MARIA NOGUEIRA DE MENEZES

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

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

São Paulo
2018

MARIA NOGUEIRA DE MENEZES

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

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

Área de concentração: Imunologia

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

Versão original

São Paulo
2018

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)

Menezes, Maria Nogueira de
Papel da IL-1alfa na malária experimental causada pelo Plasmodium chabaudi / Maria Nogueira de Menezes; orientador Maria Regina D\'Império Lima. -- São Paulo, 2018.
72 p.

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

1. Malária. 2. IL-1alfa. 3. Fígado. 4. Inflamação. 5. Neutrófilos. I. D\'Império Lima, Maria Regina, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Nogueira de Menezes

Titulo da Tese: Papel da IL-1α na malária experimental causada pelo *Plasmodium chabaudi*

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a _____/_____/_____, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

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

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

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

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **175** nas fls. **114** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Regina D`Império Lima**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Avaliação da resposta imune na malária murina causada pelo Plasmodium Chobaudi"* do qual participam o(s) aluno(s) **Érika Machado de Salles, Maria Nogueira de Menezes** e a pesquisadora **Sheyla Inés Castillo Méndez,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **14.12.2011, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 15 de dezembro de 2011.

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

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

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 "***Avaliação da resposta imunológica desenvolvida na malária experimental***", registrado sob o protocolo nº ***29/2016***, 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 ***31/05/2016*** 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.)** ***Maria Regina D'Imperio Lima***
- Departamento: *Imunologia*
- Membros da Equipe: *Alexandra dos Anjos Cassado (Pós-doutorando), Maria Nogueira de Menezes, Érika Machado de Salles*

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 www.icb.usp.br/ceua. 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 "***Evaluation of immune response developed in experimental malaria***", protocol nº ***29/2016***, 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 ***5/31/2016*** 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.)** ***Maria Regina D'Imperio Lima***
- Team members: *Alexandra dos Anjos Cassado (Postdoctoral Researcher), Maria Nogueira de Menezes, Érika Machado de Salles*

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	*P2X7KO*	*Fêmea/female*	*4 semanas/weeks*	*400*
	C57bl/6	*Fêmea/female*	*4 semanas/weeks*	*1075*
	C57bl/6	*Macho/Male*	*4 semanas/weeks*	*230*
	CD4KO	*Fêmea/female*	*4 semanas/weeks*	*160*
	FoxP3-GFP	*Fêmea/female*	*4 semanas/weeks*	*250*
	Myd88KO	*Macho/Male*	*4 semanas/weeks*	*150*

São Paulo, 03 de junho de 2016.

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

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria Regina D'Império Lima, por todo o aprendizado adquirido ao longo destes 7 anos de excelente orientação, além da atenção pessoal que ela dedica aos seus alunos.

A minha família, por todo o apoio dado, mesmo à distância, estando sempre presente nos momentos mais importantes. Principalmente a meu pai, o qual sempre incentivou e deu todo o apoio necessário para que eu sempre tivesse a melhor educação.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, que fizeram do trabalho um ambiente agradável, sempre me ajudando quando foi preciso e oferecendo todo tipo de apoio e amizade essenciais para um Doutorado realizado de forma saudável.

A todos os funcionários do ICB que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do "Mota Lab" em Lisboa, que me receberam da melhor forma possível em um novo país e a quem devo um imenso aprendizado profissional e pessoal.

Aos amigos de Salvador e de São Paulo, que sempre me deram alegrias para superar a distância da cidade natal, também colaborando para que nenhum problema fosse maior do que a importância das pessoas na vida.

A FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro, oferecendo a oportunidade para a realização deste Doutorado na USP com estágio BEPE em Lisboa.

Este trabalho foi realizado em sua maioria no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (Malária e Tuberculose) do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), projeto número 2013/09176-4. Parte do trabalho foi realizado durante o período de um ano em Doutorado-sanduíche no Mota Lab, no Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa, com o auxílio financeiro da FAPESP (BEPE), projeto número 2015/25874-9.

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

liver during acute *P. chabaudi* malaria. This cytokine amplifies the inflammatory response to infection and promotes liver necrosis, as well as exacerbates the weight loss and hypothermia.
Keywords: Malaria. IL-1alpha. Neutrophils. Liver. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

IL – Interleucina

NLRP3 – *Nod-like receptor protein 3*

TNF-α – *Tumor necrosis factor alpha*

IL-1Ra – *IL-1 receptor antagonist*

TIR – Toll/IL-1R

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response 88*

TLR – *Toll-like receptor*

NF-κB – Fator nuclear kappa B

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

IL-1R – *IL-1 receptor*

HIF – *Hipoxia-inducible factor*

TNFR- *TNF receptor*

LPS – Lipopolissacarídeo

DSS – Sulfato de sódio dextrana

IFN-γ – *Interferon-gamma*

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

D-gal – D-galactosamina

APAP – Acetaminofeno

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

HSV-1 – *Herpes simplex vírus 1*

NO – Óxido nítrico

TGF-β – *Transforming growth factor beta*

HO-1 – Heme oxigenase-1

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LDH – Lactato desidrogenase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....16

1.1 As citocinas da família IL-1.....16

1.1.1 Produção e liberação da IL-1α.....17

1.1.2 Funções biológicas da IL-1α.....20

1.2 Aspectos gerais da malária.....24

1.2.1 Imunopatogênese da malária.....25

2. OBJETIVOS.....30

2.1 Objetivo geral.....30

2.2 Objetivos específicos.....30

3. MATERIAL E MÉTODOS......31

3.1 Camundongos, parasitos e infecção.....31

3.2 Parasitemias e análises de parâmetros clínicos.....31

3.3 Análises histopatológicas.....31

3.4 Imunofluorescência.....32

3.5 Análises bioquímicas do plasma.....32

3.6 Suspensões de células.....33

3.7 Fenotipagem das células.....33

3.8 Detecção de citocinas.....34

3.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)....34

3.10 Ensaio de TUNEL.....35

3.11 Análises estatísticas.....35

4. RESULTADOS.....36

4.1 Sinais de dano hepático em diferentes modelos de malária experimental.....36

4.2 Necrose e inflamação hepática ocorrem durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*.....36

4.3 A produção de IL-1α, mas não de IL-1β, aumenta no fígado durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*.....37

4.4 A produção de IL-1α também ocorre em outros órgãos em diferentes dias após a infecção com o *P. chabaudi*.....40

4.5 Neutrófilos são a maior fonte de IL-1α no fígado dos camundongos infectados com o *P. chabaudi*.....41

4.6 A deficiência em IL-1α resulta em maior parasitemia, mas reduz a severidade das manifestações clínicas durante a malária causada pelo *P. chabaudi*.....42

4.7 A deficiência em IL-1α atenua a morte celular no fígado durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*.....45

4.8 A produção de citocinas pró-inflamatórias por leucócitos do fígado induzida pelo *P. chabaudi* encontra-se comprometida na ausência da IL-1α.....46

4.9 A IL-1α parece não possuir papel essencial no fenômeno da proteção à reinfecção pelo esporozoíto do *Plasmodium* sp......47

5. DISCUSSÃO.....54

6. CONCLUSÃO.....60

REFERÊNCIAS.....61

APÊNDICES.....69

1. INTRODUÇÃO

1.1 As citocinas da família IL-1

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

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

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

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

1.1.1 Produção e liberação da IL-1α

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

A indução da expressão de IL-1α ocorre rapidamente em resposta a diferentes estímulos fisiológicos ou patológicos. O stress oxidativo parece aumentar a expressão da IL-1α através da elevação das concentrações de H_2O_2 ou em situações de hipóxia, podendo ser dependente ou não do HIF-1 (*Hipoxia-inducible factor 1*) [26, 27]. O hormônio estradiol é capaz de induzir a expressão de IL-1α em fibroblastos, podendo estar relacionado à maior

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

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

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

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

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

1.1.2 Funções biológicas da IL-1α

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Aspectos gerais da malária

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

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

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

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

1.2.1 Imunopatogênese da malária

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

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção e o papel da IL-1α na resposta imunológica e na patogênese da malária experimental causada pela infecção de camundongos com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi* (cepa AS).

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a necrose e inflamação no fígado que ocorrem no modelo de infecção pelo *P. chabaudi* em camundongos C57BL/6.
- Detectar a produção de IL-1α no fígado e em outros órgãos durante a fase aguda da infecção.
- Determinar a população celular responsável pela produção de IL-1α no fígado durante a infecção.
- Avaliar o papel da IL-1α de forma sistêmica na resposta à malária causada pelo *P. chabaudi*.
- Avaliar o papel da IL-1α no fígado durante a fase aguda da infecção.
- Investigar se a IL-1α exerce algum papel na proteção contra a reinfecção com esporozoítos na presença de uma infecção eritrocítica com o *P. chabaudi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos, parasitos e infecção

Camundongos machos C57BL/6 (Jackson Laboratory, EUA), *IL1A*$^{-/-}$ (Jackson Laboratory), *NLRP3*$^{-/-}$ (Genentech, EUA) e *CASP1*$^{-/-}$ (Jackson Laboratory), com 6 a 8 semanas de idade, foram criados em condições "*specific pathogen free"* no biotério de camundongos do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo.

Como o ciclo de reprodução assexuada dos parasitas depende do ciclo circadiano do hospedeiro, os camundongos foram mantidos em ciclo invertido de claro/escuro por pelo menos 15 dias antes da infecção para que a manipulação dos animais seja feita em um período próximo à invasão eritrocítica [134]. A manutenção do *P. chabaudi* (cepa AS) foi realizada como descrito anteriormente [135]. Os camundongos foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com 1 x 10^6 eritrócitos parasitados.

3.2 Parasitemias e análises de parâmetros clínicos

As parasitemias foram monitoradas através de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. A variação do peso corporal foi determinada em relação ao peso do dia 0 utilizando uma balança analítica (Sartorious, EUA). A temperatura corporal foi medida com um termômetro digital (Kent Scientific Co, EUA). A concentração de hemoglobina no sangue foi quantificada utilizando-se o kit colorimétrico para detecção de hemoglobina no sangue total da Doles Reagentes (Goiânia, GO, Brasil).

3.3 Análises histopatológicas

Os camundongos foram eutanasiados e os fígados foram retirados de animais infectados e controles não infectados. Seções do fígado foram fixadas em formalina 10% por 24 horas em temperatura ambiente. Os órgãos fixados foram embebidos em parafina, seccionados (5 µm), e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Análises histológicas foram realizadas por uma

patologista sem conhecimento dos grupos experimentais em um microscópio Leica DM2000 (Leica, EUA) acoplado a uma câmera Leica MC170.

O score atribuído às lesões hepáticas é feito a partir da análise de múltiplos parâmetros (adaptado de [136]), incluindo (i) infiltrado cellular inflamatório (tipo celular, distribuição e severidade) e (ii) mudanças celulares (necrose, lipidose, hipertrofia, distribuição e severidade). O score de severidade varia de 0 a 4 (0, ausente; 1, mínimo; 2, suave; 3, moderado; 4, acentuado), resumido na **Tabela 1**.

Tabela 1. Esquema de classificação para lesões hepáticas

Severity	Proportion of liver affected	Score	Quantifiable finding*
Minimal	very small amount	1	1-2 foci
Mild or slight/ few	small amount	2	3-6 foci
Moderate or several	medium amount	3	7-12 foci
Marked or many	large amount	4	>12 foci, coalescing

3.4 Imunofluorescência

Seções do fígado foram retiradas e fixadas em paraformaldeído 4% por 12 horas. Cortes com 5 µm de espessura foram feitos em criostato CM3050S (Leica). A etapa de bloqueio e permeabilização foi realizada incubando os cortes por 1 hora com PBS BSA 1% + 0,3% Triton-X em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada uma incubação em câmara úmida com os seguintes anticorpos diluídos em PBS: anti-IL-1α FITC (ALF-161), anti-Ly6G PE (IA8), anti-CD45 APC (30-F11), por 4 horas, a 4 °C. Todos os anticorpos foram obtidos da eBioscience (Thermo Fisher, EUA) A marcação com faloidina-rodamina foi realizada posteriormente em temperatura ambiente, por 30 minutos. Os cortes foram montados com Fluoromount-G (Southern Biotechnologies, EUA) contendo DAPI. As imagens foram obtidas em microscópio confocal LSM 780 (Zeiss, Alemanha) e as análises foram feitas com o software ImageJ (NIH, EUA).

3.5 Análises bioquímicas do plasma

Os níveis de ALT e AST no plasma foram medidos utilizando o analisador bioquímico Catalyst One (Idexx Laboratories, EUA). Os níveis de lactato desidrogenase (LDH) no plasma foram medidos no equipamento Beckman Coulter AU 680 (Beckman Coulter, EUA).

3.6 Suspensões de células

Os camundongos foram eutanasiados e foi realizada uma perfusão pelo coração com 10 ml de PBS. Fígado e baço foram retirados, pesados e processados para obtenção das células. O fígado foi picotado em pedaços menores que foram imersos em 5 ml de meio de digestão, contendo meio RPMI (Thermo Fisher), 0,02% de colagenase tipo IV (Sigma, EUA) e 0,002% de DNAse I (Sigma), e foram colocados a 37 °C por 40 minutos. Em seguida, o órgão foi homogeneizado utilizando um *cell strainer* de 100 µm (Corning, EUA) em meio RPMI contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher). Foi realizada uma primeira centrifugação de 3 minutos, a 30 x g e a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e submetido a uma nova centrifugação de 10 minutos, a 300 x g e a 4 °C. Os eritrócitos foram lisados utilizando um tampão de lise (40 mM NH_4Cl e 4.2 mM Tris pH 7.4) por 3 minutos e depois a suspensão foi lavada com meio RPMI 3% SFB. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em Percoll 35% (GE Healthcare Life Sciences, Inglaterra), centrifugadas por 10 minutos a 360 x g e a 20°C. Após este passo, as células não parenquimais do fígado encontram-se no pellet, que foi lavado mais uma vez e ressuspendido em meio RPMI 10% SFB. O processamento do baço foi realizado com a maceração do órgão e posterior lavagem das células com meio RPMI 3% SFB. Os eritrócitos foram lisados utilizando o tampão de lise e as células foram lavadas novamente após este passo. Por fim, as células foram ressuspendidas em meio RPMI 10% SFB.

3.7 Fenotipagem das células

As células do fígado e do baço (1×10^6) foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados aos fluoróforos FITC, PE, APC, PerCP, PECy7, APCCy7, Pacific blue ou AmCyan com especificidade para os antígenos CD45 (30-F11), CD4 (H129.19 or GK1.5), CD8 (53-6.7), NK1.1 (PK136), F4/80 (BM8),

CD11b (M1/70), CD11c (HL3), Gr1 (RBC-8C5), Ly6C (HK1.4) e Ly6G (1A8). Os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences (EUA) ou da eBioscience (Thermo Fisher). Após lavagem as células foram marcadas com Live/Dead (Thermo Fisher) para determinação de viabilidade celular. As células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo utilizando os citômetros FACSCanto ou LSRFortessa II e o software DIVA (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo v.9 (Tree Star Inc., EUA).

3.8 Detecção de citocinas

A quantificação de IL-1α e IL-β no sobrenadante do homogenato de fígado foi realizada por ELISA (BD Biosciences). Para detecção intracelular de IFN-γ, TNF-α e IL-1α, as células do fígado e do baço (1×10^6) foram cultivadas na presença de *GolgiStop* ou *GolgiPlug* (BD Biosciences) por 6 horas, a 37 °C. Após lavagem, as células foram marcadas para os marcadores de superfície como descrito anteriormente. As células foram posteriormente fixadas e permeabilizadas com o tampão *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-IFN-γ PE e anti-TNFα PE diluídos em tampão *Permwash* (BD Biosciences). Após lavagem, as células foram ressuspendidas em tampão de marcação e analisadas por citometria de fluxo utilizando os citômetros FACSCanto ou LSRFortessa II e o software DIVA (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo v.9.

3.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

As amostras de RNA total foram extraídas a partir do fígado usando o kit *RNeasy Mini* (Qiagen. EUA). A transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher) seguindo as instruções do produtor. O cDNA resultante foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Fisher) no aparelho de RT-PCR QuantStudio 3 (Thermo Fisher). As sequências de oligonucleotídeos utilizadas na reação de RT-PCR são as seguintes: para *IL1A*, ACCTGCAGTCCATAACCCA (*forward*) e GACAAACTTCTGCCTGACGA (*reverse*); para *TNFA*, CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA (*forward*) e

TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC (*reverse*); para *GAPDH*, TGAAGCAGGCATCTGAGGG (*forward*) e CGAAGGTGGAAGAGTGCGAG (*reverse*); para *IL6*, ATGGATGCTACCAAACTGGAT (*forward*) e TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT (*reverse*); para *IFNG*, TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA (*forward*) e TGGCTCTGCAGGATTTTCATG (*reverse*). Foi realizada uma análise comparativa de CT (*threshold cycle*) para determinar a expressão relativa do gene em relação ao gene endógeno *GAPDH*.

3.10 Ensaio de TUNEL

Seções do fígado foram congeladas em Tissue-TEK OCT (Sakura Finetek, EUA) na presença de 2-metilbutano em gelo seco. Cortes de 5 µm de espessura foram realizados em criostato. A detecção da fragmentação de DNA *in situ* foi realizada utilizando o kit *DeadEnd Fluorometric TUNEL System* (Promega, EUA) de acordo com as instruções do produtor. As imagens foram obtidas em microscópio invertido Nikon TiS (Nikon, Japão) e analisadas utilizando o software ImageJ (NIH).

3.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism 6* utilizando os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Sinais de dano hepático em diferentes modelos de malária experimental

Embora o ciclo de vida do *Plasmodium* sp. contenha uma fase hepática, é a fase eritrocítica a responsável pelos sintomas e pelo desenvolvimento da doença na malária. Para demonstrar o impacto da fase eritrocítica da malária no fígado, foi realizado um acompanhamento da parasitemia e dos níveis das enzimas indicadoras de dano hepático (ALT, AST e LDH) no plasma de camundongos após infecção com o estágio eritrocítico de diferentes espécies de *Plasmodium* sp. de roedores. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1 x 10^6 eritrócitos infectados por *P. berghei* NK65, *P. chabaudi* ou *P. yoelii* e eutanasiados em diferentes dias pós-infecção (p.i.). As curvas de parasitemia diferem entre as espécies. Camundongos infectados pelo *P. berghei* apresentaram um crescimento contínuo da parasitemia durante os dias analisados (**Figura 1**). Por outro lado, os camundongos infectados pelo *P. chabaudi* e pelo *P. yoelii* apresentaram um pico de parasitemia nos dias 7 e 16, respectivamente, e após estes picos, as parasitemias começaram a diminuir (**Figura 1**). A quantificação dos indicadores de dano hepático no plasma sugere que ocorra dano hepático durante as infecções pelo estágio eritrocítico do *Plasmodium* sp. e que este dano possa estar relacionado com a parasitemia, uma vez que os maiores níveis das enzimas encontrados durante os dias analisados foram nos mesmos dias das maiores parasitemias para o *P. berghei* e *P. chabaudi* (**Figura 1**). Embora os níveis de ALT e AST não tenham aumentado no plasma dos camundongos infectados pelo *P. yoelii*, os níveis de LDH parecem se comportar da mesma forma, apresentando maior concentração no mesmo dia do pico de parasitemia (**Figura 1**).

4.2 Necrose e inflamação hepáticas ocorrem durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*

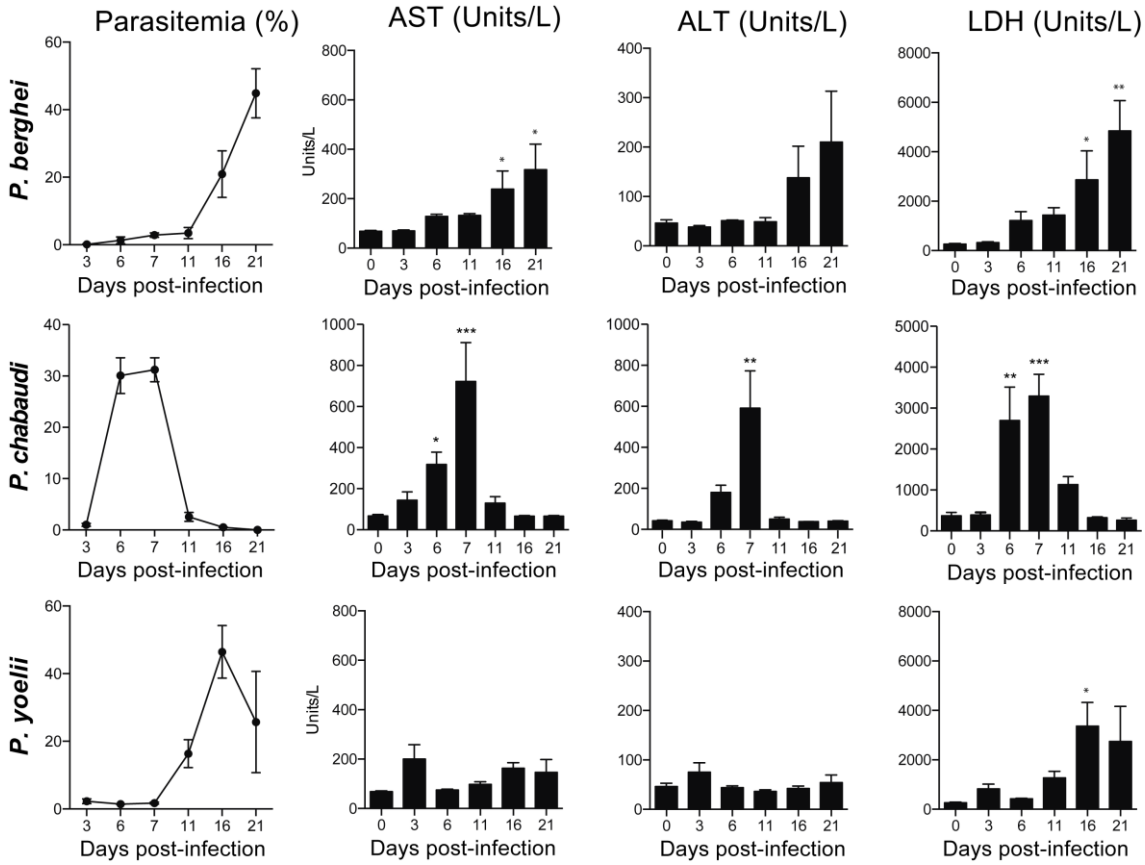
A infecção com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi* apresentou a melhor correlação entre parasitemia e a presença dos indicadores de dano hepático durante a fase aguda da infecção. A fim de avaliar melhor o dano hepático e a inflamação na malária causada pelo *P. chabaudi*, o fígado dos camundongos

C57BL/6 infectados foi analisado em diferentes dias da fase aguda da infecção. Corroborando o aumento encontrado nos níveis de ALT, AST e LDH no plasma (**Figura 1**), as análises histopatológicas mostraram diversos focos necróticos no tecido hepático nos dias 6 e 7 p.i. (**Figura 2A**). Também foi observada uma maior inflamação durante a fase aguda, sendo possível observar infiltrados inflamatórios no tecido nos dias 3, 6 e 7 p.i. (**Figura 2A**). Além disso, também foi possível verificar focos de hematopoiese extramedular, principalmente após o controle da parasitemia, quando o acúmulo de pigmento de hemozoína torna-se mais evidente (**Figura 2A**). Os maiores scores de inflamação e necrose durante os dias analisados foram registrados no dia 7 p.i. (**Figura 2B**), mesmo dia, portanto, do pico de parasitemia. Tais resultados demonstram que durante a fase aguda da infecção com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi*, é possível observar a ocorrência de necrose e inflamação no fígado dos camundongos infectados.

4.3 A produção de IL-1α, mas não de IL-1β, aumenta no fígado durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*

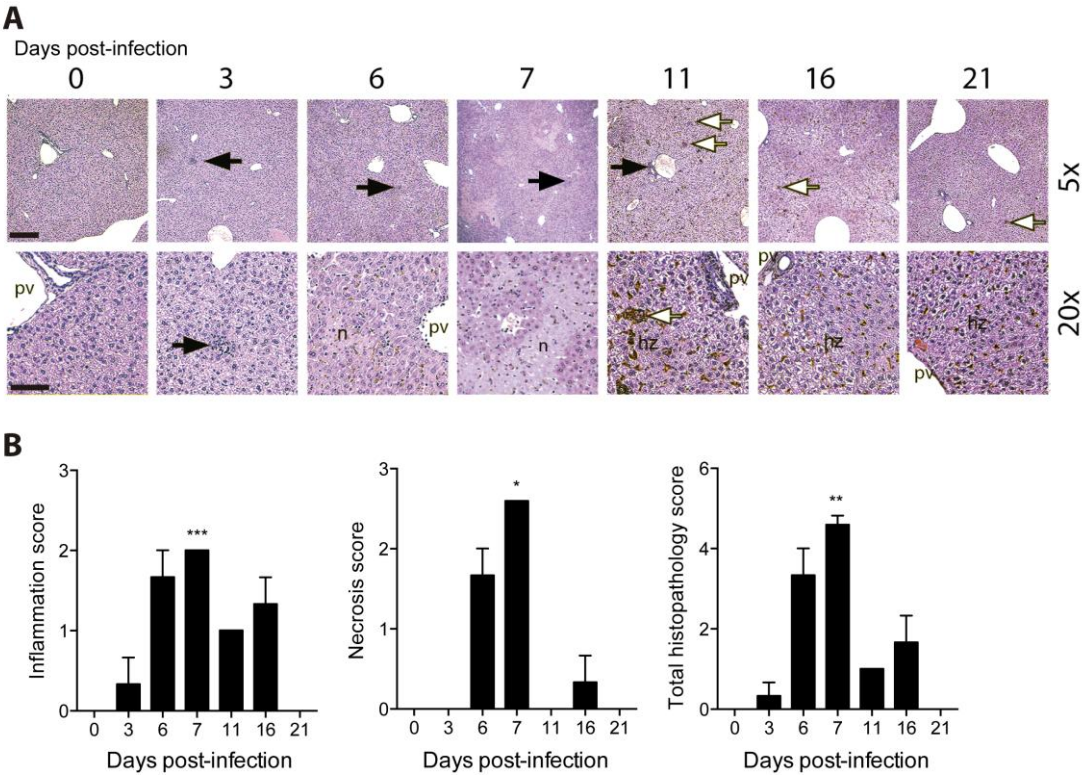
Como a produção das citocinas da família da IL-1 está associada com o dano tecidual e a inflamação, foi verificada a presença destas citocinas no fígado dos camundongos C57BL/6 infectados pelo *P. chabaudi*. Nos dias 6 e 7 p.i., a expressão do RNA mensageiro (mRNA) que codifica a IL-1α (*IL1A*) encontrou-se aumentada no tecido hepático (**Figura 3A**) e os níveis de proteína da IL-1α também estavam maiores nos homogenatos de fígado (**Figura 3B**). Para avaliar o papel do inflamassoma NLRP3 nesta produção, foram utilizados camundongos deficientes para os componentes NLRP3 e Caspase-1. Demonstrando independência do inflamassoma na produção da IL-1α, um aumento semelhante nos níveis de IL-1α foi encontrado no fígado dos camundongos C57BL/6, *NLRP3*$^{-/-}$ e *CASP1*$^{-/-}$ (**Figura 3C**). Já os níveis de IL-1β permaneceram semelhantes ao nível basal encontrado em camundongos não infectados mesmo nos dias 6 e 7 p.i. e o mesmo foi verdade para os camundongos *NLRP3*$^{-/-}$ e *CASP1*$^{-/-}$ (**Figuras 3D** e **3E**). Em conclusão, a infecção pelo *P. chabaudi* induz uma produção de IL-1α no fígado durante a fase aguda, a qual é independente do inflamassoma NLRP3.

Figura 1. Modelos de malária experimental em roedores apresentam dano hepático associado ao aumento da parasitemia



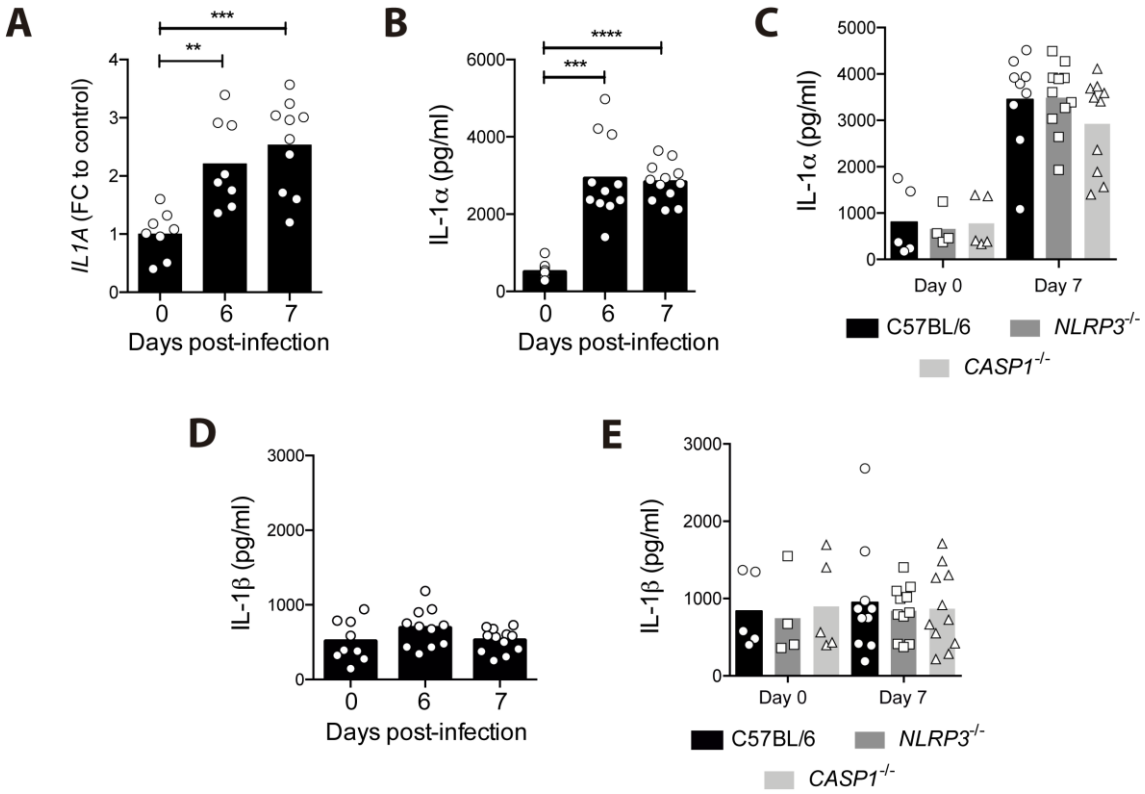
Camundongos C57BL/6 machos foram inoculados com 1 x 10^6 eritrócitos infectados por *P. berghei*, *P. chabaudi* e *P. yoelli* e sacrificados em diferentes dias ao longo da infecção. As curvas de parasitemia, obtidas através de análise microscópica de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, e as concentrações plasmáticas de AST, ALT e LDH dos camundongos infectados com cada uma das espécies de *Plasmodium* são representadas. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (SD) (n = 3). Dado representativo de um experimento para *P. berghei* e *P. yoelli* e dois para *P. chabaudi*. As diferenças estatísticas foram observadas entre o grupo controle e os grupos de animais infectados com *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 obtidas através do teste de Kruskal-Wallis.

Figura 2. Necrose e inflamação no fígado de camundongos C57BL/6 infectados com o *P. chabaudi*



Camundongos C57BL/6 machos foram inoculados com 1 x 10^6 eritrócitos infectados com o *P. chabaudi*. Camundongos não infectados (Dia 0) foram usados como controles. **A.** Cortes de fígado corados com H&E de camundongos infectados mostram focos de necrose (indicados por **n**), infiltrado celular (seta preta), hematopoiese extramedular (seta branca) e deposição de hemozoína (hz). pv = veia porta. Magnificação original de 5X (barra de escala: 300 µm) e 20X (barra de escala: 50 µm). **B.** Análises histopatológicas semiquantitativas para inflamação, necrose e score histopatológico total (inflamação + necrose). Dados representativos de dois experimentos com grupos de 3 camundongos por dia analisado (média ± desvio padrão). Diferenças significativas foram observadas entre os grupos controle e de camungongos infectados com *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 obtidas através do teste de Kruskal-Wallis.

Figura 3. IL-1α, mas não IL-1β, é produzida no fígado durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* de maneira independente do inflamassoma NLRP3



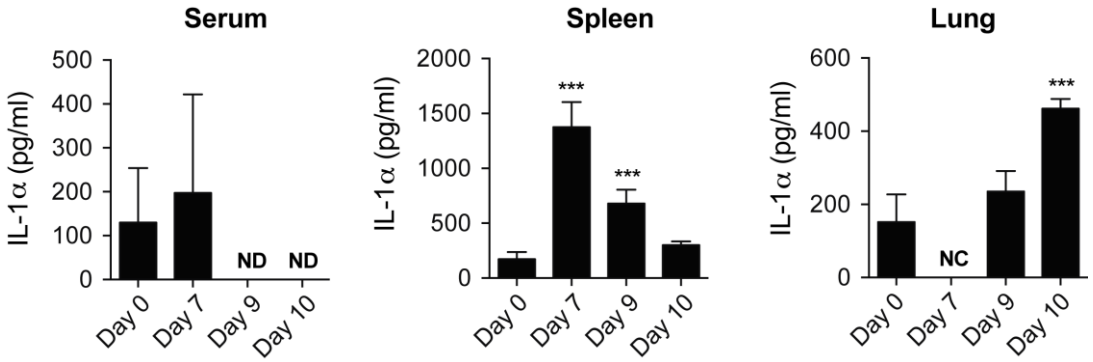
Camundongos C57BL/6 machos foram inoculados com 1 x 10^6 eritrócitos infectados com o *P. chabaudi*. Camundongos não infectados (Dia 0) foram usados como controles. **A.** Níveis de mRNA do *IL1A* no tecido hepático de camundongos C57BL/6 6 e 7 dias p.i. determinados por RT-PCR. **B.** Níveis proteicos de IL-1α no sobrenadante do homogenato de fígado de camundongos C57BL/6 também 6 e 7 dias p.i. quantificados por ELISA. **C.** Níveis proteicos de IL-1α no sobrenadante do homogenato de fígado de camundongos C57BL/6, *NLRP3*$^{-/-}$ e *CASP1*$^{-/-}$ 7 dias p.i. quantificados por ELISA. (A-C) Os dados compõem um *pool* de três experimentos independentes (*n* = 4-12). Diferenças significativas foram observadas entre os grupos de camundongos não-infectados e infectados com ***p*<0,01, ****p*<0,001 e *****p*<0,0001 através do Teste de Kruskal-Wallis. **D.** Níveis proteicos de IL-1β no sobrenadante do homogenato de fígado de camundongos C57BL/6 6 e 7 dias p.i. quantificados por ELISA. **E.** Níveis proteicos de IL-1β no sobrenadante do homogenato de fígado de camundongos C57BL/6, *NLRP3*$^{-/-}$ e *CASP1*$^{-/-}$ 7 dias p.i. quantificados por ELISA. Os dados compõem um *pool* de três experimentos independentes (*n* = 4-11). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de camundongos não-infectados e infectados através do teste de Kruskal-Wallis.

4.4 A produção de IL-1α também ocorre em outros órgãos em diferentes dias após a infecção com o *P. chabaudi*

A fim de verificar se a IL-1α era produzida exclusivamente no fígado em resposta à infecção com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi*, os níveis da proteína foram também quantificados no soro e nos sobrenadantes dos

homogenatos do baço e pulmão. Os níveis de IL-1α detectados no soro foram baixos e não houve um aumento significativo destes níveis em resposta à infecção (**Figura 4**). Por outro lado, no baço, os níveis de IL-1α aumentaram significativamente nos dias 7 e 9 p.i., retornando aos níveis basais no dia 10 p.i. (**Figura 4**). Já no pulmão, o aumento de IL-1α parece ter uma cinética mais tardia, com um aumento significativo detectado apenas no dia 10 p.i. (**Figura 4**). Os resultados demonstram que a IL-1α também é produzida no baço e pulmão após infecção com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi*.

Figura 4. Produção de IL-1α também ocorre no baço e pulmão em resposta à infecção pelo *P. chabaudi*



Camundongos C57BL/6 machos foram inoculados com 1 x 10^6 eritrócitos infectados com o *P. chabaudi*. Camundongos não infectados (Dia 0) foram usados como controles. Quantificação por ELISA dos níveis de IL-1α presentes no soro e no sobrenadante dos homogenatos do baço e pulmão dos camundongos. Os dados estão expressos como média ± SD (*n* = 3-5) de um experimento representativo de dois. Diferenças significativas foram observadas entre o grupo controle e o grupo de animais infectados com ***p<0,001 utilizando o teste Mann-Whitney. ND = não detectável. NC = não consta.

4.5 Neutrófilos são a maior fonte de IL-1α no fígado dos camundongos infectados com o *P. chabaudi*

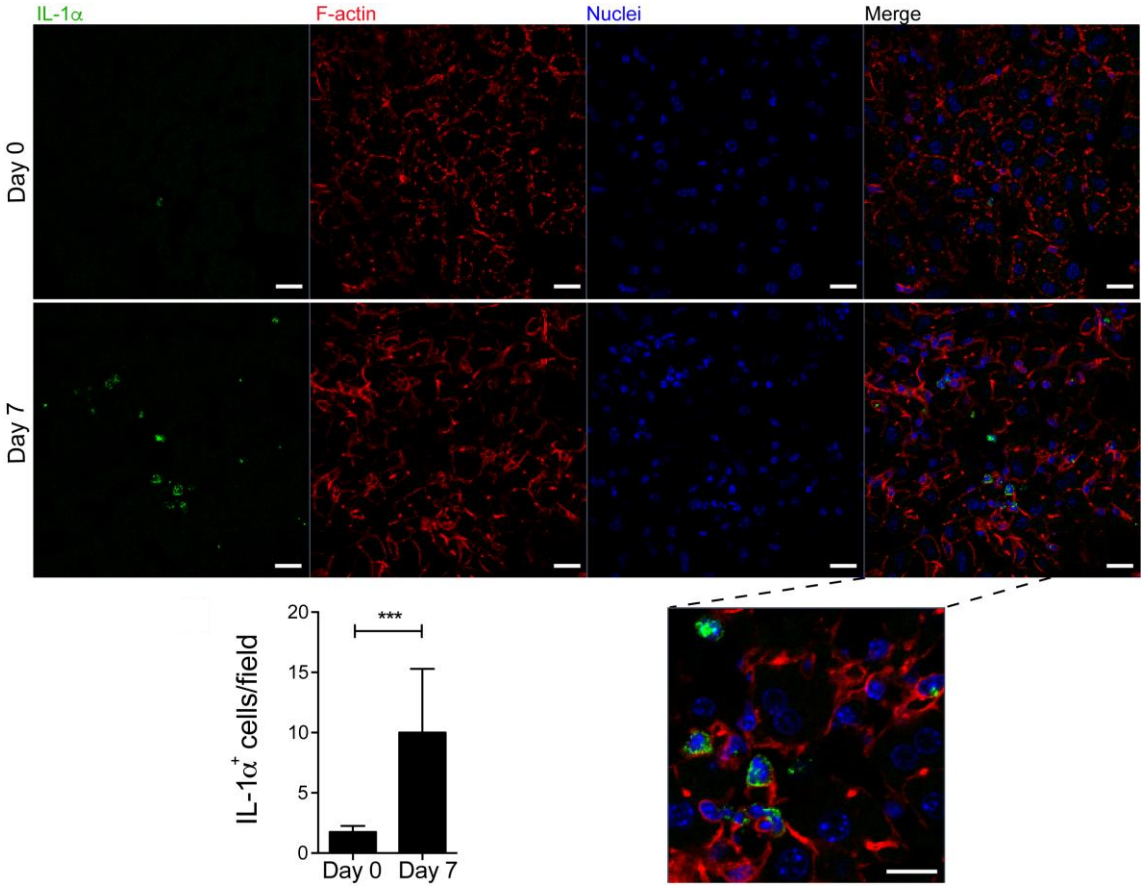
Uma vez que foi detectado um aumento na produção de IL-1α no fígado durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*, torna-se importante elucidar qual seria a fonte desta IL-1α neste contexto. A análise do fígado por microscopia confocal revelou a presença de leucócitos produtores de IL-1α que se encontram em maior número no fígado de animais infectados quando comparado aos controles não infectados (**Figura 5**). A fim de identificar esta população leucocitária produtora de IL-1α, os fígados foram submetidos à

análise por citometria de fluxo. A marcação intracelular de IL-1α nas células $CD45^+$ do fígado no dia 7 p.i. confirmou um aumento significativo da população $IL\text{-}1\alpha^+$ em comparação aos animais não infectados (**Figura 6A**). Além disso, a maior parte da população $IL\text{-}1\alpha^+$ expressava também CD11b (**Figura 6A**). A população $CD45^+CD11b^+$ do fígado foi dividida em subpopulações e a análise da expressão de IL-1α intracelular nos monócitos inflamatórios ($Ly6C^{high}Ly6G^-$), neutrófilos ($Ly6C^{int}Ly6G^+$) e outras células $CD11b^+$ revelou que os neutrófilos são, portanto, a maior fonte de IL-1α (**Figura 6B**). Embora todas as subpopulações de células $CD11b^+$ tenham aumentado em número no dia 7 p.i., os neutrófilos foram as únicas células produtoras de IL-1α em maior número neste dia (**Figura 6B**). Os presentes resultados demonstram que a IL-1α presente no fígado em resposta à infecção pelo estágio eritrocítico do *P. chabaudi* provém majoritariamente de neutrófilos que infiltram o fígado.

4.6 A deficiência em IL-1α resulta em maior parasitemia, mas reduz a severidade das manifestações clínicas durante a malária causada pelo *P. chabaudi*

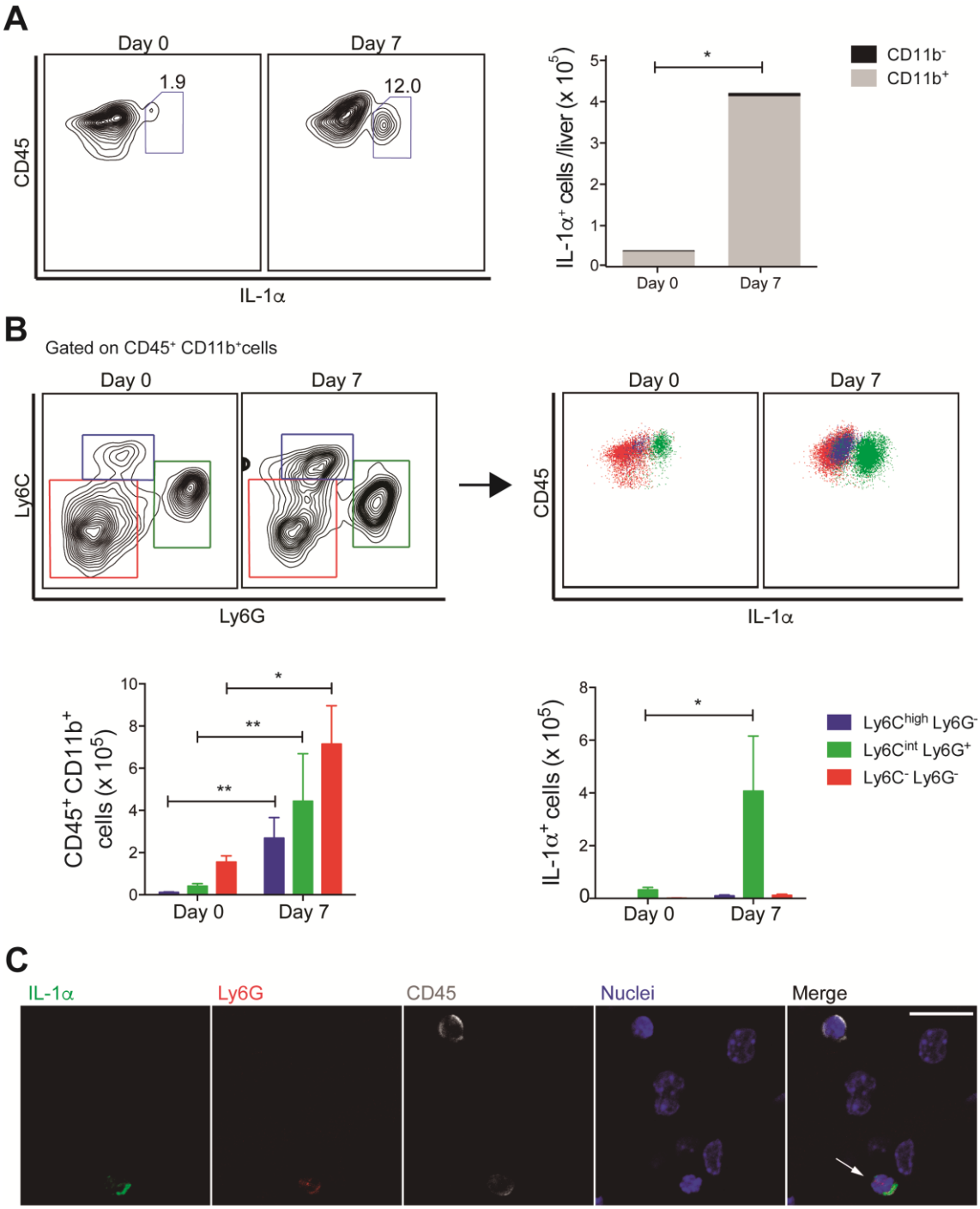
A fim de investigar o papel da IL-1α, produzida no fígado e em outros órgãos, na evolução da doença após infecção pelo *P. chabaudi*, a parasitemia, mortalidade e manifestações clínicas da malária foram acompanhadas e comparadas entre camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$. Ambas as linhagens de camundongos apresentaram parasitemia similar até o dia 7 p.i., no entanto, nos dias 8 e 9 p.i., a parasitemia foi maior nos animais *IL1A*$^{-/-}$, retornando aos níveis dos animais C57BL/6 no dia 10 p.i. com ambos os grupos controlando a parasitemia a partir do dia 12 p.i. (**Figura 7A**). Além disso, a maioria dos animais das duas linhagens sobreviveu à infecção (**Figura 7B**). Em relação aos parâmetros clínicos, não houve diferença na concentração de hemoglobina no plasma entre os animais *IL1A*$^{-/-}$ e C57BL/6 (**Figura 7C**). No entanto, a perda de peso corpóreo e a hipotermia foram atenuadas nos camundongos *IL1A*$^{-/-}$ em comparação aos camundongos C57BL/6 (**Figuras 7D** e **7E**). Estes dados permitem concluir que a IL-1α promove a perda de peso corpóreo e a hipotermia causadas pelo *P. chabaudi*, sem influenciar de forma significante no controle da parasitemia.

Figura 5. A infecção pelo *P. chabaudi* promove aumento no número de células produtoras de IL-1α no fígado



Camundongos C57BL/6 foram analisados 7 dias p.i. com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi*. Camundongos não infectados (Day 0) foram utilizados como controle. Análise por imunofluorescência de cortes de fígado marcados para IL-1α (verde), F-actina (vermelho) e núcleo (DAPI, azul) (magnificação de 40X, barra de escala corresponde a 20 µm). O número de células IL-1α^{+} por campo é representado graficamente. Os dados estão expressos como média ± SD (*n* = 3-5) de um experimento representativo de dois. Diferenças significativas foram observadas entre o grupo controle e o grupo de animais infectados com ***p<0,001 utilizando o teste Mann-Whitney.

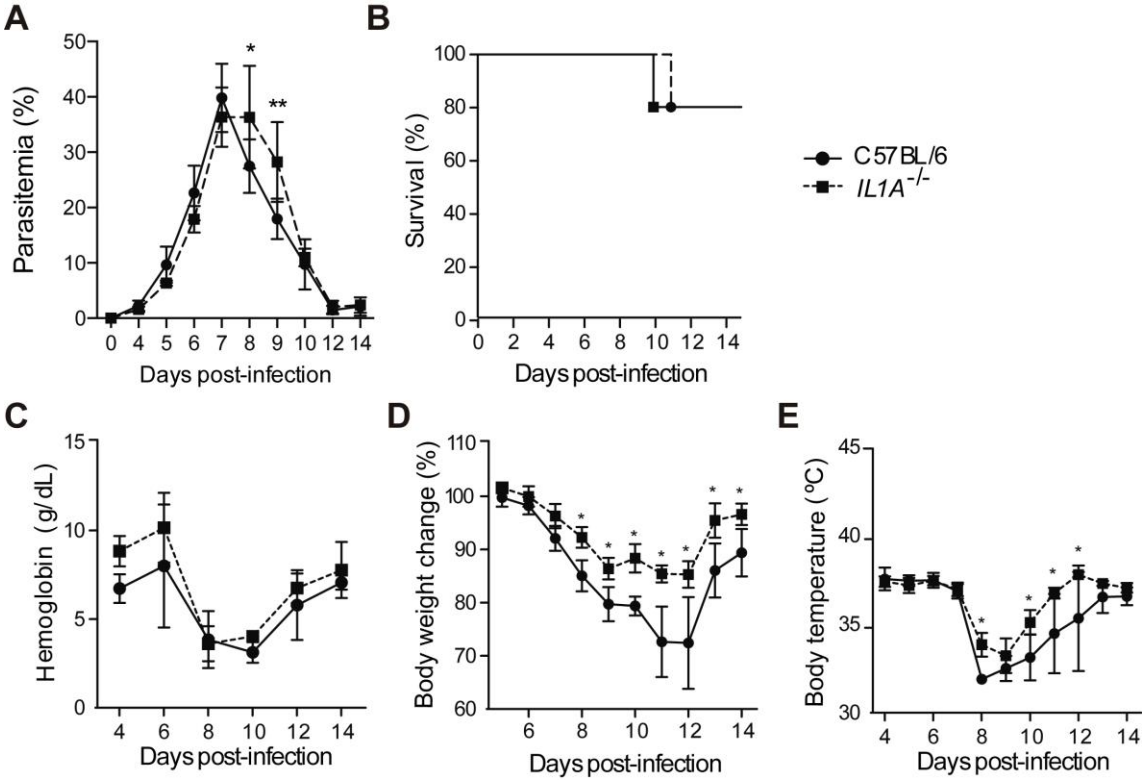
Figura 6. Neutrófilos são a maior fonte de IL-1α no fígado durante a fase aguda da infeção pelo *P. chabaudi*



Camundongos C57BL/6 foram analisados 7 dias p.i. com eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados (Day 0) foram utilizados como controle. **A.** *Contour plots* da produção de IL-1α por células CD45$^+$ do fígado e o número de células CD45$^+$IL-1α$^+$ distribuídas pela expressão do marcados CD11b. Os dados estão expressos como média ± SD (*n* = 3-5) de um experimento representativo de dois. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos de camundongos controles e infectados com *p<0,05 através do teste Mann-Whitney. **B.** *Contour plots* das células CD11b$^+$ analisadas pela expressão dos marcadores Ly6C e Ly6G e estas subpopulações foram posteriormente analisadas para a produção de IL-1α. A quantificação do número de monócitos (Ly6C^{high}Ly6G$^-$ - azul), neutrófilos (Ly6C^{int}Ly6G$^+$

- verde) e outras células CD11b^{+} (Ly6C^{-}Ly6G^{-} - vermelho) por fígado e o número de células IL-1α^{+} dentro de cada uma das subpopulações também é apresentado graficamente. **C.** Análise de imunofluorescência dos cortes de fígado de camundongos C57BL/6 7 dias p.i. marcados com IL-1α (verde), Ly6G (vermelho), CD45 (cinza) e núcleo (DAPI, azul) (magnificação de 40X, barra de escala corresponde a 16 µm).

Figura 7. Parasitemia e manifestações clínicas da doença em camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$



Camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ foram inoculados com 1 x 10^{6} eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi*. Camundongos não infectados (Day 0) foram utilizados como controle. **A.** Curvas de parasitemia obtidas através da análise microscópica de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. **B.** Curvas de sobrevivência. **C.** Concentração de hemoglobina sérica. **D.** Mudança no peso corporal. **E.** Temperatura corporal. Os dados estão expressos como média ± SD (n = 5) de um experimento representativo de três. Diferenças significativas são observadas entre os grupos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ com *p<0,05 e **p<0,01 através dos testes Two-way ANOVA e Sidak's de mu ltiplas comparações.

4.7 A deficiência em IL-1α atenua a morte celular no fígado durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi*

Uma vez que neutrófilos produtores de IL-1α infiltravam o fígado durante a fase aguda da infecção, foi investigada a participação da IL-1α no desenvolvimento do dano e da inflamação hepática. No dia 7 p.i., as análises histopatológicas do fígado revelaram menos lesões necróticas nos

camundongos *IL1A*$^{-/-}$ em comparação aos camundongos C57BL/6 (**Figuras 8A** e **8B**). Os scores de inflamação hepática e total histopatológico também foram menores nos animais *IL1A*$^{-/-}$ infectados (**Figura 8B**). Além disso, no dia 7 p.i., os níveis de ALT, AST e LDH plasmáticos estavam reduzidos nos camundongos *IL1A*$^{-/-}$ comparado aos camundongos C57BL/6 (**Figura 8C**). Confirmando que o processo de morte celular encontra-se atenuado na ausência de IL-1α, um menor número de células TUNEL^{+} foi observado 7 dias p.i. nos cortes de fígado de camundongos *IL1A*$^{-/-}$ do que o encontrado nos camundongos C57BL/6 (**Figuras 8D** e **8E**). Estes resultados mostram que a IL-1α promove a morte celular no fígado durante a fase aguda da malária causada pelo *P. chabaudi*.

4.8 A produção de citocinas pró-inflamatórias por leucócitos do fígado induzida pelo *P. chabaudi* encontra-se comprometida na ausência da IL-1α

Evidenciando a contribuição da IL-1α para a inflamação hepática induzida pelo estágio eritrocítico do *P. chabaudi*, um menor número de leucócitos foi obtido do fígado processado com colagenase de camundongos *IL1A*$^{-/-}$ quando comparado ao número de células do fígado dos animais C57BL/6 (**Figura 9A**). As populações de células CD4^{+}, CD8^{+}, NK1.1^{+}, CD11c^{+} e CD11b^{+}Ly6G^{+} encontraram-se reduzidas na ausência de IL-1α, enquanto um número similar de células CD11b^{+}Ly6C^{high} foi observado no fígado de ambos os camundongos *IL1A*$^{-/-}$ e C57BL/6 infectados. O baço destes animais também foi investigado, já que este é um órgão fundamental na resposta imune inata e adaptativa na malária [137, 138]. Em contraste com o observado na resposta inflamatória do fígado, a IL-1α não exerceu nenhuma influência aparente na população leucocitária do baço (**Figura 11A**).

Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6 e IFN-γ, exercem papéis importantes tanto na proteção como na patogênese durante a infecção pelo *Plasmodium* sp. [108, 139]. TNF-α e IL-6 também estão frequentemente associadas com o dano e inflamação hepática [21, 140]. Neste sentido, foi avaliada a produção de TNF-α e IFN-γ por leucócitos do fígado de camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ no dia 7 p.i. através de marcação intracelular.

A população de células $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ estava significativamente reduzida no fígado dos animais *IL1A*$^{-/-}$ infectados quando comparados aos animais C57BL/6 infectados (**Figura 10A**). Em relação à produção de TNF-α, a deficiência em IL-1α resultou em uma redução tanto na frequência, como no número de células $CD11c^+TNF\text{-}\alpha^+$, $CD11b^+Ly6C^{high}TNF\text{-}\alpha^+$, e $CD11b^+Ly6G^+TNF\text{-}\alpha^+$ por fígado (**Figura 10A**). Os níveis de mRNA de TNF-α, IL-6 e IFN-γ também encontraram-se reduzidos no fígado dos camundongos *IL1A*$^{-/-}$ infectados em comparação aos C57BL/6 infectados (**Figura 10B**). As células T $CD4^+$ esplênicas são a principal fonte de IFN-γ durante a fase aguda da infecção pelo *P. chabaudi* [141] e esta resposta não foi afetada pela ausência da IL-1α (**Figura 11B**).

Todos estes dados demonstram que a IL-1α promove o recrutamento de leucócitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias no fígado durante a infecção pelo estágio eritrocítico do *P. chabaudi*, aparentemente sem exercer efeitos nas populações esplênicas e na produção de IFN-γ pelas células T $CD4^+$.

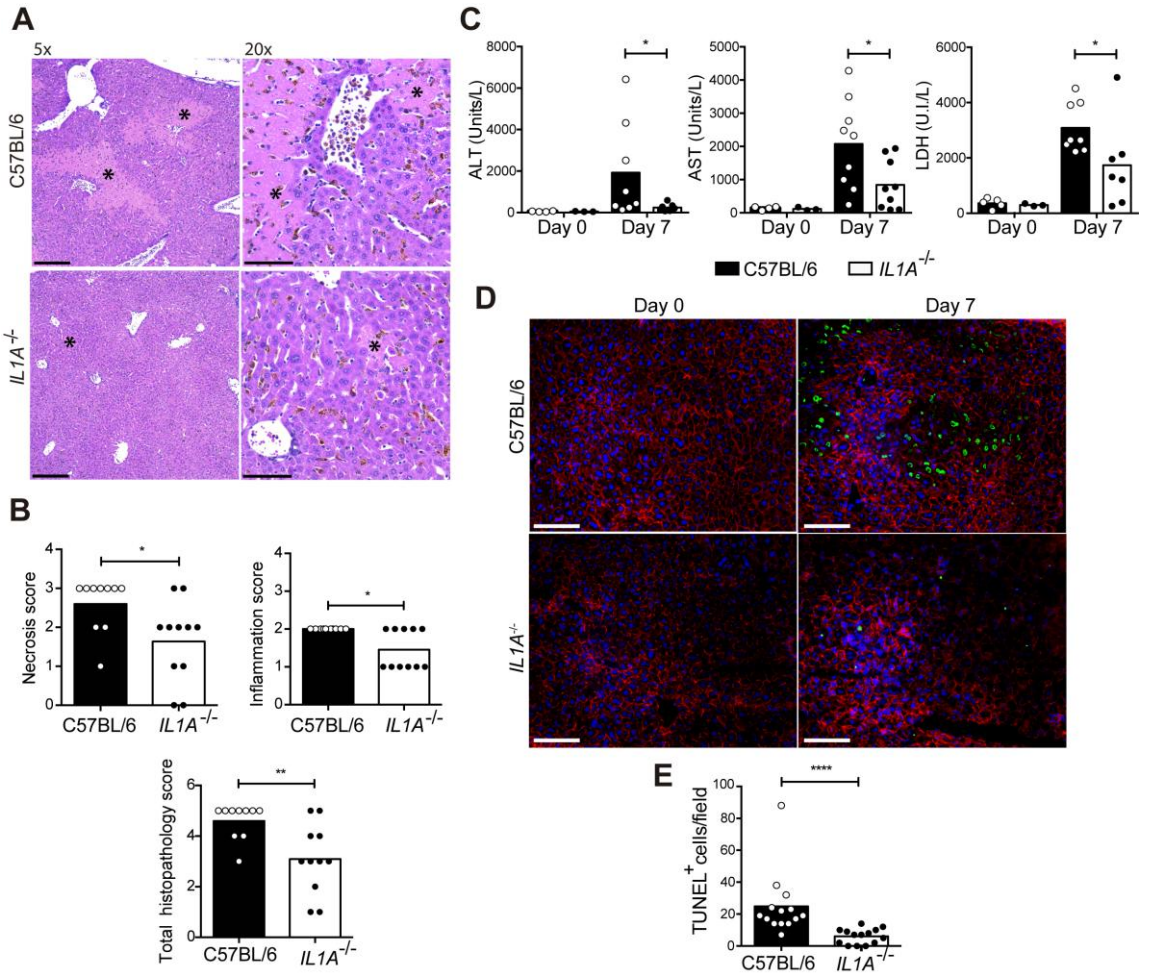
4.9 A IL-1α parece não possuir papel essencial no fenômeno da proteção à reinfecção pelo esporozoíto do *Plasmodium* sp.

Visto que a IL-1α possui papel fundamental em eventos que ocorrem no fígado durante a infecção com a fase eritrocítica do *P. chabaudi*, foi investigada se ela também exerceria algum papel na proteção contra a reinfecção com o estágio hepático do *Plasmodium* sp. Para isso, camundongos C57BL/6 e *IL1AB*$^{-/-}$ foram infectados com 1×10^6 eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi* e 7 dias p.i., foram reinfectados com 50.000 esporozoítos do *P. berghei* ANKA-GFP, sendo sacrificados 48 horas depois (9 dias p.i. com o estágio sanguíneo). Não foram observadas diferenças significativas na parasitemia entre as linhagens C57BL/6 e *IL1AB*$^{-/-}$ (**Figura 12A**). A carga parasitária no fígado dos animais reinfectados foi menor tanto para os camundongos C57BL/6, como para os *IL1AB*$^{-/-}$, em comparação aos camundongos de ambas as linhagens infectados apenas com os esporozoítos (**Figura 12B**). Os níveis de mRNA da hepcidina nos camundongos reinfectados estava baixo, no entanto, inesperadamente foram observados altos níveis de hepcidina nos

camundongos *IL1AB*$^{-/-}$ infectados apenas com esporozoítos (**Figura 12C**). Em relação à produção de citocinas pró-inflamatórias, os níveis de mRNA de TNF-α e IL-6 foram maiores nos camundongos previamente infectados com o estágio eritrocítico do que aqueles infectados apenas com o esporozoíto (**Figura 12D**). Além disso, a expressão de mRNA de TNF-α nos camundongos *IL1AB*$^{-/-}$ infectados com a fase eritrocítica do *P. chabaudi* estava reduzida em relação aos animais C57BL/6 na mesma condição (**Figura 12D**), corroborando os resultados apresentados anteriormente. Análises histopatológicas mostraram que não houve diferenças entre os camundongos C57BL/6 e *IL1AB*$^{-/-}$ em relação aos scores de inflamação e necrose no fígado dos camundongos previamente infectados com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi*, embora estes scores tenham sido maiores do que os animais infectados apenas com os esporozoítos (**Figura 12E**).

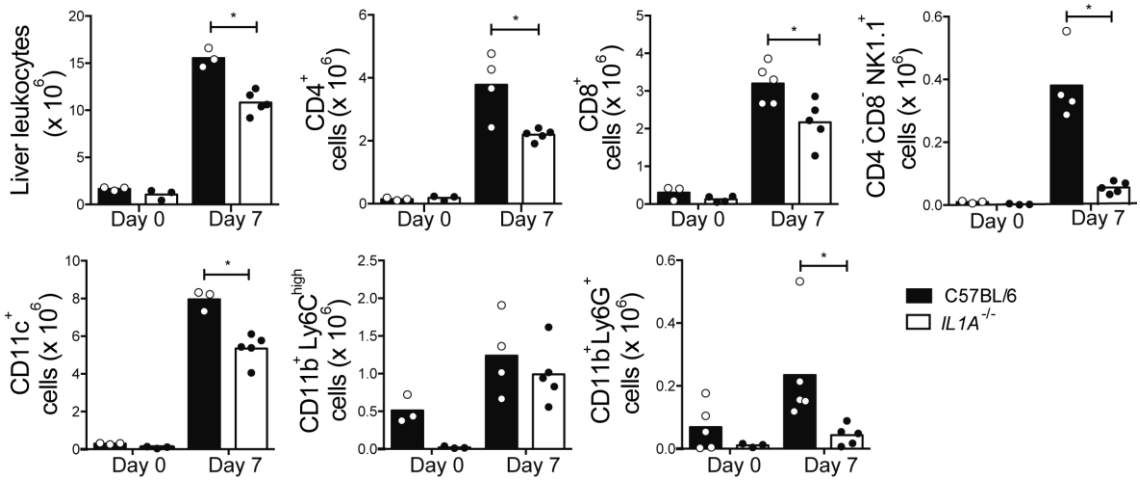
Estes resultados permitem concluir que a ausência das citocinas da família da IL-1 não altera o fenômeno da proteção contra a reinfecção com esporozoítos em camundongos previamente infectados com o estágio sanguíneo do *P. chabaudi*.

Figura 8. Morte celular no fígado dos camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ após infecção pelo *P. chabaudi*



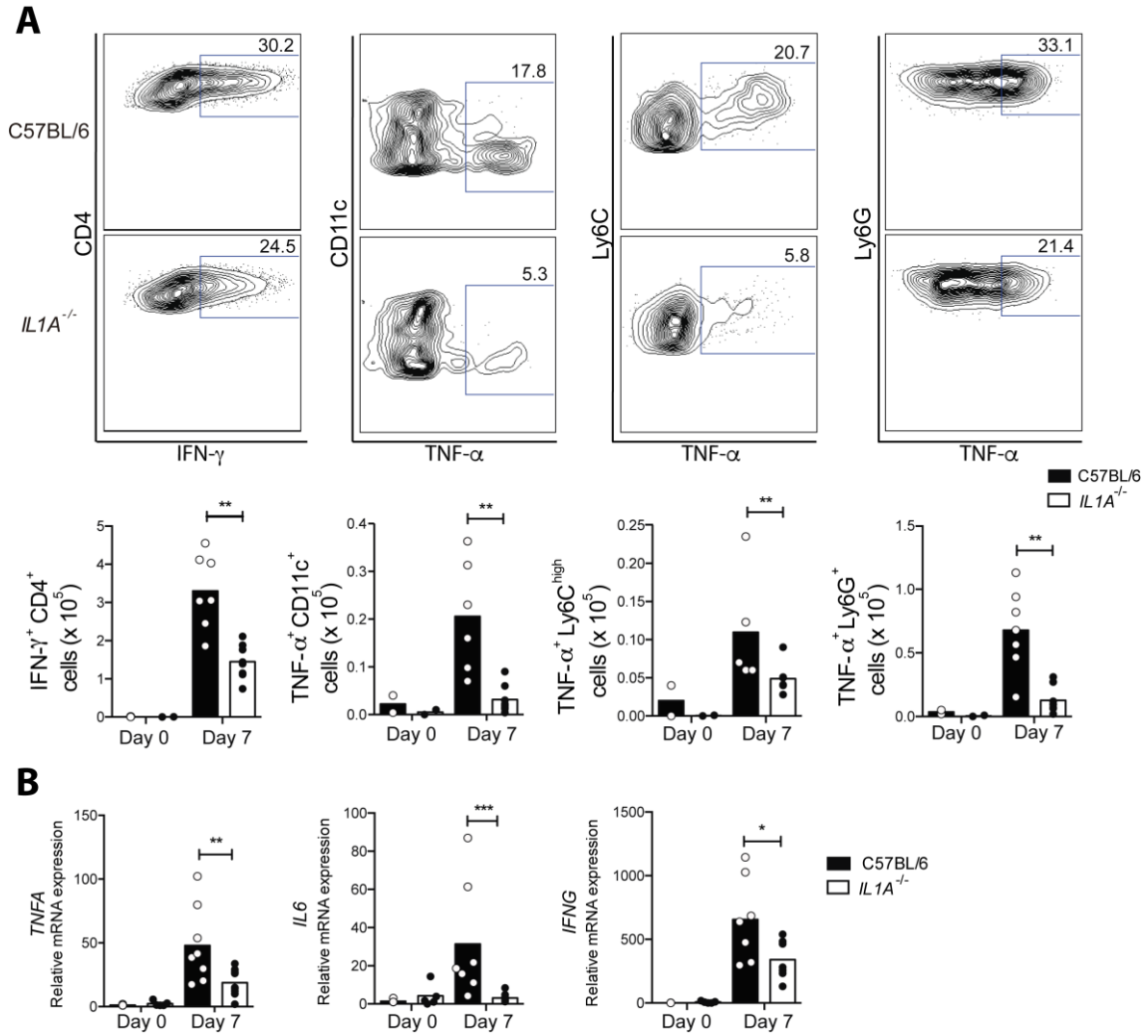
Camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ foram analisados 7 dias p.i. com eritrócitos infectados com o *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como grupo controle (Day 0). **A.** Cortes de fígado corados com H&E mostram focos necróticos (asteriscos) e infiltrado celular. Magnificação original de 5X (barra de escala: 300 µm) e de 20X (barra de escala: 50 µm). **B.** Scores histopatológicos semiquantitativos da inflamação, necrose e histopatológico total (inflamação + necrose). Os dados compõem um *pool* de três experimentos independentes (*n*= 10-11). **C.** Concentrações plasmáticas de AST, ALT e LDH. Os dados são um *pool* de três experimentos independentes (*n*=3-9). **D.** Ensaio de imunofluorescência de cortes congelados de fígado com marcação para células TUNEL^{+} (verde), F-actina (vermelho) e núcleo (DAPI, azul). Magnificação de 40X (barra de escala corresponde a 100 µm). **E.** Quantificação das células TUNEL^{+} por campo analisado nos cortes de fígado. Os dados são expressos como média ± SD (*n*=14) de um experimento representativo de três. (B, C e E) Diferenças significativas foram observadas entre os grupos de camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ com **p*<0,05, ***p*<0,01 e *****p* < 0,0001 através do teste de Mann-Whitney.

Figura 9. Redução do número de leucócitos no fígado dos camundongos *IL1A*$^{-/-}$ em comparação aos camundongos C57BL/6 após infecção pelo *P. chabaudi*



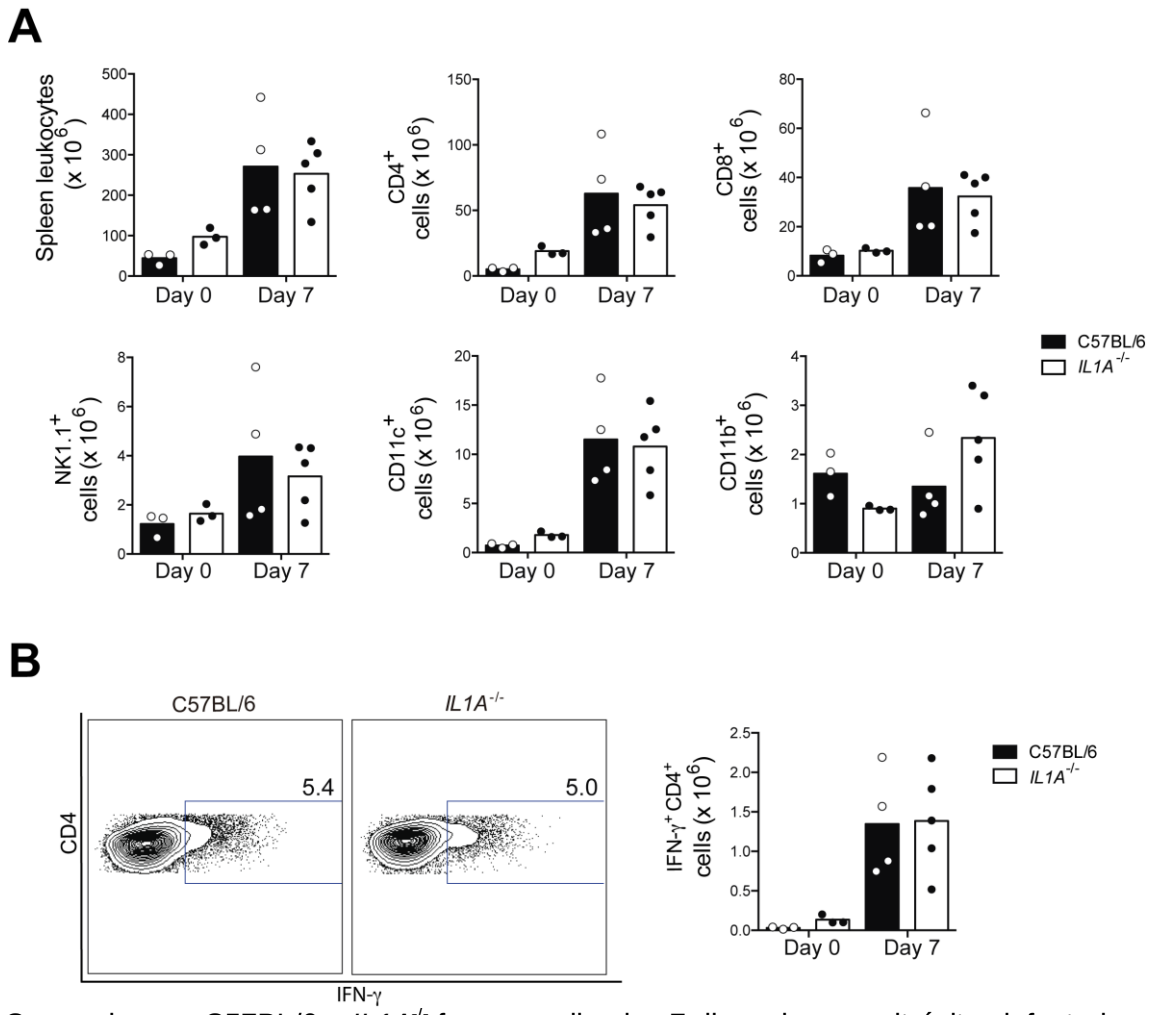
Camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ foram analisados 7 dias p.i. com eritrócitos infectados com o *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como grupo controle (Day 0). Os leucócitos do fígado foram analisados por citometria de fluxo. O número de leucócitos totais e de células CD4^{+}, CD8^{+}, NK1.1^{+}, CD11c^{+}, CD11b^{+}–Ly6C^{high} e CD11b^{+}Ly6G^{+} estão representados graficamente. Os dados estão expressos como média ± SD (*n*= 3-5) de um experimento representativo de três. Diferenças significativas foram observadas com **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p* < 0,001 através do teste de Mann-Whitney.

Figura 10. Produção de citocinas pelos leucócitos do fígado é comprometida nos camundongos *IL1A*$^{-/-}$ infectados pelo *P. chabaudi*



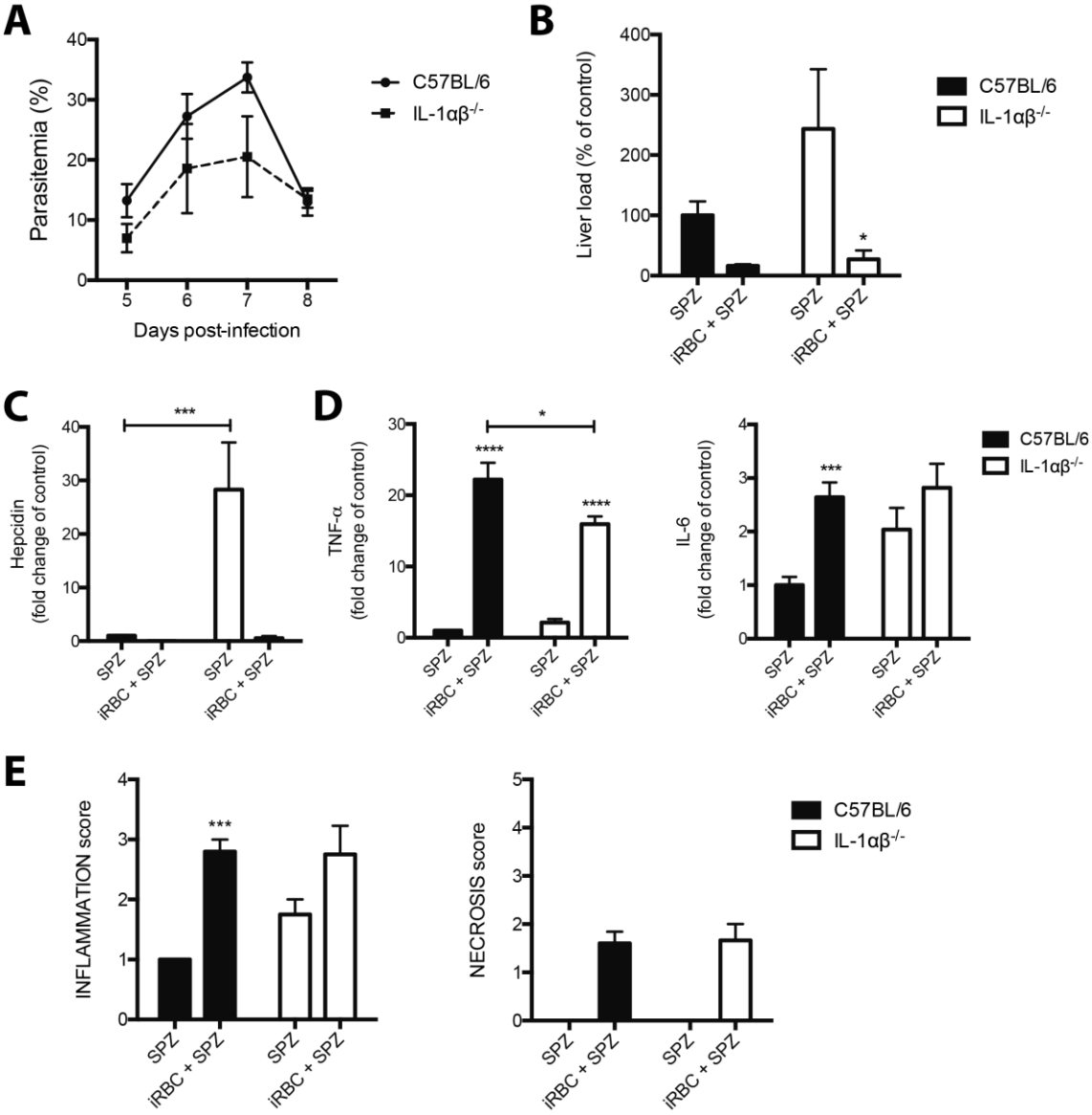
Camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ foram analisados 7 dias p.i. com eritrócitos infectados com o *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como grupo controle (Day 0). Os leucócitos do fígado foram analisados por citometria de fluxo. **A.** *Contour plots* da produção de IFN-γ e TNF-α por células CD4^{+} e populações mielóides, respectivamente. O número de células CD4^{+}IFN-γ^{+}, CD11c^{+}TNF-α^{+}, CD11b^{+}Ly6C^{high}TNF-α^{+}, e CD11b^{+}Ly6G^{+}TNF-α^{+} por fígado também estão apresentados. **B.** Expressão relativa do mRNA de *TNFA*, *IL6* e *IFNG* no tecido hepático determinado por RT-PCR. Os dados compõem um *pool* de dois experimentos independentes (*n*=3-8). Diferenças significativas foram observadas entre os grupos de camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ com **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p* < 0,001 através do teste de Mann-Whitney.

Figura 11. População de leucócitos e produção de IFN-γ por células CD4^{+} no baço nos camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ após infecção pelo *P. chabaudi*



Camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ foram analisados 7 dias p.i. com eritrócitos infectados com o *P. chabaudi*. Camundongos não infectados foram usados como grupo controle (Day 0). Os leucócitos do baço foram analisados por citometria de fluxo. **A.** Número de leucócitos totais e células CD4^{+}, CD8^{+}, NK1.1^{+}, CD11c^{+} e CD11b^{+} por baço. **B.** *Contour plots* representando a produção intracelular de IFN-γ em células CD4^{+} e a quantificação do número de células CD4^{+}IFN-γ^{+} por baço. Os dados estão expressos como média ± SD (*n*=3-5) de um experimento representativo de três. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de camundongos C57BL/6 e *IL1A*$^{-/-}$ através do teste Mann-Whitney.

Figura 12. As citocinas da família da IL-1 não são essenciais para a proteção conferida pelas formas eritrocíticas contra a reinfecção com esporozoítos



Camundongos C57BL/6 e *IL1AB*$^{-/-}$ foram inoculados com 1 x 10^6 eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi* (iRBCs) e 7 dias depois, foram reinfectados com 50.000 esporozoítos do *P. berghei* ANKA-GFP (SPZ). Os animais foram sacrificados 48h depois. Camundongos infectados apenas com esporozoítos foram usados como controle. **A.** Curvas de parasitemia da infecção com o estágio sanguíneo. **B.** Carga parasitária no fígado quantificada por RT-PCR para a expressão de GFP pelos parasitas 48h após infecção com o estágio hepático dos camundongos previamente infectados com o estágio sanguíneo (iRBC + SPZ) ou não (SPZ). **C.** Quantificação do mRNA da hepcidina e **D.** das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6 no fígado dos camundongos reinfectados ou infectados apenas com os esporozoítos. **E.** Análises histopatológicas dos scores de inflamação e necrose do fígado dos camundongos reinfectados ou infectados apenas com esporozoítos. Dados representativos de um experimento (n=5) com *p<0,05, ***p<0,001 e ****p<0,0001 através do teste de Mann-Whitney.

5. DISCUSSÃO

O comprometimento do fígado durante a malária é um evento comum em pacientes infectados com diferentes espécies de *Plasmodium* sp. [97, 142, 143]. Embora a ocorrência de dano hepático em modelos murinos de malária já tenha sido descrito por outros [118, 130, 144], a cinética das concentrações plasmáticas dos indicadores de dano hepático em camundongos infectados com diferentes espécies de *Plasmodium* sp. apresentou uma possível relação entre o dano hepático e a parasitemia dos animais. De fato, a correlação entre a presença de hemozoína no fígado de animais infectados com o estágio sanguíneo de *P. berghei* e *P. chabaudi* e o dano e inflamação no fígado já foi investigada [130]. A cinética do citado estudo e dos resultados aqui apresentados diferem, uma vez que são utilizados inóculos diferentes de parasitas, não sendo possível uma comparação entre os níveis encontrados nos respectivos dias. No entanto, apenas camundongos infectados pelo *P. chabaudi* apresentaram, de fato, uma correlação positiva entre os níveis de hemozoína e o dano e inflamação hepáticos [130]. As análises histopatológicas do fígado de camundongos infectados pelo *P. chabaudi* confirmam a maior incidência de necrose hepática e inflamação durante a fase aguda da doença, principalmente no pico de parasitemia. O acúmulo de eritrócitos parasitados pelo *P. chabaudi* preferencialmente no fígado durante o pico da parasitemia [129] corrobora com a correlação entre a presença de hemozoína e dano hepático, explicando os resultados obtidos. Embora muitos estudos utilizem inóculos diferentes de eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi*, a relação entre alta parasitemia e dano hepático está presente em todos [118, 128, 129, 131], evidenciando que o dano e a inflamação ocorrem no fígado durante a malária desenvolvida por camundongos durante a fase eritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium* sp.

Os mecanismos pelos quais este dano hepático ocorre, no entanto, permanecem com alguns aspectos a serem esclarecidos. Embora se saiba que o stress oxidativo esteja envolvido [131], o papel das citocinas da família da IL-1 nunca havia sido investigado. Uma vez que os maiores scores de necrose e inflamação foram encontrados nos dias próximos ao pico de parasitemia, foi realizada a quantificação dos níveis de mRNA e de proteína da IL-1α no fígado,

e os altos níveis encontrados confirmaram a hipótese de que esta citocina estaria sendo produzida neste contexto. Em relação à IL-1β, outra importante citocina da família da IL-1, os níveis basais no fígado foram mantidos ao longo da infecção. A não dependência do inflamassoma NLRP3 na produção de IL-1α foi verificada a partir da manutenção dos níveis encontrados nos camundongos C57BL/6 em animais deficientes para os componentes NLRP3 e Caspase-1. Além disso, como esperado, também não houve alteração dos níveis de IL-1β no fígado destes animais em comparação com os camundongos C57BL/6. O inflamassoma NLRP3 parece, portanto, não participar da produção das citocinas da família da IL-1 no contexto da infecção pelo *P. chabaudi*. Isto é corroborado pelo estudo que verifica que a produção de IL-1β dependente do inflamassoma NLRP3 só ocorre em animais infectados pelo *P. chabaudi* após desafio com LPS [145]. Em camundongos infectados pelo *P. berghei* que desenvolvem lesões renais também ocorre um aumento nos níveis de IL-1α no rim [75]. A fim de determinar se havia produção desta citocina em outros órgãos, a quantificação foi realizada também no soro, baço e pulmão dos camundongos C57BL/6 infectados com o *P. chabaudi*. Constatou-se que os níveis encontrados no soro eram muito baixos, chegando a ser indetectáveis nos dias 9 e 10 p.i. Já no baço, foram encontrados altos níveis de IL-1α no dia 7 p.i., semelhante ao fígado, enquanto que no pulmão, os maiores níveis foram observados após 10 dias de infecção. O acúmulo de eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi* e a consequente inflamação associada ocorre primeiramente no baço e fígado e apenas mais tardiamente no pulmão [129], o que poderia explicar a diferença de cinética de produção da IL-1α entre estes órgãos.

O aumento na produção de IL-1α já foi descrito em diversos modelos experimentais de lesão hepática [19, 146, 147]. Durante o dano hepático induzido pela malária experimental causada pelo *P. chabaudi* pôde-se verificar um aumento no número de células produtoras de IL-1α no fígado. Sabe-se que hepatócitos e células de Kupffer são capazes de produzir IL-1α no fígado [19, 21, 22, 62], porém, no modelo de infecção pelo *P. chabaudi*, os neutrófilos infiltrantes são a maior fonte de IL-1α. Tanto por imunofluorescência, como por citometria de fluxo, a IL-1α foi localizada em neutrófilos e não em outras

populações celulares presentes no fígado. A produção e estocagem de altos níveis de IL-1α em neutrófilos é conhecida [148]. A forma a qual a IL-1α está expressa nos neutrófilos no contexto da malária não foi investigada, embora haja um trabalho que apresente a forma precursora não clivada como a mais abundante nos neutrófilos [25]. Sabe-se que a infiltração e ativação de neutrófilos estão associadas com complicações no fígado, pulmão e cérebro durante a malária [133, 149-151]. O acúmulo de eritrócitos infectados pelo *P. chabaudi* na vasculatura do fígado [152] pode levar a uma ativação imune e consequente recrutamento dos neutrófilos produtores de IL-1α. No entanto, sabe-se também que ocorre um recrutamento precoce de neutrófilos produtores de IL-1α para o tecido subcutâneo após a injeção de sobrenadante de células em hipóxia [25]. Uma vez que a hipóxia também é um fenômeno que ocorre durante a malária [123, 131], este pode ser um importante fator atrativo para os neutrófilos produtores de IL-1α infiltrarem o fígado. Embora tenha sido mostrado que a infiltração neutrofílica possa estar diretamente relacionada com o dano hepático após a infecção pelo *P. chabaudi* [133], os mecanismos pelos quais isto ocorre não foram investigados.

A fim de avaliar se a IL-1α produzida pelos neutrófilos exerce algum papel na imunopatogênese da malária, passou-se a utilizar camundongos deficientes para a IL-1α. A avaliação dos parâmetros clínicos dos animais infectados mostrou que a IL-1α promove a perda de peso e a hipotermia, mas não exerce um grande papel no controle da parasitemia. Estes achados evidenciam o efeito da IL-1α como um pirógeno endógeno na malária, enquanto a perda de peso pode estar relacionada à capacidade desta citocina em induzir a produção de TNF-α e IL-6, as quais estão relacionadas com a indução da caquexia [153]. A falta de controle transitória da parasitemia poderia ser explicada pela redução da produção de IFN-γ, citocina importante para este controle durante a malária [108], encontrada no fígado. No entanto, como esta redução não foi vista no baço, os níveis sistêmicos de IFN-γ podem ter sido suficientes para o posterior controle da parasitemia. Estudos anteriores associam a IL-1α à patogênese da falência hepática fulminante e ao dano hepático induzido por stress do retículo endoplasmático [19, 62, 63] e pela primeira vez é mostrado o papel da IL-1α no dano hepático causado pela

malária. Além de promover as lesões necróticas, a IL-1α aumenta o infiltrado celular no fígado durante a infecção pelo *P. chabaudi*, o que corrobora com o bem estabelecido papel desta citocina na promoção da inflamação ao induzir o recrutamento de populações celulares mieloides e linfoides [21, 34, 50, 68]. O recrutamento dos neutrófilos produtores de IL-1α no fígado dos camundongos infectados amplifica a resposta inflamatória através da sinalização do IL-1R de forma autócrina ou parácrina [63, 64], induzindo a secreção local de citocinas pró-inflamatórias. De fato, a baixa produção de IFN-γ por células T $CD4^+$ do fígado em camundongos *IL1A*$^{-/-}$ infectados pode estar relacionada à capacidade da IL-1α de promover a ativação de linfócitos T, como descrito durante a injúria hepática induzida por tetracloreto de carbono [65]. Além disso, a sinalização de IL-1α culmina na ativação via MyD88 do NF-κB [11, 15], justificando a reduzida produção de TNF-α por neutrófilos, monócitos e células dendríticas e os menores níveis de mRNA da IL-6 no fígado dos camundongos *IL1A*$^{-/-}$. A influência da IL-1α na produção de TNF-α vem sendo mostrada em vários modelos, evidenciando a relação entre estas duas citocinas e corroborando o resultado aqui apresentado [35, 70].

A produção de TNF-α no fígado durante a malária, a qual é potencializada pela IL-1α de acordo com os resultados aqui apresentados, pode estar diretamente envolvida na morte dos hepatócitos e no desenvolvimento das lesões necróticas. Foi demonstrado que o grupamento heme livre sensibiliza hepatócitos para seguir a via da apoptose mediada por TNF-α durante a infecção pelo *P. chabaudi*, processo que é inibido pela superexpressão da HO-1 [131]. Além disso, a sinalização via IL-1R em hepatócitos também promove a morte celular induzida por TNF-α e o recrutamento de neutrófilos durante a inflamação hepática [64]. Desse modo, os baixos níveis de produção de TNF-α no fígado de camundongos *IL1A*$^{-/-}$ infectados podem atenuar a apoptose de hepatócitos, reduzindo o desenvolvimento da necrose secundária. De fato, os resultados apresentados em relação ao ensaio de TUNEL sugerem que os hepatócitos morrem por processo de apoptose durante a malária aguda e que este processo é amplificado pela IL-1α. IL-22 e IL-12 são outras citocinas que têm sido associadas com a proteção e indução, respectivamente, do dano hepático

durante a malária experimental [126, 132], assim como a molécula adaptadora MyD88, a qual é compartilhada entre as vias do TLR e do IL-1R [126]. A IL-1α produzida pelos neutrófilos no fígado exerce, portanto, papel fundamental na imunopatogênese do dano hepático induzido pela infecção com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi*. A atuação na indução do recrutamento de mais leucócitos para o fígado, incluindo os próprios neutrófilos, e na ativação celular para produção de citocinas pró-inflamatórias, inclusive TNF-α, fundamental para o processo de morte celular, faz com que esta seja uma citocina central no processo de inflamação hepática.

Uma vez que a IL-1α possui um papel tão importante em eventos que ocorrem no fígado durante a fase eritrocítica da infecção pelo *P. chabaudi* e sabendo que a reinfecção pelo estágio hepático do *Plasmodium* sp. é inibido pela presença da infecção eritrocítica, foi questionado se a IL-1α também teria alguma participação neste processo. A utilização do camundongo *IL1AB*$^{-/-}$ permitiu avaliar a participação de ambas as citocinas da família da IL-1 neste processo, embora já tenha sido mostrado que a IL-1β não é produzida em níveis significativos no fígado dos animais infectados com o *P. chabaudi*. A manutenção da carga parasitária baixa nos camundongos *IL1AB*$^{-/-}$ demonstra que as citocinas da família da IL-1 não são essenciais para a proteção contra a reinfecção com esporozoítos. Os altos níveis de hepcidina encontrados nos camundongos *IL1AB*$^{-/-}$ infectados apenas com esporozoítos foram inesperados tanto pelo fato de este hormônio estar relacionado com a inibição do desenvolvimento dos esporozoítos no fígado [82], como pelo fato de que a IL-1 já foi demonstrada como um fator estimulador da expressão da hepcidina [154]. Os menores níveis de TNF-α encontrados nos camundongos *IL1AB*$^{-/-}$ infectados com o estágio sanguíneo do *P. chabaudi* comparados aos animais C57BL/6 confirmam o papel da IL-1 na produção de TNF-α. No entanto, não foram observadas diferenças entre as duas linhagens de camundongos infectadas com o *P. chabaudi* em relação à produção de IL-6 e aos scores de inflamação e necrose. Embora já tenha sido descrito que os animais deficientes para MyD88 também não foram capazes de reverter a proteção [82], o efeito do dano hepático não havia sido investigado. A necrose apresentou um score abaixo do descrito anteriormente para o modelo de infecção pelo *P. chabaudi*,

o que evidencia que a ocorrência de necrose não é fator determinante para a proteção contra a reinfecção. Além disso, as diferenças quanto à produção de IL-6 e inflamação podem ser explicadas pela linhagem de camundongo não ser a mesma utilizada nos experimentos anteriores e o dia analisado (9 dias p.i.) também não ser o mesmo. Por conta do resultado claro quanto à proteção à reinfecção, repetições e a utilização de camundongos apenas deficientes para IL-1α não tiveram continuidade. Apesar, portanto, do importante papel na imunopatogênese do fígado durante a infecção com a fase eritrocítica do *P. chabaudi*, a deleção apenas das citocinas da família da IL-1 não foi capaz de reverter a proteção contra a reinfecção, indicando que estas citocinas sozinhas não são fundamentais para este processo.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, o presente trabalho mostra que a infecção com o estágio eritrocítico do *P. chabaudi* induz o recrutamento de neutrófilos produtores de IL-1α para o fígado, além de promover a produção de IL-1α em outros órgãos. A IL-1α liberada localmente no fígado promove a resposta inflamatória, recrutando diversas populações leucocitárias e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, em particular TNF-α, a qual tem sido diretamente associada com a apoptose de hepatócitos e, consequentemente, a necrose no tecido hepático. Além disso, a IL-1α contribui para as manifestações clínicas da malária aguda, como as mudanças de temperatura e peso corporais. No entanto, a IL-1α não é essencial para a proteção contra a reinfecção por esporozoítos que ocorre quando há uma infecção eritrocítica pré-existente. Este estudo ajuda a entender a patofisiologia da doença hepática durante a malária, abrindo futuras perspectivas para novas abordagens terapêuticas.

REFERÊNCIAS

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

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

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

65. Lin, D., et al., *Secreted IL-1alpha promotes T-cell activation and expansion of CD11b(+) Gr1(+) cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice.* Eur J Immunol. **45**(7): p. 2084-98.
66. Altmeier, S., et al., *IL-1 Coordinates the Neutrophil Response to C. albicans in the Oral Mucosa.* PLoS Pathog. **12**(9): p. e1005882.
67. Mayer-Barber, K.D., et al., *Innate and adaptive interferons suppress IL-1alpha and IL-1beta production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection.* Immunity. **35**(6): p. 1023-34.
68. Neyt, K., et al., *Early IL-1 Signaling Promotes iBALT Induction after Influenza Virus Infection.* Front Immunol. **7**: p. 312.
69. Chatziandreou, N., et al., *Macrophage Death following Influenza Vaccination Initiates the Inflammatory Response that Promotes Dendritic Cell Function in the Draining Lymph Node.* Cell Rep. **18**(10): p. 2427-2440.
70. Voronov, E., et al., *IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice.* Int Immunol. **22**(4): p. 245-57.
71. Von Stebut, E., et al., *Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in Leishmania major-susceptible BALB/c mice.* J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 191-9.
72. Kautz-Neu, K., et al., *IL-1 signalling is dispensable for protective immunity in Leishmania-resistant mice.* Exp Dermatol. **20**(1): p. 76-8.
73. Kim, J.M., et al., *Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to Toxoplasma gondii infection.* Parasitol Res, 2001. **87**(9): p. 758-63.
74. Biswas, A., et al., *Ly6C(high) monocytes control cerebral toxoplasmosis.* J Immunol. **194**(7): p. 3223-35.
75. Sinniah, R., L. Rui-Mei, and A. Kara, *Up-regulation of cytokines in glomerulonephritis associated with murine malaria infection.* Int J Exp Pathol, 1999. **80**(2): p. 87-95.
76. Griffith, J.W., et al., *Pure Hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid.* J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5208-20.
77. World Health Organization, *World malaria report*, World Health Organization: Geneva, Switzerland. p. volumes.
78. White, N.J., *Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite.* Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 172-3.
79. Tuteja, R., *Malaria - an overview.* FEBS J, 2007. **274**(18): p. 4670-9.
80. Sturm, A., et al., *Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids.* Science, 2006. **313**(5791): p. 1287-90.
81. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers.* Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
82. Portugal, S., et al., *Host-mediated regulation of superinfection in malaria.* Nat Med. **17**(6): p. 732-7.
83. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-80.
84. Lyke, K.E., et al., *Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls.* Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5630-7.
85. Ochiel, D.O., et al., *Differential regulation of beta-chemokines in children with Plasmodium falciparum malaria.* Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4190-7.
86. Anstey, N.M., et al., *Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression.* J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 557-67.

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

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

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

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

APÊNDICES

PLOS | PATHOGENS

RESEARCH ARTICLE

P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria

Érika Machado de Salles[1]*, Maria Nogueira de Menezes[1], Renan Siqueira[1], Henrique Borges da Silva[1,2], Eduardo Pinheiro Amaral[1], Sheyla Inés Castillo-Méndez[1], Isabela Cunha[1], Alexandra dos Anjos Cassado[1], Flávia Sarmento Vieira[1], David Nicholas Olivieri[3], Carlos Eduardo Tadokoro[4], José Maria Alvarez[1], Robson Coutinho-Silva[5,6], Maria Regina D'Império-Lima[1]*

1 Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Department of Laboratory Medicine and Pathology, Center of Immunology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, United States, **3** Escuela Superior de Enxeñaría Informática, Universidad de Vigo, Vigo, Spain, **4** Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil, **5** Programa de Imunobiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Pesquisa Translacional em Saúde e Meio Ambiente da Região Amazônica, Rio de Janeiro, Brazil

* erika.salles@gmail.com (EMS); relima@usp.br (MRDL).

Abstract

A complete understanding of the mechanisms underlying the acquisition of protective immunity is crucial to improve vaccine strategies to eradicate malaria. However, it is still unclear whether recognition of damage signals influences the immune response to *Plasmodium* infection. Adenosine triphosphate (ATP) accumulates in infected erythrocytes and is released into the extracellular milieu through ion channels in the erythrocyte membrane or upon erythrocyte rupture. The P2X7 receptor senses extracellular ATP and induces CD4 T cell activation and death. Here we show that P2X7 receptor promotes T helper 1 (Th1) cell differentiation to the detriment of follicular T helper (Tfh) cells during blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. The P2X7 receptor was activated in CD4 T cells following the rupture of infected erythrocytes and these cells became highly responsive to ATP during acute infection. Moreover, mice lacking the P2X7 receptor had increased susceptibility to infection, which correlated with impaired Th1 cell differentiation. Accordingly, IL-2 and IFNγ secretion, as well as T-bet expression, critically depended on P2X7 signaling in CD4 T cells. Additionally, P2X7 receptor controlled the splenic Tfh cell population in infected mice by promoting apoptotic-like cell death. Finally, the P2X7 receptor was required to generate a balanced Th1/Tfh cell population with an improved ability to transfer parasite protection to CD4-deficient mice. This study provides a new insight into malaria immunology by showing the importance of P2X7 receptor in controlling the fine-tuning between Th1 and Tfh cell differentiation during *P. chabaudi* infection and thus in disease outcome.

OPEN ACCESS

Citation: Salles ÉMd, Menezes MNd, Siqueira R, Borges da Silva H, Amaral EP, Castillo-Méndez SI, et al. (2017) P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. PLoS Pathog 13(8): e1006595. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006595

Editor: Jean Langhorne, Francis Crick Institute, UNITED KINGDOM

Received: March 22, 2017

Accepted: August 21, 2017

Published: August 31, 2017

Copyright: © 2017 Salles et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) grants, 2010/51150-4, 2013/07140-2 and 2015/20432-8 (MRDL) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) grants, 303676/2014-0 and 448765/2014-4 (MRDL). EMS received a PhD fellowship from FAPESP (2011/

PLOS | PATHOGENS

RESEARCH ARTICLE

In Vivo Approaches Reveal a Key Role for DCs in CD4+ T Cell Activation and Parasite Clearance during the Acute Phase of Experimental Blood-Stage Malaria

Henrique Borges da Silva[1,2], Raíssa Fonseca[1], Alexandra dos Anjos Cassado[1], Érika Machado de Salles[1], Maria Nogueira de Menezes[1], Jean Langhorne[3], Katia Regina Perez[4], Iolanda Midea Cuccovia[5], Bernhard Ryffel[6], Vasco M. Barreto[2], Cláudio Romero Farias Marinho[1], Silvia Beatriz Boscardin[1], José Maria Álvarez[1], Maria Regina D'Império-Lima[1‡*], Carlos Eduardo Tadokoro[2‡*]

1 Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, **2** Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal, **3** Medical Research Center, London, United Kingdom, **4** Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil, **5** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, **6** Unité d'Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires (CNRS—UMR7355), Université d'Orléans, Orléans, France

‡ These authors are joint senior authors on this work.
* relima@usp.br (MRDL); ctadokoro@igc.gulbenkian.pt (CET)

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Borges da Silva H, Fonseca R, Cassado AdA, Machado de Salles Érika, de Menezes MN, Langhorne J, et al. (2015) *In Vivo* Approaches Reveal a Key Role for DCs in CD4+ T Cell Activation and Parasite Clearance during the Acute Phase of Experimental Blood-Stage Malaria. PLoS Pathog 11(2): e1004598. doi:10.1371/journal.ppat.1004598

Editor: Maria M. Mota, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, PORTUGAL

Received: December 18, 2013

Accepted: December 2, 2014

Published: February 6, 2015

Copyright: © 2015 Borges da Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from the São Paulo Research Foundation 2011/24038-1 (MRDL) and 2009/08559-1 (HBdS), CAPES/IGC 04/2012 (MRDL, CET) and Fundação para a Ciência e Tecnologia PTDC/EBB-BIO/115514/2009 (CET). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Dendritic cells (DCs) are phagocytes that are highly specialized for antigen presentation. Heterogeneous populations of macrophages and DCs form a phagocyte network inside the red pulp (RP) of the spleen, which is a major site for the control of blood-borne infections such as malaria. However, the dynamics of splenic DCs during Plasmodium infections are poorly understood, limiting our knowledge regarding their protective role in malaria. Here, we used *in vivo* experimental approaches that enabled us to deplete or visualize DCs in order to clarify these issues. To elucidate the roles of DCs and marginal zone macrophages in the protection against blood-stage malaria, we infected DTx (diphtheria toxin)-treated C57BL/6.CD11c-DTR mice, as well as C57BL/6 mice treated with low doses of clodronate liposomes (ClLip), with *Plasmodium chabaudi* AS (*Pc*) parasites. The first evidence suggesting that DCs could contribute directly to parasite clearance was an early effect of the DTx treatment, but not of the ClLip treatment, in parasitemia control. DCs were also required for CD4+ T cell responses during infection. The phagocytosis of infected red blood cells (iRBCs) by splenic DCs was analyzed by confocal intravital microscopy, as well as by flow cytometry and immunofluorescence, at three distinct phases of *Pc* malaria: at the first encounter, at pre-crisis concomitant with parasitemia growth and at crisis when the parasitemia decline coincides with spleen closure. *In vivo* and *ex vivo* imaging of the spleen revealed that DCs actively phagocytize iRBCs and interact with CD4+ T cells both in T cell-rich areas and in the RP. Subcapsular RP DCs were highly efficient in the recognition and capture of iRBCs during pre-crisis, while complete DC maturation was only achieved during

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry

ISSN: 1475-6366 (Print) 1475-6374 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/ienz20

Evaluation of naphthoquinones identified the acetylated isolapachol as a potent and selective antiplasmodium agent

Diogo R. M. Moreira, Matheus S. de Sá, Taís S. Macedo, Maria N. Menezes, José Rui M. Reys, Antônio E. G. Santana, Thaissa L. Silva, Gabriela L. A. Maia, José M. Barbosa-Filho, Celso A. Camara, Tania M. S. da Silva, Katia N. da Silva, Elisalva T. Guimaraes, Ricardo R. dos Santos, Marília O. F. Goulart & Milena B. P. Soares

To cite this article: Diogo R. M. Moreira, Matheus S. de Sá, Taís S. Macedo, Maria N. Menezes, José Rui M. Reys, Antônio E. G. Santana, Thaissa L. Silva, Gabriela L. A. Maia, José M. Barbosa-Filho, Celso A. Camara, Tania M. S. da Silva, Katia N. da Silva, Elisalva T. Guimaraes, Ricardo R. dos Santos, Marília O. F. Goulart & Milena B. P. Soares (2015) Evaluation of naphthoquinones identified the acetylated isolapachol as a potent and selective antiplasmodium agent, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 30:4, 615-621, DOI: 10.3109/14756366.2014.958083

To link to this article: https://doi.org/10.3109/14756366.2014.958083

Published online: 28 Nov 2014.

Submit your article to this journal

Article views: 263

View Crossmark data

Citing articles: 2 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ienz20