândulas salivares para aguardar a inoculação no próximo repasto sanguíneo. O ciclo completo deve demorar aproximadamente uma semana (Modificado de White NJ. et al., 2014)(11).

1.3. Malária grave

Como já citado, uma vez rompidos os eritrócitos infectados durante a fase assexuada do ciclo, há a liberação dos merozoítos e dos produtos de seu metabolismo na corrente sanguínea do hospedeiro, promovendo, assim, a ativação de uma cascata de mediadores inflamatórios, a qual é responsável por muitos sintomas típicos da malária, a saber: febre, calafrios, sudorese, dores nas articulações, dores de cabeça, mialgias, náuseas, vômito, tontura, dentre outros. Contudo, são sintomas da malária não complicada, a qual, muitas vezes, pode evoluir rapidamente para a forma grave da doença(30).

A malária grave é por definição a forma mais severa da doença, associada a um alto índice de mortalidade, clinicamente é precedida pela malária assintomática e/ou pela forma não-complicada da doença(31). As principais complicações da malária grave incluem o comprometimento cerebral e pulmonar, lesões hepáticas e renais, anemia severa e/ou hemorragia, acidose metabólica, hipoglicemia, além da malária placentária. Em muitos pacientes estas complicações podem aparecer concomitantemente, e todas possuem potencial para desenvolver-se de modo rápido, progredindo para a morte em dias ou horas(32,33).

Um importante aspecto da patogênese da malária grave provocada por *P. falciparum* resulta da habilidade de eritrócitos parasitados (EP) de serem sequestrados na microvasculatura do hospedeiro. Este envolvimento pode ser um resultado direto do bloqueio dos vasos sanguíneos ou efeitos causados pela interação entre os EP e o endotélio, o que inclui a resposta inflamatória local(34). Como consequência, a adesão promove o desaparecimento das formas assexuadas do parasito da circulação periférica, evitando, assim, que estes sejam destruídos no baço e favorecendo ainda mais a infecção(14,35,36).

1.4. Malária durante a gravidez

A malária corresponde a uma doença parasitária grave e, potencialmente fatal, que acomete cerca de 200 milhões de pessoas por ano, colocando em risco cerca 40% da população mundial. Estima-se que ocorra cerca de 1 milhão de óbitos decorrentes dessa enfermidade(15). Anualmente, quase 50 milhões de mulheres que vivem em zonas endêmicas tornam-se grávidas, aumentando o risco de sofrerem as complicações associadas às infecções por *Plasmodium falciparum*(37). Essa enfermidade é uma das principais causas de mortalidade em regiões tropicais, acarretando em cerca de 10.000 mortes maternas e entre 75.000 a 200.000 mortes infantis a cada ano(38). Além de ser uma importante causa de mortalidade materno-infantil, a malária na gravidez (MIP, do inglês *Malaria in Pregnancy*) traz como consequência o aumento do número de abortos, de nascimentos prematuros, de anemia e de retardo nos desenvolvimentos fetal e infantil(39–41).

O motivo das mulheres grávidas serem particularmente suscetíveis às infecções por *P. falciparum* tem merecido intenso debate nos últimos anos. A

princípio, foi proposto que seria devido à imunoregulação materna que, por um lado, protege o feto contra a ação do sistema imunológico, por outro, deixa-a menos resistente às infecções(42,43). Entretanto, atualmente, acredita-se que a placenta ofereça um ambiente único para o desenvolvimento de subpopulações de parasitos que se ligam aos receptores, tais como a Condroitina Sulfato A (CSA) presente em grande quantidade nesse órgão(44). Assim, os eritrócitos parasitados (EP) são sequestrados e multiplicam-se no ambiente placentário, evitando a sua posterior destruição pelo baço. Um intenso infiltrado inflamatório constituído, predominantemente por macrófagos, desenvolve-se no espaço intervilar da placenta e, por conseguinte, há a produção de citocinas pró-inflamatórias, associada a abortos, restrição de crescimento intrauterino, partos prematuros e baixo peso ao nascimento(45).

Uma imunidade específica contra as formas placentárias do parasito é adquirida após sucessivas gestações, podendo prevenir o sequestramento e, dessa maneira, evitar a cascata de eventos inflamatórios que conduzem ao agravamento da doença(39,46). Paradoxalmente, mulheres que vivem em áreas de alta endemicidade, muitas vezes, apresentam poucos sintomas da doença. Em particular, os mais severos efeitos da malária são observados na primeira e na segunda gravidez, indicando a existência de um mecanismo de proteção associado à imunidade específica diante das formas placentárias do plasmódio, o que poderia ser reforçado pela vacinação(43). Nestas mulheres, o aumento dos níveis de parasitemia durante a gestação consiste em um indicador de suscetibilidade. Entretanto, as informações relacionadas aos mecanismos responsáveis pela recrudescência da infecção durante a gravidez são de difícil acessibilidade nas populações humanas. Além disso, a malária pode ser assintomática durante a gravidez e, mesmo assim, trazer sérios prejuízos ao desenvolvimento fetal, sugerindo um complexo mecanismo de patogênese ligado à recrudescência, às lesões placentárias e, portanto, a restrição no desenvolvimento intrauterino(47).

1.5. Malária placentária

Histologicamente, placentas afetadas pela malária são caracterizadas pelo acúmulo de parasitos e leucócitos maternos (monócitos e neutrófilos) no espaço

interviloso, presença de pigmentos de hemozoína no interior de macrófagos, depósito de fibrina, proliferação exacerbada das células citotrofoblásticas e espessamento da membrana basal que suporta a camada trofoblástica, diminuindo, assim, a eficiência das trocas entre mãe e feto nessas áreas(48–51). De fato, a restrição do crescimento intrauterino e o baixo peso ao nascer são resultados desse comprometimento da superfície de trocas entre mãe e feto, o qual culmina em hipóxia e inflamação(50,52).

A malária placentária é particularmente observada em infecções causadas pelo *P. falciparum* (maior números de casos no continente africano); todavia, trabalhos apontam para a importância do *P. vivax* (com maior ocorrência de casos na Ásia e América do Sul), apesar de esta ser considerada uma espécie com menor grau de severidade para gestantes, quando comparada com o *P. falciparum*(37,53–55).

Nas infecções provocadas pelo *P. falciparum*, o mecanismo pelo qual desenvolve-se a malária placentária já é conhecido. Nesse processo, a proteína PfEMP-1 liga-se ao glicosaminoglicano sulfato de condroitina A (CSA) **(Fig. 5)**. A particularidade desta ligação reside no fato de que este CSA placentário possui uma sequência de aminoácidos única, não encontrada em nenhum outro órgão do corpo. Na placenta este CSA apresenta-se compondo a estrutura do proteoglicano Syndecan-1, produzido de forma abundante pelo sinciciotrofoblasto. Uma vez que a conformação do Syndecan-1 expõe o CSA ao contato direto com o sangue que circula nas lacunas placentárias, o órgão torna-se um ambiente propício à ligação e ao sequestro dos eritrócitos parasitados(56). A consequência disso, como já abordado, é o escape da remoção dos parasitos pelo baço, propiciando a infecção e tornando as comorbidades associadas à malária gestacional mais severas(57).

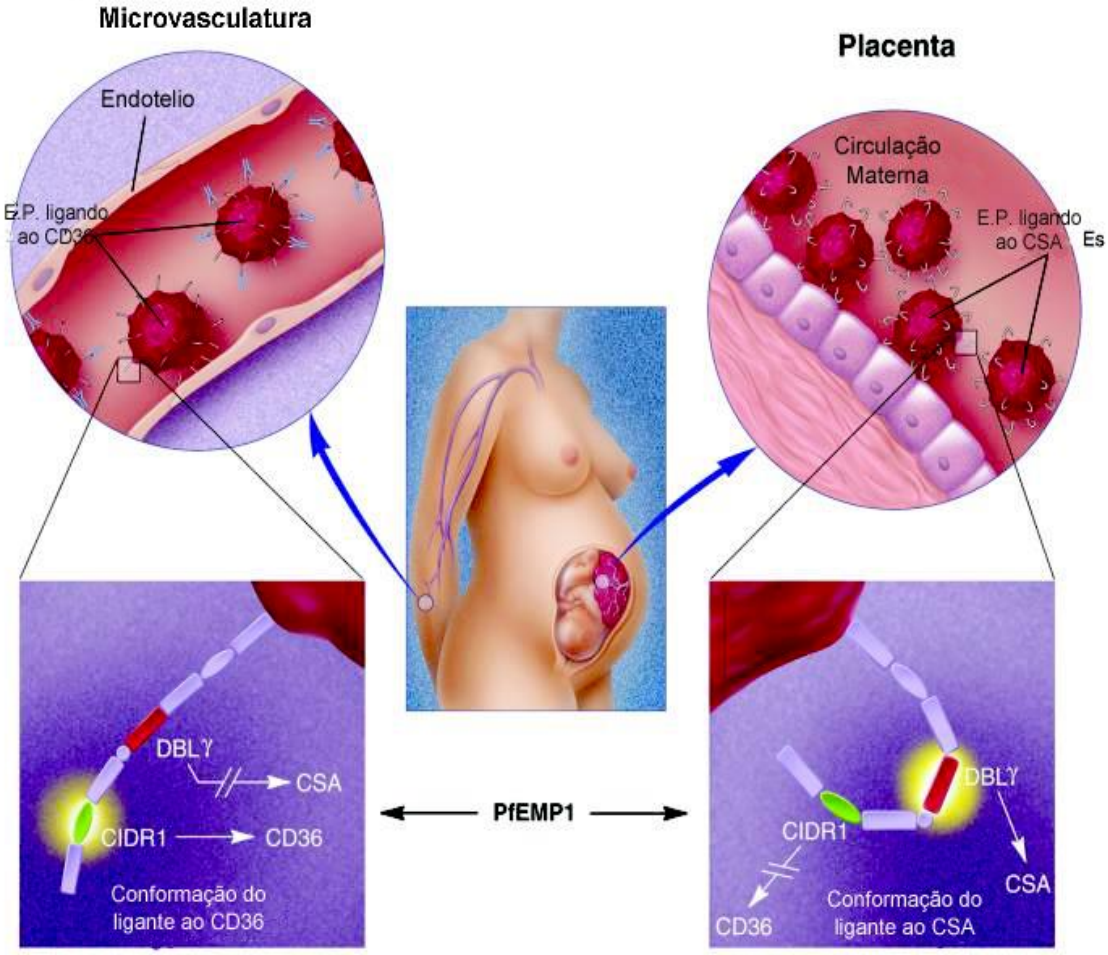
A família de proteínas PfEMP-1 é codificada por ser uma das principais famílias de multigenes do *P. falciparum*, denominada de genes *var.* Essa família multigênica compreende mais de 60 genes já identificados, os quais são transcritos aleatoriamente. Embora muitos genes sejam transcritos no estágio de anel do parasito, somente um produto do gene vai ser expresso na superfície do eritrócito. A variabilidade genética pela qual milhões de novas estruturas antigênicas podem ser geradas em um único indivíduo infectado ajuda o parasito a escapar do reconhecimento imune e adaptar-se a novos ambientes do hospedeiro(58–60).

A PfEMP-1 é sintetizada pelo plasmódio e exportada do vacúolo parasitóforo até a superfície da membrana plasmática do eritrócito infectado. Esta proteína é constituída de vários domínios de ligação tipo Duffy (DBLs) e regiões entre os domínios ricos em cisteína (CIDRs), responsáveis pela adesão a diversos receptores celulares(61). Esses domínios são altamente polimórficos e podem ser classificados em classes e subclasses distintas(59). A região extracelular da VAR2CSA compõe-se de seis subdomínios DBL mais uma região interdomínios ricos em cisteína. A ligação ao CSA envolve resíduos básicos nos subdomínios 2 e 3 (subdomínios pertencentes ao domínio DBL)(58,59,62) **(Fig. 5)**.

Portanto, a malária placentária consiste no resultado direto do sequestro de eritrócitos infectados na placenta. Em virtude da presença destes, o sinciciotrofoblasto e as células monucleares maternas são estimulados a liberarem quimiocinas atrativas de monócitos e macrófagos, tais como CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α, MIP-1β e IL-8(63–66). Assim, instaura-se um intenso infiltrado inflamatório na placenta. Esse perfil inflamatório caracteriza-se principalmente pela presença de monócitos/macrófagos maternos, que são consideradas células efetoras diretas no ataque aos eritrócitos infectados(67). Uma vez ativadas, em decorrência da infecção placentária, essas células monucleares maternas e células do sinciciotrofoblasto são fortemente associadas ao aumento nos níveis de citocinas do perfil pró-inflamatório. Apesar dessa citocinas inflamatórias visarem a eliminação do parasito pelo aumento da atividade fagocítica de macrófagos, a produção exacerbada destas pode acarretar modificações da homeostase local, sendo capaz, inclusive, de gerar alterações morfológicas e fisiológicas do órgão(68).

Aumento nos níveis normais de TNF-α (produzido principalmente por macrófagos) e IFN-γ durante a gestação estão associados a resultados adversos no nascimento. Embora essas citocinas sejam extremamente fundamentais para mediarem a defesa do hospedeiro, sua produção exacerbada é correlacionada com o perda da capacidade placentária para transferir nutrientes para o feto(69).

Figura 5 – Ligação de eritrócitos parasitados na microvasculatura e nas vilosidades placentárias



Mulheres no período gestacional, principalmente as primigrávidas, podem apresentar um sequestro excessivo de eritrócitos parasitados (EP) na placenta, por não serem reconhecidos pelos anticorpos existentes antes da gestação. Devido à presença do CSA na placenta, esses EP ligam-se à placenta por meio da variante da PfEMP-1. As PfEMP-1 de parasitas aderentes ao CSA possuem uma conformação estrutural única, permitindo que o domínio DBLγ (domínio γ de ligação tipo Duffy) ligue-se ao CSA (quadro inferior direito), ao passo que, na microvasculatura endotelial vascular, os EP se ligam através da CD36 vascular utilizando o domínio CIDR1 (interdomínio da região 1 rica em cisteína) da PfEMP-1 (quadro inferior esquerdo). Mostrando a importância da alteração no domínio CIDR1 para a conformação estrutural da PfEMP-1. (Modificado de Gamain B. et al., 2002)(70).

Na malária placentária as alterações fisiológicas da placenta estão atreladas às modificações histopatológicas, incluindo a degradação do sinciciotrofoblasto e subsequente destruição da integridade dos vilos da placenta, a necrose fibrinoide e o espessamento da membrana basal trofoblástica; consequentemente, aumentando o risco de baixo peso ao nascer, em virtude da restrição do crescimento intrauterino e parto prematuro(69).

1.6. Placenta

A placenta é um órgão transitório que se origina durante a gestação, exercendo a função de interface entre mãe e feto, indispensável, portanto, para o sucesso da gravidez. A placenta executa uma infinidade de funções dentre as quais, destacam-se o aporte nutricional, as trocas metabólicas e gasosas entre mãe e feto, a regulação endócrina e a ativação de mecanismos de tolerância imunológica. O estabelecimento do diálogo materno-embrionário a partir da secreção de numerosas substâncias pela unidade placentária, tais como hormônios, fatores de crescimento, citocinas, eicosanoides e outras moléculas bioativas sintetizadas. Além da atuação na linha de defesa contra patógenos que podem alcançar este órgão, como o plasmódio(71–74).

O processo de formação da placenta conta com a participação de populações celulares tanto maternas quanto fetais. No caso da placenta hemocorial, presente em primatas e roedores, essa interação entre mãe e feto é tão íntima que o sangue materno banha diretamente as estruturas coriônicas, de origem fetal(75,76).

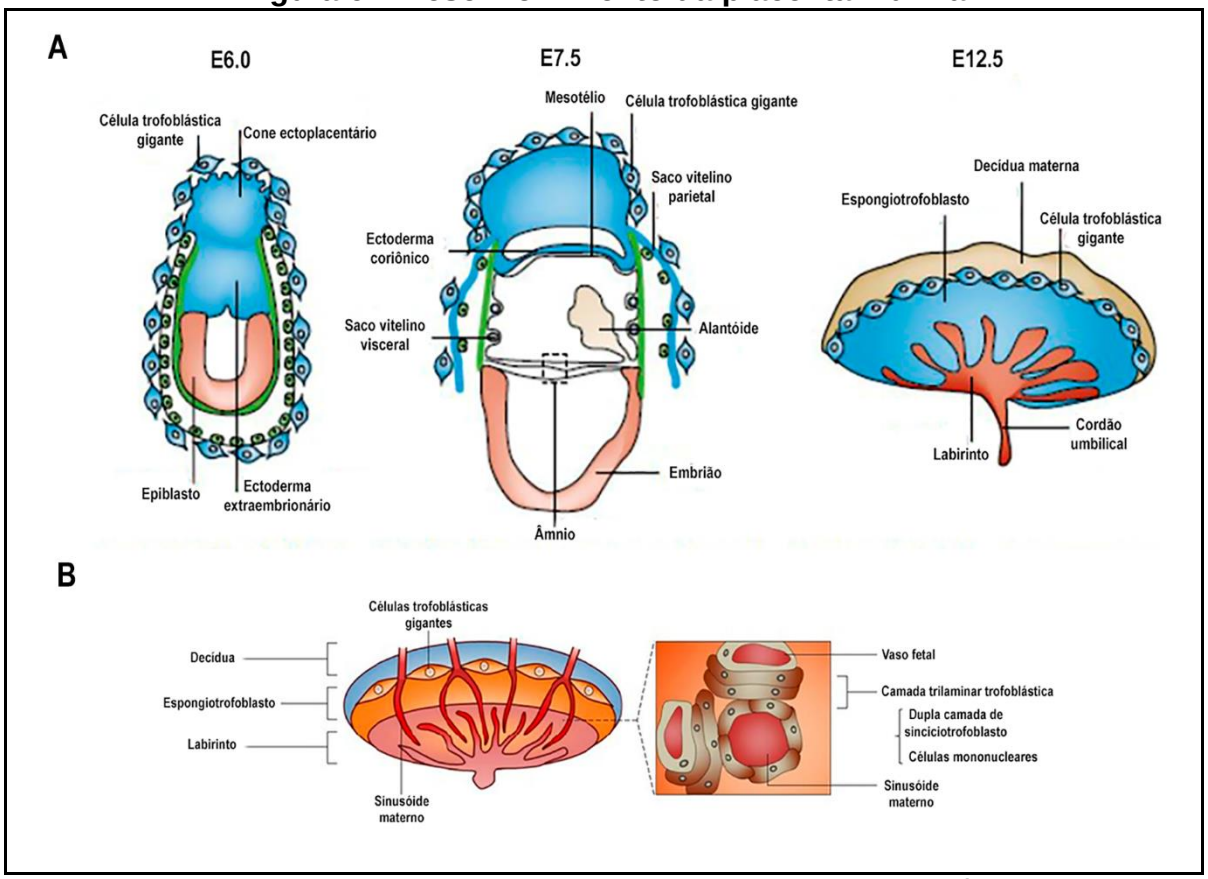
A placentação é precedida pelo processo pré-implantacional, no qual o blastocisto invade o endométrio materno e estabelece-se, de modo a possibilitar a formação de um sistema de trocas entre os organismos materno e embrionário(72). Nesta fase, o blastocisto forma-se pela massa celular interna e uma cavidade denominada blastocele, ambas revestidas pela trofoectoderme, da qual se originam as distintas populações de células trofoblásticas que formarão a porção fetal da placenta(77,78).

Em camundongos por volta do 6° e 7° dias de prenhez, as células trofoblásticas situadas acima da massa celular interna do blastocisto proliferam de forma muito intensa, originando uma excrescência denominada cone ectoplacentário. Por sua vez, as células mais periféricas desta estrutura diferenciam-se em células gigantes, as quais possuem um grande potencial invasivo e fagocítico, invadindo o tecido materno para formar a estrutura placentária. Já as células mais internas do cone ectoplacentário mantêm sua capacidade proliferativa e diferenciam-se em células do espongiotrofoblasto, uma camada da placenta formada por células que acumulam glicogênio e por células endócrinas produtoras de hormônios como o lactogênio placentário. As células trofoblásticas da base dessa estrutura (também

chamadas de ectoderma extraembrionário ou ectoderma coriônico) organizam-se com o mesoderma alantoideano para formarem as estruturas coriônicas do labirinto placentário, região responsável pelas trocas entre mãe e feto. Por fim, ao redor do 10° dia de prenhez esse mesoderma torna-se vascularizado, configurando aí a formação de uma placenta completa, porém imatura, a qual se tornará amadurecida por volta do 14° dia de prenhez(79–83) **(Fig.6A)**.

Por meio desse processo descrito, há a estruturação de uma placenta hemocorial, a qual possui um formato discoide e é formada por três camadas distintas: a decídua (por onde chegam as artérias maternas), o espongiotrofoblasto e o labirinto(82) **(Fig.6A)**. O objeto deste trabalho foi a camada do labirinto, região onde não só o sangue oriundo dos vasos maternos circula, como também os eritrócitos infectados por *Plasmodium* sp., assim como o parasita na sua forma livre. As estruturas coriônicas do labirinto são constituídas por uma camada trilaminar de células trofoblásticas que separam os capilares fetais do sangue materno circulante, a qual deriva da diferenciação do trofoblasto que reveste a estrutura coriônica inicial. Esta é composta mais internamente por uma bicamada sincicial ou de sinciciotrofoblasto envolvendo o endotélio dos vasos sanguíneos fetais e o mesênquima; e mais internamente por uma camada de células trofoblásticas gigantes (mononucleares) revestindo o espaço por onde o sangue materno circula (também chamados de sinusoides maternos(76,84–86) **(Fig.6B)**.

Figura 6 – Desenvolvimento da placenta murina



(A). Desenvolvimento do embrião de camundongo a partir do dia embrionário (E) 6 – E12.5. (Modificado de Rossant J, Cross JC, 2011)(82). **(B).** Estrutura da placenta de camundongo. (Modificado de Yamashita et al., 2011)(87).

Por sua vez, a vasculatura fetal na placenta, acomodada no interior das estruturas coriônicas do labirinto, conflui e liga-se ao feto em desenvolvimento por meio das veias e artérias umbilicais. Assim, os sinusoides com sangue materno permeiam as ramificações coriônicas do labirinto, banhando-as diretamente. Nesse processo, os sangues materno e fetal estabelecem um fluxo contracorrente dentro do labirinto para maximizar o transporte de nutrientes(79,82,85,88). Perturbações nessa região, como as provocadas pela presença do *Plasmodium berghei*, podem afetar essas trocas entre a mãe e o feto.

Outro aspecto interessante refere-se à receptividade da mãe para o desenvolvimento placentário e do embrião/feto (que possuem padrões antigênicos geneticamente diferentes da mãe), e que tem sido relacionada à existência de uma imunomodulação do sistema imune materno. Em condições normais na gestação, esses padrões antigênicos relacionados ao tecido placentário não sofrem a ação do sistema imunológico; assim, não geram respostas negativas no final da prenhez. A

intrínseca associação entre as células de origem fetal e materna vão garantir o sucesso gestacional. Neste sentido, a placenta também exerce uma barreira entre o sangue materno e o sangue fetal, protegendo o feto de um possível ataque do sistema imune. No entanto, a ocorrência de infecções durante a gestação, como no caso da malária gestacional, leva à disfunção desse delicado balanço imunológico, acarretando prejuízos para a mãe e o feto. Visto isso, os desfechos deletérios da malária durante a gestação podem ser consequência da somatória de efeitos associados às imunidades humoral e celular, e às alterações ocorridas durante o desenvolvimento da placenta, ocasionando a disfunção do órgão(64,89).

1.7. Autofagia

A autofagia trata-se de um processo catabólico fundamental para a homeostase celular, é o único sistema para degradação de grandes componentes celulares que não podem ser destruídos pela via ubiquitina-proteassoma. Esse mecanismo está bem conservado entre os diversos grupos de organismos vivos, compreendendo de leveduras até células eucarióticas superiores. Esse processo de “autodigestão” é responsável pela reciclagem de metabólitos, como macromoléculas solúveis e organelas, através da via lisossomal(90). A palavra autofagia foi criada pelo cientista Christian De Dove em 1963, e significa “autodigestão”. Durante o processo autofágico, as proteínas celulares de longa duração e organelas danificadas e/ou envelhecidas são sequestradas por vacúolos de dupla membrana e destruídas nos lisossomos pela ação de hidrolases, a fim de manter a manutenção da homeostase e integridade das células(91–93). O equilíbrio entre a síntese de proteínas e a degradação é de vital importância para o funcionamento e sobrevivência celular. Logo, as funções da autofagia tornam-se muito relevantes nesse contexto.

A autofagia é constitutivamente ativa em níveis basais nas células. A principal referência de um vacúolo autofagocítico compreende a presença de conteúdos interiorizados por uma estrutura de dupla membrana. A atividade autofágica é regulada, principalmente, pelo estresse metabólico celular, como, por exemplo: a falta de nutrientes, hipóxia, danos ao DNA, presença de patógenos e de doenças inflamatórias. Diante disso, pode desempenhar o papel de um mecanismo de

sobrevivência adaptativa. O mecanismo da autofagia pode permitir à célula o tempo necessário para estabilizar-se ante um ambiente estressor(91). Todavia, o contínuo estímulo do agente estressor pode contribuir para a morte celular, pois, em células cancerosas a autofagia tem sido mostrada como um mecanismo de morte celular, o que poderia ser uma alternativa à via da apoptose(94,95).

Foram descritos diferentes tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas. Na microautofagia, os componentes citosólicos a serem degradados são envolvidos diretamente por uma invaginação da membrana lisossomal. Enquanto a autofagia mediada por chaperonas (observada apenas em mamíferos) é capaz de selecionar as proteínas citosólicas que devem ser degradadas. As proteínas contendo o motivo KERFQ de aminoácidos são reconhecidas pela chaperona Hsc70 e conduzidas ao lisossomo, onde podem passar através da proteína 2 associada à membrana do lisossomo (LAMP-2A), culminando na degradação. Por sua vez, a macroautofagia (denominada somente de autofagia) é a via principal, que vai englobar os conteúdos citoplasmáticos no interior de uma estrutura vesicular, denominada fagóforo; este pode ser originado da membrana citoplasmática do retículo endoplasmático ou da membrana mitocondrial externa. A fusão das extremidades do fagóforo formará uma estrutura de dupla membrana, denominada autofagossoma, a qual será combinada ao lisossomo, originando o autolisossoma. Logo, os três processos citados compreendem maquinarias moleculares bem semelhantes, resultando na decomposição e reciclagem dos seus conteúdos englobados no interior dos lisossomos(93,96,97).

Os mecanismos moleculares da autofagia foram inicialmente descritos em leveduras, compreendendo mais de trinta genes (conhecidos como os genes da família Atg), os quais estão bem conservados em eucariotos superiores. Trata-se de um processo altamente dinâmico, onde ocorrem vários eventos envolvendo o tráfico de membrana.

A via canônica da autofagia consiste em quatro eventos principais: iniciação/indução, alongamento, maturação e fusão com o lisossomo. A proteína serina/treonina quinase mTORC1 (alvo de rapamicina em mamíferos) é um regulador inibidor da via autofágica, por fosforilar e inibir diretamente o complexo ULK1 (Atg13-ULK-FIP200-Atg101). A atividade de mTORC1 é estimulada dependendo de uma variedade de insumos, que podem incluir não apenas a energia

e nutrientes, bem como a presença de aminoácidos e fatores de crescimento para as funções celulares. No entanto, a mTORC1 pode ser inibida pela falta de nutrientes para a célula. Desse modo, o ULK1 é diretamente fosforilado pela proteína quinase ativada AMP (AMPK) em resposta à restrição de insumos energéticos para a célula. A AMPK desencadeia a autofagia tanto pela regulação positiva quanto pela inativação de mTORC1(96,98).

A ativação do complexo ULK1 marca o início da autofagia canônica e pode promover a sobrevivência celular(96). Concomitantemente, ocorre o início da nucleação da estrutura pré-autofagossomal ou local de formação do fagóforo (PAS), pela ação das proteínas Atg. A proteína PI3K de classe III (fosfatidilinositol 3-quinase de classe III) está envolvida nessa fase inicial, juntamente com Vps34, Beclin-1, Atg14L, entre outras. Essas proteínas em conjunto formam o complexo I Vps34, que deriva na nucleação do fagóforo. Esse complexo torna-se o principal ponto de regulação para as quinases que modulam a ativação da autofagia. Apesar de Beclin-1 ser reconhecida como uma proteína relacionada à autofagia e ser importante nesse complexo, ela mantém a associação com outras proteínas, como, por exemplo, Bcl-2 (uma proteína antiapoptótica). A fosforilação de Beclin-1 por DAPK (proteína quinase associada à morte) ou a fosforilação de Bcl-2 pela JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*) desencadeia a dissociação do complexo Beclin-1/Bcl-2 em respostas a vários estímulos, permitindo que Beclin-1 associe-se ao complexo multiprotéico Vps34 para manter a sua função na via autofágica(99,100). A partir desse momento, ocorre o reconhecimento de conteúdos a serem englobados e segue a fase de alongamento e formação do autofagossoma(96,101) **(Fig.7)**.

A continuação da expansão da membrana autofágica depende da interação inicial de dois sistemas de conjugação tipo ubiquitina: o sistema de conjugação Atg12 e o sistema de conjugação LC3(102). Atg12 é inicialmente expresso com uma glicina C-terminal, que será clivada pelo Atg7 (enzima tipo E1). O Atg12 é transferido para Atg10 (enzima tipo E2) e, finalmente, conjugado a um resíduo de lisina de Atg5(103). Por seguinte, a proteína LC3 ou MAP-1LC3 (proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia leve 3) também é formada com uma extensão do seu C-terminal, que será processada pela Atg4 (protease de cisteína) para expor sua glicina residual (a forma denominada de LC3-I)(104). Posteriormente, LC3-I ativada por Atg7, transferida para Atg3 (enzima tipo E2) e, por fim, mediante a ação do

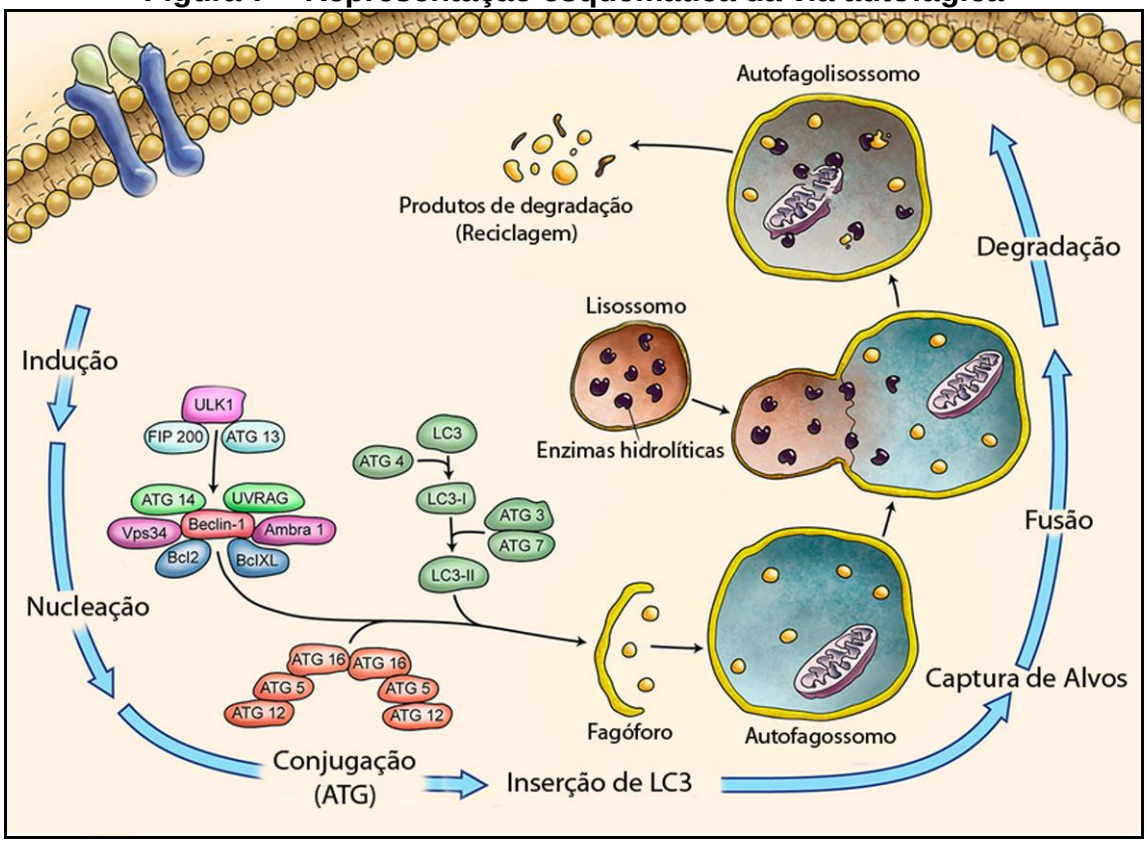
sistema de conjugação Atg12/Atg5, que funciona como uma enzima tipo E3, o LC3-I é ligada ao grupo amino de fosfatidiletanolamina (PE) (denominado de LC3-II ou LC3-PE)(105). A quantificação de LC3-II é frequentemente utilizada para estimar a abundância de autofagossomas no citoplasma celular. O complexo Atg12/Atg5 forma um novo complexo com Atg16, que torna possível selecionar o local de lipidação de LC3(106). Esse novo complexo (Atg12/Atg5/Atg16) é encontrado na membrana externa do autofagossoma e apenas se dissocia deste antes da formação completa do autofagossoma(107–110) **(Fig.7)**.

Embora a autofagia já tenha sido considerada como um processo aleatório de degradação de conteúdos citoplasmáticos, essa concepção mudou em face da descoberta de proteínas receptoras que sequestram diversos conteúdos, como mitocôndrias, agregados proteicos, ribossomos, entres outros. O LC3-II tem sido mostrado atuando como um receptor do fagóforo para essas proteínas adaptadoras e/ou carreadoras, visando uma absorção e degradação lisossomal seletiva(111). São conhecidas quatro proteínas adaptadoras capazes de reconhecer conteúdos citoplasmáticos ubiquitinizados: p62/SQSTM1, NBR1, optineurina e NDP52(112). A p62 foi a primeira proteína carreadora a ser mostrada a mediar a ligação de proteínas ubiquitinizadas e entregá-las ao fagóforo para a degradação(113). Apesar de estar bem consolidado que autofagossomas formados pela autofagia seletiva não apresentam ou quase não contêm massa citoplasmática aleatória, não está claro o grau de seletividade da autofagia induzida pela falta de aminoácidos(109).

Na fase de maturação e/ou fusão, os autofagossomas formados aleatoriamente no citosol, movimentam-se direcionados por microtúbulos, para fundirem-se com os lisossomos. Após a fusão do autofagossoma com o lisossomo, esse vacúolo passa a ser denominado, conforme mencionado, de autolisossoma ou autofagolisossoma. Em células de mamíferos, a fusão é mediada pelas proteínas da membrana lisossomal LAMP-1 e LAMP-2, e pela pequena proteína G Rab7 quando ligada ao GTP. Contudo, esse mecanismo ainda é pouco caracterizado. Posterior à fusão, o processo de degradação da vesícula inicial ocorre pela ação das hidrolases lisossomais presentes no interior dos lisossomos para a degradação de componentes, mediada por ATPases, fosfatases, lipases e, especialmente, proteases, tais como: as catepsinas, calpaínas, caspases e presinilinas. O resultado do processo de degradação são principalmente aminoácidos, os quais são liberados

no citosol pela ação das permeases presentes na membrana do lisossomo, para serem reciclados e participarem de síntese proteica e da manutenção das funções celulares em condições de privação de nutrientes(91,114). Portanto, a autofagia pode estar envolvida em diversos processos de tentativa de recuperação da homeostase celular.

Figura 7 – Representação esquemática da via autofágica



O processo autofágico envolve circuitos moleculares que iniciam com a nucleação (formação do fagóforo), seguida da conjugação de ATG5-ATG12 e da interação com ATG16L na estrutura formada; sequencialmente, há o processamento e a inserção de LC3 lipidado na membrana do fagóforo, agora denominado “autofagossomo”. É nesta estrutura que ocorre a captura randômica ou seletiva de alvos para degradação. Posteriormente, o autofagossomo funde-se com o lisossomo, originando o “autofagolisossomo”, no interior do qual as enzimas proteolítcas provenientes do lisossomo degradarão os alvos englobados. Por fim, há a liberação para o citoplasma dos produtos dessa degradação, os quais poderão ser reciclados pelas células. (Modificado de Marzban et al., 2015)(115).

1.8. Autofagia no desenvolvimento

Em todas as etapas de vida do mamífero, seja na formação e desenvolvimento do embrião, seja na fase de neonato e pós-nascimento, a autofagia exerce um papel primordial, possivelmente, devido à escassez de nutrientes e à alta demanda pela troca de proteínas e organelas durante o processo de remodelação

dos estágios iniciais da formação. A autofagia tem servido como hipótese por ser essencial na remoção de componentes dispensáveis do esperma e constituintes desnecessários do oócito(116). Além de ser necessária no remodelamento celular durante a diferenciação de eritrócitos, linfócitos e adipócitos; e de inequívoca relevância em células que vão ser diferenciadas, como neurônios e hepatócitos, nos quais a manutenção contínua da massa citoplasmática revela-se essencial(90,117).

A autofagia está presente no trofoblasto extraviloso, sendo importante no início da gestação para promover a invasão trofoblástica e remodelação vascular uterina(118). A placenta humana é formada sob condições de hipóxia e privação de nutrientes; já é conhecido que sob esses estressores, a via autofágica é ativada para atuar como um mecanismo protetivo, auxiliando a adaptação placentária. Logo, deficiências na autofagia durante esse estágio podem comprometer etapas cruciais da placentação, como a invasão e o remodelamento vascular(119–121).

Em camundongos, a autofagia é ativada poucas horas após a fecundação e torna-se necessária para o seguimento de pré-implantação de embriões murinos, pois, a inibição do processo autofágico suscita à morte embrionária no início da fertilização(122). A via da autofagia atua, presumivelmente, degradando proteínas maternas, permitindo, assim, que novas proteínas oriundas do zigoto sejam sintetizadas(123). Camundongos *knockout* para Atgs 3, 5, 7, 9 ou 16L não sobrevivem após o nascimento, graças ao decréscimo de aminoácidos no organismo. Após o nascimento, quando a nutrição não é mais feita através da placenta, ocorre um severo estresse nutricional manifestando o processo autofágico. Logo, a participação da autofagia mostra-se importante em diversos órgãos como o cérebro, onde previne a formação de agregados proteicos e o acúmulo de organelas danificadas, o que poderia desembocar em doenças neurodegenerativas(90,124).

Conforme tem sido mostrado, a autofagia está reduzida em placentas provenientes de trabalho de parto normal quando comparada a partos por cesárea eletiva(125). Um estudo recente demonstrou não ter havido diferença na expressão da autofagia entre as placentas entregues por meio do trabalho de parto espontâneo e do parto induzido farmacologicamente(126). Segundo Brickle e colaboradores, proteínas da maquinaria autofágica (Beclin-1, Atg3, Atg5, Atg7, Atg12 e Atg16L1) estão reduzidas nas membranas fetais humanas, provenientes de trabalhos de parto espontâneo, prematuro e ruptura prematura das membranas. Além disso, esses

autores demonstraram que a autofagia pode estar relacionada com o controle da inflamação induzida por infecção durante a gestação, induzindo o trabalho de parto prematuro(127).

1.9. Autofagia e inflamação

O repertório das funcionalidades autofágicas abrange também, os estímulos imunológicos(128). A via da autofagia e as proteínas autofágicas desempenham uma atribuição no controle da imunidade em organismos multicelulares, tais como o controle da resposta inflamatória como parte da imunidade inata(129), a apresentação de antígeno como parte da imunidade adaptativa e a função imunológica das células T e B(128,130).

Durante a infecção por algum patógeno invasor, como bactérias, vírus e protozoários, a autofagia atua na resposta imune para degradar esses microrganismos dentro da célula, um processo denominado de xenofagia (um tipo de autofagia seletiva). Esses fatores podem ter evoluído como um dos primeiros mecanismos de defesa autônomos em eucariontes. Semelhante à autofagia não seletiva (sequestro de massa citoplasmática aleatória), na xenofagia também é necessária à formação de um autofagossoma de dupla membrana que é fundido ao lisossomo para a destruição da carga. Apesar das duas formas serem semelhantes na utilização da maquinaria autofágica, a xenofagia depende de proteínas adaptadoras, por exemplo, a p62/SQSTM1, que se ligam aos patógenos invasores para entrarem em contato com a maquinaria autofágica e serem englobados para a degradação(131).

Além da via canônica autofágica ter um papel bem caracterizado pela formação do autofagossoma de dupla membrana, certas proteínas da maquinaria autofágica também se encontram envolvidas na defesa contra patógenos invasores de maneira não canônica(132). A via não canônica, denominada de fagocitose associada à LC3 (LAP), difere de várias maneiras da via canônica. A LAP é ativada de modo a jusante, pelos receptores de reconhecimento de padrões do tipo *Toll-like receptors* (TLR), por exemplo TLR4, durante a fagocitose. Nesse processo ocorre um rápido recrutamento de um subconjunto de proteínas da maquinaria autofágica para o fagossoma que se torna marcado por LC3 na forma lipidada. Apesar da LAP

necessitar da maquinaria de lipidação de LC3, essa forma da via não requer as proteínas sob a ação da via m-TOR, como é o caso do complexo ULK-1, ativado no caso de privação de aminoácidos. No entanto, precisa do complexo VPS34/Beclin-1 que é importante para a entrega eficiente ao lisossomo do patógeno fagocitado. A proteína Rubicon, que se associa ao complexo PI3K de classe III contendo UVRAG e que regula negativamente a autofagia canônica, mostra ser essencial para a LAP. Além disso, a LAP apresenta uma vesícula com uma única membrana marcada com LC3, diferente da via autofágica canônica que apresenta uma vesícula de dupla membrana(132–135).

O processo inflamatório compreende um mecanismo importante empregado pelo sistema imunológico para a defesa do hospedeiro. Esse mecanismo de defesa depende de receptores, como o tipo TLR para identificar padrões moleculares de patógenos e responder pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Essa resposta deve ser bem controlada, pois, a sua subativação ou hiperativação vai desencadear efeitos deletérios no hospedeiro(130,136,137). Presume-se que, a autofagia pode regular uma resposta inflamatória extensiva, auxiliando na eliminação do complexo multiprotéico do inflamassoma, responsável pela produção e mobilização de citocinas. Relatórios científicos mostraram que defeitos na via autofágica contribuem para um aumento da resposta inflamatória, causado pela maior produção de citocinas pró-inflamatórias. Já foi demonstrado que o inflamassoma NLRP3 induz a produção das citocinas IL-1β e IL-18, na ausência de autofagia, está aumentada a produção dessas citocinas levando à inflamação excessiva. Por outro lado, a ativação da autofagia sob essas condições pode eliminar componentes do inflamassoma NLRP3 e reduzir a resposta inflamatória exacerbada(138–141). Em face disso, a autofagia tem uma comprovada relevância na função imunológica, o que a torna num alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapias.

Atualmente, vários grupos têm estudado as consequências da forma grave da malária, como, por exemplo, a malária durante a gravidez(142–144). Todavia, os mecanismos moleculares que, consequentemente, conduzem aos resultados negativos no final da gestação permanecem por ser elucidados. Uma possível explicação para a falta de conhecimentos a respeito da malária placentária é que os estudos abrangendo seres humanos são insatisfatórios, devido às limitações óbvias

intrínsecas aos sistemas experimentais humanos e à acessibilidade ao material biológico nos diferentes estágios da gestação.

Uma vez que a placenta de camundongo possui muitas similaridades com a placenta humana, isso a torna um bom modelo, pois permite a manipulação genética e funcional. Dessa forma, os modelos murinos apresentam a possibilidade de estudos dos mecanismos imunopatológicos relacionados à malária placentária, em condições experimentais e controladas(82). O modelo experimental murino de infecção pelo plasmódio vem sendo utilizado pelo grupo desta pesquisa não apenas no estudo das populações e de mediadores imunológicos associados à malária durante a gravidez, assim como na análise dos fatores que propiciam o estabelecimento das lesões placentárias(49,145–147).

Tendo em vista que o perfil inflamatório corresponde a um fator crítico para o estabelecimento da malária placentária e a importância da autofagia na resposta imunológica; alterações no perfil autofágico, devido a uma possível associação deste processo com a inflamação desencadeada, poderiam colaborar para o estabelecimento da patologia. Neste viés, estudos básicos voltados para a avaliação da regulação da autofagia em modelos animais de malária placentária poderão oferecer novos conhecimentos sobre as disfunções celulares associadas à exposição ao *Plasmodium* spp. Estes conhecimentos, além de elucidar possíveis mecanismos envolvidos nos desfechos negativos da malária gestacional, poderão conduzir a estudos aplicados que visem o desenvolvimento de intervenções terapêuticas que se contraponham a estes.

2. OBJETIVOS

2.0. Objetivo geral

Caracterizar o perfil autofágico e sua associação com o processo inflamatório na malária placentária.

2.1. Objetivos específicos

i) Examinar histologicamente a morfologia de placentas de animais que apresentaram malária placentária em relação a animais não infectados.

ii) Analisar e comparar a expressão dos marcadores de autofagia e do fluxo autofágico (ULK-1, Beclin-1 e LC3) em placentas de animais que apresentaram malária placentária em relação a animais não infectados.

iii) Verificar o perfil inflamatório em placentas de animais que apresentaram malária placentária em relação a animais não infectados.

iv) Correlacionar os perfis autofágico e inflamatório nestes dois grupos de animais: infectados e não infectados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.0. Procedências

Abcam – Abcam, Cambridge, Reino Unido
BD – BD Biosceinces, Franklin Lakes, NJ, EUA
BioAmerica – BioAmerica Biotech, Miami, FL, EUA
Biodinâmica – Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil
Bio-Rad – Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA
Cell Marque – Cell Marque Corporation, Rocklin, CA, EUA
Merck – Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
Millipore – Merck Millipore, Billerica, MA, EUA
Molecular Devices – Molecular Devices, San Jose, CA, EUA
Nuvital – Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil
Novus – Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA
Qiagen – Qiagen, Hilden, Alemanha
Sigma – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA
Spring – Spring Bioscience Corporation, Pleasanton, CA, EUA
Synth – LabSynth produtos para laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil
Thermo Fisher Scientific – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA
Zeiss – Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha

3.1. Animais e parasitas

Camundongos *Mus musculus* da linhagem C57Bl/6 (tipo selvagem [WT]) foram criados e mantidos com um ciclo constante de luz – escuro (12h / 12h) em alojamento convencional no biotério do ICB/USP. Os camundongos receberam água e foram alimentados com a ração NUVILAB comercial CR-1 (Nuvital) *ad libitum*. Todos os procedimentos estão de acordo com o regulamento nacional de bem-estar e experimentação animal, autorizados pelo Comitê de Bem-Estar Animal da Universidade de São Paulo e aprovados pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (Protocolo registrado sob o n° 32/2016).

Para as infecções, utilizou-se fêmeas adultas, entre 8-14 semanas de idade. Foi utilizada a cepa de plasmódio murino *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} (GFP, *green fluorescent protein*) gentilmente cedido pelo professor Daniel Youssef Bargieri

(Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil). Os camundongos foram infectados via intravenosa (iv) com $2x10^5$ eritrócitos parasitados (EP) obtidos de estoques congelados após a passagem em fêmeas C57Bl/6. O congelamento foi feito quando a parasitemia estava entre 5% e 10%. As parasitemias foram avaliadas por citometria de fluxo, como descrito por Jasen e colaboradores(148).

3.2. Monitoramento da prenhez

Para a obtenção de fêmeas prenhes, duas fêmeas por gaiola foram mantidas com um macho da mesma linhagem por até 14 horas. A detecção de tampão vaginal e a quantificação do peso corporal foram usados em conjunto para monitorar o tempo de prenhez, como previamente descrito por Freyre e colaboradores(149). O dia de detecção do tampão vaginal (mistura de sêmen com a secreção vaginal) foi considerado o dia gestacional 1 (G1). A prenhez foi confirmada entre G10 e G13 quando os animais foram novamente pesados. O aumento médio de peso de 3-4 g nesse período é tomado como um sinal de prenhez e a perda súbita de peso, como indicador de injúria ou interrupção da prenhez(49). Para verificar os efeitos do parasito sobre a autofagia foi realizada a cesárea para retirada dos fetos e placentas no G19. No parto, a quantidade e o peso dos neonatos e das placentas foram registrados, assim como o peso do baço materno.

3.3. Infecção e avaliação da parasitemia

Os animais foram inoculados com $2x10^5$ eritrócitos infectados por via intravenosa, tanto as fêmeas prenhes (infectadas em G13) quanto as fêmeas não prenhes. As parasitemias foram avaliadas por citometria de fluxo para detectar eritrócitos infectados que expressassem GFP. Dois microlitros de sangue foram coletados por compressão da cauda dos camundongos e adicionados em 300 ul de tampão de FACS (PBS 1x, 1% SFB, azida 0.05%). As parasitemias foram expressas em percentual de células marcadas em relação ao total de eritrócitos.

3.4. Tratamento com cloroquina

A fim de se obter um controle para o fluxo autofágico, tratou-se com cloroquina uma fêmea prenhe, por meio de uma adaptação de protocolos já utilizados(150,151). Em suma, após a confirmação da prenhez, a fêmea foi pesada para a determinação da dosagem de cloroquina (Sigma) a ser injetada, cuja dose utilizada foi de 50mg/kg de peso aplicada intraperitonealmente (100µL de volume com a cloroquina diluída em solução salina estéril) a cada 24h pelo período de 6 dias (14° dia de prenhez - 19° dia de prenhez).

3.5. Coleta das placentas

As placentas de fêmeas prenhes infectadas, do grupo controle e tratadas com cloroquina foram analisadas de forma idêntica. As amostras de placenta foram coletadas em paraformaldeído 4% tamponado em um tampão fosfato-salino (PBS) pH=7.2, para o posterior processamento histológico. Para a extração proteica, as amostras foram armazenadas em tampão RIPA (1% NP-40, 0,25% Na-desoxicolato, 1mM NaF, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM Na3VO4, 50mM Tris-HCl, pH7,4, Sigma) e acondicionadas no *freezer* -80°C.

3.6. Processamento histológico

Os fragmentos de tecido coletados foram processados de acordo com a rotina histológica para inclusão em parafina Histosec® (Merck Millipore) do setor de técnicas histológicas do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB1. Resumidamente, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado em PBS, pH 7,2 por 48 horas a 4°C, e seguiram procedimentos rotineiros para a inclusão – desidratação em bateria crescente de álcool etílico (70%, 80%, 95% e 100%), diafanização com xilol e infiltração dos cortes com parafina.

3.7. Reações colorimétricas e de imunolocalização

A partir dos blocos confeccionados foram obtidos cortes de 5 µm de espessura. Estes espécimes, recolhidos em lâminas histológicas sinalizadas (Biodinâmica), receberam desparafinização, foram hidratados e submetidos à coloração de rotina (Hematoxilina e Eosina) (Sigma) e a reações imunoistoquímicas para a localização das proteínas Tpbpa (*Trophoblast specific protein alpha*), Slc16A3 (*Solute Carrier Family 16 Member 3*) e PECAM-1 (*Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule*), seguindo os seguintes procedimentos:

1. Bloqueio da peroxidase endógena: 10% de peróxido de hidrogênio (H2O2, Sigma) diluído em um tampão fosfato-salino (PBS, Sigma) 0,1M (v/v), por 10 minutos à temperatura ambiente (T.A.);
2. Três lavagens consecutivas com PBS por 5 minutos a T.A.;
3. Resgate antigênico em panela de pressão (Cell Marque) com tampão citrato pH 6.0. por 10 minutos (apenas para a proteína Slc16A3);
4. Bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos: incubação com albumina sérica bovina (BSA, Sigma) 1% em PBS (m/v) por 1 hora (T.A.) em câmara úmida;
5. Incubação com o anticorpo primário em solução de PBS/BSA 1%, *overnight* a 4° C, em câmara úmida. Ver concentrações usadas e detalhes dos anticorpos na **tabela 1**;
6. Três lavagens consecutivas com PBS (5 min, T.A.);
7. Incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (kit Reveal, Spring), por 1 hora (T.A.), em câmara úmida;
8. Três lavagens consecutivas com PBS (5 min, T.A.);
9. Revelação da atividade enzimática com 3,3’-diaminobenzidina utilizando *kit* Sigma Fast TM (Sigma), segundo as recomendações do fabricante;
10. Lavagem em água corrente por 5 minutos;
11. Contracoloração com hematoxilina de Mayer (Sigma) por 30 segundos (T.A.);
12. Montagem da lâmina com lamínula de vidro e Entellan® (Merck).

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos utilizados na imunoistoquímica

Anticorpos	Animal doador	Referência/Empresa	Resgate	Diluição
Tpbpa	Coelho	#104401/Abcam	Não	1:150
Slc16A3	Coelho	#190497/Abcam	10 minutos	1:200
Pecam-1 (CD31)	Coelho	#28364/Abcam	10 minutos	1:50
Anti-rabbit IgG	Cabra	#AP307P/Millipore	-	1:30.000
Rabbit isotype control	Cabra	#AB27478/Millipore	-	1:20.000

3.8. Morfometria

As imagens foram obtidas por meio do microscópio AxioImager M2 (Zeiss) acoplado à câmera colorida AxioCam HRc (Zeiss) sempre em 300 dpi. Para as análises quantitativas e morfométricas das imagens adquiridas foi utilizado o *Software* ImageJ v1.51k.

3.8.1. Avaliação da estrutura placentária

Selecionou-se de forma aleatória um total de dez placentas, sendo cinco do grupo controle e cinco do grupo infectado, das quais os cortes imunomarcados foram fotografados utilizando a objetiva de 10x do microscópio óptico (MO). A ferramenta de *freehand selection* foi usada para mensurar as áreas do labirinto e do espongiotrofoblasto em relação à área placentária total. Para determinar os limites de cada camada, foram utilizados imunomarcadores específicos de cada uma, Tpbpa (espongiotrofoblasto) e Slc16A3 (labirinto). Todas as medições foram realizadas às cegas, e os resultados expressos como porcentagens da área placentária total.

3.8.2. Espessura da membrana interhemal

A espessura das membranas interhemais do labirinto foram obtidas por meio da determinação da distribuição da espessura da membrana a partir de intercepções ortogonais, propostas por Jensen e colaboradores(152). Brevemente, selecionou-se aleatoriamente um total de doze placentas, metade do grupo controle e metade do grupo infectado, coradas pela hematoxilina e eosina. Essas placentas foram fotografadas aleatoriamente utilizando a objetiva de 63x do MO, para obtenção de,

no mínimo, cinco fotos por placenta. Para a correta identificação da barreira interhemal, ficou estabelecido mensurar apenas as regiões onde a célula gigante associada à estrutura coriônica, e o endotélio do vaso fetal pudessem ser evidenciados. Foram sobrepostos *grides* de 85µm^2 às fotografias, que serviram como pontos de partida randômicos para se traçarem as linhas ortogonais. Com a ferramenta *line selection*, essas linhas foram traçadas a partir do ponto onde a *gride* fazia a intersecção com um dos limites da membrana interhemal, estendendo-as até o limite oposto. O comprimento dessas linhas foi medido em µm e a média harmônica dessas medidas foi considerada para a determinação média da espessura das membranas interhemais de cada placenta. Obteve-se um n=219 e 191 observações para os grupos controle e infectado, respectivamente. Todas as observações foram realizadas às cegas.

3.8.3. Quantificação do marcador Slc16A3

As imagens obtidas sob a objetiva de 40x compreenderam uma área de 90.220µm^2 e uma resolução de 1,388 x 1,040 *pixels*. Um total de dez lâminas, quatro controles e seis infectadas, foi escolhido aleatoriamente, obtendo-se três fotos de cada uma delas. A quantificação foi realizada de acordo com o descrito por Bandeira e colaboradores(153). Brevemente, usando o *pluggin colour deconvolution*, a densidade da imunorreatividade em *pixels* para Slc16A3 foi mensurada em cada área fotografada, e expressa como uma média dessas mensurações. Os resultados foram expressos como a porcentagem da área marcada em relação à área total.

3.9. Análise da expressão proteica por *Western Blotting*

Por meio de *Western blotting* foram verificados os níveis de ULK-1 (Abcam), Beclin-1 (Abcam) e LC3 (Sigma) para acompanhar a atividade e o fluxo autofágico **(tabela 2)**. Para isso, os tecidos previamente congelados em *freezer* a -80°C foram mecanicamente homogeneizados em tubos CK14 (BioAmerica) contendo microesferas metálicas (#69997, QIAGEN) no equipamento Precellys® (BioAmerica) em 2 ciclos de 20 segundos. A concentração de proteína total foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices) com

filtro de 595 ηm, utilizando-se o *kit* Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), segundo indicações do fabricante. Após a determinação da concentração proteica total, as amostras foram diluídas em um tampão de amostra (85 mM Tris, 40 mM DTT, 17% glicerol, 0,1% SDS e 0,4% azul de bromofenol diluídas em água milliQ, Bio-Rad), acrescidas de 0,05% de β-mercaptoetanol (#BCBK1106V, Sigma); as amostras foram, então, aquecidas em placa de banho seco (DB-2A, TECHNE, Bibby Scientific Limited), a 100°C por 5 minutos para desnaturação proteica. Em seguida, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em minigel de poliacrilamida (Bio-Rad) a uma voltagem de 100 V e corrente de 14 mA durante cerca de 2 horas em um aparelho Mini-PROTEAN® Tetra cell (Bio-Rad). Como padrão de peso molecular, utilizou-se o padrão comercial Kaleidoscope (Bio-Rad). Posteriormente, as proteínas separadas no gel foram transferidas para as membranas de PVDF (Difluoreto de Polivinilideno, Bio-Rad) 0,2 µm (LC3 [transferência por 1 hora, 200 mA]) e 0,45 µm (ULK-1 e Beclin-1 [transferência durante a noite, 70 mA]), em um tampão de transferência (0,1 M glicina, 0,02 M Tris), a uma amperagem constante em um equipamento de transferência úmida (Bio-Rad).

Após a transferência, foi feito o bloqueio de sítios inespecíficos com 5% de leite desnatado (Molico) diluído em TBS-T (tampão tris-buffer-salina-Tween-20, 0,05 M TRIS, 0,1 M NaCl, pH=7,3 e 0,1% Tween-20, Synth®), sob agitação por 1 hora (LC3) e 2 horas (ULK-1 e Beclin-1) à temperatura ambiente. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em TBS-T com 1% de leite. As incubações de anticorpos primários a 4ºC durante a noite; e anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (HRP) por 1 hora (T.A.).

A revelação da membrana utilizou o Kit ECL (ClarityTM Western ECL, Bio-Rad), seguindo as recomendações do fabricante. A detecção da reação imune por quimioluminescência foi realizada em um transiluminador Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) com o auxílio do programa ImageLab™ (Bio-Rad).

Em todos os experimentos, as membranas foram reutilizadas para a incubação com o anticorpo anti-β-actina por 2 horas (T.A.), usado como controle endógeno. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por 1 hora (T.A.). As bandas detectadas pelo método de quimioluminescência foram densitometricamente mensuradas pelo *software* ImageJ

v1.51k. Ver concentrações e condições usados, e detalhes dos anticorpos na **tabela 2**.

Tabela 2 – Especificações dos anticorpos e das condições aplicadas ao *Western Blotting*

Anticorpos	Animal doador	Referência/ Empresa	Diluição	Concentração do gel (%)	Metanol (%)[e]	Proteína total (µg)
ULK-1[a]	Coelho	#Ab128859/ Abcam	1:5.000	10	10	30
Beclin-1[a]	Coelho	#Ab207612/ Abcam	1:10.000	10	10	30
LC3[a]	Coelho	#L7543/ Sigma	1:5.000	15	20	15
β-Actina[a]	Camundongo	#NB600-501/Novus	1:40.000	-	-	-
Anti-Coelho[b]	Cabra	#AP307P/ Millipore	1:20.000[c]/ 1:30.000[d]	-	-	-
Anti-Camundongo[b]	Cabra	#AP308P/ Millipore	1:20.000	-	-	-

a Anticorpo primário.
b Anticorpo secundário.
c Concentração do anticorpo secundário utilizado para Beclin-1 e LC3.
d Concentração do anticorpo secundário utilizado para ULK-1.
e Concentrações de metanol no tampão de transferência.

3.10. Quantificação de citocinas

Os níveis de citocinas inflamatórias presentes nos tecidos placentários e no sangue periférico dos animais foram verificados por meio de CBA™ (Cytometric Bead Array, BD Biosciences). Utilizou-se o *kit mouse inflammation* (#552364, BD Biosciences) para quantificação das citocinas Interleucina 10 (IL-10), Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), Interferon gama (IFN-γ), Interleucina 6 (IL-6), e da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Resumidamente, as beads de captura específicas para cada citocina foram incubadas com as amostras ou com os padrões da curva de referência (valores da curva padrão: 5000 pg/ml a 20 pg/ml). Em seguida, adicionamos o anticorpo de detecção conjugado com ficoeritrina (PE).. As amostras foram, então, incubadas por duas horas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas por centrifugação a 200 g durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as *beads* ressuspensas em um tampão de lavagem. Os dados obtidos para os tecidos

foram normalizados pela quantidade inicial de proteína total presente em cada amostra, quantificadas utilizando-se o Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientifics) de acordo com as especificações do fabricante. A análise da fluorescência produzida pelas *beads* foi quantificada por meio de citometria de fluxo (FACS Canto) e analisada com o *software* FCAP Array versão 3.0 (BD Biosciences).

3.11. Análises estatísticas

As análises estatísticas e representações gráficas destas foram geradas utilizando o programa *GraphPad Prism* para Windows (versão 6.01). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) dos grupos experimentais. Para a análise da expressão dos marcadores de autofagia, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*, o qual também foi empregado na comparação entre o peso dos fetos e das placentas. Para a determinação das correlações, usou-se o teste de *Pearson*. O nível de significância adotado foi de $p<0,05$.

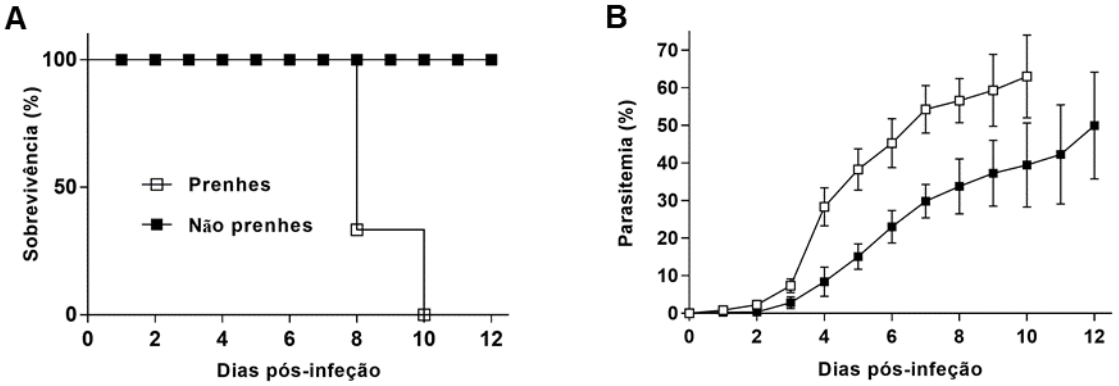
4. RESULTADOS

4.0. Caracterização do modelo murino de malária placentária

Com o objetivo de estudar a patologia da malária na placenta, reproduzimos o modelo murino desenvolvido por nosso grupo de estudo, o qual mostra as seguintes características: (i) aumento de reabsorção fetal, (ii) restrição do crescimento intrauterino, (iii) aumento das taxas de prematuridade, (iv) aumentos das taxas de baixo peso ao nascer, (v) tamanho reduzido da prole e (vi) taxa de crescimento menos expressiva após o nascimento. Todas estas características são similares às encontradas em mulheres grávidas em regiões endêmicas para malária(49,147,154).

Para o projeto atual, incluíram-se cinco grupos de animais: quatro prenhes e um não prenhe. A primeira análise para a obtenção da curva de parasitemia e sobrevivência compreendeu um grupo de fêmeas prenhes e um grupo de não prenhes, ambos submetidos à infecção. Este primeiro experimento demonstrou que a presença do parasito *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} provocou o aumento da susceptibilidade à infecção, o desenvolvimento de parasitemias mais elevadas e uma menor taxa de sobrevida nos animais prenhes em relação às fêmeas não prenhes. Além disso, é importante salientar que as fêmeas não prenhes infectadas morrem posteriormente por hiperparasitemia **(Fig.8, A e B)**.

Figura 8 – Maior suscetibilidade à infecção das fêmeas prenhes



Fêmeas C57Bl/6 prenhes não infectadas (controle) e infectadas com o *Plasmodium berghei* NK65^{GFP}, no G13 (dia de prenhez) por injeção intravenosa (iv) de $2x10^5$ eritrócitos parasitados (EP). Fêmeas não prenhes foram infectadas simultaneamente. **(A)** e **(B)** Gráficos representativos das curvas de sobrevivência e desenvolvimento da parasitemia, respectivamente. N=10 fêmeas.

Posteriormente, foram montados mais dois grupos experimentais compreendendo fêmeas prenhes infectadas no 13° dia de prenhez e fêmeas prenhes não infectadas, ambos sacrificados no 19° dia de prenhez para a retirada

dos fetos, placentas e baços maternos. A presença do parasito *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} provocou um aumento significativo do baço das fêmeas infectadas, assim como a incidência de 42% de partos prematuros nesses animais em relação ao grupo controle; de um total de sete fêmeas infectadas, três pariram em datas anteriores ao 19º dia de gestação **(tabela 3)**.

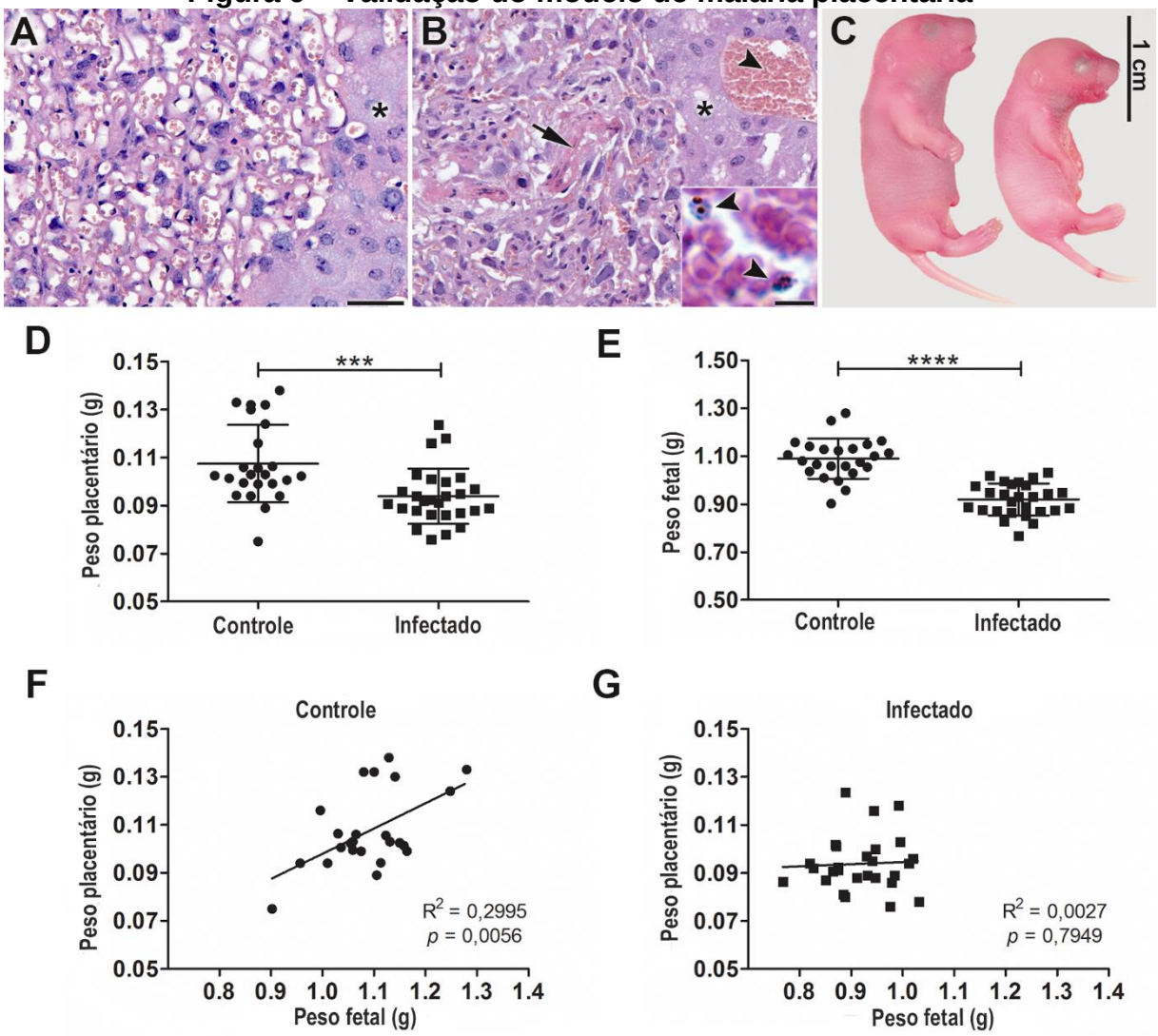
Foram observadas extensas áreas de degeneração tecidual, onde núcleos com cromatina condensada puderam ser evidenciados, bem como a presença de eritrócitos parasitados nos vasos materno da placenta **(Fig.9 A e B)**. Além disso, fetos e placentas de fêmeas infectadas diferiram negativamente em relação ao peso quando comparados aos de controle (15% e 19%, respectivamente) **(Fig.9 C, D e E)** e a correlação entre ambos os parâmetros foi perdida no grupo das fêmeas prenhes infectadas **(Fig.9 F e G)**.

Tabela 3 – Caracterização do modelo obtido a partir da cesárea

Infecção *P. berghei* NK65^{GFP}	Animais (n)	Peso do baço materno (g)[b]	Fetos	Prematuridade (%)	Parasitemia (%)[d]
Não infectado	5[c]	0,08	24	0	-
Infectado	7	0,19	27	42	4,52
Valor de *p*	-	0,0286	-	-	-

a Fêmeas C57Bl/6 foram infectadas no 13º de prenhez com *P. berghei* NK65^{GFP}, via injeção intravenosa com 2x10^5 EP. Cesárea foi realizada no 19º de prenhez.
b Teste de *Mann-Whitney.*
c n=5 animais, considerando o controle tratado com cloroquina.
d Parasitemia verificada no dia da cesárea.

Figura 9 – Validação do modelo de malária placentária



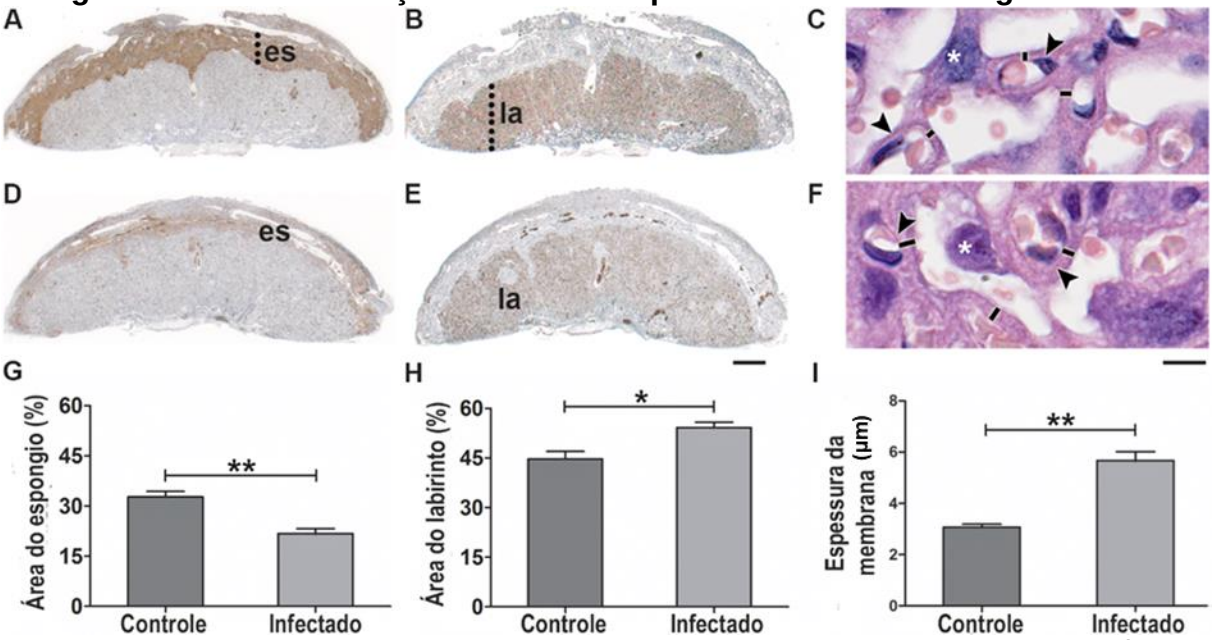
Fotomicrografias de placentas **(A)** controle e **(B)** infectada com *P. berghei* NK65^{GFP}. Região do espongiotrofoblasto (*); degeneração tecidual e depósito de fibrina (seta); eritrócitos parasitados na placenta (cabeça de seta) **(C)** Fotografia de fetos obtidos por cesárea no 19° dia de gestação evidenciando a discrepância de tamanho entre as proles de animais controles (direita) e infectadas (esquerda). **(D-E)** Representação gráfica da comparação entre peso placentário e fetal, respectivamente, mostrando a redução de ambos na presença do parasita, e validando assim o modelo experimental utilizado. Teste de *Mann-Whitney*; ***p≤0.0001 e **** p≤0.0004. **(F)** Representação gráfica da correlação direta entre peso placentário e fetal. Tal correlação é perdida **(G)** mediante o desenvolvimento da malária gestacional.

4.1. Análise da estrutura placentária

Utilizando o *Software* ImageJ, avaliou-se para cada placenta a porcentagem da área do labirinto e do espongiotrofoblasto em relação à área placentária total. Para isso, realizaram-se marcações imunoistoquímicas para as moléculas Slc16A3 e Tpbpa (marcadores de labirinto e espongiotrofoblasto, respectivamente) em seis placentas de cada grupo experimental (n=3 animais por grupo, duas placentas por

animal). As áreas de interesse foram evidenciadas pela coloração castanho-escura do composto DAB (*3,3'-Diaminobenzidine*) enquanto a área total foi delimitada por meio da contracoloração realizada com hematoxilina de Harris. Os resultados deste trabalho demonstraram que placentas de fêmeas infectadas possuem em média 11% a menos de área de espongiotrofoblasto e 9,5% a mais de área de labirinto **(Fig.10 A, B, D, E, G e H)** em relação à área total quando comparadas às placentas de fêmeas controles. Além disso, as placentas das fêmeas infectadas evidenciaram maior espessamento das membranas sinciciais da região do labirinto em relação às placentas de fêmeas que não tiveram contato com o parasito **(Fig.10 C, F e I)**.

Figura 10 – Caracterização da estrutura placentária na malária gestacional



Fotomicrografias de placentas de 19° dia de prenhez submetidas a reações de imunoistoquímica e HE evidenciadas por método colorimétrico (barra 500µm). **(A e D)** Imunolocalização da proteína Tpbpa na região do espongiotrofoblasto (es) de uma placenta controle **(A)** e de uma placenta infectada **(D)**. **(B e E)** Imunolocalização da proteína SLC16A3 na região do labirinto (la) de uma placenta controle **(B)** e de uma placenta infectada **(E)**. **(G)** Representação gráfica (em porcentagem) da quantificação da área imunorreativa para Tbpa em relação à área total corada por hematoxilina de Harris, evidenciando a diminuição expressiva do espongiotrofoblasto em placentas de animais infectados; **(H)** por outro lado, há um aumento acentuado da área imunorreativa para Slc16A3, evidenciando o incremento significativo do labirinto nessas placentas. **(C)** Região do labirinto de placentas controle e **(F)** infectada, mostrando membranas interhemais (linhas) que separam o sangue materno dos capilares fetais (cabeças de setas). Note a célula trofoblástica gigante (*) delimitando externamente a estrutura coriônica que abriga, em seu interior, um capilar fetal. Barra=20µm. Teste de *Mann-Whitney*; ***p*=0,0079 e * *p*=0,0173, respectivamente.

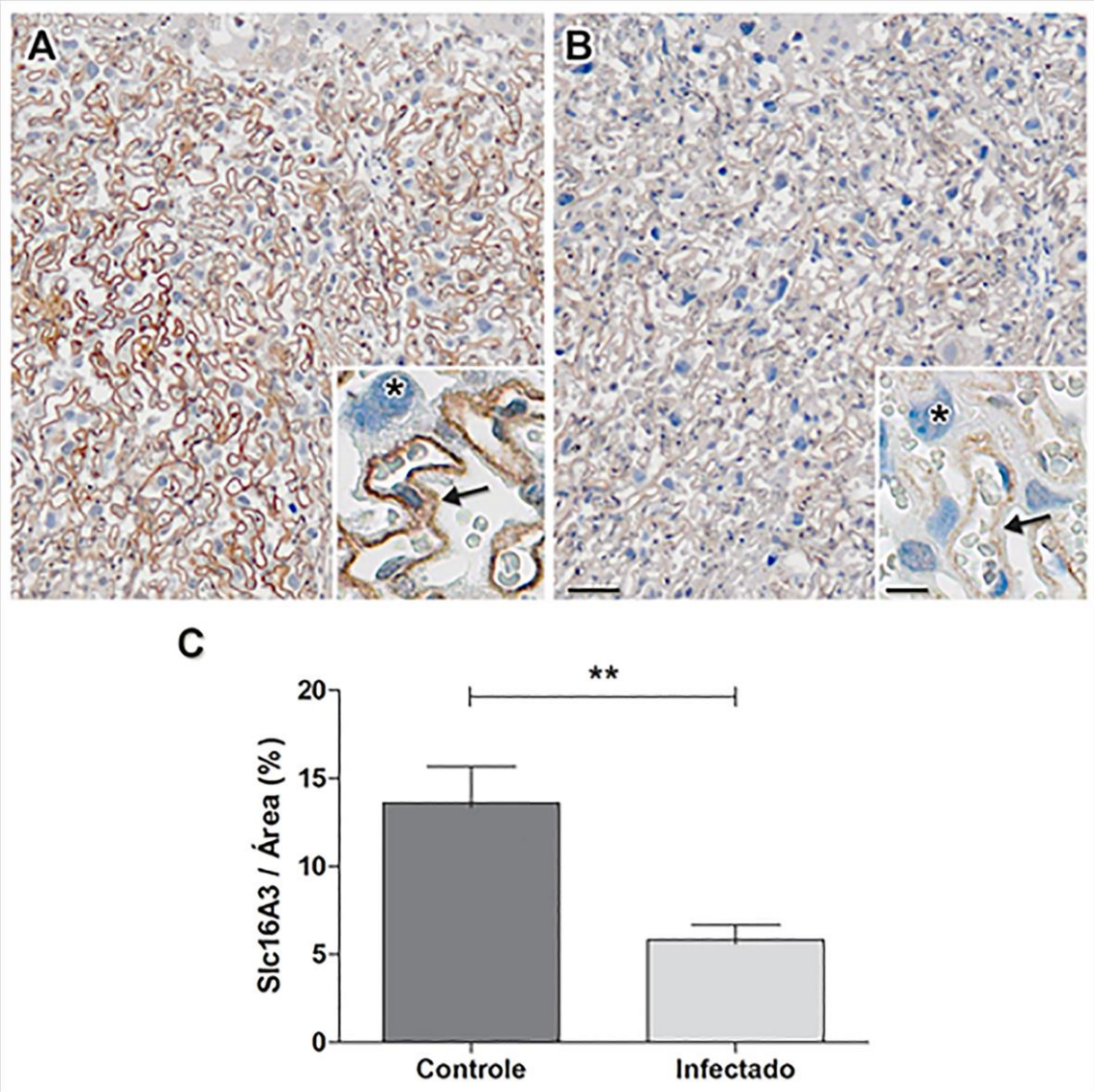
4.2. Quantificação do transportador Slc16A3 na placenta

Durante a análise da estrutura placentária se observou que a imunorreatividade para o transportador Slc16A3 no labirinto de placentas infectadas encontrava-se visualmente diminuída **(Fig.10 D)**. Realizou-se, então, a mensuração da imunorreatividade para a proteína a partir da quantificação da coloração castanho-escura produzida pelo composto DAB em seis placentas de cada grupo experimental (conforme descrito no item 4.2). Um total de 18 imagens (03 fotomicrografias por placenta) foram obtidas no aumento de 40x sob luz transmitida e quantificadas por meio do *software* ImageJ. Os resultados das médias obtidas em cada placenta apontaram uma redução de 43% na expressão da proteína Slc16A3 na camada de sinciotrofoblasto das placentas infectadas em relação às de controle **(Fig.11 A-C)**.

4.3. Verificação do perfil de marcadores inflamatórios

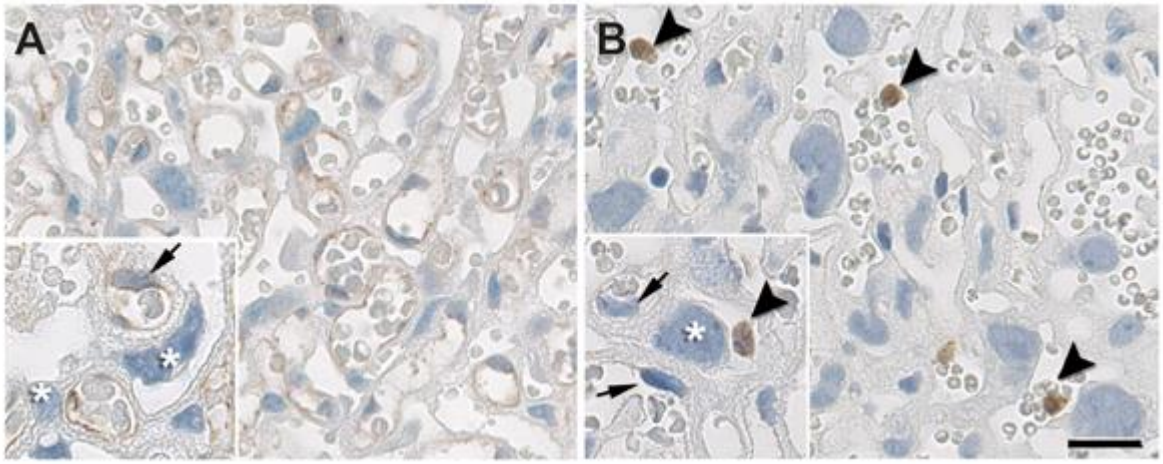
Ao se realizar a imunolocalização do marcador CD31 (PECAM-1) para a visualização dos vasos sanguíneos fetais **(Fig.12 A)**, na tentativa de estabelecer o limite interno da membrana interhemal, verificou-se a ausência total da marcação do endotélio nas placentas de fêmeas infectadas **(Fig.12 B)**. Contudo, nestas placentas foi possível observar a marcação para CD31 em células imunes maternas, localizadas no interior dos sinusoides do labirinto **(Fig.12 B)**. Além disso, foi feita a caracterização do perfil inflamatório local e sistêmico (pela análise do tecido placentário e soro, respectivamente) que contemplou, no mínimo, quatro animais por grupo. Com exceção de IL-10, os resultados obtidos mostraram um aumento de todas as citocinas avaliadas (TNF-α, IFN-γ, IL6 e MCP-1) no soro das fêmeas infectadas em relação ao soro das fêmeas controle **(Fig.13, coluna à esquerda da figura)**. Já no tecido placentário, esse aumento foi observado para TNF-α, IFN-γ e MCP-1, não sendo observadas diferenças estatísticas entre placentas controles e infectadas para IL-6 e IL-10 **(Fig.13, coluna à direita da figura).**

Figura 11 - Alteração do transportador Slc16A3 no tecido placentário devido à infecção com *Plasmodium berghei* NK65^{GFP}



(A-B) Fotomicrografias da região do labirinto de placentas de 19°dg submetidas a reações de imunoistoquímica reveladas por método colorimétrico e contracoradas por hematoxilina de Harris para o marcador Slc16A3 (barra 15µm). Nos insertos evidenciam-se em maior aumento capilares fetais rodeados pelo sinciotrofoblasto (seta) e por células gigantes (asterisco, camada mais externa); essa organização típica da interface materno-fetal encontrada no labirinto separa os sinusoides nos quais circula o sangue materno (m) dos capilares que contém sangue fetal (barra 10µm). **(C)** Representação gráfica (em porcentagem) da quantificação da reatividade de Slc16A3 por área de labirinto, demonstrando uma diminuição significativa desse transportador nas placentas infectadas. Teste de *Mann-Whitney*; ***p*=0,0095.

Figura 12 - Imunolocalização da proteína CD31

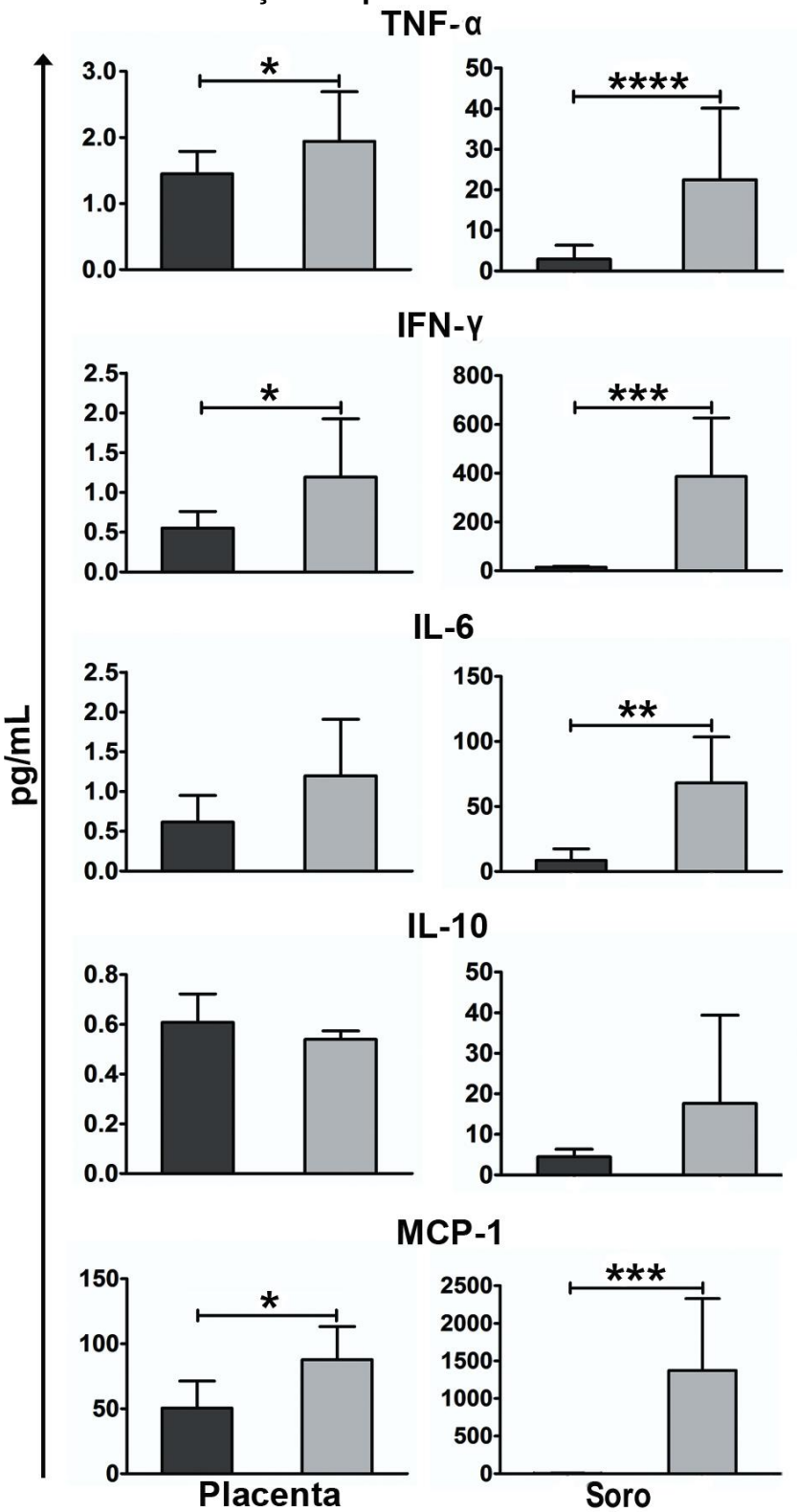


Fotomicrografias das reações de imunoistoquíca para o marcador CD31 (PECAM-1) evidenciando a marcação do endotélio em placentas de animais controle (A) e a total ausência da marcação do endotélio em placentas de animais infectados (B). Contudo, é possível observar a presença de células imunes maternas positivas para CD31 (cabeças de setas) no labirinto de placentas de fêmeas infectadas (B). As setas apontam para as células endoteliais dos vasos fetais, e os asteriscos encontram-se sobre os núcleos de células gigantes da estrutura coriônica. Barra de escala = 20µm.

4.4. Verificação do perfil da via autofágica

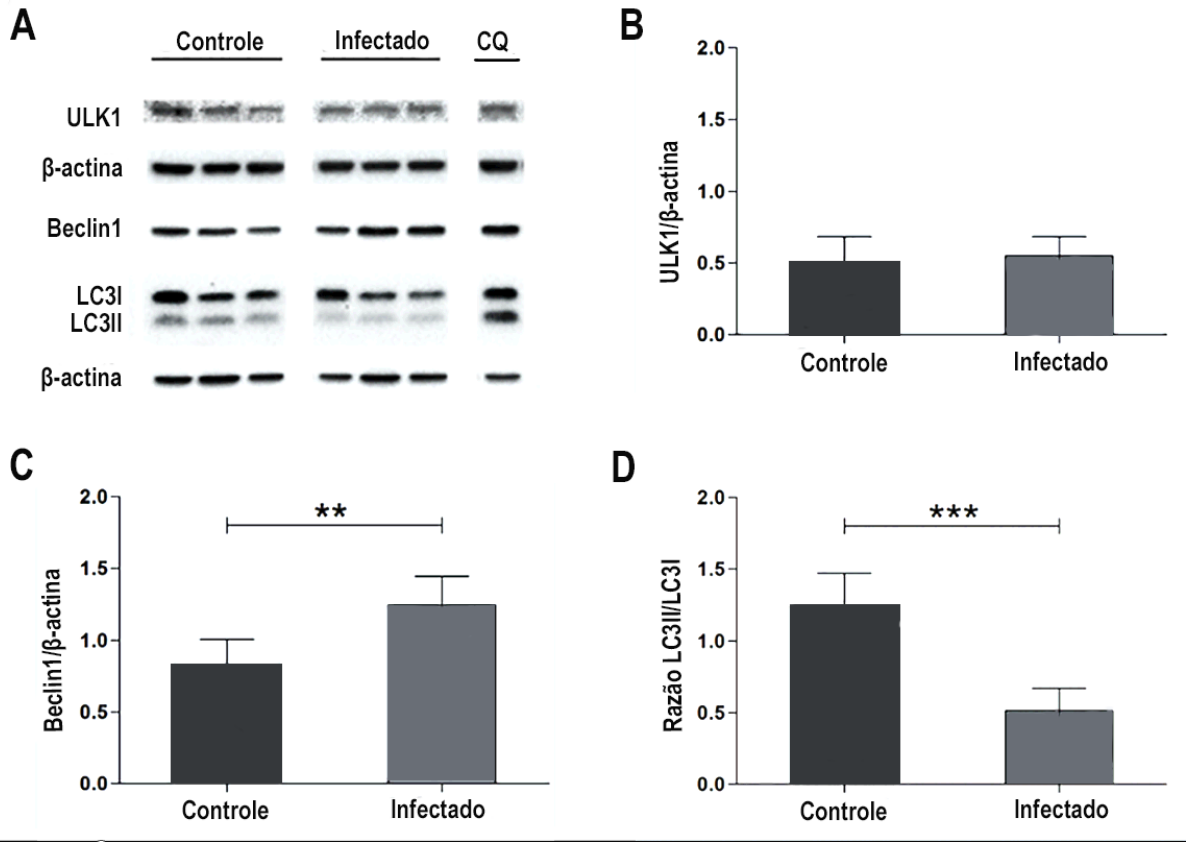
A caracterização do perfil autofágico envolveu a quantificação das bandas produzidas por *imunoblotting* das proteínas ULK-1, Beclina-1 e LC3. Foram feitas triplicatas biológicas (n= 3 placentas por grupo) e experimentais (três experimentos independentes), gerando um total de dezoito observações. Utilizou-se ainda uma amostra de placenta da fêmea tratada com cloroquina para servir como controle de fluxo autofágico e como parâmetro para a etapa de transferência, assegurando que os resultados gerados não representaram a perda de LC3II no momento do *blotting*. A partir da comparação das médias de cada experimento, verificou-se o aumento da autofagia nas placentas infectadas em relação aos controles sem interrupção de fluxo **(Fig.14 A e D)**. Ainda, os resultados demonstraram um aumento significativo de Beclin-1 nas placentas do grupo infectado, sem, contudo, haver o aumento de ULK-1 no modelo experimental **(Fig.14 A - C).**

Figura 13 – Caracterização do perfil inflamatório local e sistêmico



Representações gráficas da mensuração em tecido placentário e sangue periférico das citocinas TNF-α, IFN- γ, IL6, IL-10 e MCP-1 por meio de CBA. Os resultados expressos em pg/mL foram obtidos pela análise de, no mínimo, quatro animais para cada grupo. Para cada amostra foram utilizados 25µL de soro e idêntico volume de proteína total extraída da placenta; os valores gerados para as amostras de placenta foram normalizados pela quantidade de proteína total presente nesse volume. Teste de *Mann-Whitney*; *p≤0.05, **p≤0.001 e *** p≤0.0001.

Figura 14 – Modulação da autofagia pela presença do parasito



(A) *Imunobloting* representativo da expressão de ULK-1, Beclina-1 e LC3B – I e II nas placentas de animais infectados com *P. berghei* NK65^{GFP}. As duas últimas proteínas compartilham o mesmo controle endógeno (β-actina). Note que a amostra de placenta do animal tratado com cloroquina **(CQ)** apresenta o padrão esperado para o fluxo autofágico interrompido, com acúmulo de LC3II. **(B-D)** Os gráficos de barras representam a análise por densitometria da expressão de proteínas envolvidas na via autofágica e demonstram não haver diferença significativa entre placentas controles e infectadas para a proteína ULK-1 (p=0,77) **(B)**; no entanto, essa diferença é evidenciada para a proteína Beclina-1 (**p=0,0081) **(C)**, assim como para a razão entre as formas distintas de LC3 (LC3II/LC3I) (***p=0,0009) **(D)**. Densitometrias expressas em unidades arbitrárias. Teste estatístico utilizado: *Mann-Whitney.*

5. DISCUSSÃO

Embora a etiopatogenia da malária placentária não esteja claramente definida, há evidências consistentes de que as alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no tecido placentário, devido ao sequestro dos eritrócitos parasitados na placenta, constituem um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento da doença e sua gravidade materno-fetal(45,155). Logo, o entendimento dos processos envolvidos no estabelecimento da doença revela-se crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Em virtude disso, este grupo de trabalho propôs a avaliação da atividade autofágica em placentas de animais infectados que desenvolveram a patologia, uma vez que se trata de um processo crítico para a manutenção da homeostase e da sobrevivência celular ante injúrias e estresse celular(156,157); além disso, é sabidamente ativado pelo sistema imune inato(133,156,158), inclusive durante a malária gestacional(159), e está envolvido na indução e modulação do processo inflamatório(160).

No presente trabalho, utilizou-se um modelo experimental de camundongos não imunes à malária, fato comparável ao de gestantes de locais onde a transmissão do parasito é baixa ou instável. Assim, para confirmar a eficácia da infecção experimental nas fêmeas, acompanhamos a parasitemia desenvolvida e comparamos o peso do baço destes animais com o de animais controle. A parasitemia foi de fato detectada nas fêmeas infectadas, assim como o aumento significativo do baço destas fêmeas **(tabela 3)**. Esse dado já era esperado e demonstra o desenvolvimento da infecção, visto ser o baço o principal local para a eliminação do parasito, e o aumento do seu peso evidencia um sinal da ativação do sistema imunológico acarretando a esplenomegalia. Trata-se de um fenômeno comum observado nas infecções causadas pela presença do *Plasmodium* sp., como consequência da indução excessiva da resposta imune do hospedeiro via proliferação de linfócitos esplênicos(161), e ocorre tanto em humanos quanto em modelo murino(162) em resposta aos parasitos da malária, sendo uma característica corrente da malária grave(163).

Uma vez identificada a eficácia da infecção, avaliaram-se alguns dos parâmetros descritos na literatura para infecções por *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} durante a prenhez em fêmeas da linhagem C57Bl/6 a fim de validar o

modelo(146,154,164). Logo, nesta primeira etapa foram comparados animais infectados prenhes e não prenhes, quando se detectou o desenvolvimento de parasitemias mais elevadas e uma menor taxa de sobrevida em face da hiperparasitemia no grupo de fêmeas prenhes, dados que corroboram a susceptibilidade aumentada à infecção no período gestacional **(Fig.8 A e B)**(49,154,164). Também verificamos a presença do parasito *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} em placentas de fêmeas infectadas, o qual é responsável por provocar a significativa redução no peso de fetos e placentas dessas fêmeas em relação àqueles de fêmeas não infectadas **(Fig.9 D e E)**. Esse fenótipo reproduz o descrito pelos autores citados anteriormente, o qual também é encontrado nas infecções que acometem o ser humano(165,166).

Interessantemente, ao avaliar os parâmetros gestacionais deparou-se também com uma incidência de partos prematuros de mais de 40% **(tabela 3)**. De fato, a prematuridade é uma das consequências associadas à malária placentária em seres humanos(40,167) e o fenômeno já foi descrito por Van Zon(168) em um modelo animal de recrudescência. No entanto, este autor verificou taxas mais baixas (10%) de prematuridade, possivelmente, subestimadas pela morte das fêmeas prenhes. Os dados da literatura ainda não haviam descrito tal fenômeno na malária gestacional sem recrudescência, sendo este trabalho pioneiro neste aspecto.

O modelo adotado apresentou perda da correlação entre a taxa de peso ao nascer em relação ao peso da placenta **(Fig.9 G)**. A placenta influencia o peso fetal(169) e, desse modo, a disfunção placentária pode levar ao prejuízo no fornecimento de nutrientes para o feto, sendo a principal responsável pela falha fetal em alcançar o tamanho e peso ideais predeterminados geneticamente(170). Consequências comuns da insuficiência placentária são a restrição do crescimento intrauterino e o baixo peso ao nascer. Cabe lembrar que já foi documentado que a restrição do crescimento intrauterino está associada a taxas significativas de morbidade e mortalidade(171).

As análises morfométricas das placentas revelaram que a alteração de peso deste órgão foi acompanhada de alterações estruturais nas placentas infectadas. Por meio da quantificação das imagens obtidas, analisou-se a espessura destas camadas em relação à área placentária total e se verificou que as placentas de fêmeas infectadas possuem em média 11% a menos de área de espongiotrofoblasto

e 9,5% a mais de área de labirinto **(Fig.10 G e H)** em relação à área total, quando comparadas às placentas de fêmeas controles. Além disso, foram observadas extensas áreas de degeneração tecidual, onde núcleos com cromatina condensada puderam ser evidenciados **(Fig.9 B)**.

Este trabalho também evidenciou o aumento do espessamento da membrana interhemal das estruturas coriônicas que formam o labirinto **(Fig.10 F)**, dado que vai ao encontro da literatura. Contudo, esses autores demonstraram tal fato por meio da quantificação do espaço vascular (sinusoides do labirinto), uma forma indireta de inferir o espessamento da membrana interhemal(49,147,164). O presente trabalho inovou propondo a mensuração desse parâmetro de forma direta. Utilizando uma adaptação do protocolo de Jensen e colaboradores(152). Assim, determinamos a espessura das membranas interhemais por meio das interceptações ortogonais traçadas randomicamente (com o auxílio de *grids*) em imagens obtidas por microscopia de luz, em cortes de cinco micrômetros. Os dados aqui obtidos para a espessura das membranas interhemais das placentas de fêmeas controle são compatíveis com o descrito pela literatura utilizando-se cortes semi-finos preparados para microscopia eletrônica, denotando que a proposta de quantificação aqui apresentada é válida(172).

A placenta desempenha funções primordiais para o crescimento e desenvolvimento adequado do feto. Uma vez que se trata da estrutura de interface entre mãe e feto responsável, dentre inúmeras outras funções, pelas trocas gasosas, metabólicas e de nutrientes, suportando, assim, o desenvolvimento intrauterino(173). Todavia, alterações no desenvolvimento placentário, principalmente na região onde ocorrem as trocas materno-fetais, podem desencadear efeitos dramáticos para a formação do feto e prejudicar, inclusive, o seu desenvolvimento ao longo da vida adulta(75).

Neste sentido, este órgão é capaz de adaptar-se de uma forma dinâmica diante de fatores intrínsecos (como o crescimento fetal) e extrínsecos (como as infecções, por exemplo), visando sempre alcançar condições que garantam o desenvolvimento fetal e viabilizem o nascimento(63,173,174). Assim, modificações estruturais fazem parte da fisiologia placentária, mas por outro lado, podem ser indicativos da presença de condições patológicas adversas(175).

Interessantemente, na placenta de camundongos as duas principais áreas responsáveis pelas funções endócrinas e de trocas são o espongiotrofoblasto e o labirinto, respectivamente(82,173,176). Uma vez que a área de labirinto aumenta até o 18º dia de prenhez, enquanto o volume placentário máximo é alcançado por volta do 16º dia, incrementos nesta região são obtidos às custas da diminuição do espongiotrofoblasto e/ou da decídua basal(172,177). Nesse contexto, as proporções inversas em relação às áreas de labirinto e espongiotrofoblasto identificadas neste trabalho **(Fig.10 A-B, D-E, G-H)** poderiam refletir uma adaptação placentária no sentido de aumentar a superfície de trocas (área do labirinto) entre a mãe e o feto. De fato, as placentas infectadas apresentaram áreas de degeneração tecidual no labirinto, o que, vinculado ao fato de haver um comprometimento das hemácias maternas durante a infecção pelo plasmódio, explica a ineficiência das trocas entre a mãe e o feto e a necessidade do aumento dessa superfície de trocas.

Além disso, devido ao fato de haver uma conhecida relação inversamente proporcional entre a espessura da barreira interhemal e as taxas de difusão facilitada nesta região(175,177), o espessamento da barreira sincicial provocado pela infecção compromete ainda mais a eficiência dessas trocas e ratifica a necessidade de aumento da área do labirinto **(Fig.10 C, F e I)**.

Outro ponto interessante englobando a adaptação placentária, diz respeito à modulação dos transportadores de nutrientes presentes na placenta ante condições adversas, como a hipóxia ou o estado nutricional materno. Já foi demonstrado que a anemia em gestantes que se encontram em altas altitudes gera restrição de crescimento fetal, diretamente ligada a uma menor expressão de transportadores de glicose pela placenta, a qual altera o próprio metabolismo aeróbico para que o oxigênio disponível (nesse caso, em menor concentração) seja majoritariamente entregue ao feto(178,179). Nesse contexto, em ratos, também já foi demonstrada a diminuição das concentrações de aminoácidos no plasma de fetos cujas mães apresentavam deficiência de ferro(180).

Tendo em vista a existência de um comprometimento do transporte de oxigênio pelas hemácias infectadas, os resultados desta pesquisa parecem ir ao encontro dessa alteração metabólica placentária, já que se observou uma redução de 43% na expressão do transportador Slc16A3 na camada de sinciotrofoblasto das placentas infectadas em relação às controles **(Fig.10 B, E; Fig.11 C)**. Convém

ressaltar que a interrupção no transporte de aminoácidos já foi demonstrada em infecções pelo *Plasmodium falciparum* na malária gestacional(181) e, provavelmente, correlaciona-se com a inibição da via mTOR (*mammalian target of rapamycin*) observada nesse modelo(182).

Somada a essa quebra da homeostase metabólica, há ainda a diminuição da camada do espongiotrofoblasto, responsável pela produção de hormônios, dentre os quais, o IGF-2 (*Insulin-like growth factor-II*). Interessantemente, a expressão de IGF-2 tem sido apontada como um determinante do tamanho fetal durante a gestação em camundongos(183,184), e a diminuição da camada de espongiotrofoblasto já foi associada à redução do peso placentário e restrição de crescimento no mesmo modelo(185).

Outro fator diretamente associado com os desfechos gestacionais negativos vistos na malária reside no processo inflamatório desencadeado pela ligação do parasito na placenta(144,146,186,187). Este fato já está bem estabelecido para as infecções com *P. falciparum*, e as moléculas específicas envolvidas na aderência dos eritrócitos parasitados ao sinciciotrofoblasto da placenta humana são bem conhecidas(188). No presente trabalho, mostramos a presença de eritrócitos parasitados com *P. berghei* NK65^{GFP} na placenta murina **(Fig.9 B)**. Tal acúmulo poderia explicar os desfechos negativos encontrados na placenta, em virtude do processo inflamatório exacerbado desencadeado no ambiente uterino em resposta à presença do parasito.

Durante uma gestação normal, o balanço no perfil de citocinas Th1/Th2 são de extrema importância para o sucesso final da gravidez. O perfil predominante de citocinas anti-inflamatórias do tipo Th2 (principalmente IL-10) regulam negativamente a produção de citocinas do tipo Th1 (perfil pro-inflamatório, tais como TNF-α e IFN-γ), tornando o ambiente favorável para o desenvolvimento fetal(189). As alterações nesse perfil no decorrer da gestação podem suscitar resultados prejudiciais para a mãe e o feto. Muitos trabalhos correlacionam a malária placentária à indução do desequilíbrio do perfil Th1/Th2, favorecendo um perfil de citocinas do tipo Th1, provocando o aumento de citocinas inflamatórias no sangue placentário e periférico(45,64,190).

Efetivamente, a caracterização do perfil inflamatório do soro e tecido placentário das fêmeas utilizadas no estudo mostrou que todas as citocinas

avaliadas (TNF-α, IFN-γ, IL6 e MCP-1) estavam aumentadas no soro das fêmeas infectadas em relação ao soro das fêmeas controle, interessantemente com exceção de IL10 **(Fig.13, coluna à esquerda da figura)**. Já no tecido placentário, esse aumento foi observado para TNF-α, IFN- γ e MCP-1 **(Fig.13, coluna à direita da figura)**. Esse aumento nos níveis de citocinas e quimiocinas deve-se a presença dos eritrócitos parasitados na placenta e os bioativos derivados do parasito (hemozoína, por exemplo). Tais estímulos induzem um efeito retroativo positivo para a secreção dessas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias pelas células trofoblásticas, monócitos, macrófagos e células NK uterinas principalmente. A elevação dos níveis inflamatórios está associada com alterações histopatológicas na placenta devido às modificações na vasculogênese e angiogênese do órgão, além do espessamento e danos causados aos sinciciotrofoblasto que reveste os vilos coriônicos, por onde acontecem as trocas materno-fetais(191–193). Isto nos leva a inferir que a inflamação encontrada pode responder também pelo desarranjo tecidual e pela perda das funções placentárias encontrados no modelo aqui adotado.

Ainda, uma vez que a indução exacerbada dessas citocinas inflamatórias pode ocasionar a diminuição do transporte de aminoácidos através da camada do sinciciotrofoblasto, isso também ajudaria a explicar o baixo peso da prole observado neste trabalho(52,144,194). Em consonância com isso, é sabido que o aumento nos níveis normais de TNF-α e IFN-γ durante a gestação está associado aos resultados adversos no nascimento(69). O IFN-γ também é responsável por estimular a liberação de TNF-α pelas células monucleares. Apesar dessas citocinas possuírem efeitos extremamente citotóxicos para mediarem a defesa do hospedeiro, sua produção exacerbada tem sido correlacionada com o impedimento da capacidade funcional placentária para transferir nutrientes para o crescimento do feto(65,143,195).

Citocinas são sabidamente associadas com o trabalho de parto em gestações a termo e pré-termo em humanos(196–198); em modelos experimentais de infecção, estão diretamente ligadas a piores desfechos gestacionais e à indução de partos prematuros(186,199,200). A indução da resposta imune inata pela presença do parasito, com a produção de citocinas pró-inflamatórias, poderia justificar a alta incidência de partos prematuros encontrada no modelo experimental desta pesquisa.

Uma vez que o tecido placentário não seguiu o mesmo padrão de expressão das citocinas visto no soro, sugere-se, portanto, a possibilidade de haver uma regulação do processo inflamatório pela placenta. Assim, procurou-se investigar o processo autofágico no tecido placentário, pois a autofagia é um regulador negativo da ativação do inflamassoma e da liberação da IL-1β (citocina altamente pró-inflamatória), servindo como uma forma endógena de controle para os processos inflamatórios desencadeados no ambiente celular(201,202). Além disso, alguns estudos demonstraram que a ativação dos receptores do tipo *Toll* (TLRs) impulsiona o complexo do inflamassoma na presença dos eritrócitos parasitados(203–205).

Conforme esperado, os dados demonstraram uma regulação positiva do processo autofágico na presença da infecção **(Fig.14)**. A expressão aumentada da molécula iniciadora Beclin-1 **(Fig.14 C)** serve como um indicativo do aumento da indução do processo autofágico nessas placentas, e a diminuição da razão LC3II/LC3I **(Fig.14 D)** indica que o fluxo autofágico não está interrompido(114,206). Citocinas inflamatórias, tais como TNF-α e IL-1β, são conhecidas por induzirem a autofagia(207). Segundo Prokesch e colaboradores, a citocina pró-inflamatória TNF-α reduziu os níveis proteicos de LC3-II em cultura de explantes de placenta de primeiro trimestre, sugerindo a diminuição da autofagia; e a forma não lipidada (LC3-I) não teve alteração. Contudo, os referidos autores analisaram as duas formas do LC3 de maneira separada, sem fazer a razão entre as duas isoformas, logo, não se pode induzir sobre um possível fluxo autofágico(208).

Entretanto, verificou-se que outra molécula iniciadora (da via autofágica canônica), ULK-1, não se tornou diferencialmente alterada em relação às placentas controles **(Fig.14 B)**. Contudo, nossas observações limitaram-se à ULK-1 total, sem a verificação da forma fosforilada. Por outro lado, esse dado pode ser um indicativo de que a via autofágica observada trata-se da via não canônica LAP (LC3 associado à fagocitose). Essa via é independente de mTOR (principal via de regulação negativa da autofagia) e, por isso, dispensa a ULK-1 para a sua ativação(158). De fato, a via LAP já foi associada à fase hepática do ciclo de vida tanto do *P. vivax* quanto do *P. berghei*, e tem sido associada à defesa do hospedeiro contra vários patógenos(133). Apesar de não necessitar da ULK-1, a ativação não canônica tem sido relacionada com outras moléculas, como Rubicon e Nox2, esta última é parte do complexo responsável pela produção de ROS (espécies reativas de oxigênio),

imprescindível na indução da lipidação de LC3-I e, consequentemente, na colocalização de LC3-II com o fagossoma(135).

Por sua vez, as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF também podem interagir com Beclin 1 e, portanto, reduzir a ligação de Beclin 1 à Bcl-2 e promover a autofagia(209). Interessantemente, nosso grupo de trabalho já demonstrou que MyD88 e TRIF são ativados na presença do *P. berghei*(147). Assim, a possibilidade do envolvimento de uma via não canônica no processo é factível, mas necessita de experimentos adicionais para ser demonstrada.

Neste aspecto, Dimasuay e colaboradores(182) propuseram que alterações da via mTOR (principal reguladora positiva do transporte de aminoácido), em virtude da ativação do processo autofágico durante a infecção, poderia ser o ponto chave para explicar a restrição de peso observada na malária gestacional provocada por *P. falciparum* em humanos. Diferente do ocorrido no modelo aqui escolhido, nessas placentas ocorreu um bloqueio de fluxo autofágico, o que poderia explicar de forma mais satisfatória o baixo peso dos fetos observado pelos autores, visto que a indução da autofagia permanece ativa, com consequente acúmulo de vesículas autofágicas no citoplasma da célula gerando toxicidade(210). Contudo, uma vez que o grupo não avaliou os iniciadores do processo autofágico em trabalhos anteriores(159), há possibilidade da existência da via LAP nessas placentas, o que implicaria o fato da interrupção de mTOR ter ocorrido em virtude de outros fatores e não necessariamente da ativação da autofagia via sistema imune inato.

A exacerbação do processo autofágico pode ter efeitos negativos, tendo em vista que níveis muito altos ou muito baixos de autofagia causam a morte celular, e a autofagia ativada de forma anormal está envolvida em diferentes patologias(159). No modelo adotado no presente estudo, a autofagia poderia contribuir para a degeneração tecidual observada no labirinto. Logo, o aumento desta poderia suscitar o estabelecimento da patologia placentária. Tal fato associado aos dados obtidos, que mostram alterações estruturais e de modulação metabólica nas placentas infectadas, permitem-nos inferir que o aumento da autofagia e a adaptação placentária ocorridos são os responsáveis pelo baixo peso observado nos fetos. Esses dois processos possivelmente são desencadeados visando restituir a homeostase de um ambiente perturbado pela inflamação.

Dessa forma, uma das hipóteses possíveis é a de que o baixo peso dos fetos associado à infecção pelo *P. berghei* deve-se às adaptações estruturais e metabólicas da placenta, a fim de manter sua eficiência, principalmente no que diz respeito às trocas gasosas. Os dados encontrados sobre o espessamento da membrana interhemal, aumento da região do labirinto, perda de parte do espongiotrofoblasto e do transportador Slc16A3 (MCT4) reforçam essa idéia. Porém, a despeito de tais adaptações, a eficiência placentária não é mantida, e o órgão é incapaz de sustentar o crescimento fetal determinado geneticamente, fato claramente observado na perda da correlação entre peso fetal e peso placentário. Assim, a insuficiência placentária também pode estar envolvida no desfecho gestacional negativo observado em nosso trabalho.

Nesse sentido, acreditamos que a insuficiência do órgão pode estar limitando o processo autofágico, que se encontra ativo, e coincide com uma modulação parcial da inflamação local. Outra possibilidade seria o aumento da autofagia ser uma das adaptações placentárias utilizadas para garantir o aporte nutricional para o feto, pela estratégia da diminuição das demandas energéticas da placenta. Contudo, essa interação permanece ainda não clara, e o quanto essa ativação autofágica está envolvida nos efeitos deletérios e nas alterações observadas na placenta é um ponto que merece novos estudos, utilizando inibidores específicos dos processos autofágicos no modelo aqui adotado.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram que a infecção pelo *Plasmodium berghei* NK65GFP em camundongos C57BL/6 induziu a ocorrência de partos prematuros, baixo peso fetal, da perda da correlação peso fetal/peso placentário e a alteração estrutural da placenta - com diminuição do espongiotrofoblasto, e espessamento do labirinto e da membrana interhemal. Ainda, essa modulação estrutural placentária parece estender-se também para o metabolismo do órgão, com a drástica diminuição do transportador Slc16A3 (MCT4) e o aumento do processo autofágico.

Em conjunto, esses dados servem para levantar a hipótese de que o baixo peso associado à infecção provavelmente reflete uma série de fatores ligados a adaptações estruturais e metabólicas da placenta, seguidas da insuficiência placentária. Em relação à autofagia nesse processo, o quanto sua ativação está diretamente envolvida é um ponto que permanece não claro, e que continuaremos investigando.

Finalmente, a alta taxa de prematuridade e o dano tecidual observados no grupo infectado, com aumento nos níveis sistêmico e local de citocinas pró-inflamatórias, nos leva a crer que a inflamação pode ter um papel crucial na gênese das alterações e da insuficiência placentárias observadas. Assim, acreditamos que controlar a inflamação poderia ser uma das formas de amenizar as adaptações placentárias induzidas pelo parasita, atenuando os desfechos negativos observados na prole.

Nesse sentido, pesquisas relacionadas aos mecanismos envolvidos na adaptação placentária em resposta ao processo inflamatório parecem ser promissoras na busca de estratégias terapêuticas para a malária gestacional.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

1. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria [Internet]. 2016 [cited 2016 Aug 15]. Available from: http://www.cdc.gov/malaria/

2. Cox FEG. History of human parasitic diseases. Infect Dis Clin North Am [Internet]. 2004 Jun;18(2):171–88, table of contents. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15145374

3. MANSON-BAHR P. The malaria story. Proc R Soc Med [Internet]. 1961 Feb;54:91–100. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21661463

4. Arrow KJ, Panosian C, Gelband H. Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance [Internet]. Drugs. 2004. 388 p. Available from: http://www.nap.edu/catalog/11017.html

5. Gopalakrishnan AM, Kumar N, Orleans N. Encyclopedia of Malaria [Internet]. Kremsner PG, Krishna S, editors. New York, NY: Springer New York; 2016. 1-8 p. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-8757-9

6. Cox FEG. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2002 Oct;15(4):595–612. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364371

7. Meshnick SR, Dobson MJ. The History of Antimalarial Drugs. Antimalar Chemother Mech Action, Resist New Dir Drug Discov. 2001;15–25.

8. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. ClinMicrobiolRev [Internet]. 2004;17(0893–8512 (Print)):235–54. Available from: doi: 10.1128/CMR.17.1.235

9. Neafsey DE, Juraska M, Bedford T, Benkeser D, Valim C, Griggs A, et al. Genetic Diversity and Protective Efficacy of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine. N Engl J Med [Internet]. 2015;373(21):2025–37. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1505819%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26488565

10. de Koning-Ward TF, Dixon MWA, Tilley L, Gilson PR. Plasmodium species: master renovators of their host cells. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2016 Aug;14(8):494–507. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro.2016.79

11. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet [Internet]. 2014 Feb;383(9918):723–35. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613600240

12. Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, et al. The

---

[1] De acordo com:
Internatonal Commitee of Medical Journal Editors. [Internet].Uniform requirements for manuscripts submited to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: htp://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. Lancet [Internet]. 2013 Sep;382(9895):900–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60310-4

13. World Health Organization. Guidelines for the Treatment of Malaria. Third Edition [Internet]. Third. 2015. 313 p. Available from: https://books.google.com.br/books?id=IVo0DgAAQBAJ

14. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. J Clin Invest [Internet]. 2008 Apr;118(4):1266–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382739

15. World Health Organization. World Malaria Report 2017 [Internet]. 2017 [cited 2018 Jun 2]. p. 196. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/

16. Unicef. Malaria mortality among children under five is concentrated in sub-Saharan Africa [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 25]. Available from: http://data.unicef.org/topic/child-health/malaria/

17. de Oliveira EC, dos Santos ES, Zeilhofer P, Souza-Santos R, Atanaka-Santos M. Geographic information systems and logistic regression for high-resolution malaria risk mapping in a rural settlement of the southern Brazilian Amazon. Malar J [Internet]. 2013 Nov 15;12:420. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3842636&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

18. Ministério da Saúde. Malária [Internet]. 2015. 2016 [cited 2016 Nov 19]. Available from: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10933&Itemid=646

19. Sampaio VS, Siqueira AM, Alecrim M das GC, Mourão MPG, Marchesini PB, Albuquerque BC, et al. Malaria in the state of amazonas: A typical brazilian tropical disease infl uenced by waves of economic development. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(Suppl I):4–11.

20. Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. Climate, environment and transmission of malaria. Infez Med [Internet]. 2016 Jun 1;24(2):93–104. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27367318

21. Zimmerman RH, Lounibos LP, Nishimura N, Galardo AKR, Galardo CD, Arruda ME. Nightly biting cycles of malaria vectors in a heterogeneous transmission area of eastern Amazonian Brazil. Malar J [Internet]. 2013 Jul 26;12(1):262. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890413

22. Lee AH, Symington LS, Fidock DA. DNA repair mechanisms and their biological roles in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2014;78(3):469–86. Available from: http://mmbr.asm.org/content/78/3/469.abstract

23. Baton LA, Ranford-Cartwright LC. Spreading the seeds of million-murdering death: Metamorphoses of malaria in the mosquito. Trends Parasitol.

2005;21(12):573–80.

24. Frischknecht F, Matuschewski K. Plasmodium Sporozoite Biology. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2017 Jan 20;a025478. Available from: http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a025478

25. Baton LA, Ranford-Cartwright LC. How do malaria ookinetes cross the mosquito midgut wall? Trends Parasitol [Internet]. 2005 Jan;21(1):22–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15639737

26. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. Cell [Internet]. 2016 Oct;167(3):610–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055

27. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJI, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 2016 May;40(3):343–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26833236

28. Bannister L., Hopkins J., Fowler R., Krishna S, Mitchell G. A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium falciparum Asexual Blood Stages. Parasitol Today [Internet]. 2000 Oct;16(10):427–33. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169475800017555

29. Bannister L, Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. Trends Parasitol [Internet]. 2003 May;19(5):209–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763426

30. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2012;4(1).

31. Gachot B, Ringwald P. [Severe malaria]. Rev Prat [Internet]. 1998 Feb 1;48(3):273–8. Available from: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&NEWS=N&PAGE=fulltext&AN=9781074&D=med4

32. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. Crit Care [Internet]. 2003 Aug;7(4):315–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930555

33. Miller LH, Ackerman HC, Su X, Wellems TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. Nat Med [Internet]. 2013 Feb;19(2):156–67. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389616

34. Hughes KR, Biagini GA, Craig AG. Continued cytoadherence of Plasmodium falciparum infected red blood cells after antimalarial treatment. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 2010 Feb;169(2):71–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.09.007

35. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. Nature [Internet]. 2002 Feb 7;415(6872):673–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832955

36. Pouvelle B, Buffet P a, Lépolard C, Scherf a, Gysin J. Cytoadhesion of

Plasmodium falciparum ring-stage-infected erythrocytes. Nat Med. 2000;6(11):1264–8.

37. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamoa K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. Lancet Infect Dis [Internet]. 2007 Feb;7(2):93–104. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251080

38. Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RFG, Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. Lancet Infect Dis [Internet]. 2007 Feb;7(2):105–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251081

39. Beeson JG, Duffy PE. The immunology and pathogenesis of malaria during pregnancy. Curr Top Microbiol Immunol [Internet]. 2005;297:187–227. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16265906

40. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. J Infect Dis [Internet]. 2000;181(5):1740–5. Available from: %5C%5Clarser13%5CTIS$%5Clit%5CB4000%5CB03049.pdf

41. Meuris S, Piko BB, Eerens P, Vanbellinghen AM, Dramaix M, Hennart P. Gestational malaria: Assessment of its consequences on fetal growth. Am J Trop Med Hyg. 1993;48(5):603–9.

42. Menendez C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. Parasitol Today [Internet]. 1995 May;11(5):178–83. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169475895801510

43. Nosten F, Rogerson SJ, Beeson JG, McGready R, Mutabingwa TK, Brabin B. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? Trends Parasitol [Internet]. 2004 Sep;20(9):425–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324733

44. Fried M, Duffy PE. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. Science [Internet]. 1996 Jun 7;272(5267):1502–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8633247

45. Brabin BJ, Romagosa C, Abdelgalil S, Menéndez C, Verhoeff FH, McGready R, et al. The sick placenta-the role of malaria. Placenta [Internet]. 2004 May;25(5):359–78. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400403003072

46. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. Nat Rev Immunol [Internet]. 2005 Sep;5(9):722–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138104

47. Nwagha UI, Ugwu VO, Nwagha TU, Anyaehie BU. Asymptomatic Plasmodium parasitaemia in pregnant Nigerian women: almost a decade after Roll Back Malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 2009 Jan;103(1):16–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783809

48. Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM. Placental malaria. I. Pathological classification. Histopathology [Internet]. 1993 Mar;22(3):211–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8495954

49. Neres R, Marinho CRF, Gonçalves LA, Catarino MB, Penha-Gonçalves C. Pregnancy outcome and placenta pathology in Plasmodium berghei ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. PLoS One [Internet]. 2008;3(2):e1608. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18270595

50. Sharma L, Shukla G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. Front Med [Internet]. 2017;4(July):1–6. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00117/full

51. Walter PR, Garin Y, Blot P. Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. Am J Pathol [Internet]. 1982 Dec;109(3):330–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6758604

52. Umbers AJ, Aitken EH, Rogerson SJ. Malaria in pregnancy: Small babies, big problem. Trends Parasitol [Internet]. 2011;27(4):168–75. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.01.007

53. Kuile FO, Rogerson SJ. Plasmodium vivax Infection during Pregnancy : An Important Problem in Need of New Solutions. 2008;46:1382–4.

54. Takem EN, D'Alessandro U. Malaria in pregnancy. Mediterr J Hematol Infect Dis [Internet]. 2013 Jan 2;5(1):e2013010. Available from: http://www.mjhid.org/article/view/2013.010

55. Rao AJ. Regulation of Growth and Function of Lifeline Placenta. Kaul SK, editor. MGM J Med Sci [Internet]. 2014;1(September):139–42. Available from: http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=6331&Type=FREE&TYP=TOP&IN=~/eJournals/images/JPLOGO.gif&IID=478&isPDF=YES

56. Rogerson SJ, Desai M, Mayor A, Sicuri E, Taylor SM, van Eijk AM. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. Lancet Infect Dis [Internet]. 2018;18(4):e107–18. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918300665

57. Khunrae P, Dahlbäck M, Nielsen MA, Andersen G, Ditlev SB, Resende M, et al. Full-length recombinant Plasmodium falciparum VAR2CSA binds specifically to CSPG and induces potent parasite adhesion-blocking antibodies. J Mol Biol [Internet]. 2010 Apr 2;397(3):826–34. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.040

58. Tuikue Ndam NG, Salanti A, Bertin G, Dahlbäck M, Fievet N, Turner L, et al. High level of var2csa transcription by Plasmodium falciparum isolated from the placenta. J Infect Dis [Internet]. 2005 Jul 15;192(2):331–5. Available from: https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/430933

59. Wahlgren M, Goel S, Akhouri RR. Variant surface antigens of Plasmodium falciparum and their roles in severe malaria. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2017 Aug;15(8):479–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28603279%5Cnhttp://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro.2017.47

60. Costa FTM, Avril M, Nogueira PA, Gysin J. Cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and the infected placenta: a two-way pathway.

Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol [Internet]. 2006 Dec;39(12):1525–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160261

61. Bentley G a, Gamain B. How does Plasmodium falciparum stick to CSA? Let's see in the crystal. Nat Struct Mol Biol [Internet]. 2008;15(9):895–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769465

62. Rovira-Vallbona E, Monteiro I, Bardají A, Serra-Casas E, Neafsey DE, Quelhas D, et al. VAR2CSA signatures of high Plasmodium falciparum parasitemia in the placenta. PLoS One [Internet]. 2013;8(7):e69753. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23936092

63. Dimasuay KG, Boeuf P, Powell TL, Jansson T. Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. Front Physiol [Internet]. 2016;7(JAN):12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26858656

64. Mens PF, Bojtor EC, Schallig HDFH. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol [Internet]. 2010;152(2):126–32. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2010.05.013

65. Suguitan AL, Leke RGF, Fouda G, Zhou A, Thuita L, Metenou S, et al. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with Plasmodium falciparum malaria. J Infect Dis [Internet]. 2003 Oct 1;188(7):1074–82. Available from: http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/378500

66. Abrams ET, Brown H, Chensue SW, Turner GDH, Tadesse E, Lema VM, et al. Host Response to Malaria During Pregnancy: Placental Monocyte Recruitment Is Associated with Elevated Chemokine Expression. J Immunol [Internet]. 2003 Mar 1;170(5):2759–64. Available from: http://www.jimmunol.org/content/170/5/2759%5Cnhttp://www.jimmunol.org/content/170/5/2759

67. Manirakiza A, Serdouma E, Ngbalé RN, Moussa S, Gondjé S, Degana RM, et al. A brief review on features of falciparum malaria during pregnancy. J Public Health Africa [Internet]. 2017 Dec 31;8(2):668. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29456824

68. Schofield L. Intravascular infiltrates and organ-specific inflammation in malaria pathogenesis. Immunol Cell Biol [Internet]. 2007;85(2):130–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17344907

69. Fried M, Muga RO, Misore a O, Duffy PE. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. J Immunol [Internet]. 1998 Mar 1;160(5):2523–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498798

70. Gamain B, Gratepanche S, Miller LH, Baruch DI. Molecular basis for the dichotomy in Plasmodium falciparum adhesion to CD36 and chondroitin sulfate A. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2002 Jul 23;99(15):10020–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12096191

71. Lyall F. The human placental bed revisited. Placenta. 2002;23(8–9):555–62.

72. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. J Clin Invest. 2004;114(6):744–54.

73. Vause S, Saroya DK. Functions of the placenta. Anaesth Intensive Care Med [Internet]. 2005 Mar;6(3):77–80. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472029906700546

74. Thellin O, Heinen E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. Toxicology [Internet]. 2003 Apr 1;185(3):179–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581692

75. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. Thromb Res [Internet]. 2004 Jan;114(5–6):397–407. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384804003421

76. da Anunciação A, Mess AM, Orechio D, Aguiar BA, Favaron PO, Miglino MA. Extracellular matrix in epitheliochorial, endotheliochorial and haemochorial placentation and its potential application for regenerative medicine. Reprod Domest Anim [Internet]. 2017 Feb;52(1):3–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27925305

77. Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Cell death and morphogenesis during early mouse development: Are they interconnected? BioEssays. 2015;37(4):372–8.

78. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. Endocr Rev [Internet]. 2004 Jun;25(3):341–73. Available from: https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2003-0020

79. Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review. Placenta [Internet]. 2005 Apr;26 Suppl A(SUPPL.):S3-9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837063

80. Hu D, Cross JC. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. Int J Dev Biol. 2010;54(2–3):341–54.

81. El-Hashash AHK, Warburton D, Kimber SJ. Genes and signals regulating murine trophoblast cell development. Mech Dev [Internet]. 2010;127(1–2):1–20. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2009.09.004

82. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. Nat Rev Genet [Internet]. 2001 Jul;2(7):538–48. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/35080570

83. Cross JC. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. Semin Cell Dev Biol [Internet]. 2000 Apr;11(2):105–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873707

84. Chucri TM, Monteiro JM, Lima AR, Salvadori MLB, Kfoury JR, Miglino MA. A review of immune transfer by the placenta. J Reprod Immunol [Internet]. 2010 Dec;87(1–2):14–20. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2010.08.062

85. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: the forgotten organ. Annu Rev Cell Dev Biol

[Internet]. 2015;31(1):523–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443191

86. Simmons DG, Natale DRC, Begay V, Hughes M, Leutz A, Cross JC. Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth. Development [Internet]. 2008 May 14;135(12):2083–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763191

87. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. Nat Nanotechnol [Internet]. 2011;6(5):321–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.41

88. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. Physiology (Bethesda) [Internet]. 2005 Jun;20:180–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15888575

89. Du M-R, Wang S-C, Li D-J. The integrative roles of chemokines at the maternal-fetal interface in early pregnancy. Cell Mol Immunol [Internet]. 2014 Sep;11(5):438–48. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109684

90. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. Nat Cell Biol [Internet]. 2010 Sep;12(9):823–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811354

91. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet [Internet]. 2009;43(68):67–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831538/

92. Klionsky DJ. Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. Autophagy. 2008;4(6):740–3.

93. Lyndsay Murrow & Jayanta Debnath. Autophagy As A Stress Response And Quality Control Mechanism—Implications for Cell Injury and Human Disease. Annu Rev Pathol. 2013;(2):105–37.

94. Boya P, Gonza R, Casares N, Perfettini J, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. Mol Cell Biol. 2005;25(3):1025–40.

95. Arroyo DS, Gaviglio EA, Peralta Ramos JM, Bussi C, Rodriguez-Galan MC, Iribarren P. Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer. Int Immunopharmacol. 2014;18(1):55–65.

96. Limbergen J Van, Stevens C, Nimmo ER, Wilson DC, Satsangi J. Autophagy : from basic science to clinical application. Nature [Internet]. 2009;2(4):315–30. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/mi.2009.20

97. Rut Valdor & Fernando Macian. Autophagy and the Regulation of the Immune Response. Pharmacol Res. 2012;66(6):475–83.

98. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. Nat Cell Biol [Internet]. 2013 Jul;15(7):713–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817233

99. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. Mol Cell [Internet]. 2008 Jun 20;30(6):678–88. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18570871

100. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, et al. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. EMBO Rep [Internet]. 2009 Mar;10(3):285–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19180116

101. Russell RC, Yuan H-X, Guan K-L. Autophagy regulation by nutrient signaling. Cell Res [Internet]. 2014;24(1):42–57. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24343578

102. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. Annu Rev Cell Dev Biol [Internet]. 2011;27(1):107–32. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005

103. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. Nature [Internet]. 1998 Sep 24;395(6700):395–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759731%5Cnhttp://www.nature.com/nature/journal/v395/n6700/pdf/395395a0.pdf

104. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J [Internet]. 2000 Nov 1;19(21):5720–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060023

105. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. Nature [Internet]. 2000 Nov 23;408(6811):488–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11100732

106. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. Mol Biol Cell [Internet]. 2008 May;19(5):2092–100. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321988

107. Chunli Liu, Yanqin Gao, John Barret and BH. Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. J Neurochem. 2010;115(1):68–78.

108. Scherz-shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. autophagy and specifically regulate the activity. EMBO J. 2007;26(7):1749–60.

109. Karanasios E, Ktistakis NT. Autophagy at the Cell, Tissue and Organismal Level [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-33145-4

110. Wu J, Dang Y, Su W, Liu C, Ma H, Shan Y, et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome. Biochem Biophys Res Commun. 2006;339(1):437–42.

111. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. Autophagy [Internet]. 2011 Mar;7(3):279–96. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189453

112. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. Mol Cell [Internet]. 2014 Jan 23;53(2):167–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462201

113. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. J Cell Biol [Internet]. 2005 Nov 21;171(4):603–14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16286508

114. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol [Internet]. 2010 May;221(1):3–12. Available from: papers://1342abd5-e320-4e10-a9b6-f8497f56318b/Paper/p11731

115. Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M. Cellular commitment in the developing cerebellum. Front Cell Neurosci [Internet]. 2014;8(January):450. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00450/abstract

116. Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA: degradation of paternal mitochondria by allogeneic organelle autophagy, allophagy. Autophagy [Internet]. 2012 Mar;8(3):424–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302002

117. Nakashima A, Aoki A, Kusabiraki T, Shima T, Yoshino O, Cheng S Bin, et al. Role of autophagy in oocytogenesis, embryogenesis, implantation, and pathophysiology of pre-eclampsia. J Obstet Gynaecol Res. 2017;43(4):633–43.

118. Saito S, Nakashima A. A review of the mechanism for poor placentation in early-onset preeclampsia: The role of autophagy in trophoblast invasion and vascular remodeling. J Reprod Immunol [Internet]. 2014;101–102(1):80–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2013.06.002

119. Sisti G, Kanninen TT, Ramer I, Witkin SS. Interaction between the inducible 70-kDa heat shock protein and autophagy: effects on fertility and pregnancy. Cell Stress Chaperones. 2015;20(5):753–8.

120. Kanninen TT, de Andrade Ramos BR, Witkin SS. The role of autophagy in reproduction from gametogenesis to parturition. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol [Internet]. 2013 Nov;171(1):3–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.07.020

121. Saito S, Nakashima A. Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia. Placenta [Internet]. 2013;34(SUPPL):S79–84. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.11.026

122. Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. Science [Internet]. 2008 Jul 4;321(5885):117–20. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1154822

123. Stitzel ML, Seydoux G. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. Science [Internet]. 2007 Apr 20;316(5823):407–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446393

124. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. Nature [Internet]. 2009;458(7242):1131–5. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2676208&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

125. Signorelli P, Avagliano L, Virgili E, Gagliostro V, Doi P, Braidotti P, et al. Autophagy in term normal human placentas. Placenta [Internet]. 2011;32(6):482–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2011.03.005

126. Avagliano L, Virgili E, Garò C, Quadrelli F, Doi P, Samaja M, et al. Autophagy and human parturition: Evaluation of LC3 expression in placenta from spontaneous or medically induced onset of labor. Biomed Res Int. 2013;2013.

127. Brickle A, Tran HT, Lim R, Liong S, Lappas M. Autophagy, which is decreased in labouring fetal membranes, regulates IL-1β production via the inflammasome. Placenta [Internet]. 2015 Dec;36(12):1393–404. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400415300758

128. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. Nature. 2011;469(7330):323–35.

129. Cadwell K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. Nat Rev Immunol [Internet]. 2016;16(11):661–75. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri.2016.100

130. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Munz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. Nat Immunol [Internet]. 2015;16(10):1014–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26382870

131. Randow F, Youle RJ. Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. Cell Host Microbe [Internet]. 2014 Apr 9;15(4):403–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.012

132. Boonhok R, Rachaphaew N, Duangmanee A, Chobson P, Pattaradilokrat S, Utaisincharoen P, et al. LAP-like process as an immune mechanism downstream of IFN-γ in control of the human malaria Plasmodium vivax liver stage. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2016;113(25):E3519-28. Available from: http://www.pnas.org/content/early/2016/05/11/1525606113.full

133. Schille S, Crauwels P, Bohn R, Bagola K, Walther P, van Zandbergen G. LC3-associated phagocytosis in microbial pathogenesis. Int J Med Microbiol [Internet]. 2017 Nov 21;308(1):228–36. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.10.014

134. Martinez J, Almendinger J, Oberst A, Ness R, Dillon CP, Fitzgerald P, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. Proc Natl

Acad Sci [Internet]. 2011 Oct 18;108(42):17396–401. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1113421108

135. Martinez J, Malireddi RKS, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. Nat Cell Biol [Internet]. 2015;17(7):893–906. Available from: http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84934287492&partnerID=tZOtx3y1

136. Saitoh T, Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. J Cell Biol [Internet]. 2010 Jun 14;189(6):925–35. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201002021

137. Into T, Inomata M, Takayama E, Takigawa T. Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. Cell Signal [Internet]. 2012 Jun;24(6):1150–62. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.020

138. Lupfer C, Thomas PG, Anand PK, Vogel P, Milasta S, Martinez J, et al. Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. Nat Immunol [Internet]. 2013 May;14(5):480–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ni.2563

139. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol [Internet]. 2011 Mar;12(3):222–30. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3079381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

140. Razani B, Feng C, Coleman T, Emanuel R, Wen H, Hwang S, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. Cell Metab [Internet]. 2012 Apr 4;15(4):534–44. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.02.011

141. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nat Immunol [Internet]. 2011 May;12(5):408–15. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ni.2022

142. Chaikitgosiyakul S, Rijken MJ, Muehlenbachs A, Lee SJ, Chaisri U, Viriyavejakul P, et al. A morphometric and histological study of placental malaria shows significant changes to villous architecture in both Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infection. Malar J [Internet]. 2014 Jan 4;13:4. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3900675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

143. Fried M, Kurtis JD, Swihart B, Pond-Tor S, Barry A, Sidibe Y, et al. Systemic Inflammatory Response to Malaria During Pregnancy Is Associated With Pregnancy Loss and Preterm Delivery. Clin Infect Dis [Internet]. 2017;(October):16–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29020221%0Ahttp://academic.oup.com/cid/article/doi/10.1093/cid/cix623/3980252/Systemic-Inflammatory-Response-to-

Malaria-During

144. Ataíde R, Murillo O, Dombrowski JG, Souza RM, Lima FA, Lima GFMC, et al. Malaria in Pregnancy Interacts with and Alters the Angiogenic Profiles of the Placenta. Rodrigues MM, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015 Jun 19;9(6):e0003824. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003824

145. Marinho CRF, Neres R, Epiphanio S, Gonçalves LA, Catarino MB, Penha-Gonçalves C. Recrudescent Plasmodium berghei from pregnant mice displays enhanced binding to the placenta and induces protection in multigravida. PLoS One. 2009;4(5).

146. Barboza R, Lima FA, Reis AS, Murillo OJ, Peixoto EPM, Bandeira CL, et al. TLR4-Mediated Placental Pathology and Pregnancy Outcome in Experimental Malaria. Sci Rep. 2017;7(1):1–12.

147. Barboza R, Reis AS, da Silva LG, Hasenkamp L, Pereira KRB, Camara NOS, et al. MyD88 Signaling Is Directly Involved in the Development of Murine Placental Malaria. Infect Immun [Internet]. 2014 Feb 1;82(2):830–8. Available from: http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01288-13

148. Janse CJ, Van Vianen PH. Flow cytometry in malaria detection. Methods Cell Biol [Internet]. 1994;42 Pt B:295–318. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533245

149. Freyre A, Falcón J, Méndez J, Rodriguez A, Correa L, González M. Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. Exp Parasitol [Internet]. 2006 Jul;113(3):154–60. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489405003498

150. Schmalbruch H. The early changes in experimental myopathy induced by chloroquine and chlorphentermine. J Neuropathol Exp Neurol. 1980 Jan;39(1):65–81.

151. Perry CN, Kyoi S, Hariharan N, Takagi H, Sadoshima J, Gottlieb RA. Novel methods for measuring cardiac autophagy in vivo. Methods Enzymol [Internet]. 2009;453:325–42. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687908040160

152. Jensen EB, Gundersen HJG, Osterby R. Determination of membrane thickness distribution from orthogonal intercepts. J Microsc [Internet]. 1979 Jan;115(1):19–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/423237

153. Bandeira CL, Urban Borbely A, Pulcineli Vieira Francisco R, Schultz R, Zugaib M, Bevilacqua E. Tumorigenic factor CRIPTO-1 is immunolocalized in extravillous cytotrophoblast in placenta creta. Biomed Res Int [Internet]. 2014;2014:892856. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25165718

154. Hviid L, Marinho CRF, Staalsoe T, Penha-Gonçalves C. Of mice and women: rodent models of placental malaria. Trends Parasitol [Internet]. 2010 Aug;26(8):412–9. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492210000863

155. Ioannidis LJ, Nie CQ, Hansen DS. The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye. Parasitology. 2014;141(5):602–13.

156. Deretic V, Levine B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. Cell Host Microbe [Internet]. 2009 Jun;5(6):527–49. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312809001838

157. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. Cell Res [Internet]. 2014;24(1):9–23. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cr.2013.169

158. Heckmann BL, Boada-Romero E, Cunha LD, Magne J, Green DR. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. J Mol Biol [Internet]. 2017;429(23):3561–76. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.08.012

159. Gong J-S, Kim GJ. The role of autophagy in the placenta as a regulator of cell death. Luty AJF, editor. Clin Exp Reprod Med [Internet]. 2014 Sep 10;41(3):97–107. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0187291

160. Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. Autophagy [Internet]. 2016;12(2):245–60. Available from: http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1071759

161. Leoni S, Buonfrate D, Angheben A, Gobbi F, Bisoffi Z. The hyper-reactive malarial splenomegaly: a systematic review of the literature. Malar J. 2015 Dec;14(1):185.

162. Hansen DS, Siomos MA, de Koning-Ward T, Buckingham L, Crabb BS, Schofield L. CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. Eur J Immunol. 2003;33(9):2588–98.

163. Buffet P a, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. Blood [Internet]. 2011 Jan 13;117(2):381–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20852127

164. Rodrigues-Duarte L, de Moraes LV, Barboza R, Marinho CRF, Franke-Fayard B, Janse CJ, et al. Distinct placental malaria pathology caused by different Plasmodium berghei lines that fail to induce cerebral malaria in the C57BL/6 mouse. Malar J [Internet]. 2012 Jul 16;11:231. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22799533

165. Briand V, Saal J, Ghafari C, Huynh B-T, Fievet N, Schmiegelow C, et al. Fetal Growth Restriction Is Associated With Malaria in Pregnancy: A Prospective Longitudinal Study in Benin. J Infect Dis. 2016 Aug;214(3):417–25.

166. Djontu JC, Siewe Siewe S, Mpeke Edene YD, Nana BC, Chomga Foko EV, Bigoga JD, et al. Impact of placental Plasmodium falciparum malaria infection on the Cameroonian maternal and neonate's plasma levels of some cytokines known to regulate T cells differentiation and function. Malar J. 2016;15(1):1–11.

167. Moore KA, Simpson JA, Wiladphaingern J, Min AM, Pimanpanarak M, Paw MK, et al. Influence of the number and timing of malaria episodes during pregnancy on prematurity and small-for-gestational-age in an area of low transmission. BMC Med [Internet]. 2017 Jun 21 [cited 2017 Dec 3];15(1):117. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28633672

168. Van Zon AAJC, Eling WMC. Depressed malarial immunity in pregnant mice. Infect Immun. 1980;28(2):630–2.

169. Pásztor N, Sikovanyecz J, Keresztúri A, Kozinszky Z, Németh G. Evaluation of the relation between placental weight and placental weight to foetal weight ratio and the causes of stillbirth: a retrospective comparative study. J Obstet Gynaecol (Lahore) [Internet]. 2018;38(1):74–80. Available from: https://doi.org/10.1080/01443615.2017.1349084

170. Hayward CE, Lean S, Sibley CP, Jones RL, Wareing M, Greenwood SL, et al. Placental adaptation: What can we learn from Birthweight:placental weight ratio? Front Physiol. 2016;7(FEB):1–13.

171. Cetin I, Foidart J-M, Miozzo M, Raun T, Jansson T, Tsatsaris V, et al. Fetal growth restriction: a workshop report. Placenta [Internet]. 2004 Sep;25(8–9):753–7. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014340040400058X

172. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. Biol Reprod [Internet]. 2004 Jun;70(6):1806–13. Available from: https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.103.024166

173. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: The Forgotten Organ. Annu Rev Cell Dev Biol [Internet]. 2015;31(1):523–52. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-100814-125620

174. Dilworth MR, Sibley CP. Review: Transport across the placenta of mice and women. Placenta [Internet]. 2013;34(SUPPL):S34–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.10.011

175. Sandovici I, Hoelle K, Angiolini E, Constância M. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: Implications for fetal growth and developmental programming. Reprod Biomed Online. 2012;25(1):68–89.

176. Watson E, Cross J. Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. Physiology. 2005;20:180–93.

177. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Ultrastructural changes in the interhaemal membrane and junctional zone of the murine chorioallantoic placenta across gestation. J Anat. 2005 Dec;207(6):783–96.

178. Zamudio S, Baumann MU, Illsley NP. Effects of chronic hypoxia in vivo on the expression of human placental glucose transporters. Placenta. 2006 Jan;27(1):49–55.

179. Zamudio S, Torricos T, Fik E, Oyala M, Echalar L, Pullockaran J, et al. Hypoglycemia and the Origin of Hypoxia-Induced Reduction in Human Fetal

Growth. Zhou W-L, editor. PLoS One. 2010 Jan;5(1):e8551.

180. James LA, Zhang J, Byrne CD, Nicholas Hales C. Effects of maternal iron restriction in the rat on hypoxia-induced gene expression and fetal metabolite levels. Br J Nutr. 2001 Feb;85(02):193.

181. Boeuf P, Aitken EH, Chandrasiri U, Chua CLL, McInerney B, McQuade L, et al. Plasmodium falciparum Malaria Elicits Inflammatory Responses that Dysregulate Placental Amino Acid Transport. PLoS Pathog. 2013;9(2):1–12.

182. Dimasuay KG, Aitken EH, Rosario F, Njie M, Glazier J, Rogerson SJ, et al. Inhibition of placental mTOR signaling provides a link between placental malaria and reduced birthweight. BMC Med [Internet]. 2017;1–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s12916-016-0759-3

183. Sferruzzi-Perri AN, Vaughan OR, Coan PM, Suciu MC, Darbyshire R, Constancia M, et al. Placental-specific Igf2 deficiency alters developmental adaptations to undernutrition in mice. Endocrinology. 2011;152(8):3202–12.

184. Redline RW, Chernicky CL, Tan HQ, Ilan J, Ilan J. Differential expression of insulin-like growth factor-II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta. Mol Reprod Dev [Internet]. 1993 Oct;36(2):121–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257562

185. Oh-McGinnis R, Bogutz AB, Lefebvre L. Partial loss of Ascl2 function affects all three layers of the mature placenta and causes intrauterine growth restriction. Dev Biol [Internet]. 2011 Mar 15;351(2):277–86. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.01.008

186. Hirsch E, Wang H. The Molecular Pathophysiology of Bacterially Induced Preterm Labor: Insights From the Murine Model. J Soc Gynecol Investig. 2005 Apr;12(3):145–55.

187. Krishnan L, Nguyen T, McComb S. From mice to women: The conundrum of immunity to infection during pregnancy. J Reprod Immunol [Internet]. 2013;97(1):62–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.015

188. Ofori MF, Lamptey H, Dickson EK, Kyei-Baafour E, Hviid L. The Etiology of Placental Plasmodium Falciparum Malaria in African Women. J Infect Dis [Internet]. 2018 Mar 22;(June):1–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29579263

189. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: Roles and regulation during human pregnancy and parturition. Placenta. 2002;23(4):257–73.

190. Fievet N, Moussa M, Tami G, Maubert B, Cot M, Deloron P, et al. Plasmodium falciparum induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. J Infect Dis [Internet]. 2001;183(10):1530–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319691

191. Dorman EK, Shulman CE, Kingdom J, Bulmer JN, Mwendwa J, Peshu N, et al. Impaired uteroplacental blood flow in pregnancies complicated by falciparum malaria. Ultrasound Obstet Gynecol [Internet]. 2002 Feb;19(2):165–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11876809

192. Silver KL, Zhong K, Leke RGF, Taylor DW, Kain KC. Dysregulation of angiopoietins is associated with placental malaria and low birth weight. PLoS One [Internet]. 2010 Mar 1;5(3):e9481. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208992

193. Conroy AL, Silver KL, Zhong K, Rennie M, Ward P, Sarma JV, et al. Complement activation and the resulting placental vascular insufficiency drives fetal growth restriction associated with placental malaria. Cell Host Microbe [Internet]. 2013;13(2):215–26. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.010

194. Dobaño C, Berthoud T, Manaca MN, Nhabomba A, Guinovart C, Aguilar R, et al. High production of pro - inflammatory cytokines by maternal blood mononuclear cells is associated with reduced maternal malaria but increased cord blood infection. Malar J [Internet]. 2018;1–13. Available from: https://doi.org/10.1186/s12936-018-2317-2

195. Requena P, Barrios D, Robinson LJ, Samol P, Umbers AJ, Wangnapi R, et al. Proinflammatory responses and higher IL-10 production by T cells correlate with protection against malaria during pregnancy and delivery outcomes. J Immunol [Internet]. 2015 Apr 1;194(7):3275–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25725110

196. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased Expression of Pro-Inflammatory Cytokines in Placentas of Women Undergoing Spontaneous Preterm Delivery or Premature Rupture of Membranes. Am J Reprod Immunol. 2004 Jul;52(1):45–52.

197. Arababadi MK, Aminzadeh F, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, Norouzi M, Zarandi ER, et al. Cytokines in Preterm Delivery. Lab Med. 2012 May;43(4):27–30.

198. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. Semin Fetal Neonatal Med. 2006 Oct;11(5):317–26.

199. Riley JK, Nelson DM. Toll-like receptors in pregnancy disorders and placental dysfunction. Clin Rev Allergy Immunol. 2010;39(3):185–93.

200. Ilievski V, Lu S-J, Hirsch E. Activation of Toll-like Receptors 2 or 3 and Preterm Delivery in the Mouse. Reprod Sci. 2007 May;14(4):315–20.

201. Harris J, Lang T, Thomas JPW, Sukkar MB, Nabar NR, Kehrl JH. Autophagy and inflammasomes. Mol Immunol [Internet]. 2017 Jun;86:10–5. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589017300524

202. Samie M, Lim J, Verschueren E, Baughman JM, Peng I, Wong A, et al. Selective autophagy of the adaptor TRIF regulates innate inflammatory signaling. Nat Immunol [Internet]. 2018 Mar 22;19(3):246–54. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41590-017-0042-6

203. Olivier M, Van Den Ham K, Shio MT, Kassa FA, Fougeray S. Malarial Pigment Hemozoin and the Innate Inflammatory Response. Front Immunol [Internet]. 2014;5(February):1–10. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00025/abstract

204. Kalantari P, DeOliveira RB, Chan J, Corbett Y, Rathinam V, Stutz A, et al. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. Cell Rep [Internet]. 2014 Jan 16;6(1):196–210. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.014

205. Ataide MA, Andrade WA, Zamboni DS, Wang D, Souza M do C, Franklin BS, et al. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. PLoS Pathog [Internet]. 2014 Jan;10(1):e1003885. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453977

206. Mizushima N, Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting ND RIB ND ES SC RIB. Autophagy [Internet]. 2007;3(December):4–7. Available from: http://www.tandfonline.com.proxy.library.adelaide.edu.au/doi/abs/10.4161/auto.4600

207. Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, et al. Autophagy controls IL-1β secretion by targeting Pro-IL-1β for degradation. J Biol Chem. 2011;286(11):9587–97.

208. Prokesch A, Blaschitz A, Bauer T, Moser G, Hiden U, Zadora J, et al. Placental DAPK1 and autophagy marker LC3B-II are dysregulated by TNF-α in a gestational age-dependent manner. Histochem Cell Biol [Internet]. 2017 Jun 17;147(6):695–705. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00418-016-1537-1

209. Shi C-S, Kehrl JH. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. J Biol Chem [Internet]. 2008 Nov 28;283(48):33175–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772134

210. Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2009;1793(4):664–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706940