

MARCO ANTÔNIO ATAÍDE SILVA

Dissertação de Mestrado

Ativação de caspase-1 durante a infecção por *Plasmodium*:
avaliação dos componentes envolvidos e implicações na
patogênese da malária.

Belo Horizonte-MG
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Ativação de caspase-1 durante a infecção por *Plasmodium*:
avaliação dos componentes envolvidos e implicações na
patogênese da malária.

Dissertação apresentada ao Departamento
De Bioquímica e Imunologia como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de Mestre
em Bioquímica e Imunologia.

Aluno: Marco Antônio Ataíde Silva.
Orientador: Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli.

Belo Horizonte-MG
Agosto/2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por fazer todas as coisas vivas dando-me a oportunidade de estudá-las.

A minha esposa, Fabrícia Ataíde, pelo seu companheirismo inestimável.

Ao Prof. Ricardo Gazzinelli quem me acolheu em seu laboratório dando liberdade para pensar além de excelentes condições de trabalho.

Ao Bernardo S. Franklin quem me pegou pelo braço no início da minha vida científica.

A Dra. Catherine Ropert pelos grandes ensinamentos e discussões científicas muito enriquecedoras.

Ao Prof. Dario Zamboni pelo seu apoio e disponibilidade.

A equipe técnica do LAIM/FIOCRUZ-MG e IMPAR/UFMG pelo apoio imprescindível.

Aos amigos do LAIM e IMPAR em especial a Luara Santos pela leitura crítica do meu trabalho e ao Humberto Gravina pelo grande apoio na bancada.

Aos amigos da Universidade de Massachusetts, Bruno Reis, Warrison Andrade e Braulia Caetano os quais me apoiaram durante a minha curta estadia nos Estados Unidos.

A todos que colaboraram para esse trabalho com ideias e discussões.

A toda equipe do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical em Porto Velho, em especial ao Prof. Luiz Hildebrando quem nos recebeu de braços abertos.

A minha família, em especial a minha mãe, a Shirley e ao Antônio Sérgio pela torcida e apoio, obrigado pela confiança!

Uma mente aberta para uma nova
ideia, jamais poderá voltar ao seu
tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO.

Anualmente a infecção por *Plasmodium* causa a morte de aproximadamente 800.000 indivíduos em todo mundo. Anos de estudos relacionados a patogênese da malária culminaram para o seguinte consenso: a malária é uma doença altamente inflamatória sendo as manifestações clínicas relacionadas com a produção exagerada de mediadores pró-inflamatórios. Nesse trabalho foi demonstrado a presença de dímeros de ASC em amostras de PBMCs, além da caspase-1 ativa em monócitos de pacientes infectados por *P.vivax*, sendo esses componentes constituintes dos inflamosomos, uma plataforma multiproteica de grande potencial inflamatório. Além disso, foi observado a liberação de altos níveis de IL-1 β por PBMCs estimulados com LPS. Foi demonstrado também que caspase-1 é ativada em macrófagos e em células dendríticas durante a malária murina, sendo esse fenômeno dependente dos receptores citosólicos NLRP3 e NLRP12. Normalmente a infecção causada por *P.chabaudi*, um modelo de malária murina, é resolvida em quatro semanas. No entanto, quando foi administrado baixas doses de LPS durante a fase aguda da doença, níveis elevados de IL-1 β e TNF α foram secretados culminando na morte do hospedeiro. Parte dessa susceptibilidade está relacionada com alta produção de IL-1 β , um vez que animais IL-1R nocautes são parcialmente resistentes a esse choque. Ademais, foi demonstrado que MyD88, ASC, IFN- γ e TNFR1 controlam esses eventos. Os resultados aqui descritos permitem concluir que a plataforma conhecida como inflamosomo está montada e pronta para gerar altos níveis de IL-1 β durante a malária, se um indutor de pro-IL-1 β , como por exemplo agonistas de TLRs estiverem disponíveis.

Palavras chave: inflamosomo, caspase-1, interleucina 1 beta e malária

ABSTRACT.

Malaria is a major cause of death worldwide infecting around half-billion people annually. Years of studies on malaria pathogenesis has funneled into consent: malaria is a highly pro-inflammatory disease where clinical manifestations are directly correlated with the induction of high levels of pro-inflammatory mediators. Here we demonstrated a pre-formed ASC dimers and active caspase-1 in monocytes from *P.vivax* infected patients. Furthermore was observed immediate release of IL-1 β by peripheral blood mononuclear cells stimulated with LPS. Additionally we show a new feature of malaria pathogenesis with deleterious consequences even for the non-lethal murine model, *Plasmodium chabaudi*. We report that caspase 1 is persistently active in macrophages and dendritic cells during acute murine malaria, being this phenomenon NLRP3 and NLRP12 inflammasome-dependent. Usually, *P.chabaudi* infection resolves at fourth week, but challenging of acute infected mice with low doses of LPS resulted in alarming levels of IL-1 β and TNF α , culminating in septic shock-like syndrome and ultimately death. Susceptibility of mice to low LPS doses was associated with a high background of caspase 1 activation and release of IL-1 β . We have shown that MyD88, ASC, IFN- γ and TNFR1 signaling controls these events. Together, our results show that the inflammasomes platform is fully assembled and ready to generate high IL-1 β levels if an inducer of pro-IL1 β , such as TLR agonists, is present during malaria infection.

Key words: inflammasomes, caspase-1, interleukin 1 beta and malária

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.

Figura 1: O ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>, o agente causador da malária...	15
Figura 2: Os três principais modelos propostos para explicar a formação do NLRP3-inflamosomo.	24
Figura 3: Ativação de caspase-1 e secreção de IL-1β durante a infecção por <i>P.vivax</i>.....	35
Figura 4: Caspase-1 é ativada durante a infecção por <i>P.chabaudi</i>.	37
Figura 5: A sinalização via MyD88 é um evento fundamental para a ativação de caspase-1 durante a malária murina	39
Figura 6: (a) Citocinas pró-inflamatórias envolvidas na ativação de caspase-1 e secreção de IL-1β durante a infecção por <i>P.chabaudi</i>.	41
Figura 7: Envolvimento de receptores NLRs na ativação de caspase-1 durante a malária murina.	43
Figure 8: Consequências da predisposição para alta produção IL-1β durante a malária murina.	46
Tabela 1: Associação entre a produção/sinalização de IL-1β e a mortalidade observada em animais que receberam baixas doses de LPS.	47

LISTA DE ABREVIATURAS.

AIM2: Ausente em melanoma do tipo 2

ASC: Proteína associada a apoptose contendo o domínio CARD

ATP: Adenosina trifosfato.

CAPS: Síndrome periódica associada ao “Cryopyrin”

CARD: Domínio de recrutamento e ativação de caspase

Casp-1: caspase-1

CM: Malária cerebral

CPPD: Pirofosfato de cálcio dihidratado

DAMPs: Padrão molecular associado a dano

dNTPs: Desoxiribonucleotídeos

DSS: Dissuccinimidil suberato

IFN γ R: Receptor de interferon gamma

IL-18: Interleucina dezoito

IL-1Ra: Antagonista do receptor de interleucina 1

IL-1 β : Interleucina 1 beta

iRBCs: Células vermelhas infectadas

MDP: Muramil dipeptideo

MSU: Monosódio de urato

MyD88: Gene de resposta a diferenciação mielóide primária

NLRC4: Receptor da família dos NLRs contendo o domínio CARD 4

NLRP1: Receptor da família dos NLRs contendo o domínio Pyrin 1

NLRP3: Receptor da família dos NLRs contendo o domínio Pyrin 3

NLRP12: Receptor da família dos NLRs contendo o domínio Pyrin 12

NLRs: Receptores do Tipo NOD

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico

PfEMP1: Proteína 1 do *P.falciparum* presente na superfície de eritrócitos

PGN: Peptideoglicano

PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride

PRR: Receptor reconhecedor de padrões

PYD: Domínio pyrin

TLRs: Receptores do Tipo Toll

TNF α : Fator de necrose tumoral alpha

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral alpha

TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp</i>	13
1.2 A malária: aspectos epidemiológicos e clínicos.....	16
1.3 “Tempestade de citocinas”, TLRs e a patogênese da malária.	17
1.4 Receptores do tipo NOD (NLRs) e a formação dos inflamosomos.....	20
1.5 Caspase-1 ativa, distúrbios inflamatórios e a malária.....	25
2. OBJETIVOS.	28
2.1 Objetivo geral.	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.	29
3.1 Reagentes.	29
3.2 Pacientes.	29
3.3 Modelo murino de malária e animais.	30
3.4 Obtenção e estimulação de PBMCs.	30
3.5 Avaliação da ativação de caspase-1 por citometria de fluxo.	31
3.6 Preparação do lisado celular.	31
3.7 Eletroforese e <i>Western blotting</i>	31
3.8 Avaliação do estado oligomérico de ASC em PBMCs de pacientes.	32
3.9 Dosagem de citocinas.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Oligomerização de ASC e a ativação de caspase-1 são eventos observados durante a infecção por <i>P. vivax</i>	33
4.2 Monócitos inflamatórios (CD14 ^{low} CD16 ⁺) e monócitos clássicos (CD14 ⁺ CD16 ⁻) são a fonte de caspase 1 ativa durante a infecção por <i>P. vivax</i>	34
4.3 Macrófagos e células dendríticas presentes no baço de camundongos, apresentam caspase-1 ativa de modo dependente de ASC durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	36
4.4 A ativação de caspase-1 durante a infecção por <i>P. chabaudi</i> depende de MyD88.	38
4.5 IFN- γ e TNFR1: componentes inflamatórios que regulam a ativação de caspase-1 e a liberação de IL-1 β durante a malária murina.....	40
4.6 A infecção por <i>P. chabaudi</i> promove a ativação de caspase 1 de modo dependente dos receptores NLRP3 e NLRP12.....	42
4.7 Ativação de caspase-1 pode se tornar em um evento letal para o hospedeiro, se um indutor de pro-IL-1 β estiver disponível durante a malária murina.....	44
5. DISCUSSÃO.	48
5.1 ASC e a ativação de caspase-1 durante a malária.....	48
5.2 Secreção de IL-1 β e ativação de caspase-1 em monócitos.	50
5.3 TLRs Vs NLRs e a ativação de caspase-1.	52
5.4 Citocinas pró-inflamatórias Vs ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β	53
5.5 Receptores NLRP3 e NLRP12, desordem inflamatória e malária.....	55
5.6 Consequências da ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β durante malária	56
6. CONCLUSÕES	59

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 60

1. INTRODUÇÃO.

A malária é uma das doenças mais devastadoras do mundo, estando presente na África subsaariana, sul da Ásia e em algumas partes da América do sul (Feachem et al. 2010). De acordo com o levantamento feito pela organização mundial de saúde, essa doença provoca a morte de aproximadamente 800.000 pessoas anualmente, além de causar uma enorme perda econômica (WHO 2010).

Há vários anos, um grande esforço tem sido empregado em pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas que confirmam proteção contra a infecção por *Plasmodium*. Entretanto, visto a complexidade do ciclo de vida do *desse parasito* e conseqüentemente da resposta imune à infecção, ainda não há disponível uma vacina eficaz (Casares e Richie 2009; Chilengi e Gitaka 2010).

Atualmente são os antimaláricos os grandes aliados dos profissionais da saúde no combate à malária. Existem uma série de classes de drogas utilizadas no tratamento, sendo o estágio intraeritrocítico o alvo de todas elas (Sullivan et al. 1996). Embora o tratamento da malária seja eficiente quando administrado antimaláricos logo após o surgimento dos primeiros sintomas, ainda existe um risco considerável devido a presença de cepas resistentes (Hyde 2002; Le Bras e Durand 2003).

Muito já tem sido feito no intuito de compreender os mecanismos associados a patogênese da malária, porém ainda há bastante a ser desvendado. O que se pode dizer com segurança é que um dos aspectos relacionados com a morbidade e morte do hospedeiro, é a resposta inflamatória exagerada (Schofield e Grau 2005; Erdman et al. 2008), a qual alguns componentes da imunidade inata estão associados (Franklin et al. 2007; Franklin et al. 2009) (Parroche et al. 2007). Nesse contexto, desvendar a imunopatogênese da malária, bem como os mecanismos relacionados ao distúrbio inflamatório observado durante a doença, podem gerar uma fonte valiosa de informações indicando por exemplo alvos terapêuticos (Franklin et al. 2011).

Uma plataforma multiproteica recentemente descrita por Martinon e colaboradores em 2002 denominado inflamossomo tem sido envolvida em

algumas desordens inflamatórias (Petrilli e Martinon 2007; Church et al. 2008; Cassel e Sutterwala 2010). Recentemente foi demonstrado que a hemozoína, um produto metabólico do *Plasmodium*, tem a capacidade de promover a formação desse complexo de grande potencial inflamatório (Dostert et al. 2009). Intuitivamente surgiram algumas perguntas: a infecção por *Plasmodium* pode levar a formação do inflamosomo? Quais seriam as implicações da formação dessa estrutura durante a malária? Nesse trabalho são apresentados resultados obtidos por meio da investigação orientada por essas questões.

1.1 Ciclo de vida do *Plasmodium* sp.

A fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* é a responsável pela transmissão das formas infectantes do *Plasmodium* ao hospedeiro vertebrado, sendo essas conhecidas como esporozoítos (**Figura 1**). Essas formas são capazes de se movimentar e rapidamente acessarem a corrente sanguínea em busca do fígado, onde invadem os hepatócitos. O estágio hepático da doença é assintomático e dura por volta de 6 dias. Nesse momento ocorre a multiplicação dos esporozoítos gerando milhares das formas conhecidas como merozoítos. A etapa hepática encerra-se com a liberação dos merozoítos para a corrente sanguínea onde esses invadem e se desenvolvem dentro dos eritrócitos.

Durante a fase sanguínea da infecção ocorrem repetidos ciclos de multiplicação do parasito de modo assexuado, sendo gerados de 8-20 novos merozoítos circulantes a cada 48 horas. Esse é o estágio patogênico, onde o indivíduo começa a sentir os primeiros sintomas podendo culminar na malária severa até a morte. Além disso, nessa fase também são gerados os gametócitos masculino e feminino que irão circular até serem ingeridos por um anofelino fêmea.

A reprodução sexuada do *Plasmodium* só é possível quando uma fêmea anofelina ingere os gametócitos durante o seu repasto sanguíneo. No mosquito ocorre a recombinação gênica gerando então novos esporozoítos duas semanas depois da ingestão dos gametócitos. No entanto, esse intervalo de tempo pode sofrer variações por ser influenciado pela temperatura do ambiente externo. O desenvolvimento do *P. vivax* pode ocorrer em temperaturas mais baixas do que a

exigida pelo *P.falciparum*, explicando a preponderância de infecções por *P.vivax* em áreas fora da região tropical.

Um conjunto de mais de 5000 genes permite que esse parasito peculiar passe por metamorfoses dramáticas tornando possível sua sobrevivência em diferentes ambientes e capacitando-o a ultrapassar as mais distintas barreiras. Cada fase do desenvolvimento do *Plasmodium* representa um alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos e vacinas no intuito de interromper o seu ciclo de vida que é extremamente complexo e ainda parcialmente compreendido. (Aravind et al. 2003) (Haldar et al. 2007).

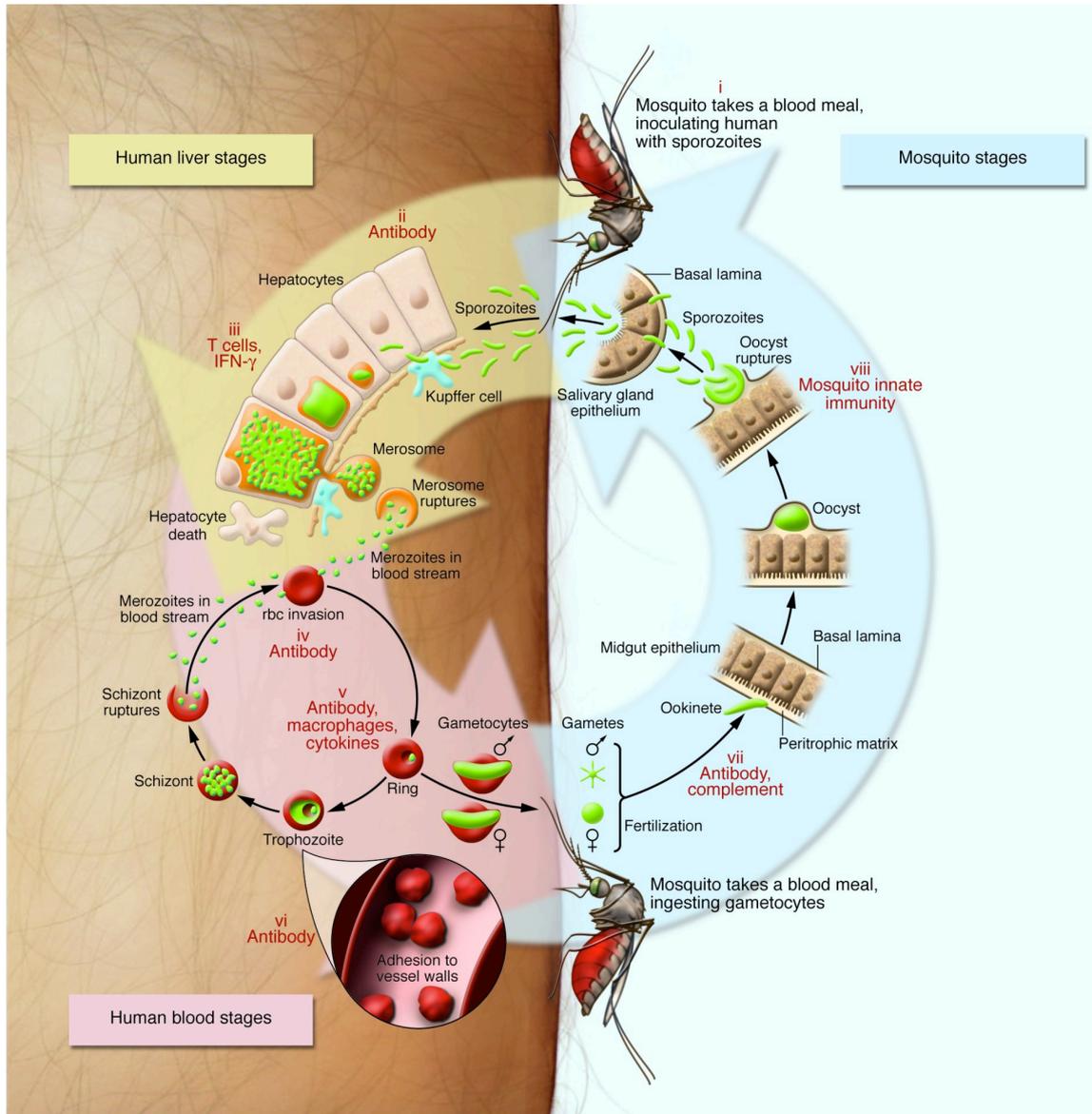


Figura 1 – O ciclo de vida do *Plasmodium*, o agente causador da malária.

Depois de ser inoculado na derme humana pelo *Anopheles* (i), uma forma alongada e móvel do *Plasmodium* conhecida como esporozoítos, consegue escapar dos anticorpos (ii) ganhando então a corrente sanguínea. Posteriormente, essas formas circulam por entre macrófagos e hepatócitos iniciando então o ciclo hepático da infecção. Os parasitas presentes no interior dos hepatócitos são susceptíveis a atividade citotóxica de células citolíticas (CTLs) (iii). Depois de uma semana aproximadamente, os hepatócitos infectados se rompem liberando merozoítos envolvidos por estruturas vesiculares conhecidas como merozossomos (iv). A liberação desses merozoítos “escondidos” dentro dos merozossomos permite que essas formas escapem dos anticorpos, culminando na infecção dos eritrócitos. Durante o estágio intraeritrocítico (v) os parasitas são susceptíveis a opsonização por anticorpos e fagocitose por macrófagos. A resposta mediada por citocinas tem sido relacionado tanto com a proteção quanto com a severidade da doença durante esse estágio do ciclo de vida do *Plasmodium*. Anticorpos capazes de bloquear a ligação de eritrócitos infectados por *P.falciparum* ao endotélio (vi) podem prevenir a malária cerebral e controlar a parasitemia. Anticorpos humanos específicos para gametócitos (vii) podem ser ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. Esses anticorpos aliados às proteínas do complemento, podem bloquear a transmissão para o mosquito ao eliminar o parasita. A resposta imune inata do mosquito também pode matar o parasita durante a fase de tardia de esporogonia (viii). Caso isso não ocorra, o mosquito está pronto para infectar um novo indivíduo. (Greenwood et al. 2008).

1.2 A malária: aspectos epidemiológicos e clínicos.

A malária humana pode ser causada por cinco diferentes espécies de *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*, sendo essa a espécie mais virulenta. *P. vivax* é a segunda espécie mais prevalente, ambas coexistindo em uma vasta área do planeta (Gething et al. 2011). A América Latina é uma das regiões mais afetadas pelo *P. vivax* com 70 a 80% da sua população residindo em áreas de risco. Anualmente, cerca de 80 a 300 milhões de pessoas são infectadas por essa espécie em todo mundo. (Feachem et al. 2010).

Estudos recentes tem reportado um elevado número de casos de malária severa causada pela infecção por *P. vivax* sugerindo que a malária vivax não é tão branda quanto era admitido (Lacerda et al. 2008; Kochar et al. 2009; Sharma e Khanduri 2009). Na África, o continente mais afetado pela malária, a infecção por *P. vivax* é limitada a poucos países na sua porção oriental, região do continente onde a população apresenta uma alta prevalência de uma proteína do grupo sanguíneo conhecida como Duffy (Fy) (Miller et al. 1976; Langhi e Bordin 2006). O *P. vivax* utiliza essa proteína como uma porta de entrada garantindo assim a invasão dos eritrócitos (Chitnis 2001).

Nas últimas seis décadas a malária tem sido alvo de intensas campanhas no intuito de erradicar a transmissão do parasito por meio do controle do vetor e quimioterapia (WHO 2010). Embora tenha diminuído o número de áreas propensas a transmissão dessa doença, o número de casos aumentou significativamente nesse período (Feachem et al. 2010). Desde que foi reportado o primeiro caso de *P. vivax* resistente a cloroquina em Papua Nova Guiné em 1989, vários relatórios tem mostrado que esse tipo de caso vem aumentando em outras áreas endêmicas. Além disso, o surgimento de cepas resistentes a primaquina, a única droga disponível até o momento capaz de impedir que formas latentes alojadas no fígado despertem causando o reaparecimento da doença, é algo que tem ocasionado preocupação na comunidade científica. (Arias e Corredor 1989; Baird 2004; Tjitra et al. 2008) .

A malária é conhecida pelo seu padrão cíclico de febre e calafrios, sendo essa periodicidade relacionada com a fase intraeritrocítico do ciclo de vida do *Plasmodium* onde ocorre a ruptura e conseqüentemente a invasão de novas hemácias por formas conhecidas como merozoítos. Além de febre e calafrios, a

malária severa é acompanhada de hipoglicemia, anemia e perda de consciência (Weatherall et al. 2002). Habitantes das áreas endêmicas gradualmente adquirem “imunidade” a esse sintomas clínicos, mesmo estando parasitados (Morahan et al. 2002; Boutlis et al. 2003). Por esse motivo, crianças africanas com idade entre 6 meses à 5 anos compõem o grupo de alto risco com grande possibilidade de progredir para malária severa e morte. A malária cerebral (CM), observada durante a malária severa, é a patologia mais bem estudada associada a infecção por *P.falciparum* (Molyneux et al. 1989; WHO 2000). No entanto, é importante notar que recentes estudos tem mostrado que a infecção por *P.vivax* também pode levar a manifestações clínicas como angústia respiratória, anemia severa, bem como manifestações neurológicas como o coma (Bassat e Alonso ; Anstey et al. 2009; Mueller et al. 2009).

1.3 “Tempestade de citocinas”, TLRs e a patogênese da malária.

O termo tempestade de citocinas (citokine storm) foi empregado pela primeira vez em 1994 por (Clark e Rockett 1994) que estão entre os maiores defensores da ideia de que a patologia da malária está intrinsicamente ligada com a produção descontrolada de mediadores inflamatórios. A relação entre esses mediadores e a malária cerebral é extensivamente estudada e o TNF α tem sido indicado como o grande vilão (Grau et al. 1989; Clark e Rockett 1994).

O TNF α induz a expressão de moléculas de adesão intercelular, ICAM-1, no endotélio cerebral, sendo esse um suposto receptor para uma molécula do parasita expressa na superfície de eritrócitos infectados, PfEMP1. Esse é um fenômeno chave associado ao sequestro de hemácias infectadas (iRBCs) durante a malária cerebral (Newbold et al. 1999; Wassmer et al. 2003; Wassmer et al. 2003; Schofield e Grau 2005; Clark 2007; Clark 2007; Clark 2009). Durante a malária humana são encontrados, no soro de pacientes, níveis elevados de TNF α e também dos receptores 1 e 2 dessa citocina (TNFR1/2) (Gimenez et al. 2003; Hunt e Grau 2003).

Estudos genéticos mostraram que polimorfismos encontrados no gene de TNF α estariam associados com alguns aspectos patológicos da malária. Assim, enquanto alguns polimorfismos estariam relacionados com susceptibilidade à malária cerebral, outros causariam resistência à essa condição, mas aumentariam a susceptibilidade à anemia severa (Knight et al. 1999; McGuire et

al. 1999; Wattavidanage et al. 1999; Kwiatkowski 2000; Aidoo et al. 2001). Recentemente estudos utilizando um inibidor transcricional de $\text{TNF}\alpha$, o LMP-420, capaz de inibir os efeitos de $\text{TNF}\alpha$ e também da linfotóxina- α ($\text{LT}\alpha$), demonstraram, em camundongos, um aumento da resistência à malária cerebral (Wassmer et al. 2005). Enfim, o $\text{TNF}\alpha$ parece ser um dos componentes de grande relevância para patologia da malária

Outro mediador inflamatório que também tem sido associado com a patogênese da malária é o receptor do tipo 1 da citocina $\text{IFN}\gamma$ ($\text{IFN}\gamma\text{R1}$). Acredita-se que as células natural killer (NK) e células $\gamma\delta$ sejam a principal fonte de $\text{IFN}\gamma$ durante a malária (Hansen et al. 2003) (Hensmann e Kwiatkowski 2001; Artavanis-Tsakonas e Riley 2002) e que essa citocina estaria intimamente ligada com a produção de $\text{TNF}\alpha$ (Clark e Cowden 1992; Hunt e Grau 2003). O polimorfismo no receptor $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ foi relacionado com a resistência a malária cerebral em um estudo realizado com pacientes da Gambia (Koch et al. 2002). Em camundongos a proteção contra a malária cerebral pode ser alcançada quando utilizado animais deficientes em $\text{IFN}\gamma$ ($\text{IFN}\gamma^{-/-}$) ou $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ ($\text{IFN}\gamma\text{R1}^{-/-}$), além do tratamento com anti- $\text{IFN}\gamma$ (Yanez et al. 1996; Amani et al. 2000)

Além dessas citocinas, existem fortes evidências de que os receptores do tipo Toll (TLRs) também estão envolvidos na patogênese da malária (Coban et al. 2005; Coban et al. 2007; Franklin et al. 2007; Franklin et al. 2009; Franklin et al. 2011). Agonistas de TLR2 e TLR9 foram encontrados em *P.falciparum* (Krishnegowda et al. 2005; Parroche et al. 2007) e de modo curioso, pacientes com mutações no gene de TLR2, TLR9 e Mal/Tirap, uma molécula adaptadora responsável por amplificar os sinais provenientes de alguns TLRs, apresentaram uma maior resistência a infecção por *Plasmodium*. Ademais camundongos deficientes em TLR9 e MyD88, sendo essa última uma outra molécula adaptadora utilizada pela grande maioria dos TLRs, apresentaram uma diminuição na produção de citocinas pro-inflamatórias. (Coban et al. 2005; Coban et al. 2007; Franklin et al. 2007; Franklin et al. 2009). Em 2011 foi demonstrado que o uso terapêutico de antagonistas de TLRs pode aumentar a resistência de camundongos à malária cerebral (Franklin et al. 2011).

Outro aspecto patológico associado ao distúrbio inflamatório durante a malária é a anemia, a qual tem sido apontada como a principal causa de

internações em hospitais da África. Além disso, esse estado é responsável por mais da metade dos casos de morbidade e mortalidade causado pela malária em crianças abaixo dos cinco anos de idade em regiões endêmicas (Snow et al. 1999; Murphy e Breman 2001). A anemia observada durante a infecção por *Plasmodium* pode ser classificada da seguinte maneira: (i) anemia não complicada (hemoglobina < 110g/L, hematócrito < 30% e parasitemia periférica) (ii) anemia severa (hemoglobina < 50g/L, hematócrito < 15% e parasitemia periférica). Recentemente foi demonstrado que a anemia severa observada em crianças infectadas por *P.vivax* tem a resposta imune como principal fator, devido ao efeito inibitório da eritropoiese causado pela citocinas pró-inflamatórias como $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ (Rodriguez-Morales et al. 2006; Ru et al. 2009)

1.4 Receptores do tipo NOD (NLRs) e a formação dos inflamosomos.

A mineração genômica em busca de genes conservados evolutivamente, trouxe a tona uma grande família de genes que codificam proteínas com estruturas similares tanto em plantas quanto em animais. Essas moléculas, conhecidas como Receptores do Tipo NOD (NLRs) estão relacionadas com a resistência de plantas à um subgrupo de doenças. (Ausubel 2005). Entre os animais, os NLRs foram encontrados em uma diversidade de espécies, desde ouriço-do-mar ao ser humano (Ting e Davis 2005). Esses receptores são capazes de reconhecer padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados à danos (DAMPs), sendo compostos geralmente por três domínios descritos assim: (i) domínio “pyrin” (PYD) contido na porção N terminal responsável por interagir com a molécula adaptadora ASC (ii) domínio ligador de nucleotídeo (NACHT) presente na porção central, responsável pela atividade de dNTPase e oligomerização (iii) e no C terminal está presente uma série de regiões ricas em leucina LRRs, as quais acredita-se estar relacionada com o reconhecimento dos PAMPs e DAMPs bem como a autoregulação dos NLRs (Ting e Davis 2005; Schroder e Tschopp 2010).

Os NLRs também fazem parte de uma plataforma proteica de grande potencial inflamatório presente no citosol denominada inflamosomo (Martinon et al. 2002; Martinon et al. 2007). A ativação de caspase-1, uma cisteína protease, é regulada por essas estruturas multiméricas formadas quando cada componente, receptor NLR, molécula adaptadora ASC e pro-caspase-1, são super expressos no citosol (Martinon et al. 2002).

ASC é uma molécula adaptadora de 22kd que apresenta um domínio PYD no N terminal, capaz de interagir com o domínio de PYD do NLR. No C terminal, ASC apresenta um domínio CARD, pelo qual promove o recrutamento de pro-caspase-1 também por meio de uma interação homotípica do tipo CARD-CARD. (Masumoto et al. 1999; Srinivasula et al. 2002). A deleção de ASC em camundongos revelou que essa molécula é essencial para ativação de caspase-1 e conseqüentemente para geração de IL-1 β em sua forma madura. Esses achados sugerem que ASC seja um componente efetor chave da via de ativação de caspase-1 (Mariathasan et al. 2004; Mariathasan et al. 2005; Kanneganti et al. 2006; Mariathasan et al. 2006; Martinon et al. 2006; Sutterwala et al. 2006).

Alguns NLRs tem a capacidade de levar a formação de inflamosomo *in vitro*. Vários estudos tem demonstrado que NLRP1, 2, 3, 6, 12, NLRC4, NOD2 quando super expressos ectopicamente com a caspase-1 e com a molécula adaptadora ASC, levam a ativação de caspase-1 e o processamento de IL-1 β . Entretanto, somente alguns “NLRs-inflamosomo” têm sido bem caracterizado como por exemplo, NLRP1, NLRC4 e NLRP3 sendo esse último o mais estudado (Grenier et al. 2002; Martinon et al. 2002; Srinivasula et al. 2002; Agostini et al. 2004).

O receptor NLRP3 é constitutivamente expresso em células da linhagem mielóide e tem a sua expressão aumentada em resposta a estímulos provenientes de PAMPs (O'Connor et al. 2003). Uma outra característica desse receptor é incapacidade de recrutar a pro-caspase-1 sem o auxílio de ASC, por ter não possuir o domínio CARD (Yu et al. 2006).

Dentre os ativadores de NLRP3-inflamosomo pode ser citado o ATP, o monossódio de urato (MSU), o pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD), cristais de colesterol, polímeros de β -amiloide e possivelmente a glicose (Rock et al. 2010). Atualmente alguns autores admitem que NLRP3 é capaz de detectar alterações na concentração de componentes intracelulares por um mecanismo ainda desconhecido. Dentre esses componentes pode-se citar o ATP e ácido úrico, que são normalmente observados no citosol das células, e podem gerar uma resposta inflamatória a partir do momento em que são liberados para o meio extracelular. Ao mesmo tempo, NLRP3 parece funcionar como um sensor de moléculas endógenas presentes em locais indevidos. Um exemplo descrito desse mecanismo ocorre quando componentes não constitutivos do citosol são detectados no interior da célula, como é o caso de cristais de colesterol e β -amiloide (Iyer et al. 2009).

Além da inflamação estéril, NLRP3-inflamosomo pode ser observado durante a infecção por bactérias intracelulares como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Cervantes et al. 2008; Monack 2008; Kim et al. 2010). Compostos antivirais como R837, R847, RNA bacteriano bem como RNA viral, também são capazes de promover a ativação de caspase-1 utilizando NLRP3 como receptor na formação do inflamosomo. (Kanneganti et al. 2006; Kanneganti et al. 2006).

Ainda há muito a ser desvendado no que se refere aos mecanismos associados a formação dos inflamosomos. Atualmente existem 3 modelos propostos para explicar a formação do NLRP3-inflamosomo muito bem revisado por Kate Schroder e Jurg Tschopp (Schroder e Tschopp 2010) (**Figura 2**).

O primeiro mecanismo proposto coloca a presença de ATP no meio extracelular como um ponto chave. O ATP extracelular tem a capacidade de estimular o receptor purinérgico P2X7 promovendo o efluxo de potássio (K), o que por consequência leva ao recrutamento de panexina-1 e formação de poro na membrana (Kahlenberg e Dubyak 2004). Esse poro formado na membrana seria o responsável pela entrada de agonistas do receptor NLRP3 que até então estaria inacessível no meio extracelular (Kanneganti et al. 2007). Além disso, eletrólitos como sódio e potássio tem sido relacionado com a intensa repulsão intermolecular entre monômeros de proteínas em concentrações fisiológicas, uma vez que esses monômeros estão aprisionados em “jaulas” de água devido ao efeito hidrófobo (Petsev et al. 2000). Desse modo, a diminuição da concentração de potássio pode então favorecer a formação de oligômeros de NALP3 e ASC. De fato, células cultivadas na presença de concentrações elevadas de KCL não são capazes de ativar caspase-1 tampouco liberar IL-1 β (Franchi et al. 2007). Talvez a influência de K na repulsão intermolecular, seja uma explicação possível para a formação do NLRP3-inflamosomo, uma vez que recentemente foi demonstrado que macrófagos derivados de animais deficientes em panexina-1 não apresentam falha na ativação de caspase-1.(Qu et al. 2011).

O segundo modelo está relacionado com ativadores de NLRP3-inflamosomo que formam cristais ou estruturas particuladas como por exemplo MSU, sílica, asbestos, β -amilóide e alum, onde a ingestão desses “agonistas” por fagócitos, pode levar ao dano lisossomal resultando na liberação de componentes presentes nesse compartimento para o citosol. Haveria alguma molécula, até então aprisionada no lisossomo, capaz de despertar o receptor NLRP3?. Catepsina B, uma protease presente no lisossomo, foi indicada como um possível ligante direto de NLRP3 capaz de levar a formação de inflamosomo (Halle et al. 2008; Hornung et al. 2008). No entanto macrófagos deficientes em catepsina B são plenamente capazes de ativar caspase-1 e maturar IL-1 β em resposta à estruturas particuladas ou cristais (Dostert et al. 2008).

O terceiro modelo leva em consideração um componente microbicida altamente conservado evolutivamente, conhecido como espécies reativas de oxigênio (ROS) (Bolwell 1999). Todas as moléculas capazes de promover formação do NLRP3-inflamosomo também levam a produção de ROS. Por outro lado, se ROS é bloqueado por inibidores químicos, a ativação de caspase-1 é suprimida. Teria ROS alguma influência na ativação de NLRP3 e consequentemente na montagem do inflamosomo? (Cruz et al. 2007; Petrilli et al. 2007; Cassel et al. 2008; Dostert et al. 2008; Gross et al. 2009; Shio et al. 2009). A fonte de ROS nesse modelo ainda não foi bem definida, no entanto a supressão de uma subunidade comum (p22) à NADPH oxidases tem implicado na inibição da ativação do inflamosomo (Dostert et al. 2008). Apesar da forte evidência de que a produção de ROS seja uma peça chave desse quebra cabeça, ainda há uma série de aspectos que precisam de resolução. Por exemplo, alguns agentes indutores de ROS como citocinas, são incapazes sozinhas de engatilhar a formação dos inflamasomos. (Bauernfeind et al. 2009)

Acredita-se que o domínio LRR do NLRP3 possui um importante papel na atividade de autoinibição desse receptor de modo semelhante ao NLRC4 (Poyet et al. 2001). Essa inibição parece estar relacionada com a presença das proteínas chaperones SGT1 HSP90 ligadas ao domínio LRR, evento o qual torna o receptor NLRP3 inativo, porém pronto para responder quando requisitado (Mayor et al. 2007). Após a ativação do NLRP3, como proposto nos três modelo acima citados, esses receptores se oligomerizam levando ao agrupamento dos domínios PYD os quais então tornam-se disponíveis para uma interação homotípica com o domínio PYD da molécula adaptadora ASC, a qual utiliza o seu domínio CARD para recrutar a pro-caspase-1. A montagem dessa estrutura posiciona a pró-caspase-1 em um orientação ótima para que ocorra uma autoclivagem. A caspase-1 ativa vista sob a forma de tetrâmero p10/p20 agora pode clivar os seus substratos, por exemplo IL-1 β , que é então liberada em sua forma madura por um caminho ainda desconhecido (Schroder e Tschopp 2010).

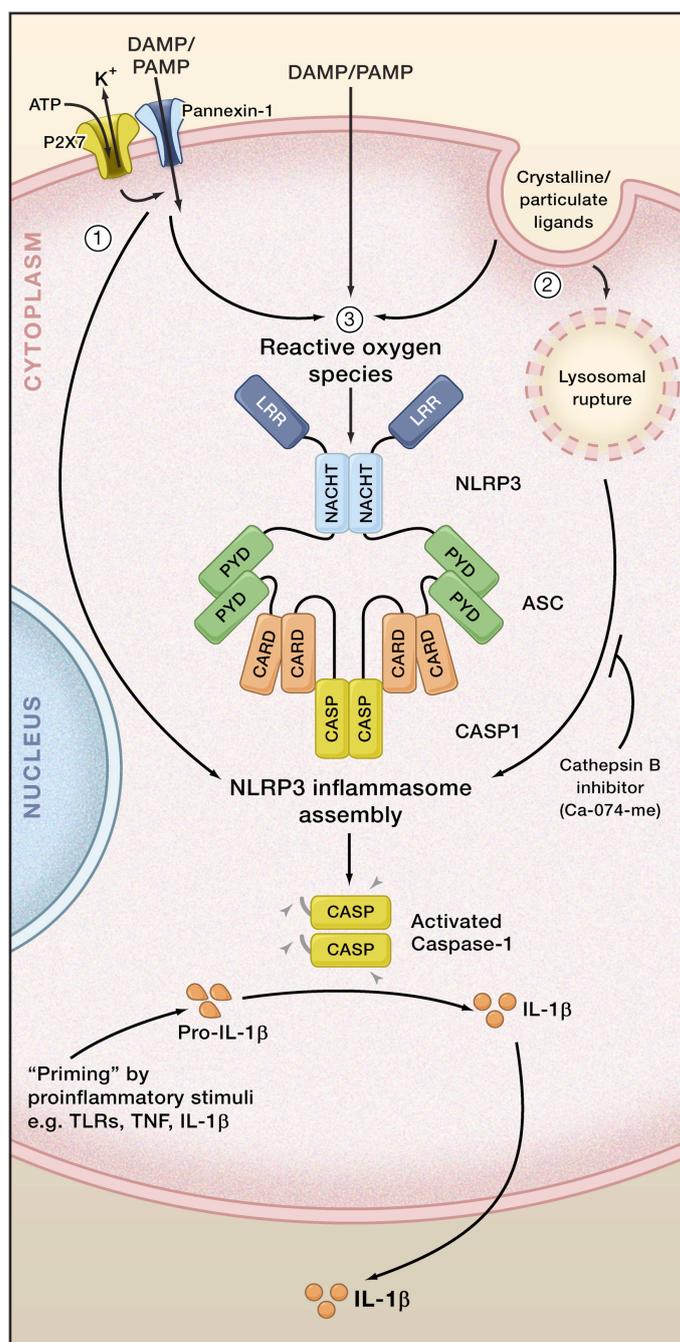


Figura 2 - Os três principais modelos propostos para explicar a formação do NLRP3-inflamosomo.

(1) O ATP extracelular promove a formação de poro na membrana de modo dependente do receptor P2X7 e do hemi-canal Panexina-1, permitindo a entrada no citosol de agonista diretos de NLRP3. (2) Estrutura cristalinas ou particuladas podem ser fagocitadas e devido as suas características físicas podem levar a ruptura do lisossomo. Moléculas presentes no ambiente lisossomal pode então estar relacionadas com a ativação de NLRP3. (3) Todos os DAMPs e PAMPs incluindo ATP e ativadores cristalinos/particulados são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS). Um via dependente de ROS pode levar a ativação de caspase-1 de modo dependente de NLRP3 (Schroder e Tschopp 2010).

1.5 Capase-1 ativa, distúrbios inflamatórios e a malária.

Mais de 70 mutações no gene NLPR3 foram identificadas, sendo essas relacionadas com as conhecidas “cryopyrinopatias” ou síndromes da febre periódica associado a “cryopyrin” (CAPS) (Hoffman e Wanderer 2010; Hoffman e Brydges 2011). PBMCs de pacientes que sofrem de CAPS secretam uma quantidade muito maior de IL-1 β espontaneamente ou após dado um estímulo ativador de NLRP3 (Willingham et al. 2007). Os sintomas característicos observados em pacientes com algum tipo de CAPS como a recorrente urticaria, artralgia, perda auditiva, conjuntivite e febre são praticamente eliminados com tratamento utilizando Anakinra, um antagonista de IL-1R, ou outra estratégia que possa impedir a sinalização de IL-1 β (Muckle e Wellsm 1962; Stych e Dobrovolny 2008; Montealegre Sanchez e Hashkes 2009) (Masters et al. 2009). Isso porque essas mutações são observadas em maior frequência no domínio relacionado com a regulação da montagem dos inflamosomos, NACHT, e em uma pequena porcentagem na porção LRR. Uma mutação nesse domínio proporciona a desregulação da montagem dessas estruturas podendo levar a um aumento dessas plataformas no citosol (Duncan et al. 2007).

Animais contendo algumas mutações no NLPR3 foram desenvolvidos no intuito de disponibilizar modelos para o estudo de CAPS. O fenótipo comum entre todas as cepas desenvolvidas foi o aparecimento de eritema e abscesso marcado por uma intensa atividade inflamatória. Os níveis de IL-1 β , TNF- α bem como a produção de IL-17, mostraram-se elevados nos sítios de inflamação. Após o tratamento desses animais com drogas que levaram a inibição da sinalização de IL-1 β , assim como o acréscimo de outra manipulação genética eliminando o receptor IL-1R, mostraram um papel parcial de IL-1 β na progressão da doença (Brydges et al. 2009; Meng et al. 2009).

A hiperuricemia crônica e conseqüente a deposição de cristais de MSU nas articulações, características da doença gota, induzem uma potente resposta inflamatória caracterizada pelos níveis elevados de IL-1 β , TNF- α e IL-18 (Martinon 2010; Martinon 2010). Foi observado que a injeção de cristais de MSU no peritônio de camundongos induz uma forte inflamação de modo dependente de neutrófilo, NLRP3 e IL-1R (Martinon 2010). Além disso, ensaios clínicos

utilizando um antagonista de IL-1R em pacientes sofrendo de gota aguda levou a uma significativa melhora dos sintomas.(So et al. 2007).

Agregados insolúveis de β -amiloide estão associados com doenças neurodegenerativas como por exemplo a doença de Alzheimer (Hardy e Allsop 1991; Mudher e Lovestone 2002). Em 2008 foi constatado que a presença extracelular dessa proteína mal dobrada em placas senis, e somente sob a forma fibrilar, induz uma resposta inflamatória por macrófagos residentes de modo dependente de NLRP3 (Halle et al. 2008).

Um outro exemplo de indutor de inflamação estéril são os cristais de colesterol, funcionando como DAMPs quando capturados por macrófagos. Recentes estudos têm mostrado que a deposição de cristais de colesterol coincide com a infiltração de macrófagos para o interior da placa aterosclerótica. Ademais, a produção de IL-1 β por macrófagos em resposta a cristais de colesterol ocorre de maneira dependente de NLRP3 (Dowell et al. 2010).

Estruturas cristalinas ou particuladas provenientes de fontes exógenas também são capazes de promover inflamação estéril de modo dependente de NLRP3. Isso tem sido observado, por exemplo, na exposição ocupacional à asbesto e sílica que são responsáveis pela indução da inflamação nos pulmões, podendo levar a doenças crônicas e debilitantes. Essas partículas são fagocitadas por macrófagos desencadeando a secreção de quantidades alarmantes de IL-1 β proveniente da ativação de caspase-1, em um fenômeno que possui o receptor NLRP3 com um ponto chave. Corroborando com esses dados foi observado que animais deficientes em NLRP3 (NLRP3^{-/-}) são menos susceptíveis à lesão pulmonar induzida por sílica e asbestos, diminuindo a infiltração neutrofílica e a produção de citocinas (Cassel et al. 2008; Dostert e Petrilli 2008; Dostert et al. 2008; Hornung et al. 2008)..

A hemozoína é um cristal presente no ciclo da malária, gerado pelo metabolismo do *Plasmodium spp.* como uma forma de eliminar os tóxicos grupamentos heme liberados em decorrência da digestão da hemoglobina pelo parasito (Sherman et al. 1968; Egan 2008). Dostert e colaboradores mostraram que essa estrutura poderia providenciar sinais de perigo levando a ativação de caspase-1 de modo dependente de NLRP3. Foi demonstrado que a fagocitose, a produção de ROS e o efluxo de K são fatores limitantes para ativação de

caspase-1 por hemozoína (Dostert et al. 2009; Shio et al. 2009). No entanto, ainda não há nenhuma evidência de que a infecção por *Plasmodium spp. in vivo* possa levar a formação do inflamosomo.

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo geral.

Investigar a formação do inflamosomo durante a infecção por *Plasmodium*.

2.2 Objetivos específicos.

- Verificar se a infecção por *P.vivax* e *P.chabaudi* pode levar a ativação de caspase-1.
- Identificar possíveis receptores citosólicos envolvidos na ativação de caspase-1 durante a malária murina.
- Investigar alguns mecanismos relacionados com a ativação de caspase-1 e a secreção de IL-1 β durante a malária murina.
- Avaliar possíveis implicações da ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β na patogênese da malária durante a infecção por *P.chabaudi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 Reagentes.

A não ser que seja declarado ao contrário, todos os reagentes foram adquiridos junto à SIGMA. Todos os anticorpos utilizados em ensaios de citometria de fluxo, além do 7AAD e PI são provenientes da Ebioscience. O kit de detecção de Caspase-1 (FLICA™ CASPASE-1 kit) foi adquirido junto a ImmunoChemistry Technologies, LLC. Os anticorpos primários caspase-1 (p10) humano, ASC e actina foram obtidos junto a Santa Cruz Biotechnology. O anti-caspase-1 (p20) foi uma doação da Genentech. Todos os anticorpos secundários utilizados são provenientes da empresa KPL. Ficoll-Paque Plus foi obtido junto a GE Healthcare e o “crosslinker” disuccinimidil suberato, Pierce (DSS) junto a Fisher Scientific. O inibidor de protease livre de EDTA é disponibilizado pela Roche, e os meios de cultura RPMI e DMEM pela Gibco. Os kits de ELISA são provenientes da R&D Systems e o Cytometric Bead Array (CBA) da BD Bioscience.

3.2 Pacientes.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou e também pelo Comitê de Ética e Pesquisa Brasileiro (CEP 096/09 CONEP: 15653). Pacientes infectados por *P.vivax* foram atendidos na clínica de malária, sendo essa parte do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Porto Velho, Brasil. Essa é uma região endêmica de malária pertencente a bacia amazônica. A constatação da infecção por *P.vivax* foi definida por meio da avaliação microscópica convencional utilizando lâminas de gota espessa. Essa avaliação foi feita por microscopistas com experiência em diagnósticos de malária em área endêmica. Os pacientes que apresentaram no mínimo 100 formas de *P.vivax* por gota espessa foram convidados a participar do estudo. Imediatamente após a confirmação da infecção por *P.vivax*, o sangue era coletado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico. Após a avaliação médica, os pacientes recebiam os medicamentos cloroquina e primaquina iniciando o tratamento de 15 dias. Entre 30-40 dias após o início do tratamento os pacientes retornavam para verificação de cura parasitológica, avaliada por microscopia. Imediatamente após essa confirmação

o sangue desses pacientes eram coletados e utilizados como controle. Indivíduos saudáveis residentes de Porto Velho foram incluídos como controles adicionais.

3.3 Modelo murino de malária e animais.

Um modelo não letal de malária foi utilizado em todo estudo envolvendo camundongos. A cepa *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS é mantida congelada em nitrogênio líquido. Esses parasitas foram mantidos viáveis por passagens de semanais. Após 12 passagens consecutivas uma nova alíquota era descongelada. Os animais utilizados nos experimentos foram infectados por via intraperitoneal com 10^5 hemácias parasitadas (Stevenson et al. 1990). Os animais C57BL/6 bem como $IFN\gamma^{-/-}$ $TNFR1^{-/-}$ foram originalmente adquiridos junto aos Laboratórios Jackson. Os camundongos $MyD88^{-/-}$ foram gentilmente disponibilizados pelo Prof. S. Akira (Universidade de Osaka). Os camundongos $ASC^{-/-}$, $Casp-1^{-/-}$ e $NLRC4^{-/-}$ foram doados pelo Prof. D. Zamboni (Universidade de São Paulo). Os animais $NLRP3^{-/-}$, $NLRP12^{-/-}$ e $AIM2^{-/-}$ foram disponibilizados pelos colaboradores desse trabalho, sendo esses parte do corpo docente da Escola de Medicina da Universidade de Massachusetts. Os camundongos B6.129 foram comprados diretamente dos Laboratórios Jackson (Maine-USA). A idade desses animais sempre estava em torno de 8-12 semanas. Todos os animais foram acondicionados sob condições livre de patógenos do biotério do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG e também no biotério da Escola de Medicina de Universidade de Massachusetts, UMASSmed. Número do protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais (38/10-3).

3.4 Obtenção e estimulação de PBMCs.

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes foram obtidas por meio de separação por densidade utilizando Ficoll-Paque Plus de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). As células foram acondicionadas em placas de cultura de 96 poços sendo a densidade de 2×10^5 células/poço em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) e $10 \mu\text{g}$ de ciprofloxacina (Cellofarm) para cada ml. O sobrenadante da cultura foi coletado para dosagem citocinas 24 horas após o estímulo, como indicado na figura.

3.5 Avaliação da ativação de caspase-1 por citometria de fluxo.

PBMCs de pacientes foram marcados com as seguintes combinações de anticorpos: Monócitos (CD14/CD16), linfócitos T (CD3/CD4) e (CD3/CD8), linfócitos B e células dendríticas mielóides (CD1c/CD19), células dendríticas plasmocitóides (CD123/CD303) e células NK (CD3/CD56).

Células do baço de camundongos infectados foram marcados com as seguintes combinações de anticorpos: Macrófagos (CD11b/F480), células dendríticas (CD11C/MHC-II) linfócitos T (CD4⁺) e (CD8⁺), linfócitos B (B220⁺) e células NK (NKG2d⁺). Todas as amostras também foram marcadas com o reagente FLICA para avaliar a presença da caspase-1 ativa. A aquisição dos dados foi feita por citometria de fluxo, sendo os dados analisados com o auxílio do software Flowjo. Utilizando os parâmetros de tamanho e granulosidade a população de PBMC foi delimitada de modo que se pudesse excluir a contaminação de PMN.

3.6 Preparação do lisado celular.

O baço de animais infectados foram assepticamente removidos e macerados mecanicamente passando por uma malha de nylon, nos dias de infecção indicados nas figuras. Após a lise das hemácias, as células totais foram ressuspensas em 1 ml de RPMI com 1% de gentamicina (Schering Plough) sendo feita a quantificação utilizando uma câmara de Neubauer. Para cada "pellet" contendo 40×10^6 células foi adicionado 250 μ l de Ripa buffer enriquecido com inibidor de protease livre de EDTA seguindo as orientações do fabricante. PBMCs isolados de pacientes também foram lisados utilizando Ripa buffer enriquecido. Após 15 minutos em descanso no gelo, os lisados foram coletados e acondicionados em tubos Eppendorf e centrifugados a 13 000g durante 20min a 4°C (Rouse et al. 1994). A quantidade de proteína total foi quantificada pelo método de Bradford seguindo as orientações do fabricante.

3.7 Eletroforese e *Western blotting*.

As proteínas presentes nos lisados celulares foram separadas em gel de 15% de acrilamida por SDS-PAGE e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, U.K.). As membranas foram bloqueadas "overnight" à 4°C em PBS contendo 5% (w/v) de leite em pó desnatado e 0.1% de Tween 20. Essas membranas foram lavadas 3 vezes com

PBS contendo 0.1% de Tween 20 e então incubadas com o anticorpo primário indicado em cada figura. Os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 5% (w/v) de leite em pó desnatado e 0.1% de Tween 20. Depois de lavadas, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP e reveladas utilizando-se o sistema quimioluminescente ECL Plus de acordo com as orientações do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

3.8 Avaliação do estado oligomérico de ASC em PBMCs de pacientes.

Os PBMCs isolados de pacientes foram ressuspensos em 250 μ l de uma solução hipotônica (10mM HEPES pH7.9; 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.2mM PMSF, 0.5mM DTT, mais o inibidor de protease Roche). As amostras foram incubadas durante 15 minutos no gelo e submetidas a 80 ciclos no homogeneizador Kontes (22mm). Posteriormente essas amostras foram submetidas a um “spin” e, após coletado o sobrenadante, adicionou-se o mesmo volume da solução hipotônica nesses sobrenadantes que então foram centrifugados durante 8 minutos a 10.000g. Os “pellets” foram ressuspensos em 500 μ l de solução CHAPs buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, e 0.1% CHAPs, 0.1 mM PMSF, mais inibidor de protease da Roche) e novamente centrifugados. Esse processo foi repetido por duas vezes. Finalmente os “pellets” foram ressuspensos em 200 μ l de CHAPs buffer onde foi adicionado 4 μ l do “crosslinker” DSS à 100mM, chegando na concentração final de 2mM. As amostras foram então incubadas por 30 minutos protegidas da luz. A reação foi parada quando adicionado 20 μ l de tampão de amostra 6x. Os oligômeros de ASC foram resolvidos em gel de acrilamida 12% em SDS-PAGE.

3.9 Dosagem de citocinas.

Todas as citocinas foram dosadas utilizando kits comerciais de ELISA (R&D Systems), e CBA (BD Bioscience) como indicado em cada figura seguindo exatamente as recomendações do fabricante.

4. RESULTADOS.

4.1 Oligomerização de ASC e a ativação de caspase-1 são eventos observados durante a infecção por *P. vivax*.

Em 2009, Dostert e colaboradores demonstraram que a hemozoína teria a capacidade de promover a formação do inflamosomo utilizando NLRP3 como receptor (Dostert et al. 2009). No entanto, ainda não havia sido demonstrado que esse fenômeno pudesse ocorrer durante a malária. No intuito de verificar se a infecção por *Plasmodium* poderia levar a ativação de caspase-1, foi utilizado lisado de PBMC de pacientes infectados por *P.vivax* em ensaios de Western blot. Amostras provenientes desses lisados apresentaram a subunidade ativa (p10) dessa protease (**Figura. 3a**).

Durante a formação do inflamosomo alguns receptores citosólicos como NLRP3 utilizam a molécula adaptadora ASC para recrutar a pro-caspase-1, enquanto outros, por exemplo NLRC4, tem a capacidade de fazer esse recrutamento ligando diretamente no domínio CARD (Schroder e Tschopp 2010). Visto isso, a presença de multímeros de ASC pode ser um indicativo da formação de inflamosomo, dependente dessa molécula, ou do piroptosomo (Fernandes-Alnemri et al. 2007). Utilizando um protocolo de “crosslink” foi possível constatar que a infecção por *P.vivax* leva a oligomerização de ASC podendo ser observado a presença de dímeros, trímeros e tetrâmeros dessa molécula (**Figura. 3b**).

Um dos produtos gerados pela caspase-1 ativa é a IL-1 β , uma citocina proinflamatória produzida por macrófagos e monócitos ativados. Sendo um pirógeno endógeno, IL-1 β está envolvida em inflamações crônicas e agudas possuindo um papel crucial em respostas febris (Dinarello 1998; Dinarello et al. 1999). Quando avaliado os níveis de IL-1 β no sobrenadante de PBMCs de pacientes infectados por *P.vivax* e estimulados com LPS, um potente indutor de pro-IL-1 β , pôde-se observar níveis elevados dessa molécula em sua forma madura (**Figura. 3C**).

4.2 Monócitos inflamatórios (CD14^{low}CD16⁺) e monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) são a fonte de caspase 1 ativa durante a infecção por *P.vivax*.

Monócitos presentes no sangue periférico são células fagocíticas derivadas da medula óssea envolvidas na resposta imune inata a uma gama de microorganismos como bactérias, fungos, protozoários e também a infecção viral (Gupta et al. 2001; Stroher et al. 2001; Serbina et al. 2008; Serbina et al. 2009). No entanto, a nossa compreensão a respeito do espectro funcional dos monócitos e de suas subpopulações ainda é incompleta. Vários trabalhos tem revelado uma heterogeneidade dentro da população de monócitos, sendo bem definido duas subpopulações distintas.(Geissmann et al. 2003; Auffray et al. 2007; Geissmann et al. 2008; Auffray et al. 2009; Cros et al. 2010; Geissmann et al. 2010). Curiosamente, observamos o aumento de uma dessas subpopulações em pacientes infectados com *P.vivax*, caracterizada pela expressão de baixos níveis de CD14 além de ser positiva para CD16 (CD14^{low}CD16⁺) . No entanto, quarenta dias após o início do tratamento contra o *P.vivax*, essa subpopulação de monócitos praticamente desaparece e assim, o perfil desses pacientes, passa a ser semelhante ao encontrado em indivíduos saudáveis (**Figura 3d,3f**). É interessante notar que tal subpopulação celular foi descrita como sendo a principal fonte de IL-1 β e TNF- α em resposta a LPS (Belge et al. 2002).

Monócitos clássicos definidos por apresentarem CD14 na superfície e perfil negativos para CD16 (CD14⁺CD16⁻) também foram observados em maior quantidade no sangue de pacientes antes do tratamento (**Figura 3d,3f**). Dentre as subpopulações avaliadas nos PBMCs somente os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) e os também conhecidos como monócitos patrulhadores (CD14^{low}CD16⁺) (Cros et al. 2010), apresentaram a caspase-1 ativa (**Figura 3e**). É importante ressaltar que a ativação da caspase-1 ocorreu de modo diferencial apenas nos monócitos inflamatórios (CD14^{low}CD16⁺) ao comparar os pacientes antes e após o tratamento (**Figura 3e,3f**).

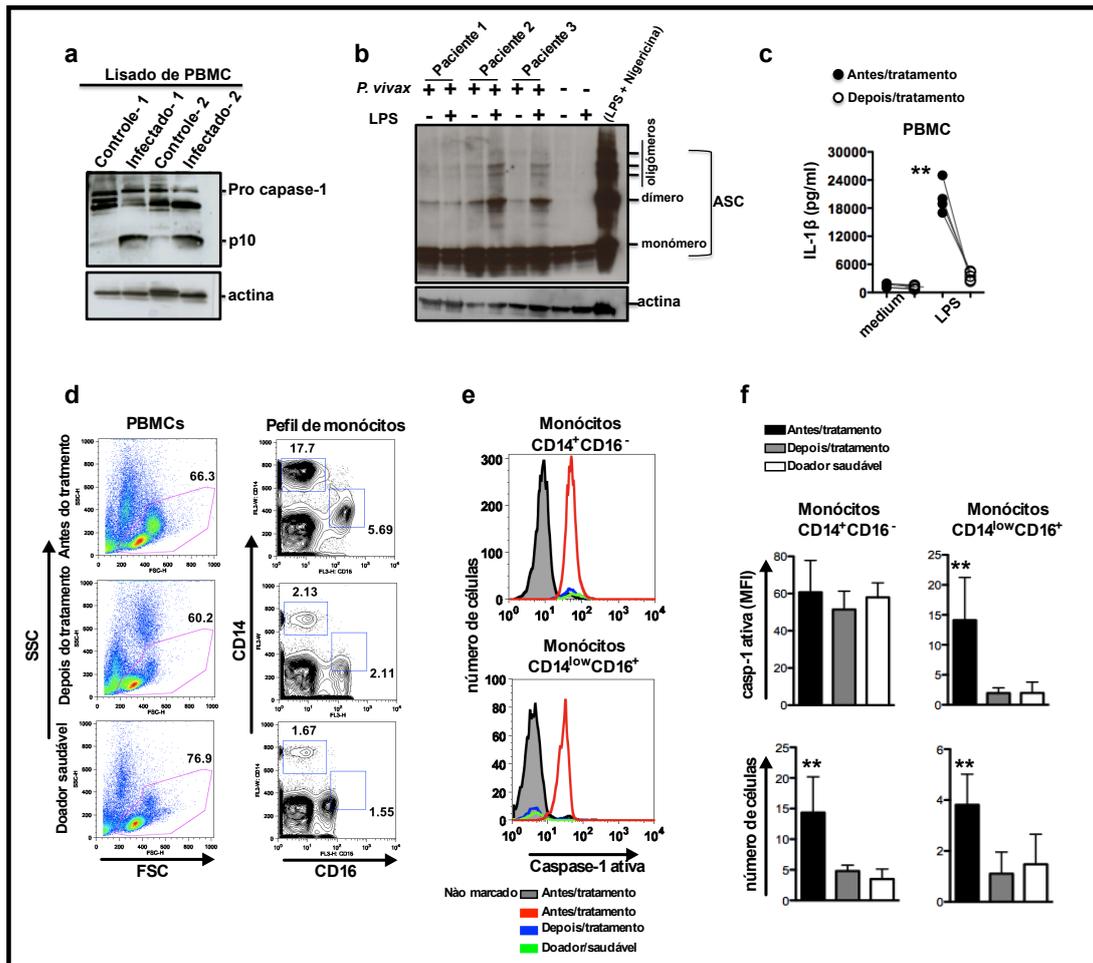


Figura 3 Ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β durante a infecção por *P. vivax*.

(a) A subunidade (p10) da caspase-1 ativa foi encontrada em lisado de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes infectados por *P. vivax*. (b) Dímeros e oligômeros de ASC foram encontrados em PBMCs submetidos a um protocolo de "crosslink" utilizando disuccinimidil suberato (DSS). Também foi utilizado um controle positivo, PBMCs de doadores saudáveis estimulados com LPS (100ng/ml) durante 3 horas e Nigericina (10 μ M) durante 50min. Anti-actina foi utilizado como normalizador. (c) (PBMCs) obtidos de indivíduos infectados por *P. vivax* antes e 30-40 dias após o tratamento. Os níveis de IL-1 β foram avaliados em sobrenadante de PBMCs estimuladas com LPS (100ng/ml) durante 24 horas por meio de citometria de fluxo (kit inflamatório CBA) (d) A superfície dos PBMCs foram marcadas com anticorpos CD14 e CD16 para determinar o perfil de monócitos, sendo encontrado (CD14⁺CD16⁻) e (CD14^{low}CD16⁺). (e) Um inibidor de caspase-1 ativa acoplado a carboxifluoresceína ([FAM-YVAD-FMK] reagente FLICA) foi utilizado para avaliar a presença de caspase-1 ativa em monócitos por citometria de fluxo. (f) Mediana da intensidade de fluorescência de caspase-1 ativa e média do número de células expressando caspase-1 ativa (5 pacientes infectados por *P. vivax* antes e após o tratamento e 8 pacientes saudáveis). As diferenças estatísticas são indicadas por (**) com o *p*-value variando de (0.0025-0.0055). Esses valores foram obtidos por meio do (*t* test) pareado ou Mann-Whitney quando o teste de normalidade falhava.

4.3 Macrófagos e células dendríticas presentes no baço de camundongos, apresentam caspase-1 ativa de modo dependente de ASC durante a infecção por *P.chabaudi*.

Visto que a infecção por *P.vivax* foi capaz de promover a ativação de caspase-1 em humanos, foi avaliado se o mesmo poderia ocorrer durante a infecção por um modelo murino, *P.chabaudi*. Inicialmente foi observado por meio de citometria de fluxo a presença dessa protease em células do baço de animais selvagens, a qual mostrou-se ausente tanto em animais deficientes para a molécula adaptadora ASC quanto em células de animais não infectados (**Figura 4a**). O mesmo resultado foi comprovado por “Western blot” (**Figura 4b**). Esse dado foi de encontro à observação feita em humanos, demonstrado na **Figura 3b**, em que pôde-se verificar a presença de ASC oligomerizado, indicando a dependência dessa molécula para a formação de inflamosomo e ativação de caspase-1 durante a malária.

Até o momento ainda não havia sido determinado se existiria alguma população específica presente no baço na qual a caspase-1 pudesse ser ativada durante a malária murina. Visando investigar tal aspecto, foram utilizados marcadores para linfócitos T e B, células NK, macrófagos e células dendríticas, juntamente com o inibidor de caspase-1 fluorescente em ensaios de citometria de fluxo. Foi possível observar que durante a infecção por *P. chabaudi* a caspase-1 é ativada somente em macrófagos (CD11b⁺/F480⁺) e em células dendríticas (CD11c⁺/MHC-II⁺) (**Figura 4c**), não havendo diferença nas demais populações avaliadas quando comparado animais selvagens infectados ou não (**Figura 4d**).

Curiosamente não foi observado um aumento significativo de IL-1 β circulante no soro de animais C57BL/6 infectados, quando comparado com os níveis vistos no soro dos animais deficientes para ASC (ASC^{-/-}) e Caspase-1 (Casp-1^{-/-}). No entanto, quando foi inoculado baixos níveis de LPS (10 μ g) em animais selvagens infectados, pôde-se observar níveis alarmantes de IL-1 β circulante nove horas após à esse desafio. Por outro lado, animais deficientes em componentes do inflamosomo como ASC e Casp-1 e animais selvagens não infectados apresentaram baixos níveis dessa citocina, mesmo após o inóculo de LPS (**Figura 4e**).

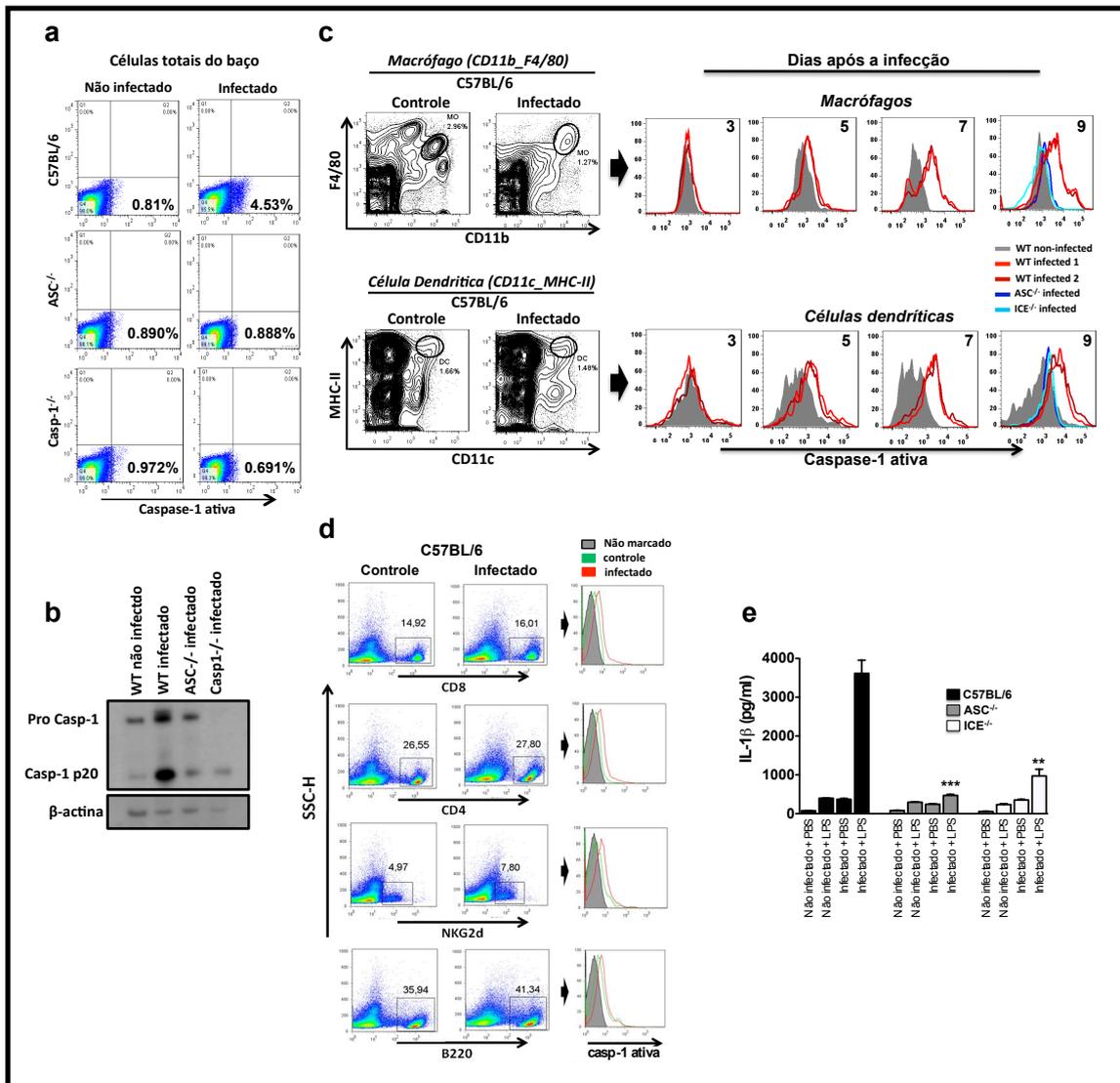


Figura 4 - Caspase-1 é ativada durante a infecção por *P.chabaudi*.

(a) Camundongos C57BL/6, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} foram infectados via i.p. com 10⁵ hemácias parasitadas (iRBCs) por *P.chabaudi*. Sete dias após a infecção células do baço desse animais foram marcadas com o reagente FLICA no intuito de avaliar a presença da caspase-1 ativa (b) ou lisadas gerando amostras utilizadas em ensaios de Western blot. Esses resultados são representativos de 2 ensaios diferentes, com resultados similares, onde foram utilizados 3 animais por grupo. (c-d) Células do baço de animais infectados foram marcadas no intuito de identificar macrófagos (CD11b⁺ F4/80⁺), células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺), linfócitos T (CD8⁺) ou (CD4⁺), células NK (NKG2d⁺) linfócitos B (B220⁺). Essas células também foram marcadas com o reagente FLICA no intuito de identificar a presença de caspase-1 ativa. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes nos quais foram utilizados 3 animais por grupo (e) Animais infectados por *P.chabaudi* receberam um inóculo de 10μg de LPS no 7º dia após a infecção. Nove horas após à esse inóculo, o soro desse animais foram coletados para a dosagem de IL-1β. Esses resultados são a média de 15 animais provenientes de 3 experimentos independentes. As diferenças significativas são indicadas por (***) *p-value*=0.0008) e (** *p-value*=0.0023) obtido pelo Mann-Whitney test.

4.4 A ativação de caspase-1 durante a infecção por *P.chabaudi* depende de MyD88.

A atividade do inflamosomo bem como a disponibilidade da pro-IL-1 β são altamente influenciados pela integração das vias de sinalização pro-inflamatórias, como aquelas dirigidas por TLRs (Lamkanfi 2011). Normalmente, quando se estuda a ativação do inflamosomo, principalmente *in vitro*, é utilizado o artifício de “priming” obtido a partir do estímulo com agonistas de TLRs, como o LPS, ou citocinas pro-inflamatórias, como TNF α (Schroder e Tschopp 2010). Embora a função primária do “priming” seja garantir a disponibilidade de pro-IL-1 β , existem evidências de que esse efeito pode potencializar a atividade dos inflamosomos que utilizam NLRP3 como receptor. por meio da translocação de NF- κ B, fator de transcrição o qual controla a expressão desse componente do inflamosomo (Bauernfeind et al. 2009). Além disso, um segundo sinal é requerido para que ocorra a oligomerização desse receptor com os demais componentes do inflamosomo, como por exemplo sinais de perigo emitidos por ATP ou nigericina. No entanto, ainda há muito a ser investigado no que se refere a sinergia entre os sinais promovidos pelos PAMPs e DAMPs na formação dos inflamosomos.

A sinalização via Myd88 requerida por todos os TLRs, com exceção do TLR3, culmina com a translocação de NF- κ B para o núcleo (Medzhitov et al. 1998). Sendo assim, foi avaliado se a perda dessa via poderia influenciar de alguma maneira na ativação de caspase-1 durante a malária murina. Na **Figura 5a** pode-se verificar a ausência dessa protease em sua forma ativa e níveis reduzidos de sua forma inativa em amostras provenientes do lisado dos esplenócitos de animais deficientes para MyD88 (MyD88^{-/-}). Esses animais também deixaram de apresentar caspase-1 ativa em macrófagos e em células dendríticas durante a infecção por *P.chabaudi* (**Figura 5b**).

Finalmente, animais (MyD88^{-/-}) apresentaram baixos níveis de IL-1 β e também de TNF- α circulante no soro quando comparados com os níveis produzidos pelos animais selvagens nove horas após o inóculo de baixas doses de LPS (**Figura 5c**).

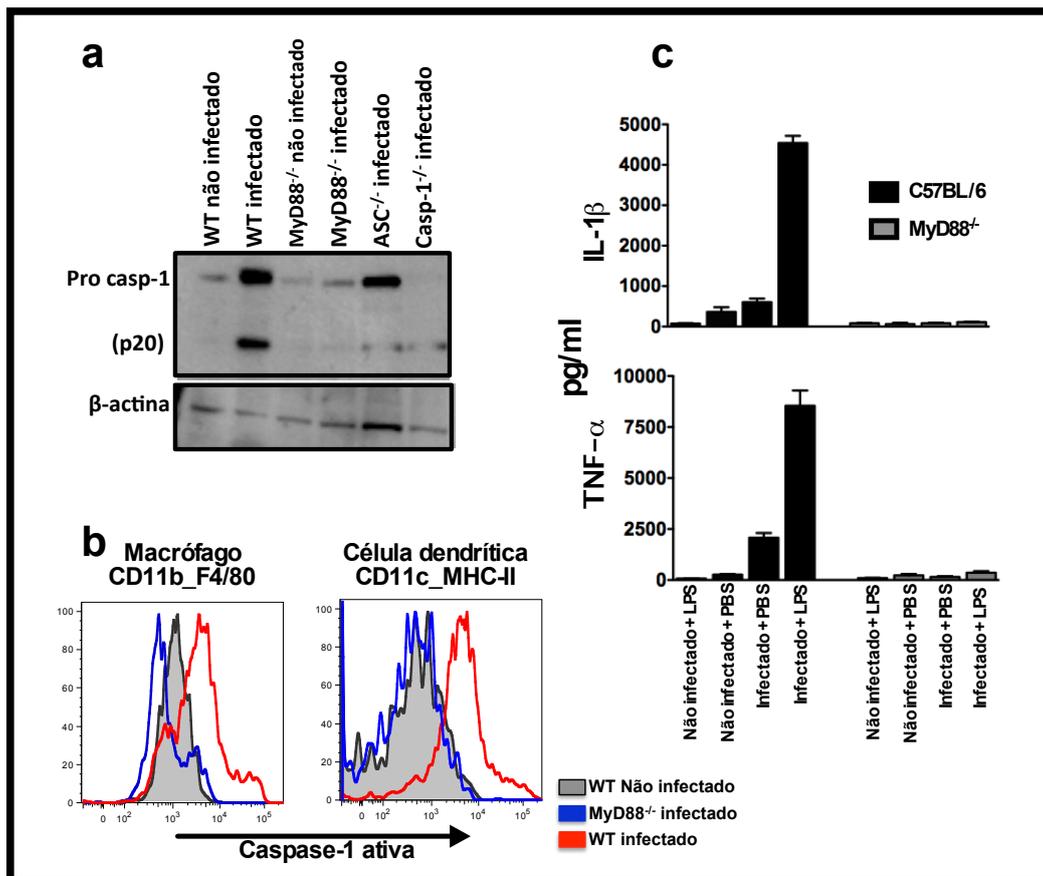


Figura 5 – A sinalização via MyD88 é um evento fundamental para a ativação de caspase-1 durante a malária

(a) Camundongos C57BL/6, MyD88^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} foram infectados via i.p com 10⁵ hemácias parasitadas (iRBCs) por *P.chabaudi*. Sete dias após a infecção, células do baço desses animais foram lisadas e utilizadas em ensaios de “Western blot”. Esses resultados são representativos de 2 ensaios diferentes, com resultados similares, onde foram utilizados 3 animais por grupo. (b) 7 dias após a infecção células do baço provenientes de animais C57BL/6, MyD88^{-/-} foram marcadas identificando macrófagos (CD11b_F4/80) e células dendríticas (CD11c_MHC-II). A presença de caspase-1 ativa foi identificada por meio do reagente FLICA. Esses resultados são representativos de 2 experimentos com resultados similares onde foram utilizados 4 animais por grupo. (c) Animais infectados por *P.chabaudi* receberam um inóculo de 10 μ g de LPS no 7^o dia de infecção. Nove horas após a esse inóculo, o soro desses animais foram coletados para a dosagem de IL-1 β e TNF por ELISA. Esses resultados são a média de 10 animais provenientes de 2 experimentos independentes. As diferenças significativas são indicadas por (***) *p-value*=0.0008) obtido pelo Mann-Whitney test.

4.5 IFN- γ e TNFR1: componentes inflamatórios que regulam a ativação de caspase-1 e a liberação de IL-1 β durante a malária murina.

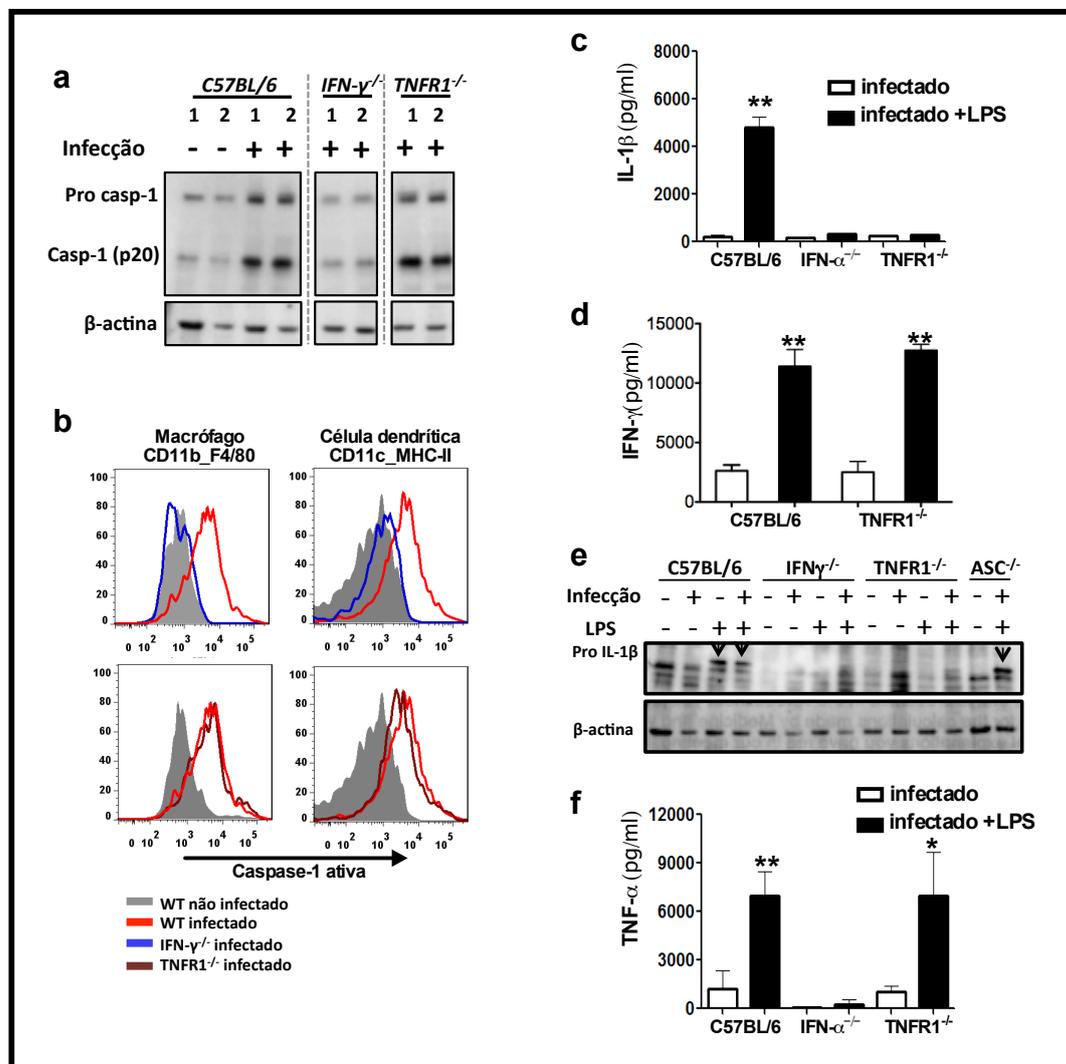
Citocinas pro-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , são comumente relacionadas com a morbidade causada pela malária, sendo essas encontradas em níveis elevados no plasma de pacientes infectados por *P.falciparum* (Clark et al. 2008). Desse modo, foi questionado se tais citocinas poderiam ter algum papel na regulação e ativação de caspase-1 durante a infecção por *P.chabaudi*. Assim, células do baço de animais infectados e deficientes para IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}) e TNFR1 (TNFR1^{-/-}) foram obtidas no intuito de avaliar a presença de caspase-1 ativa. Na **Figura 6a**, observamos a dependência de IFN- γ para a ativação de caspase-1 e, similarmente aos resultados observados em animais deficientes em MyD88, a sinalização via IFN- γ parece estar envolvida no controle da expressão de pro-caspase-1.

Bauernfeind e colaboradores (Bauernfeind et al. 2009) demonstraram que o “priming” por meio da sinalização via TNFR pode ser um fator limitante na ativação de NLRP3-inflamosomo *in vitro*. Entretanto, *in vivo*, a ativação de caspase-1 durante a malária murina não requer a sinalização de TNFR1 (**Figura 6a**).

Como era esperado, baseado em resultados obtidos anteriormente, a caspase-1 ativa aparece em macrófagos e em células dendríticas de animais TNFR1, mas não está presente nos animais IFN- γ nocautes (**Figura 6b**).

De modo curioso, animais TNFR1^{-/-} apresentaram níveis basais de IL-1 β circulante, mesmo nove horas após o inóculo de LPS (**Figura 6c**). É importante notar que a ativação de caspase-1 ocorre normalmente nesses animais, inclusive a falta de sinalização via TNFR1 não compromete a produção de IFN- γ (**Figura 6d**), sendo essa citocina um componente limitante para ativação de caspase-1 durante a malária murina (**Figura 6a,6b**). Após esses resultados surgiu a seguinte pergunta: por qual motivo IL-1 β não é vista no soro de animais TNFR1^{-/-}? Como hipótese, baseada em dados secundários, (Dinarello et al. 1986; Hiscott et al. 1993) propusemos que a sinalização via TNFR1 poderia estar controlando a expressão da pro-IL-1 β . Como pode ser observado na **Figura 6e** os animais deficientes para TNFR1 bem como os IFN- γ nocautes não são capazes de expressar pro-IL-1 β , mesmo após o inóculo de LPS.

Provavelmente a falta de pro-IL-1 β em animais deficientes em IFN- γ se deve a incapacidade desses animais secretarem níveis elevados de TNF- α durante a infecção por *P.chabaudi* (Figura 6f).



Fi

Figura. 6 (a) Citocinas próinflamatórias envolvidas na ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β durante a infecção por *P.chabaudi*.

Camundongos C57BL/6, IFN γ ^{-/-} e TNFR1^{-/-} foram infectados via i.p com 10⁵ hemácias parasitadas (iRBCs) por *P.chabaudi*. Sete dias após a infecção, as células do baço desses animais foram lisadas e utilizadas em ensaios de "Western blot". Esses resultados são representativos de 2 ensaios diferentes, com resultados similares, onde foram utilizados 3 animais por grupo. (b) Também 7 dias após a infecção por *P.chabaudi*, células do baço provenientes de animais C57BL/6, MyD88^{-/-} foram marcadas identificando macrófagos (CD11b_F4/80) e células dendríticas (CD11c_MHC-II). A presença de caspase-1 ativa foi identificada por meio do reagente FLICA. Esses resultados são representativos de 2 experimentos com resultados similares onde foram utilizados 4 animais por grupo. Animais infectados por *P.chabaudi* receberam um inóculo de 10 μ g de LPS no 7º de infecção. Nove horas após a esse inóculo (c, d, f) o soro desses animais foram coletados para a dosagem de IL-1 β , IFN γ e TNF α por ELISA. Esses resultados são a média de 10 animais provenientes de 2 experimentos independentes. As diferenças significativas são indicadas por (**) e (*) com o *p-value* variando entre (0.0034-0.001) obtido pelo Mann-Whitney test. (e) Também no 7º dia de infecção esses animais receberam um

inóculo de 10µg de LPS. 2 horas após ao inóculo o baço foi coletado, sendo o lisado celular utilizado em ensaio de “Western blot”.

4.6 A infecção por *P.chabaudi* promove a ativação de caspase 1 de modo dependente dos receptores NLRP3 e NLRP12.

No intuito de identificar um possível receptor citosólico envolvido na ativação de caspase-1 durante a malária murina, animais deficientes para NLRP3 (NLRP3^{-/-}), NLRP12 (NLRP12^{-/-}), NLRC4 (NLRC4^{-/-}) e AIM2 (AIM2^{-/-}) foram empregados nesse modelo. Como pode ser visto na **Figura 7a** a ativação de caspase-1 durante a infecção por *P.chabaudi* ocorre de modo dependente de NLRP3 e NLRP12. Animais deficientes para os receptores AIM2 (**Figura. 7b**) e NLRC4 (**dados não mostrados**) apresentaram um perfil similar aos animais selvagens, no que se refere a ativação de caspase-1. Esses resultados foram reproduzidos em ensaios de “Western blot” (**Figura 7c-d**).

Confirmando mais um vez que os altos níveis de IL-1β circulante observados após o inóculo de LPS é dependente da ativação de caspase-1 durante a malária, animais NLRP3^{-/-} e NLRP12^{-/-} mas não os AIM2^{-/-} NLRC4^{-/-}, apresentaram uma diminuição na produção dessa citocina (**Figura. 7e**). Os níveis de TNF-α circulante vistos nesse animais foram similares aos observados em animais selvagens, nove horas após o inóculo de LPS (**Figura. 7e**).

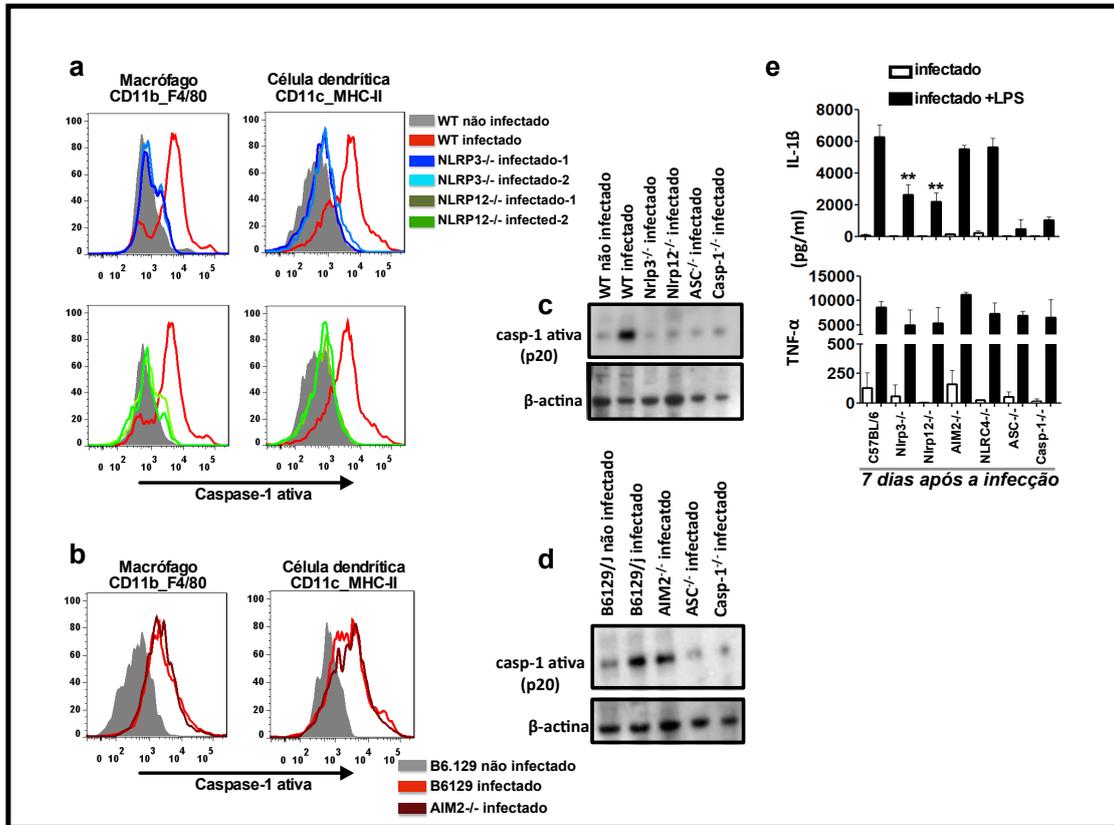


Figura 7 - Envolvimento de receptores NLRs na ativação de caspase-1 durante a malária murina.

(a-b) Camundongos C57BL/6, B6.129, NLRP3^{-/-}, NLRP12^{-/-} e AIM2^{-/-} foram infectados via i.p com 10⁵ hemácias parasitadas (iRBCs) por *P.chabaudi*. Sete dias após infecção, o baço desses animais foram coletados sendo as células marcadas no intuito de identificar macrófagos (CD11b_F4/80) e células dendríticas (CD11c_MHC-II). A presença de caspase-1 ativa foi avaliada por meio do reagente FLICA. (c-d) Essas células também foram lisadas gerando amostras utilizadas em ensaios de "Western blot". Esses resultados são representativos de 2 experimentos com resultados similares onde foram utilizados 4 animais por grupo. (e) Também no 7º dia de infecção, porém 9 horas após à um inóculo de LPS (10µg/animal), o soro desses animais foram coletados para dosagem de IL-1β e TNFα por ELISA. Esses resultados são a média de 10 animais provenientes de 2 experimentos independentes. As diferenças significativas são indicadas por (** p-value=0.0013) obtido pelo Mann-Whitney test.

4.7 Ativação de caspase-1 pode se tornar em um evento letal para o hospedeiro, se um indutor de pro-IL-1 β estiver disponível durante a malária murina.

No início desse estudo foi observado a presença de caspase-1 ativa durante a infecção por *Plasmodium*, porém fazia-se necessário também a presença de um indutor exógeno de pro-IL-1 β para que se pudesse detectar essa citocina em níveis elevados no soro de animais. Na **Figura 8a** pode ser observado uma cinética da produção de IL-1 β e TNF- α , nos tempos (0,3,6 e 9) horas após o inóculo de LPS, em quatro diferentes grupos de animais selvagens em diferentes dias após a infecção (7°, 14°, 21° e 28°). Também na **Figura 8a** pode ser visto a taxa de mortalidade de animais selvagens 12 horas após o inóculo de LPS,. Curiosamente, 100% dos animais com 7 ou 14 dias de infecção sucumbiram ao inóculo de LPS 12 horas após. Esse fenômeno não foi visto em animais não infectados (**Tabela. 1**). Vale a pena ressaltar que *P.chabaudi* não é uma cepa letal, sendo observado dois picos de parasitemia um no 7° e outro no 14° dia de infecção. Após 16 dias de infecção, o número de hemácias infectadas começa a diminuir até a cura parasitológica ocorrendo por volta do 28° de infecção (**dados não mostrados**).

Visto isso, por qual motivo a infecção por *P.chabaudi* poderia se tornar letal para o hospedeiro após uma baixa dose de LPS? A ativação da caspase-1 e por consequência a liberação de altos níveis de IL-1 β após a esse desafio, poderia está relacionada com essa letalidade?

Para responder a esse questionamentos, animais deficientes para IL-1R (IL-1R^{-/-}) foram infectados com *P.chabaudi* e 7 dias após a infecção receberam um inóculo de 10 μ g de LPS. Como pode ser observado na **Figura 8b** a perda da sinalização via IL-1R aumentou a resistência dos animais ao inóculo de LPS. É interessante notar que os níveis de TNF- α , IL-1 β bem como o perfil de caspase-1 ativa são similares entre os animais C57BL/6 e IL-1R^{-/-} (**Figura 8b-c**). Os dados mostrados **Figura 8d** deixa claro que a infecção por *P.chabaudi* fornece sinais suficientes para levar a ativação de caspase-1, mas não para expressão de pró-IL-1 β , sendo necessário um estímulo adicional o que torna presença da caspase-1 ativa algo perigoso para o hospedeiro.

Os resultados apresentados na **Tabela 1** mostram que animais $MyD88^{-/-}$, $IFN\gamma^{-/-}$ e $TNFR1^{-/-}$ são completamente resistentes a esse “choque séptico” induzido por uma baixa dose de LPS durante a malária murina. Por outro lado, animais deficientes em alguns componentes que constituem o inflamosomo, por exemplo $Casp-1^{-/-}$, $ASC^{-/-}$, $NLRP3^{-/-}$ e $NLRP12$, além do $IL-1R^{-/-}$ foram parcialmente resistentes ao inóculo de LPS, com a letalidade variando entre 12,5% a 40% nesses animais e acometendo 100% dos animais selvagens. É importante notar que animais $AIM2^{-/-}$ e $NLRP4^{-/-}$, os quais apresentaram caspase-1 ativa e $IL-1\beta$ circulante de modo similar ao que foi observado em animais selvagens.

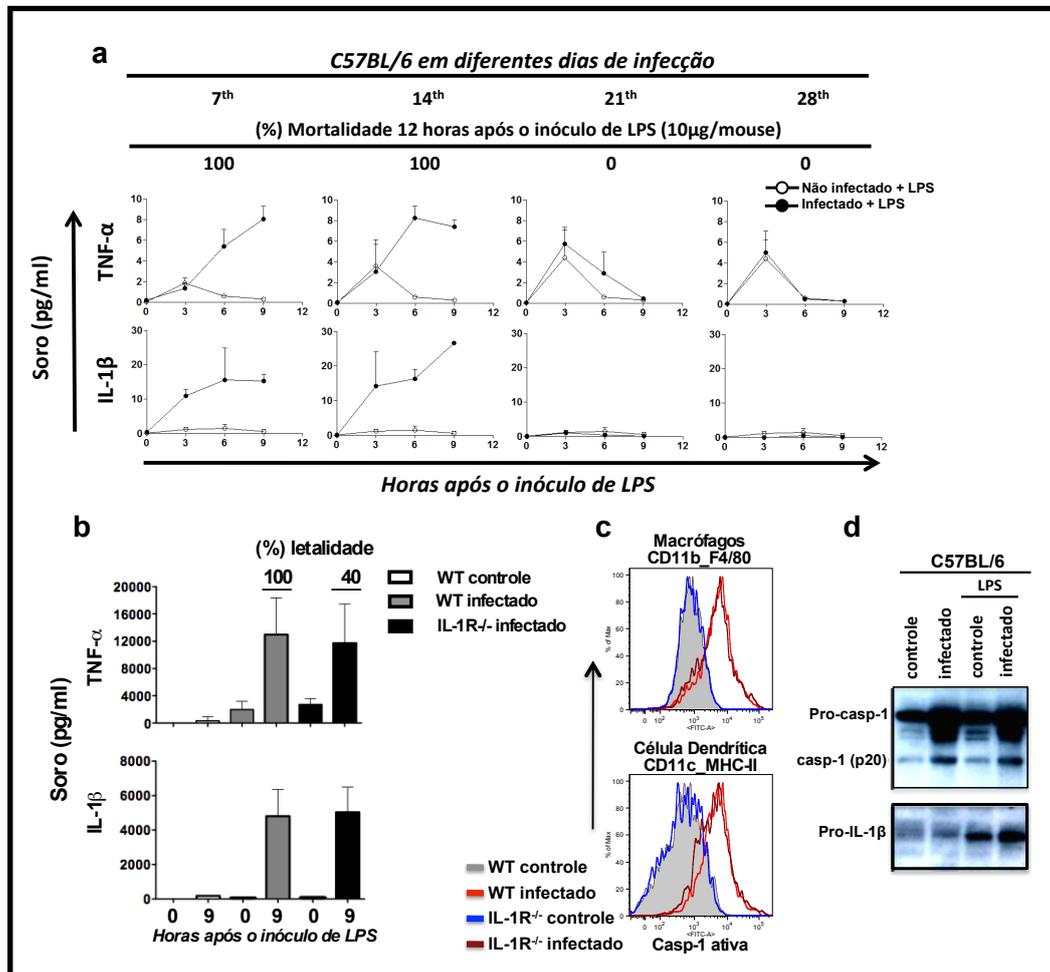


Figure 8 Consequências da predisposição para alta produção IL-1 β durante a malária murina. (a) 4 grupos de camundongos C57BL/6 foram infectados via i.p com 10⁵ hemácias parasitadas (iRBCs) por *P.chabaudi*. Esses grupos foram utilizados em diferentes dias após a infecção (7^o, 14^o, 21^o e 28^o). Esses grupos foram submetidos a um inóculo de LPS (10 μ g/animal) sendo utilizados 5 animais diferentes em cada ponto (0, 3, 6, 9 horas) da cinética onde foi avaliado a produção de IL-1 β e TNF α por meio de citometria de fluxo, utilizando o kit CBA. Foram realizados 2 ensaios com resultados similares. A taxa de mortalidade foi avaliada 12 horas após ao inóculo de LPS (10 μ g/animal). (b) Também no 7^o dia de infecção animais IL-1R^{-/-} também receberam um inóculo de LPS. 9 horas após a esse inóculo, o soro foi obtido para dosagem de IL-1 β e TNF α por ELISA, sendo mortalidade avaliada 12 horas após. (c) Macrófagos (CD11b_F4/80) e células dendríticas (CD11c_MHC-II) foram marcados utilizando o reagente FLICA no intuito de avaliar a presença de caspase-1 ativa.

Animais	N° de animais Morto/testado	(%) Média Parasitemia	(%) Mortalidade	Casp-1 ativa (MFI x 1000)	Níveis de IL-1 β (ng/ml)
Camundongos selvagens C57BL/6					
Controles não infectados	0/15	-	0	1.57 (\pm 0.17)	0.35
Infectados com <i>P.chabaudi</i>	30/30	16	100	4.21 (\pm 0.64)	6.36
Camundongos nocautes e infectados por <i>P.chabaudi</i>					
MyD88 ^{-/-}	0/5	19	0	1.23 (\pm 0.13)	0.25
IFN ^{-/-}	0/12	23	0	1.29 (\pm 0.11)	0.31
TNFR1 ^{-/-}	0/12	20	0	3.65 (\pm 0.49)	0.23
IL-1R ^{-/-}	4/10	18.5	40	3.89 (\pm 0.15)	5.40
ASC ^{-/-}	1/8	17	12.5	1.12 (\pm 0.23)	0.47
ICE ^{-/-}	3/9	16	33	1.25 (\pm 0.17)	1.27
Nlrp 3 ^{-/-}	3/10	17	30	1.18 (\pm 0.27)	2.61
Nlrp 12 ^{-/-}	2/5	17.5	40	1.28 (\pm 0.36)	1.89
AIM2 ^{-/-}	5/5	18	100	4.19 (\pm 0.42)	5.49
Nlcr4 ^{-/-} (Ipaf ^{-/-})	4/4	14.5	100	3.93 (\pm 0.32)	4.38

Tabela 1 - Associação entre a produção/sinalização de IL-1 β e a mortalidade observada em animais que receberam baixas doses de LPS.

Todos os camundongos foram infectados via i.p com 10^5 hemácias parasitadas (iRBCs) por *P.chabaudi*. No 7° dia de infecção esses animais receberam um inóculo de LPS (10 μ g/animal) sendo a mortalidade avaliada 12 horas após a esse desafio. A parasitemia foi definida por meio de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa. Células totais do baço de animais no 7° dia de infecção foram marcadas com reagente FLICA no intuito de avaliar a presença de caspase-1 ativa. Esse dados foram coletados por meio de citometria de fluxo e a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) obtidas por análises feitas utilizando o software Flowjo.

5. DISCUSSÃO.

5.1 ASC e a ativação de caspase-1 durante a malária.

Caspase-1 é ativada por complexos citosólicos conhecidos como inflamosomos (Martinon et al. 2002; Mariathasan 2007). Durante a formação desses complexos, receptores pertencentes à família dos Nod-Like receptors participam do recrutamento da caspase-1 diretamente, como por exemplo NLRC4 e NLRP1 (Poyet et al. 2001; Faustin et al. 2007) ou por meio da molécula adaptadora ASC, por exemplo NLRP2, NLRP3 e AIM2, sendo o último não pertencente à família dos NLRs (Agostini et al. 2004; Yu et al. 2006; Burckstummer et al. 2009). Estudos recentes revelaram que diferentes sinais podem levar a formação dos inflamosomos, porém, pouco se sabe a respeito dos mecanismos associados a montagem dessas estruturas (Boyden e Dietrich 2006; Faustin et al. 2007) (Mariathasan e Monack 2007) (McCoy et al. 2010).

O inflamosomo mais estudado é aquele formado a partir do receptor NLRP3, o qual é ativado por um grande número de estímulos que vão desde a infecção bacteriana a sinais gerados por cristais de natureza distintas (Kanneganti et al. 2006; Kanneganti et al. 2006; Mariathasan et al. 2006; Martinon et al. 2006; Cervantes et al. 2008; Dostert et al. 2008; Halle et al. 2008; Hornung et al. 2008; Monack 2008; Duewell et al. 2010; Kim et al. 2010). Recentemente foi demonstrado que NLRP3-inflamosomo também poderia ser montado a partir de estímulos provenientes de hemozoína, após ser fagocitada por macrófagos murinos diferenciados a partir da medula óssea (Dostert et al. 2009; Shio et al. 2009). Adicionalmente foi demonstrado que a produção de ROS bem como efluxo de K são elementos chaves na ativação da caspase-1 por hemozoína. Entretanto, nada havia sido demonstrado durante a infecção por *Plasmodium spp.*, a não ser dados contraditórios onde Dostert e colaboradores que mostraram a resistência de animais NLRP3^{-/-} à malária cerebral murina, enquanto Reimer e colaboradores demonstram exatamente o contrário (Dostert et al. 2009) (Reimer et al. 2010). No entanto, a pergunta fundamental ainda não havia sido respondida: a infecção por *Plasmodium* poderia levar a ativação da caspase-1? Nesse trabalho foi comprovado que, de fato, a caspase-1 é ativada durante a malária tanto humana quanto murina (**Figura 3-4**), sendo esse

fenômeno dependente não apenas do receptor NLRP3, mas também do NLRP12 durante a malária causada por *P.chabaudi* (**Figura 7**).

Em 2007, Fernandes-Alnemri e colaboradores demonstraram uma plataforma molecular que se forma em células THP1 (*Human acute monocytic leukemia cell line*) após o estímulo com LPS, sendo essa capaz de clivar pro-IL-1 β . Essa plataforma conhecida como piroptosomo é constituída por dímeros de ASC capazes de recrutar a pro-caspase-1. Curiosamente essa estrutura não requer a presença de nenhum receptor citosólico, seja ele pertencente à família dos NLRs ou não. Os autores citados acima avaliaram ainda o estado oligomérico de ASC por meio de um protocolo de “crosslink”, o que permitiu observar que grande parte dessa molécula estava sob a forma de dímeros além de alguns oligômeros após o estímulo com LPS (Fernandes-Alnemri et al. 2007). Nessa dissertação foi utilizado o mesmo protocolo de “crosslink” descrito anteriormente, permitindo observar a presença desses dímeros em amostras provenientes do lisado de PBMCs de pacientes infectados por *P.vivax*. A infecção causada por *P.vivax* forneceu sinais suficientes para levar a oligomerização de ASC, dispensando o estímulo de LPS (**Figura 3b**).

A ativação de caspase-1 durante a malária é fruto da formação do inflamosomo ou do piroptosomo? Quando feito o “crosslink” em amostras do lisado de PBMCs previamente estimulados com (LPS + nigericin), sendo esse um controle positivo amplamente utilizado para induzir a formação do NLRP3-inflamosomo, também foi observar a presença de dímeros de ASC (**Figura 3b**).

O piroptosomo, conforme descrito por Fernandes-Alnemri, foi elucidado em um tipo celular muito específico e, por isso, deve-se ter cuidado na extrapolação dos dados. Nesse contexto foi observado que o LPS apenas é incapaz de levar a dimerização de ASC em PBMCs de pacientes saudáveis, porém, aumenta o número de dímeros em PBMCs de pacientes infectados por *P.vivax* (**Figura 3b**). De modo curioso, a formação do piroptosomo requer ambientes com concentrações sub-fisiológicas de K, um dos pré-requisitos para a formação do NLRP3-inflamosomo bem como para a ativação de caspase-1 por hemozoína (Fernandes-Alnemri et al. 2007; Dostert et al. 2009).

Talvez os inflamosomos que utilizam ASC como molécula adaptadora (NLRP3-inflamosomo, por exemplo) possuam como parte da sua estrutura o

piroptosomo, um agregado de ASC com a função de recrutar pro-caspase-1, sendo essa ideia proposta por (Bauernfeind et al. 2009).

De modo interessante, a ativação de caspase-1 em macrófagos e células dendríticas, bem como a secreção de IL-1 β durante a malária murina, também exigiram a presença da molécula adaptadora ASC (**Figura 3**). Baseado nos resultados observados em humanos e em camundongos, pode se concluir que a molécula ASC é um elemento crucial na ativação de caspase-1 durante a malária.

5.2 Secreção de IL-1 β e ativação de caspase-1 em monócitos.

Existe uma discussão calorosa a respeito da capacidade do LPS levar a secreção de IL-1 β sem depender de outro estímulo em cultura de células THP1. Recentemente alguns trabalhos mostraram que contaminantes presentes no LPS, como por exemplo lipoproteínas, seriam os responsáveis pela ativação da caspase-1 e conseqüentemente pela maturação de IL-1 β . Quando utilizado LPS ultra puro para estimular células THP1 esse fenômeno não é mais observado (Agostini et al. 2004; Martinon et al. 2004). Curiosamente, Fernandes-Alnemri e colaboradores (Fernandes-Alnemri et al. 2007) só puderam observar a formação do piroptosomo em células THP1 após o estímulo com LPS bruto ou com Pam3CSK4, um análogo do lipopeptídeo bacteriano. Esse evento foi praticamente abolido quando utilizado LPS ultra puro (Fernandes-Alnemri et al. 2007). Desse modo, a proposta é que quando se utiliza o LPS bruto, são fornecidos 2 sinais; um via TLR dado pelo LPS e o outro pelo contaminante por exemplo muramil dipeptídeo (MDP), um produto da degradação de peptidoglicanos (PGN), atuando como um DAMP. A sinergia desses dois sinais culmina na ativação da caspase-1 e conseqüentemente na secreção de IL-1 β (Martinon et al. 2004; Martinon e Tschopp 2005; Martinon e Tschopp 2007).

No entanto, essa discussão ainda está longe de acabar. Trabalhos clássicos tem mostrado que o LPS purificado tem a capacidade de promover a maturação de IL-1 β , sem depender de outro estímulo (Bernaudin et al. 1988; Hoffmann et al. 1988). Além disso recentemente foi demonstrado que monócitos humanos CD14⁺, purificados a partir de PBMCs, apresentam caspase-1 ativa constitutivamente e quando estimulados com LPS purificado são plenamente

capazes de secretar IL-1 β . Por outro lado, macrófagos diferenciados a partir da medula óssea ou presentes em tecidos necessitam de um sinal adicional, por exemplo ATP, para secretar IL-1 β (Netea et al. 2009).

De modo semelhante aos achados de Netea, monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) provenientes tanto de pacientes saudáveis quanto de pacientes infectados por *P.vivax*, apresentaram caspase-1 ativa. No entanto, pacientes infectados apresentaram em média 3 vezes mais monócitos (CD14⁺CD16⁻) quando comparado com pacientes saudáveis (**Figura. 3d-f**). Uma outra população de monócitos conhecidos por apresentarem baixos níveis de expressão de CD14 na superfície e, porém, positivos para CD16 (CD14^{low}CD16⁺), descrita em 2003 por (Geissmann et al. 2003), também teve a sua presença aumentada no PBMC de pacientes infectados por *P.vivax*. Além disso, quando avaliado os níveis de caspase-1 ativa nessa subpopulação, foi observado que somente as células provenientes de pacientes infectados apresentavam essa protease em sua forma ativa (**Figura. 3d-f**). Desse modo, pode-se concluir que além do aumento do número de monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), a ativação diferencial da caspase-1 em monócitos não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) durante a infecção por *P.vivax*, são as principais fontes da caspase-1 ativa observada na **Figura 3a**, culminando na secreção de IL-1 β , em sua forma madura, se um indutor de pro-IL-1 β for adicionado ao sistema (**Figura 3c**).

É importante notar que os monócitos não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) tem sido relacionados em à respostas geradas desencadeadas por à componentes liberados em decorrência de danos teciduais, uma grande fonte de DAMPs (Auffray et al. 2009; Cros et al. 2010; Geissmann et al. 2010). Além disso inúmeros trabalhos tem mostrado o envolvimento desse tipo celular em doenças autoimunes e desordens inflamatórias (Evans et al. 2009; Santiago-Raber et al. 2009; Nakatani et al. 2010), sendo que esses os monócitos (CD14^{low}CD16⁺) são especialistas em produzir TNF α e IL-1 β (Cros et al. 2010).

5.3 TLRs Vs NLRs e a ativação de caspase-1.

Na grande maioria dos trabalhos nos quais se estudam a formação do inflamosomo, a ativação da caspase-1 e a secreção de IL-1 β são utilizados como controle positivo a combinação de agonistas de TLRs mais DAMPs, sendo esses “sentidos” por NLRs. No entanto ainda não é totalmente compreendido como o “prime” causado pelos agonistas de TLRs influencia na formação de alguns inflamosomos.

Os TLRs emitem sinais em resposta a moléculas derivadas de microorganismos quando essas são disponibilizadas no meio extracelular ou no compartimento endolisossomal (Takeda et al. 2003; Meylan et al. 2006). A sinalização desses receptores é de certo modo restrita a um espectro limitado de ligantes (Akira et al. 2006). Por outro lado uma imensa variedade de entidades como bactéria, vírus, produtos microbianos purificados, componentes provenientes de células necróticas, cristais ou agregados de materiais podem ativar os NLRs e desencadear uma resposta inflamatória robusta (Martinon et al. 2009). Poderiam essas duas frentes da imunidade inata, TLRs e NLRs (e também outros receptores citosólicos), trabalharem em conjunto no intuito de prevenir uma resposta inflamatória acidental, como por exemplo vista nas “cryopyrinopatias”, devido a mutações de NLRP3? (Church et al. 2008).

Recentemente foi demonstrado que a ativação de NF κ B, em decorrência da sinalização dos TLRs e também do receptor de TNF (TNFR), estaria relacionado com o “licenciamento” da formação do NLRP3-inflamosomo, uma vez que esse fator de transcrição regula a expressão do receptor NLRP3. É importante observar que somente a ativação de NF κ B é insuficiente para levar a ativação de caspase-1, sendo necessário um sinal adicional para que ocorra oligomerização dos componentes desse inflamosomo (Bauernfeind et al. 2009). Bauernfeind e colaboradores só conseguiram abolir a ativação de caspase-1, utilizando LPS ou poly I:C como primeiro sinal, em animais duplo deficientes para as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF (MyD88^{-/-}/TRIF^{-/-}).

Considerando que a ativação de caspase-1 durante a malária murina acontece de modo similar ao mecanismo proposto por Bauernfeind, o primeiro sinal, provavelmente proveniente de moléculas derivadas do *Plasmodium*, estimularia algum receptor, provavelmente TLR, que utiliza somente MyD88

como molécula adaptadora. Como pode ser visto na **Figura 4** a falta de Myd88 foi suficiente para impedir a ativação de caspase-1, bem como a produção de IL-1 β durante a malária murina. Ainda resta identificar qual receptor (es) poderia (m) estar associado (s) a essa cascata durante a malária. A sinalização via TLR9 seria um boa hipótese, uma vez que foi demonstrado que a hemozoína teria a capacidade de carrear DNA de *Plasmodium*, sendo esse responsável pela sinalização via TLR9 (Parroche et al. 2007). Seria a sinalização de TLR9, em resposta ao DNA do *Plasmodium*, juntamente com o sinal de perigo emitido pela hemozoína, os dois sinais requeridos para ativação de caspase-1 durante a malária? Esse mecanismo ainda precisa ser desvendado.

5.4 Citocinas proInflamatórias Vs ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β .

Malária: doença sistêmica causada por uma tempestade de citocinas, pro-inflamatórias (IL-12, IFN γ , TNF α) e anti-inflamatórias (IL-10), em estado de desequilíbrio que culmina para quadros de encefalopatia em alguns casos. Esse é o ponto de vista amplamente aceito por grande parte dos malariologistas a respeito da patogênese dessa doença (Clark et al. 2008; Clark e Alleva 2009). Durante a malária várias síndromes podem ser desencadeadas, como a anemia severa, acidose metabólica, sepse e, além dessas, o desenvolvimento da malária cerebral, estando todas relacionadas com a produção exagerada de citocinas pro-inflamatórias (Schofield e Grau 2005).

O fator alpha de necrose tumoral tem sido colocado em destaque quando o assunto é a patogênese da malária (Clark et al. 2010). Níveis elevados dessa citocina, e de outras induzidas por ela, tem sido encontrados em fluidos cérebro-espinais de pacientes infectados com *P.falciparum*, sendo observado uma correlação com a cefalopatia incluindo perda neuro-funcional ao longo do tempo (John 2008; John 2009). A infecção por *P.vivax* também pode levar a quadros de encefalopatia em casos não tratados ou em regiões de resistência a cloroquina (Tjitra et al. 2008). Ademais, níveis elevados de TNF α também podem ser observados em pacientes durante a malária vivax (Karunaweera et al. 1992).

Recentemente foi demonstrado que macrófagos de camundongos selvagens estimulados com $\text{TNF}\alpha$ (o que culmina na ativação de $\text{NF}\kappa\text{B}$) e expostos à ATP, são capazes de ativar caspase-1 e secretar $\text{IL-1}\beta$ de modo dependente do NLRP3-inflamosomo. (Bauernfeind et al. 2009). Poderia $\text{TNF}\alpha$ regular a formação do inflamosomo durante a malária? Como pode ser visto na **Figura 7a e b** animais deficientes para o receptor 1 de TNF ($\text{TNFR1}^{-/-}$) são plenamente capazes de ativar caspase-1, enquanto a ativação da caspase-1 em animais deficientes para $\text{IFN}\gamma$ ($\text{IFN}\gamma^{-/-}$) é praticamente abolida. É importante ressaltar que no modelo proposto por Bauernfeind a sinalização via TNFR é apenas uma das possibilidades de regulação do NLRP3-inflamosomo via a ativação de $\text{NF}\kappa\text{B}$, ao passo que macrófagos oriundos de animais $\text{TNFR1}/2^{-/-}$ quando estimulados com LPS mais ATP são plenamente capazes de ativar caspase-1. Nesse caso a sinalização via TLR4 foi quem gerou a fonte do primeiro sinal (Bauernfeind et al. 2009).

Recentemente foi demonstrado que durante a infecção por *Plasmodium*, ocorre um aumento da expressão e responsividade de TLRs sendo esse fenômeno dependente do $\text{IFN}\gamma$ (Franklin et al. 2009). Essa pode ser uma possível explicação para o fato de não ser observado caspase-1 ativa em animais $\text{IFN}\gamma^{-/-}$, mas sim em animais $\text{TNFR1}^{-/-}$, no qual a produção de $\text{IFN}\gamma$ é normal (**Figura 6d**). É interessante lembrar que a ativação da caspase-1 durante a malária murina foi completamente dependente de MyD88. De fato, deve haver algum TLR responsável por fornecer o primeiro sinal, responsável provavelmente pelo aumento da expressão dos componentes do inflamosomo durante a malária.

Em contrapartida, mesmo apresentando caspase-1 ativa, animais $\text{TNFR1}^{-/-}$ foram incapazes de secretar $\text{IL-1}\beta$, mesmo após o estímulo com um potente indutor da pro- $\text{IL-1}\beta$, LPS (**Figura 6c**). Como a falta de sinalização via TNFR1 poderia afetar a secreção de $\text{IL-1}\beta$ em sua forma ativa? Normalmente, pro- $\text{IL-1}\beta$ não é expressa constitutivamente na células. Entretanto, a sua expressão pode ser potentemente induzida por sinais proinflamatórios que levam a ativação de $\text{NF}\kappa\text{B}$ como LPS e $\text{TNF}\alpha$ (Dinarello et al. 1986; Hiscott et al. 1993). De fato, como pode ser observado na **Figura 6e**, animais $\text{TNFR1}^{-/-}$ assim como $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ não são capazes de expressar pro- $\text{IL-1}\beta$. É importante notar que a produção de

TNF α em animais IFN γ ^{-/-} é praticamente inexistente, ao passo que animais TNFR1^{-/-} são plenamente capazes de produzir IFN γ e TNF α , porém, não há como sinalizar devido a falta do receptor (**Figura 6d,f**). Desse modo podemos concluir que durante a malária murina, a produção de IFN γ torna possível a produção de TNF α habilitando as células a expressar pro-IL-1 β .

5.5 Receptores NLRP3 e NLRP12, desordem inflamatória e malária.

Febres recorrentes, inflamação sistêmica, peritonite estéril, além de manifestações cutâneas e artrites, não são sintomas encontrados somente em pacientes que sofrem de “cryopyrinopatias” associadas a mutação de NLRP3. Uma nova classe de síndromes auto-inflamatória conhecida como “desordens associadas ao receptor NLRP12” (NLRP12AD) tem sido relacionada com mutações nesse receptor, um outro membro da família dos NLRs. (Jeru et al. 2008; Gattorno et al. 2009; Goldbach-Mansky 2011; Jeru et al. 2011)

Células mononucleares do sangue periférico, obtidas de pacientes com mutações no receptor NLRP12, secretam altos níveis de IL-1 β espontaneamente. Quando esses pacientes foram submetidos ao tratamento utilizando IL-1Ra, apresentando então uma melhora clínica, pôde-se observar também uma diminuição significativa nos níveis de IL-1 β secretados por seus PBMCs (Borghini et al. 2011; Jeru et al. 2011; Jeru et al. 2011). É relevante notar que a sinalização via IL-1R leva a um “feedback” positivo, ou seja mais IL-1 β é produzida (Dinarello et al. 1987; Dinarello 2010). As similaridades entre as “cryopyrinopatias” e a síndrome NLRP12AD ocorrem desde a mutação nos genes NLRs e dependência do ASC até a secreção anormal de IL-1 β . A síndrome NLRP12AD representa uma nova classe de desordem com poucos casos relatados no mundo até o momento.

Até a presente data ainda não foi descrito nenhum caso de infecção que pudesse levar à ativação de caspase-1 de modo dependente de NLRP12. No entanto, esse fenômeno agora pode ser observado durante a infecção por *P.chabaudi* (**Figura 7**). De modo interessante, ambos animais deficientes em somente um receptor, NLRP3 ou NLRP12, tiveram a ativação da caspase-1 praticamente abolida, podendo assim ser observado somente um “background” similar ao do animal Casp-1^{-/-} (**Figura 7c**). Poderia a ativação de caspase-1

durante a malária murina ser fruto de uma plataforma única (NLRP3/NLRP12-inflamosomo)? Não é a primeira vez que é observado a cooperação de receptores citosólicos envolvidos na ativação de caspase-1. Em 2010 Tsuchiya e colaboradores mostraram que a ativação da caspase-1 em macrófagos infectados por *L.monocytogenes*, é fruto da cooperação dos receptores AIM2, NLRP3 e NLRC4. No entanto, também não foi definido se todos esses receptores faziam parte do mesmo inflamosomo (Tsuchiya et al. 2010).

5.6 Consequências da ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β durante malária

A atividade de IL-1 β é estritamente controlada requerendo a conversão do transcrito primário em um precursor inativo, o qual é convertido em sua forma madura somente após ser disponibilizado sua protease, sendo essa controlada por uma série de mecanismos. Além disso, o receptor pelo qual essa citocina sinaliza, possui um antagonista natural. O que pode acontecer se a produção e a liberação dessa citocina estiver fora do controle?

Um espectro cada vez maior de doenças inflamatórias, não infecciosas, agudas ou crônicas são simplesmente controladas pela neutralização da IL-1 β . Essas doenças normalmente são chamadas de autoinflamatórias onde predominantemente IL-1 β é secretada por monócitos ou macrófagos em resposta à moléculas endógenas. O termo autoinflamação foi inicialmente utilizado no intuito de descrever uma doença rara, caracterizada por recorrentes surtos de febre e inflamação sistêmica, devido a uma mutação na região codificante da subunidade p55 do receptor de TNF (McDermott et al. 1999). A mutação observada nessa doença, conhecida como síndrome periódica associada ao receptor de TNF (TRAPS), culmina em baixos níveis de TNFR solúvel devido a um mal dobramento dessa molécula no retículo endoplasmático. De modo curioso, o tratamento da inflamação causada por TRAPS pode ser eliminado utilizando anakinra, um antagonista de IL-1R (Simon et al. 2004; Gattorno et al. 2008) e, desse modo TRAPS emerge como uma doença mediada por IL-1R.

Não é a primeira vez que a história dessas duas citocinas se encontram, a produção de uma estimula a produção de outra, entrando em um “loop” que

quando não controlado pode ser extremamente perigoso (Dinarello et al. 1986; Dinarello 2011). A infecção causada por *P.chabaudi* fornece sinais suficientes para levar a formação do inflamosomo de modo dependente de NLRP3 e NLRP12, culminando na ativação da caspase-1. Entretanto a presença dessa estrutura, por si só, não impede que o hospedeiro consiga resolver a sua parasitemia, obtendo a cura parasitológica sem maiores complicações em torno de 4 semanas após a infecção (**dados não mostrados**).

É importante ressaltar que *P.chabaudi* é uma cepa não letal, porém quando inoculado baixos níveis de LPS animais C57BL/6 infectados sucumbem 12 horas após a esse desafio, não podendo ser visto tal fenômeno em animais não infectados. De modo curioso essa letalidade é acompanhada pela produção descontrolada de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, visto em uma cinética apresentada na **Figura 8a**. É interessante notar que a partir do 21° e 28° dia de infecção, os animais selvagens são completamente resistentes ao desafio de LPS e coincidentemente são capazes de controlar a produção de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. Curiosamente em casos de choque endotóxico, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ são secretados de forma rápida e descontrolada (Dinarello 1997).

No intuito de avaliar se os níveis alarmantes de $\text{IL-1}\beta$, observados após o inóculo de LPS, poderiam estar relacionado com essa letalidade, animais $\text{IL-1R}^{-/-}$ foram submetidos ao mesmo modelo. De fato, a ativação de caspase-1 pode ser tornar um evento perigoso durante a malária murina se um potente indutor de $\text{TNF}\alpha$ e conseqüentemente de $\text{IL-1}\beta$ estiver disponível. Na **Figura 7b** pode ser observado que animais $\text{IL-1R}^{-/-}$ tornaram se mais resistentes a esse choque induzido por LPS, mesmo com a produção de $\text{TNF}\alpha$ equivalente aos níveis observados em animais selvagens. A resistência total a esse choque só foi possível quando eliminado a produção de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$, observado em animais $\text{MyD88}^{-/-}$ e $\text{IFN}\gamma^{-/-}$, ou impedindo a sinalização via TNFR1 . Por outro lado animais deficientes em alguns componentes do inflamosomo apresentaram uma resistência parcial (**Tabela 1**) ao choque pelo LPS. A sinalização via TNFR1 é um componente chave nesse fenômeno, uma vez que além de permitir a produção de $\text{IL-1}\beta$, também pode ser “tóxica” por si só (Clark 2007).

É importante ressaltar que esse é um modelo artificial até um certo ponto, porém ainda assim é tentador fazer a seguinte pergunta: o que poderia

acontecer com indivíduos coinfectados por *Plasmodium* e algum tipo de bactéria. Recentemente foi demonstrado que a coinfecção por *Plasmodium berghei* NK65 e uma bactéria Gram-negativa, *Borrelia duttonii*, aumenta a mortalidade dos animais. É importante dizer que *P.berghei* NK65 não causa malária cerebral, porém causa anemia severa levando a morte do seu hospedeiro em torno do 21º dia de infecção. No entanto, durante a coinfecção, esse animais passaram a morrer em torno do 10º dia apresentando baixas taxas de parasitemia quando comparado com os níveis observados durante a infecção causada somente por *P.berghei* NK65 (Lundqvist et al. 2010).

Áreas endêmicas da malária apresentam uma alta incidência de infecções bacterianas como por exemplo *Salmonella*, *Pneumococcus* e *Meningococcus* (Berkley et al. 2005; Bronzan et al. 2007). A taxa de casos de coinfecção por *Plasmodium* e algum tipo de bactéria é extremamente elevada nessas regiões. Nesse contexto, pacientes coinfectados apresentam uma redução nos níveis de parasitemia. No entanto, esse também apresentam uma piora nos sintomas clínicos como angústia respiratória, anemia severa sendo a taxa de mortalidade 8,5 vezes maior, principalmente em casos de coinfecção por Gram-negativas (Ukaga et al. 2006; Bassat et al. 2009; Mtove et al. 2010; Were et al. 2011). Ademais, níveis elevados de IL-1 β , IL1Ra e do receptor de TNFR1 solúvel (sTNFR1p55) foram encontrados no soro e no fluido cérebro espinhal de pacientes com malária cerebral causada por *P.falciparum* (Jakobsen et al. 1994; Armah et al. 2007).

6. CONCLUSÕES

Anos de estudos relacionados a patogênese da malária tem revelado que essa é um doença, antes de mais nada, causada por um distúrbio inflamatório diretamente correlacionado com as manifestações clínicas. Nesse trabalho foi demonstrado mais um componente da imunidade inata que pode estar relacionado com esse desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, o inflamosomo. De fato, a infecção causada por *Plasmodium* pode levar a ativação de caspase-1, porém ainda resta desvendar se realmente esse fenômeno *in vivo* é mediado pela presença de hemozoína natural, produzida e liberada no decorrer da infecção. Durante a malária humana, causada por *P.vivax*, e também durante a malária murina, causada por *P.chabaudi*, a molécula adaptadora ASC parece ter um papel central na formação do inflamosomo e conseqüentemente na ativação de caspase-1. Uma outra molécula adaptadora, MyD88, também está envolvida na ativação de caspase-1 durante a malária murina, porém em um nível diferente da molécula ASC. Enquanto ASC está relacionado com o recrutamento e oligomerização de pro-caspase-1, Myd88 provavelmente está regulando a expressão dos componentes do inflamosomo durante a malária. Ainda resta definir se existe algum TLR envolvido nessa regulação. A infecção causada por *P.chabaudi* depende dos receptores citosólicos NLRP3 e NLRP12 para que a ativação de caspase-1 possa ocorrer. No entanto, ainda resta revelar se esses receptores estão presentes na mesma plataforma multiprotéica. Visto o potencial tóxico de IL-1 β para o hospedeiro, provavelmente a produção dessa citocina é altamente regulada durante a malária. No entanto, se um indutor de pro-IL-1 β estiver disponível, a ativação de caspase-1 pode se tornar em um evento extremamente perigoso. Desse modo, não se deve perder de vista que a coinfeção em áreas endêmicas de malária, principalmente por bactérias Gram-negativas, não é exceção e sim regra.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins and J. Tschopp (2004). "NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder." *Immunity* **20**(3): 319-325.

Aidoo, M., P. D. McElroy, M. S. Kolczak, D. J. Terlouw, F. O. ter Kuile, B. Nahlen, A. A. Lal and V. Udhayakumar (2001). "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." *Genet Epidemiol* **21**(3): 201-211.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.

Amani, V., A. M. Vigario, E. Belnoue, M. Marussig, L. Fonseca, D. Mazier and L. Renia (2000). "Involvement of IFN-gamma receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by Plasmodium berghei infection." *Eur J Immunol* **30**(6): 1646-1655.

Anstey, N. M., B. Russell, T. W. Yeo and R. N. Price (2009). "The pathophysiology of vivax malaria." *Trends Parasitol* **25**(5): 220-227.

Aravind, L., L. M. Iyer, T. E. Wellems and L. H. Miller (2003). "Plasmodium biology: genomic gleanings." *Cell* **115**(7): 771-785.

Arias, A. E. and A. Corredor (1989). "Low response of Colombian strains of Plasmodium vivax to classical antimalarial therapy." *Trop Med Parasitol* **40**(1): 21-23.

Armah, H. B., N. O. Wilson, B. Y. Sarfo, M. D. Powell, V. C. Bond, W. Anderson, A. A. Adjei, R. K. Gyasi, Y. Tettey, E. K. Wiredu, J. E. Tongren, V. Udhayakumar and J. K. Stiles (2007). "Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children." *Malar J* **6**: 147.

Artavanis-Tsakonas, K. and E. M. Riley (2002). "Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes." *J Immunol* **169**(6): 2956-2963.

Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau and F. Geissmann (2007). "Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior." *Science* **317**(5838): 666-670.

Auffray, C., M. H. Sieweke and F. Geissmann (2009). "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **27**: 669-692.

Ausubel, F. M. (2005). "Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?" *Nat Immunol* **6**(10): 973-979.

Baird, J. K. (2004). "Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4075-4083.

Bassat, Q. and P. L. Alonso "Defying malaria: Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease." Nat Med **17**(1): 48-49.

Bassat, Q., C. Guinovart, B. Sigauque, I. Mandomando, P. Aide, J. Sacarlal, T. Nhampossa, A. Bardaji, L. Morais, S. Machevo, E. Letang, E. Macete, J. J. Aponte, A. Roca, C. Menendez and P. L. Alonso (2009). "Severe malaria and concomitant bacteraemia in children admitted to a rural Mozambican hospital." Trop Med Int Health **14**(9): 1011-1019.

Bauernfeind, F. G., G. Horvath, A. Stutz, E. S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B. G. Monks, K. A. Fitzgerald, V. Hornung and E. Latz (2009). "Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression." J Immunol **183**(2): 787-791.

Belge, K. U., F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik and L. Ziegler-Heitbrock (2002). "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF." J Immunol **168**(7): 3536-3542.

Berkley, J. A., K. Maitland, I. Mwangi, C. Ngetsa, S. Mwarumba, B. S. Lowe, C. R. Newton, K. Marsh, J. A. Scott and M. English (2005). "Use of clinical syndromes to target antibiotic prescribing in seriously ill children in malaria endemic area: observational study." Bmj **330**(7498): 995.

Bernaudin, J. F., K. Yamauchi, M. D. Wewers, M. J. Tocci, V. J. Ferrans and R. G. Crystal (1988). "Demonstration by in situ hybridization of dissimilar IL-1 beta gene expression in human alveolar macrophages and blood monocytes in response to lipopolysaccharide." J Immunol **140**(11): 3822-3829.

Bolwell, G. P. (1999). "Role of active oxygen species and NO in plant defence responses." Curr Opin Plant Biol **2**(4): 287-294.

Borghini, S., S. Tassi, S. Chiesa, F. Caroli, S. Carta, R. Caorsi, M. Fiore, L. Delfino, D. Lasiglie, C. Ferraris, E. Traggiai, M. Di Duca, G. Santamaria, A. D'Ostualdo, M. Tosca, A. Martini, I. Ceccherini, A. Rubartelli and M. Gattorno (2011). "Clinical presentation and pathogenesis of cold-induced autoinflammatory disease in a family with recurrence of an NLRP12 mutation." Arthritis Rheum **63**(3): 830-839.

Boutlis, C. S., P. K. Fagan, D. C. Gowda, M. Lagog, C. S. Mgone, M. J. Bockarie and N. M. Anstey (2003). "Immunoglobulin G (IgG) responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols are short-lived and predominantly of the IgG3 subclass." J Infect Dis **187**(5): 862-865.

Boyden, E. D. and W. F. Dietrich (2006). "Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin." Nat Genet **38**(2): 240-244.

Bronzan, R. N., T. E. Taylor, J. Mwenechanya, M. Tembo, K. Kayira, L. Bwanaisa, A. Njobvu, W. Kondowe, C. Chalira, A. L. Walsh, A. Phiri, L. K. Wilson, M. E. Molyneux and S. M. Graham (2007). "Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome." *J Infect Dis* **195**(6): 895-904.

Brydges, S. D., J. L. Mueller, M. D. McGeough, C. A. Pena, A. Misaghi, C. Gandhi, C. D. Putnam, D. L. Boyle, G. S. Firestein, A. A. Horner, P. Soroosh, W. T. Watford, J. J. O'Shea, D. L. Kastner and H. M. Hoffman (2009). "Inflammasome-mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptive immunity." *Immunity* **30**(6): 875-887.

Burckstummer, T., C. Baumann, S. Bluml, E. Dixit, G. Durnberger, H. Jahn, M. Planyavsky, M. Bilban, J. Colinge, K. L. Bennett and G. Superti-Furga (2009). "An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome." *Nat Immunol* **10**(3): 266-272.

Casares, S. and T. L. Richie (2009). "Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development." *Curr Opin Immunol* **21**(3): 321-330.

Cassel, S. L., S. C. Eisenbarth, S. S. Iyer, J. J. Sadler, O. R. Colegio, L. A. Tephly, A. B. Carter, P. B. Rothman, R. A. Flavell and F. S. Sutterwala (2008). "The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(26): 9035-9040.

Cassel, S. L. and F. S. Sutterwala (2010). "Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome." *Eur J Immunol* **40**(3): 607-611.

Cervantes, J., T. Nagata, M. Uchijima, K. Shibata and Y. Koide (2008). "Intracytosolic *Listeria monocytogenes* induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages." *Cell Microbiol* **10**(1): 41-52.

Chilengi, R. and J. Gitaka (2010). "Is vaccine the magic bullet for malaria elimination? A reality check." *Malar J* **9 Suppl 3**: S1.

Chitnis, C. E. (2001). "Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion." *Curr Opin Hematol* **8**(2): 85-91.

Church, L. D., G. P. Cook and M. F. McDermott (2008). "Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders." *Nat Clin Pract Rheumatol* **4**(1): 34-42.

Clark, I. A. (2007). "The advent of the cytokine storm." *Immunol Cell Biol* **85**(4): 271-273.

Clark, I. A. (2007). "How TNF was recognized as a key mechanism of disease." *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(3-4): 335-343.

Clark, I. A. (2009). "Along a TNF-paved road from dead parasites in red cells to cerebral malaria, and beyond." *Parasitology* **136**(12): 1457-1468.

Clark, I. A. and L. M. Alleva (2009). "Is human malarial coma caused, or merely deepened, by sequestration?" Trends Parasitol **25**(7): 314-318.

Clark, I. A., L. M. Alleva, A. C. Budd and W. B. Cowden (2008). "Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases." Travel Med Infect Dis **6**(1-2): 67-81.

Clark, I. A., L. M. Alleva and B. Vissel (2010). "The roles of TNF in brain dysfunction and disease." Pharmacol Ther **128**(3): 519-548.

Clark, I. A. and W. B. Cowden (1992). "Roles of TNF in malaria and other parasitic infections." Immunol Ser **56**: 365-407.

Clark, I. A. and K. A. Rockett (1994). "The cytokine theory of human cerebral malaria." Parasitol Today **10**(10): 410-412.

Coban, C., K. J. Ishii, T. Kawai, H. Hemmi, S. Sato, S. Uematsu, M. Yamamoto, O. Takeuchi, S. Itagaki, N. Kumar, T. Horii and S. Akira (2005). "Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin." J Exp Med **201**(1): 19-25.

Coban, C., K. J. Ishii, S. Uematsu, N. Arisue, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kawai, O. Takeuchi, H. Hisaeda, T. Horii and S. Akira (2007). "Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria." Int Immunol **19**(1): 67-79.

Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S. Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S. K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J. P. Jais, D. D'Cruz, J. L. Casanova, C. Trouillet and F. Geissmann (2010). "Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors." Immunity **33**(3): 375-386.

Cruz, C. M., A. Rinna, H. J. Forman, A. L. Ventura, P. M. Persechini and D. M. Ojcius (2007). "ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages." J Biol Chem **282**(5): 2871-2879.

Dinarello, C. A. (1997). "Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock." Chest **112**(6 Suppl): 321S-329S.

Dinarello, C. A. (1998). "Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist." Int Rev Immunol **16**(5-6): 457-499.

Dinarello, C. A. (2010). "IL-1: discoveries, controversies and future directions." Eur J Immunol **40**(3): 599-606.

Dinarello, C. A. (2011). "A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation." Eur J Immunol **41**(5): 1203-1217.

Dinarello, C. A., J. G. Cannon, S. M. Wolff, H. A. Bernheim, B. Beutler, A. Cerami, I. S. Figari, M. A. Palladino, Jr. and J. V. O'Connor (1986). "Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1." J Exp Med **163**(6): 1433-1450.

Dinarello, C. A., S. Gatti and T. Bartfai (1999). "Fever: links with an ancient receptor." Curr Biol **9**(4): R147-150.

Dinarello, C. A., T. Ikejima, S. J. Warner, S. F. Orencole, G. Lonnemann, J. G. Cannon and P. Libby (1987). "Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro." J Immunol **139**(6): 1902-1910.

Dostert, C., G. Guarda, J. F. Romero, P. Menu, O. Gross, A. Tardivel, M. L. Suva, J. C. Stehle, M. Kopf, I. Stamenkovic, G. Corradin and J. Tschopp (2009). "Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal." PLoS One **4**(8): e6510.

Dostert, C. and V. Petrilli (2008). "[Asbestos triggers inflammation by activating the Nalp3 inflammasome]." Med Sci (Paris) **24**(11): 916-918.

Dostert, C., V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman and J. Tschopp (2008). "Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica." Science.

Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung and E. Latz (2010). "NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals." Nature **464**(7293): 1357-1361.

Duncan, J. A., D. T. Bergstralh, Y. Wang, S. B. Willingham, Z. Ye, A. G. Zimmermann and J. P. Ting (2007). "Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 8041-8046.

Egan, T. J. (2008). "Haemozoin formation." Mol Biochem Parasitol **157**(2): 127-136.

Erdman, L. K., C. A. Finney, W. C. Liles and K. C. Kain (2008). "Inflammatory pathways in malaria infection: TLRs share the stage with other components of innate immunity." Mol Biochem Parasitol **162**(2): 105-111.

Evans, H. G., N. J. Gullick, S. Kelly, C. Pitzalis, G. M. Lord, B. W. Kirkham and L. S. Taams (2009). "In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(15): 6232-6237.

Faustin, B., L. Lartigue, J. M. Bruey, F. Luciano, E. Sergienko, B. Bailly-Maitre, N. Volkmann, D. Hanein, I. Rouiller and J. C. Reed (2007). "Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation." Mol Cell **25**(5): 713-724.

Feachem, R. G., A. A. Phillips, J. Hwang, C. Cotter, B. Wielgosz, B. M. Greenwood, O. Sabot, M. H. Rodriguez, R. R. Abeyasinghe, T. A. Ghebreyesus and R. W. Snow (2010). "Shrinking the malaria map: progress and prospects." Lancet **376**(9752): 1566-1578.

Fernandes-Alnemri, T., J. Wu, J. W. Yu, P. Datta, B. Miller, W. Jankowski, S. Rosenberg, J. Zhang and E. S. Alnemri (2007). "The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation." Cell Death Differ **14**(9): 1590-1604.

Franchi, L., T. D. Kanneganti, G. R. Dubyak and G. Nunez (2007). "Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria." J Biol Chem **282**(26): 18810-18818.

Franklin, B. S., S. T. Ishizaka, M. Lamphier, F. Gusovsky, H. Hansen, J. Rose, W. Zheng, M. A. Ataide, R. B. de Oliveira, D. T. Golenbock and R. T. Gazzinelli (2011). "Therapeutic targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(9): 3689-3694.

Franklin, B. S., P. Parroche, M. A. Ataide, F. Lauw, C. Ropert, R. B. de Oliveira, D. Pereira, M. S. Tada, P. Nogueira, L. H. da Silva, H. Bjorkbacka, D. T. Golenbock and R. T. Gazzinelli (2009). "Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5789-5794.

Franklin, B. S., S. O. Rodrigues, L. R. Antonelli, R. V. Oliveira, A. M. Goncalves, P. A. Sales-Junior, E. P. Valente, J. I. Alvarez-Leite, C. Ropert, D. T. Golenbock and R. T. Gazzinelli (2007). "MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria." Microbes Infect **9**(7): 881-890.

Gattorno, M., M. La Regina, A. Martini and R. Manna (2009). "An update on autoinflammatory diseases. New concepts for new and old diseases." Clin Exp Rheumatol **27**(2): 354-365.

Gattorno, M., M. A. Pelagatti, A. Meini, L. Obici, R. Barcellona, S. Federici, A. Buoncompagni, A. Plebani, G. Merlini and A. Martini (2008). "Persistent efficacy of anakinra in patients with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome." Arthritis Rheum **58**(5): 1516-1520.

Geissmann, F., C. Auffray, R. Palframan, C. Wirrig, A. Ciocca, L. Campisi, E. Narni-Mancinelli and G. Luvau (2008). "Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses." Immunol Cell Biol **86**(5): 398-408.

Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.

Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

Gething, P. W., T. P. Van Boeckel, D. L. Smith, C. A. Guerra, A. P. Patil, R. W. Snow and S. I. Hay (2011). "Modelling the global constraints of temperature on transmission of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*." Parasit Vectors **4**: 92.

Gimenez, F., S. Barraud de Lagerie, C. Fernandez, P. Pino and D. Mazier (2003). "Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1623-1635.

Goldbach-Mansky, R. (2011). "Current Status of Understanding the Pathogenesis and Management of Patients With NOMID/CINCA." Curr Rheumatol Rep **13**(2): 123-131.

Grau, G. E., P. F. Pigué, P. Vassalli and P. H. Lambert (1989). "Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data." Immunol Rev **112**: 49-70.

Greenwood, B. M., D. A. Fidock, D. E. Kyle, S. H. Kappe, P. L. Alonso, F. H. Collins and P. E. Duffy (2008). "Malaria: progress, perils, and prospects for eradication." J Clin Invest **118**(4): 1266-1276.

Grenier, J. M., L. Wang, G. A. Manji, W. J. Huang, A. Al-Garawi, R. Kelly, A. Carlson, S. Merriam, J. M. Lora, M. Briskin, P. S. DiStefano and J. Bertin (2002). "Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1." FEBS Lett **530**(1-3): 73-78.

Gross, O., H. Poeck, M. Bscheider, C. Dostert, N. Hanneschlager, S. Endres, G. Hartmann, A. Tardivel, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, A. Mocsai, J. Tschopp and J. Ruland (2009). "Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence." Nature **459**(7245): 433-436.

Gupta, M., S. Mahanty, R. Ahmed and P. E. Rollin (2001). "Monocyte-derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with ebola virus secrete MIP-1alpha and TNF-alpha and inhibit poly-IC-induced IFN-alpha in vitro." Virology **284**(1): 20-25.

Haldar, K., S. C. Murphy, D. A. Milner and T. E. Taylor (2007). "Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease." Annu Rev Pathol **2**: 217-249.

Halle, A., V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore and D. T. Golenbock (2008). "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta." Nat Immunol **9**(8): 857-865.

Hansen, D. S., M. A. Siomos, L. Buckingham, A. A. Scalzo and L. Schofield (2003). "Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex." Immunity **18**(3): 391-402.

Hardy, J. and D. Allsop (1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." Trends Pharmacol Sci **12**(10): 383-388.

Hensmann, M. and D. Kwiatkowski (2001). "Cellular basis of early cytokine response to Plasmodium falciparum." Infect Immun **69**(4): 2364-2371.

Hiscott, J., J. Marois, J. Garoufalos, M. D'Addario, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, G. Bensi and et al. (1993). "Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop." Mol Cell Biol **13**(10): 6231-6240.

Hoffman, H. M. and S. D. Brydges (2011). "Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease." J Biol Chem **286**(13): 10889-10896.

Hoffman, H. M. and A. A. Wanderer (2010). "Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders." Curr Allergy Asthma Rep **10**(4): 229-235.

Hoffmann, P., S. Heinle, U. F. Schade, H. Loppnow, A. J. Ulmer, H. D. Flad, G. Jung and W. G. Bessler (1988). "Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues." Immunobiology **177**(2): 158-170.

Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E. O. Samstad, H. Kono, K. L. Rock, K. A. Fitzgerald and E. Latz (2008). "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." Nat Immunol **9**(8): 847-856.

Hunt, N. H. and G. E. Grau (2003). "Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria." Trends Immunol **24**(9): 491-499.

Hyde, J. E. (2002). "Mechanisms of resistance of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs." Microbes Infect **4**(2): 165-174.

Iyer, S. S., W. P. Pulskens, J. J. Sadler, L. M. Butter, G. J. Teske, T. K. Ulland, S. C. Eisenbarth, S. Florquin, R. A. Flavell, J. C. Leemans and F. S. Sutterwala (2009). "Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20388-20393.

Jakobsen, P. H., V. McKay, S. D. Morris-Jones, W. McGuire, M. B. van Hensbroek, S. Meisner, K. Bendtzen, I. Schousboe, I. C. Bygbjerg and B. M. Greenwood (1994). "Increased concentrations of interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist and decreased concentrations of beta-2-glycoprotein I in Gambian children with cerebral malaria." Infect Immun **62**(10): 4374-4379.

Jeru, I., P. Duquesnoy, T. Fernandes-Alnemri, E. Cochet, J. W. Yu, M. Lackmy-Port-Lis, E. Grimprel, J. Landman-Parker, V. Hentgen, S. Marlin, K. McElreavey, T. Sarkisian, G. Grateau, E. S. Alnemri and S. Amselem (2008). "Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1614-1619.

Jeru, I., V. Hentgen, S. Normand, P. Duquesnoy, E. Cochet, A. Delwail, G. Grateau, S. Marlin, S. Amselem and J. C. Lecron (2011). "Role of interleukin-1beta in NLRP12-associated autoinflammatory disorders and resistance to anti-interleukin-1 therapy." Arthritis Rheum **63**(7): 2142-2148.

Jeru, I., G. Le Borgne, E. Cochet, H. Hayrapetyan, P. Duquesnoy, G. Grateau, A. Morali, T. Sarkisian and S. Amselem (2011). "Identification and functional consequences of a recurrent NLRP12 missense mutation in periodic fever syndromes." Arthritis Rheum **63**(5): 1459-1464.

John, C. C., Bangirana, P., Byarugaba, J., Opoka, R. O., Idro, R., Jurek, A. M., (2009). "Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment." Pediatr Cardiol **122**: 92-99.

John, C. C., Panoskaltzis Mortari, A., Opoka, R. O., Park, G. S., Orchard, P. J., Jurek, A. M., (2008). "Cerebrospinal fluid cytokine levels and cognitive impairment in cerebral malaria." Am J Trop Med Hyg **78**: 198-205.

Kahlenberg, J. M. and G. R. Dubyak (2004). "Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release." Am J Physiol Cell Physiol **286**(5): C1100-1108.

Kanneganti, T. D., M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, J. Whitfield, L. Franchi, Z. F. Taraporewala, D. Miller, J. T. Patton, N. Inohara and G. Nunez (2006). "Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA." J Biol Chem **281**(48): 36560-36568.

Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, Y. G. Kim, G. Chen, J. H. Park, L. Franchi, P. Vandenabeele and G. Nunez (2007). "Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling." Immunity **26**(4): 433-443.

Kanneganti, T. D., N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira and G. Nunez (2006). "Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3." Nature **440**(7081): 233-236.

Karunaweera, N. D., R. Carter, G. E. Grau, D. Kwiatkowski, G. Del Giudice and K. N. Mendis (1992). "Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune Plasmodium vivax malaria patients." Clin Exp Immunol **88**(3): 499-505.

Kim, S., F. Bauernfeind, A. Ablasser, G. Hartmann, K. A. Fitzgerald, E. Latz and V. Hornung (2010). "Listeria monocytogenes is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome." Eur J Immunol **40**(6): 1545-1551.

Knight, J. C., I. Udalova, A. V. Hill, B. M. Greenwood, N. Peshu, K. Marsh and D. Kwiatkowski (1999). "A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria." Nat Genet **22**(2): 145-150.

Koch, O., A. Awomoyi, S. Usen, M. Jallow, A. Richardson, J. Hull, M. Pinder, M. Newport and D. Kwiatkowski (2002). "IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria." J Infect Dis **185**(11): 1684-1687.

Kochar, D. K., A. Das, S. K. Kochar, V. Saxena, P. Sirohi, S. Garg, A. Kochar, M. P. Khatri and V. Gupta (2009). "Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India." Am J Trop Med Hyg **80**(2): 194-198.

Krishnegowda, G., A. M. Hajjar, J. Zhu, E. J. Douglass, S. Uematsu, S. Akira, A. S. Woods and D. C. Gowda (2005). "Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity." J Biol Chem **280**(9): 8606-8616.

Kwiatkowski, D. (2000). "Genetic dissection of the molecular pathogenesis of severe infection." Intensive Care Med **26 Suppl 1**: S89-97.

Lacerda, M. V., J. R. Hipolito and L. N. Passos (2008). "Chronic Plasmodium vivax infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia." Rev Soc Bras Med Trop **41**(5): 522-523.

Lamkanfi, M. (2011). "Emerging inflammasome effector mechanisms." Nat Rev Immunol **11**(3): 213-220.

Langhi, D. M., Jr. and J. O. Bordin (2006). "Duffy blood group and malaria." Hematology **11**(5): 389-398.

Le Bras, J. and R. Durand (2003). "The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in Plasmodium falciparum." Fundam Clin Pharmacol **17**(2): 147-153.

Lundqvist, J., C. Larsson, M. Nelson, M. Andersson, S. Bergstrom and C. Persson (2010). "Concomitant infection decreases the malaria burden but escalates relapsing fever borreliosis." Infect Immun **78**(5): 1924-1930.

Mariathasan, S. (2007). "ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome." Microbes Infect **9**(5): 664-671.

Mariathasan, S. and D. M. Monack (2007). "Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation." Nat Rev Immunol **7**(1): 31-40.

Mariathasan, S., K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson and V. M. Dixit (2004). "Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf." Nature **430**(6996): 213-218.

Mariathasan, S., D. S. Weiss, V. M. Dixit and D. M. Monack (2005). "Innate immunity against Francisella tularensis is dependent on the ASC/caspase-1 axis." J Exp Med **202**(8): 1043-1049.

Mariathasan, S., D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack and V. M. Dixit (2006). "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP." Nature **440**(7081): 228-232.

Martinon, F. (2010). "Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation." Immunol Rev **233**(1): 218-232.

Martinon, F. (2010). "Update on biology: uric acid and the activation of immune and inflammatory cells." Curr Rheumatol Rep **12**(2): 135-141.

Martinon, F., L. Agostini, E. Meylan and J. Tschopp (2004). "Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome." Curr Biol **14**(21): 1929-1934.

Martinon, F., K. Burns and J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." Mol Cell **10**(2): 417-426.

Martinon, F., O. Gaide, V. Petrilli, A. Mayor and J. Tschopp (2007). "NALP Inflammasomes: a central role in innate immunity." Semin Immunopathol.

Martinon, F., A. Mayor and J. Tschopp (2009). "The inflammasomes: guardians of the body." Annu Rev Immunol **27**: 229-265.

Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel and J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-241.

Martinon, F. and J. Tschopp (2005). "NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens." Trends Immunol **26**(8): 447-454.

Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." Cell Death Differ **14**(1): 10-22.

Masters, S. L., A. Simon, I. Aksentijevich and D. L. Kastner (2009). "Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*)." Annu Rev Immunol **27**: 621-668.

Masumoto, J., S. Taniguchi, K. Ayukawa, H. Sarvotham, T. Kishino, N. Niikawa, E. Hidaka, T. Katsuyama, T. Higuchi and J. Sagara (1999). "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells." J Biol Chem **274**(48): 33835-33838.

Mayor, A., F. Martinon, T. De Smedt, V. Petrilli and J. Tschopp (2007). "A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses." Nat Immunol **8**(5): 497-503.

McCoy, A. J., Y. Koizumi, N. Higa and T. Suzuki (2010). "Differential regulation of caspase-1 activation via NLRP3/NLRC4 inflammasomes mediated by aerolysin and type III secretion system during *Aeromonas veronii* infection." J Immunol **185**(11): 7077-7084.

McDermott, M. F., I. Aksentijevich, J. Galon, E. M. McDermott, B. W. Ogunkolade, M. Centola, E. Mansfield, M. Gadina, L. Karenko, T. Pettersson, J. McCarthy, D. M. Frucht, M. Aringer, Y. Torosyan, A. M. Teppo, M. Wilson, H. M. Karaarslan, Y. Wan, I. Todd, G. Wood, R. Schlimgen, T. R. Kumarajeewa, S. M. Cooper, J. P. Vella, C. I. Amos, J. Mulley, K. A. Quane, M. G. Molloy, A. Ranki, R. J. Powell, G. A. Hitman, J. J. O'Shea and D. L. Kastner (1999). "Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes." Cell **97**(1): 133-144.

McGuire, W., J. C. Knight, A. V. Hill, C. E. Allsopp, B. M. Greenwood and D. Kwiatkowski (1999). "Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles." J Infect Dis **179**(1): 287-290.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh and C. A. Janeway, Jr. (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." Mol Cell **2**(2): 253-258.

Meng, G., F. Zhang, I. Fuss, A. Kitani and W. Strober (2009). "A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses." *Immunity* **30**(6): 860-874.

Meylan, E., J. Tschopp and M. Karin (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." *Nature* **442**(7098): 39-44.

Miller, L. H., S. J. Mason, D. F. Clyde and M. H. McGinniss (1976). "The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy." *N Engl J Med* **295**(6): 302-304.

Molyneux, M. E., T. E. Taylor, J. J. Wirima and A. Borgstein (1989). "Clinical features and prognostic indicators in paediatric cerebral malaria: a study of 131 comatose Malawian children." *Q J Med* **71**(265): 441-459.

Monack, D. M. (2008). "The inflammasome: a key player in the inflammation triggered in response to bacterial pathogens." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **46 Suppl 1**: E14.

Montealegre Sanchez, G. A. and P. J. Hashkes (2009). "Neurological manifestations of the Mendelian-inherited autoinflammatory syndromes." *Dev Med Child Neurol* **51**(6): 420-428.

Morahan, G., C. S. Boutlis, D. Huang, A. Pain, J. R. Saunders, M. R. Hobbs, D. L. Granger, J. B. Weinberg, N. Peshu, E. D. Mwaikambo, K. Marsh, D. J. Roberts and N. M. Anstey (2002). "A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production." *Genes Immun* **3**(7): 414-418.

Mtove, G., B. Amos, L. von Seidlein, I. Hendriksen, A. Mwambuli, J. Kimera, R. Mallahiyo, D. R. Kim, R. L. Ochiai, J. D. Clemens, H. Reyburn, S. Magesa and J. L. Deen (2010). "Invasive salmonellosis among children admitted to a rural Tanzanian hospital and a comparison with previous studies." *PLoS One* **5**(2): e9244.

Muckle, T. J. and Wellsm (1962). "Urticaria, deafness, and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome." *Q J Med* **31**: 235-248.

Mudher, A. and S. Lovestone (2002). "Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?" *Trends Neurosci* **25**(1): 22-26.

Mueller, I., M. R. Galinski, J. K. Baird, J. M. Carlton, D. K. Kochar, P. L. Alonso and H. A. del Portillo (2009). "Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite." *Lancet Infect Dis* **9**(9): 555-566.

Murphy, S. C. and J. G. Breman (2001). "Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy." *Am J Trop Med Hyg* **64**(1-2 Suppl): 57-67.

Nakatani, K., S. Yoshimoto, M. Iwano, O. Asai, K. Samejima, H. Sakan, M. Terada, H. Hasegawa, M. Nose and Y. Saito (2010). "Fractalkine expression and CD16+ monocyte accumulation in

glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models." Am J Physiol Renal Physiol **299**(1): F207-216.

Netea, M. G., C. A. Nold-Petry, M. F. Nold, L. A. Joosten, B. Opitz, J. H. van der Meer, F. L. van de Veerdonk, G. Ferwerda, B. Heinhuis, I. Devesa, C. J. Funk, R. J. Mason, B. J. Kullberg, A. Rubartelli, J. W. van der Meer and C. A. Dinarello (2009). "Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages." Blood **113**(10): 2324-2335.

Newbold, C., A. Craig, S. Kyes, A. Rowe, D. Fernandez-Reyes and T. Fagan (1999). "Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in Plasmodium falciparum." Int J Parasitol **29**(6): 927-937.

O'Connor, W., Jr., J. A. Harton, X. Zhu, M. W. Linhoff and J. P. Ting (2003). "Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties." J Immunol **171**(12): 6329-6333.

Parroche, P., F. N. Lauw, N. Goutagny, E. Latz, B. G. Monks, A. Visintin, K. A. Halmen, M. Lamphier, M. Olivier, D. C. Bartholomeu, R. T. Gazzinelli and D. T. Golenbock (2007). "Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1919-1924.

Petrilli, V. and F. Martinon (2007). "The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout." Joint Bone Spine.

Petrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon and J. Tschopp (2007). "Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration." Cell Death Differ **14**(9): 1583-1589.

Petsev, D. N., B. R. Thomas, S. Yau and P. G. Vekilov (2000). "Interactions and aggregation of apoferritin molecules in solution: effects of added electrolytes." Biophys J **78**(4): 2060-2069.

Poyet, J. L., S. M. Srinivasula, M. Tnani, M. Razmara, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2001). "Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1." J Biol Chem **276**(30): 28309-28313.

Qu, Y., S. Misaghi, K. Newton, L. L. Gilmour, S. Louie, J. E. Cupp, G. R. Dubyak, D. Hackos and V. M. Dixit (2011). "Pannexin-1 Is Required for ATP Release during Apoptosis but Not for Inflammasome Activation." J Immunol **186**(11): 6553-6561.

Reimer, T., M. H. Shaw, L. Franchi, C. Coban, K. J. Ishii, S. Akira, T. Horii, A. Rodriguez and G. Nunez (2010). "Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome." Eur J Immunol **40**(3): 764-769.

Rock, K. L., E. Latz, F. Ontiveros and H. Kono (2010). "The sterile inflammatory response." Annu Rev Immunol **28**: 321-342.

Rodriguez-Morales, A. J., E. Sanchez, M. Vargas, C. Piccolo, R. Colina, M. Arria and C. Franco-Paredes (2006). "Is anemia in *Plasmodium vivax* malaria more frequent and severe than in *Plasmodium falciparum*?" *Am J Med* **119**(11): e9-10.

Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt and A. R. Nebreda (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* **78**(6): 1027-1037.

Ru, Y. X., B. Y. Mao, F. K. Zhang, T. X. Pang, S. X. Zhao, J. H. Liu and S. N. Wickramasinghe (2009). "Invasion of erythroblasts by *Plasmodium vivax*: A new mechanism contributing to malarial anemia." *Ultrastruct Pathol* **33**(5): 236-242.

Santiago-Raber, M. L., H. Amano, E. Amano, L. Baudino, M. Otani, Q. Lin, F. Nimmerjahn, J. S. Verbeek, J. V. Ravetch, Y. Takasaki, S. Hirose and S. Izui (2009). "Fcγ receptor-dependent expansion of a hyperactive monocyte subset in lupus-prone mice." *Arthritis Rheum* **60**(8): 2408-2417.

Schofield, L. and G. E. Grau (2005). "Immunological processes in malaria pathogenesis." *Nat Rev Immunol* **5**(9): 722-735.

Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." *Cell* **140**(6): 821-832.

Serbina, N. V., M. Cherny, C. Shi, S. A. Bleau, N. H. Collins, J. W. Young and E. G. Pamer (2009). "Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia." *J Immunol* **183**(4): 2678-2687.

Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl and E. G. Pamer (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." *Annu Rev Immunol* **26**: 421-452.

Sharma, A. and U. Khanduri (2009). "How benign is benign tertian malaria?" *J Vector Borne Dis* **46**(2): 141-144.

Sherman, I. W., I. P. Ting and J. A. Ruble (1968). "Characterization of the malaria pigment (hemozoin) from the avian malaria parasite *Plasmodium lophurae*." *J Protozool* **15**(1): 158-164.

Shio, M. T., S. C. Eisenbarth, M. Savaria, A. F. Vinet, M. J. Bellemare, K. W. Harder, F. S. Sutterwala, D. S. Bohle, A. Descoteaux, R. A. Flavell and M. Olivier (2009). "Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases." *PLoS Pathog* **5**(8): e1000559.

Simon, A., E. J. Bodar, J. C. van der Hilst, J. W. van der Meer, T. J. Fiselier, M. P. Cuppen and J. P. Drenth (2004). "Beneficial response to interleukin 1 receptor antagonist in traps." *Am J Med* **117**(3): 208-210.

Snow, R. W., M. Craig, U. Deichmann and K. Marsh (1999). "Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population." *Bull World Health Organ* **77**(8): 624-640.

So, A., T. De Smedt, S. Revaz and J. Tschopp (2007). "A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout." Arthritis Res Ther **9**(2): R28.

Srinivasula, S. M., J. L. Poyet, M. Razmara, P. Datta, Z. Zhang and E. S. Alnemri (2002). "The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1." J Biol Chem **277**(24): 21119-21122.

Stevenson, M. M., M. F. Tam and M. Nowotarski (1990). "Role of interferon-gamma and tumor necrosis factor in host resistance to Plasmodium chabaudi AS." Immunol Lett **25**(1-3): 115-121.

Stroher, U., E. West, H. Bugany, H. D. Klenk, H. J. Schnittler and H. Feldmann (2001). "Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses." J Virol **75**(22): 11025-11033.

Stych, B. and D. Dobrovoly (2008). "Familial cold auto-inflammatory syndrome (FCAS): characterization of symptomatology and impact on patients' lives." Curr Med Res Opin **24**(6): 1577-1582.

Sullivan, D. J., Jr., I. Y. Gluzman, D. G. Russell and D. E. Goldberg (1996). "On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11865-11870.

Sutterwala, F. S., Y. Ogura, M. Szczepanik, M. Lara-Tejero, G. S. Lichtenberger, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, J. E. Galan, P. W. Askenase and R. A. Flavell (2006). "Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1." Immunity **24**(3): 317-327.

Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-376.

Ting, J. P. and B. K. Davis (2005). "CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases." Annu Rev Immunol **23**: 387-414.

Tjitra, E., N. M. Anstey, P. Sugiarto, N. Warikar, E. Kenangalem, M. Karyana, D. A. Lampah and R. N. Price (2008). "Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia." PLoS Med **5**(6): e128.

Tsuchiya, K., H. Hara, I. Kawamura, T. Nomura, T. Yamamoto, S. Daim, S. R. Dewamitta, Y. Shen, R. Fang and M. Mitsuyama (2010). "Involvement of absent in melanoma 2 in inflammasome activation in macrophages infected with Listeria monocytogenes." J Immunol **185**(2): 1186-1195.

Ukaga, C. N., C. N. Orji, S. Orogwu, B. E. Nwoke, J. C. Anosike, O. S. Udujih, P. I. Onyeka and N. C. Awujo (2006). "Concomitant bacteria in the blood of malaria patients in Owerri, southeastern Nigeria." Tanzan Health Res Bull **8**(3): 186-188.

Wassmer, S. C., G. J. Cianciolo, V. Combes and G. E. Grau (2005). "Inhibition of endothelial activation: a new way to treat cerebral malaria?" PLoS Med **2**(9): e245.

Wassmer, S. C., N. Coltel, V. Combes and G. E. Grau (2003). "[Pathogenesis of cerebral malaria: facts and hypotheses]." Med Trop (Mars) **63**(3): 254-257.

Wassmer, S. C., V. Combes and G. E. Grau (2003). "Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion." Ann N Y Acad Sci **992**: 30-38.

Wattavidanage, J., R. Carter, K. L. Perera, A. Munasingha, S. Bandara, D. McGuinness, A. R. Wickramasinghe, H. K. Alles, K. N. Mendis and S. Premawansa (1999). "TNFalpha*2 marks high risk of severe disease during Plasmodium falciparum malaria and other infections in Sri Lankans." Clin Exp Immunol **115**(2): 350-355.

Weatherall, D. J., L. H. Miller, D. I. Baruch, K. Marsh, O. K. Doumbo, C. Casals-Pascual and D. J. Roberts (2002). "Malaria and the red cell." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 35-57.

Were, T., G. C. Davenport, J. B. Hittner, C. Ouma, J. M. Vulule, J. M. Ong'echa and D. J. Perkins (2011). "Bacteremia in Kenyan children presenting with malaria." J Clin Microbiol **49**(2): 671-676.

WHO (2000). "Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster." Trans R Soc Trop Med Hyg **94 Suppl 1**: S1-90.

WHO (2010). World Malaria Report. World Health Organization.

Willingham, S. B., D. T. Bergstralh, W. O'Connor, A. C. Morrison, D. J. Taxman, J. A. Duncan, S. Barnoy, M. M. Venkatesan, R. A. Flavell, M. Deshmukh, H. M. Hoffman and J. P. Ting (2007). "Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC." Cell Host Microbe **2**(3): 147-159.

Yanez, D. M., D. D. Manning, A. J. Cooley, W. P. Weidanz and H. C. van der Heyde (1996). "Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria." J Immunol **157**(4): 1620-1624.

Yu, J. W., J. Wu, Z. Zhang, P. Datta, I. Ibrahimi, S. Taniguchi, J. Sagara, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2006). "Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization." Cell Death Differ **13**(2): 236-249.