UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós graduação em Bioquímica e Imunologia

PAPEL DO INTERFERON DO TIPO I EM NEUTRÓFILOS DURANTE A MALÁRIA

Bruno Coelho Rocha

Belo Horizonte
2015

BRUNO COELHO ROCHA

PAPEL DO INTERFERON DO TIPO I EM NEUTRÓFILOS DURANTE A MALÁRIA

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Imunologia.

Orientador: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Co-orientador: Dr. Douglas Taylor Golenbock

BELO HORIZONTE
2015

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNO COELHO ROCHA. Aos sete dias do mês de abril de 2015 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Papel do interferon do tipo I em neutrófilos durante a malária", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Érika Martins Braga (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Claudio Romero Farias Marinho (Universidade de São Paulo), aprovado; Dr. José Carlos Farias Alves Filho (Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto), aprovado; Dr. Douglas Taylor Golenbock - Co-Orientador (University of Massachusetts Med. School), aprovado; Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 07 de abril de 2015.

Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)

Dra. Érika Martins Braga (UFMG)

Prof. Jadervidos Santos Cruz
Coordenador de Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

Dr. Claudio Romero Farias Marinho (Universidade de São Paulo)

Dr. José Carlos Farias Alves Filho (Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto)

Dr. Douglas Taylor Golenbock - Co-Orientador (University of Massachusetts Med. School)

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Orientador (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo Gazzinelli pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório e pela orientação;

Ao Dr. Douglas Golenbock pela oportunidade de trabalhar com novas tecnologias na Universidade de Massachusetts e pela orientação;

Às Dras. Lis Antonelli e Fabiana Leoratti pelas discussões e direcionamentos durante a realização do projeto;

Aos Drs. Gustavo Menezes e Pedro Marques pelo auxílio na realização dos experimentos de intravital;

À todos do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia;

À todos do Laboratório de Imunopatologia;

Aos funcionários do biotério do Centro de Pesquisas Rene Rachou;

À equipe do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical em Porto Velho;

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde PDTIS-FIOCRUZ pela utilização de suas instalações;

Às agências financiadoras, CAPES e CNPq, que viabilizaram o desenvolvimento deste estudo;

Aos meus pais, Roberto e Angela, pelo apoio incondicional;

À Carol pelo exemplo de organização, carinho e pela compreensão durante as minhas viagens.

EPÍGRAFE

“The fuel on which science runs is ignorance. Science is like a hungry furnace that must be fed logs from the forests of ignorance that surround us. In the process, the clearing we call knowledge expands, but the more it expands, the longer its perimeter and the more ignorance comes into view.”

Matt Ridley

RESUMO

A interação complexa entre o *Plasmodium spp*. e o hospedeiro vertebrado e o pouco conhecimento dos mecanismos pelos quais o parasito ativa as células do sistema imune inato contribuem para o limitado entendimento da patogênese da malária. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico o principal foco de infecção do *Plasmodium spp*. Entretanto o papel destas células conferindo resistência ou induzindo dano tecidual é pouco compreendido. Assim este trabalho teve como objetivo avaliar o papel dos neutrófilos na patogênese da malária. Inicialmente foi observado elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias nos plasmas de pacientes infectados com *P. vivax*, porém apesar do aumento do número de neutrófilos no sangue periférico durante a infecção estas células não são responsáveis pela produção destas citocinas. Entretanto foi demonstrado que os neutrófilos de pacientes com *P. vivax* estão altamente ativados durante a malária através da elevada produção de espécies reativas de oxigênio, mieloperoxidase, do aumento da expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) e da alta frequência de neutrófilos de baixa densidade. Em humanos, essa assinatura transcricional de ISGs correlacionou com elevadas concentrações séricas de aminotransferases que indicam um dano hepático. Utilizando um modelo experimental murino de infecção foi observado que o recrutamento de neutrófilos para o fígado durante a infecção, assim como a produção de IL-1 e de quimiocinas são dependentes da sinalização por interferon do tipo I. Portanto este trabalho demonstra que interferon do tipo I tem um papel crucial na ativação de neutrófilos e consequentemente na indução de danos teciduais durante a malária.

ABSTRACT

The complexity of parasite-host interactions and the limited knowledge of the mechanisms by which *Plasmodium spp.* trigger innate immune cells are the main impediments in understanding the pathogenesis of malaria. Neutrophils are the most abundant leukocyte population in the bloodstream, a main site of *Plasmodium sp.* infection. Yet, the role of these polymorphonuclear cells in mediating either resistance or pathogenesis of malaria is poorly understood. Here, we report that malaria patients display higher levels of plasma cytokines and although we found an increased number of circulating neutrophils in malaria patients, they are not responsible for this elevated production. We show that monocytes are the primary source of cytokines during *P. vivax* infection. Besides that, we demonstrated that neutrophils from malaria patients are highly activated, as indicated by type I interferon transcription signature, increased expression of surface activation markers, myeloperoxidase and release of reactive oxygen species, as well as high frequency of low-density granulocytes subpopulation. In humans, the activation of neutrophils was associated with increased levels of serum alanine and aspartate aminotransferases that indicate liver damage. In a rodent malaria model, we observed an intense recruitment of neutrophils to liver sinusoids. Neutrophil migration, caspase-1 activation, IL-1β and chemokines expression as well as liver damage were all dependent on type I interferon signaling. Thus, type I interferon has pivotal role in neutrophil activation and malaria pathogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO PROPOSTO PARA INDUÇÃO DE FEBRE EM PACIENTES INFECTADOS COM MALÁRIA 17
FIGURA 2. SINALIZAÇÃO DA VIA DO INTERFERON DO TIPO I 24
FIGURA 3. MALÁRIA INDUZ ELEVADOS NÍVEIS DE TRANSAMINASES HEPÁTICAS E BILIRRUBINAS 47
FIGURA 4. PACIENTES INFECTADOS COM *P. VIVAX* APRESENTAM ELEVADOS NÍVEIS DE CITOCINAS 48
FIGURA 5 NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS ESTÃO AUMENTADOS DURANTE INFECÇÃO POR *P. VIVAX* 49
FIGURA 6 NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS ESTÃO ATIVADOS EM PACIENTES INFECTADOS COM *P. VIVAX* 51
FIGURA 7. PBMCS DE PACIENTES INFECTADOS COM *P. VIVAX* APRESENTAM UMA POPULAÇÃO DE LDGS 54
FIGURA 8. AVALIAÇÃO DA PUREZA DE NEUTRÓFILOS 55
FIGURA 9. AGONISTAS DE TLRS INDUZEM A PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM MONÓCITOS DE PACIENTES INFECTADOS COM *P. VIVAX*. MONÓCITOS 56
FIGURA 10. SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS APRESENTAM PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIADO 58
FIGURA 11. NEUTRÓFILOS APRESENTAM UMA ASSINATURA DE GENES ESTIMULADOS POR INTERFERON DURANTE A MALÁRIA. 61
FIGURA 12. EXPRESSÃO DE ISGS EM NEUTRÓFILOS CORRELACIONA COM OS NÍVEIS DE AST 62
FIGURA 13. NEUTRÓFILOS SÃO RECRUTADOS PARA O FÍGADO DURANTE A INFECÇÃO POR *P. CHABAUDI* 63
FIGURA 14. NEUTRÓFILOS INDUZEM DANO HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *P. CHABAUDI*. 65
FIGURA 15. A DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS AFETA O NÚMERO DE OUTROS LEUCÓCITOS NO FÍGADO DE ANIMAIS INFECTADOS COM *P. CHABAUDI*. 67
FIGURA 16. A SINALIZAÇÃO DE INTERFERON DO TIPO I REGULA O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO APÓS INFECÇÃO COM *P. CHABAUDI* 69
FIGURA 17. SINALIZAÇÃO DE IFN DO TIPO I INDUZ A EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS E IL-1B EM NO FÍGADO DE ANIMAIS INFECTADOS COM *P. CHABAUDI* 70
FIGURA 18. RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO E O DANO HEPÁTICO FORMADO APÓS INFECÇÃO COM *P. CHABAUDI* É DEPENDENTE DE CASPASE-1/11. 71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM *P. VIVAX* INCLUSOS NOS ESTUDOS.....97
TABELA 2. LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS 44
TABELA 3. VALORES DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MRNA DE GENES QUE FORAM EXPRESSOS POR NEUTRÓFILOS DURANTE INFECÇÃO POR *P. VIVAX*.....99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIM2: Ausente em melanoma do tipo 2
ALT: Alanina aminotransferase
AST: Aspartato aminotransferase
CBA: Cytometric bead array
dNTP: Dinucleotídeo trifosfato
DPI: Diphenyleneiodonium
HD: Healthy donors (controles saudáveis)
IFN: Interferon
IFNαβR: Receptor do interferon alfa e beta
ISGs: Interferon stimulated genes
LDGs: Low density granulocytes
MPO: Mieloperoxidase
NETs: Neutrophil extracelular traps
NFκB: Nuclear fator kappa
NLRP3: Receptor da família do tipo NOD contendo o domínio Pyrin 3
NLRP6: Receptor da família do tipo NOD contendo o domínio Pyrin 6
OMS: Organização mundial da saúde
PBMC: Peripheral blood mononuclear cells
PBS: Phosphate saline buffer
PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PMN: Polimorfonuclear
RIG-I: Receptor de dupla fita RNA induzido por ácido retinóico
ROS: Reactive oxygen species
SLE: Systemic lupus erythematosus
TLR: Toll like receptor
TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TNF-α: Tumor necrosis factor alpha

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 Malária 13
1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium spp.* 15
1.3 Imunidade inata e imunopatogênese na malária 16
1.4 Neutrófilos 19
1.5 Interferons 22
2 JUSTIFICATIVA 29
3 OBJETIVOS 31
3.1 Objetivo geral 31
3.2 Objetivos específicos 31
4 MATERIAL E MÉTODOS 32
4.1 Recrutamento dos participantes 32
4.2 Uso de animais e modelo murino de malária 33
4.3 Avaliação dos dados clínicos dos pacientes 33
4.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de células polimorfonucleares (PMN) 34
4.5 Enriquecimento de monócitos e neutrófilos 34
4.6 Separação de populações celulares de monócitos por citômetria de fluxo 36
4.7 Detecção de mRNA e análise de expressão gênica por nanostring (Nanostring Technologies) 37
4.8 Dosagem da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos 38
4.9 Estímulos com agonistas de TLRs 39
4.10 Dosagem de citocinas 39
4.11 Quantificação de neutrófilos em camundongos 40
4.12 Depleção de neutrófilos 41
4.13 Dosagem de ALT 41
4.14 Extração de RNA total do fígado por Trizol 42
4.15 Síntese de cDNA 43
4.16 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) 43
4.17 Análises estatísticas 45
5 RESULTADOS 46
5.1 Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes 46
***5.2* Malária induz altos níveis de citocinas 47**
5.3 Pacientes infectados com *P. vivax* apresentam um aumento da frequência e número absoluto de monócitos e neutrófilos 48
5.4 Monócitos e neutrófilos circulantes estão ativados durante a infecção com *P. vivax* 49
5.5 Pacientes com *P. vivax* apresentam uma população de neutrófilos de baixa densidade (LDGs) 52
5.6 Avaliação da pureza das células 55
5.7 Monócitos são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção com P. vivax 55

5.8 Neutrófilos apresentam uma assinatura de genes estimulados por interferon durante a infecção com *P. vivax* **59**
5.9 Neutrófilos são recrutados para o fígado após a infecção com *P. chabaudi* e são responsáveis pelo dano hepático observado nos animais **62**
5.10 A sinalização por IFN do tipo I regula o recrutamento de neutrófilos para o fígado **68**
5.11 Dano hepático e recrutamento de neutrófilos para o fígado durante a infecção com *P. chabaudi* é dependente de Caspase-1 ..... **70**
6 DISCUSSAO **72**
7 CONCLUSÕES **80**
Referências Bibliográficas **81**
ANEXOS **97**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária ainda é considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo se tornando um grande obstáculo de desenvolvimento econômico. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas residem em áreas nas quais a doença é considerada endêmica e cerca de 200 milhões de casos ocorreram em 2013 levando a uma estimativa de 584.000 mortes, sendo 78% delas de crianças abaixo dos cinco anos de idade. O continente africano é responsável por cerca de 90% dos casos, enquanto os outros 10% são distribuídos no sudeste asiático, Oceania e América Latina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

No Brasil, cerca de 500 mil casos são relatados por ano sendo que 99% destes se concentram na região da Amazônia Legal que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do estado do Maranhão onde condições socioeconômicas e ambientais favorecem a exposição de grandes contingentes populacionais ao risco de infecção. O aumento da doença ocorreu em função do crescimento da imigração e a colonização da floresta Amazônica. Nas décadas de 70 e 80, o desenvolvimento intensificado da Amazônia acelerou os processos migratórios, atraindo moradores de outras regiões do país, graças aos projetos de colonização e expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, projetos agropecuários, extração da madeira e mineração (KATSURAGAWA et al., 2010; SAWYER, 1986).

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* em diferentes hospedeiros vertebrados, sendo que somente cinco espécies são capazes de infectar os homens: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* (GARNHAM, P. C. C., 1966) e mais recentemente o *P. knowlesi* foi encontrado em humanos no sudeste asiático (SINGH et al., 2004). O *P. falciparum* é a espécie mais estudada uma vez que é o principal responsável pelo número de casos e mortes na África.

No Brasil, as infecções por *P. vivax* representam mais de 90% dos casos e, apesar de serem consideradas mais brandas que a *P. falciparum*, relatos de malária grave causada por *P. vivax* estão sendo caracterizados e descritos na região (ALEXANDRE et al., 2010; ANDRADE et al., 2010; COSTA et al., 2012). A predominância dos casos de malária vivax no Brasil ocorreu devido a uma intensificação do controle a partir da década de 90 através do diagnóstico rápido, seguido do tratamento (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Essa metodologia permitiu eliminar de forma mais eficiente os gametócitos do *P. falciparum* uma vez que eles aparecem na circulação do hospedeiro vertebrado somente 8-10 dias após a infecção. Entretanto, os gametócitos do *P. vivax*, estão presentes na corrente sanguínea por volta do terceiro dia após a infecção quando o hospedeiro ainda não apresenta nenhum sintoma da doença (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011). Assim, possibilita a infecção de novos mosquitos mesmo antes do diagnóstico do indivíduo dificultando o controle dessa doença.

Diferentes espécies foram descritas como capazes de infectar camundongos, embora difiram entre si considerando-se algumas características. Devido a limitações nos estudos em humanos e nos ensaios *in vitro*, o uso de modelos experimentais de infecção se tornam de extrema importância. A possibilidade de utilização de animais *knockouts* para determinados genes permite a avaliação de diferentes aspectos imunológicos na resposta durante a infecção. Além disso, os modelos murinos permitem a investigação da progressão da doença e o estudo de órgãos como o baço, cérebro, pulmão, fígado, entre outros. Existem quatro espécies de *Plasmodium spp.* que são capazes de infectar camundongos (*P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. yoelli* e *P. vinckei*) e cada uma delas possuem diferentes cepas com biologia do parasito e patogenicidade distintas. A utilização de diferentes linhagens de camundongos e de parasitos auxiliou na identificação de mecanismos de susceptibilidade e resistência durante a infecção e de como o parasito induz a malária (WYKES; GOOD, 2009; ZUZARTE-LUÍS; MOTA; VIGARIO, 2014).

O *P. chabaudi chabaudi* AS é um parasito não letal que infecta tanto reticulócitos quanto hemácias sendo portanto considerado similar a infecções com *P. vivax* e *P. falciparum*, uma vez que a maioria dos casos em humanos não são graves. O *P. chabaudi* AS tem a capacidade de infectar hemácias e induzir a adesão ao endotélio vascular porém é importante salientar que neste modelo não ocorre o sequestro de hemácias infectadas para o cérebro (STEPHENS; CULLETON; LAMB, 2012). A adesão ocorre predominantemente no fígado, apesar de que estudos utilizando animais deficientes para interleucina-10 (IL-10), demonstraram que a infecção com *P. chabaudi* induziu uma hemorragia e um edema cerebral nesses animais (SANNI et al., 2004). O sequestro endotelial das hemácias infectadas ocorre através da ligação a receptores endoteliais do hospedeiro como o CD36 tanto em *P. falciparum* quanto em *P. chabaudi* assim como a ligação a moléculas de adesão vasculares como o ICAM1 e VCAM1 (HEDDINI et al., 2001; MOTA et al., 2000). Outra característica semelhante ao *P. falciparum* é a capacidade de indução de anemia nos camundongos através do rompimento da hemácias infectadas, supressão da eritropoiese e remoção de hemácias não infectadas por fagocitose sugerindo que este parasito é um bom modelo para o estudo dos mecanismos de indução de anemia durante a malária (LAMIKANRA et al., 2007). Por fim, a indução da resposta imune por *P. chabaudi* possui características semelhantes a da resposta ao *P. falciparum* (STEPHENS; CULLETON; LAMB, 2012).

1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium spp.*

Os parasitos possuem um ciclo heteroxênico necessitando obrigatoriamente de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. A fase assexuada ocorre nos hospedeiros vertebrados enquanto a reprodução sexuada ocorre nos hospedeiros invertebrados. Ao longo do desenvolvimento do parasito são encontradas uma multiplicidade de formas altamente especializadas e morfologicamente distintas, que se alternam entre formas invasoras e replicativas (HALL et al., 2005).

Durante o repasto sanguíneo, fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* inoculam esporozoítos do *Plasmodium spp.* na derme dos hospedeiros vertebrados. Em seguida, os esporozoítos atingem a corrente sanguínea e alcançam o fígado aonde infectam os hepatócitos e se multiplicam de forma assexuada produzindo milhares de merozoítos. O parasito evade o fígado de forma indetectável se recobrindo com restos da membrana celular das células hospedeiras (STURM et al., 2006). Após a ruptura das células hospedeiras, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e invadem as hemácias dando início à fase eritrocítica da doença (COWMAN; BERRY; BAUM, 2012). Uma vez dentro da hemácia, o parasito se multiplica de forma assexuada e periódica, rompendo as células e infectando novas. Os ciclos de febre coincidem com o rompimento de hemácias e a liberação de um grande número de merozoítos na circulação do hospedeiro. Alguns merozoítos passam por um desenvolvimento diferencial se transformando nas formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, que serão transmitidos durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos mosquitos, iniciando a fase sexuada do ciclo no hospedeiro invertebrado.

1.3 Imunidade inata e imunopatogênese na malária

A malária apresenta um paroxismo febril acompanhado de calafrios e sudorese bem característicos que coincidem com a liberação de merozoítos na corrente sanguínea após a ruptura das hemácias (ANSTEY et al., 2009; MILLER et al., 2013). Esses sintomas são característicos de uma resposta inflamatória com a liberação de citocinas altamente pirogênicas principalmente fator de necrose tumoral (TNF-α), IL-6 e IL-1β. Estes pirógenos podem circular na corrente sanguínea e atravessar a barreira hematoencefálica atuando no hipotálamo, órgão responsável pela termorregulação aumentando a temperatura corporal. Esses pirógenos podem atuar no hipotálamo por outra via através da condução de impulsos nervosos começando pelo nervo vago (**Figura 1**) (OAKLEY et al., 2011).

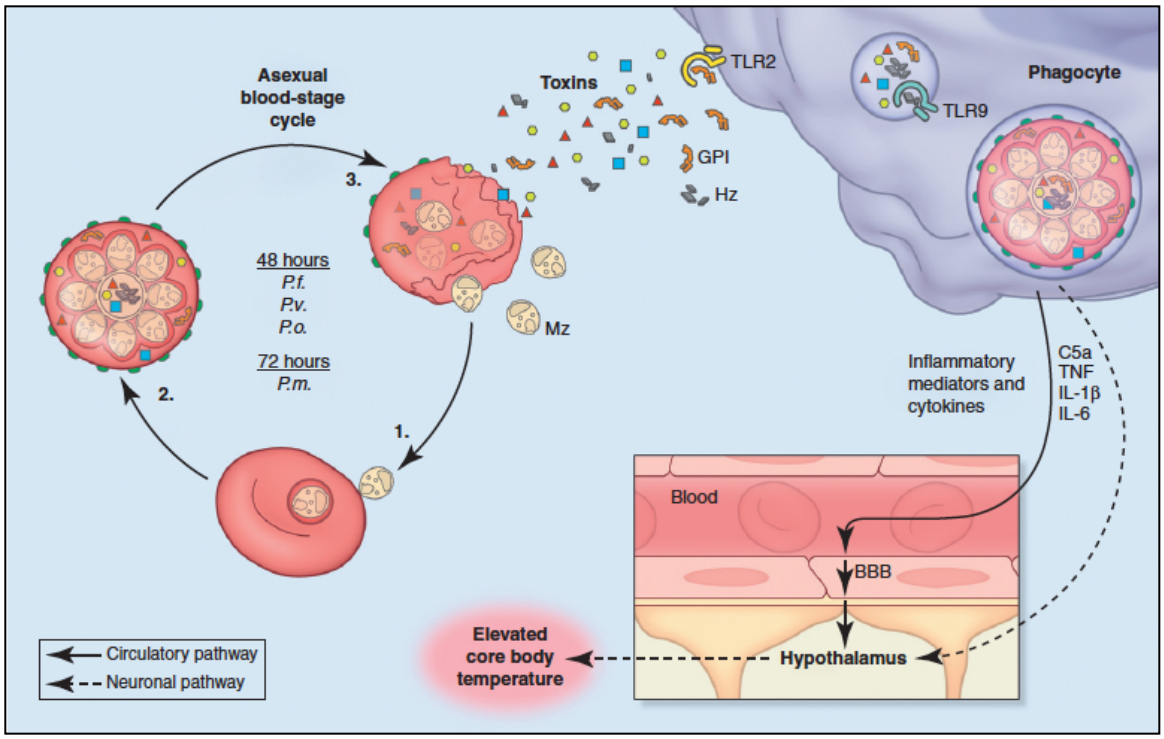


Figura 1. Modelo proposto para indução de febre em pacientes infectados com malária. Durante o ciclo eritrocítico da doença merozoítos (Mz) infectam hemácias (1) aonde se replicam assexuadamente (2) levando ao rompimento destas com liberação de toxinas derivadas dos parasitos além de novos merozoítos que irão infectar novas hemácias (3). Dentre as toxinas liberadas as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) irão se ligar a receptores do tipo Toll 2 (TLR2) enquanto cristais de hemozoína (Hz) se ligarão ao TLR9 nos endossomos dos fagócitos. Essas células ativadas produzirão citocinas pró inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IL-6 além de outros pirógenos como fator do completo C5a. Estes pirógenos induzirão regiões termorreguladoras do hipotálamo para aumentar a temperatura corporal (OAKLEY et al., 2011).

A produção exacerbada destas citocinas pró-inflamatórias tem sido demonstrada durante a malária (CLARK et al., 2006; WALTHER et al., 2006) e vários estudos relatam que polimorfismos nos genes que codificam para estas citocinas estão associados à gravidade da infecção (AIDOO et al., 2001; CLARK et al., 2009; HANANANTACHAI et al., 2007). Essa liberação exagerada de mediadores pró-inflamatórios pode ocasionar danos teciduais e consequentemente contribuir para a patogênese da doença.

Estas citocinas são produzidas por células da imunidade inata do hospedeiro, tais como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killers* (NK). A ativação dessas células pode ocorrer por meio do reconhecimento de padrões moleculares por receptores do tipo *Toll* (TLRs)

(GAZZINELLI et al., 2014). Por exemplo, moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), encontradas em *P. falciparum*, ativam TLR2 e em menor intensidade TLR4 levando a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IL-12 além de óxido nítrico (NO) em macrófagos (KRISHNEGOWDA et al., 2005; ZHU et al., 2011).

Por sua vez, extratos solúveis de esquizontes purificados da cultura de *P. falciparum* foram capazes de ativar células dendríticas plasmacitóides (pDCs) e induzir a produção de interferon alfa (IFN-α) através do TLR9. Essas pDCs também promovem a proliferação de células T gama delta (Tγδ) e a produção de IFN gama (IFN-γ) (PICHYANGKUL et al., 2004).

A fim de evitar um dano oxidativo por resíduos formados após o rompimento das hemácias, o parasito converte o grupamento heme em um cristal insolúvel, a hemozoína. Este cristal é capaz de transportar o DNA do parasito para o endossomo aonde o mesmo se ligará ao TLR9 e ativará a produção de citocinas pró- inflamatórias (PARROCHE et al., 2007). O cristal de hemozoína sintético também é capaz de induzir a formação de inflamassomos, ativação de caspase-1 e produção de IL-1β em macrófagos murinos (DOSTERT et al., 2009; SHIO et al., 2009).

Nosso grupo demonstrou previamente que ao bloquear a ativação de TLR9 utilizando-se um antagonista, ocorreu uma diminuição significativa na produção de citocinas inflamatórias em camundongos infectados pelo *P. berghei,* evitando assim o desenvolvimento de sintomas de malária cerebral nesses animais (FRANKLIN et al., 2011).

Em relação à imunopatogênse da doença, é importante ressaltar que os sinais e sintomas da malária ocorrem durante a fase eritrocítica da mesma. Outro aspecto relevante da patogênese da malária são as complicações observadas no fígado que se associam com elevados níveis de bilirrubina (KOCHAR et al., 2010; WHITTEN et al., 2011). Foi encontrado em pacientes infectados com *P. falciparum* uma correlação entre o número de hemácias infectadas sequestradas no fígado com elevados níveis séricos de bilirrubina e aspartato aminotransferase (AST). Outros trabalhos demonstraram a

importância deste órgão tanto para o acúmulo de hemácias infectadas quanto para eliminação do parasito da circulação (KRÜCKEN et al., 2009; MURTHI et al., 2006). Durante a infecção, ocorre um aumento do número de células de kuppfer e um significativo aumento da capacidade fagocítica destas contribuindo para a eliminação do parasito da circulação (MURTHI et al., 2006). Como resultado do acúmulo do parasito nos sinusóides do fígado, vários leucócitos são recrutados para o órgão contribuindo para a lesão tecidual (DEY et al., 2012; HAQUE et al., 2011a).

1.4 Neutrófilos

Outras células da imunidade inata que participam no combate ao parasito da malária são os neutrófilos, leucócitos polimorfonucleares (PMNs) produzidos na medula óssea. Morfologicamente, os neutrófilos possuem núcleo multi-lobulado e apresentam grânulos contendo peptídeos antimicrobianos e outras proteínas. Esses grânulos são classificados em primários ou azurofílicos, secundários ou específicos, terciários e vesículas secretoras (AMULIC et al., 2012).

É válido salientar que camundongos e humanos diferem na quantidade de neutrófilos presentes na corrente sanguínea. Em humanos, os neutrófilos constituem cerca de 50 a 70% dos leucócitos circulantes enquanto em camundongo esses números reduzem para 10-20% (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Os neutrófilos são células efetoras da imunidade inata que formam a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogênicos. São prontamente recrutados para o sítio de infecção e exercem sua atividade microbicida por meio da fagocitose, liberação de grânulos que contém proteínas líticas, produção de reativos intermediários do oxigênio e, através da formação de redes extracelulares de DNA (NETs) (AMULIC et al., 2012; BORREGAARD, 2010; BRINKMANN et al., 2004; MANTOVANI et al., 2011; NATHAN, 2006).

A fagocitose é um processo ativo no qual um microorganismo é internalizado via receptores para o citoplasma celular em um vacúolo, o

fagossomo. Em neutrófilos esses fagossomos se fundem com os grânulos liberando os peptídeos antimicrobianos que irão atuar contra os patógenos. Simultaneamente ocorre a montagem das subunidades da enzima NADPH oxidase na membrana dos fagossomos levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses dois produtos criam um ambiente tóxico para a maioria dos patógenos (AMULIC et al., 2012; LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003).

Os grânulos dos neutrófilos podem se fundir com os fagossomos como descrito anteriormente e com a membrana plasmática liberando os seus conteúdos antimicrobianos nos tecidos. Esse processo pode causar danos nos tecidos. Algumas proteínas presentes nesses grânulos quando liberadas podem recrutar monócitos assim como aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos (BROGDEN, 2005).

Após ativação os neutrófilos produzem ROS em um processo denominado explosão respiratória. O complexo enzimático do NADPH oxidase se forma na membrana plasmática e na membrana do fagossomo dando início a cascata que reduz o oxigênio molecular a superóxido. Este pode levar a formação de peróxido de hidrogênio, pode formar peroxinitrito em uma reação com óxido nítrico e produzir outras espécies reativas quando em contato com mieloperoxidase (MPO) liberada dos grânulos dos neutrófilos (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; WINTERBOURN, 2008).

Em 2004, foi descrito um novo mecanismo de eliminação de patógenos executado por essas células. A formação de redes extracelulares de DNA (NETs) por neutrófilos que consiste na liberação de conteúdo nuclear e citoplasmático no espaço extracelular foi capaz de imobilizar e matar bactérias Gram negativas e Gram positivas (BRINKMANN et al., 2004). Essas NETs são compostas principalmente por histonas e DNA além de proteínas presentes em grânulos como mieloperoxidase (MPO), elastase (NE), catepsina G entre outras (BRINKMANN et al., 2004; JAILLON et al., 2007; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010; URBAN et al., 2009). Além de bactérias, já foi demonstrado que fungos (BRUNS et al., 2010), protozoários (ABI ABDALLAH et al., 2012; BAKER et al.,

2008; GABRIEL et al., 2010; GUIMARAES-COSTA et al., 2009) e até mesmo vírus (NARASARAJU et al., 2011; SAITOH et al., 2012) são capazes de induzir a formação de NETs.

Além de participarem diretamente da eliminação dos patógenos, os neutrófilos podem interagir e até mesmo regular diversas funções do sistema imune, tanto inato quanto adaptativo. Os neutrófilos produzem uma ampla variedade de citocinas, quimiocinas e outras proteínas capazes de recrutar, ativar, e estimular a produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas (DCs) (MANTOVANI et al., 2011).

A interação com as células dendríticas foi confirmada quando sobrenadantes de cultura de neutrófilos de camundongos estimulados com *Toxoplasma gondii* induziu *in vitro* a maturação das DCs provenientes da medula óssea e a produção de IL-12 e TNF-α (BENNOUNA; DENKERS, 2005). Neutrófilos humanos foram capazes de induzir a maturação de DCs derivados de monócitos através de contato direto envolvendo as moléculas *Cluster of differentiation 18 (*CD18) e molécula de adesão celular 1 relacionada a antígeno carcinoembrionico (CEACAM1) em neutrófilos e molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 (DC-SIGN) em DCs derivadas de monócitos. Assim, estas células induzem a proliferação de células T e a polarização para resposta Th1 (MEGIOVANNI et al., 2006; VAN GISBERGEN et al., 2005).

Os neutrófilos também podem interagir com macrófagos como demonstrado em um modelo de infecção helmíntica. Foi observado que os neutrófilos de camundongos previamente infectados foram capazes de promover a polarização de macrófagos para um perfil Th2 mediando a eliminação do patógeno (CHEN et al., 2014). Outro trabalho observou que grânulos secretados por neutrófilos aumentam a capacidade fagocítica de macrófagos (SOEHNLEIN et al., 2008). Além destas, os neutrófilos também interagem com células NK (COSTANTINI; CASSATELLA, 2011; COSTANTINI et al., 2011), células B (PUGA et al., 2012) células T (PILLAY et al., 2012; TILLACK et al., 2012) e plaquetas (SREERAMKUMAR et al., 2014).

Apesar da vasta literatura sobre neutrófilos e patógenos, pouco se sabe sobre as funções destes durante a malária. A ausência destas células em camundongos infectados com *P. berghei* ANKA preveniu a morte dos mesmos por malária cerebral e reduziu o sequestramento de monócitos para os vasos sanguíneos no cérebro diminuindo a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias nesse tecido (CHEN; ZHANG; SENDO, 2000). Além disso, foi demonstrado que a infecção por *P. berghei* induziu a expressão de um receptor de alta afinidade para imunoglobulina E (IgE) em neutrófilos que migraram para o cérebro induzindo um aumento de citocinas pró-inflamatórias. A depleção especifica destas células protegeu os animais da malária cerebral (PORCHERIE et al., 2011).

Uma subpopulação de neutrófilos foi identificada nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes com Lúpus eritematoso (SLE) e artrite reumatoide após a separação por gradiente de Ficoll Hypaque (HACBARTH; KAJDACSY-BALLA, 1986). Estas células foram denominadas granulócitos de baixa densidade (LDGs) devido às diferenças de densidades entre as subpopulações. Mais recentemente, essas LDGs foram descritas em outras doenças como câncer (BRANDAU et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2009), HIV (CLOKE et al., 2012) e psoríase (LIN et al., 2011). Os LDGs encontrados nos pacientes com SLE apresentaram um fenótipo ativado com uma produção de citocinas pró-inflamatórias além de uma assinatura de genes estimulados por interferon, entretanto uma redução na capacidade fagocítica destas células foi observada (DENNY et al., 2010). Em pacientes com diferentes tipos de câncer os LDGs apresentaram um perfil de inibição da proliferação e produção de IFN-γ de células T, além de uma deficiência na capacidade de migração (BRANDAU et al., 2011).

1.5 Interferons

Os interferons (IFNs) foram descobertos a mais de 50 anos e descritos como fatores que interferem em infecções virais (ISAACS; LINDENMANN, 1957). Nos dias atuais sabe-se que os interferons são citocinas com papel importante na

modulação da resposta imune inata contra diversos patógenos principalmente os virais. Existem três classes de interferons classificados de acordo com os receptores que eles utilizam durante a sinalização celular: interferon do tipo I, do tipo II e do tipo III (MCNAB et al., 2015).

Entre os interferons do tipo I estão as citocinas IFN-α e IFN-β. O IFN-α consiste em 13 subtipos enquanto o IFNβ é produzido por um único gene. Os genes que codificam para IFN do tipo I estão agrupados no cromossomo 9 em humanos e no cromossomo 4 em camundongos (CHEN; BAIG; FISH, 2004; SADLER; WILLIAMS, 2008). Os IFNs do tipo I se ligam a um receptor comum de superfície celular (IFNAR) que consiste em duas subunidades, o IFNAR1 e IFNAR2.

A produção de IFN do tipo I é desencadeada após o reconhecimento dos produtos virais e/ou bacterianos por receptores específicos, entre eles estão os receptores do tipo *Toll*, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, que em geral reconhecem o ácido nucleico viral e o TLR4 que reconhece lipopolissacarídeos (LPS). Este reconhecimento também é efetuado por receptores presentes no citoplasma como o receptor de dupla fita RNA induzido por ácido retinóico (RIG-I) e o receptor estimulador de genes do IFN (STING) entre outros (ISHIKAWA; MA; BARBER, 2009; STETSON; MEDZHITOV, 2006). Em seguida, inicia-se uma cascata de sinalização que levará a produção de IFNs do tipo I. Após a secreção dessas citocinas pela célula, estas se ligam ao seu receptor específico (IFNAR) de forma parácrina ou autócrina e induzem uma cascata de sinalização intracelular que culmina na transcrição dos genes estimulados por IFN (ISGs) (Figura 2) (BORDEN et al., 2007; SADLER; WILLIAMS, 2008; STARK, 2007). Estes genes, por sua vez, estão envolvidos na produção de proteínas relacionadas com a resposta antiviral, antibacteriana, apoptose e produção de proteínas pró e anti-inflamatórias (GONZÁLEZ-NAVAJAS et al., 2012; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2003).

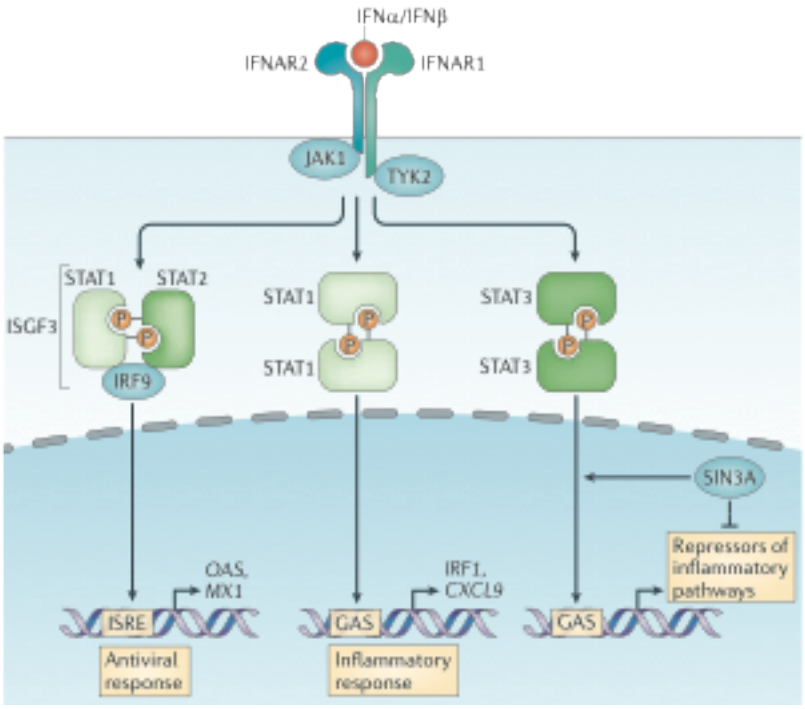


Figura 2. Sinalização da via do interferon do tipo I. A ligação do IFN do tipo I no seu receptor, IFNAR (composto pelas subunidades IFNAR1 e IFNAR2), ativa as proteínas Janus quinase 1 (JAK1) e tirosina quinase 2 (TYK2) que irão fosforilar o receptor e induzir o recrutamento e ativação de transdutores e ativadores transcricionais (STAT1, STAT2 e STAT3) que também serão fosforilados e sofrerão dimerização e translocação nuclear. A dimerização de STAT1 e STAT2 recruta o fator de regulação de IFN 9 (IRF9) que forma o complexo ISGF3. STAT1 tambem pode sofrer uma homodimerização assim como STAT3. Os três complexos STAT que são formados em resposta ao IFN do tipo I controlam programas de expressão genica distintos através da ligação a diferentes regiões promotoras como o elemento responsivo à estimulação por IFN (ISRE) que induzem uma resposta antiviral ou sequencias ativadoras de interferon gamma (GAS) que levam a uma resposta pró-inflamatória **(IVASHKIV; DONLIN, 2014)**.

Várias células são capazes de produzir IFN do tipo I quando estimuladas com patógenos ou produtos microbianos. Nas células relacionadas à imunidade, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK e linfócitos já foram descritas produzindo essas citocinas (BOGDAN; MATTNER; SCHLEICHER, 2004; CONTA; POWELL; RUDDLE, 1983; ELORANTA et al., 1997; PETER et al., 1980; SHIRAFUJI et al., 1990). As células dendríticas plasmacitóides (pDCs) são as principais produtoras desses IFNs quando estimuladas com vírus ou oligodeoxinucleotideos CpG (ASSELIN-PATUREL et al., 2001).

Como dito anteriormente, os IFNs do tipo I são produzidos principalmente em resposta a infecções virais, porém já existem relatos na literatura da

produção dessas citocinas quando em contato com protozoários como *Trypanossoma spp.* (CHESSLER et al., 2009), *Leishmania spp.* (DIEFENBACH et al., 1998; XIN et al., 2010) e *Toxoplasma spp.* (KOBLANSKY et al., 2013; SHIRAHATA et al., 1986). Na malária, a produção de IFN do tipo I por macrófagos murinos ocorre quando estes são estimulados com hemácias infectadas ou oligonucleotideos contendo um motivo com repetições ricas em AT desenhados a partir do genoma de *P. falciparum* (SHARMA et al., 2011) e por pDCs humanos quando entram em contato com extratos solúveis de esquizontes purificados (PICHYANGKUL et al., 2004).

Além da produção por vários tipos celulares, o IFN do tipo I pode atuar através de diferentes mecanismos em células do sistema imune inato como macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos (SALAZAR-MATHER; LEWIS; BIRON, 2002; SEO et al., 2011; SIMMONS et al., 2012; SWIECKI et al., 2011). O papel protetor ou de patogênese vai variar dependendo do modelo de infecção do estudo assim como de outros parâmetros como a quantidade de citocina produzida.

Na malária esse papel duplo do IFN do tipo I pode ocorrer devido as diferentes espécies utilizadas nos estudos assim como os diferentes estágios de infecção analisados. Estudos utilizando *P. berghei* mostraram que IFN do tipo I aumentam a infecção inibindo células T $CD4^+$ (HAQUE et al., 2011b). Posteriormente esse mesmo grupo demonstrou que esta inibição ocorre pela supressão de células dendríticas que apresentam uma redução na capacidade de apresentar antígenos para as células T CD4+ e consequentemente uma diminuição na produção de IFN-γ (HAQUE et al., 2014).

Outro trabalho utilizou um animal deficiente para IFNAR e o *P. berghei* como modelo de infecção. Os autores observaram que estes animais não morriam de malária cerebral enquanto os animais selvagens infectados morriam entre 8 a 12 dias sugerindo um papel do IFN do tipo I na patogênese da malária cerebral (PALOMO et al., 2013). Entretanto, estudos utilizando outro modelo, o *P. yoelli,* demonstraram um papel protetor destas citocinas possivelmente através da

inibição da produção de reticulócitos uma vez que esta espécie de *Plasmodium* infecta preferencialmente estas células (VIGÁRIO et al., 2001).

Além disso, a administração de IFN do tipo I recombinante protegeu animais infectados com *P. berghei* de malária cerebral através de diferentes mecanismos, como a redução do número de parasito no sangue e da expressão da molécula de adesão ICAM1 nas células endoteliais do cérebro e consequentemente diminuição do sequestro de parasitos neste órgão (VIGÁRIO et al., 2007).

É importante destacar que todos estes estudos citados acima trabalham com o estagio eritrocítico da infecção. Com relação ao estagio pré-eritrocítico, um trabalho recente demonstrou que *P. berghei* induz uma resposta a IFN do tipo I no fígado, a qual recrutará leucócitos conferindo uma proteção contra o *Plasmodium spp.* (LIEHL et al., 2014). Outros autores observaram o mesmo perfil e caracterizaram o recrutamento de células T *natural killer* (NKT) para o fígado mediados por IFN do tipo I (MILLER et al., 2014).

O IFN do tipo II consiste apenas de uma família, a citocina IFN-γ. O gene que codifica essa proteína está localizado no cromossomo 12 em humanos e no cromossomo 10 em camundongos. O IFN-γ se liga a um receptor de superfície celular para interferon do tipo II (IFNGR) e apresenta funções diferentes dos IFNs do tipo I apesar de também atuar contra infecções virais (PLATANIAS, 2005).

As principais células produtoras de IFN-γ são as células NK, T $CD4^+$ e T $CD8^+$, porém outras células como células B, células NKT, macrófagos e células dendríticas também são capazes de produzirem esse IFN (CARNAUD et al., 1999; FLAISHON et al., 2000; GESSANI; BELARDELLI, 1998; SCHRODER et al., 2004).

A citocina IFN-γ é conhecida pela sua importância nas respostas Th1 em infecções com patógenos intracelulares, doenças autoimunes e em respostas antitumorais. Essa citocina tem a capacidade de estimular as células e assim aumentar a resposta a um determinado patógeno. Outras funções importantes são de ativar a capacidade microbicida e aumentar a capacidade fagocítica em

macrófagos e neutrófilos além de participar no recrutamento de outras células para os sítios inflamatórios através do aumento da expressão gênica de moléculas de adesão e de quimiocinas (BOEHM et al., 1997; DECKER et al., 2002).

Durante infecção pelo *P. falciparum*, as células NK são as principais produtoras de IFN-γ durante os estágios inicias da infecção. A partir de 24 horas, as células T assumem o papel de produção de IFN-γ (HOROWITZ et al., 2010). Nosso grupo mostrou a importância dessa citocina durante o modelo murino de malária. Camundongos previamente infectados com *P. chabaudi* apresentaram um aumento de resposta quando estimulados com diversos ligantes de TLR. Porém camundongos *knockouts* para IFN-γ não apresentaram esse aumento de resposta e assim foram protegidos, sugerindo que IFN-γ produzido após contato com o parasito estimula as células para outras infecções (FRANKLIN et al., 2009).

IFNs do tipo I e do tipo II não apresentam homologias estruturais porém eles possuem similaridades em suas funções devido a indução de vários genes em comum. Trabalhos utilizando micro arranjos de oligonucleotídeos identificaram diversos genes estimulados por interferons (ISGs), alguns deles induzidos somente por IFN do tipo I ou do tipo II e outros induzidos por ambos (SANDA et al., 2006). Dentre esses genes, estão genes envolvidos na resposta imune como citocinas, quimiocinas, receptores de ácidos nucleicos citoplasmáticos e receptores do tipo *Toll* (SANDA et al., 2006).

Outro trabalho mostrou que IFN do tipo I pode controlar IFN do tipo II. Pacientes infectados com *Mycobacterium leprae* apresentam um perfil de expressão de genes estimulados por IFN do tipo I que levou a uma inibição da indução de peptídeos antimicrobianos produzidos por IFN-γ. Essa inibição é mediada por IL-10 (TELES et al., 2013).

Por último, foi descrito uma terceira classe de interferons denominada de interferon do tipo III. Consistem em 3 citocinas, IFNλ1, IFNλ2 e IFNλ3 também conhecidas como interleucina 29 (IL29), IL28A e IL28B, respectivamente. Esses

IFNs do tipo III possuem funções anti-virais porém se ligam a um receptor diferente dos outros interferons (KOTENKO et al., 2003).

2 JUSTIFICATIVA

A imunidade inata possui um papel importante na defesa contra o *Plasmodium spp.* sendo capaz de impedir a proliferação do parasito. Entretanto, uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias pode ocasionar danos a tecidos dos hospedeiros, assim como os sintomas detectados no percurso da doença (LANGHORNE et al., 2008). Sabe-se que a infecção por *P. falciparum* é a responsável pela maioria das mortes e de formas graves da doença, porém diferentes estudos vem demonstrando que o *P. vivax* pode causar complicações clinicas e até mesmo levar a morte assim como *P. falciparum* (ALEXANDRE et al., 2010; LACERDA et al., 2012; TJITRA et al., 2008). Uma das principais manifestações clinicas da malária é o dano hepático observado através do aumento de enzimas hepáticas no soro dos pacientes. Essa lesão em alguns casos pode se complicar levando os pacientes à internação geralmente quando associadas com elevação dos níveis de bilirrubina (KOCHAR et al., 2010; WHITTEN et al., 2011). Entretanto, os mecanismos que causam este dano hepático ainda não estão totalmente elucidados.

Os neutrófilos são uma destas células efetoras da imunidade inata capazes de eliminar principalmente patógenos microbianos através de diferentes mecanismos (MANTOVANI et al., 2011). Além disso, neutrófilos são mediadores centrais na resposta inflamatória podendo ocasionar danos teciduais. Entretanto, o papel dos neutrófilos na resistência ao hospedeiro e na patogênese da malária foi pouco estudado.

Os interferons do tipo I estão sendo produzidos durante a malária e PBMCs de pacientes infectados com *P. falciparum* possuem um aumento na indução de ISGs (SHARMA et al., 2011). Pacientes com polimorfismos para o gene do receptor de IFN do tipo I apresentaram uma proteção para o aparecimento de malária grave (AUCAN et al., 2003). Entretanto, o papel da regulação de IFN do tipo I em neutrófilos durante a malária não foi descrito na literatura até o momento.

Portanto este trabalho visa investigar a importância de IFN do tipo I em orquestrar a ativação de neutrófilos e suas funções durante a malária além de

avaliar o mecanismo de indução do dano hepático por estas células. O conhecimento desse mecanismo no fígado pode então ser extrapolado para outros órgãos como o pulmão e os rins que são conhecidos como importantes em casos de malária grave.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do IFN do tipo I na regulação de neutrófilos durante a infecção por malária

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a ativação e a produção de citocinas entre neutrófilos e monócitos purificados de pacientes infectados por *P. vivax*;
- Caracterizar as funções de neutrófilos durante a infecção por *P. vivax*;
- Analisar o perfil fenotípico de neutrófilos de baixa densidade encontrados em PBMC de pacientes infectados com *P. vivax*;
- Analisar o perfil de expressão gênica em neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax*;
- Determinar os mecanismos utilizado pelo IFN do tipo I para ativar os neutrófilos;
- Avaliar o recrutamento de neutrófilos para o fígado durante infecção com *P. chabaudi*;
- Determinar a importância de neutrófilos para o aparecimento de dano hepático.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Recrutamento dos participantes

Todos os pacientes inclusos no trabalho foram selecionados em colaboração com o grupo de pesquisadores e médicos do IPEPATRO (Instituto de Pesquisas em Doenças Tropicais), CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical) e CEMETRON (Centro de Medicina Tropical de Rondônia) em Porto Velho, Rondônia. Após a confirmação do resultado positivo para malária através da gota espessa, os pacientes foram entrevistados e convidados a participarem dos estudos. Os pacientes que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa foram informados sobre a possibilidade de se retirarem do estudo quando assim o desejassem, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico e tratamento terapêutico. O tratamento foi realizado com os medicamentos e dosagens preconizadas pelo Ministério da Saúde: três dias de cloroquina, sendo quatro comprimidos no primeiro dia e três comprimidos no segundo e terceiro dias, além de dois comprimidos de primaquina por sete dias.

Amostras de sangue periférico foram coletadas de pacientes residentes em área endêmica, em fase aguda da infecção por *P. vivax*. Foram incluídos no estudo indivíduos adultos (idade > 18 anos), que não apresentavam nenhuma outra infecção aguda ou crônica ou gravidez, e não estavam em tratamento com drogas imunossupressoras. Além disso, somente foram selecionados os pacientes com febre (temperatura maior que 38^{o}C) e/ou calafrios pelo menos nas últimas 24 horas antes da consulta. Indivíduos apresentando co-infecção com outras espécies do plasmódio foram excluídos do trabalho (Anexo 1-Tabela 1). Após 30-45 dias do início do tratamento, os indivíduos retornavam ao CEPEM para uma reavaliação clínica e uma segunda coleta de sangue. Sangue periférico também foi coletado de indivíduos saudáveis (HDs) residentes da área endêmica e comprovadamente negativos para malária através de avaliação da gota espessa. Esses controles também assinaram os termos de consentimento.

Todos os procedimentos e termos de consentimentos foram aprovados pelo comitê de ética do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical (CEP-CEPEM 096/09), pelo comitê de ética nacional (CONEP 15653) e pelo comitê de

ética da Universidade de Massachusetts Medical School (IRB-ID11116_1).

4.2 Uso de animais e modelo murino de malária

Camundongos C57BL/6, 129/Sv, IFNαβR$^{-/-}$ e Casp1/11$^{-/-}$ foram mantidos sob condições livre de patógenos no biotério de experimentação do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG e também no biotério da Escola de Medicina da Universidade de Massachusetts. Para cada experimento a idade dos animais utilizados foi entre 8-12 semanas. Todos os experimentos envolvendo animais foram de acordo com as diretrizes da *American Association for Laboratory Animal Science* (AALAS). Todos os protocolos utilizados nesse trabalho foram aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) da Universidade de Massachusetts Medical School (ID – 1369-11) e pelo comitê de ética no uso de animais do Centro de Pesquisas Rene Rachou (61/13-2).

A espécie de *Plasmodium* utilizada nos experimentos foi o *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS, que é um modelo não letal de malária. Esta cepa é mantida em animais selvagens C57BL/6 através de passagens semanais e a cada 12 passagens consecutivas, uma nova alíquota era descongelada. Os animais utilizados nos experimentos foram inoculados via intraperitoneal com 10^5 hemácias infectadas (STEVENSON; TAM; NOWOTARSKI, 1990). A parasitemia dos animais infectados era avaliada a partir do terceiro dia.

4.3 Avaliação dos dados clínicos dos pacientes

A avaliação de parâmetros hematológicos foi realizada nos pacientes infectados com *P. vivax* e 30-45 dias após o tratamento. Amostras de sangue periférico foram coletados em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para análises do numero de hemácias, plaquetas e leucócitos e dos níveis de hemoglobina. Já para a determinação dos níveis de bilirrubina, aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT respectivamente) o soro destes indivíduos foram obtidos.

4.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de células polimorfonucleares (PMN)

O sangue periférico coletado de pacientes infectados com *P. vivax*, dos mesmo indivíduos após o tratamento e dos controles foi diluído 2x em tampão fosfato salino estéril (PBS 1x) (vol/vol). Trinta mL do sangue diluído foram adicionados delicadamente em um tubo contendo 15 mL de Ficoll Hypaque (GE) e as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 500 x*g.* Em seguida, o plasma foi coletado e guardado no freezer -80^{o}C. O PBMC foi coletado e lavado com PBS 1x por duas vezes a 300 x*g* por 10 minutos. A camada celular contendo os polimorfonucleares (PMN) logo acima das hemácias, foi coletada e a suspenção celular foi lisada com ACK (150mM NH4Cl, 10mM KHCO3 e 0.1 mM Na_2EDTA) e lavada 2 vezes com solução salina a 300 x*g* por 10 minutos.

Os PBMCs e os PMNs foram ressuspendidos em meio RPMI e PBS 2% soro fetal bovino (SFB), 1mM EDTA respectivamente e a concentração celular foi determinada com a utilização da câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi avaliada utilizando o Trypan Blue (Sigma) e somente as preparações celulares com mais de 90% de viabilidade foram utilizadas nos experimentos seguintes.

4.5 Enriquecimento de monócitos e neutrófilos

Os monócitos de pacientes infectados com *P. vivax* e os mesmo indivíduos após o tratamento foram purificados do PBMC através de seleção negativa com o kit Human Monocytes Enrichment (StemCell Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. As células ($5x10^7$) foram incubadas com um coquetel contendo anticorpos monoclonais purificados contra antígenos de superfícies de células do sangue (CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123 e glicoforina A) e dextran por 10 minutos a 4^{o}C. Em seguida, nanopartículas magnéticas foram adicionadas e incubadas por 5 minutos a 4^{o}C e depois os tubos foram colocados em magnetos e incubados por 5 minutos. Foi realizado duas incubações nos magnetos para aumentar a pureza das células.

Neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* e os mesmo indivíduos

após o tratamento, além de PMNs de indivíduos saudáveis foram ressuspendidos em PBS, 2% SFB, 1mM EDTA na concentração final de $5x10^7$/mL. A purificação foi realizada com o kit de seleção negativa, Human Neutrophil Enrichment kit (StemCell Technologies). Inicialmente os neutrófilos foram incubados por 10 minutos com um coquetel contendo anticorpos monoclonais purificados de sobrenadantes de cultura de hibridoma contra antígenos de superfícies de células do sangue (CD2, CD3, CD9, CD19, CD36, CD56 e glicoforina A) e dextran. Em seguida, nanopartículas magnéticas foram adicionadas e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e depois os tubos foram colocados em magnetos e incubados por 5 minutos. Foi realizado duas incubações nos magnetos para aumentar a pureza das células. Os LDGs foram purificados a partir do PBMC de pacientes infectados utilizando o mesmo procedimento descrito para neutrófilos.

A pureza dos monócitos, neutrófilos e LDGs purificados foi determinada por citometria de fluxo em um FACSCan atualizado com um segundo laser utilizando o *Cellquest Pro* e o *Rainbow*. Pelo menos 100.000 eventos foram adquiridos para neutrófilos enquanto para LDGs todos os eventos foram adquiridos uma vez que o número de células é pequeno. Alíquotas das células purificadas foram incubadas com seus respectivos anticorpos de superfície por 20 minutos a 4^{o}C e em seguida lavadas com PBS1x contendo 2% de soro fetal bovino. Após a centrifugação de 300 x*g* por 8 minutos, as células foram ressupendidas no tampão utilizado anteriormente e adquiridas no citômetro. Os anticorpos utilizados foram o anti-CD14 APC (clone 61D3; ebioscience), anti-HLA-DR APC-Cy7 (clone L243; BD) anti-CD66b FITC (clone G10F5; BD) e anti-CD16 PE (clone B73.1; ebioscience) anti-CD15 PercP-Cy5.5 (clone HI98; BD), anti-CD11b APC (clone D12; BD), anti-CD117 PE (clone 104D2; eBioscience) e anti-CD34 PercP (clone 8G12; BD). A análise de neutrófilos, monócitos e LDGs foi realizada baseada nos perfis de tamanho e granulosidade das células, além da expressão de seus marcadores específicos. Neutrófilos: $CD66b^+CD16^+HLA\text{-}DR^-CD14^-$; LDGs: $CD66b^+CD16^+HLA\text{-}DR^-CD14^-$. Os neutrófilos foram diferenciados dos LDGs pela sua densidade durante o gradiente de Ficoll. Os

marcadores CD15, CD66b, CD11b e CD16 foram utilizados para determinação da ativação de neutrófilos e LDGs, enquanto os marcadores CD34 e CD117 avaliaram os estágios de maturação destas células. Os dados foram analisados usando o software FlowJo Versão 9.4.2 (TreeStar). As marcações com anticorpos específicos para neutrófilos e monócitos foram utilizadas também para a determinação da frequência de células no sangue total dos pacientes infectados e tratados. O número absoluto foi obtido através da contagem total de leucócitos disponibilizada no hemograma.

Após a purificação dos neutrófilos de indivíduos saudáveis, estas células foram cultivadas em meio RPMI por 2 horas com 1000 U/mL interferon do tipo I (PBL Interferon Source) ou com 100 ng/mL IFNγ (R&D systems) ou mantidas sem estímulo algum como controle negativo.

As populações celulares após suas purificações foram centrifugadas e lisadas em tampão RLT suplementado com β-Mercaptoetanol em uma concentração de $1x10^4$ células/µL. Estas células lisadas foram estocadas no freezer -80^oC até a sua utilização nos experimentos de expressão gênica.

4.6 Separação de populações celulares de monócitos por citômetria de fluxo

As subpopulações de monócitos foram separadas através de marcações especificas de anticorpos utilizando o citômetro de fluxo FACSAria II (BD). Para isso utilizou-se os seguintes marcadores para cada subpopulação: Monócitos clássicos: $CD14^+CD16^-HLA\text{-}DR^+$; Monócitos inflamatórios: $CD14^+CD16^+HLA\text{-}DR^+$; Monócitos patrulhadores: $CD14^{lo}CD16^+HLA\text{-}DR^+$. Inicialmente células positivas para CD14 foram selecionadas. Em seguida uma combinação de anticorpos permitiu a exclusão de uma possível contaminação com neutrófilos ($CD16^+HLA\text{-}DR^-$). Por fim utilizou-se os marcadores específicos para separar cada uma das subpopulações em amostras de pacientes infectados com *P. vivax* (n=5) e em indivíduos saudáveis (n=5). Estas células foram então ressuspendidas em tampão RLT (Qiagen) suplementado com β-Mercaptoetanol em uma concentração de $2x10^3$ celulas/µL para análise de expressão gênica.

4.7 Detecção de mRNA e análise de expressão gênica por nanostring (Nanostring Technologies)

Células purificadas de pacientes infectados com *P. vivax* e seus respectivos controles após 30-45 dias do tratamento foram utilizados nos experimentos de expressão gênica. Neutrófilos purificados de controles saudáveis e estimulados com IFN do tipo I e IFN-γ também foram analisados em experimentos de expressão gênica. Além desses, as diferentes populações de monócitos purificadas através da separação por citometria de fluxo foram estudadas. A expressão genica também foi avaliada em LDGs de pacientes infectados com *P. vivax*.

As análises de expressão de mRNA foram realizados através da metodologia do *Nanostring Technologies* que consiste em uma reação não enzimática utilizando *barcodes* de sondas fluorescentes (GEISS et al., 2008). *Codesets* foram desenhados para detectar genes humanos relacionados as vias de interferon do tipo I e do tipo II e as vias de NFκB. Um total de $5x10^4$ células de cada população foram lisadas com tampão RLT (Qiagen) suplementado com β-Mercaptoetanol, e em seguida congeladas no freezer -80^oC. Posteriormente, os lisados celulares foram hibridizados com sondas repórter e de captura por 16 horas a 65^oC e depois foram colocados em uma plataforma aonde ocorre a separação magnética das sondas hibridizadas, lavagem para remover excessos de sondas e imobilização destas nos cartuchos. Por fim, a quantificação foi realizada no analisador digital utilizando 600 campos para detecção das sondas hibridizadas.

A análise dos dados gerados foi realizada utilizando um software do programa (nSolver). Estas análises consistem na normalização dos controles positivos para detectar pequenas variações entre diferentes *codesets*, seguido de normalização com sete genes constitutivos, inclusos nos *codesets*, para avaliar diferenças entre as amostras. Após as duas normalizações os valores de expressão gênica de neutrófilos de cada paciente infectado foram normalizados com os valores dos mesmos indivíduos 30-45 dias após o tratamento. Já para o

experimento de comparação da expressão gênica a partir da estimulação com os IFNs, a normalização ocorreu com neutrófilos não estimulados. Por último, as análises das purificações celulares de monócitos foram normalizadas com a média das mesmas populações de indivíduos não infectados. Somente os genes com intensidades maiores que a média dos controles negativos foram inclusos nas análises. Os *heatmaps* foram construídos utilizando o programa Multi Experiment Viewer v4.8 e os dados foram transformados na escala logarítmica de base 2. Diferenças de expressão gênica foram considerados estatisticamente significativo com $P < 0,05$ utilizando o teste T pareado múltiplo com correção da taxa de falsos positivos (FDR < 0.05).

4.8 Dosagem da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos

A capacidade dos neutrófilos purificados de pacientes de produzir ROS foi comparada com neutrófilos de HDs da área endêmica pelo método de quimioluminescência do luminol (LIU et al., 1996). Células purificadas ($5x10^5$) foram plaqueadas em triplicatas em placas de 96 poços com fundo claro (Corning). Células foram estimuladas em PBS 1x com 100 ng/mL de PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) ou mantidas em PBS 1x por 60 minutos na presença de 100 µM de luminol. Trinta minutos antes de colocar o estímulo, 5 µM de diphenyleneiodonium (DPI), um inibidor da produção de ROS foi adicionado nas células como controle. A cinética da quimioluminescência foi medida a cada 10 minutos no leitor de microplacas Synergy HT (Biotek).

A produção de mieloperoxidase foi avaliada em neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* e após o tratamento além de indivíduos saudáveis. Células purificadas ($1x10^6$) foram estimuladas em meio RPMI com 100 ng/mL de PMA ou deixadas sem estímulo algum por 24 horas em cultura. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e congelado em freezer -20^{o}C. A dosagem dos níveis de MPO foi realizada através de um kit de Elisa para MPO de acordo com as instruções do fabricante (Calbiochem). As amostras e os padrões foram adicionados nos devidos poços e incubados por uma hora a 37^{o}C. Após 5

lavagens com PBS 0,05% *Tween* 20, 100 µL do anticorpo diluído anti-MPO biotinilado foi adicionado em cada poço e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) seguido de mais 5 lavagens. Em seguida, 100 µL da solução diluída de fosfatase alcalina conjugada com avidina foi adicionada nos poços e incubadas por 30 minutos a TA. Novamente mais 5 lavagens foram realizadas seguida de uma incubação com 100 µL do substrato para fosfatase alcalina *p*-nitrophenylphosphate (pNPP) por cerca de 20 minutos. A reação foi parada com a adição de 50 µL de uma solução 2N H_2SO_4 e a leitura foi realizada em uma absorbância de 405 nm em leitor de microplacas (VersaMax).

4.9 Estímulos com agonistas de TLRs

Os monócitos e neutrófilos purificados de pacientes infectados com *P. vivax* e após o tratamento foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços em uma concentração de $2x10^5$ células/mL com meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino e 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina na presença ou ausência de agonistas de TLRs: 100 ng/mL LPS (TLR4; Sigma) ou 100 ng/mL de Pam2CSK4 (TLR2/TLR1; Invivogen). As células foram incubadas a 37^{o}C com 5% de CO2 por 48 horas e o sobrenadante foi coletado e guardado em freezer -20^{o}C para avaliação da produção de citocinas.

4.10 Dosagem de citocinas

A quantificação dos níveis séricos e do sobrenadante de cultura de monócitos e neutrófilos das citocinas IL-8 (CXCL8), IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α foi realizada através do sistema citofluorométrico com microesferas fluorescentes (CBA; BD). Este ensaio consiste na avaliação simultânea de diversas citocinas na mesma amostra utilizando esferas cobertas com anticorpos específicos com intensidades de fluorescência diferentes. Inicialmente 50 µL da mistura destas esferas foram transferidas para placas de cultura celular de 96 poços e misturadas com 100 µL das amostras testadas diluídas 2x e foram incubadas po 90 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida as amostras foram lavadas duas vezes com PBS 1x e centrifugadas a

200 x*g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e foi adicionado um coquetel de anticorpos monoclonais contra antígenos humanos marcados com PE e incubados por mais 90 minutos protegido da luz. Após a incubação as células foram novamente lavadas e ressuspendidas em PBS 1x para aquisição das amostras no citômetro de fluxo FACScan (BD). Para cada amostra processada foram adquiridos 1800 eventos dentro de região pré-estabelecida. O cálculo dos níveis de citocinas foi realizado com a utilização do software FCAP Array (BD). Os limites de detecção para as citocinas foram: 3.6 pg/mL (IL8); 7.2 pg/mL (IL1β); 2.5 pg/mL (IL6); 3.3 pg/mL (IL10) e 3.7 pg/mL (TNFα).

4.11 Quantificação de neutrófilos em camundongos

Células primárias não parenquimais do fígado foram purificadas em animais infectados ou não com *P. chabaudi* (LIEHL et al., 2014). Inicialmente os fígados foram perfundidos para remoção de células provenientes da circulação sanguínea e foram macerados em filtro de 70 µM. As células foram passadas na peneira com 5 mL de PBS 1x. Em seguida elas foram centrifugadas a 300 x*g* por 8 minutos e as células foram ressuspendidas em 10 mL de Percoll 35% e centrifugadas a 800 x*g* por 20 minutos a temperatura ambiente sem freio. O sobrenadante foi descartado e as células não parenquimais foram ressupendidas e lavadas duas vezes em PBS 1x. Por fim ressuspendeu em PBS 1x com 2% soro fetal bovino para determinação da frequência de PMNs no citômetro de fluxo. A viabilidade das células foi avaliada utilizando o Trypan Blue (Sigma). Os seguintes marcadores específicos para neutrófilos foram utilizados: anti-CD45.2 APC-eFluor780 (clone 104; eBioscience), anti-Ly6G PE (clone 1A8; BD), anti-CD11b PE-Cy7 (clone M1/70; eBioscience) e anti-Ly6C eFluor450 (clone HK1.4; eBioscience). As células marcadas foram adquiridas no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD) e as análises dos dados foram realizadas no FlowJo Version 9.4.10.

O número de neutrófilos também foi quantificado através da microscopia intravital (MARQUES et al., 2015b). Camundongos foram anestesiados com

ketamina (60 mg/kg) e xylazina (8 mg/kg) e 4 µg de anti-GR1 PE (clone RB6-8C5; eBioscience) diluído em PBS 1x foi injetado via intravenosa 10 minutos antes da aquisição das imagens. Estas foram obtidas usando o microscópio confocal C2 Eclipse Ti (Nikon). As contagens dos neutrófilos foram realizadas no *software* Image J. Para cada animal pelo menos 4 campos de visualização (FOV) foram analisados e uma media destas foram plotadas nos gráficos.

4.12 Depleção de neutrófilos

Experimentos *in vivo* de depleção de neutrófilos foram realizados em animais infectados com *P. chabaudi* e em animais não infectados através da administração intraperitoneal de anticorpos anti-Ly6G (500 µg/dose, clone 1A8; BioXCell) ou de anticorpos isotipo controle (500 µg/dose, clone 2A3; BioXCell). Quatro doses foram inoculadas um dia antes da infecção com *P. chabaudi* e 2, 6 e 10 dias após a infecção. A confirmação de depleção de PMNs foi verificada no sangue total destes camundongos no 11^{o} dia após infecção por citômetria de fluxo, microscopia confocal e esfregaços sanguíneos corados com giemsa. Os anticorpos monoclonais utilizados foram os mesmos utilizados na quantificação de PMNs além dos específicos para células T: anti-CD3 APC-eFluor 780 (clone 17A2; eBioscience), anti-CD4 eFluor605NC (clone GK1.5; eBioscience), anti-CD8a AlexaFluor700 (clone 53-6.7; eBioscience); e macrófagos: anti-F4/80 PercP-Cy5.5 (clone BM8; eBioscience). As frequências de neutrófilos, monócitos inflamatórios e células T CD4 e CD8 foram obtidas e a partir delas foi calculado o número absoluto destas células.

4.13 Dosagem de ALT

Os níveis de ALT no soro de animais infectados ou não com *P. chabaudi* foram medidos com um Kit Transaminase ALT cinética (Bioclin) com modificações para realização deste ensaio em placas de 96 poços. Antes da dosagem todos os reagentes e o leitor de microplacas foram aquecidos a 37^{o}C. Os reagentes foram misturados na formulação adequada (9 partes do substrato para uma parte da coenzima) e 200 µL desta solução foi adicionada em cada

poço contendo 20 µL de soro diluído 5x em PBS 1x. Foram realizadas 4 leituras a cada minuto na absorbância de 340 nm em leitor de microplacas (VersaMax). A variação da absorbância a cada minuto foi calculada e os resultados foram expressos em U/L.

4.14 Extração de RNA total do fígado por Trizol

Amostras de fígados de animais infectados com *P. chabaudi* em diferentes dias (3d, 7d, 11d) e de camundongos não infectados foram coletados e estocados em 1 mL de RNA later (Life Technologies). Cerca de 20 mg do tecido foi cortado para realização da extração e transferidos para tubos eppendorfs contendo 1 mL de Trizol (Life Technologies). As amostras foram maceradas em um homogeneizador de tecidos (Tissue Lyser LT; Qiagen) em uma frequência de 30 Hz por 3 minutos e deixadas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados em cada tubo e incubados por 3 minutos e centrifugados a 12000 x*g* por 15 minutos a 4^{o}C. A fase aquosa foi coletada e removida para um novo tubo aonde foi adicionado 500 µL de isopropanol (Merck) 100% para precipitar o RNA. Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 x*g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi lavado uma vez com etanol 75% e centrifugado a 7500 x*g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e os tubos foram deixados abertos por cerca de 10 minutos para permitir a evaporação do álcool e a secagem do pellet. Este foi ressuspendido em 30 µL de água livre de DNAse e RNAse (Life Technologies). Logo após a extração dos RNAs, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi retirada e diretamente dosada em um leitor NanoDrop ND-1000. A pureza do RNA total foi determinada pelo valor da razão dos valores de leitura das absorbâncias a 260/280 nm e consideramos um RNA puro quando esta razão variou de 1,8 a 2,1.

4.15 Síntese de cDNA

Amostras de RNA total (1µg) foram, inicialmente, tratadas com a enzima RQ1 DNAse (Promega). Foram utilizadas 2U da enzima, 2µL do tampão da enzima (400mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM MgSO4, 10mM CaCl2) e água livre de RNAse e DNAse (Life Technologies) para completar um volume final de 20 µL. Essas reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em seguida foram adicionados 2µL de solução de parada da reação (*Stop Solution)* e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 65°C para inativação da DNAse.

Após o tratamento com DNAse, foram acrescentados a cada reação 2µL de uma solução de dNTPs (10 mM) e 2 µL do iniciador Oligo dT (10 mM). As reações foram incubadas a 65^{o}C por 2 minutos, colocadas em gelo, acrescidas de 8 µL de tampão 5x (TRIS-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl2 15 mM, DTT 50 mM, pH 8,0) para a enzima M-MLV RT e os tubos foram homogeneizados, incubados por 2 minutos a 42°C. Para a síntese do cDNA foi adicionado 200U da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega) e as amostras foram incubadas por 50 minutos a 42^{o}C e em seguida, a transcriptase reversa foi inativada a 70^{o}C por 15 minutos.

4.16 Reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

Inicialmente os cDNAs obtidos foram diluídos 10 vezes com água livre de nucleases. O reagente Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies), 200nM de iniciadores específicos para cada gene e quantidade suficiente de água para um volume final de 15 µL foram adicionados em placas brancas de 96 poços. Por fim, adicionou-se 5 µL do cDNA diluído 10x. Uma curva padrão foi realizada para cada gene analisado utilizando diferentes diluições dos cDNAs controles. Todas as reações foram testadas em triplicata. A especificidade das amplificações para cada amostra foram determinadas através da análise da curva de dissociação. Os valores obtidos foram analisados no software Q-Gene (SIMON, 2003) para geração da curva padrão e cálculo da eficiência dos iniciadores que foram obtidos a partir da inclinação (*slope*) das

curvas geradas. A fórmula utilizada para o cálculo da eficiência da amplificação dos genes foi:

$$E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$$

O cálculo da expressão relativa dos genes alvos também foi realizado pelo software Q-Gene. Esse programa utiliza os valores dos CTs (ciclo do PCR no qual a curva de amplificação cruza a linha de corte) do gene alvo e do endógeno e a eficiência dos seus iniciadores. O erro padrão derivado da obtenção das médias do CT foi calculado através da equação diferencial de Gauss.

Após essa análise o valor gerado pelos três experimentos desenvolvidos foi avaliado em um programa estatístico (GraphPad Prism, v.6) para observar se houve diferença significativa da expressão. Para isso utilizou-se o teste D'Agostino & Pearson para verificar a normalidade das amostras e em seguida aplicou-se o teste-T *Student*. O equipamento utilizado para as reações de qPCR foi o 7500 Real Time System (Life Technologies). As sequencias dos iniciadores utilizados neste estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos

Iniciadores	Sequência (5'→ 3')
GAPDH Fwd	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG
GAPDH Rev	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA
CCL3 Fwd	TTC TCT GTA CCA TGA CAC TCT GC
CCL3 Rev	CGT GGA ATC TTC CGG CTG TAG
CXCL1 Fwd	CTG GGA TTC ACC TCA AGA ACA TC
CXCL1 Rev	CAG GGT CAA GGC AAG CCT C
IL-1β Fwd	ACC TGT CCT GTG TAA TGA AAG ACG
IL-1β Rev	TGG GTA TTG CTT GGG ATC CA
IFI44 Fwd	TCG ATT CCA TGA AAC CAA TCA C
IFI44 Rev	CAA ATG CAG AAT GCC ATG TTT T
IRF7 Fwd	CTT CAG CAC TTT CTT CCG AGA
IRF7 Rev	TGT AGT GTG GTG ACC CTT GC
IFIT1 Fwd	CCT TTA CAG CAA CCA TGG GAG A
IFIT1 Rev	GCA GCT TCC ATG TGA AGT GAC

4.17 Análises estatísticas

A determinação da significância estatística das diferenças observadas foi realizada utilizando o teste T de *Student* ou *Mann Whitney* quando a distribuição dos dados não atingia os critérios de uma distribuição Gaussiana. Para as anDiferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. O software Graphpad Prism 6.0 foi utilizado para as análises dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes

Para a realização de todos os experimentos deste trabalho foram recrutados trinta e oito pacientes durante a fase aguda da infecção com *P. vivax* e os mesmos indivíduos 30-45 dias após o tratamento anti-malárico. Deste número total de pacientes, somente cinco não retornaram para a coleta da segunda amostra após a quimioterapia e estas amostras foram inclusas em experimentos que não foram utilizadas amostras pareadas. A média de idade dos pacientes foi de 36 anos e a maioria deles era do sexo masculino. Todos os pacientes apresentaram febre e/ou calafrios pelo menos nas últimas 24 horas antes do atendimento e, no momento da coleta, 51% dos pacientes estavam com febre. Não se observou diferenças nos números de hemácias e de hemoglobina entre os indivíduos infectados e após o tratamento (Tabela 1). Entretanto, os pacientes com *P. vivax* apresentaram uma redução no número de plaquetas e um aumento dos níveis das transaminases hepáticas e de bilirrubina total (Figura 3).

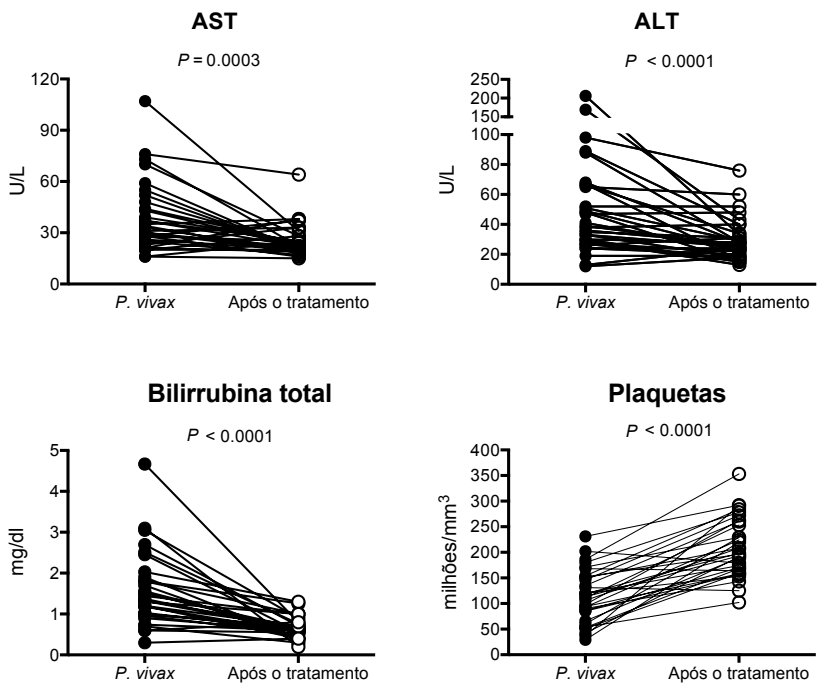


Figura 3. Malária induz elevados níveis de transaminases hepáticas e bilirrubinas. As concentrações de alanaina (A) e aspartato (B) aminotransferases (ALT e AST respectivamente) e de bilirrubina total (C) e plaquetas (D)) foram avaliadas nos soros de pacientes infectados com *P. vivax* e dos mesmos indivíduos 30-45 dias após o tratamento (n=32). Para estas análises foram utilizados o Teste T de *Student* pareado ou o teste de Wilcoxon de acordo com a normalidade e os valores de P estão descritos em cada gráfico

Os valores de AST e ALT considerados dentro da normalidade são abaixo de 30 a 40 U/L dependendo do laboratório aonde foi realizado o teste (PRATT; KAPLAN, 2000). Já para a bilirrubina total os valores de referência são menores que 1.2 mg/dl enquanto os valores para plaquetas são acima de 150 x 10^3/mm^3.

5.2 Malária induz altos níveis de citocinas

Plasmas de 11 pacientes infectados com *P. vivax* e dos mesmos indivíduos após o tratamento foram obtidos para avaliação dos níveis de citocinas por CBA. Foram detectados altos níveis de citocinas pró inflamatórias, IL-8, IL-1β e IL-6, além da IL-10 nos plasmas de pacientes infectados em relação aos mesmo indivíduos após o tratamento. Já para TNF-α não foi encontrada diferença estatística quando comparado pacientes na fase aguda da malária e após o tratamento. Entretanto os indivíduos infectados com *P. vivax* apresentaram uma tendência de aumento na produção de TNF-α no plasma (Figura 4).

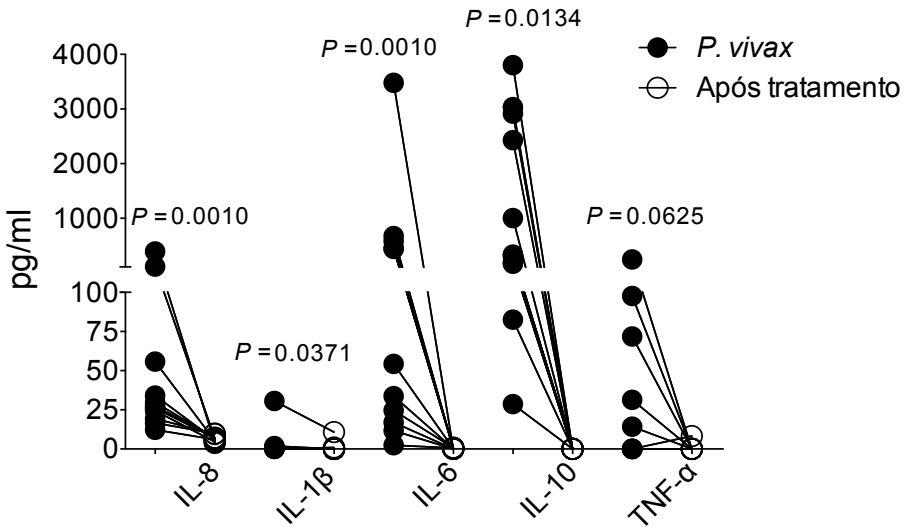


Figura 4. Pacientes infectados com *P. vivax* apresentam elevados níveis de citocinas. IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α foram avaliados no plasma de pacientes infectados com *P. vivax* (círculo preto) e dos mesmos indivíduos 30-45 dias após o tratamento (círculo branco) (n=11). Para estas análises foram utilizados o Teste T de *Student* pareado ou o teste de Wilcoxon de acordo com a normalidade das amostras e os valores de P estão mostrados no gráfico para cada citocina.

5.3 Pacientes infectados com *P. vivax* apresentam um aumento da frequência e número absoluto de monócitos e neutrófilos

Neutrófilos e monócitos foram marcados com anticorpos específicos para cada tipo celular e suas frequências e valores absolutos foram quantificados em sangue periférico de indivíduos infectados com *P. vivax* e dos mesmos 30 a 45 dias após o tratamento. Os neutrófilos foram identificados no sangue periférico por citometria de fluxo através da sua granulosidade e da expressão de duas moléculas: CD66b uma molécula de adesão altamente expressa em neutrófilos humanos e de CD16, um receptor Fc-γIII. Já os monócitos foram identificados no sangue pela expressão de CD14, uma glicoproteína de membrana ancoradas em glicolipídeos. A média da frequência de neutrófilos durante a infecção aumentou de 49% para 62%, enquanto em monócitos o aumento foi de 4% para 7,9% (Figura 5A e 5B). Os valores absolutos seguiram a mesma tendência da frequência para todos os tipos celulares.

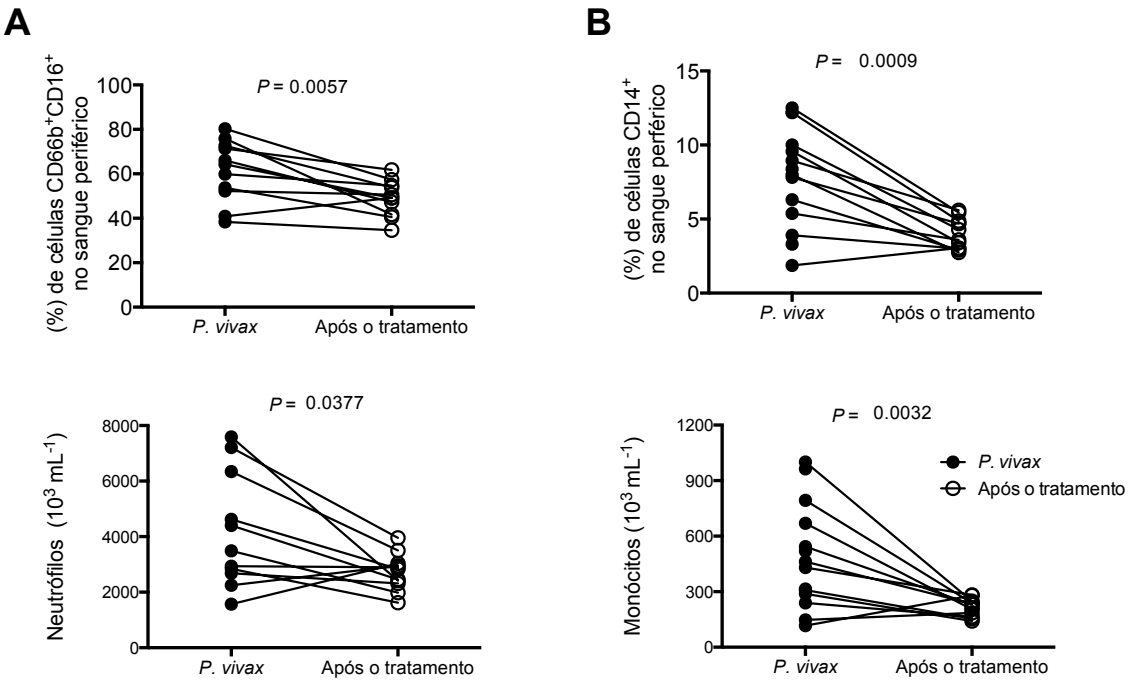


Figura 5. Neutrófilos e monócitos estão aumentados durante infecção por *P. vivax*. Frequência (Painel superior) e valores absolutos (painel inferior) de neutrófilos ($CD66b^+CD16^+$) (A) e monócitos ($CD14^+$) (B), em pacientes infectados com *P. vivax* (círculos fechados) e os mesmos 30 a 45 dia após o tratamento (círculos abertos) (n=11). Teste T pareado foi utilizado para determinar as diferenças entre as amostras. Os valores de *P* estão representados nos gráficos.

5.4 Monócitos e neutrófilos circulantes estão ativados durante a infecção com *P. vivax*

A expressão de marcadores de ativação foi avaliada em monócitos e neutrófilos circulantes de pacientes infectados com *P. vivax* e dos mesmos indivíduos após o tratamento. Os monócitos foram separados através da expressão de CD14 e as células dos pacientes na fase aguda da malária apresentaram uma diminuição na expressão de HLA-DR (mediana de intensidade de fluorescência, MFI) quando comparados com os mesmos indivíduos após o tratamento (Figura 6A). Os neutrófilos foram primeiramente identificados com a expressão de $CD66b^+CD16^+$ no sangue total. Em seguida observou-se uma redução na expressão dos marcadores de ativação CD62L e CD88 (Figura 6B e 6C). CD62L é uma molécula de adesão da família selectina enquanto CD88 é um receptor do componente C5a do complemento. Durante a

ativação de neutrófilos observa-se uma diminuição na expressão destes dois marcadores (FORTUNATI et al., 2009).

Os neutrófilos purificados de pacientes infectados com *P. vivax* também apresentaram uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) após estímulo com PMA quando comparados com neutrófilos purificados de controles saudáveis. Esta diferença na liberação de ROS apareceu após 20 minutos da adição de PMA e permaneceu por mais 40 minutos. Como controle as células foram pré-tratadas com DPI, um inibidor da enzima NADPH oxidase, e mesmo após o estímulo com PMA não foi observado nenhuma liberação de ROS (Figura 6D). Neste mesmo experimento foi observado que neutrófilos de pacientes na fase aguda da malária produzem mais ROS que estas células de indivíduos saudáveis mesmo sem estímulo de PMA. A ativação dos neutrófilos durante a malária vivax também foi avaliada pela produção de mieloperoxidase (MPO). Observou-se um aumento na liberação de MPO em neutrófilos de pacientes infectados e estimulados com PMA quando comparados com células de indivíduos após o tratamento e de controles saudáveis (Figura 6E).

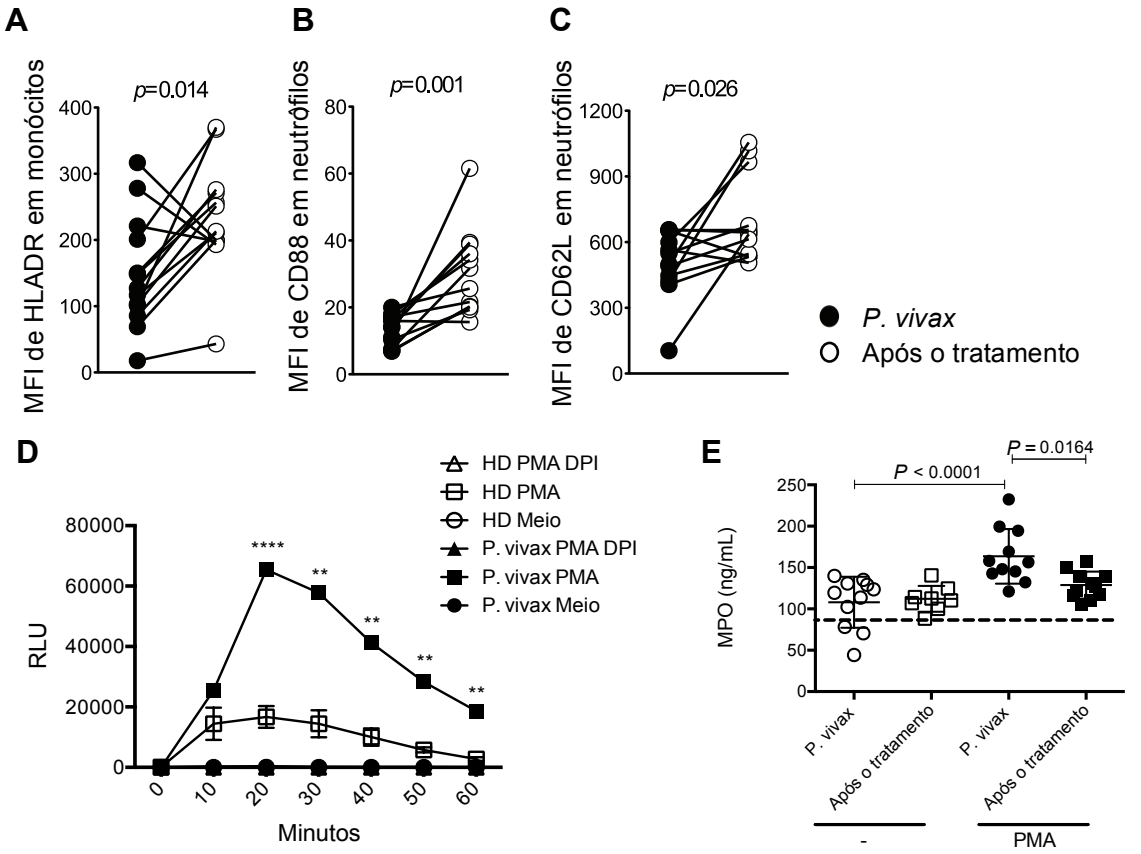


Figura 6. Neutrófilos e monócitos estão ativados em pacientes infectados com *P. vivax*. Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de HLADR (A) em monócitos e CD88 (B) e CD62L (C) em neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* (círculos pretos) e dos mesmos indivíduos 30-45 dias após o tratamento (círculos brancos) (n=12). As diferenças foram estabelecidas a partir do teste T de *student* pareado ou do Teste Wilcoxon de acordo com a normalidade das amostras. Os valores de P estão indicados nos gráficos. (D) Cinética de produção de ROS em neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* e de indivíduos controles (HD) estimulados ou não com 100 ng/mL de PMA na presença ou ausência de DPI (5 µM). A cinética de quimioluminescência dependente do luminol foi medida por 60 minutos (n=8). O eixo y indica a luminescência emitida (RLU). Os dados estão representados como média ± SEM. O teste *One-way* Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças para cada tempo. **0.01 > P > 0.001; ****P < 0.0001. (E) Os níveis de MPO foram avaliados nos sobrenadantes de cultura de neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* e dos mesmos após o tratamento estimulados ou não com 100 ng/mL de PMA por 24 horas (n=11). A linha tracejada indica a média dos valores de MPO de indivíduos saudáveis. O teste *One-way* Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças. Os valores de P estão indicados no gráfico.

5.5 Pacientes com *P. vivax* apresentam uma população de neutrófilos de baixa densidade (LDGs)

Usando um gradiente de centrifugação convencional (Ficoll) para separar células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados com *P. vivax* foi encontrado uma população de leucócitos apresentando alta granulosidade (SSC^{hi}) o que não foi observado nos mesmos indivíduos após o tratamento e nem em controles saudáveis. A fim de confirmar se esses leucócitos de alta granulosidade são neutrófilos, o PBMC foi marcado com CD66b e CD16 e ambos os marcadores foram expressos por essas células. Esta população celular foi então denominada como neutrófilos de baixa densidade (LDGs), uma vez que durante o gradiente de Ficoll os neutrófilos convencionais são separados do PBMC e encontrados logo acima das hemácias. A média da frequência de LDGs ($SSC^{hi}CD66b^{+}CD16^{+}$) no PBMC de pacientes com malária vivax foi de 11.56%, enquanto nos mesmos indivíduos após o tratamento e nos controles saudáveis foi de 0.97% e 1.3% respectivamente (Figura 7A e 7B). Para descartar uma possível contaminação de monócitos, os LDGs de pacientes infectados com *P. vivax* foram marcados com CD14 e HLA-DR. Pode-se observar que estas células não expressam estes marcadores. Além disso, os LDGs também expressam o CD15 uma molécula de adesão encontrada em neutrófilos confirmando que estas células são realmente um subpopulação de neutrófilos (Figura 7C).

Em seguida foi avaliada a expressão de marcadores de ativação em LDGs e nos neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* e de doadores saudáveis. Observou-se que o MFI de CD66b e de CD15 nos LDGs estavam aumentados em relação aos neutrófilos de pacientes e dos controles saudáveis enquanto para CD16 e CD11b não foi encontrada diferença estatística (Figura 7D). Para determinar se essa subpopulação de neutrófilos eram células imaturas ou células maduras que degranularam, os LDGs e neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* foram marcados com CD34 e CD117, marcadores que são expressos em células progenitoras (DE JONG; WAGEMAKER; WOGNUM, 1995). Entretanto os LDGs assim como os neutrófilos de pacientes na fase

aguda da malária não expressaram estes marcadores (Figura 7E). Além disso sabe-se que a expressão de CD16 em neutrófilos varia de acordo com a maturação das células com um aumento na expressão em células maduras (ELGHETANY, 2002). Como mostrado, os LDGs apresentam uma expressão de CD16 semelhante ao de neutrófilos. Estes dados sugerem que os LDGs são células maduras que estão ativadas durante a malária.

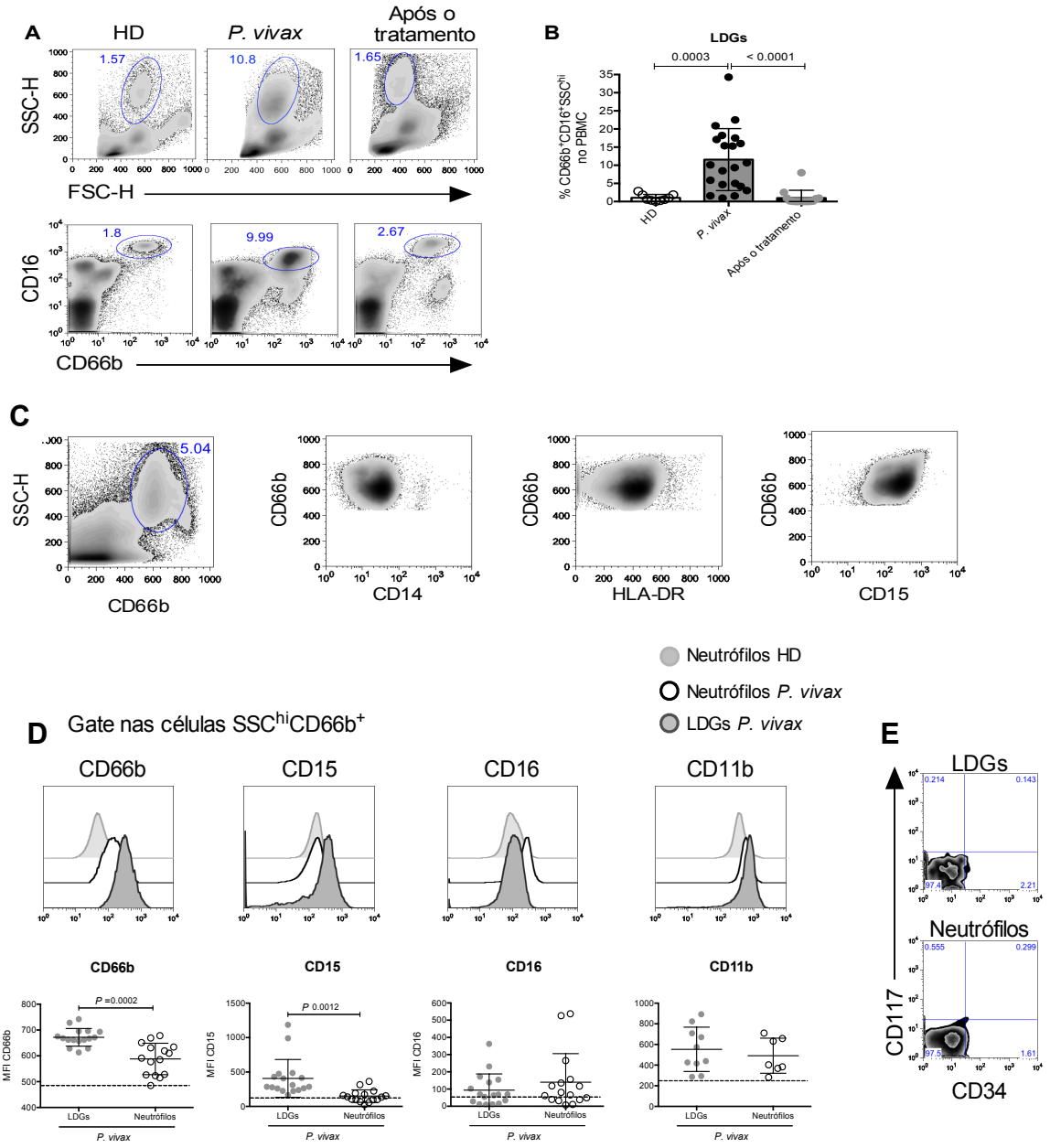


Figura 7. PBMCs de pacientes infectados com *P. vivax* apresentam uma população de LDGs. *Densityplots* representativos (A) e gráfico de barras (B) da frequência de $SSC^{hi}CD66b^{+}CD16^{+}$ (LDGs) nos PBMCs de pacientes infectados com *P. vivax* (n=21) e os mesmos indivíduos após o tratamento (n=14) e de controles saudáveis (HD) (n=9). As frequências de cada população estão identificada nos quadrantes. Os dados são representativos da média ± SD. (C) *Densityplot* representativos de células $SSC^{hi}CD66b^{+}$ marcadas com CD14 (esquerda) HLA-DR (centro) e CD15 (direita) em amostras de pacientes infectados com *P. vivax*. (D) Representação de histogramas de marcadores de ativação CD66b, CD15, CD16 e CD11b de LDGs e neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* e de neutrófilos de controles saudáveis (Painel superior). Gráfico de barras da intensidade de fluorescência média (MFI) dos marcadores de ativação de LDGs e neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax*. Cada circulo corresponde a um individuo e a linha tracejada representa a média de MFI do controle não infectado (n=7-16). (E) *Zebraplot* representativo da frequência de marcadores de células progenitoras, CD34 e CD117 em LDGs e neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax*.

5.6 Avaliação da pureza das células

As células foram marcadas antes e após as purificações e analisadas por citometria de fluxo para avaliar o grau de pureza antes da utilização em experimentos posteriores. A purificação de neutrófilos apresentou purezas entre 94%-99%, sendo todas as amostras com purezas menores que 99% excluídas das análises de expressão gênica. Já para monócitos, as purezas variaram entre 90,2%-99,6% e todas as células purificadas foram utilizadas para os outros experimentos. A Figura 8 mostra um exemplo de cada população celular antes e após as purificações em pacientes infectados com *P. vivax* e tratados.

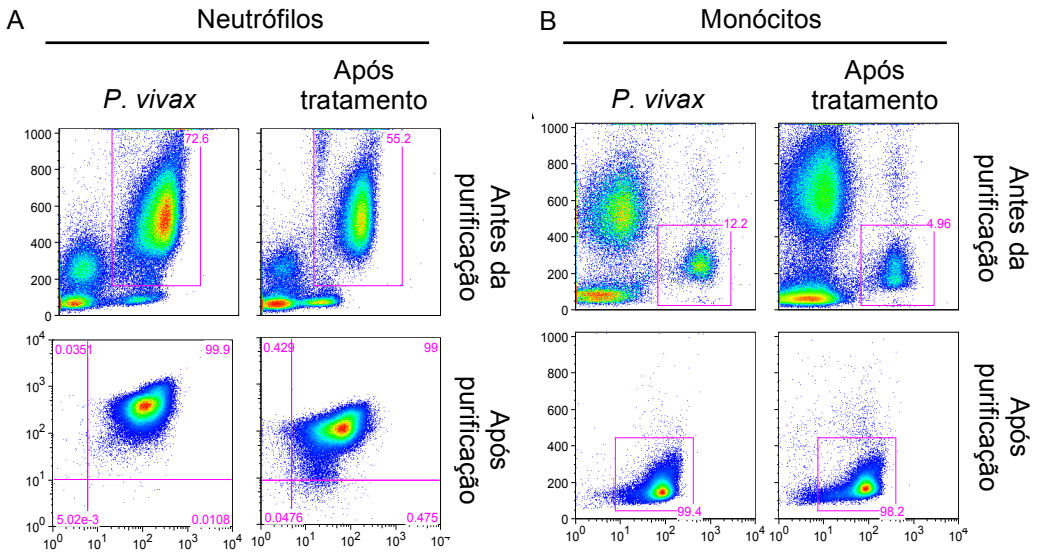


Figura 8. Avaliação da pureza de neutrófilos. *Dotplots* representativos mostrando as frequências de neutrófilos (A) e de monócitos (B) antes e após as purificações celulares durante a infecção por *P. vivax* e após o tratamento.

5.7 Monócitos são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção com P. vivax

Com a finalidade de avaliar a produção de citocinas após estímulos com agonistas de TLR, monócitos e neutrófilos purificados de pacientes infectados com *P. vivax* e dos mesmos indivíduos após o tratamento foram incubados em cultura na presença de Pam ou LPS. Monócitos de pacientes na fase aguda da malária produziram elevados níveis de IL-1β, IL-6 e TNF-α na presença do

agonista Pam quando comparados com células dos mesmos indivíduos após o tratamento. Por sua vez a produção de IL-10 foi menor nos monócitos de pacientes após estímulos com LPS (Figura 9A). Não foi detectado a produção de IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α por neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax*. Estas células produziram somente IL-8 após estímulos com os 2 agonistas, porém não foram observadas diferenças entre neutrófilos de pacientes e dos mesmo indivíduos após o tratamento (Figura 9B).

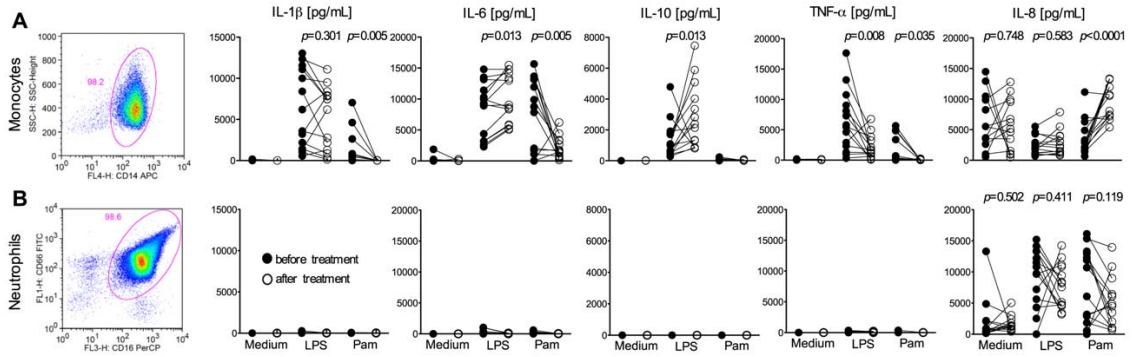


Figura 9. Agonistas de TLRs induzem a produção de citocinas em monócitos de pacientes infectados com *P. vivax*. Monócitos (A) e neutrófilos (B) purificados de pacientes infectados com *P. vivax* (círculos pretos) e dos mesmos indivíduos após o tratamento (círculos brancos) foram cultivados por 48 horas na ausência ou presença de 100 ng/mL dos agonistas de TLR2 (Pam) e TLR4 (LPS) (n=13). Os níveis de IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e IL-8 foram avaliados por CBA nos sobrenadantes destas culturas. Os valores de P estão indicados nos gráficos.

Os monócitos foram identificados como as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção com *P. vivax.* Recentemente foi descrito que os monócitos são uma população heterogênea no sangue periférico, sendo divididos em três subpopulações de acordo com a expressão de marcadores fenotípicos: monócitos clássicos ($CD14^{+}CD16^{-}$); inflamatórios ou intermediários ($CD14^{+}CD16^{+}$); e patrulhadores ($CD14^{lo}CD16^{+}$) (CROS et al., 2010; ZAWADA et al., 2011). Com isso, foi avaliado o perfil de expressão gênica dessas três subpopulações para determinar a importância de cada uma na produção desta citocinas pró-inflamatórias.

Primeiramente, as três subpopulações foram purificadas através do citômetro de fluxo de pacientes infectados com *P. vivax* e de controles saudáveis (Figura 10A). Após a confirmação da pureza, as células foram lisadas e o perfil

de expressão gênica relacionados a respostas inflamatórias foi avaliado por *nanostring*. Um codeset contendo 72 genes envolvidos na resposta imune inata, adesão celular, migração e fagocitose foi utilizado. Observou-se que 41 genes foram diferencialmente expressos durante a infecção com *P. vivax* quando comparados com os controles em pelo menos uma das três subpopulações de monócitos. Como pode ser observado no *heatmap*, os genes das citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6 e IL-1β) além de IL-10 e de quimiocinas foram os que apresentaram maior indução durante a malária para as três subpopulações. Genes envolvidos na sinalização do fator de transcrição NFκB como por exemplo *NFκB1*, *NFκB2* e *REL* também estão aumentados durante a infecção com *P. vivax*, assim como componentes dos inflamassomos como *NLRP3* e *NLRP6*. Já a expressão dos genes dos TLRs (TLR5, TLR6 e TLR7) foi diminuídas durante a infecção com *P. vivax* nas três subpopulações de monócitos (Figura 10B).

Em seguida, foi analisada as diferenças na expressão gênica entre as subpopulações durante a fase aguda da doença. Em geral, os monócitos clássicos e inflamatórios foram os que expressaram os maiores níveis de mRNA de genes pró-inflamatórios. As quimiocinas *CXCL2* e *CCL2* foram altamente induzidas nos monócitos $CD14^{+}CD16^{-}$ e $CD14^{+}CD16^{+}$, enquanto que nos monócitos patrulhadores estes genes foram menos expressos. O mesmo padrão de expressão pode ser observado para molécula de adesão *ICAM1*, para o receptor de TNF, *TNFR1*, para os genes da via NFκB, *NFκB1*, *NFκBIA* e *REL* além dos genes constituintes do inflamassoma, *NLRP3 e Caspase1*. O padrão de expressão de genes de citocinas também apresentou variação entre as subpopulações. Tanto *IL-6* quanto *IL-10* foram mais expressos nos monócitos inflamatórios quando comparados com os clássicos. Os monócitos patrulhadores expressaram níveis altos de TNF e níveis mais baixos de IL-8 quando comparados com os clássicos (Figura 10C). Portanto esses dados indicam que tanto os monócitos clássicos quanto os inflamatórios apresentam um perfil mais ativado que os patrulhadores durante a infecção com *P. vivax*.

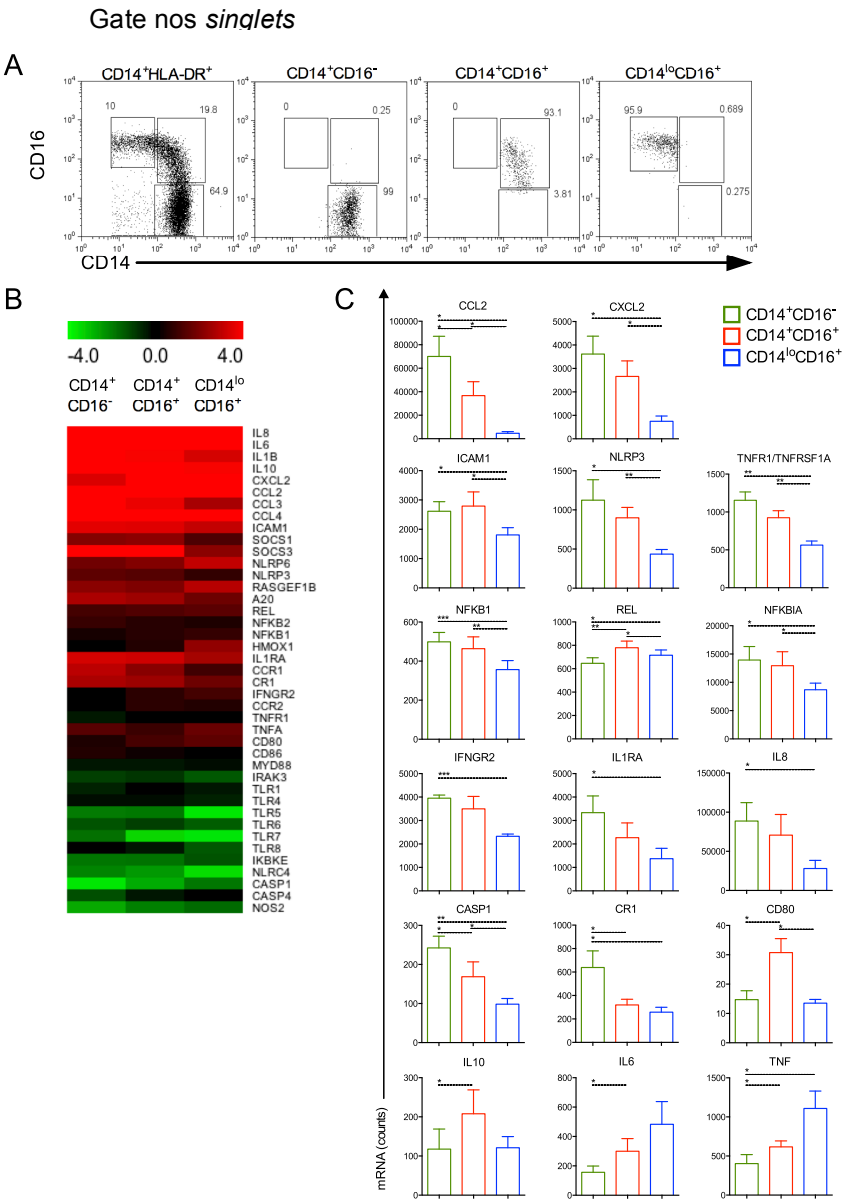


Figura 10. Subpopulações de monócitos apresentam perfil de expressão gênica diferenciado. As subpopulações $CD14^{+}CD16^{-}$, $CD14^{+}CD16^{+}$ e $CD14^{lo}CD16^{+}$ de monócitos de controles saudáveis e de pacientes infectados com *P. vivax* foram purificados por citometria de fluxo. (A) *Dotplots* representativos das três subpopulações de monócitos antes (painel da esquerda) e depois das purificações (painéis da direita). As frequências de cada subpopulação estão representadas em cada quadrante. (B) Análise de expressão gênica de $CD14^{+}CD16^{-}$, $CD14^{+}CD16^{+}$ e $CD14^{lo}CD16^{+}$ de monócitos de pacientes infectados com *P. vivax* e de controles saudáveis (n=5). Representação por *heatmap* de 41 genes diferencialmente expressos durante a infecção por *P. vivax*. O *heatmap* indica a razão de genes normalizados na escala logarítmica na base 2 (*P. vivax*/HDs). Os genes estão indicados nas linhas enquanto cada coluna representa as diferentes subpopulações de monócitos. (C) Representação gráfica da contagem de mRNAs pelo *nanostring* de genes diferencialmente expressos entre as subpopulações de monócitos. Para calcular as diferenças estatísticas entre as três subpopulações foi utilizado o Teste *One-way* Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. *0.05>P>0.01; **0.01>P>0.001; ***0.001<P<0.0001.

5.8 Neutrófilos apresentam uma assinatura de genes estimulados por interferon durante a infecção com *P. vivax*

Além do perfil de expressão gênica das subpopulações de monócitos, também foi avaliada a indução de genes em neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* quando comparados com os mesmos indivíduos após o tratamento. Para esses experimentos somente neutrófilos com mais de 99% de pureza, determinada por citometria de fluxo, foram inclusos. Esse fator foi selecionado a fim de evitar qualquer contaminação com outros tipos celulares. De um total de 105 genes relacionados a respostas inflamatórias presentes no *codeset* analisado, 7 eram constitutivos e foram utilizados para normalização e os outros 98 são genes relacionados a resposta imune inata como genes de citocinas, de TLRs, da via do NFkB e do interferon. Os neutrófilos expressaram 66 genes acima do limite de detecção da técnica. Alguns dos genes que não foram detectados nos procedimentos foram genes de citocinas como IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IL-6, IL-10 entre outros confirmando os dados anteriores que mostram que neutrófilos não são fontes de citocinas durante a malária. Dos 66 genes expressos por neutrófilos, 34 foram classificados como diferencialmente expressos durante a infecção por *P. vivax* com um valor de $P < 0.05$ e uma indução maior que 1.8 (Anexo 2-Tabela 3). Os genes mais induzidos durante a infecção em neutrófilos foram genes estimulados por interferon (ISGs). A maioria dos ISGs induzidos durante a malária estão relacionados com funções anti-virais como *VIPERIN* (CHIN; CRESSWELL, 2001), *IFIT1* (PICHLMAIR et al., 2011), *IFIT2* (FENSTERL et al., 2012) e *SAMHD1* (LAGUETTE et al., 2011). Outros ISGs induzidos em neutrófilos foram receptores de reconhecimento de padrões como o *RIG-I* (YONEYAMA et al., 2004), *IFI16* (UNTERHOLZNER et al., 2010) e *AIM2* (HORNUNG et al., 2009); fatores reguladores de IFN como IRF2, IRF5 e IRF7; genes inibidores de citocinas como SOCS1 (MADONNA et al., 2008); e a quimiocina *CXCL10*. Além dos ISGs, outros genes com diferentes funções foram induzidos durante a malária em neutrófilos como por exemplo *ICAM1* e *CASP1* entre outros. Somente três genes apresentaram uma expressão reduzida durante a infecção com *P. vivax*: receptor do tipo *Toll*, TLR9; um componente do

inflamassoma, *NLRP6*; e o gene para a enzima heme oxygenase 1, *HMOX1* (Figura 11A).

Em seguida foi realizado um experimento com neutrófilos purificados de indivíduos saudáveis que foram estimulados com IFN do tipo I e IFN-γ. Assim foi possível determinar qual interferon é responsável pela indução da expressão destes ISGs durante a malária. Dos 19 ISGs que foram induzidos durante a fase aguda da doença, a grande maioria apresentou uma maior expressão quando estimulados com IFN do tipo I. Alguns genes como *CXCL10* e *IFI30* apresentaram os mesmos níveis de expressão com os dois estímulos enquanto o único gene que foi mais induzido quando estimulado com IFN-γ foi um gene que codifica uma proteína associada a regulação do citoesqueleto, PSTPIP2 (WU; DOWBENKO; LASKY, 1998) (Figura 11B). Portanto todos estes dados indicam que essa assinatura de ISGs presente em neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* é predominantemente devido a resposta a IFN do tipo I.

Também foi avaliado o perfil de expressão gênica nos LDGs e comparado com neutrófilos nos pacientes na fase aguda da malária. Ao contrário do perfil de indução de ISGs encontrado nos neutrófilos, os LDGs não apresentaram esse aumento na indução destes genes. Somente os genes *SAMHD1*, *PSTPIP2*, *IFI16* e *IFI30* apresentaram altos níveis de expressão semelhantes aos de neutrófilos de pacientes (Figura 11C). Isto sugere diferentes funções destas duas populações de neutrófilos encontradas em pacientes infectados com *P. vivax*.

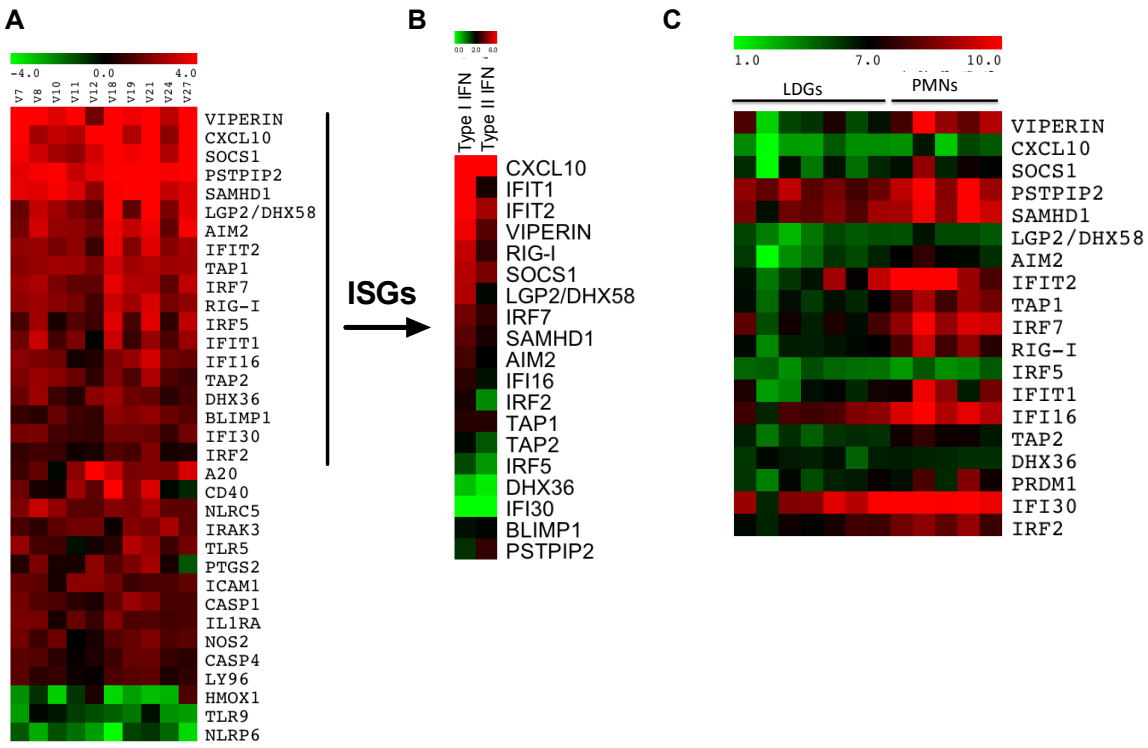


Figura 11. Neutrófilos apresentam uma assinatura de genes estimulados por interferon durante a malária. (A) Análise de expressão gênica de neutrófilos purificados de 10 pacientes infectados com *P. vivax*. Representação do *heatmap* de 32 genes diferencialmente expressos durante a infecção. O *heatmap* indica a razão de genes normalizados na escala logarítmica na base 2 (*P. vivax*/após o tratamento). Os genes estão indicados nas linhas enquanto cada coluna representa os pacientes. (B) Representação do *heatmap* de genes que foram diferencialmente expressos durante a malária e classificados como genes estimulados por interferon (ISGs). Neutrófilos de indivíduos saudáveis foram purificados e estimulados com 1000 U/mL de interferon do tipo I ou 100 ng/mL de IFN do tipo II (IFN-γ) por duas horas e as amostras foram normalizadas com os controles não estimulados (n=3). O *heatmap* mostra a razão na escala logarítmica na base 2 (IFN do tipo I ou IFN-γ /não estimulado) de ISGs diferencialmente expressos durante a malária. (C) Valores absolutos da contagem de mRNA gerada pelo *nanostring* de neutrófilos (n=5) e LDGs (n=7) de pacientes infectados com *P. vivax*. O *heatmap* mostra ISGs que foram diferencialmente expressos durante a infecção e as colunas representam LDGs ou neutrófilos normalizados com genes constitutivos.

Foi observado também que quanto maior a expressão de alguns destes ISGs induzidos durante a malária, como o *LGP2* (r=0.8120) (Figura 12A), *VIPERIN* (r=0.6826) (Figura 12B) e *IRF5* (r=0.6666) (Figura 12C) maior as concentrações séricas de AST. Outros ISGs apresentaram uma tendência de correlação positiva com os valores de AST, como o *TAP2* (r=0.6547) (Figura 12D), *RIG-I* (r=0.6420) (Figura 12E) e *IRF7* (r=0.5847) (Figura 12F). Sabe-se que a malária causa um aumento nas concentrações de AST e se não tratado

adequadamente o dano hepático pode se deteriorar. Portanto esses dados indicam uma relação entre os altos níveis de AST e a expressão destes genes em neutrófilos.

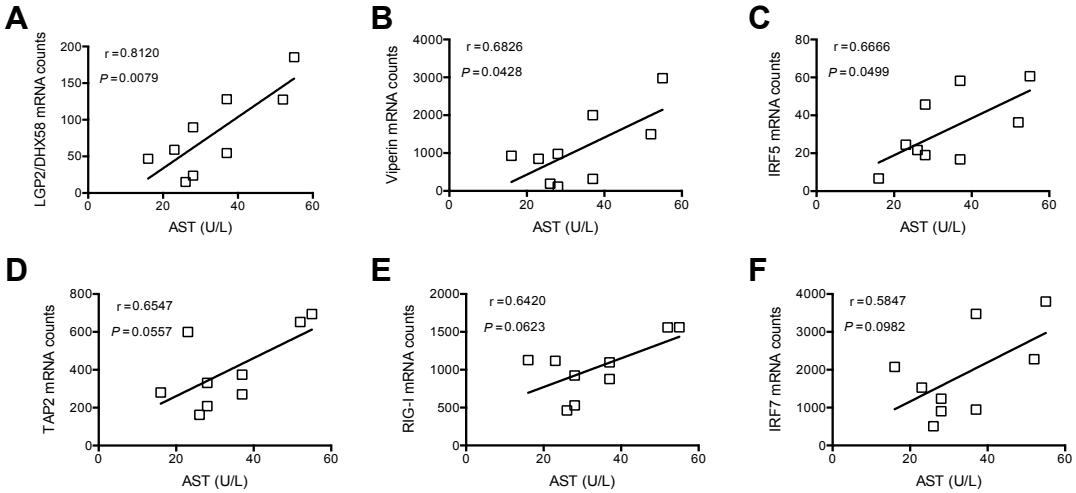


Figura 12. Expressão de ISGs em neutrófilos correlaciona com os níveis de AST. mRNAs de ISGs que foram estimulados durante a malária em neutrófilos, *LGP2/DHX58* (A), *VIPERIN* (B), *IRF5* (C), *TAP2* (D), *RIG-I* (E) e *IRF7* (F) correlacionam ou apresentam uma tendência de correlação positiva com os níveis séricos de AST (U/L) no sangue dos pacientes infectados com *P. vivax*. Cada quadrado indica dados de um paciente e os valores de P e de r estão indicados em cada gráfico.

5.9 Neutrófilos são recrutados para o fígado após a infecção com *P. chabaudi* e são responsáveis pelo dano hepático observado nos animais

Baseado nos resultados observados em humanos o próximo passo foi avaliar o papel de neutrófilos no modelo murino de infecção com *P. chabaudi*. Inicialmente utilizando animais C57BL/6, foi realizado uma microscopia intravital na qual os neutrófilos foram marcados com o anti-GR1 e os fígados destes animais foram expostos para obtenção de imagens e contagem dos números de células marcadas. O sucesso da infecção desses animais foi confirmado por esfregaços sanguíneos e também pela presença de pigmentos pretos (hemozoína) encontrados somente nos fígados de animais infectados visualizados pela microscopia de luz transmitida (Figura 13A). Foi realizada a contagem do número de neutrófilos em diferentes dias após a infecção para

avaliar o dia com o maior recrutamento destas células. Pode-se observar um aumento significativo de neutrófilos após 7, 11 e 14 dias da infecção quando comparados com os animais não infectados (Figura 13B). A média do número de neutrófilos por campo contado em camundongos não infectados foi de 25.73 ± 4.69 (média ± SEM) enquanto a média dos animais infectados aumentou para 177.9 ± 22.93, 204.7 ± 11.44 e 140.9 ± 3.99 neutrófilos por campo de visualização (FOV) após 7, 11 e 14 dias respectivamente. Para avaliar o dano hepático, a concentração sérica de ALT foi medida nesses animais após os diferentes dias de infecção e novamente os animais infectados apresentaram um aumento significativo dos níveis de ALT quando comparados com os animais não infectados (Figura 13C). Baseado nesses resultados foi decidido utilizar nos experimentos seguintes o 11^{o} dia após a infecção uma vez que esse dia foi o que apresentou o maior número de neutrófilos e o maior dano hepático.

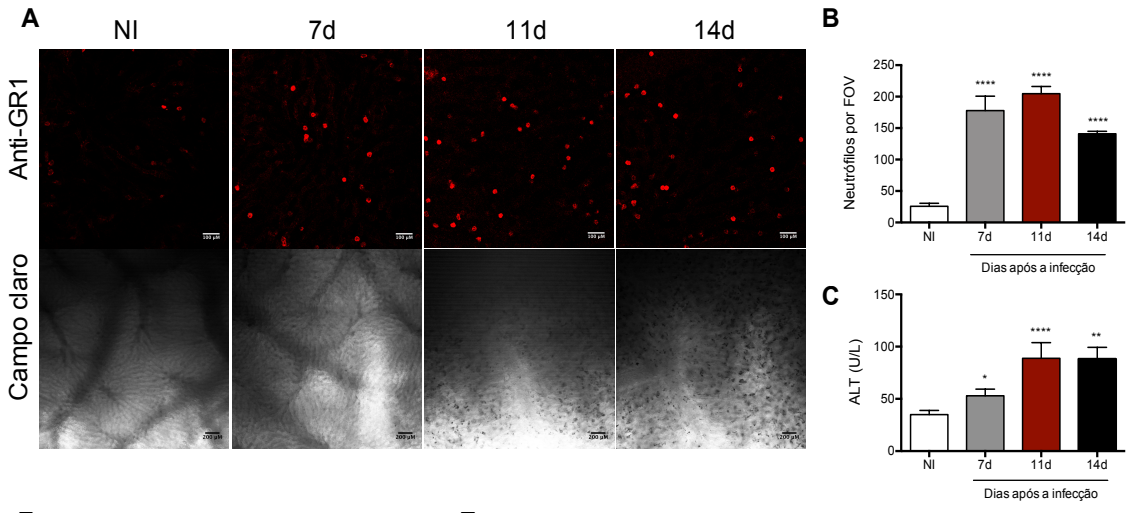


Figura 13. Neutrófilos são recrutados para o fígado durante a infecção por *P. chabaudi*. Neutrófilos foram quantificados por microscopia intravital. (A) Painel superior: Imagens representativas de marcação de PMNs com anti-GR1 em animais não infectados (NI) e em camundongos após diferentes dias de infecção com *P. chabaudi*. Painel inferior: Imagens representativas de microscopia de luz transmitida (*Bright field*) das amostras utilizadas no painel superior. As escalas estão representadas nas figuras: Painel superior, 100 µM; Painel inferior, 200 µM. (B) Quantificação da contagem do número de neutrófilos por pelo menos quatro campos de visualização (FOV) de animais não infectados e de camundongos após 7, 11 e 14 dias de infecção por *P. chabaudi*. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes (n=4). (C) Dosagem de ALT nos soros dos camundongos infectados e não infectados (n=8). As diferenças estatísticas das contagens dos números de neutrófilos e dos níveis de ALT no soro são relacionadas aos animais não infectados e o teste estatístico utilizado foi o *One-way* Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. *0.05>P>0.01; **0.01>P>0.001; ****P<0.0001.

Em seguida foi realizado um experimento para determinar a importância dos neutrófilos no dano hepático observado nos animais infectados com *P. chabaudi*. Para isso os neutrófilos foram depletados do sangue periférico de animais infectados ou não com *P. chabaudi*, através da injeção intraperitoneal de um anticorpo específico anti-Ly6G (clone 1A8) ou de um anticorpo isotipo controle (clone 2A3). Uma redução de aproximadamente 86% da quantidade de células $CD11b^{+}Ly6C^{int}Ly6G^{+}$ (neutrófilos) no sangue periférico foi encontrada em animais infectados com *P. chabaudi* e tratados com anti-Ly6G após 11 dias de infecção confirmando o sucesso de depleção destas células durante a infecção (Figura 14A). A depleção de neutrófilos também foi avaliada nos fígados dos animais infectados tratados com o anti-Ly6G ou com o controle do isotipo utilizando a microscopia intravital após 11 dias de infecção (Figura 14B). A média da quantificação de neutrófilos por FOV foi de 278.9 ± 17.6 (média ± SEM) e 24.31 ± 4.1 em animais infectados com *P. chabaudi* tratados com isotipo controle (clone 2A3) e com o anti-Ly6G (clone 1A8), respectivamente. Já os camundongos não infectados apresentaram uma contagem de neutrófilos similar aos animais tratados com o anti-Ly6G (isotipo controle: 12.9 ± 2.7; anti-Ly6G: 25.6 ± 4.2) (Figura 14C). Os níveis de ALT no soro destes animais também foi avaliado e observou-se uma redução nas concentrações séricas de ALT nos camundongos infectados e tratados com anti-Ly6G quando comparados com animais infectados e tratados com isotipo controle (Figura 14D). Este resultado sugere um papel importante na indução de dano hepático pelos neutrófilos no modelo de infecção com malária.

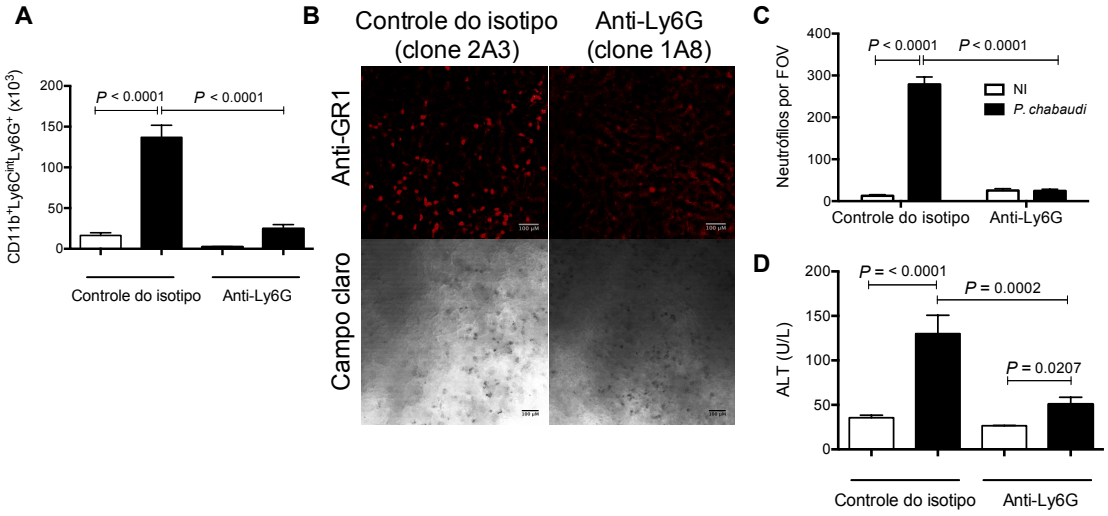


Figura 14. Neutrófilos induzem dano hepático em camundongos infectados com *P. chabaudi*. Quantificação de neutrófilos por microscopia intravital e por citometria de fluxo de animais infectados por 11 dias com *P. chabaudi* tratados com anti-Ly6G (clone 1A8) ou com controle do isotipo (clone 2A3). (A) Quantificação do número de neutrófilos ($CD11b^{+}Ly6C^{int}Ly6G^{+}$) no sangue periférico, por citometria de fluxo. Resultados são de 2 experimentos independentes (n=8). (B) Imagens representativas de microscopia intravital da marcação de anti-GR1 (painel superior) e de luz transmitida (painel inferior). As escalas estão representadas nas figuras: Painel superior, 100 µM; Painel inferior, 200 µM. (C) Quantificação do número de neutrófilos por pelo menos quatro campos de visualização (FOV) de animais não infectados (NI) e de camundongos após 11 dias de infecção por *P. chabaudi* tratados com anti-Ly6G (clone 1A8) ou com isotipo controle (clone 2A3) (n=3). (D) Níveis de ALT no soro de animais não infectados e de camundongos após 11 dias de infecção tratados com anti-Ly6G (clone 1A8) ou com controle do isotipo (clone 2A3) (n=8). (A, C e D) Os valores de P estão indicados nos gráficos e as diferenças foram calculadas com o teste *One-way* Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

Para confirmar a especificidade da depleção de neutrófilos, as frequências e números absolutos de outros leucócitos foram avaliados no sangue total após 11 dias de infecção com *P. chabaudi* em animais tratados com anti-Ly6G (clone 1A8) ou tratados com isotipo controle (clone 2A3). Células T $CD4^{+}$ e T $CD8^{+}$ não apresentaram diferenças nem na frequência nem nos números absolutos nos animais infectados tratados com anti-Ly6G quando comparados com camundongos infectados e tratados com isotipo controle (Figura 15A). Entretanto, os monócitos inflamatórios ($Cd11b^{+}Ly6C^{hi}Ly6G^{-}$) apresentaram um aumento significativo tanto da frequência quanto do número absoluto de células nos animais infectados e tratados com anti-Ly6G (Figura 15B). Portanto esses dados sugerem que o tratamento com anti-Ly6G foi

específico para depleção de apenas neutrófilos. Ao avaliar a parasitemia por esfregaço sanguíneo dos camundongos infectados com os respectivos tratamentos, observou-se um aumento do número de hemácias infectadas nos animais tratados com anti-Ly6G (Figura 15C) sugerindo que os neutrófilos participam de alguma maneira na eliminação do *P. chabaudi*. Possivelmente pela produção de ROS que se produzido em grandes quantidades pode gerar danos teciduais.

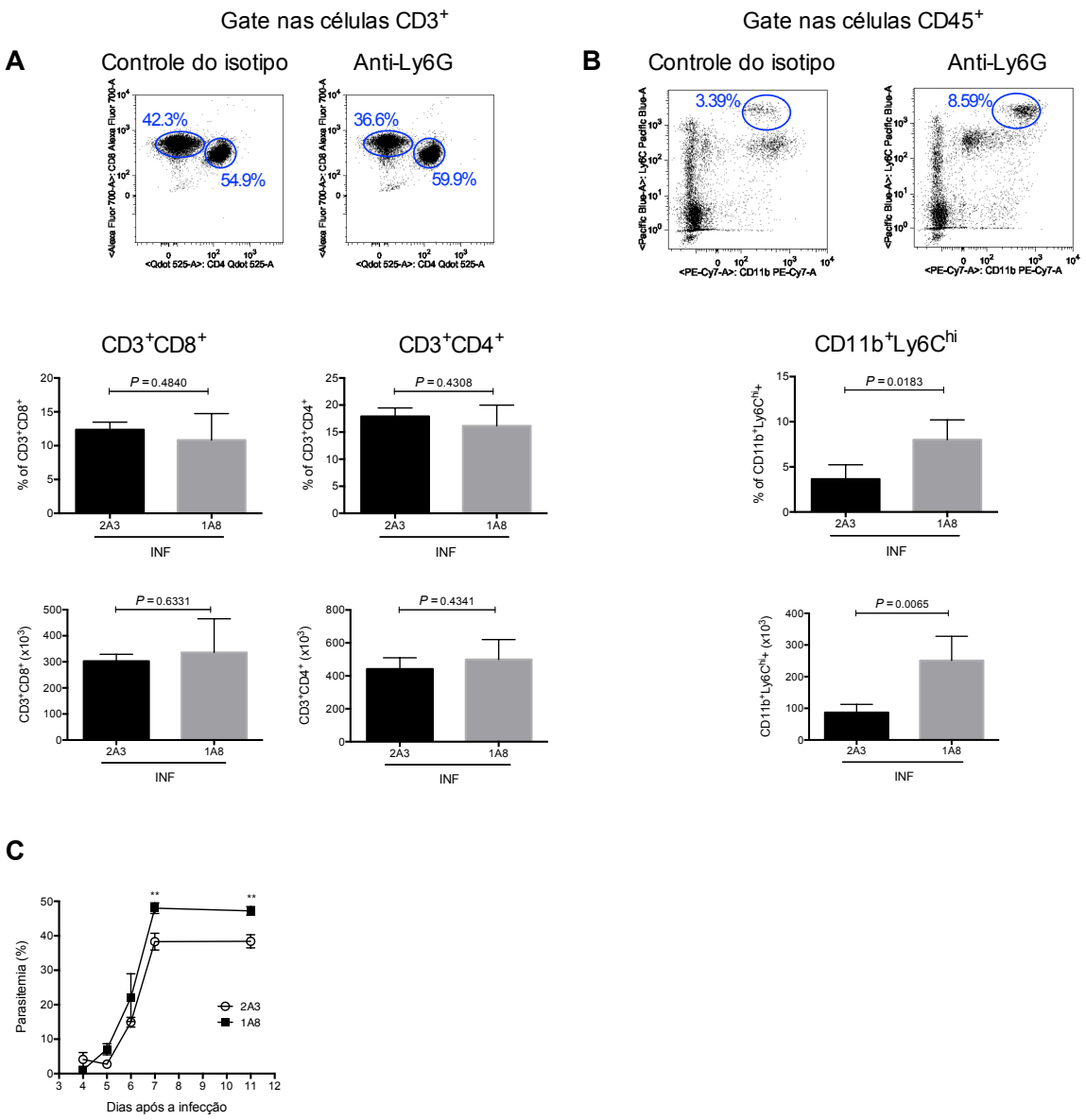


Figura 15. A depleção de neutrófilos afeta o número de outros leucócitos no fígado de animais infectados com *P. chabaudi*. Camundongos tratados com anti-Ly6G (clone 1A8) ou com isotipo controle (clone 2A3) foram infectados com *P. chabaudi* e 11 dias após a infecção diferentes populações celulares foram avaliadas no sangue periférico destes animais por citometria de fluxo. (A) Painel superior: *dotplot*s representativos de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ de animais infectados e tratados com os anticorpos mencionados acima. Painéis inferiores: gráfico de barras da frequência e do número absoluto de células T $CD3^+CD8^+$ (esquerda) e T $CD3^+CD4^+$ (direita). (B) Painel superior: *dotplot* representativo de células $CD11b^+Ly6C^{hi}$ de animais infectados e tratados com anti-Ly6G e com isotipo controle. Painel inferior: gráfico de barras da frequência e do número absoluto de células $CD11b^+Ly6C^{hi}$. Os testes estatísticos utilizados para determinar as diferenças entre os tratamentos foram o Teste T não pareado ou Teste de Mann-Whitney quando os dados não apresentavam uma distribuição normal. Os valores de P estão indicados em cada gráfico. (C) Parasitemia foi avaliada através da coloração de Giemsa de esfregaços sanguíneos em diferentes dias após a infecção com *P. chabaudi* e as diferenças encontradas são em relação aos tratamentos com anti-Ly6G e com o isotipo controle para cada dia. **0.01>P>0.001.

5.10 A sinalização por IFN do tipo I regula o recrutamento de neutrófilos para o fígado

Após a confirmação da importância dos neutrófilos no desenvolvimento do dano hepático na infecção com *P. chabaudi*, o próximo passo foi avaliar o papel da sinalização por IFN do tipo I neste modelo, visto que em humanos neutrófilos de pacientes infectados apresentaram uma indução de ISGs predominantemente por IFN do tipo I. Para isso foi utilizado nestes experimentos camundongos deficientes para o receptor do IFN do tipo I ($IFN\alpha\beta R^{-/-}$). Inicialmente foi avaliado o número de neutrófilos por microscopia intravital após 11 dias de infecção com *P. chabaudi* em animais selvagens (WT) e em camundongos $IFN\alpha\beta R^{-/-}$. A média do número de neutrófilos por FOV dos animais infectados WT foi de 284.1 ± 13.4 (média ± SEM) enquanto observou-se uma redução na média dos camundongos $IFN\alpha\beta R^{-/-}$ para 168.6 ± 9.7 (Figura 16A e 16B). Essa diminuição no número de neutrófilos no fígado em animais $IFN\alpha\beta R^{-/-}$ foi suficiente para impedir o aumento dos níveis de ALT no soro de camundongos infectados. As concentrações de ALT no soro dos animais $IFN\alpha\beta R^{-/-}$ infectados foi semelhante às dos não infectados, enquanto observou uma diferença significativa quando comparados com o selvagem infectado (Figura 16C).

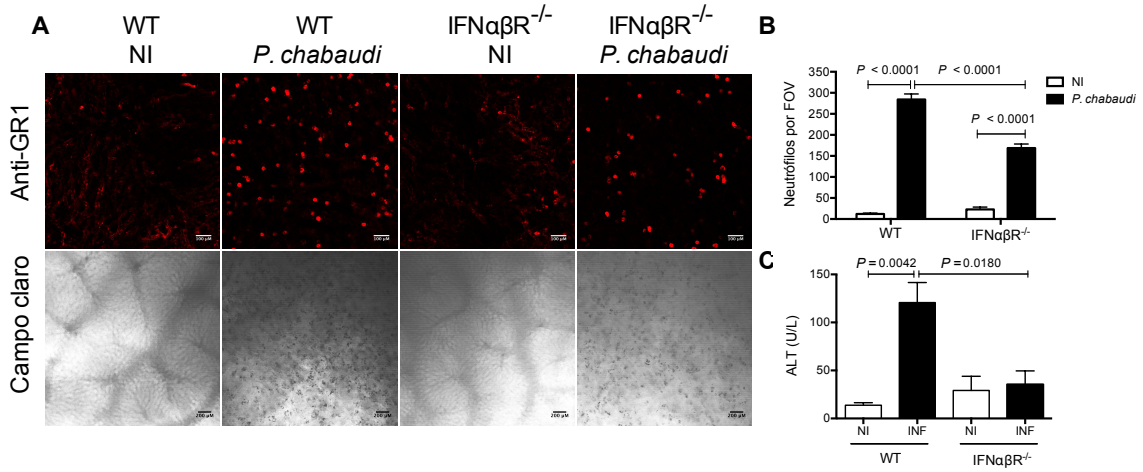


Figura 16. A sinalização de interferon do tipo I regula o recrutamento de neutrófilos para o fígado após infecção com *P. chabaudi*. A quantificação do número de neutrófilos foi realizada por microscopia intravital. (A) Imagens representativas da marcação de PMNs com anti-GR1 (painel superior) e de microscopia de luz transmitida (painel inferior) de animais selvagens (WT) e IFNαβR$^{-/-}$ não infectados e infectados com *P. chabaudi* por 11 dias. As escalas estão representadas nas figuras: Painel superior, 100 µM; Painel inferior, 200 µM. (B) Quantificação da contagem do número de neutrófilos por pelo menos quatro campos de visualização (FOV) de de animais WT e IFNαβR$^{-/-}$ não infectados e de camundongos após 11 dias de infecção por *P. chabaudi*. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes (n=4). Os dados estão representados como a média ± SD. (C) Dosagem dos níveis séricos de ALT nestes animais (n=4). Dados representativos da media ± SEM. Os valores de P estão indicados nos gráficos e as diferenças foram calculadas com o teste *Oneway* Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey..

Para tentar desvendar como a sinalização via IFN do tipo I regula o recrutamento de neutrófilos para o fígado em animais infectados com *P. chabaudi*, a expressão gênica de diferentes quimiocinas e citocinas foi avaliada em amostras do fígado de animais infectados e não infectados WT e IFNαβR$^{-/-}$. Observou-se que a sinalização por IFN do tipo I induz a expressão de mRNA das quimiocinas CCL3 (Figura 17A) e CXCL1 (Figura 17B) assim como a expressão da citocina pró-inflamatória IL-1β (Figura 17C) nos animais infectados com *P. chabaudi*. A indução de CCL3 e IL-1β nos camundongos infectados WT apresentou um aumento significativo no sétimo dia após a infecção quando comparados com os IFNαβR$^{-/-}$, enquanto a expressão da quimiocina CXCL1 foi aumentada no terceiro dia e manteve-se mais expressa no sétimo dia após a infecção. Portanto, a sinalização por IFN do tipo I regula a expressão de moléculas que são conhecidas por induzir o recrutamento de neutrófilos e assim impede essas células de migrarem para o fígado durante a infecção com *P.*

chabaudi e causar o dano hepático. A expressão de genes que são conhecidos por serem induzidos por IFN do tipo I também foram analisados no fígado de animais WT e IFNαβR$^{-/-}$. A expressão de IFI44 (*interferon induced protein* 44) (Figura 17D) IRF7 (*interferon regulatory factor* 7) (Figura 17E) e IFIT1 (*interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1*) (Figura 17F) está aumentada em camundongos WT após 3 e 7 dias da infecção quando comparados em relação aos mesmos dias em animais deficientes para a sinalização de IFN do tipo I. O aumento da expressão desses genes confirma que a infecção com *P. chabaudi* induziu a produção de ISGs no fígado no inicio da infecção contribuindo para a indução dos genes de quimiocinas e de IL-1β.

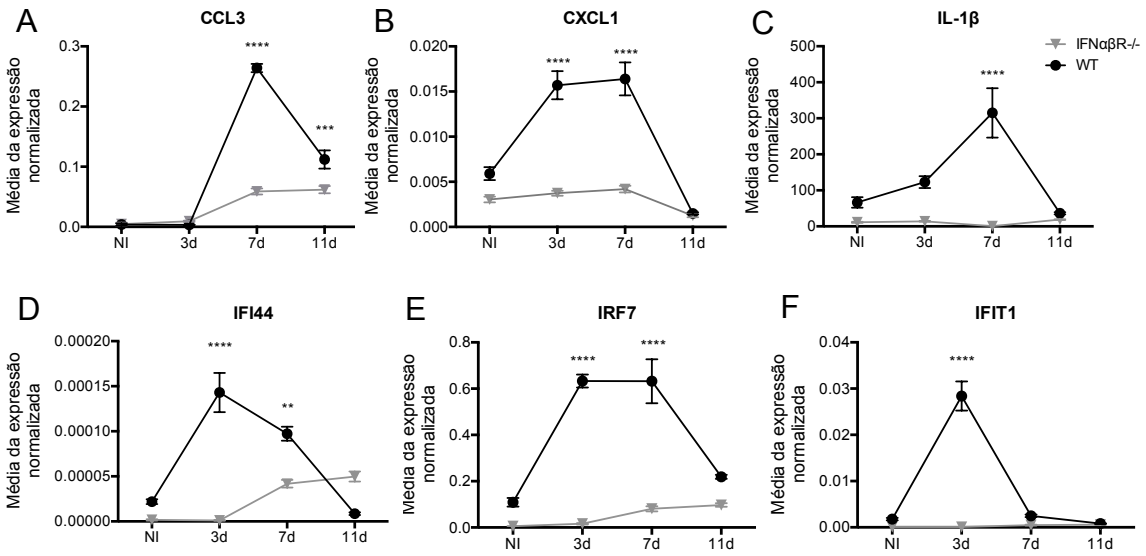


Figura 17. Sinalização de IFN do tipo I induz a expressão de quimiocinas e IL-1β no fígado de animais infectados com *P. chabaudi*. Expressão gênica de CCL3 (A), CXCL1 (B), IL-1β (C), IFI44 (D) IRF7 (E) e IFIT1 (F) em animais WT e IFNαβR$^{-/-}$ após diferentes dias de infecção (3, 7 e 11). Os dados estão representados como a média ± SEM de amostras normalizadas com o gene GAPDH (n=3). As diferenças indicadas na figura são em relação aos animais WT e foram calculadas pelo teste *Twoway* Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Sidak. **0.01>P>0.001; ***0.001>P>0.0001; ****P<0.0001.

5.11 Dano hepático e recrutamento de neutrófilos para o fígado durante a infecção com *P. chabaudi* é dependente de Caspase-1

Uma vez que a expressão de mRNA de IL-1β é controlada por interferon do tipo I e que esta molécula participa da migração de neutrófilos, resolvemos investigar o papel de Caspase-1 no recrutamento de neutrófilos. Para isso foi

utilizado nos experimentos animais deficientes para Caspase-1/11 (Casp 1/11$^{-/-}$). O número de neutrófilos nos fígados dos animais *knockouts* infectados testados foi significativamente menor quando comparados com os WT infectados (Figura 18A).

Como visto nos animais IFNαβR$^{-/-}$, a redução no número de neutrófilos no fígado encontrada em animais Casp 1/11$^{-/-}$ contribuiu para a proteção do dano hepático. Camundongos WT apresentaram concentrações séricas de ALT maiores que o Casp 1/11$^{-/-}$. Os níveis de ALT no soro dos animais knockouts infectados foram semelhantes aos dos animais não infectados (Figura 18B). Portanto esses resultados sugerem um papel de Caspase-1/11 no recrutamento de neutrófilos para o fígado durante a infecção com *P. chabaudi*, levando ao dano hepático.

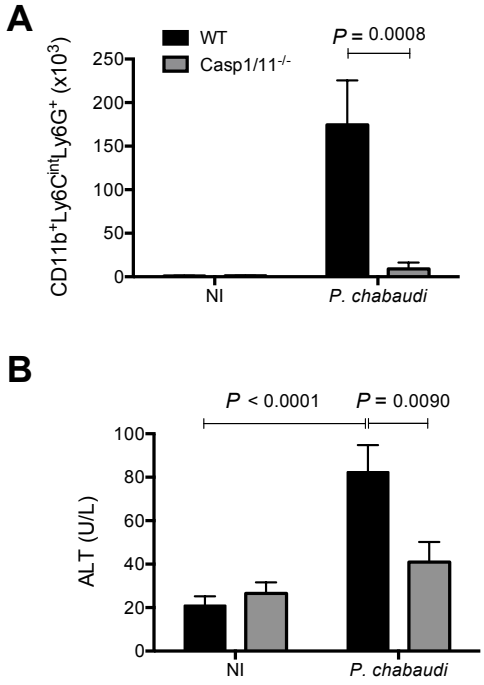


Figura 18. Recrutamento de neutrófilos para o fígado e o dano hepático formado após infecção com *P. chabaudi* é dependente de Caspase-1/11. A quantificação de neutrófilos foi realizada por citometria de fluxo. Contagem do número absoluto de neutrófilos (CD11b^{+}Ly6C^{int}Ly6G^{+}) após purificação dos leucócitos do fígado (A) e dosagem dos níveis séricos de ALT (B) de animais WT (Barra preta) e Casp1/11$^{-/-}$ (barra cinza) infectados ou não com *P. chabaudi* (n=6-8). Os dados estão representados como média ± SEM. As diferenças indicadas na figura são em relação aos animais WT infectados e foram calculadas pelo teste *Oneway* Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (A e B) Os valores de P estão representados nos gráficos.

6 DISCUSSAO

A ativação da imunidade inata levando a inflamação sistêmica durante episódios de malária é uma das responsáveis pelos sintomas clínicos da doença. A maioria dos casos mais graves de malária é causado pelo *P. falciparum* porém diferentes trabalhos vem demonstrando que o *P. vivax* também se associa com complicações, como a síndrome de respiratória aguda, trombocitopenia e anemia grave (ALEXANDRE et al., 2010; ANDRADE et al., 2010; LACERDA et al., 2012; TJITRA et al., 2008). No presente trabalho, os pacientes infectados com *P. vivax* apresentaram trombocitopenia e aumento significativo dos níveis séricos das enzimas hepáticas quando comparados com os mesmos indivíduos após o tratamento. Apesar destas alterações nos parâmetros laboratoriais, nenhum dos pacientes que foram inclusos neste trabalho foi diagnosticado com malária grave. O aumento dos níveis de AST e ALT nos soros de pacientes infectados com *P. vivax* pode ser em decorrência do dano hepático causado pela inflamação induzida pelo parasito. O aumento da concentração destas aminotransferases no soro é um indicativo de dano tecidual no fígado, como observado em diversas doenças hepáticas (PRATT; KAPLAN, 2000). Já a trombocitopenia observada nos pacientes com malária pode ser justificada por diversos mecanismos como distúrbios na coagulação, aumento do sequestro de plaquetas para o baço, presença de radicais livres que vão atuar na destruição das plaquetas, entre outros (LACERDA et al., 2011). Além das plaquetas, monócitos e neutrófilos apresentaram alterações durante a infecção por *P. vivax*, entretanto foi observado um aumento no número dessas células no sangue periférico.

Já está bem estabelecido que durante a malária ocorre uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias tanto em *P. falciparum* (CLARK et al., 2006; WALTHER et al., 2006) quanto em *P. vivax* (ANDRADE et al., 2010). No presente trabalho, foi confirmado o aumento na produção de IL-8, IL-6, IL-1β e IL-10 nos soros de pacientes infectados com *P. vivax* quando comparados com os mesmos indivíduos após o tratamento. A complexa relação entre estas citocinas pode induzir ao aparecimento de complicações na malária. Pacientes

infectados com *P. falciparum* com malária grave apresentaram níveis séricos elevados de IL-6 e IL-10 quando comparados com indivíduos com malária moderada (LYKE et al., 2004). IL-6 atua em conjunto com outros mediadores inflamatórios para controlar a parasitemia (HARPAZ et al., 1992; LYKE et al., 2004). Já IL-10 tem um papel na imunorregulação, diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias (PESTKA et al., 2004).

Como foi encontrado um aumento no número de monócitos e de neutrófilos assim como uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias a ativação destas células durante a infecção com *P. vivax* foi avaliada para determinar quais são as fontes produtoras destas citocinas. Inicialmente detectou-se que tanto os monócitos quanto os neutrófilos circulantes estavam ativados durante a infecção. A ativação destas células foi definida pela redução na expressão de diferentes marcadores de superfície. Porém quando avaliou-se a produção de citocinas após estímulos com agonistas de TLRs, os monócitos purificados de pacientes com *P. vivax* produziram níveis elevados de IL-6, IL-1β e TNF-α. Esse mesmo perfil de produção de citocinas após estímulos com agonistas de TLRs já tinha sido observado em PBMCs de pacientes experimentalmente ou naturalmente infectados com *P. falciparum* (FRANKLIN et al., 2009; MCCALL et al., 2007).

Uma vez que os monócitos são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias durante a malária e que já foi descrito que eles possuem subpopulações com diferentes funções no sangue periférico (CROS et al., 2010; ZAWADA et al., 2011), o perfil de expressão gênica destas subpopulações foi avaliada em pacientes infectados com *P. vivax*. Os monócitos clássicos ($CD14^+CD16^-$) assim como os inflamatórios ($CD14^+CD16^+$) foram os que apresentaram um maior aumento na expressão de genes com perfil pró-inflamatório.

Os neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* apesar de não produzirem citocinas apresentaram outras funções como demonstrado nesse trabalho. O papel destas células durante a malária ainda não é muito bem compreendido. Em *P. falciparum* e em um modelo murino de malária, *P. yoelli*,

foi demonstrado que a hemólise intravascular, libera grupo heme livre na circulação que recrutará neutrófilos da medula óssea com uma menor capacidade de produção de ROS contribuindo assim para um aumento na susceptibilidade a uma infecção secundária por *Salmonella* (CUNNINGTON et al., 2012a; 2012b). Entretanto observamos que neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* apresentam uma maior produção de ROS que células de indivíduos saudáveis. Os nossos dados corroboram com resultados obtidos por outros grupos que também observaram uma maior liberação de ROS em neutrófilos de pacientes infectados com *P. falciparum* (KAPELSKI et al., 2014) ou em células purificadas de indivíduos saudáveis que fagocitaram o vacúolo digestivo do parasito que é liberado juntamente com merozoitos (DASARI et al., 2011). Uma correlação foi encontrada entre elevados níveis de ROS produzidos por neutrófilos com uma rápida eliminação do *P. falciparum* da circulação demonstrando uma importância efetora destas células e de ROS durante episódios de malária (CLARK; HUNT, 1983; GREVE et al., 1999).

Além da produção de ROS, nós confirmamos a ativação dos neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax* através do aumento da capacidade fagocítica (LEORATTI et al., 2012) e da produção de MPO quando comparado com células dos mesmos pacientes após o tratamento ou de indivíduos saudáveis. Estes dados corroboram com estudos anteriores que demonstraram a ativação de neutrófilos provenientes de infecção com *P. falciparum* através do aumento das concentrações plasmáticas de MPO, lisozima e lipocalina (MOHAMED et al., 1996; MOHAMMED et al., 2003). O processo de ativação dos neutrófilos durante a malária pode ocorrer através do contato direto com o parasito, pela produção de citocinas, pela fagocitose de merozoítos opsonizados (CELADA; CRUCHAUD; PERRIN, 1983) ou então por outros mediadores produzidos durante a infecção como o cristal de hemozoína (HUY et al., 2006). Por outro lado se essa ativação não for controlada, os neutrófilos podem contribuir com danos teciduais e estas células já foram associadas à malária cerebral em estudos utilizando modelo murino do *P. berghei*. A depleção de neutrófilos protegeu os animais infectados dos sintomas da malária cerebral (CHEN;

ZHANG; SENDO, 2000). Outros modelos de infecção confirmam a importância dos neutrófilos em causar danos teciduais quando a ativação destas células não é controlada como na tuberculose (CRUZ et al., 2010), toxoplasmose (DUNAY; FUCHS; SIBLEY, 2010) e em inflamações no fígado induzidas por elevadas dosagens de fármacos (MARQUES et al., 2015a).

No presente trabalho nós descrevemos pela primeira vez um aumento na frequência de uma subpopulação de neutrófilos com baixa densidade (LDGs) no sangue periférico de pacientes com malária. Estas células estão ativadas durante a infecção de acordo com os elevados níveis de expressão de marcadores de ativação. Além disso nós confirmamos que os LDGs de pacientes infectados com *P. vivax* são células maduras uma vez que não expressam marcadores de superfície de células progenitoras e expressam CD16, uma molécula na qual sua expressão aumenta à medida que as células amadurecem (ELGHETANY, 2002). Nossos resultados estão de acordo com os dados encontrados em LDGs de pacientes com SLE que foram considerados maduros pela expressão de marcadores de superfície específicos (DENNY et al., 2010). Além disso a ativação *in vitro* com PMA e fMLP (n-formil-metionil-leucil-fenilalanina) de neutrófilos purificados de indivíduos saudáveis levou ao aparecimento destes LDGs após um gradiente de separação por densidade com aumento de expressão de CD66b (RODRIGUEZ et al., 2009). Estes resultados sugerem que os LDGs encontrados em pacientes infectados com *P. vivax* são neutrófilos previamente ativados que sofreram degranulação.

Em seguida o perfil de expressão gênica dos neutrófilos purificados durante a infecção com *P. vivax* foi avaliado. Observou-se pela primeira vez uma assinatura de genes estimulados por interferon (ISGs) nestas células. Assim como os neutrófilos, o PBMC de pacientes infectados com *P. falciparum* também apresentou um aumento na expressão de ISGs (SHARMA et al., 2011). Um padrão similar de expressão gênica foi observado em neutrófilos de outros modelos de infecção como em SLE (GARCIA-ROMO et al., 2011) e em tuberculose (BERRY et al., 2010). Neste último trabalho a expressão de ISGs em neutrófilos correlaciona com a gravidade da doença reforçando um papel do

IFN do tipo I na patogênese da tuberculose. Outro trabalho além de demonstrar uma assinatura de ISGs em neutrófilos de pacientes com periodontite ele correlaciona essa expressão com o aumento da produção de ROS (WRIGHT et al., 2008). Esta associação pode ser uma explicação para os elevados níveis de ROS observados em neutrófilos de pacientes infectados com *P. vivax*.

Portanto, neste trabalho observamos que os neutrófilos estão ativados durante a infecção por *P. vivax* através da expressão de moléculas de ativação, do aumento da produção de ROS e MPO, da presença de LDGs e pelo perfil de expressão gênica destas células. Além disso, observamos que estes pacientes apresentavam elevados níveis séricos de transaminases e o aumento da expressão alguns genes estimulados por IFN do tipo I se correlacionava com as concentrações de aspartato aminotransferases. Assim, resolvemos investigar o papel da sinalização por IFN do tipo I em neutrófilos em um modelo murino de malária.

Neste trabalho, foi observado que esta sinalização participa do recrutamento de neutrófilos para o fígado após a infecção com *P. chabaudi*. Além disso, estas células são responsáveis pelo dano tecidual, uma vez que animais infectados e depletados de neutrófilos apresentaram concentrações de ALT similares aos de camundongos não infectados. O dano hepático durante a malária ocorre devido a hemólise intravascular persistente e a resposta inflamatória do hospedeiro. O acúmulo de heme livre, o aumento da produção de ROS e de TNF-α e a ativação da sinalização do NFκB durante a malária favorecem a migração de neutrófilos para o fígado induzindo o dano hepático (DEY et al., 2012). O aumento da expressão do fator de transcrição NFκB pode levar a produção de citocinas como IFN-γ e IL-12 que também são importantes na indução do dano hepático (ADACHI et al., 2001; YOSHIMOTO et al., 1998). Além de neutrófilos outras células também participam do dano tecidual, como os linfócitos NKT $DX5^+$ (células T *natural killer*) gerados independentes de CD1d durante a infecção com *P. berghei* (ADACHI et al., 2004).

Já foi demonstrado que o IFN do tipo I participa do recrutamento de leucócitos durante a infecção por malária. Recentemente um trabalho

demonstrou que a ausência da sinalização de IFN do tipo I impediu o aumento da população de células NKT no fígado de animais infectados com *P. yoelli* durante a fase pré-eritrocítica da doença (MILLER et al., 2014). Outro estudo também observou um aumento na expressão de genes estimulados por IFN do tipo I em camundongos infectados com *P. berghei*. Estes autores observaram uma redução no recrutamento de leucócitos para o fígado em animais deficientes para o receptor de interferon do tipo I (LIEHL et al., 2014). Uma molécula que foi encontrada com expressão aumentada durante a infecção nesses trabalhos foi o CXCL10 que é conhecida por recrutar células NK, células T e NKT (GROOM; LUSTER, 2011). Além de induzir a migração de leucócitos para o fígado, o IFN do tipo I também foi relacionado com recrutamento de células T para o cérebro em um modelo de malária cerebral. Assim, a ausência desta sinalização conferiu uma proteção aos animais infectados com *P. berghei* (PALOMO et al., 2013).

Nosso trabalho é o primeiro a mostrar a participação de IFN do tipo I no recrutamento de neutrófilos durante a malária. O mesmo papel para esta sinalização foi encontrado em outros modelos de infecção como na tuberculose e na infecção por *Candida albicans* corroborando com os nossos resultados. Em ambos os trabalhos, o IFN do tipo I induziu recrutamento de neutrófilos para diferentes tecidos causando danos teciduais nos pulmões e nos rins de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e com *C. albicans* respectivamente (DORHOI et al., 2014; MAJER et al., 2012). Entretanto outros autores demonstram que esta sinalização por IFN do tipo I pode inibir a migração de neutrófilos para os sítios de infecção (SEO et al., 2011; SHAHANGIAN et al., 2009; XIN et al., 2010). Estes efeitos opostos observados da sinalização por IFN do tipo I podem ser devidos aos diferentes modelos de infecção utilizados em cada trabalho que vão induzir quantidades variáveis de IFN do tipo I cada um com uma duração especifica, além dos diferentes tecidos analisados.

Uma vez que observamos que a sinalização do IFN do tipo I induz a produção de IL-1β após 7 dias da infecção com *P. chabaudi*, nós resolvemos

avaliar a participação de Caspase-1 no recrutamento de neutrófilos durante a malária. Nosso grupo demonstrou recentemente que a malária induz *in vivo* a ativação de caspase-1 através do inflamassoma NLRP3, levando a uma produção sistêmica de IL-1β (ATAIDE et al., 2014). A hemozoína é um produto gerado a partir da detoxificação do grupo heme livre (SLATER et al., 1991), e este cristal é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 assim como o AIM2 (*absent in melanoma*) induzindo a produção de IL-1β (DOSTERT et al., 2009; KALANTARI et al., 2014; SHIO et al., 2009). Além disso este cristal está associado a danos hepáticos causados durante malária (DEROOST et al., 2014). A injeção de hemozoína sintética induz um aumento da expressão gênica de várias quimiocinas como a CCL3, CCL4 e CXCL2 no fígado dos camundongos (JARAMILLO et al., 2004). Baseado nos dados de produção de citocinas e quimiocinas relatados acima, sugere-se que a hemozoína possui um papel importante no recrutamento de leucócitos para os sítios de infecção como demonstrado pelo aumento da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após administração de hemozoína. Este efeito foi dependente de Caspase-1 (SHIO et al., 2009).

Já foi descrito também que o maior acúmulo de hemozoína ocorre no fígado provavelmente devido ao alto volume de sangue que passa por este órgão assim como pela presença de macrófagos residentes que são capazes de fagocitar e remover esses cristais rapidamente da circulação (DEROOST et al., 2012). No presente trabalho, nós observamos a deposição de hemozoína nos fígados de animais infectados com *P. chabaudi* e sugerimos que estes cristais induzem a produção de quimiocinas e IL-1β, possivelmente por células de kupffer, que em conjunto irão recrutar neutrófilos para o fígado. Essa migração é dependente de IFN do tipo I e Caspase-1. Considerando nossos resultados e os dados publicados na literatura, nós sugerimos que IFN do tipo I induz a ativação de Caspase-1 no fígado que levará a produção de IL-1β, um potente indutor de quimiocinas que culmina no recrutamento de neutrófilos. Consistente com nossos dados, a indução de IL-1β nas infecções com *Francisella tularensis* e

Listeria monocytogenes foi dependente de IFN do tipo I (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2010; HENRY et al., 2007).

Portanto a sinalização de IFN do tipo I é importante no recrutamento de neutrófilos para o fígado que irão induzir um dano hepático. Apesar dos elevados níveis de ALT e AST encontrados nos pacientes com *P. vivax* não causar casos graves de malária, o mecanismo sugerido neste trabalho pode ocorrer em outros órgãos como pulmão e rim, conhecidos por serem afetados durante os casos graves de infecção por *P. falciparum* e *P. vivax*.

7 CONCLUSÕES

Os dados deste trabalham levam a uma melhor compreensão do papel dos neutrófilos durante a malária. Um aumento na expressão de marcadores de ativação e na produção de ROS e MPO, assim como uma assinatura de transcrição de ISGs e uma frequência elevada de LDGs no sangue periférico indicam que os neutrófilos estão ativados durante a infecção com *P. vivax*. Além disso, uma associação entre os altos níveis séricos de transaminases e estas células altamente ativadas sugerem um potencial papel dos neutrófilos no dano hepático em pacientes com malária. Finalmente, foi observado um papel da sinalização do IFN do tipo I e de caspase-1 como mediadores da migração de neutrófilos para o fígado e da indução do dano hepático durante a infecção por *P. chabaudi*. Portanto estes resultados sugerem que os neutrófilos possuem um papel na imunopatogênese da malária.

Referências Bibliográficas

ABI ABDALLAH, D. S. et al. Toxoplasma gondii Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 2, p. 768–777, 20 jan. 2012.

ADACHI, K. et al. Contribution of CD1d-unrestricted hepatic DX5+ NKT cells to liver injury in Plasmodium berghei-parasitized erythrocyte-injected mice. **International Immunology**, v. 16, n. 6, p. 787–798, jun. 2004.

ADACHI, K. 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. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 10, p. 5928–5934, 15 nov. 2001.

AIDOO, M. M. et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX. **Genetic Epidemiology**, v. 21, n. 3, p. 201–211, 1 nov. 2001.

ALEXANDRE, M. A. et al. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 10, p. 1611–1614, out. 2010.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459–489, jan. 2012.

ANDRADE, B. B. et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9, p. 13, 2010.

ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 5, p. 220–227, maio 2009.

ASSELIN-PATUREL, C. et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. **Nature Immunology**, v. 2, n. 12, p. 1144–1150, 1 dez. 2001.

ATAIDE, M. A. et al. Malaria-Induced NLRP12/NLRP3-Dependent Caspase-1 Activation Mediates Inflammation and Hypersensitivity to Bacterial Superinfection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003885, 16 jan. 2014.

AUCAN, C. C. et al. Interferon-alpha receptor-1 (IFNAR1) variants are associated with protection against cerebral malaria in the Gambia. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 4, p. 275–282, 1 jun. 2003.

BAKER, V. S. et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in Plasmodium falciparum infected children under six years of age. **Malaria Journal**, v. 7, p. 41, Feb 29, 2008.

BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y. Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 8, p. 4845–4851, 15 abr. 2005.

BERRY, M. P. R. et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 973–977, 19 ago. 2010.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-γ. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 749–795, 1997.

BOGDAN, C.; MATTNER, J.; SCHLEICHER, U. The role of type I interferons in non-viral infections. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 33–48, dez. 2004.

BORDEN, E. C. et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 6, n. 12, p. 975–990, 1 dez. 2007.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 24 nov. 2010.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 377–410, 1 abr. 2011.

BRANDAU, S. et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 2, p. 311–317, fev. 2011.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 5 mar. 2004.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 1 mar. 2005.

BRUNS, S. et al. Production of extracellular traps against Aspergillus fumigatus in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000873–e1000873, April 29, 2010.

CARNAUD, C. C. et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 9, p. 4647–4650, 1 nov. 1999.

CELADA, A.; CRUCHAUD, A.; PERRIN, L. H. Phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes by human polymorphonuclear leukocytes.

Journal of Parasitology, v. 69, n. 1, p. 49–53, 1 fev. 1983.

CHEN, F. et al. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. **Nature Immunology**, v. 15, n. 10, p. 938–946, out. 2014.

CHEN, J. J.; BAIG, E. E.; FISH, E. N. E. Diversity and relatedness among the type I interferons. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 24, n. 12, p. 687–698, 1 dez. 2004.

CHEN, L.; ZHANG, Z.; SENDO, F. Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 120, n. 1, p. 125–133, 1 abr. 2000.

CHESSLER, A.-D. C. et al. Trypanosoma cruzi triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 4, p. 2288–2296, 15 fev. 2009.

CHIN, K. C.; CRESSWELL, P. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15125–15130, 18 dez. 2001.

CLARK, I. A. et al. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria Journal**, v. 5, p. 85, Oct 10, 2006.

CLARK, I. A.; HUNT, N. H. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1–6, jan. 1983.

CLARK, T. G. et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms and severe malaria in African populations. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 4, p. 569–575, 15 fev. 2009.

CLOKE, T. et al. Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48939–e48939, 1 jan. 2012.

CONTA, B. S.; POWELL, M. B.; RUDDLE, N. H. Production of lymphotoxin, IFN-gamma and IFN-alpha, beta by murine T cell lines and clones. **Journal of Immunology**, v. 130, n. 5, p. 2231–2235, maio 1983.

COSTA, F. T. M. F. et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: Perspectives from the Brazilian field. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1099–1105, 1 nov. 2012.

COSTANTINI, C. C.; CASSATELLA, M. A. M. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 2, p. 221–233, 1 fev. 2011.

COSTANTINI, C. et al. Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc+ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN{gamma}: role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3. **Blood**, v. 117, n. 5, p. 1677–1686, 3 fev. 2011.

COWMAN, A. F. A.; BERRY, D. D.; BAUM, J. J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 6, p. 961–971, 17 set. 2012.

CROS, J. et al. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. **Immunity**, v. 33, n. 3, p. 375–386, 24 set. 2010.

CRUZ, A. et al. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 8, p. 1609–1616, 2 ago. 2010.

CUNNINGTON, A. J. et al. Malaria impairs resistance to Salmonella through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. **Nature Medicine**, v. 18, n. 1, p. 120–127, 1 jan. 2012a.

CUNNINGTON, A. J. et al. Prolonged neutrophil dysfunction after Plasmodium falciparum malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 11, p. 5336–5346, 1 dez. 2012b.

DASARI, P. et al. Digestive vacuoles of Plasmodium falciparum are selectively phagocytosed by and impair killing function of polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 118, n. 18, p. 4946–4956, 3 nov. 2011.

DE JONG, M. O.; WAGEMAKER, G.; WOGNUM, A. W. Separation of myeloid and erythroid progenitors based on expression of CD34 and c-kit. **Blood**, v. 86, n. 11, p. 4076–4085, 1 dez. 1995.

DECKER, T. et al. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 10, p. 1271–1277, maio 2002.

DENNY, M. F. et al. A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 6, p. 3284–3297, 3 mar. 2010.

DEROOST, K. et al. Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the Plasmodium strain. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113519, Nov 24, 2014.

DEROOST, K. et al. Improved methods for haemozoin quantification in tissues yield organ-and parasite-specific information in malaria-infected mice. **Malaria Journal**, v. 11, p. 166–166, 1 jan. 2012.

DEY, S. et al. Impact of Intravascular Hemolysis in Malaria on Liver Dysfunction: Involvement Of Hepatic Free Heme Overload, Nf-kB Activation, And Neutrophil Infiltration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 32, p. 26630–26646, 3 ago. 2012.

DIEFENBACH, A. A. et al. Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, v. 8, n. 1, p. 77–87, 1 jan. 1998.

DORHOI, A. et al. Type I IFN signaling triggers immunopathology in tuberculosis-susceptible mice by modulating lung phagocyte dynamics. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 8, p. 2380–2393, 1 ago. 2014.

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

DUNAY, I. R.; FUCHS, A.; SIBLEY, L. D. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with Toxoplasma gondii in mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1564–1570, abr. 2010.

ELGHETANY, M. T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 28, n. 2, p. 260–274, 1 mar. 2002.

ELORANTA, M. L. M. et al. Production of interferon-alpha/beta by murine dendritic cell lines stimulated by virus and bacteria. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 46, n. 3, p. 235–241, 1 set. 1997.

FENSTERL, V. et al. Interferon-induced Ifit2/ISG54 protects mice from lethal VSV neuropathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002712–e1002712, 1 jan. 2012.

FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 385–393, 1 maio 2010.

FLAISHON, L. L. et al. Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 9, p. 1381–1388, 6 nov. 2000.

FORTUNATI, E. et al. Human neutrophils switch to an activated phenotype after homing to the lung irrespective of inflammatory disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 155, n. 3, p. 559–566, mar. 2009.

FRANKLIN, B. S. et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5789–5794, 7 abr. 2009.

FRANKLIN, B. S. et al. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 9, p. 3689–3694, 1 mar. 2011.

GABRIEL, C. et al. Leishmania donovani Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 7, p. 4319–4327, 1 out. 2010.

GARCIA-ROMO, G. S. et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 73, p. 73ra20, 9 mar. 2011.

GARNHAM, P. C. C. Malaria parasites and other Haemosporidia. 1966.

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

GEISS, G. K. G. et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 317–325, 1 mar. 2008.

GESSANI, S.; BELARDELLI, F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 9, n. 2, p. 117–123, jun. 1998.

GONZÁLEZ-NAVAJAS, J. M. et al. Immunomodulatory functions of type I interferons. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 125–135, fev. 2012.

GREVE, B. et al. High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with Plasmodium falciparum malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 6, p. 1584–1586, jun. 1999.

GROOM, J. R.; LUSTER, A. D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 2, p. 207–215, 1 fev. 2011.

GUIMARAES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 21 abr. 2009.

HACBARTH, E.; KAJDACSY-BALLA, A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. **Arthritis & Rheumatism**, v. 29, n. 11, p. 1334–1342, 1 nov. 1986.

HALL, N. N. et al. A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. **Science**, v. 307, n. 5706, p. 82–86, 7 jan. 2005.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3007–3017, 1 nov. 1998.

HANANANTACHAI, H. et al. Significant association between TNF-alpha (TNF) promoter allele (-1031C, -863C, and -857C) and cerebral malaria in Thailand. **Tissue Antigens**, v. 69, n. 3, p. 277–280, 1 mar. 2007.

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. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 1882–1888, maio 2011a.

HAQUE, A. et al. Type I interferons suppress $CD4^+$ T-cell-dependent parasite control during blood-stage Plasmodium infection. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2688–2698, set. 2011b.

HAQUE, A. et al. Type I IFN signaling in CD8- DCs impairs Th1-dependent malaria immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 6, p. 2483–2496, 2 jun. 2014.

HARPAZ, R. et al. Serum cytokine profiles in experimental human malaria. Relationship to protection and disease course after challenge. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 2, p. 515–523, ago. 1992.

HEDDINI, A. et al. Fresh isolates from children with severe Plasmodium falciparum malaria bind to multiple receptors. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5849–5856, 1 set. 2001.

HENRY, T. et al. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during Francisella infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 5, p. 987–994, 7 maio 2007.

HORNUNG, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514–518, 17 mar. 2009.

HOROWITZ, A. et al. Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 11, p. 6043–6052, 1 jun. 2010.

HUY, N. T. et al. Leukocyte activation by malarial pigment. **Parasitology International**, v. 55, n. 1, p. 75–81, mar. 2006.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J. Virus Interference. I. The Interferon. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 147, n. 927, p. 258–267, 12 set. 1957.

ISHIKAWA, H.; MA, Z.; BARBER, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 788–792, 8 out. 2009.

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36–49, 1 jan. 2014.

JAILLON, S. et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 793–804, 16 abr. 2007.

JARAMILLO, M. et al. Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3101–3110, 1 mar. 2004.

KALANTARI, P. et al. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. **Cell Reports**, v. 6, n. 1, p. 196–210, 16 jan. 2014.

KAPELSKI, S. et al. Assessment of the neutrophilic antibody-dependent respiratory burst (ADRB) response to Plasmodium falciparum. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 6, p. 1131–1142, dez. 2014.

KATSURAGAWA, T. H. et al. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9245, Feb 16, 2010.

KOBLANSKY, A. A. A. et al. Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to Toxoplasma gondii. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 119–130, 24 jan. 2013.

KOCHAR, D. K. et al. Clinical features of children hospitalized with malaria--a study from Bikaner, northwest India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 981–989, 1 nov. 2010.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 1 mar. 2013.

KOTENKO, S. V. S. et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 69–77, 1 jan. 2003.

KRISHNEGOWDA, G. G. et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8606–8616, 4 mar. 2005.

KRÜCKEN, J. et al. Augmented particle trapping and attenuated inflammation in the liver by protective vaccination against Plasmodium chabaudi malaria. **Malaria Journal**, v. 8, p. 54–54, 1 jan. 2009.

LACERDA, M. V. G. et al. Thrombocytopenia in malaria: who cares? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 Suppl 1, p. 52–63, ago. 2011.

LACERDA, M. V. G. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v. 11, p. 12, 2012.

LAGUETTE, N. et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. **Nature**, v. 474, n. 7353, p. 654–657, 30 jun. 2011.

LAMIKANRA, A. A. et al. Malarial anemia: of mice and men. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 18–28, 1 jul. 2007.

LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 725–732, jul. 2008.

LEE, W. L. W.; HARRISON, R. E. R.; GRINSTEIN, S. S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1299–1306, 1 nov. 2003.

LEORATTI, F. M. DE S. et al. Neutrophil Paralysis in Plasmodium vivax Malaria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1710, 26 jun. 2012.

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

LIN, A. M. et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 490–500, 1 jul. 2011.

LIU, L. L. et al. A simple chemiluminescence assay for the determination of reactive oxygen species produced by human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v. 192, n. 1-2, p. 173–178, 10 jun. 1996.

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. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5630–5637, 1 out. 2004.

MADONNA, S. et al. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IFN-gamma inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining ERK1/2 activation. **FASEB Journal**, v. 22, n. 9, p. 3287–3297, 1 set. 2008.

MAJER, O. et al. Type I interferons promote fatal immunopathology by regulating inflammatory monocytes and neutrophils during Candida infections. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. e1002811–e1002811, 1 jan. 2012.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 1 ago. 2011.

MARQUES, P. E. et al. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 348–360, jan. 2015a.

MARQUES, P. E. et al. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. **Nature Protocols**, v. 10, n. 2, p. 258–268, fev. 2015b.

MCCALL, M. B. B. et al. Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 162–171, 1 jul. 2007.

MCNAB, F. et al. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 87–103, 23 jan. 2015.

MEGIOVANNI, A. M. et al. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 5, p. 977–988, maio 2006.

MILLER, J. L. et al. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. **Cell Reports**, v. 7, n. 2, p. 436–447, 24 abr. 2014.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–167, fev. 2013.

MOHAMED, A. O. et al. Neutrophil leucocyte activation in severe malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 277, maio 1996.

MOHAMMED, A. O. et al. Human neutrophil lipocalin: a specific marker for neutrophil activation in severe Plasmodium falciparum malaria. **Acta Tropica**, v. 87, n. 2, p. 279–285, jul. 2003.

MOTA, M. M. et al. Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes adhere to CD36 and bind to microvascular endothelial cells in an organ-specific way. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4135–4144, 1 jul. 2000.

MURTHI, P. et al. Kupffer cell function during the erythocytic stage of malaria. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 1 Pt 2, p. 313–318, 1 jan. 2006.

NARASARAJU, T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 199–210, 1 jul. 2011.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–182, 1 mar. 2006.

OAKLEY, M. S. et al. Clinical and molecular aspects of malaria fever. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 442–449, out. 2011.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, p. 115–115, 1 jan. 2010.

PALOMO, J. et al. Type I interferons contribute to experimental cerebral malaria development in response to sporozoite or blood-stage Plasmodium berghei ANKA. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 10, p. 2683–2695, out. 2013.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677–691, 1 nov. 2010.

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

PESTKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 929–979, 1 jan. 2004.

PETER, H. H. H. et al. Human peripheral null lymphocytes. II. Producers of type-1 interferon upon stimulation with tumor cells, Herpes simplex virus and Corynebacterium parvum. **European Journal of Immunology**, v. 10, n. 7, p. 547–555, 1 jul. 1980.

PICHLMAIR, A. et al. IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. **Nature Immunology**, v. 12, n. 7, p. 624–630, 1 jul. 2011.

PICHYANGKUL, S. et al. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4926–4933, 15 abr. 2004.

PILLAY, J. et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 327–336, 3 jan. 2012.

PLATANIAS, L. C. L. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated

signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 5, p. 375–386, 1 maio 2005.

PORCHERIE, A. et al. Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 11, p. 2225–2236, 24 out. 2011.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of Abnormal Liver-Enzyme Results in Asymptomatic Patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1266–1271, 27 abr. 2000.

PUGA, I. et al. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. **Nature Immunology**, v. 13, n. 2, p. 170–180, fev. 2012.

RODRIGUEZ, P. C. et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. **Cancer Research**, v. 69, n. 4, p. 1553–1560, 15 fev. 2009.

SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. G. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 559–568, jul. 2008.

SAITOH, T. et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109–116, 19 jul. 2012.

SALAZAR-MATHER, T. P.; LEWIS, C. A.; BIRON, C. A. Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1alpha delivery to the liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 3, p. 321–330, 1 ago. 2002.

SANDA, C. et al. Differential gene induction by type I and type II interferons and their combination. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 26, n. 7, p. 462–472, jul. 2006.

SANNI, L. A. et al. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 3054–3058, 1 maio 2004.

SAWYER, D. R. Malaria on the Amazon frontier: economic and social aspects of transmission and control. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 342–345, set. 1986.

SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, fev. 2004.

SEO, S.-U. et al. Type I Interferon Signaling Regulates Ly6Chi Monocytes and Neutrophils during Acute Viral Pneumonia in Mice. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 2, p. e1001304, 24 fev. 2011.

SHAHANGIAN, A. et al. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1910–1920, 1 jul. 2009.

SHARMA, S. et al. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the Plasmodium falciparum genome. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 194–207, 26 ago. 2011.

SHIO, M. T. et al. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, p. e1000559–e1000559, 1 ago. 2009.

SHIRAFUJI, N. et al. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates human mature neutrophilic granulocytes to produce interferon-alpha. **Blood**, v. 75, n. 1, p. 17–19, 1 jan. 1990.

SHIRAHATA, T. T. et al. Strain differences of interferon-generating capacity and resistance in toxoplasma-infected mice. **Microbiology and Immunology**, v. 30, n. 12, p. 1307–1316, 1 jan. 1986.

SIMMONS, D. P. et al. Type I IFN Drives a Distinctive Dendritic Cell Maturation Phenotype That Allows Continued Class II MHC Synthesis and Antigen Processing. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3116–3126, 21 mar. 2012.

SIMON, P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. **Bioinformatics**, v. 19, n. 11, p. 1439–1440, 22 jul. 2003.

SINGH, B. et al. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. **Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 8–8, 27 mar. 2004.

SLATER, A. F. et al. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 2, p. 325–329, 15 jan. 1991.

SOEHNLEIN, O. O. et al. Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3491–3502, 1 out. 2008.

SREERAMKUMAR, V. et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Science**, v. 346, n. 6214, p. 1234–1238, 5 dez. 2014.

STARK, G. R. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. **Annual Review of Biochemistry**, v. 18, n. 5-6, p. 419–423, out. 2007.

STEPHENS, R.; CULLETON, R. L.; LAMB, T. J. The contribution of Plasmodium chabaudi to our understanding of malaria. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 73–82, 1 fev. 2012.

STETSON, D. B.; MEDZHITOV, R. Type I interferons in host defense. **Immunity**, v. 25, n. 3, p. 373–381, set. 2006.

STEVENSON, M. M.; TAM, M. F.; NOWOTARSKI, M. Role of interferon-gamma and tumor necrosis factor in host resistance to Plasmodium chabaudi AS. **Immunology Letters**, v. 25, n. 1-3, p. 115–121, 1 ago. 1990.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 1 set. 2006.

SWIECKI, M. et al. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 12, p. 2367–2374, 21 nov. 2011.

TELES, R. M. B. et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. **Science**, v. 339, n. 6126, p. 1448–1453, 22 mar. 2013.

TILLACK, K. et al. T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3150–3159, 1 abr. 2012.

TJITRA, E. et al. Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLOS Medicine**, v. 5, n. 6, p. e128–e128, 17 jun. 2008.

UNTERHOLZNER, L. et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nature Immunology**, v. 11, n. 11, p. 997–1004, 3 out. 2010.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000639–e1000639, 1 out. 2009.

VAN GISBERGEN, K. P. J. M. et al. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 8, p. 1281–1292, 18 abr. 2005.

VIGÁRIO, A. M. et al. Inhibition of Plasmodium yoelii blood-stage malaria by interferon alpha through the inhibition of the production of its target cell, the reticulocyte. **Blood**, v. 97, n. 12, p. 3966–3971, 15 jun. 2001.

VIGÁRIO, A. M. et al. Recombinant human IFN-alpha inhibits cerebral malaria and reduces parasite burden in mice. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, p. 6416–6425, 15 maio 2007.

WALTHER, M. et al. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage Plasmodium falciparum

correlate with parasitological and clinical outcomes. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 8, p. 5736–5745, 15 out. 2006.

WHITTEN, R. et al. Liver pathology in Malawian children with fatal encephalopathy. **Human Pathology**, v. 42, n. 9, p. 1230–1239, 1 set. 2011.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278–286, 1 maio 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2014**. Traducao. [s.l: s.n.].

WRIGHT, H. J. et al. Periodontitis associates with a type 1 IFN signature in peripheral blood neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 8, p. 5775–5784, 15 out. 2008.

WU, Y.; DOWBENKO, D.; LASKY, L. A. PSTPIP 2, a second tyrosine phosphorylated, cytoskeletal-associated protein that binds a PEST-type protein-tyrosine phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 46, p. 30487–30496, 13 nov. 1998.

WYKES, M. N.; GOOD, M. F. What have we learnt from mouse models for the study of malaria? **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2004–2007, 1 ago. 2009.

XIN, L. et al. Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to Leishmania parasites. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 7047–7056, 15 jun. 2010.

YONEYAMA, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 7, p. 730–737, jul. 2004.

YOSHIMOTO, T. et al. A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain Plasmodium berghei NK65 infection. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 11, p. 5500–5505, 1 jun. 1998.

ZAWADA, A. M. et al. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. **Blood**, v. 118, n. 12, p. e50–e61, 22 set. 2011.

ZHU, J. et al. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of Plasmodium falciparum are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 205–211, jul. 2011.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 285–290, 10 jun. 2003.

ZUZARTE-LUÍS, V.; MOTA, M. M.; VIGARIO, A. M. Malaria infections: what and how can mice teach us. **Journal of Immunological Methods**, v. 410, p. 113–122, 1 ago. 2014.