

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

Larissa Marina Nogueira Pereira

O PAPEL DA CASPASE-8 NA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

Belo Horizonte
2021

Larissa Marina Nogueira Pereira

O PAPEL DA CASPASE-8 NA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Belo Horizonte
2021



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



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LARISSA MARINA NOGUEIRA PEREIRA. Aos trinta dias do mês de março de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela Plataforma meet.google.com, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “O Papel da Caspase-8 na Malária Cerebral Experimental”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Warrison Athanásio Coelho de Andrade (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de março de 2021.

Warrison A. C. de Andrade

Dr. Warrison Athanásio Coelho de Andrade (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP)

Flávio Almeida Amaral

Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)

Ricardo T. Gazzinelli

Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli - Orientador (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo Gazzinelli, pela orientação e por toda confiança depositada em mim e no meu trabalho.

Aos colaboradores, em especial à Dra. Patricia Assis, por toda contribuição no desenvolvimento e realização deste trabalho.

Ao Dr. Douglas Golenbock e à Universidade de Massachusetts por me receberem tão bem durante meu ano fora do Brasil.

Ao Dr. Milton Pereira, por todos os ensinamentos científicos e de vida.

Aos colegas da Fiocruz Minas, em especial do laboratório de Imunopatologia, pelo companheirismo e amizade de todos os dias.

A todos os amigos e amigas que sempre estiveram ao meu lado durante essa caminhada, tornando mais leves os dias difíceis.

Aos meus pais e irmão por todo amor e apoio que me dão. Não estaria aqui se não fosse o esforço diário de vocês.

RESUMO

A malária é uma doença causada pelo *Plasmodium spp* e afeta milhões de pessoas todos os anos. A resposta imune exacerbada do hospedeiro desencadeia grande produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF α , contribuindo para o aparecimento dos sintomas da doença. Durante a malária murina, embora haja ativação de caspase-11, a via não canônica de ativação do inflamassoma parece não contribuir para a patogênese da doença, enquanto a caspase-1 desempenha papel importante na produção de IL-1 β . Nossos resultados mostram que há ativação de caspase-8 em monócitos do baço de camundongos infectados e a caspase-8 participa da produção de IL-1 β e TNF α . Além disso, camundongos *Ripk3/Casp8*^{-/-} são parcialmente resistentes ao modelo de infecção e desafio com LPS e à malária cerebral experimental, enquanto os camundongos *Ripk3/Casp8/1/11*^{-/-} e *Ripk3/Casp8/Gsdmd*^{+/-} são altamente em ambos os modelos. Esses resultados demonstram um papel complementar da caspase-8, porém independente à função do inflamassoma, para mediar a patogênese da malária. Além disso, pacientes infectados por *P. falciparum* ou *P. vivax* possuem GSDMD ativa e ativação de caspase-4 e -8 em monócitos. Assim, esse trabalho sugere a importância da caspase-8 durante a malária e seu potencial como possível alvo de intervenção terapêutica.

Palavras-chaves: Malária. Inflamassoma. Caspase-8. IL-1 β . TNF α

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by *Plasmodium spp.* parasites which affects millions of people every year. Exacerbated immune response by the host triggers a large production of inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF α , contributing to the symptoms of the disease. During mouse malaria, although there is caspase-11 activation, the non-canonical pathway of inflammasome does not seem to contribute to the pathogenesis of the disease, whereas caspase-1 plays an important role on IL-1 β production. Caspase-8 is cleaved in splenic monocytes from infected mice and caspase-8 participates in IL-1 β and TNF α production. Moreover, *Ripk3/Casp8*^{-/-} mice are partially resistant to infection followed by LPS challenge and experimental cerebral malaria and *Ripk3/Casp8/1/11*^{-/-} e *Ripk3/Casp8/Gsdmd*^{-/-} mice highly resistant in both models. These results demonstrate a complementary, but independent, role of caspase-8 and inflammasomes in mediating malaria pathogenesis. Besides, *P. vivax* and *P. falciparum* infected patients display active GSDMD, caspase-4 and caspase-8 in monocytes. In conclusion, the present work suggests the importance of caspase-8 during malaria and its potential role as a possible therapeutical target.

Keywords: Malaria. Inflammasome. Caspase-8. IL-1 β . TNF α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i>	15
Figura 2. Ativação do inflamassoma.....	23
Figura 3. Ativação de caspase-1 e caspase-11 durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	33
Figura 4. Caspase-1 contribui para a produção de IL-1 β após infecção por <i>P. chabaudi</i> e desafio com LPS.....	34
Figura 5. GSDMD participa da secreção de IL-1 β durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	36
Figura 6. Ativação de caspase-8 durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	37
Figura 7. Caspase-8 participa da liberação de IL-1 β e letalidade durante a infecção por <i>P. chabaudi</i> e desafio com LPS.....	38
Figura 8. Ativação de caspase-8 durante a infecção por <i>P. berghei ANKA</i>	40
Figura 9. Caspase-8 contribui para o desenvolvimento da malária cerebral experimental causada pelo <i>P. berghei ANKA</i>	42
Figura 10. Expressão e indução de caspase-4, caspase-8 e GSDMD em monócitos de pacientes infectados.....	43

LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
ACK	Tampão amônia-cloreto-potássio (<i>Ammonium-chloride-potassium buffer</i>)
AIM2	Ausente em melanoma-2 (<i>Absent in melanoma-2</i>)
ASC	Proteína <i>speck-like</i> associada a apoptose contendo um domínio CARD (<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD</i>)
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
BID	Agonista de morte de domínio de interação BH3 (<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>)
BSA	Albumina bovina sérica (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
Caspase	Proteases cisteína-aspártica (<i>Cysteine-aspartic proteases</i>)
CD	Grupamento de diferenciação (<i>Cluster of differentiation</i>)
cFLIP	Proteína inibitória de FLICE celular (<i>Cellular FLICE inhibitory protein</i>)
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano (<i>Damage associated molecular patterns</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DR4/5	Receptor de morte 4/5 (<i>Death receptor 4/5</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FADD	Proteína de domínio de morte associada a FAS (<i>FAS-associated protein with death domain</i>)
FASL	Fas-Ligante (<i>Fas ligand</i>)
FLICE	Enzima conversora de IL-1β do tipo FADD (<i>FADD-like IL-1β-converting enzyme</i>)
g	Força gravitacional ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)

GPI	Glicosilfosfatidilinositol (<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>)
ICAD	Inibidor de DNase ativada por caspase (<i>Inhibitor of caspase-activated DNase</i>)
ICAM	Molécula de adesão intercelular 1 (<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>)
IFN I	Interferon tipo I
IFN γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
K ⁺	Íon potássio
LDH	Lactato desidrogenase (<i>Lactate dehydrogenase</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitro
MSP-1	Proteína de superfície de merozoítos-1 (<i>Merozoite surface protein-1</i>)
MLKL	Domínio quinase de linhagem mista do tipo pseudoquinase (<i>Mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>)
mM	Milimolar
MyD88	Resposta primária de diferenciação mieloide 88 (<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>)
NAIP	Proteína inibidora de apoptose neuronal (<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>)
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
NLR	Receptores do tipo Nod (<i>Nod-like receptors</i>)
NLRC	Proteínas da família de NLR contendo domínio N-terminal CARD (<i>NLR with caspase activation and recruitment N-terminal domain</i>)
NLRP	Proteínas da família de NLR contendo domínio N-terminal pirina (<i>NLR with pyrin N-terminal domain</i>)
nm	Nanômetros
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen associated molecular patterns</i>)
PARP	Poli ADP-ribose polimerase (<i>Poly ADP-ribose polymerase</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffer saline</i>)

PRR	Receptor de reconhecimento padrão (<i>Pattern recognition receptor</i>)
RIPA	Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)
RIPK	Proteína quinase de interação com receptor (<i>Receptor-interacting Protein Kinase</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel</i>)
TLR	Receptores do tipo Toll (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumoral necrosis factor alfa</i>)
TRADD	Proteína de domínio de morte associada ao receptor do tipo 1 de TNF (<i>TNF receptor type 1-associated death domain protein</i>)
TRIF	Adaptador indutor de Interferon- β contendo domínio TIR (<i>TIR-domain-containing adapter</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Malária: Aspectos Gerais.....	13
1.1.1. Epidemiologia.....	13
1.1.2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp</i>	13
1.1.3. Sintomas e diagnóstico.....	15
1.1.4. Tratamento.....	16
1.2. Patogênese da malária.....	16
1.3. Resposta imune inata na malária.....	17
1.4. Malária cerebral.....	19
1.5. Inflamassoma.....	20
1.5.1. Aspectos gerais e ativação.....	20
1.5.2. Via não-canônica de ativação do inflamassoma.....	21
1.6. Gasdermina-D e piroptose.....	22
1.7. Caspase-8.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Modelo Experimental.....	26
3.1.1. Camundongos.....	26
3.1.2. Infecção.....	26
3.1.3. Eutanásia e processamento de baços.....	27
3.1.4. Purificação de células CD11b+.....	27
3.1.5. Eletroforese e Western Blot.....	27
3.1.6. Desafio com LPS/ Curva de mortalidade.....	28
3.1.7. Quantificação de citocinas.....	28
3.1.8. Curva de mortalidade (malária cerebral).....	29
3.1.9. Ensaio com Azul de Evans.....	29
3.1.10. RNAseq.....	29
3.2. Estudo de amostras de pacientes.....	30
3.2.1. Pacientes infectados.....	30
3.2.2. Purificação de células CD14+.....	30
3.2.3. Avaliação de caspase-4, caspase-8 e gasdermina-D.....	30
3.3. Análises estatísticas.....	31
4. RESULTADOS.....	32

4.1.	A infecção por <i>P. chabaudi</i> é suficiente para promover a indução de caspase-11 .	32
4.2.	A caspase-1 é a principal responsável pela produção de IL-1 β circulante durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	33
4.3.	Gasdermina-D controla a liberação de IL-1 β durante a infecção por <i>P. chabaudi</i> ..	35
4.4.	A infecção por <i>P. chabaudi</i> é suficiente para promover a clivagem de caspase-8 .	36
4.5.	Caspase-8 participa da produção de IL-1 β e TNF α durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	37
4.6.	Aumento da expressão gênica e de níveis proteicos de caspase-8 durante a infecção por <i>P. berghei</i> ANKA.....	39
4.7.	Caspase-8 participa do desenvolvimento da malária cerebral experimental	40
4.8.	Ativação de caspase-4, caspase-8 e GSDMD em pacientes com malária	42
5.	DISCUSSÃO	43
6.	CONCLUSÃO	47
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8.	APÊNDICE	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Malária: Aspectos Gerais

1.1.1. Epidemiologia

A malária ainda é uma doença de extrema importância no mundo e um grande problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2019 foram estimados cerca de 229 milhões de casos de malária, oriundos de 87 países, e 409 mil mortes, principalmente de crianças menores de 5 anos (WHO 2020). A grande maioria dos casos de malária ocorre na região africana (94%), seguido do sudeste asiático com 3% (WHO 2020).

Na região das Américas, o número de casos de malária registrados em 2019 foi cerca de 900 mil, além de 551 mortes. Esses números representam uma queda de cerca de 40% quando comparado ao número de casos e mortes desde o ano 2000. Dentre esses casos, 76% deles foram atribuídos ao *P. vivax*, ao contrário do que é visto mundialmente, onde somente cerca de 3% dos casos registrados de malária são causados por essa espécie. Essa baixa porcentagem mundial de casos de *P. vivax* se deve basicamente à grande predominância de casos de malária na região africana, sendo a maioria causada pelo *P. falciparum* (mais de 99% dos casos no continente), influenciado principalmente pelo grande número de indivíduos Duffy negativos (WHO 2020; GETTING *et. al.* 2012).

No Brasil, a grande maioria das infecções por malária ocorrem na região amazônica, sendo que em 2019 foram reportados 157.454 casos, uma redução de 19,1% em relação aos registrados em 2018 (Ministério da Saúde, 2020). Em relação aos casos autóctones no Brasil, cerca de 10,7% foram causados pelo *P. falciparum* e a grande maioria, 89,3%, causada pelo *P. vivax* (Ministério da Saúde, 2020).

1.1.2. Ciclo de vida do *Plasmodium spp*

O agente etiológico da malária é o protozoário do gênero *Plasmodium*, pertencente ao filo Apicomplexa. Atualmente, são conhecidas seis espécies capazes

de infectar seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* (SINGH *et. al.*, 2004) e *P. simium* (BRASIL *et. al.*, 2017). Seu ciclo é bastante complexo e passa por etapas sexuadas no mosquito e assexuadas no homem (**Figura 1**).

A infecção pelo *Plasmodium spp.* se inicia durante o repasto sanguíneo de fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* (BEIER *et. al.* 1992). Formas esporozoítas são inoculadas na derme junto com a saliva do vetor e atingem vasos sanguíneos e linfáticos (AMINO *et. al.* 2006). Da circulação, alguns esporozoítos atingem o fígado e atravessam diversas células de K pffer e hepatócitos até realizarem invasão com forma o de vacúolo parasitóforo, dando continuidade ao seu desenvolvimento (MOTA *et. al.* 2001). Dentro do hepatócito, cada esporozo to se divide dando origem ao esquizonte hepático, formado por milhares de merozoítos (PRUDÊNCIO *et. al.* 2006). Os merozoítos saem da célula dentro de vesículas chamadas de merossomos que os liberam diretamente nos sinusóides hepáticos (STURM *et. al.* 2006).

Na corrente sanguínea, os merozoítos interagem com a membrana dos eritrócitos por meio de diversas moléculas, como as proteínas ancoradas por GPI, como MSP1, e iniciam o processo de invasão (COWMAN e CRABB 2006). Dentro dos eritrócitos realizam novamente a esquizogonia para a libera o de merozoítos por meio de rompimento da membrana das células parasitadas. Esses merozoítos reiniciam o ciclo sanguíneo, infectando novos eritrócitos, porém uma pequena porão d  origem aos gametócitos, gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas), que, quando ingeridos pelo vetor durante o repasto sanguíneo, d o continuidade ao ciclo (COWMAN *et. al.* 2016).

Seguida a ingestão dos gametócitos pelo vetor, há fecunda o entre o microgameta e macrogameta para forma o do zigoto. A forma móvel do zigoto, chamada oocineto, se adere ao epitélio intestinal do mosquito onde se desenvolve em oocisto. Ele sofre diversas divisões dando origem aos esporozoítos, os quais rompem o oocisto e migram para a hemolinfa, de onde atingem a glândula salivar do mosquito e estão prontos para serem transmitidos durante o novo repasto sanguíneo do vetor (MATUSCHEWSKI 2006).

Infec es causadas pelo *P. vivax* e *P. ovale* podem gerar formas dormentes do parasito nos hepatócitos, chamadas de hipnozo tos. Essas formas podem ser

reativadas semanas ou até longos períodos após a cura da parasitemia sanguínea e são um dos motivos envolvidos nas recaídas da doença (MULLER *et. al.* 2009).

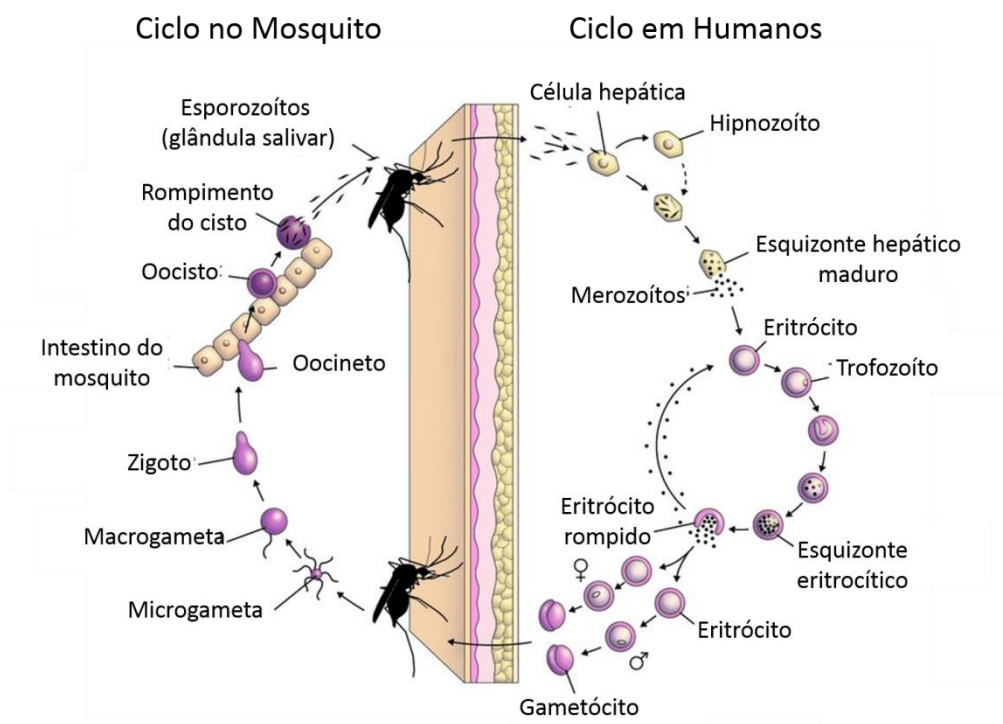


Figura 1: Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. Adaptado de <https://www.malariasite.com/life-cycle/>.

1.1.3. Sintomas e diagnóstico

Após o período de incubação da doença, que varia normalmente de 7-15 dias, iniciam-se os sintomas físicos. O principal e mais característico deles é a febre (paroxismo), e após alguns dias de seu início, ela passa a ser sincronizada de acordo com o ritmo de esquizogonia da espécie de *Plasmodium*: na malária por *P. vivax* e *P. ovale*, o paroxismo ocorre a cada 48 horas (malária terçã), por *P. falciparum* pode ser a cada 24 ou 48 horas, e por *P. malariae* é a cada 72 horas (malária quartã) (BARTOLONI e ZAMMARCHI 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010).

Os sintomas iniciais da malária costumam ser inespecíficos, se assemelhando aos apresentados durante a gripe. Além da febre, surgem calafrios, sudorese, mialgia, tonturas, dores de cabeça, náuseas e vômitos (BARTOLONI e ZAMMARCHI 2012; TRAMPUZ *et. al.* 2003).

Na malária complicada, causada pelo *P. falciparum*, os sintomas clássicos podem evoluir para malária cerebral, problemas respiratórios, falha renal e anemia.

Para diagnóstico da malária complicada, os sintomas clínicos devem ser associados aos achados laboratoriais característicos como: hiperbilirrubinemia, hiperlactatemia, hipoglicemia, acidose metabólica, hemoglobinúria e/ou hiperparasitemia (BARTOLONI e ZAMMARCHI 2012; TRAMPUZ *et. al.* 2003).

Por serem inespecíficos, os sintomas da malária podem ser confundidos com outras doenças febris agudas como dengue, febre amarela e leptospirose, portanto o diagnóstico diferencial é de extrema importância. O padrão ouro do diagnóstico da malária é o exame microscópico da gota espessa, que consegue detectar espécie (inclusive infecções mistas) e quantificar a parasitemia. É feita a punção digital no dedo do paciente, confecção da lâmina, que é corada por método de Giemsa ou Walker, e exame por meio de microscopistas treinados (TANGPUKDEE *et. al.* 2009; TRAMPUZ *et. al.* 2003).

1.1.4. Tratamento

No Brasil, o tratamento contra a malária é distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A recomendação geral é a utilização de associação de cloroquina e primaquina para tratamento da malária por *P. vivax* ou *P. ovale*; terapias combinadas a base de artemisinina ou associação entre quinina, doxiciclina e primaquina para tratamento da malária por *P. falciparum*.

Na malária grave, causada pelo *P. falciparum*, normalmente o tratamento é feito em unidade hospitalar, com associação de derivados de artemisinina e clindamicina ou quinina e clindamicina (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010). As diferentes recomendações de tratamento seguem critérios como a espécie de *Plasmodium*, idade do paciente, histórico da doença, gravidade da infecção, gravidez e presença de resistência aos antimaláricos na região (WHO 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010).

1.2. Patogênese da malária

Os sintomas iniciais da malária estão associados à inflamação sistêmica, ocasionada pela ativação de células do sistema imune inato. Três eventos fisiopatológicos são importantes na malária: a liberação de citocinas pró-inflamatórias,

também chamada de tempestade de citocinas; a adesão de eritrócitos infectados aos vasos sanguíneos e a ruptura de eritrócitos infectados (GAZZINELLI *et. al.* 2014).

O baço tem papel importante na patogênese da malária. Durante a infecção, eritrócitos parasitados são fagocitados e destruídos por macrófagos e monócitos locais. Como consequência, há grande produção de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para o surgimento dos sintomas característicos como febre, náuseas e fadiga (DEL PORTILLO *et. al.* 2012). Além disso, é descrito que a grande produção de IL-1 β e TNF- α durante a malária é um importante fator que desencadeia os ciclos de paroxismo (PICHYANGKUL *et. al.* 1994; AL-FADHLI *et. al.* 2014). A anemia também surge como consequência da destruição de eritrócitos infectados pelo baço, além da inibição da eritropoiese por citocinas inflamatórias, como TNF- α (AWANDARE *et. al.* 2011; GAZZINELLI *et. al.* 2014)

Outro evento chave na patogênese da malária é o sequestro de eritrócitos infectados em órgãos como pulmões, placenta, cérebro, fígado e rins. A produção de citocinas inflamatórias durante a doença leva ao aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio, como CD36 e ICAM1, que interagem com moléculas do parasito levando ao sequestro (KRAEMER e SMITH, 2006). Esse processo leva a obstrução capilar, ativação da coagulação, disfunção endotelial e infiltração de leucócitos no parênquima do tecido. Quadros como a acidose metabólica, malária cerebral e placentária são consequências do sequestro parasitário nos capilares (GAZZINELLI *et. al.* 2014).

1.3. Resposta imune inata na malária

Os Receptores do tipo-Toll (TLRs) e os receptores do tipo-Nod (NLRs) são alguns dos PRRs mais importantes na imunidade inata. Os TLRs detectam moléculas na superfície celular e nas membranas endossomais, enquanto os NLRs estão localizados no citosol (KAWAI e AKIRA 2009). Durante a malária, PAMPs e DAMPs são de grande importância para a geração da resposta imune inata do hospedeiro e os PRRs atuam no seu processo de reconhecimento (GAZZINELLI *et. al.* 2014).

Alguns dos PAMPs do *Plasmodium* reconhecidos pelo sistema imune inato incluem âncoras GPI, hemozoína, RNA e DNA do parasito (GAZZINELLI *et. al.* 2014). Âncoras de GPI são moléculas que ligam proteínas de superfície à membrana

plasmática do *Plasmodium*. São reconhecidas principalmente via TLR2 e TLR4, levando a produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos (TACHADO *et. al.*, 1996; KRISHNEGOWDA *et. al.*, 2005). A hemozoína é outro potente estimulador do sistema imune e é formada a partir da degradação da hemoglobina pelo parasito (PANDEY *et. al.* 2003). A hemozoína é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 em células mielóides e leva a liberação de IL-1 β (DOSTERT *et. al.* 2009). Além disso, a hemozoína funciona como um carreador de DNA do parasito. Esse DNA ligado à hemozoína também é capaz de gerar uma resposta pró-inflamatória via ativação de TLR9 (PARROCHE *et. al.* 2007). Já o RNA do *Plasmodium* é reconhecido via TLR7 e leva a produção de IFN-I (BACCARELLA *et. al.* 2013). Entre os DAMPs reconhecidos durante a malária, estão o ácido úrico e o grupamento heme liberados das células (GAZZINELLI *et. al.* 2014).

A produção de citocinas pró-inflamatórias na malária é consequência da grande ativação de receptores da imunidade inata. Durante o ciclo eritrocítico da malária, são produzidas grandes quantidades de citocinas como IL-12, TNF- α e IFN γ (BAKIR *et. al.* 2011). A terapia com IL-12 em camundongos gera a proteção contra a infecção com o *Plasmodium* de maneira dependente à produção de TNF- α e IFN γ (SEDEGAH *et. al.* 1994; STEVENSON *et. al.* 1995). Além disso, o IFN γ tem um papel importante ao realizar o *priming* de células da imunidade inata na malária (FRANKLIN *et. al.* 2006)

Em relação ao inflamassoma, Ataíde *et. al.* (2014) mostraram que há ativação de caspase-1 em camundongos infectados por *P. chabaudi*, de maneira dependente a MyD88, NLRP3 e NLRP12. Além disso, pacientes infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum* também possuem caspase-1 ativa, originada principalmente de monócitos. Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que a malária gera uma resposta exacerbada após estímulo secundário com agonistas de TLRs. Por esse motivo, camundongos C57BL/6 infectados e desafiados com doses não-letais de LPS, são hipersensíveis e morrem por choque séptico em decorrência dos altos níveis de IL-1 β produzidos. Ademais, pacientes infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum* possuem imunocomplexos associados ao DNA do parasito circulantes no soro. Quando monócitos de doadores saudáveis são expostos a imunocomplexos de pacientes com malária, há um aumento da resposta pró-inflamatória via NF- κ B e ativação de inflamassomas, visto na formação de agregados de NLRP3 e AIM2, além da ativação de caspase-1 e produção de IL-1 β (HIRAKO *et. al.* 2015).

1.4. Malária cerebral

A infecção pelo *P. falciparum* é a maior responsável pelos casos de malária severa e de mortalidade. A infecção pode evoluir para manifestações graves, sendo a malária cerebral um dos quadros mais preocupantes. Embora adultos também possam desenvolver o quadro, crianças de até 5 anos são as maiores vítimas da malária grave. A região africana detém a grande maioria dos casos de malária por *P. falciparum* e mortalidade (WHO 2020).

De acordo com a OMS, a classificação de malária cerebral depende da confirmação de formas assexuadas do *P. falciparum* no sangue, além da presença de algum sintoma neurológico e exclusão de outras doenças que também possam causar neuropatias. Além dos sintomas iniciais da doença (descritos em 1.1.3), alguns dos sintomas específicos da malária cerebral incluem: coma, convulsões, perda de consciência, retinopatias, edema cerebral e aumento da pressão intracraniana. Fora os sintomas neurológicos, outras manifestações podem estar associadas, como: acidose metabólica, anemia, hipoglicemia e alterações respiratórias (WHO 2014).

Embora os mecanismos que promovam a patogênese da malária cerebral ainda sejam pouco elucidados, alguns eventos fisiopatológicos parecem ser importantes, dentre eles, o sequestro de eritrócitos infectados na microvasculatura cerebral. O antígeno de superfície eritrocitário PfEMP-1 parece desempenhar papel central na cito aderência ao endotélio ao se ligar as proteínas do hospedeiro, em especial ICAM e CD36. Adicionalmente, hemácias não infectadas, leucócitos e plaquetas também podem se aglutinar aos eritrócitos infectados (IDRO *et. al.* 2010; BARNWELL *et. al.* 1989; BERENDIT *et. al.* 1989; BARUCH *et. al.* 1996). Esse processo pode levar tanto à obstrução mecânica do fluxo sanguíneo local, que contribui para a diminuição da perfusão cerebral e de retina (BEARE *et. al.* 2009), quanto à ativação endotelial com consequente rompimento da barreira hematoencefálica (IDRO *et. al.* 2010). Além disso, a produção de citocinas inflamatórias, como TNF α , pode contribuir para a inflamação cerebral e alterações endoteliais (KWIATKOWSKI *et. al.* 1990; MARK e MILLER *et. al.* 1990). Há também, possível infiltração de leucócitos da circulação para o parênquima cerebral, incluindo células CD4+, CD8+ e células dendríticas derivadas de monócitos (BELNOUE *et. al.* 2008; HIRAKO *et. al.* 2016).

Embora não exista um modelo murino que reproduza completamente as características vistas na malária cerebral humana, o *Plasmodium berghei ANKA* é muito usado como modelo de neuro inflamação. Linhagens de camundongo susceptíveis à infecção apresentam sintomas neurológicos e alterações histopatológicas que podem ser extrapoladas para o estudo da malária cerebral humana (ENGWERDA *et. al.* 2005).

1.5. Inflamassoma

1.5.1. Aspectos gerais e ativação

Martinon *et al.* (2002) identificaram pela primeira vez um complexo multiproteico envolvido na ativação de caspase-1 e clivagem de IL-1 β , o qual chamaram de inflamassoma. Caspases são proteases envolvidas, entre outros eventos, no apoptose, piroptose, necroptose e autofagia (SHALINI *et. al.* 2015). Já os inflamassomas são sensores citosólicos do sistema imune inato que reconhecem e respondem a PAMPs e DAMPs.

Os principais componentes dos inflamassomas incluem alguns membros da família dos NLRs (Receptores Tipo-NOD), a molécula acessória ASC e a pro-caspase-1. Ao reconhecerem certos estímulos, os inflamassomas se oligomerizam e promovem a autoclivagem da caspase-1, que é capaz de clivar a pro-IL-1 β e pro-IL-18 em suas formas biologicamente ativas e induzir a morte celular específica chamada de piroptose (**Figura 2**). Entre esses inflamassomas, alguns dos mais estudados são NLRP1, NLRP3 e NLRC4 (BROZ e DIXIT 2016).

O NLRC4 reconhece, principalmente, a flagelina de bactérias. Esse reconhecimento se dá por meio de moléculas de NAIP, como por exemplo NAIP5, que se ligam diretamente ao estímulo e induzem a ativação do NLRC4 (FRANCHI *et. al.* 2006). Outro inflamassoma descrito é composto por proteínas da família AIM2. O AIM2 se liga diretamente ao DNA de dupla fita no citosol, tanto de vírus e bactérias citosólicas, quanto o DNA próprio, liberado na presença de dano celular. Esse reconhecimento leva ao recrutamento de ASC e o autoprocessamento de caspase-1 (JIN *et. al.* 2012). Já O NLRP1 responde à toxina letal do *Bacillus anthracis* (BOYDEN *et. al.* 2006; BROZ e DIXIT 2016; SHARMA e KANNEGANTI 2016; GUO *et. al.* 2015).

O NLRP3 pode ser ativado por diversos estímulos como ATP; cristais de sílica, colesterol e ácido úrico; moléculas de diversos patógenos como bactérias, protozoários, fungos e vírus, entre outros. Estímulos reconhecidos via TLRs, levam a ativação de NF- κ B que atua no aumento da transcrição de NLRP3 e funcionam como um primeiro sinal de *priming* do inflamassoma. (BAUERNFEIND *et. al.* 2009). Acredita-se que, devido ao grande número de ativadores do NLRP3, ele possa responder a um evento celular em comum, desencadeado por esses estímulos. Sendo assim, alguns eventos como o efluxo de K⁺, ruptura lisossomal, produção de ROS e alteração nos níveis de cálcio intracelulares são estudados como possíveis sinais que ativam diretamente o NLRP3 (BROZ e DIXIT 2016; SHARMA e KANNEGANTI 2016; GUO *et. al.* 2015).

Atualmente, já foram descritas diversas doenças cujas patogêneses envolvem a ativação de inflamassomas. Entre elas, algumas doenças neurológicas como esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer, além de outras doenças como diabetes tipo II, obesidade e aterosclerose (GUO *et. al.* 2015). Há também diversos trabalhos demonstrando o papel do NLRP3 no reconhecimento dos cristais de urato e desencadeamento dos sintomas da Gota (TERKELTAUB *et. al.* 2009; YAGNIK *et. al.* 2000).

1.5.2. Via não-canônica de ativação do inflamassoma

Kayagaki *et al.* (2011) demonstraram que a ativação de caspase-11 é crítica para que ocorra a ativação de caspase-1 e liberação de IL-1 β em macrófagos de camundongos durante a infecção por bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *C. rodentium*. A ausência de caspase-11 levava a menor produção de IL-1 β , IL-18 e IL-1 α , além de menor citotoxicidade. Além disso, no modelo de sepse induzida por LPS *in vivo*, animais caspase-11^{-/-} foram mais resistentes à letalidade. Assim, esse trabalho identificou uma via não-canônica de ativação do inflamassoma, na qual a ativação de caspase-1 é dependente de caspase-11 na presença de LPS intracelular (**Figura 2**).

Tendo em vista que o reconhecimento do LPS é feito via TLR4 (HOSHINO *et. al.* 1999; RAETZ e WHITFIELD 2002), Rathinam *et. al.* (2012) identificaram a indução e ativação de caspase-11 dependente da via TLR4-TRIF-IFN-I por meio do reconhecimento do LPS extracelular das bactérias. Porém, na ativação não-canônica

do inflamassoma pelo LPS intracelular, seu reconhecimento é feito de maneira independente ao TLR4 (KAYAGAKI *et. al.* 2013).

Como a caspase-11 é exclusiva de roedores, a ativação da via não-canônica do inflamassoma foi descrita em células humanas por meio da participação das caspases 4 e 5. Após estímulo com LPS ou infecção com bactérias Gram-negativas, monócitos humanos possuem ativação de caspase-4, caspase-5 e NLRP3, seguida de indução de morte celular e liberação de IL-1 β e IL-1 α (VIGANÒ *et. al.* 2015; BAKER *et. al.* 2015). O LPS se liga diretamente as caspases inflamatórias 11, 4 e 5 no citosol de monócitos, células dendríticas e algumas células epiteliais de maneira específica e leva à sua oligomerização e ativação (SHI *et. al.* 2014; BAKER *et. al.* 2015). No entanto, diferentemente da caspase-1, as caspases 11, 4 e 5 não estão envolvidas diretamente na clivagem de IL-1 β e IL-18 (KAYAGAKI *et. al.* 2011; SHI *et. al.* 2014).

1.6. Gasdermina-D e piroptose

Sabe-se que a ativação do inflamassoma leva à piroptose com secreção de IL-1 β (BROZ e DIXIT 2016), contudo os mecanismos ainda não são totalmente compreendidos. Em 2015, alguns grupos identificaram a gasdermina-D (GSDMD) como substrato das caspases inflamatórias e indutora da piroptose (SHI *et. al.* 2015; KAYAGAKI *et. al.* 2015; HE *et. al.* 2015). As caspases 1, 11, 4 e 5 conseguem clivar a GSDMD inativa de 53 kDa em duas subunidades: uma N-terminal (GSDMD-NT) de 31 kDa e outra C-terminal (GSDMD-CT) de 20 kDa, sendo o fragmento N-terminal o executor da piroptose (**Figura 2**). Estímulos de ativação de via canônica (SHI *et. al.* 2015; KAYAGAKI *et. al.* 2015; HE *et. al.* 2015) e não-canônica do inflamassoma (KAYAGAKI *et. al.* 2015) foram capazes de levar à clivagem de GSDMD. A ausência de GSDMD *in vitro*, acarreta prejuízo na secreção de IL-1 β e diminuição de morte celular, indicada pela menor liberação de LDH (SHI *et. al.* 2015; KAYAGAKI *et. al.* 2015; HE *et. al.* 2015). Animais GSDMD^{-/-} também foram mais resistentes ao modelo de choque séptico induzido por LPS (KAYAGAKI *et. al.* 2015).

Posteriormente, foi descrito que ao contrário da GSDMD e GSDMD-CT, a GSDMD-NT se oligomeriza na membrana celular e leva à formação de poros (LIU *et. al.* 2016; SBORGI *et. al.* 2016). Sua ligação à membrana está restrita somente a lipídios contidos na face interna da membrana celular, como fosfatidilinositol fosfatos

e fosfatidilserina (LIU *et. al.* 2016). Além disso, a GSDMD-NT também se liga à cardiolipina, presente em membranas bacterianas e é capaz de matar bactérias *in vitro* (LIU *et. al.* 2016). A estrutura dos poros formados possui cerca de 15-20 nm, o que permitiria a passagem de IL-1 β clivada gerada no processo da piroptose (LIU *et. al.* 2016; SBORGI *et. al.* 2016). Já a GSDMD-CT possui mecanismo de auto inibição ao se ligar ao fragmento GSDMD-NT e reduz a piroptose induzida por LPS *in vitro* (SHI *et. al.* 2015).

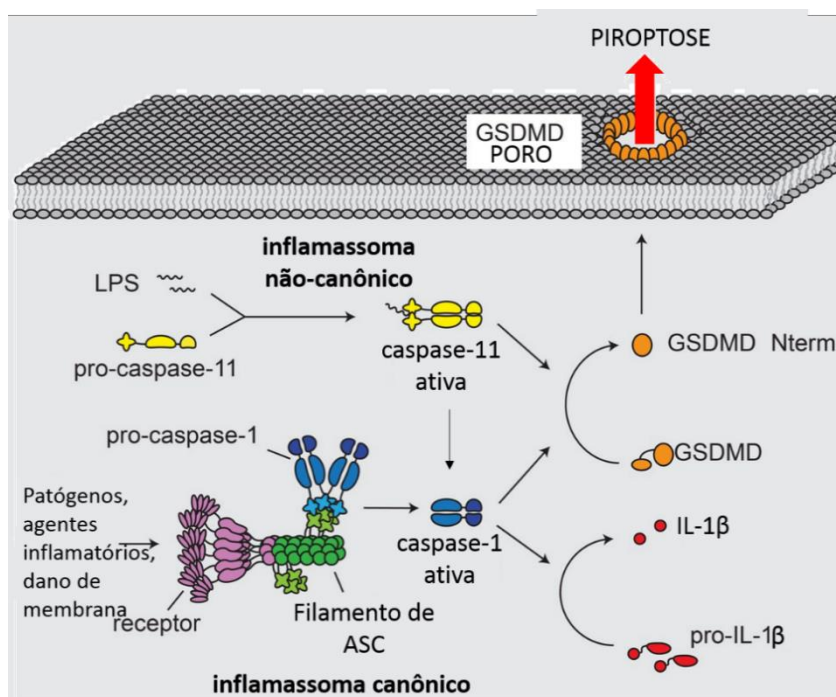


Figura 2: Ativação do Inflamassoma. Representação da ativação canônica e não-canônica do inflamassoma e clivagem de GSDMD. Adaptado de Sborgi *et. al.*, 2016.

1.7. Caspase-8

A Caspase-8 é uma cisteíno-protease sintetizada em sua pró-forma de cerca de 55kDa. Sua ativação ocorre por autoclivagem promovida por sua dimerização (MARTIN *et. al.* 1998), dando origem as subunidades de 41/43kDa e em seguida 18kDa e 12kDa, que irão clivar substratos específicos (KRUIDERING e EVAN 2000). A caspase-8 é conhecida pelo seu papel na apoptose, porém está envolvida em outros

tipos de morte celular como a necroptose, além de diversos eventos no contexto de inflamações (ORNING e LIEN 2020).

Durante a apoptose extrínseca, estímulos extracelulares como TNF, FasL e TRAIL são reconhecidos por seus respectivos receptores: TNFR, CD95 e DR4/5. Em seguida, ocorre o recrutamento das moléculas adaptadoras FADD ou TRADD e da pro-caspase-8, formando o complexo de sinalização de indução de morte (DISC), que também recruta RIPK1 e promove a autoclivagem de caspase-8, dando continuidade à apoptose assim como indução de NF- κ B (TUMMERS e GREEN 2017; SU *et. al.* 2005; ORNING e LIEN 2020). Após sua ativação, a caspase-8 participa diretamente da clivagem de caspase-3 e caspase-7, que clivam substratos como PARP e ICAD, envolvidos nas modificações celulares da apoptose (STENNICKE *et. al.* 1998; MCILROY *et. al.* 1999). A molécula cFLIP também se encontra no complexo DISC e uma de suas funções é regular a apoptose ao inibir a clivagem da pro-caspase-8 (KRUEGER *et. al.* 2001). Além disso, a caspase-8 é capaz de clivar a proteína BID, envolvida na apoptose intrínseca, sendo importante para o *crosstalk* que ocorre entre ambas as vias (LI *et. al.* 1998). Pacientes com mutação no gene da caspase-8 possuem deficiência na apoptose e na ativação de linfócitos T, B e NK, demonstrando um perfil de imunodeficiência (CHUN *et. al.* 2002).

Alguns estímulos podem levar a célula à um tipo de morte inflamatória por necrose programada, a necroptose, como ativação de receptores da superfamília do TNF, e os receptores TLR3 e TLR4 (HE *et. al.* 2009; HE *et. al.* 2011). Durante a apoptose, RIPK1 recruta RIPK3 para o complexo e são substratos clivados pela caspase-8 ativa. A inibição de caspase-8 ou FADD impede a clivagem de RIPK1 e RIPK3 e a célula inicia a necroptose por meio da fosforilação de MLKL por RIPK3 (HE *et. al.* 2009; CHAN *et. al.* 2015). O recrutamento de MLKL é importante para a perfuração da membrana plasmática por meio da formação de poros (DONDELINGER *et. al.* 2014). Sendo assim, a caspase-8 é um importante regulador da necroptose.

2. OBJETIVOS

Avaliar o papel de caspases inflamatórias durante a malária.

2.1. Objetivos específicos

- Investigar a contribuição da via não canônica do inflamassoma na patogênese da infecção por *P. chabaudi*;
- Avaliar a participação da caspase-8 na patogênese da infecção por *P. chabaudi* e malária cerebral experimental causada pelo *P. berghei ANKA*;
- Investigar o papel das caspases-1, -11 e -8 na produção de citocinas pró-inflamatórias;
- Verificar a contribuição da gasdermina-D para a produção de IL-1 β durante a malária;
- Avaliar a ativação de componentes do inflamassoma em amostras de pacientes infectados por *P. vivax* e *P. falciparum*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo Experimental

3.1.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos C57BL/6, 129S6, *Casp11^{-/-}*, *Casp1/11^{-/-}*, *Casp1^{-/-}/Casp11^{tg}* e *Tnfr^{-/-}* sob licença do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz Minas (CEUA LW15/14 e LW16/18). Camundongos *Gsdmd^{-/-}*, *Ripk3^{-/-}*, *Ripk3/Casp8^{-/-}*, *Ripk3/Casp8/1/11^{-/-}*, *Ripk3/Casp8/Gsdmd^{-/-}* e *Casp1^{-/-}* foram utilizados sob a licença IACUC/A-2371-15 da University of Massachusetts Medical School (UMMS).

3.1.2. Infecção

Para a infecção dos camundongos, foram utilizadas as cepas *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS (malária não-letal) e *Plasmodium berghei* ANKA (malária cerebral), mantidas em camundongos C57BL/6 por até dez passagens semanais.

No sétimo dia de infecção de camundongos infectados por *P. chabaudi* e sexto dia de infecção dos camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, foram feitos esfregaços sanguíneos de cada animal para contagem da parasitemia. Os esfregaços foram corados e a parasitemia calculada pela contagem do número de hemácias infectadas em cerca de 700 hemácias totais. O animal com maior porcentagem de parasitemia e menor número de parasitos fora das células teve o sangue utilizado para a infecção dos demais.

O sangue do animal escolhido foi retirado pela cauda e diluído em PBS 1x. O número de hemácias da solução foi contado em câmara de Neubauer e a partir do valor de parasitemia foi obtido o número de hemácias infectadas na solução. A concentração de hemácias infectadas foi ajustada para 10⁶/mL e cada camundongo foi infectado com 10⁵ hemácias infectadas, por meio de injeção intraperitoneal de 100µL da solução.

3.1.3. Eutanásia e processamento de baços

Camundongos não infectados e infectados foram sacrificados por overdose de anestésicos ou em câmara de CO₂. É importante notar que os animais infectados com *P. chabaudi* sempre foram sacrificados no oitavo dia pós-infecção, enquanto os animais infectados com *P. berghei* ANKA sempre foram sacrificados no sexto dia pós-infecção.

Os baços dos animais foram coletados e macerados em 2mL de meio de cultura. Após centrifugação a 300g por oito minutos, o sobrenadante do macerado foi coletado e armazenado a 4°C. O pellet de células foi incubado por cinco minutos com tampão ACK para lise de hemácias e os esplenócitos restantes foram passados em filtro de 100µm para eliminação de restos celulares. Para os experimentos realizados com esplenócitos, o pellet foi ressuscitado em tampão RIPA (Sigma) associado a um inibidor de proteases (Roche) para que ocorresse a lise celular. O lisado de esplenócitos também foi armazenado a 4°C. Para experimentos com células CD11b⁺, o pellet de esplenócitos passou pela etapa de purificação com *beads* magnéticas associadas a anticorpos anti-CD11b⁺.

3.1.4. Purificação de células CD11b⁺

As células do pellet de esplenócitos foram contadas e ressuscitadas em Tampão MACS (2mM EDTA e 0,5% BSA em 500 mL de PBS 1x) e anticorpos anti-CD11b⁺ conjugados a microbeads magnéticas (MACS Miltenyi Biotec). As células foram transferidas para uma coluna LS (MACS Miltenyi Biotec) dentro de um magneto para a seleção positiva das células marcadas. Após lavagens da coluna, o conteúdo de células CD11b⁺ foi eluído para um tubo de 15mL. As células foram contadas e transferidas para um tubo de 1,5mL. A cada 2 x 10⁶ foram usados 50µL de Tampão RIPA com inibidor de proteases para a lise das células e esse lisado foi armazenado a -20°C.

3.1.5. Eletroforese e Western Blot

Após o processamento dos esplenócitos e de células CD11b⁺, a quantidade de proteínas das amostras foi quantificada por método de Bradford. As amostras foram

misturadas a um tampão de amostra contendo SDS e agente redutor e foram aplicadas quantidades iguais de proteínas em gel de 15% poliacrilamida SDS-PAGE. A corrida foi realizada em uma cuba de eletroforese com aplicação de uma voltagem de 80 a 110 V. Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 2 horas a 300mA.

A membrana foi bloqueada por uma hora em agitação com uma solução de 5% de leite desnatado em TBS Tween 0,1%. Depois do bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários *overnight* a 4°C, com as seguintes diluições: caspase-11, caspase-1 e pro-caspase-8 (1:1000), caspase-8 clivada (1:500) e actina (1:3000). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário por 1 hora na diluição 1:25000. A revelação foi feita por método de quimioluminescência com o reagente ECLMax (Biorad).

3.1.6. Desafio com LPS/ Curva de mortalidade

No oitavo dia de infecção, camundongos infectados com *P. chabaudi* foram desafiados com 10µg de LPS (sorotipo: E. coli 055B5) diluídos em 100µL de PBS por via endovenosa. Após 8 horas de desafio, os animais foram eutanasiados e tiveram o sangue coletado pelo plexo oftálmico com Pasteur de vidro e heparina. O sangue foi centrifugado (5000 rpm por 10 minutos a 4°C) e o plasma coletado e armazenado a -20°C.

Já para avaliação da sobrevivência, os animais foram monitorados nas 72 horas seguintes ao desafio com LPS e os eventos de mortalidade contabilizados.

3.1.7. Quantificação de citocinas

As citocinas IL-1β e TNFα foram quantificadas no plasma ou sobrenadante de cultura pelo método de ELISA com o kit Mouse IL-1β ELISA Set optEIA (BD Biosciences) e Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA (R&D), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, a placa foi sensibilizada com anticorpos de captura e incubada *overnight* a 4°C. Em seguida, a placa foi incubada 1 hora com solução de bloqueio e depois 2 horas com as amostras. Os anticorpos de detecção foram aplicados e incubados por 1 hora, a enzima (peroxidase) por 30 minutos e solução de

substrato também por 30 minutos. Após a adição de uma solução de parada, a absorbância dos poços foi medida à 450 nm. Sempre que terminados os períodos de incubação recomendados, a placa era lavada com PBS Tween 0,05% quantas vezes o protocolo do fabricante indicasse.

3.1.8. Curva de mortalidade (malária cerebral)

Para realização da curva de sobrevivência, camundongos infectados com *P. berghei ANKA* foram monitorados diariamente por 18 dias e as mortes contabilizadas. É importante ressaltar que, caso um animal fosse encontrado com sintomas neurológicos graves, como coma ou convulsão, ele era submetido à eutanásia.

3.1.9. Ensaio com Azul de Evans

Camundongos não-infectados ou infectados com *P. berghei ANKA* no 6º dia de infecção foram injetados com 200µL de solução 1% de Azul de Evans em PBS1x por via intravenosa. Após uma hora, os animais foram submetidos à eutanásia e perfusão com PBS1x foi realizada. O cérebro foi coletado e fotografado para comparação visual do extravasamento do corante.

3.1.10. RNAseq

Monócitos (CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁻DC-Sign⁻MHC-II⁻) de camundongos C57BL/6 não infectados e MO-DCs (CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁺DC-Sign⁺MHCII⁺) do baço de camundongos no quinto dia pós infecção por *P. berghei ANKA* foram isoladas por meio de *sorting* no citômetro ARIA (BD).

O RNA das amostras foi extraído usando o kit Qiagen RNeasy Mini Kit (QIAGEN) e a biblioteca preparada usando o kit TruSeq Stranded mRNA Kit (ILLUMINA). A biblioteca foi submetida ao sequenciamento no Illumina NextSeq 500 (Bauer Core Facility Harvard University). As leituras foram mapeadas usando o STAR aligner (DOBIN *et al.* 2013) e as análises calculadas por meio do CUFFLINKS (TRAPNELL *et al.* 2012).

3.2. Estudo de amostras de pacientes

3.2.1. Pacientes infectados

Pacientes infectados por *P. vivax* e *P. falciparum* (diagnóstico confirmado por microscopia de gota espessa) foram recrutados no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) em Porto Velho, Rondônia. Após consentimento, os pacientes doaram cerca de 100mL de sangue periférico. Indivíduos saudáveis e não pertencentes a áreas endêmicas de malária também foram recrutados para doação de amostras de sangue, utilizadas como controle dos experimentos.

O estudo em pacientes com malária foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP 15653) e pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEP-CEPEM 096/2009).

3.2.2. Purificação de células CD14+

A partir de amostras de sangue total, células mononucleares foram separadas por meio de gradiente de densidade: o sangue, diluído em PBS 1x, foi aplicado, cuidadosamente, sobre Ficoll-Paque Plus e centrifugado a 300g por 40 minutos, sem freio e sem aceleração, em temperatura ambiente. O anel de células mononucleares foi coletado e as células lavadas duas vezes em PBS 1x. Em seguida, o PBMC foi ressuspenso em Tampão MACS (2mM EDTA e 0,5% BSA em 500 mL de PBS 1x) e anticorpos anti-CD14 conjugados a microbeads magnéticas (MACS Miltenyi Biotec). As células foram transferidas para uma coluna LS (MACS Miltenyi Biotec) dentro de um magneto para a seleção positiva das células marcadas. Após lavagens da coluna, o conteúdo de células CD14+ foi eluído para um tubo de 15mL. As células foram contadas e transferidas para um tubo de 1,5mL. A cada 2×10^6 foram usados 50µL de Tampão RIPA com inibidor de proteases para a lise das células e esse lisado foi armazenado a -70°C .

3.2.3. Avaliação de caspase-4, caspase-8 e gasdermina-D

Para realização do *western blot* das amostras dos pacientes, cerca de 10 μ L de cada uma foi aplicada em um gel industrializado NuPage 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen). A corrida, transferência e bloqueio foram realizados da mesma maneira que descrito no item 4.1.4.

Os anticorpos primários foram diluídos 1:1000 em solução 5% BSA em TBS Tween 0,1%, tanto para caspase-4 (Cell Signaling), caspase-8 (Enzo) e gasdermina-D (Sigma). Para Actina (Sigma), a diluição foi 1:3000. As membranas foram incubadas overnight a 4°C. Posteriormente, a incubação com o anticorpo secundário foi realizada por 1 hora na concentração 1:25.000 e a membrana revelada por quimioluminescência.

3.3. Análises estatísticas

As análises dos dados foram feitas por meio do Software GraphPad Prism 7.

Primeiramente, foi realizado o teste de Grubbs para avaliar possíveis discrepâncias entre os valores. Em seguida, para resultados paramétricos, foi utilizado o teste *t* e resultados não paramétricos o teste Mann-Whitney. Para análise de múltiplos grupos foi utilizado *one-way* ANOVA.

Para as análises da curva de sobrevida foram realizados o teste estatístico Log Rank (Mantel-Cox).

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$, sendo os valores de *p* indicados nos gráficos ou na legenda das figuras.

4. RESULTADOS

4.1. A infecção por *P. chabaudi* é suficiente para promover a indução de caspase-11

Como já havia sido descrita a ativação de caspase-1 durante a infecção por *P. chabaudi* (ATAÍDE *et. al.* 2014), viu-se necessário investigar se também haveria ativação de caspase-11. A infecção por *P. chabaudi* é capaz de induzir e ativar a caspase-11, uma vez que foi observada a presença das bandas de pró-caspase-11 (subunidades p43 e p38) no lisado de esplenócitos e de caspase-11 ativa (subunidade p30) no sobrenadante do baço de camundongos C57BL/6 infectados (**Figura 3A**) Como esperado, camundongos 129S6 (naturalmente deficientes para caspase-11), *Casp11^{-/-}* e *Casp1/11^{-/-}* não apresentam caspase-11.

A clivagem de caspase-1 ocorreu maneira independente à caspase-11, já que camundongos *Casp11^{-/-}* possuem bandas de caspase-1 ativas de maneira similar aos camundongos C57BL/6. (**Figura 3B**).

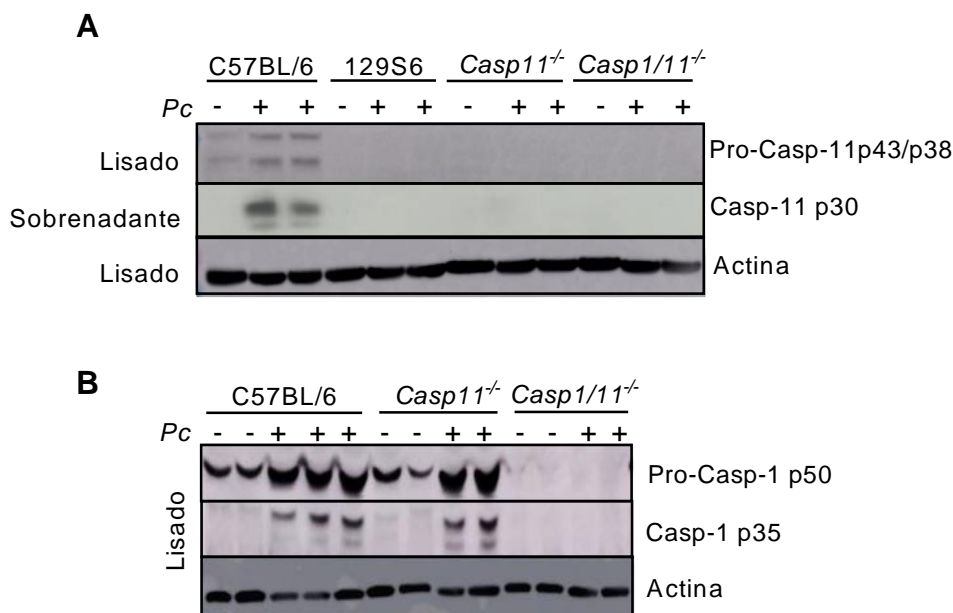


Figura 3: Ativação de caspase-1 e caspase-11 durante a infecção por *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6, 129S6, *Casp11^{-/-}* e *Casp1/11^{-/-}* foram infectados com *P. chabaudi* e após oito dias de infecção tiveram o baço coletado, os esplenócitos lisados e o sobrenadante do tecido coletado para realização de *western blot* para caspase-11 (**A**) e caspase-1 (**B**).

4.2. A caspase-1 é a principal responsável pela produção de IL-1 β circulante durante a infecção por *P. chabaudi*

O próximo passo foi avaliar se a caspase-11 desempenharia algum papel na infecção *in vivo*. Para isso, a produção de IL-1 β foi avaliada durante a infecção por *P. chabaudi* e desafio com doses não-letais de LPS. Foi visto que os níveis de IL-1 β circulantes nos animais *Casp11^{-/-}* estão reduzidos quando comparados aos dos animais C57BL/6 (**Figura 4A**). Porém, a concentração plasmática de IL-1 β reduz drasticamente na ausência de caspase-1 ou de ambas as caspases, como visto nos níveis apresentados pelos camundongos *Casp1^{-/-}/11^{tg}* (**Figura 4A**) e *Casp1/11^{-/-}* (**Figura 4B**). Animais somente infectados com *P. chabaudi* ou somente desafiados com LPS não possuem níveis significativos de IL-1 β no plasma.

Em concordância com o perfil de produção de IL-1 β , camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi* morrem devido ao choque endotóxico em cerca de 12h após o desafio com LPS. Embora apresentem um leve atraso na mortalidade em comparação aos camundongos C57BL/6, animais *Casp11^{-/-}* também não sobrevivem ao desafio com LPS (**Figura 4C**). Em oposição, camundongos *Casp1/11^{-/-}* ou *Casp1^{-/-}* infectados são parcialmente resistentes ao desafio (**Figura 4C-D**).

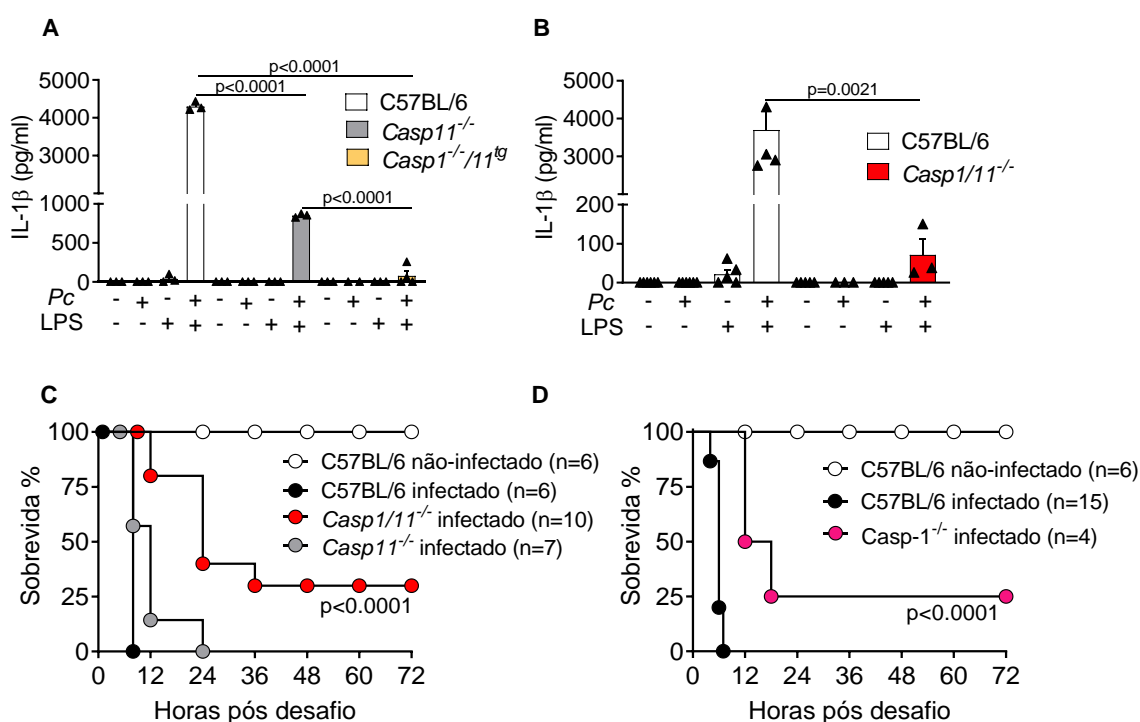


Figura 4: Caspase-1 contribui para a produção de IL-1 β após infecção por *P. chabaudi* e desafio com LPS. Camundongos C57BL/6, *Casp11^{-/-}*, *Casp1/11^{-/-}*, *Casp1^{-/-}* e *Casp1^{-/-}/11^{tg}* foram infectados com *P. chabaudi*. No oitavo dia de infecção foram desafiados com LPS (10 μ g) e **(A e B)**: após 8 horas tiveram o sangue coletado para obtenção de plasma e quantificação de IL-1 β por ELISA. **C e D**: Nas 72 horas seguintes ao desafio com LPS, os camundongos foram monitorados quanto a mortalidade.

4.3. Gasdermina-D controla a liberação de IL-1 β durante a infecção por *P. chabaudi*

Como foi demonstrada a participação da proteína GSDMD na liberação de IL-1 β (LIU *et al.* 2016), viu-se necessário estudar seu papel no modelo de infecção por *P. chabaudi*. Camundongos *Gsdmd*^{-/-} e C57BL/6 foram infectados e desafiados com LPS e, após oito horas, observou-se que os níveis de IL-1 β circulantes no plasma de camundongos *Gsdmd*^{-/-} são significativamente menores quando comparados ao de camundongos selvagens infectados (**Figura 5A**). Em contrapartida, camundongos *Gsdmd*^{-/-} infectados não sobrevivem ao desafio com LPS, embora apresentem um pequeno atraso na mortalidade. (**Figura 5B**).

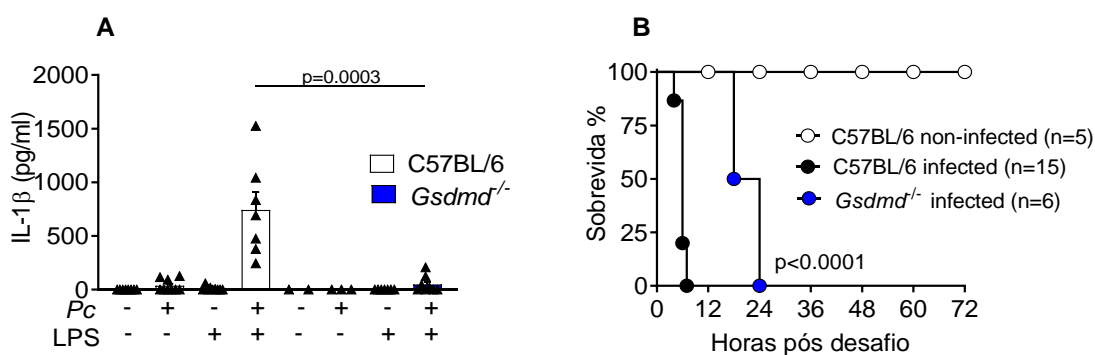


Figura 5: GSDMD participa da secreção de IL-1 β durante a infecção por *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 e *Gsdmd*^{-/-} foram infectados com *P. chabaudi* e no oitavo dia de infecção foram desafiados com LPS (10 μ g). Após oito horas tiveram o sangue coletado para obtenção de plasma e quantificação de IL-1 β por ELISA (**A**) ou foram monitorados nas 72 horas seguintes ao desafio para avaliação da letalidade (**B**).

4.4. A infecção por *P. chabaudi* é suficiente para promover a clivagem de caspase-8

Tendo em vista a participação da caspase-8 em diversos eventos inflamatórios e de morte celular (ORNING e LIEN 2020), foi grande interesse estudar sua participação na patogênese da malária. Foi demonstrado que durante a infecção por *P. chabaudi*, há clivagem de caspase-8 em células CD11b⁺ isolada do baço de camundongos C57BL/6, de maneira independente à caspase-1 e caspase-11 (**Figura 6A**). Em seguida, foi avaliado se camundongos nocautes para o receptor 1 de TNF (aqui chamados de *Tnfr*^{-/-}) teriam alguma alteração na clivagem de caspase-8. Foi observado que camundongos *Tnfr*^{-/-} não possuem clivagem de caspase-8 visto pela ausência da subunidade p18 e possuem menor indução de pro-caspase-8 (**Figura 6B**). Em contrapartida, eles não apresentaram alteração na clivagem de caspase-1 e caspase-11 (**Figura 6B**).

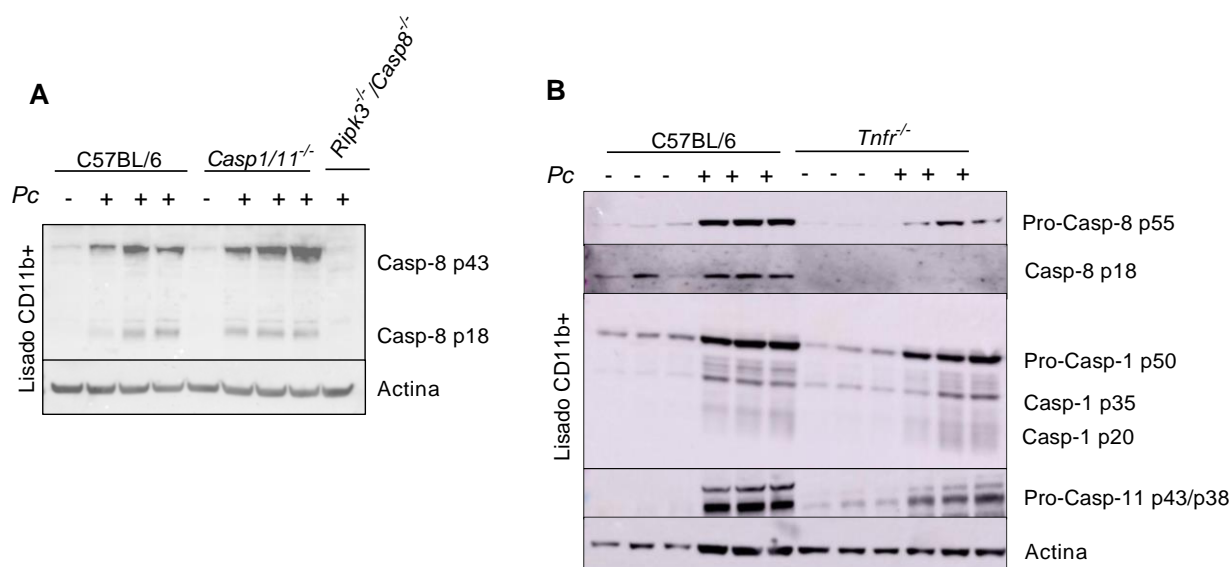


Figura 6: Ativação de caspase-8 durante a infecção por *P. chabaudi*. (A) Camundongos C57BL/6, *Casp1/11*^{-/-} e *Ripk3/Casp8*^{-/-} foram infectados com *P. chabaudi* e após oito dias de infecção tiveram o baço coletado e as células CD11b⁺ isoladas e lisadas para realização de *western blot* para caspase-8. (B) *Western blot* para caspase-8, caspase-11 e caspase-1 em amostras de lisado de células CD11b⁺ de camundongos C57BL/6 e *Tnfr*^{-/-}.

4.5. Caspase-8 participa da produção de IL-1 β e TNF α durante a infecção por *P. chabaudi*

Camundongos nocautes para caspase-8 morrem durante a fase embrionária, porém essa letalidade é restaurada ao também se realizar o nocaute de *Ripk3* (KAISER *et. al.* 2011), sendo camundongos *Ripk3/Casp8*^{-/-} viáveis e utilizados neste trabalho. Com o objetivo de avaliar se a caspase-8 participa da produção de citocinas pró-inflamatórias durante a malária, esplenócitos de camundongos infectados foram estimulados com LPS *in vitro* e a produção de IL-1 β e TNF α quantificada. Foi observado que camundongos *Ripk3/Casp8*^{-/-} e *Ripk3/Casp8/1/11*^{-/-} produzem menores níveis de IL-1 β (Figura 7A) e TNF α (Figura 7B) quando comparados aos camundongos selvagens. Camundongos *Casp1/11*^{-/-} e *Ripk3*^{-/-} foram utilizados como controles do experimento.

Além de apresentarem menor produção de citocinas, camundongos *Ripk3/Casp8*^{-/-} são parcialmente resistentes à infecção por *P. chabaudi* seguida do desafio com LPS, enquanto camundongos *Ripk3/Casp8/1/11*^{-/-} e *Ripk3/Casp8/Gsdmd*^{-/-} são totalmente resistentes. Camundongos *Ripk3*^{-/-} são susceptíveis ao desafio com LPS, assim como os animais selvagens (Figura 7C).

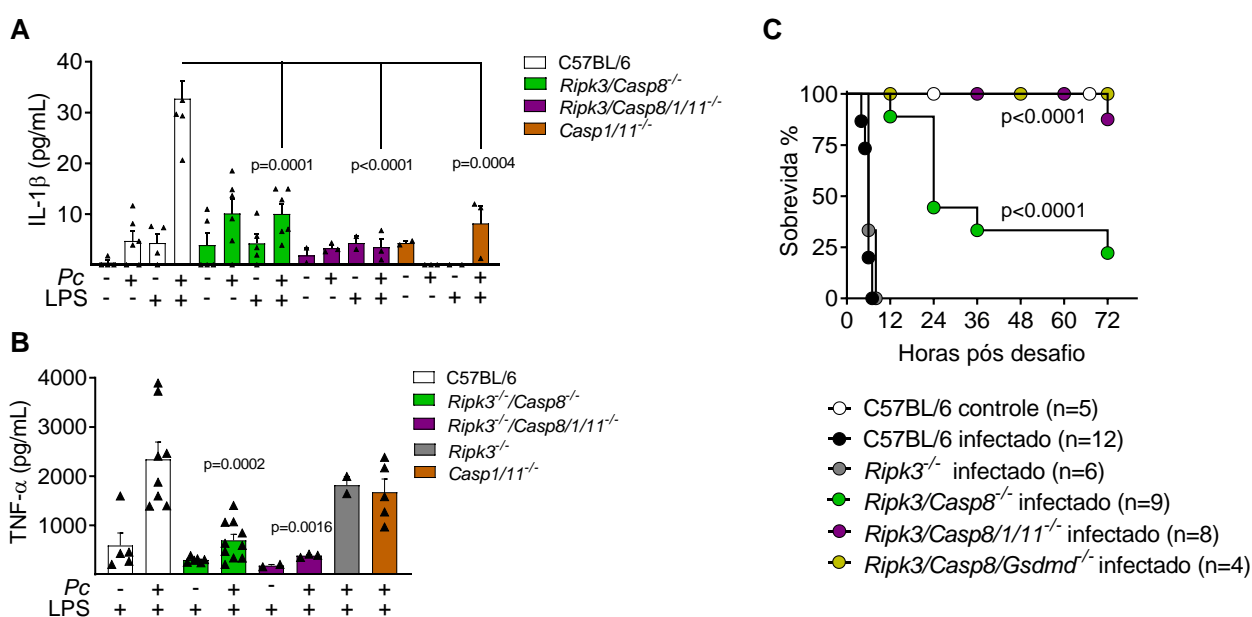


Figura 7: Caspase-8 participa da liberação de IL-1 β e letalidade durante a infecção por *P. chabaudi* e desafio com LPS. Camundongos C57BL/6, *Casp1/11*^{-/-}, *Ripk3/Casp8*^{-/-}, *Ripk3/Casp8/1/11*^{-/-} e *Ripk3*^{-/-} foram infectados com *P. chabaudi* e após oito dias de infecção tiveram o baço coletado e os esplenócitos estimulados com LPS (1ug/mL) *in vitro* por 24 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi coletado e (A) IL-1 β e (B) TNF α dosados por ELISA. (C) Camundongos C57BL/6, *Ripk3/Casp8*^{-/-}, *Ripk3/Casp8/1/11*^{-/-}, *Ripk3/Casp8/Gsdmd*^{+/-} e *Ripk3*^{-/-} foram infectados e no oitavo dia de infecção foram desafiados com LPS (10 μ g) para avaliação da mortalidade nas 72 horas seguintes.

4.6. Aumento da expressão gênica e de níveis proteicos de caspase-8 durante a infecção por *P. berghei ANKA*

A infecção por *P. berghei ANKA* induz a diferenciação de parte dos monócitos esplênicos em células dendríticas (MO-DC) que desempenham papel importante na patogênese da doença (HIRAKO *et. al.* 2016). Foi observado aumento da expressão gênica de diversos genes da família das caspases após análise por RNAseq de MO-DCs purificadas (**Figura 8A**). Entre esses genes, foi visto aumento de expressão de caspase-8, -7, -12, -1 e -4. Condizente a esses dados, células CD11b⁺ do baço de camundongos C57BL/6 infectados por *P. berghei ANKA* possuem aumento da expressão e clivagem de caspase-8 (**Figura 8B**), assim como de caspase-1 e -11 (**Figura 8C**).

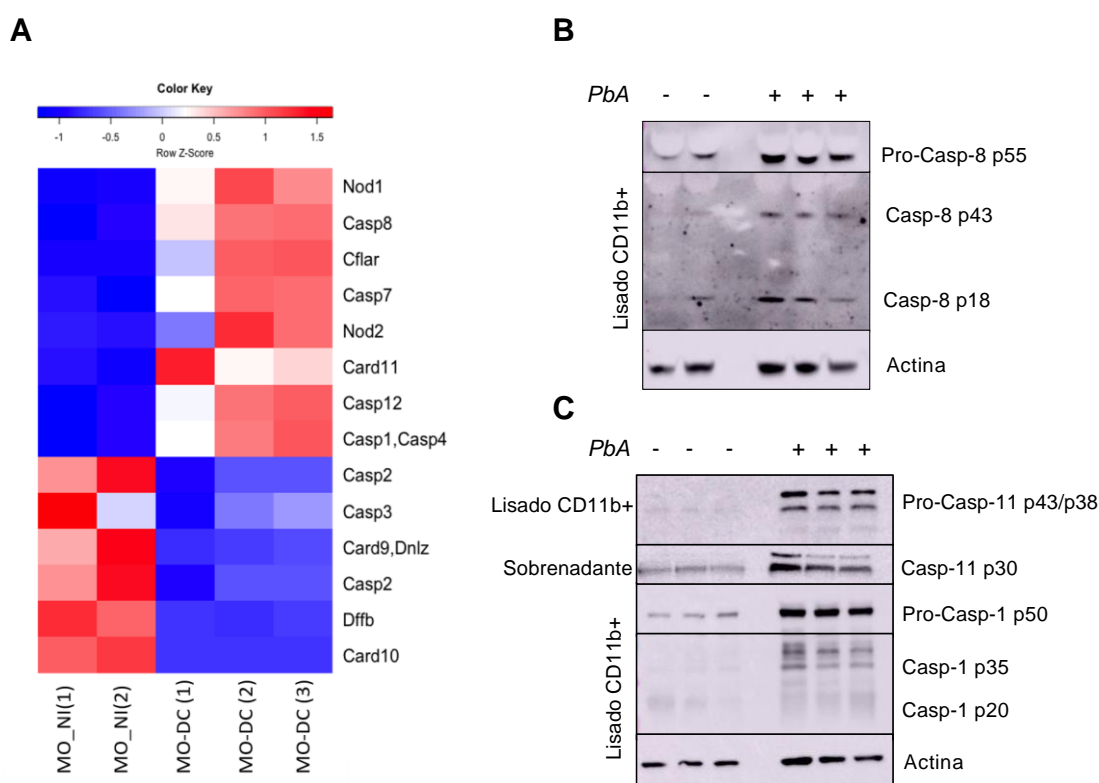


Figura 8: Ativação de caspase-8 durante a infecção por *P. berghei ANKA*. (A) Monócitos do baço de camundongos C57BL/6 não infectados (MO-NI) e MO-DCs do baço de camundongos infectados com *P. berghei ANKA* foram purificados para realização de RNA-seq. O *heatmap* mostra a comparação da expressão de diversos genes entre as duas populações celulares com base no *z-score*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com *P. berghei ANKA* e após cinco dias de infecção tiveram

o baço coletado e as células CD11b+ isoladas e lisadas para realização de *western blot* para (B) caspase-8 e (C) caspase-11 e caspase-1.

4.7. Caspase-8 participa do desenvolvimento da malária cerebral experimental

Visto que há ativação de caspase-8 em células do baço de camundongos infectados por *P. berghei ANKA*, foi interesse avaliar se, assim como ocorre durante a infecção por *P. chabaudi* e desafio com LPS (Figura 7A-B), a caspase-8 participaria da produção de IL-1 β e TNF α durante a malária cerebral. Para isso, esplenócitos de camundongos infectados foram estimulados *in vitro* com LPS e a produção de citocinas quantificada no sobrenadante. A ausência de caspase-8, tanto no animal *Ripk3/Casp8^{-/-}* quanto no *Ripk3/Casp8/1/11^{-/-}*, culminou na menor produção de TNF α (Figura 9A) e IL-1 β (Figura 9B), quando comparados aos camundongos selvagens e *Ripk3^{-/-}*.

Camundongos selvagens infectados por *P. berghei ANKA* desenvolveram sintomas neurológicos e morreram entre os dias 7-9 pós infecção. Já os nocautes *Ripk3/Casp8^{-/-}* demonstraram um atraso na mortalidade durante a malária cerebral, enquanto camundongos *Ripk3/Casp8/1/11^{-/-}* e *Ripk3/Casp8/Gsdmd^{-/-}* foram significativamente mais resistentes (Figura 9C). A infecção, porém, foi letal em nocautes para *Casp1/11^{-/-}*, *Gsdmd^{-/-}* e *Ripk3^{-/-}*.

O Azul de Evans é um corante utilizado para avaliar a permeabilidade vascular ao se ligar à albumina sanguínea. Em condições fisiológicas, o endotélio vascular é impermeável a albumina, portanto, seu extravasamento para o tecido nervoso indica possível rompimento da barreira hemato-encefálica (RADU e CHERNOFF 2013). Assim, foi observado grande extravasamento de corante no cérebro de camundongos C57BL/6 infectado. De forma oposta, os cérebros de camundongos *Ripk3/Casp8^{-/-}* e *Ripk3/Casp8/1/11^{-/-}* apresentaram menor extravasamento de Azul de Evans e, portanto, menor permeabilidade vascular no local (Figura 9D).

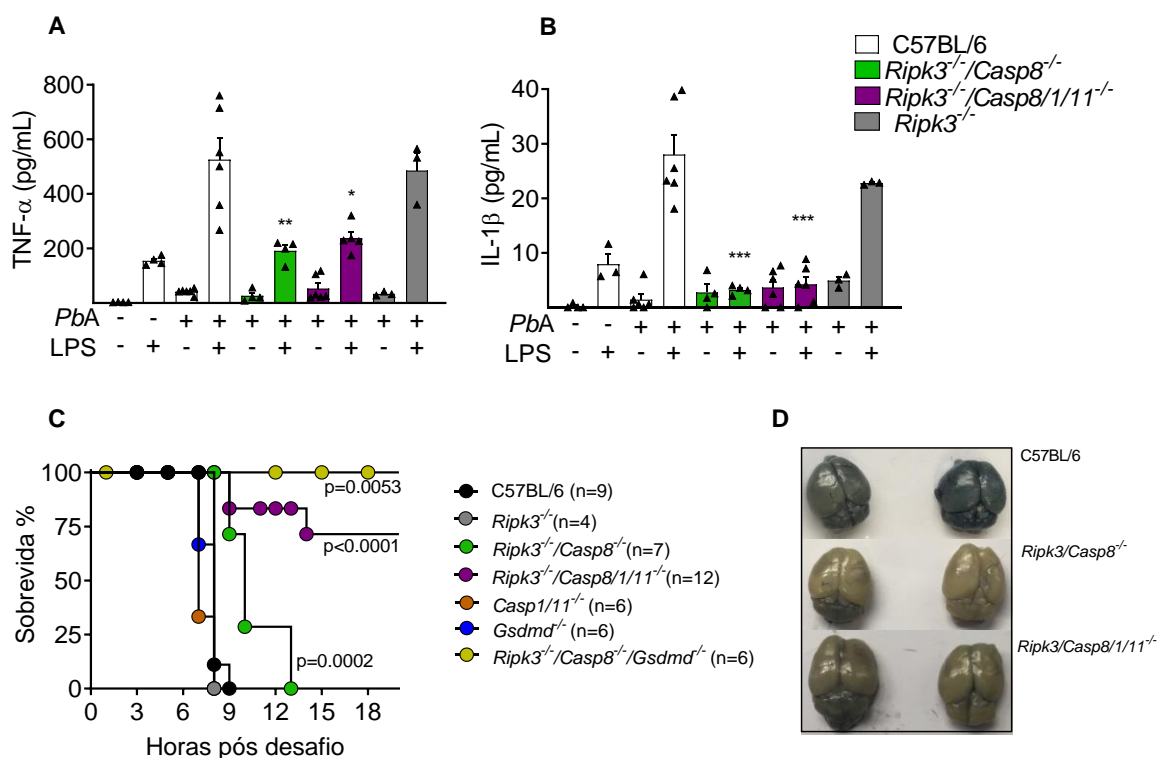


Figura 9: Caspase-8 contribui para o desenvolvimento da malária cerebral experimental causada pelo *P. berghei ANKA*. Camundongos C57BL/6, *Ripk3/Casp8*^{-/-}, *Ripk3/Casp8/1/11*^{-/-} e *Ripk3*^{-/-} foram infectados com *P. berghei ANKA* e após seis dias de infecção tiveram o baço coletado e os esplenócitos estimulados com LPS (1 μ g/mL) *in vitro* por 24 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi coletado e as citocinas (A) TNF α e (B) IL-1 β dosadas por ELISA. (C) Camundongos C57BL/6, *Ripk3/Casp8*^{-/-}, *Ripk3/Casp8/1/11*^{-/-}, *Ripk3/Casp8/Gsdmd*^{-/-}, *Ripk3*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-} e *Gsdmd*^{-/-} foram infectados e a mortalidade contabilizada durante os 18 dias pós infecção. (D) Camundongos no sexto dia de infecção foram injetados com 200 μ L de solução 1% Azul de Evans e, após uma hora, o cérebro foi coletado para análise visual do extravasamento do corante. No painel A * p=0.0104 e ** p=0.0056 e em B *** p<0.0001.

4.8. Ativação de caspase-4, caspase-8 e GSDMD em pacientes com malária

Por último, foi importante averiguar se, assim como no modelo murino, pacientes com malária apresentariam ativação de caspase-4, homóloga à caspase-11 (VIGANÓ *et. al.* 2015), caspase-8 e GSDMD. Assim, foi realizado *western blot* de amostras de lisado de células CD14⁺ de pacientes infectados por *P. vivax* e *P. falciparum*. Foi observada a ativação *ex vivo* de caspase-4 (**Figura 10A**), GSDMD (**Figura 10B**) e caspase-8 (**Figura 10C**) em monócitos de pacientes infectados por *P. vivax*. Adicionalmente, as amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* apresentaram perfil similar (**Figura 10D-E**)

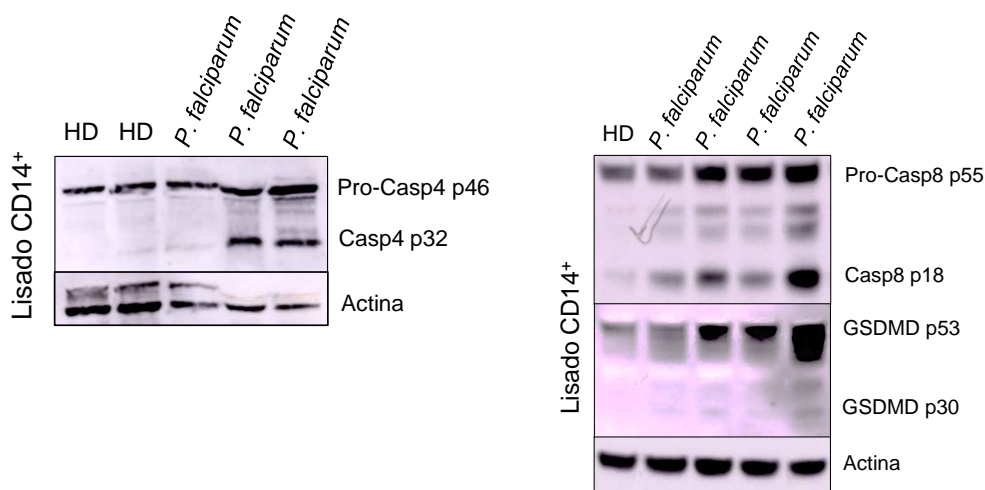


Figura 10: Expressão e indução de caspase-4, caspase-8 e GSDMD em monócitos de pacientes infectados. Após a obtenção de PBMC de pacientes infectados, células CD14⁺ foram isoladas e lisadas. Foi realizado *western blot* de amostras de pacientes com *P. vivax* para caspase-4 (**A**), GSDMD (**B**) e caspase-8 (**C**) e de pacientes infectados por *P. falciparum* (**D e E**).

5. DISCUSSÃO

A malária é uma doença febril aguda causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, responsável por milhões de casos e milhares de mortes anualmente (WHO 2020). A resposta imune inata do hospedeiro é responsável por diversos eventos que ocorrem durante a doença (GAZZINELLI *et. al.* 2014) portanto, é um campo de estudo de grande importância para a patogênese da doença. Sendo assim, como a ativação do inflamassoma e de caspase-1 já haviam sido descritas durante a malária (ATAÍDE *et. al.* 2014; HIRAKO *et. al.* 2015), foi necessário explorar o papel da caspase-11 e da via não-canônica de ativação do inflamassoma nesses modelos. Além do mais, tendo em vista a participação da caspase-8 em diversos eventos inflamatórios e de morte celular (ORNING e LIEN 2020), foi importante estudar sua participação na patogênese da malária.

Diversos trabalhos realizados com camundongos caspase-1^{-/-} para estudo do inflamassoma já foram publicados. Ataíde *et. al.* (2014), por exemplo, demonstraram que animais *Casp1^{-/-}*, após infecção com *P. chabaudi* e desafio com LPS, possuem baixos níveis de IL-1 β no plasma, além de maior resistência ao choque endotóxico. Contudo, posteriormente foi descrito que essa linhagem foi gerada a partir de *background* em camundongos 129ES, que naturalmente possuem mutação no gene da caspase-11, não havendo produção da proteína (KAYAGAKI *et. al.* 2011). Sendo assim, os camundongos antigamente referidos como caspase-1^{-/-} na verdade são caspase-1/11 duplo-nocautes. Por isso, foi importante elucidar se a caspase-11 também contribuiu para os fenótipos observados.

Neste trabalho, foi mostrado que a infecção por *P. chabaudi* é suficiente para induzir e clivar a caspase-11. Em contraste com o que foi descrito na ativação não-canônica do inflamassoma (KAYAGAKI *et. al.* 2011), no modelo de infecção apresentado neste trabalho, a caspase-11 está ativa independentemente de LPS e não participa da ativação de caspase-1. Em conjunto, nossos dados indicam que a caspase-11 contribui para os níveis de IL-1 β , porém a caspase-1 parece ser mais importante nesse processo. Isso se dá provavelmente ao fato de a caspase-1 ser a responsável direta pela clivagem de IL-1 β (MARTINON *et al.* 2002), enquanto a caspase-11 (assim como as caspases homólogas 4 e 5) não são capazes de clivar essa citocina (KAYAGAKI *et. al.* 2011; SHI *et. al.* 2014). Assim, como a caspase-11

está envolvida na regulação dos níveis de IL-1 β durante a malária ainda precisa ser melhor esclarecido.

A GSDMD é clivada pelas caspases-1, -4, -5 e -11 e a subunidade clivada NT regula a secreção de IL-1 β por meio da formação de poros na membrana (SHI *et. al.* 2015; LIU *et al.* 2016). Durante a infecção por *P. chabaudi*, a ausência de GSDMD acarretou redução extrema de IL-1 β circulante, indicando papel importante na secreção de IL-1 β durante a malária. Sendo assim, a importância da caspase-1 e da GSDMD durante a infecção por *P. chabaudi* se relaciona tanto aos picos de febre associados a IL-1 β (PICHYANGKUL *et. al.* 1994; AL-ADHLI *et. al.* 2014), quanto aos mecanismos pelos quais ocorre a hipersensibilidade a infecções bacterianas secundárias à malária. O desenvolvimento desse fenômeno está associado principalmente a bactérias Gram-negativas, como a *Salmonella* não-tifoide e pode ocasionar óbito, especialmente na África (MABEY *et. al.* 1987; BERKLEY *et. al.* 1999; SCOTT *et. al.* 2011; WERE *et. al.* 2011).

Por outro lado, a infecção por *P. chabaudi* e *P. berghei ANKA* foi suficiente para promover a clivagem de caspase-8 em células CD11b+ do baço. O TNF desempenha um papel importante na malária e aqui demonstramos que a clivagem de caspase-8 durante a malária murina é dependente de TNF α . A sinalização via TNF está envolvida na ativação de caspase-8 durante a apoptose extrínseca (ORNING e LIEN 2020) portanto, é possível que a infecção por *Plasmodium* possa induzir células do baço à apoptose, com a participação da caspase-8. Além disso, durante a malária cerebral, há clivagem de caspase-3 e apoptose em neurônios e células endoteliais da microvasculatura cerebral (POTTER *et. al.* 2006; LACKNER *et. al.* 2007; PUNSAWAD *et. al.* 2013). Células CD8+ se acumulam no cérebro e estão envolvidas no desenvolvimento da malária cerebral, sendo a expressão de Granzima-B (GzmB) importante nesse processo (HAQUE *et. al.* 2011; BARRERA *et. al.* 2019). Assim, é importante verificar se, durante a infecção por *P. berghei ANKA*, há ativação de caspase-8 no cérebro, possivelmente promovida pelas vias de células CD8+/GzmB ou TNF α , e se ela também está participando dos processos de apoptose local e neurodegeneração.

A ativação de NLRP3 e IL-1 β parece não desempenhar papel importante durante a malária cerebral experimental (REIMER *et. al.* 2010; KORDES *et. al.* 2011). De maneira similar, camundongos *Casp1/11^{-/-}* e *Gsdmd^{-/-}* são susceptíveis à infecção

por *P. berghei* ANKA. Entretanto, camundongos *Ripk3/Casp8/1/11^{-/-}* e *Ripk3/Casp8/Gsdmd^{-/-}* possuem resistência significativamente maior. Esse perfil também pode ser visto durante a infecção com *P. chabaudi* e desafio com LPS, no qual a ausência de caspase-8 promove resistência parcial a doença, enquanto os nocautes *Ripk3/Casp8/1/11^{-/-}* e *Ripk3/Casp8/Gsdmd^{-/-}* são resistentes. A letalidade nesse modelo não é explicada somente pela IL-1 β , visto que *Casp1/11^{-/-}* e *Gsdmd^{-/-}* são parcialmente resistentes ao choque endotóxico. Sendo assim, foi observado que a caspase-8 desempenha um papel importante em ambos os modelos de infecção, porém, de maneira independente do inflamassoma.

Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias podem causar perturbações no endotélio (IDRO *et. al.* 2010; MARK e MILLER *et. al.* 1990) portanto, a diminuição da permeabilidade ao Azul de Evans nos camundongos *Ripk3/Casp8^{-/-}* e *Ripk3/Casp8/1/11^{-/-}* pode indicar menor inflamação local. Durante a malária cerebral, diversas citocinas se encontram aumentadas no plasma e cérebro, dentre elas, TNF α e IL-1 β (BROWN *et. al.* 1999; LYKE *et. al.* 2004). Sendo assim, além de participar da resposta inflamatória no baço, a caspase-8 pode também estar mediando a produção de citocinas pró-inflamatórias por células localizadas na circulação e/ou parênquima cerebral. Em certas ocasiões, a caspase-8 contribui para a ativação de NF- κ B (LEMMERS *et. al.* 2007; SU *et. al.* 2005) e para a translocação de c-rel para o núcleo (DELANEY *et. al.* 2019). Além disso, já foi mostrado que a caspase-8 contribui para a indução e secreção de IL-1 β nas infecções por *Salmonella* (MAN *et. al.* 2013) e *Paracoccidioides brasiliensis* (KETELUT-CARNEIRO *et. al.* 2018). Portanto, além de averiguar se a produção de citocinas, tanto no baço quanto no cérebro, estaria relacionada à atividade da caspase-8, seria interessante avaliar se isso ocorre por atuação direta da caspase-8 na via de NF- κ B.

Os ciclos de paroxismo são eventos característicos da malária, sendo relacionados à produção de citocinas, com destaque para IL-1 β e TNF α (PICHYANGKUL *et. al.* 1994; AL-ADHLI *et. al.* 2014). Neste trabalho, foi demonstrado que monócitos de pacientes infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum* possuem caspase-4, caspase-8 e GSDMD ativas. Esses dados demonstram uma possível ativação do inflamassoma em monócitos, o que pode estar envolvido na produção de IL-1 β . Além disso, a presença de caspase-8 clivada indica que também pode estar envolvida na produção tanto de IL-1 β quanto TNF α .

Embora a terapia com anticorpos anti-TNF contribua para diminuição da febre, o bloqueio de TNF α não é suficiente para inibir o desenvolvimento da malária cerebral humana (KWIATKOWSKI *et. al.* 1993; VAN HENSBROEK *et. al.* 1996). Em camundongos, o tratamento com o antagonista de IL-1 β , Anakinra, não impediu o desenvolvimento da malária cerebral experimental (KORDES *et. al.* 2011). Tendo em vista que o bloqueio individual de IL-1 β e TNF α não reduz o desenvolvimento da malária cerebral, o efeito sinérgico entre ambas as citocinas pode ser um dos responsáveis pela patogênese da doença. Como a caspase-8 parece regular os níveis de IL-1 β e TNF α e promover uma resistência a doença, é interessante explorar os mecanismos pelos quais a caspase-8 participa do desenvolvimento da malária cerebral e assim, abrir caminho para possíveis novos tratamentos contra a doença.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados desta dissertação, concluímos que a infecção por *P. chabaudi* é capaz de induzir e ativar a caspase-11. Entretanto, a via não canônica de ativação do inflamassoma parece não ter grande influência no modelo estudado, sendo a caspase-1 a mais importante para mediar a produção de IL-1 β , cuja liberação parece ser dependente de GSDMD. Além disso, a infecção por *P. chabaudi* e *P. berghei ANKA* é suficiente para promover a clivagem de caspase-8. A caspase-8 participa da produção de IL-1 β e TNF α *in vitro* e contribui para a letalidade nos modelos de infecção por *P. chabaudi* e desafio com LPS assim como a malária cerebral experimental. De maneira semelhante ao observado em camundongos, monócitos de pacientes infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum* possuem ativação de caspase-4, caspase-8 e GSDMD clivada, indicando uma possível participação na produção de IL-1 β e TNF α durante a malária humana. Assim, como a caspase-8 parece regular duas citocinas importantes na patogênese da malária, ela pode ser um futuro alvo terapêutico para intervenção durante doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-FADHLI, M. A.; SARAYA, M. A.; QASEM, J. A. Evaluation of leptin, interleukin–1 beta and tumor necrosis factor alpha in serum of malaria patients as prognostic markers of treatment outcome. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 4, n. 6, p. 441-445, 2014.

AMINO, R.; THILBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**. v. 12, n.2, p. 220-224, 2006.

ATAIDE, M. A.; ANDRADE, W. A.; ZAMBONI, D. S.; WANG, D.; SOUZA, M.; FRANKLIN, B. S.; ELIAN, S.; MARTINS, F. S.; PEREIRA, D.; REED, G.; FITZGERALD, K. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Malaria-Induced NLRP12/NLRP3-Dependent Caspase-1 Activation Mediates Inflammation and Hypersensitivity to Bacterial Superinfection. **PLoS Pathogens**. v. 10, n. 1, e1003885, 2014.

AWANDARE, G. A.; KEMPAIAH, P.; OCHIEL, D. O.; PIAZZA, P.; KELLER, C. C.; PERKINS, D. J. Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. **American Journal of Hematology**. v. 86, n. 2, p. 155-162, 2011.

BACCARELLA, A.; FONTANA, M. F.; CHEN, E. C.; KIM, C. C. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. **Infection and Immunity**. v. 81, n. 12, p. 4431-4442, 2013.

BAKER, P. J.; BOUCHER, D.; BIERSCHENK, D.; TEBARTZ, C.; WHITNEY, P. G.; D'SILVA, D. B.; TANZER, M. C.; MONTALEONE, M.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A.; ALVAREZ-DIAZ, S.; HEROLD, M. J.; BEDOUI, S.; SCHRODER, K.; MASTERS, S. L. NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. **European Journal of Immunology**. v. 45, n. 10, p. 2918-2926, 2015.

BAKIR, H. Y.; TOMIYAMA, C.; ABO, T. Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. **Biomedical research (Tokyo, Japan)**. v. 32, n. 3, p. 203-208, 2011.

BARNWELL JW, ASCH AS, NACHMAN RL, YAMAYA M, AIKAWA M, INGRAVALLO P. A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J Clin Invest**. 84(3):765-772, 1989.

BARRERA V, HALEY MJ, STRANGWARD P, ATTREE E, KAMIZA S, SEYDEL KB, TAYLOR TE, MILNER DA JR, CRAIG AG, COUPER KN. Comparison of CD8⁺ T Cell Accumulation in the Brain During Human and Murine Cerebral Malaria. **Front Immunol**. Jul 24;10:1747, 2019.

BARTOLONI, A.; ZAMMARCHI, L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**. v. 4, n. 1, 2012.

BARUCH DI, GORMELY JA, MA C, HOWARD RJ, PASLOSKE BL. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Apr 16;93(8):3497-502, 1996.

BAUERNFEIND, F. G.; HORVATH, G.; STUTS, A.; ALNEMRI, E. S.; MACDONALD, K.; SPEERT, D.; FERNANDES-ALNEMRI, T.; WU, J.; MONKS, B. G.; FITZGERALD, K. A.; HORNUNG, V.; LATZ, E. Cutting Edge: NF-KB Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. **The Journal of Immunology**. v. 183, n. 2, p. 787-791, 2009.

BEARE NA, HARDING SP, TAYLOR TE, LEWALLEN S, MOLYNEUX ME. Perfusion abnormalities in children with cerebral malaria and malarial retinopathy. **J Infect Dis**. Jan 15;199(2):263-71, 2009.

BEIER, J. C.; BEIER, M. S.; VAUGHAN, J. A.; PUMPUNI, C. B.; DAVIS, J. R.; NODEN, B. H. Sporozoite transmission by Anopheles freeborni and Anopheles gambiae experimentally infected with Plasmodium falciparum. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 8, n. 4, p. 404-408, 1992.

BELNOUE E, POTTER SM, ROSA DS, MAUDUIT M, GRÜNER AC, KAYIBANDA M, MITCHELL AJ, HUNT NH, RÉNIA L. Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. **Parasite Immunol**. Oct;30(10):544-53, 2008.

BERENDT AR, SIMMONS DL, TANSEY J, NEWBOLD CI, MARSH K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. **Nature**. Sep 7;341(6237):57-9, 1989.

BERKLEY, J.; MWARUMBA, S.; BRAMHAM, K.; LOWE, B.; MARSH, K. Bacteraemia complicating severe malaria in children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 93, n. 3, p. 283-286, 1999.

BOYDEN ED, DIETRICH WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. **Nat Genet**. Feb;38(2):240-4, 2006.

BRASIL P, ZALIS MG, DE PINA-COSTA A, SIQUEIRA AM, JÚNIOR CB, SILVA S, AREAS ALL, PELAJO-MACHADO M, DE ALVARENGA DAM, DA SILVA SANTELLI ACF, ALBUQUERQUE HG, CRAVO P, SANTOS DE ABREU FV, PETERKA CL, ZANINI GM, SUÁREZ MUTIS MC, PISSINATTI A, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, DE BRITO CFA, DE FÁTIMA FERREIRA-DA-CRUZ M, CULLETON R, DANIEL-RIBEIRO CT. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**. Oct;5(10):e1038-e1046, 2017.

BROWN H, TURNER G, ROGERSON S, TEMBO M, MWENECHANYA J, MOLYNEUX M, TAYLOR T. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. **J Infect Dis**. Nov;180(5):1742-6, 1999.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**. v. 16, n. 7, p. 407-420, 2016.

CHAN FK, LUZ NF, MORIWAKI K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. **Annu Rev Immunol**. 2015;33:79-106, 2015.

CHUN HJ, ZHENG L, AHMAD M, WANG J, SPEIRS CK, SIEGEL RM, DALE JK, PUCK J, DAVIS J, HALL CG, SKODA-SMITH S, ATKINSON TP, STRAUS SE, LENARDO MJ. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. **Nature**. Sep 26;419(6905):395-9, 2002.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**. v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: Biology and Disease. **Cell**. v. 167, n. 3, p. 610-624, 2016.

DEL PORTILLO, H. A.; FERRER, M.; BRUGAT, T.; MARTIN-JAULAR, L.; LANGHORNE, J.; LACERDA, M. V. G. The role of the spleen in malaria. **Cellular Microbiology**. v. 14, n. 3, p. 343-355, 2012.

DELANEY AA, BERRY CT, CHRISTIAN DA, HART A, BJANES E, WYNOSKY-DOLFI MA, LI X, TUMMERS B, UDALOVA IA, CHEN YH, HERSHBERG U, FREEDMAN BD, HUNTER CA, BRODSKY IE. Caspase-8 promotes c-Rel-dependent inflammatory cytokine expression and resistance against *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Jun 11;116(24):11926-11935, 2019.

DOBIN A, DAVIS CA, SCHLESINGER F, DRENKOW J, ZALESKI C, JHA S, BATUT P, CHAISSON M, GINGERAS TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**. Jan 1;29(1):15-21, 2013.

DONDELINGER Y, DECLERCQ W, MONTESSUIT S, ROELANDT R, GONCALVES A, BRUGGEMAN I, HULPIAU P, WEBER K, SEHON CA, MARQUIS RW, BERTIN J, GOUGH PJ, SAVVIDES S, MARTINOUC JC, BERTRAND MJ, VANDENABEELE P. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. **Cell Rep**. May 22;7(4):971-81, 2014.

DOSTERT, C.; GUARDA, G.; ROMERO. J. F.; MENU, P.; GROSS, O.; TARDIVEL, A.; SUVA, M. L.; STEHLE, J. C.; KOPF, M.; STAMENKOVIC, I.; CORRADIN, G.; TSCHOPP, J. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. **PLoS ONE**. v. 4, n. 9, e6510, 2009.

ENGWERDA C, BELNOUE E, GRÜNER AC, RÉNIA L. Experimental models of cerebral malaria. **Curr Top Microbiol Immunol**. 297:103-43, 2005.

FRANCHI L, AMER A, BODY-MALAPEL M, KANNEGANTI TD, OZÖREN N, JAGIRDAR R, INOHARA N, VANDENABEELE P, BERTIN J, COYLE A, GRANT EP,

NÚÑEZ G. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. **Nat Immunol.** Jun;7(6):576-82, 2006.

FRANKLIN, B. S.; PARROCHE, P.; ATAÍDE, M. A.; LAUW, F.; ROPERT, C.; DE OLIVEIRA, R. B.; PEREIRA, D.; TADA, M. S.; NOGUEIRA, P.; DA SILVA, L. H. P.; BJORKBACKA, H.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 106, n. 14, p. 5789-5794, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; KALANTARI, P.; FITZGERALD, K. A.; GOLENBOCK, D. T. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology.** v. 14, n. 11, p. 744-757, 2014.

GETHING, P. W.; ELYAZAR, I. R. F.; MOYES, C. L.; SMITH, D. L.; BATTLE, K. E.; GUERRA, C. A.; PATIL, A. P.; TATEM, A. J.; HOWES, R. E.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; HORBY, P.; WERTHEIM, H. F. L.; PRICE, R. N.; MÜELLER, I.; BAIRD, J. K. A Long Neglected World Malaria Map: Plasmodium vivax Endemicity in 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** v. 8, n. 9, e1814, 2012.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine.** v. 21, n. 7, p. 677-687, 2015.

HAQUE A, BEST SE, UNOSSON K, AMANTE FH, DE LABASTIDA F, ANSTEY NM, KARUPIAH G, SMYTH MJ, HEATH WR, ENGWERDA CR. Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. **J Immunol.** Jun 1;186(11):6148-56, 2011.

HE S, LIANG Y, SHAO F, WANG X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Dec 13;108(50):20054-9, 2011.

HE S, WANG L, MIAO L, WANG T, DU F, ZHAO L, WANG X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. **Cell.** Jun 12;137(6):1100-11, 2009.

HE, W.; WAN, H.; HU, L.; CHEN, P.; WANG, X.; HUANG, Z.; YANG, Z.; ZHONG, C.; HAN, J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Research.** v. 25, n. 12, p. 1285-1298, 2015.

HIRAKO IC, ATAIDE MA, FAUSTINO L, ASSIS PA, SORENSEN EW, UETA H, ARAÚJO NM, MENEZES GB, LUSTER AD, GAZZINELLI RT. Splenic differentiation and emergence of CCR5⁺CXCL9⁺CXCL10⁺ monocyte-derived dendritic cells in the brain during cerebral malaria. **Nat Commun.** Nov 3;7:13277, 2016.

HIRAKO, I. C.; GALLEGO-MARIN, C.; ATAIDE, M. A.; ANDRADE, W. A.; GRAVINA, H.; ROCHA, B. C.; DE OLIVEIRA, R. B.; PEREIRA, D. B.; NIVETZ, J.; DIAMOND, B.; RAM, S.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. DNA-Containing immunocomplexes promote inflammasome assembly and release of pyrogenic cytokines by CD14⁺ CD16⁺ CD64^{high} CD32^{low} inflammatory monocytes from malaria patients. **mBio.** v. 6, n. 6, e01605-15, 2015.

HOSHINO K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **J Immunol.** v. 162, n. 7, p. 3749-3752, 1999.

IDRO R, MARSH K, JOHN CC, NEWTON CR. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. **Pediatr Res.** 68(4):267-274, 2010.

JIN T, PERRY A, JIANG J, SMITH P, CURRY JA, UNTERHOLZNER L, JIANG Z, HORVATH G, RATHINAM VA, JOHNSTONE RW, HORNUNG V, LATZ E, BOWIE AG, FITZGERALD KA, XIAO TS. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. **Immunity.** Apr 20;36(4):561-71, 2012.

KAISER WJ, UPTON JW, LONG AB, LIVINGSTON-ROSANOFF D, DALEY-BAUER LP, HAKEM R, CASPARY T, MOCARSKI ES. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. **Nature.** Mar 17;471(7338):368-72, 2011.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology.** v. 21, n. 4, p. 317-337, 2009.

KAYAGAKI, N.; STOWE, I. B.; LEE, B. L.; O'ROURKE, K.; ANDERSON, K.; WARMING, S.; CUELLAR, T.; HALEY, B.; ROOSE-GIRMA, M.; PHUNG, Q. T.; LIU, P. S.; LILL, J. R.; LI, H.; WU, J.; KUMMERFELD, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; SNIPAS, S. J.; SALVESEN, G. S.; MORRIS, L. X.; FITZGERALD, L.; ZHANG, Y.; BERTRAM, E. M.; GOODNOW, C. C.; DIXIT, V. M. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature.** v. 526, n. 7575, p. 666-671, 2015.

KAYAGAKI, N.; WARMING, S.; LAMKANFI, M.; WALLE, L. V.; LOUIE, S.; DONG, J.; NEWTON, K.; QU, Y.; LIU, J.; HELDENS, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; DIXIT, V. M. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature.** v. 4379, n.7371, p. 117-121, 2011.

KAYAGAKI, N.; WONG, M. T.; STOWE, I. B.; RAMANI, S. R.; GONZALEZ, L. C.; AKASHI-TAKAMURA, S.; MIYAKE, K.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; MUSZYNSKI, A.; FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W.; DIXIT, V. M. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. **Science.** v. 341, n. 6151, p. 1246-1249, 2013.

KETELUT-CARNEIRO N, GHOSH S, LEVITZ SM, FITZGERALD KA, DA SILVA JS. A Dectin-1-Caspase-8 Pathway Licenses Canonical Caspase-1 Inflammasome Activation and Interleukin-1 β Release in Response to a Pathogenic Fungus. **J Infect Dis.** Jan 4;217(2):329-339, 2018.

KORDES M, MATUSCHEWSKI K, HAFALLA JC. Caspase-1 activation of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 is dispensable for induction of experimental cerebral malaria. **Infect Immun.** Sep;79(9):3633-41, 2011.

KRAEMER SM, SMITH JD. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. **Curr Opin Microbiol.** Aug;9(4):374-80, 2006.

KRISHNEGOWDA G, HAJJAR AM, ZHU J, DOUGLASS EJ, UEMATSU S, AKIRA S, WOODS AS, GOWDA DC. 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**. Mar 4;280(9):8606-16, 2005.

KRUEGER A, BAUMANN S, KRAMMER PH, KIRCHHOFF S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. **Mol Cell Biol**. Dec;21(24):8247-54, 2001.

KRUIDERING M, EVAN GI. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? **IUBMB Life**. Aug;50(2):85-90, 2000.

KWIATKOWSKI D, HILL AV, SAMBOU I, TWUMASI P, CASTRACANE J, MANOGUE KR, CERAMI A, BREWSTER DR, GREENWOOD BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Lancet**. Nov 17;336(8725):1201-4, 1990.

KWIATKOWSKI D, MOLYNEUX ME, STEPHENS S, CURTIS N, KLEIN N, POINTAIRE P, SMIT M, ALLAN R, BREWSTER DR, GRAU GE, ET AL. Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. **Q J Med**. Feb;86(2):91-8, 1993.

LACKNER P, BURGER C, PFALLER K, HEUSSLER V, HELBOK R, MORANDELL M, BROESSNER G, TANNICH E, SCHMUTZHARD E, BEER R. Apoptosis in experimental cerebral malaria: spatial profile of cleaved caspase-3 and ultrastructural alterations in different disease stages. **Neuropathol Appl Neurobiol**. Oct;33(5):560-71, 2007.

LEMMERS B, SALMENA L, BIDÈRE N, SU H, MATYSIAK-ZABLOCKI E, MURAKAMI K, OHASHI PS, JURISICOVA A, LENARDO M, HAKEM R, HAKEM A. Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling. **J Biol Chem**. Mar 9;282(10):7416-23, 2007.

LI H, ZHU H, XU CJ, YUAN J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**. Aug 21;94(4):491-501, 1998.

LIU, X.; ZHANG, Z.; RUAN, J.; PAN, Y.; MAGUPALLI, V. G.; WU, H.; LIEBERMAN, J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**. v. 535, n. 7610, p. 153-158, 2016.

LYKE KE, BURGESS R, CISSOKO Y, SANGARE L, DAO M, DIARRA I, KONE A, HARLEY R, PLOWE CV, DOUMBO OK, SZTEIN MB. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. **Infect Immun**. Oct;72(10):5630-7, 2004.

MABEY, D. C. W.; BROWN, A.; GREENWOOD, B. M. *Plasmodium falciparum* Malaria and Salmonella Infections in Gambian Children. **Journal of Infectious Diseases**. v. 155, n. 6, p. 1319-1321, 1987.

MAN SM, TOURLMOUSIS P, HOPKINS L, MONIE TP, FITZGERALD KA, BRYANT CE. Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1 β production. **J Immunol**. Nov 15;191(10):5239-46, 2013.

MARK KS, MILLER DW. Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. **Life Sci**. 64(21):1941-53, 1999.

MARTIN DA, SIEGEL RM, ZHENG L, LENARDO MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. **J Biol Chem**. Feb 20;273(8):4345-9, 1998.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . **Molecular Cell**. v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.

MATUSCHEWSKI, K. Getting infectious: Formation and maturation of plasmodium sporozoites in the Anopheles vector. **Cellular Microbiology**. v. 8, n. 10, p. 1547-1556, 2006.

MCILROY D, SAKAHIRA H, TALANIAN RV, NAGATA S. Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. **Oncogene**. Aug 5;18(31):4401-8, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Boletim Epidemiológico – Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Número Especial, novembro 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C. R.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRIGUEZ, A. Migration of Plasmodium Sporozoites through Cells before Infection. **Science**. v. 291, p. 5501, p. 141-144. 2001.

MULLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 9, n. 9, p. 555-566, 2009.

PANDEY, A. V.; BABBARWAL, V. K.; OKOYEH, J. N.; JOSHI, R. M.; PURI, S. K.; SINGH, R. L.; CHAUHAN, V. S. Hemozoin formation in malaria: A two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 308, n. 4, p. 736-743, 2003.

PARROCHE, P.; LAUW, F. N.; GOUTAGNY, N.; LATZ, E.; MONKS, B. G.; VISINTIN, A.; HALMEN, K. A.; LAMPHIER, M.; OLIVIER, M.; BARTHOLOMEU, D. C.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like

receptor 9. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, n. 6, p. 1919-1924, 2007.

PICHYANGKUL, S.; SAENGKRAI, P.; WEBSTER, H. K. Plasmodium falciparum pigment induces monocytes to release high levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 51, n. 4, p. 430-435, 1994.

POTTER S, CHAN-LING T, BALL HJ, MANSOUR H, MITCHELL A, MALUISH L, HUNT NH. Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. **Int J Parasitol**. Apr;36(4):485-96, 2006.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: The Plasmodium liver stage. **Nature Reviews Microbiology**. v. 4, n. 11, p. 849-856, 2006.

PUNSAWAD C, MANEERAT Y, CHAISRI U, NANTAVISAI K, VIRIYAVEJAKUL P. Nuclear factor kappa B modulates apoptosis in the brain endothelial cells and intravascular leukocytes of fatal cerebral malaria. **Malar J**. Jul 26;12:260, 2013.

RADU M, CHERNOFF J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. **J Vis Exp**. Mar 16;(73):e50062, 2013.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**. v. 71, n. 1, p. 635-700, 2002.

RATHINAM, V. A. K.; VANAJA, S. K.; WAGGONER, L.; SOKOLOVSKA, A.; BECKER, C.; STUART, L. M.; LEONG, J. M.; FITZGERALD, K. A. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. **Cell**. v. 150, n. 3, p. 606-619, 2012.

REIMER T, SHAW MH, FRANCHI L, COBAN C, ISHII KJ, AKIRA S, HORII T, RODRIGUEZ A, NÚÑEZ G. Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome. **Eur J Immunol**. Mar;40(3):764-9, 2010.

SBORGI, L.; RÜHL, S.; MULVIHILL, E.; PIPERCEVIC, J.; HEILIG, R.; STAHLBERG, H.; FARADY, C. J.; MÜLLER, D. J.; BROZ, P.; HILLER, S. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. **The EMBO Journal**. v. 35, n. 16, p. 1766-1778, 2016.

SCOTT, J. A. G.; BERKLEY, J. A.; MWANGI, I.; OCHOLA, L.; UYOGA, S.; MACHARIA, A.; SDILA, C.; LOWE, B. S.; MWARUMBA, S.; BAUNI, E.; MARSH, K; WILLIAMS, T. N. Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: A population-based, case-control study and a longitudinal study. **The Lancet**. v. 378, n. 9799, p. 1316-1323, 2011.

SEDEGAH, M.; FINKELMAN, F.; HOFFMAN, S. L. Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, n. 22, p. 10700-10702, 1994.

SHALINI, S.; DORSTYN, L.; DAWAR, S.; KUMAR, S. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death and Differentiation**. v. 22, n. 4, p. 526-539, 2015.

SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **Journal of Cell Biology**. v. 213, n. 6, p. 617-629, 2016.

SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, K.; SHI, X.; WANG, Y.; HUANG, H.; ZHUANG, Y.; CAI, T.; WANG, F.; SHAO, F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**. v. 526, n. 7575, p. 660-665, 2015.

SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; GAO, W.; DING, J.; LI, P.; HU, L.; SHAO, F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**. v. 514, n. 7521, p. 187-192, 2014.

SINGH B, KIM SUNG L, MATUSOP A, RADHAKRISHNAN A, SHAMSUL SS, COX-SINGH J, THOMAS A, CONWAY DJ. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. **Lancet**. Mar 27;363(9414):1017-24, 2004.

STENNICKE HR, JÜRGENSMEIER JM, SHIN H, DEVERAUX Q, WOLF BB, YANG X, ZHOU Q, ELLERBY HM, ELLERBY LM, BREDESEN D, GREEN DR, REED JC, FROELICH CJ, SALVESEN GS. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. **J Biol Chem**. Oct 16;273(42):27084-90, 1998.

STEVENSON, M. M.; TAM, M. F.; WOLF, S. F.; SHER, A. IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. **J Immunol**. v. 155, n. 5, p. 2545-2556, 1995.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**. v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.

SU H, BIDÈRE N, ZHENG L, CUBRE A, SAKAI K, DALE J, SALMENA L, HAKEM R, STRAUS S, LENARDO M. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. **Science**. Mar 4;307(5714):1465-8, 2005.

TACHADO SD, GEROLD P, MCCONVILLE MJ, BALDWIN T, QUILICI D, SCHWARZ RT, SCHOFIELD L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. **J Immunol**. Mar 1;156(5):1897-1907, 1996.

TANGPUKDEE, N.; DUANGDEE, C.; WILAIRATANA, P.; KRUDSOOD, S. Malaria diagnosis: a brief review. **The Korean journal of parasitology**. v. 47, n. 2, p. 93-102, 2009.

TERKELTAUB R, SUNDY JS, SCHUMACHER HR, MURPHY F, BOOKBINDER S, BIEDERMANN S, WU R, MELLIS S, RADIN A. The interleukin 1 inhibitor riloncept in treatment of chronic gouty arthritis: results of a placebo-controlled, monosequence

crossover, non-randomised, single-blind pilot study. **Ann Rheum Dis.** Oct;68(10):1613-7, 2009.

TRAMPUZ, A.; JEREB, M.; MUZLOVIC, I.; PRABHU, R. M. Clinical review: Severe malaria. **Critical care (London, England)**. v. 7, n. 4, p. 315-323, 2003.

TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, PERTEA G, KIM D, KELLEY DR, PIMENTEL H, SALZBERG SL, RINN JL, PACHTER L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat Protoc.** Mar 1;7(3):562-78, 2012.

TUMMERS B, GREEN DR. Caspase-8: regulating life and death. **Immunol Rev.** May;277(1):76-89, 2017.

VAN HENSBROEK MB, PALMER A, ONYIORAH E, SCHNEIDER G, JAFFAR S, DOLAN G, MEMMING H, FRENKEL J, ENWERE G, BENNETT S, KWIATKOWSKI D, GREENWOOD B. The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. **J Infect Dis.** Nov;174(5):1091-7, 1996.

VIGANÒ, E.; DIAMOND, C. E.; SPREAFICO, R.; BALACHANDER, A.; SOBOTA, R. M.; MORTELLARO, A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. **Nature Communications**. v. 6, n. 8761, 2015.

WERE, T.; DAVENPORT, G. C.; HITTNER, J. B.; OUMA, C.; VULULE, J. M.; ONG'ECHA, J. M.; PERKINS, D. J. Bacteremia in Kenyan children presenting with malária. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 2, p. 671-676, 2011.

WHO, Severe malaria. **Trop Med Int Health**. World Health Organization, Sep;19 Suppl 1:7-131, 2014.

WHO. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd Edition. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 2015.

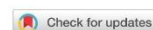
WHO. World malaria report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020.

YAGNIK DR, HILLYER P, MARSHALL D, SMYTHE CD, KRAUSZ T, HASKARD DO, LANDIS RC. Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages. Implications for the control of joint inflammation in gout. **Arthritis Rheum.** Aug;43(8):1779-89, 2000.

8. APÊNDICE – Artigo publicado



ARTICLE


<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18295-x>

OPEN

Caspase-8 mediates inflammation and disease in rodent malaria

Larissa M. N. Pereira^{1,2,3,7}, Patrícia A. Assis^{3,7}, Natalia M. de Araújo^{1,2}, Danielle F. Durso³, Caroline Junqueira¹, Marco Antônio Ataíde^{1,2}, Dhelio B. Pereira⁴, Egil Lien³, Katherine A. Fitzgerald³, Dario S. Zamboni⁵, Douglas T. Golenbock^{1,3} & Ricardo T. Gazzinelli^{1,2,3,6}✉

Earlier studies indicate that either the canonical or non-canonical pathways of inflammasome activation have a limited role on malaria pathogenesis. Here, we report that caspase-8 is a central mediator of systemic inflammation, septic shock in the *Plasmodium chabaudi*-infected mice and the *P. berghei*-induced experimental cerebral malaria (ECM). Importantly, our results indicate that the combined deficiencies of caspases-8/1/11 or caspase-8/gasdermin-D (GSDM-D) renders mice impaired to produce both TNF α and IL-1 β and highly resistant to lethality in these models, disclosing a complementary, but independent role of caspase-8 and caspases-1/11/GSDM-D in the pathogenesis of malaria. Further, we find that monocytes from malaria patients express active caspases-1, -4 and -8 suggesting that these inflammatory caspases may also play a role in the pathogenesis of human disease.

¹Instituto Rene Rachou, FIOCRUZ-MG, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil. ²Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. ³Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA. ⁴Centro de Pesquisas em Medicina Tropical, FIOCRUZ-RO, Porto Velho, RO 76812-329, Brazil. ⁵Departamento de Biologia Celular Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil. ⁶Plataforma de Medicina Translacional, Fundação Oswaldo Cruz/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil. ⁷These authors contributed equally: Larissa M. N. Pereira, Patrícia A. Assis. ✉email: ricardo.gazzinelli@umassmed.edu

Malaria is a major public health problem in >90 countries, and according to the World Health Organization affects >200 million people and kills over 400,000 children each year. The rupture of parasitized red blood cells (RBCs) release pathogen and danger-associated molecular patterns such as DNA, RNA, hemozoin and glycosylphosphatidylinositol (GPI), and uric acid¹ that activate Toll-like receptors (TLRs)^{2,3}, Nod-like receptors (NLRs)^{4–7}, and the cyclic GMP–AMP (cGAS) synthase⁸. The activation of pattern-recognition receptors leads to inflammatory priming and secretion of pyrogenic cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF α) that are responsible for signs of disease, such as high fever, chills, and rigors. Malaria priming also leads to an exquisite sensitivity to secondary bacterial infection, in particular non-typhoidal salmonellosis, that often associates with severe disease^{9–12}. Hence, a better understanding of the mechanisms that arm the innate immune cells to overreact during malaria is critical for the clinical management and prevention of severe disease.

IL-1 β processing and release are tightly controlled. After translation, a pro-IL-1 β inactive protein is cleaved by caspase-1 that is activated in an inflammasome-dependent process¹³. Inflammasomes are multiprotein complexes assembled by the oligomerization of NLRs and AIM2. The activation of caspase-1 requires an inflammasome assembly that is under the control of two signaling checkpoints. First, TLR signaling leads to enhanced transcription of inflammasome components, pro-caspase-1 and pro-IL-1 β genes^{14,15}. Then, a second signal triggered by NLRs or AIM2 activation promotes inflammasome assembly¹⁶. This second signal is induced by many stimuli, including DNA for AIM2, urate crystal, ATP, oxygen reactive, as well as microbial infections that activate NLRP3^{16,17}.

When challenged in vitro with hemozoin, monocytes release IL-1 β dependent on inflammasome and caspase-1 activation^{4,5}. Importantly, it was demonstrated that hemozoin binds to *P. falciparum* nucleic acids and traffics into the lysosomal compartment and the cytosol of host cells, where parasite DNA activates TLR9⁶. Furthermore, it was demonstrated that monocytes from febrile malaria patients express high levels of NLRP3, NLRP12, and AIM2 inflammasome specks, as well as active caspase-1^{18,19}. While experimental cerebral malaria (ECM) develops in an inflammasome-independent manner, caspase-1 activation mediates hypersensitivity to endotoxin or superinfection with *Salmonella typhimurium*, and this is attenuated in *P. chabaudi*-infected NLRP3, NLRP12, or ASC knockout mice¹⁸.

A noncanonical inflammasome pathway that regulates IL-1 β production was also described^{20,21}. Caspase-11 in mice and the homolog caspase-4 in humans lead to the processing of pro-IL-1 β and promotes the pyroptosis by gasdermin-D (GSDM-D) cleavage, independent of inflammasome activation^{22,23}. The N-terminal product of GSDM-D binds to lipid and oligomerizes in cell membranes to form pores²⁴. Then, these pores promote Ca²⁺ imbalance, the pyroptosis, and IL-1 β release, as a consequence^{25,26}. Yet another member of this family of proteases that plays an essential role in programmed cell death, caspase-8, has recently been shown to promote NF- κ B activation and induce the synthesis of pro-IL-1 β ^{27–29}. The role of Caspase-8 on IL-1 β release seems to be more complex as it is also involved in GSDM-D cleavage³⁰. However, their role in malaria pathogenesis has not been addressed.

Here, we demonstrate that in vivo *Plasmodium* infection is sufficient to activate caspases-11 (or caspase-4) and 8, both in *Plasmodium*-infected mice and malaria patients. Our awards indicate that while caspase-11 is dispensable, both caspase-1 and caspase-8 are important mediators of IL-1 β and TNF α secretion, hypersensitivity to septic shock as well as the development of ECM.

Results

Expression and activation of caspase-11 in *P. chabaudi* infection. *Plasmodium* infection induces pro-inflammatory priming leading to hypersusceptibility to septic shock. To study the importance of this pro-inflammatory priming on malaria pathogenesis, we used a low-dose Lipopolysaccharide (LPS) challenge in *Pc*-infected mice^{18,31,32}. Previous studies demonstrate that in Gram-negative bacterial infection, caspase-11 is involved in caspase-1 activation upstream of inflammasome²¹. The immunoblot using splenocytes reveals that pro-caspase-11 (p43 and p38 subunits) is induced in *Pc*-infected C57BL/6 mice. The cleaved subunit of caspase-11 (p30) was found in the splenocyte supernatants. As expected, we did not find caspase-11 in samples from 129S6 (caspase-11 mutant mice), *Casp11*^{−/−}, and *Casp11*¹¹^{−/−} mice (Fig. 1a). Splenocytes from *Casp1*^{−/−}/*11*¹⁸ mice showed regular induction and activation of caspase-11, indicating that cleavage of caspase-11 does not require caspase-1 (Fig. 1b). We also performed an immunoblot developed with an anti-caspase-1 antibody in splenocyte lysates from *Casp11*^{−/−} mice. We found the p35 caspase-1 subunit in splenocytes from *Pc*-infected mice, indicating that caspase-1 is cleaved by a caspase-11-independent mechanism (Fig. 1c)³³.

Expression of caspase-11 is dependent on IFN γ and NAS-TLRs.

Different studies also demonstrate that pro-caspase-11 is induced by Type I IFN as well as TLR agonists, such as LPS, Poly I:C, or Pam3CSK4^{34–37}. Priming with TLR agonists or IFNs induces pro-caspase-11 expression, but require a second challenge with LPS to activate caspase-11. In these models, LPS-induced lethality does not require Toll-like receptor 4 (TLR4)^{34,35}. We found that the induction of pro-caspase-11 and cleavage of p30 caspase-11 subunit in splenocytes from *Pc*-infected was independent of TLR4 (Supplementary Fig. 1a). However, the high levels of circulating IL-1 β and IL-1 β produced by splenocytes from infected *TLR4*^{−/−} mice stimulated with LPS were very low when compared to infected C57BL/6 mice (Supplementary Fig. 1b). When we evaluated splenic CD11b⁺ cells from infected *TLR4*^{−/−} mice challenged with LPS, we observed lower intracellular levels of pro-IL-1 β in *TLR4*^{−/−} than in C57BL/6 mice (Supplementary Fig. 1c). Furthermore, infected *TLR4*^{−/−} mice were resistant to LPS challenge (Supplementary Fig. 1d).

Plasmodium is a potent activator of TLR7, TLR9, and other cytosolic receptors that sense nucleic acids^{2,6,31,38–40}. In addition, IFN-priming of innate immune cells is a hallmark of both human and murine malaria^{32,39,40}. Hence, we investigated the levels of caspase-11 in mice lacking functional NAS-TLRs, IFN γ (*Ifng*), or IFN α/β receptor (*Ifnar1*) genes. Consistent with previous studies^{35–37,41}, we found that both IFN γ and Type I IFNs are key cytokine-priming differentiated monocytes for caspase-11 expression. The results presented in Supplementary Fig. 2a show that in vitro, IFN γ , and IFN Type I are sufficient to induce caspase-11 expression, and that caspase-11 p30 subunit is only detected when bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were stimulated with iRBC. Expression of caspase-11 and its active form was not affected in total splenocytes from single *TLR3*^{−/−}, *TLR7*^{−/−}, and *TLR9*-deficient mice infected with *Pc* (Supplementary Fig. 2b–d). Nevertheless, we found that the expression of pro-caspase-11 was highly impaired in splenocytes from *Pc*-infected *TLR3/7/9*^{−/−}, *Ifng*^{−/−}, or *Ifnar1*^{−/−} mice (Fig. 1d). Expression of pro-caspase-1 was not impaired, whereas cleavage and generation of active caspase-1 were affected in total splenocytes from *Pc*-infected *Ifng*^{−/−}, but not *Ifnar1*^{−/−} mice (Fig. 1e).

Caspase-1 has a dominant role in mediating IL-1 β release in *Pc* infection. A high proportion of circulating monocytes become

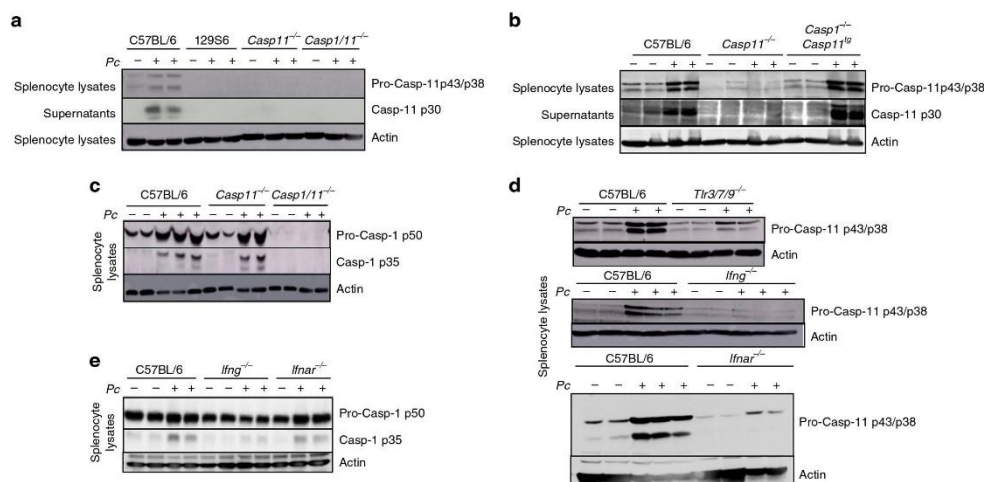


Fig. 1 Caspase-11 activation in *P. chabaudi*-infected mice. All results presented in this figure were obtained from mice either uninfected or at 8 days after infection with *Pc*, as indicated. **a, b** Splenocyte lysates and supernatants were obtained from C57BL/6, 129S6, *Casp11*^{-/-}, *Casp1/11*^{-/-}, and *Casp1*^{-/-}/*11*^g mice, and analyzed by western blot using an anti-caspase-11 antibody. **c** Splenocyte lysates from C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, and *Casp1/11*^{-/-} mice were analyzed by western blot using an anti-caspase-1 antibody. **d** Splenocyte lysates obtained from C57BL/6, *Tlr3/7/9*^{-/-}, *Ifng*^{-/-}, and *Ifnar*^{-/-} mice were analyzed by western blot using an anti-caspase-1 antibody. **e** Splenocyte lysates were obtained from C57BL/6, *Ifng*^{-/-}, and *Ifnar*^{-/-} mice and analyzed by western blot using an anti-β-actin were used as loading controls. All blots are representative of two to three different experiments with similar results.

activated during malaria^{18,42,43}. In rodent malaria, most splenic monocytes differentiate into inflammatory monocytes (iMOs, CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁻MHC II⁻), and monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs, CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁺MHC II⁺)⁴⁴ and the differentiated cells are the main source of active caspase-1 and IL-1β at 8 days post infection with *Pc*¹⁸. To investigate whether expression of pro-IL-1β is affected in *Casp11*^{-/-} or *Casp1/11*^{-/-} mice, we performed intracellular staining for IL-1β in iMOs and MO-DCs from spleens of control and *Pc*-infected mice, before and 2 h after LPS challenge (Supplementary Fig. 3 and Fig. 2a). We found the similar intensity of fluorescence of IL-1β in cells from either infected C57BL/6, *Casp11*^{-/-}, or *Casp1/11*^{-/-} mice. We then assessed the role of caspase-11 on IL-1β. Lower levels of IL-1β were found in culture supernatants of LPS-stimulated splenocytes from infected *Casp11*^{-/-} mice when compared to infected C57BL/6 mice. However, the IL-1β levels in splenocytes from *Casp11*^{-/-} were significantly higher than those from *Casp1*^{-/-}/*11*^g or *Casp1/11*^{-/-} mice (Fig. 2b). In addition, when compared to infected C57BL/6 mice challenged with a low dose of LPS, lower levels of circulating IL-1β were observed in the plasma of infected *Casp1/11*^{-/-}, but not from *Casp11*^{-/-} mice (Fig. 2c). Hence, the *Casp1*^{-/-}/*11*^g phenocopied the *Casp1/11*^{-/-} and not the *Casp11*^{-/-} mice infected with *Pc*. The plasma IL-1β levels in both control and infected mice not challenged with LPS were below the limit of detection. Altogether, our results suggest that in *Pc*-infected mice challenged with low-dose LPS, the canonical pathway of caspase-1 activation has the predominant role in IL-1β release. Consistently, deficiency of caspase-1 and not caspase-11 resulted in a small, but the significant increment of resistance to the low-dose LPS challenge in *Pc*-primed mice (Fig. 2d). Furthermore, opposite to *Ifng*^{-/-} mice²⁴, the *Ifnar1*^{-/-} mice that are defective on caspase-11, but not on caspase-1 expression, were still highly susceptible to the low-dose LPS challenge (Fig. 2e).

GSDM-D is cleaved by caspase-11 and caspase-1, generating the p30 polypeptide, which polymerizes and forms pores in the cell surface membrane of activated monocyte/macrophages. The GSDM-D pores allow the release of IL-1β and also lead to pyroptosis^{22–24,45}. Consistent with the hypothesis of a dominant role of the canonical pathway of caspase-1 activation, *Pc*-infected *Gsdmd*^{-/-} mice phenocopied the *Casp1*^{-/-} rather than *Casp11*^{-/-} mice. Despite the severe impairment of IL-1β release (Fig. 2f), as observed in the *Casp1/11*^{-/-} and *Casp1*^{-/-} mice, the *Gsdmd*^{-/-} mice were only partially resistant to the low-dose LPS challenge (Fig. 2g).

Caspase-8 mediates IL-1β release in *Pc*-infected mice. The *Casp8*^{-/-} mice are not viable, but the viability is rescued in the double *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-} mice, suggesting that unregulated necroptosis is the main cause of embryonic lethality in the caspase-8-deficient mice. Therefore, we used *Ripk3*^{-/-} mice as controls. The results are shown in Fig. 3a (top panel) indicate that in vivo *Pc* infection leads to pro-caspase-8 expression (p55) and cleavage of caspase-8 (p18) in monocytes. These results were confirmed using a different anti-caspase-8 antibody that recognizes caspase-8 p43- and p18-cleaved polypeptides in CD11b⁺ cells Fig. 3a (bottom panel). The cleavage of caspase-8 was independent of both caspase-1 and caspase-11. In addition, our results show that caspase-8 is not necessary for cleavage of either caspase-1 or caspase-11 (Fig. 3b–d). Consistently, cleavage of caspase-8 was unimpaired in *Ifng*^{-/-} mice infected with *Pc* (Fig. 3e), which are defective on caspase-1 cleavage and caspase-11 expression.

Caspase-8 mediates TNFα-induced cell death and also promotes NF-κB activation and production of pro-inflammatory cytokines⁴⁶, including TNFα^{28,29}, which is an important biomarker of severe malaria^{47,48}. To evaluate the importance of TNFα on caspase-8 activation, we used mice

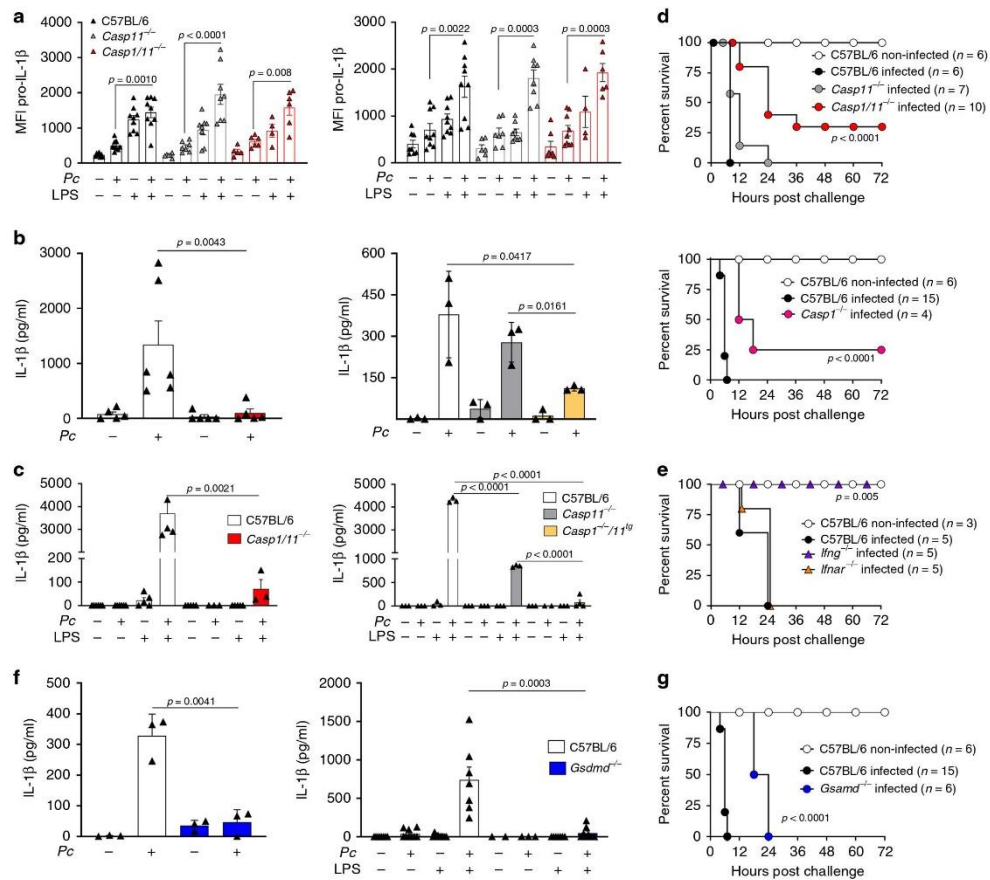


Fig. 2 Caspase-1-dependent release of IL-1β in Pc-infected mice challenged with LPS. **a** Splenocytes were stimulated with 1 μg/mL of LPS and used for intracellular pro-IL-1β staining by flow cytometry. The pro-IL-1β MFI quantification was assayed in live (live/dead⁺) monocytes (CD11b⁺F4/80⁺, left panel) and dendritic cells (CD11c⁺MHC II⁺, right panel). For MOs: C57BL/6 *n* = 9, *Casp1*^{-/-} (control *n* = 5, + LPS *n* = 4; infected *n* = 6), and *Casp1*^{-/-} (control *n* = 6, +LPS *n* = 8; infected *n* = 7, +LPS *n* = 8). For monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs): C57BL/6 *n* = 9, *Casp1*^{-/-} (control *n* = 7, +LPS *n* = 4; infected *n* = 9, +LPS *n* = 6), and *Casp1*^{-/-} (control *n* = 6, +LPS *n* = 8; infected *n* = 7, +LPS *n* = 8). **b** Splenocytes were stimulated in vitro with 1 μg/ml of LPS and 24 h later IL-1β measured by ELISA in supernatants. Left panel: C57BL/6 (control *n* = 5, infected *n* = 6) and *Casp1*^{-/-} (*n* = 5). Right panel: C57BL/6 (*n* = 3) and *Casp1*^{-/-} (*n* = 3). **c** Mice were inoculated intravenously with 10 μg/mice of LPS, and 8 h later, plasma was collected and circulating IL-1β measured by ELISA. Left panel: C57BL/6 (non-challenged *n* = 6, LPS-challenged *n* = 5) and *Casp1*^{-/-} (non-challenged *n* = 5, LPS-challenged *n* = 3). Right panel: *n* = 3 for all groups, except *Casp1*^{-/-}/*Irf3* (infected *n* = 2; infected +LPS *n* = 4). **d** C57BL/6, *Casp1*^{-/-}, *Casp1*^{-/-} (top panel), as well as C57BL/6 and *Casp1*^{-/-} (bottom panel) were inoculated intravenously with 10 μg/mouse of LPS, and survival followed for 72 h. **e** C57BL/6, *Irf3*^{-/-}, and *Irf3*^{-/-} were inoculated intravenously with 10 μg/mouse of LPS and survival followed for 72 h. **f**, left panel: Splenocytes were stimulated in vitro with LPS (1 μg/ml) and IL-1β measured by ELISA in 24 h supernatants. For all groups, *n* = 3. **f**, right panel: C57BL/6 and *Gsdmd*^{-/-} mice were inoculated i.v. with 10 μg/mouse of LPS and plasma collected to measure the levels of IL-1β at 8 h post-challenge. C57BL/6 (*n* = 9, except infected +LPS *n* = 7) and *Gsdmd*^{-/-} (control *n* = 2 and control +LPS *n* = 7; infected *n* = 3 and infected +LPS *n* = 8). **g** C57BL/6 and *Gsdmd*^{-/-} mice were challenged with 10 μg/mouse of LPS and followed for survival. In **a**, **b**, **c**, and **f**, mean ± s.e.m. of two-three different experiments are shown; statistical analysis by parametric or nonparametric *t* test and one-way ANOVA. Survival curves were analyzed by log-rank test.

deficient in the TNFp55 receptor gene *Tnfrsf1a* (here identified as *Tnfr*^{-/-}). Our results show that cleavage of caspase-8 was not observed in lysates from CD11b⁺ cells derived from the spleen of Pc-infected *Tnfr*^{-/-} mice (Fig. 3f). In contrast, expression and cleavage of either of caspase-1 or caspase-11 were not affected (Fig. 3f).

The results presented in Fig. 4a show that the levels of circulating IL-1β on *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-} or *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*Irf1*^{-/-} mice are very low when compared to C57BL/6 mice infected with Pc and challenged with low-dose LPS. Likewise, IL-1β release by splenocytes (Fig. 4b) and pro-IL-1β expression by CD11b⁺F4/80⁺ iMOs/MO-DC populations

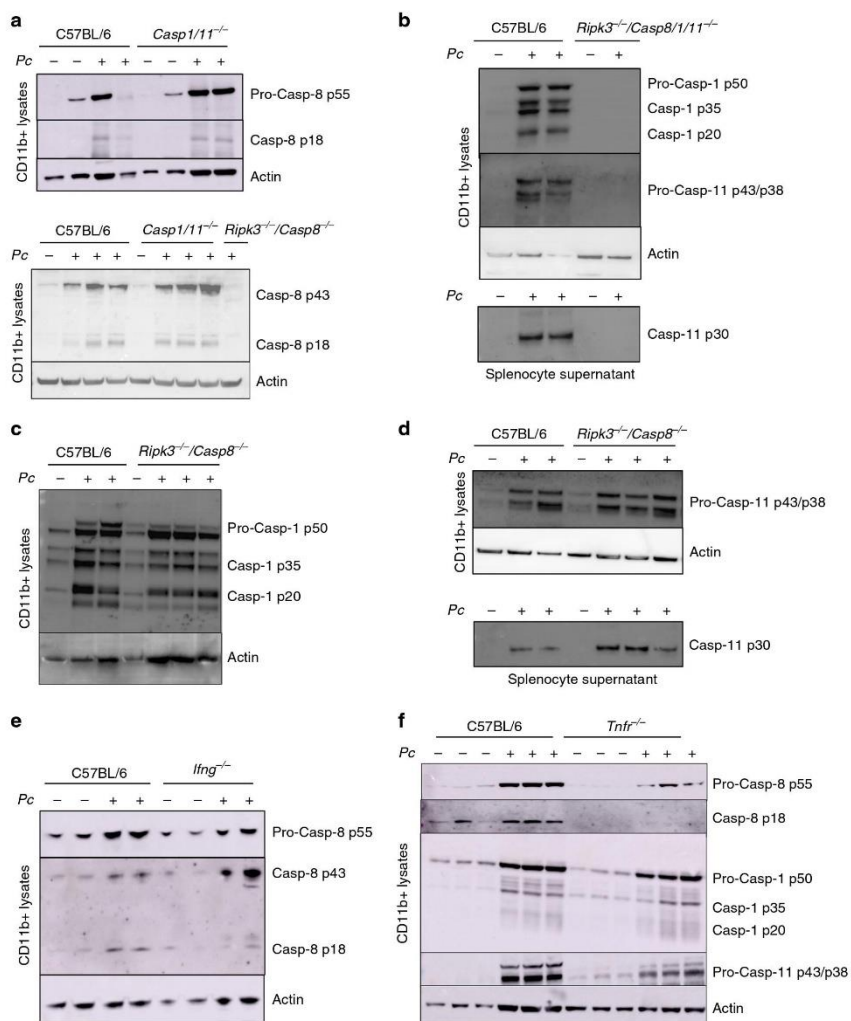


Fig. 3 Caspase-8 activation in *Pc*-infected mice. All results presented in this figure were obtained from mice either uninfected or at 8 days after infection with *Pc*. C57BL/6, *Casp1/11^{-/-}*, *Ripk3^{-/-}/Casp8^{-/-}*, *Ripk3^{-/-}/Casp8/1/11^{-/-}*, *Ifng^{-/-}*, and *Tnfr^{-/-}* mice were used in different experiments, as indicated. CD11b⁺ cells purified from splenocytes were lysed in RIPA buffer to prepare the lysates. Alternatively, splenocytes were spin down 400 × g for 5 min to prepare supernatants. Lysates from CD11b⁺ cells isolated from spleens of control and *Pc*-infected mice were analyzed by western blot using either **a** two distinct anti-caspase-8; **b** anti-caspase-1 and anti-caspase-11; **c** anti-caspase-11; **d** anti-caspase-11; and **e** anti-caspase-8 antibodies. **b**, **d** Alternatively, splenocyte supernatants were used to detect active caspase-11 (p30) by western blot using an anti-caspase-11 antibody. **f** Lysates of CD11b⁺ cells from uninfected and infected C57BL/6 and *Tnfr^{-/-}* mice were analyzed by western blot with anti-caspase-8, anti-caspase-1, and anti-caspase-11 antibodies. Blots revealed with anti-β-actin were used as loading controls. Blots are representative of two to three different experiments with similar results.

(Fig. 4c) from both *Pc*-infected *Ripk3^{-/-}/Casp8^{-/-}* and *Ripk3^{-/-}/Casp8/1/11^{-/-}* mice were impaired. As observed for IL-1β, TNFα production by splenocytes from *Pc*-infected mice was impaired in mice with various gene deficiencies (Fig. 4d). Consistently, the release of IL-1β was highly impaired in *Pc*-infected *Tnfr^{-/-}* mice, which are also resistant to LPS challenge (Supplementary Fig. 4a, b). Importantly, while the *Pc*-infected *Ripk3^{-/-}/Casp8^{-/-}* mice were only partially resistant,

the infected *Ripk3^{-/-}/Casp8/1/11^{-/-}* and *Ripk3^{-/-}/Casp8/Gsdmd^{-/-}* mice were highly resistant to the low-dose LPS-induced lethality (Fig. 4e). The results obtained from *Ripk3* single-knockout mice were identical to C57BL/6, showing that the deletion of this gene did not contribute to the phenotype observed in the double *Ripk3^{-/-}/Casp8^{-/-}* or the quadruple *Ripk3^{-/-}/Casp8/1/11^{-/-}*-deficient mice. These results also indicate a loop of amplification that involves TNFα induction by

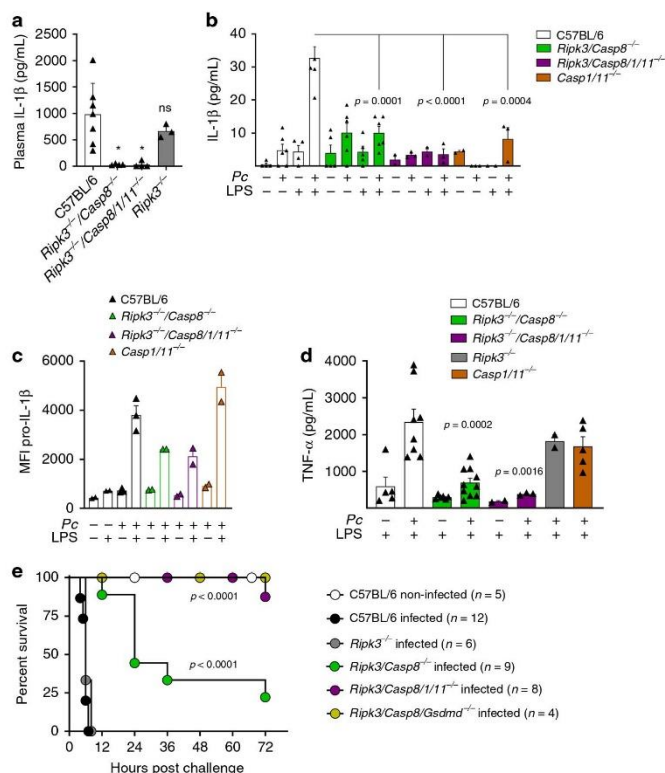


Fig. 4 Caspase-8-mediated IL-1 β release and lethality in Pc-infected mice challenged with LPS. All results presented in this figure were obtained from mice either uninfected or at 8 days after infection with Pc. C57BL/6, *Casp1/11*^{-/-}, *Ripk3*^{-/-}, *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}, *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*1/11*^{-/-}, and *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*Gsdmd*^{-/-}. **a** Uninfected and Pc-infected mice were inoculated intravenously with 10 μ g/mouse of LPS, and 8 h later plasma was collected to measure the levels of circulating IL-1 β . C57BL/6 ($n = 7$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-} ($n = 4$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*1/11*^{-/-} ($n = 4$), and *Ripk3*^{-/-} ($n = 3$). * $P = 0.01$. **b** Splenocytes from uninfected controls and Pc-infected mice were stimulated in vitro with 1 μ g/ml of LPS, and 24 h later the levels of IL-1 β measured in culture supernatants by ELISA. For uninfected mice: C57BL/6 ($n = 4$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-} ($n = 5$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*1/11*^{-/-}, and *Casp1/11*^{-/-} ($n = 2$). For infected mice: C57BL/6 and *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-} ($n = 6$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*1/11*^{-/-} ($n = 4$), and *Ripk3*^{-/-} ($n = 3$). **c** Splenocytes from uninfected and infected mice were stimulated with 1 μ g/mL of LPS, and 2 h later used for intracellular staining of pro-IL-1 β . The pro-IL-1 β quantification in live (live/dead⁻) monocytes (CD11b + F4/80 +) was performed by flow cytometry. For all groups: $n = 2$, except infected C57BL/6 ($n = 3$). **d** Splenocytes from uninfected controls and Pc-infected mice were stimulated in vitro with 1 μ g/ml of LPS, and 24 h later the levels of tumor necrosis factor (TNF) α measured in culture supernatants by ELISA. For uninfected mice: C57BL/6 ($n = 5$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-} ($n = 6$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*1/11*^{-/-} ($n = 2$). For infected mice: C57BL/6 ($n = 8$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-} ($n = 10$), *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*1/11*^{-/-} ($n = 3$), *Casp1/11*^{-/-} ($n = 5$), and *Ripk3*^{-/-} ($n = 2$). **e** Uninfected and Pc-infected mice were inoculated intravenously with 10 μ g/mouse of LPS and survival followed for 72 h. Mean \pm s.e.m of two to three different experiments are shown; statistical analysis by unpaired t test and one-way ANOVA. The survival curve was analyzed by log-rank test.

caspase-8, TNF α -induced caspase-8 cleavage, and consequent activation of IL-1 β . Hence, our results indicate that the deleterious role of caspase-8 in the hypersensitivity to septic shock in this malaria model may also involve the induction of TNF α expression.

A neuroinflammation gene signature in MO-DCs from *Pba*-infected mice. In our earlier studies, we found that MO-DCs are an important source of active caspase-1, IL-1 β and have a pathogenic role in ECM and acute respiratory distress syndrome in malaria (MA-ARDS) models^{18,44,49}. To address the importance of inflammatory caspases in ECM, RNA was extracted from MO-DCs (CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁺DC-Sign⁺MHC II⁺, purity >97%)

highly purified from spleens of control and infected mice (Supplementary Fig. 3). The MO-DCs were purified at day 5 post infection, since in this model, mice become very sick by days 6–7 post infection. The bar graph presented in Fig. 5a shows the main inflammatory pathways that were enriched in MO-DCs from *Pba*-infected mice. We found that three pathways were highly relevant to our study, i.e., maturation of dendritic cells, neuroinflammation signaling, and NF κ B signaling, which is promoted by caspase-8. Importantly, the connectivity diagram shows that both TNF α and IL-1 β genes were involved in all three pathways (Fig. 5b). In addition, we found that caspase-1, caspase-11, and caspase-8 genes were all upregulated in splenic MO-DCs from *Pba*-infected mice (Fig. 5c).

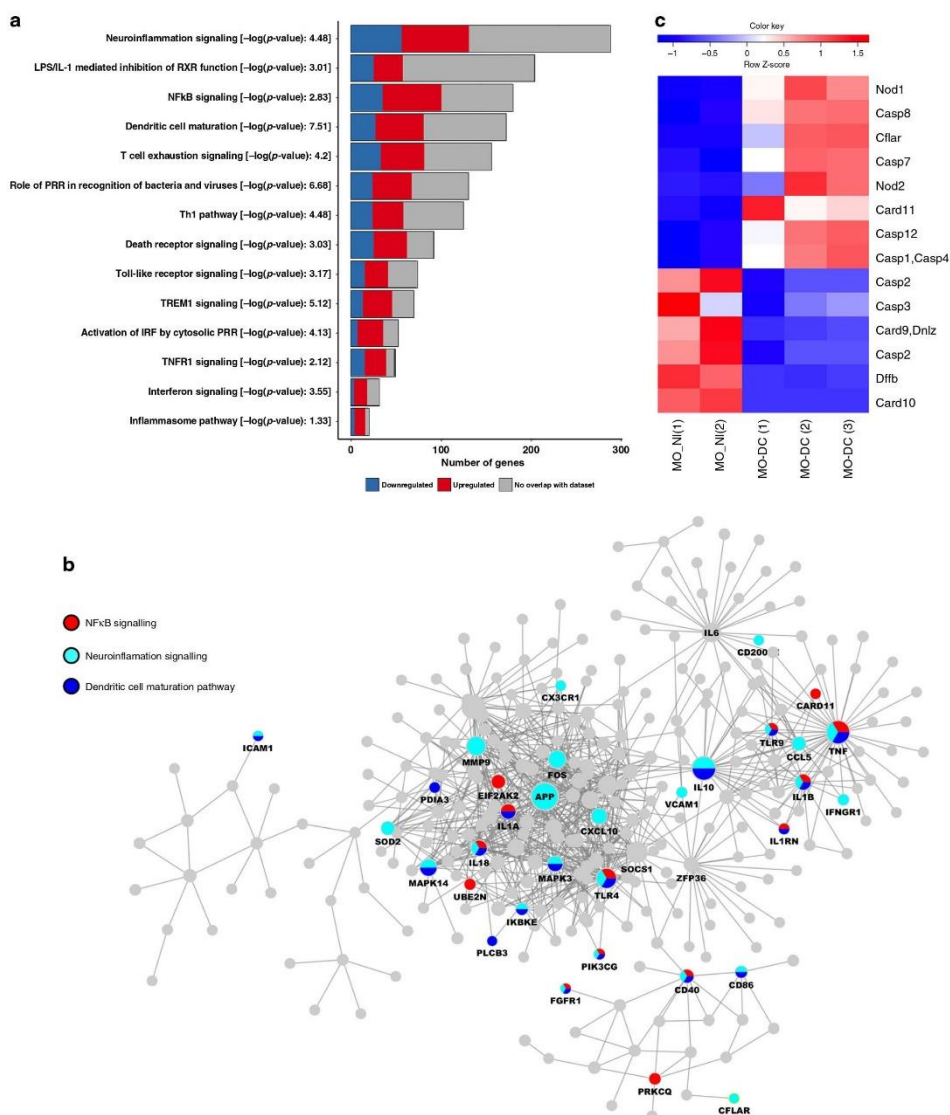


Fig. 5 Gene signatures from monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) from *PbA*-infected mice. Monocytes and MO-DCs were sorted from splenocytes from C57BL/6 controls (uninfected) mice and at 5 days post infection for RNA extraction and RNA-seq analysis. **a** Bar plot showing pathways significantly activated in MO-DCs from *PbA*-infected mice. Each color in the bar indicates the number of differentially expressed (DE) genes involved in a given pathway: in blue are downregulated, in red are upregulated, and in gray are the genes that do not show overlap with Ingenuity pathway analysis (IPA) database. **b** The main component of IPA network of all DE genes. All the DE genes are in gray, except the genes from NF- κ B signaling, neuroinflammation, and dendritic cell differentiation pathways, which have been highlighted of red, light blue, and dark blue, respectively. **c** Heatmap illustrates the expression of genes from caspase family in highly purified (over 98% purity) splenic MO-DCs ($CD11b^+F4/80^+CD11c^+DC\text{-}Sign^+MHC\ II^+$) from *PbA*-infected C57BL/6 mice compared to splenic monocytes (MO, $CD11b^+F4/80^+CD11c^-DC\text{-}Sign^-MHC\ II^-$) from uninfected controls (NI). The color scheme represents the row Z score.

resistant to ECM (Fig. 6d). In contrast, *Ripk3*^{-/-}, *Gsdmd*^{-/-}, or *Casp1/11*^{-/-} mice were as susceptible to ECM as the C57BL/6 mice. The clinical signs of disease correlated with the lethality curves (Fig. 6e). The images presented in Fig. 6f show the Evans blue staining of C57BL/6 mice, but not *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-} or *Ripk3*^{-/-}/*Casp8/11*^{-/-} infected with *PbA*. Pro-inflammatory cytokines are known to promote blood-brain barrier permeability, leading to leak and infiltration of mononuclear cells contributing to ECM. Hence, these results are consistent with the hypothesis that the defective cytokine response is contributing to *Casp8* knockout mice resistance to ECM. However, consistent with the results from *Pc*-primed mice, caspase-8 also has an important role in mediating ECM, which seems to be independent of GSDM-D cleavage and IL-1 β release. These results indicate that caspase-8 and caspase-1 and -11 also have a complementary role in the pathogenesis of ECM.

Expression of caspases-4 and -8 in monocytes from malaria patients. Our previous studies show that infection with either *P. vivax* or *P. falciparum* prime circulating monocytes to express an inflammasome gene signature, form AIM2, NLRP3, and NLRP12 specks, express active caspase-1, and produce high levels of IL-1 β , when challenged with LPS^{18,19,32}. We now evaluated the expression and activation of the inflammatory caspases-4 and -8 as well as GSDM-D in monocytes from malaria patients. It is well established that cytokinemia and fever coincide with the synchronized burst of infected red blood cells and the consequent release of parasites¹. Hence, blood samples from febrile malaria patients were collected for peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation. Western blots of monocytes purified of PBMCs from *P. vivax*-infected patients showed active caspase-4 (p32 subunit) (Fig. 7a). In addition, infection with *P. vivax* induced expression and cleavage of caspase-8 in circulating CD14⁺ monocytes (Fig. 7b). Furthermore, we found that GSDM-D is cleaved in monocytes from *P. vivax*-infected individuals, and not in monocytes from HD (Fig. 7c). A similar pattern of caspase-8, GSDM-D and caspase-4 activation was observed in monocytes from *P. falciparum*-infected patients (Fig. 7d, e). Altogether, we provide evidence that *P. vivax* and *P. falciparum* infection leads to induction and activation of caspases-4 and -8 as well as GSDM-D in monocytes, which may contribute to the overall amount of IL-1 β and pathogenesis of malaria.

Discussion

Plasmodium infection results in activation of NLRs, inflammasome oligomerization, and caspase-1 via the canonical pathway in circulating and splenic monocytes. Upon secondary stimuli, these armed cells produce extremely high levels of IL-1 β , which is thought to be a key cytokine-mediating high peak of fever as well as high sensitivity to endotoxic shock induced in bacterial superinfection^{4-6,18,19}. However, the role of caspase-11 and the noncanonical inflammasome activation²¹ has not been taken into consideration. Furthermore, different studies demonstrate the role of caspase-8 on IL-1 β synthesis and host cell death in bacterial and fungal infections²⁷⁻³⁰. Here, we report that caspase-11 and the homologous inflammatory human caspase-4, as well as caspase-8, are highly activated during *Plasmodium* infection, both in mouse and malaria patients. We found that while caspase-11 has a limited role, caspase-8 is essential for IL-1 β release and to mediate hypersensitivity to septic shock and cerebral disease in ECM model.

Catalyzing the formation of β -hematin crystals (hemozoin) is a key strategy to detoxify the heme released from hemoglobin digestion by *Plasmodium* parasites⁵². Different studies have reported that phagocytosis of hemozoin results in caspase-1

activation and IL-1 β secretion by monocytes/macrophages, and that this process is dependent on AIM2, NLRP3, and ASC oligomerization⁴⁻⁶. Indeed, it was found that DNA bound to hemozoin is essential to this process by activating TLR9 and inducing expression of inflammasome components as well as pro-IL-1 β , whereas hemozoin crystals translocate to the cytoplasm of phagocytic cells and promote inflammasome assembling⁶. In addition, studies performed in our laboratory¹⁹ and elsewhere⁵³ have shown that immunocomplexes-containing DNA present in plasma of malaria patients as well as opsonized infected RBCs also trigger the formation of inflammasome specks in human monocytes. However, most of the early studies that evaluated the role inflammasome in rodent malaria used a mouse strain that is double deficient for caspase-1 and caspase-11. Importantly, it was found in other infectious disease models that caspase-11 is involved in induction of pyroptosis, alarmin as well as IL-1 β secretion, in a process that is independent of the canonical activation of inflammasome^{21,54,55}. Hence, we revisited this question to evaluate the contribution of the noncanonical pathway on IL-1 β release during malaria.

The inflammasome activation through the noncanonical pathway requires as starting point caspase-11 activation in the mouse. Once activated, these inflammatory caspases are thought to promote potassium efflux, NLRP3, and ASC oligomerization and consequently, caspase-1 activation that amplifies cleavage of pro-IL-1 β ⁵⁶⁻⁵⁸. Different studies also demonstrate that pro-caspase-11 is induced by Type I IFN as well as TLR agonists, such as LPS, Poly IC, or PAMCys3³⁴⁻³⁷. Recent studies have demonstrated that, like caspase-11, cytosolic LPS is an agonist for the noncanonical inflammasome in humans and revealed that the inflammatory caspase-4 is a direct sensor of bacterial endotoxin^{22,57,59}.

We also found that in vivo *Plasmodium* infection was sufficient to activate caspase-11 in mice. As TLRs have been shown necessary in the process of priming for induction of pro-caspase-11 and TLR7 as well as TLR9 are strongly activated by infection with malaria parasites^{31,60,61}, we investigated the role of NAS-TLRs on activation of the noncanonical inflammasome pathway. Importantly, activation of NAS-TLRs during malaria is important to trigger IL-12, which is necessary for maximal IFN γ response during acute infection with malaria^{31,32,44,62}. We found that expression of pro-caspase-11 was diminished both in triple *Thr3/7/9* as well as *Ifng* knockout mice infected with *P. chabaudi*. Importantly, our in vitro experiments indicate that whereas IFN γ is required to induce pro-caspase-11, activation with infected erythrocytes promoted cleavage of pro-caspase-11. Indeed, it has been demonstrated that a combined activation by NAS-TLRs and IFN γ results in high expression of pro-caspase-11 in the host cell cytoplasm⁴¹, which initiates the process of self-cleavage⁶³.

It has also been shown that caspase-11 needs a secondary stimulus with cytosolic LPS to be activated and promote endotoxic shock in a process independent of TLR4^{34,35}. It is established that LPS binds to the caspase-11 CARD domain and is required to promote caspase-11 activation. However, our in vivo and ex vivo experiments indicate that caspase-11 was not necessary to cleave caspase-1 and had a limited role in secretion of IL-1 β or susceptibility to the low-dose LPS-induced shock. Different from the bacteria models described above, *Plasmodium* infection was sufficient to induce and activate caspase-11, and TLR4 was required to induce pro-IL-1 β , the release of IL-1 β , and lethality induced by LPS challenge.

In addition to caspase-1 and caspase-11, caspase-8 has also been shown to play a key role in regulating IL-1 β secretion in bacterial and fungal infections²⁷⁻²⁹. These studies indicate that caspase-8 mediates the synthesis of pro-IL-1 β by activating NF- κ B. Unlike caspases-1 and -11, the role of caspase-8 does not

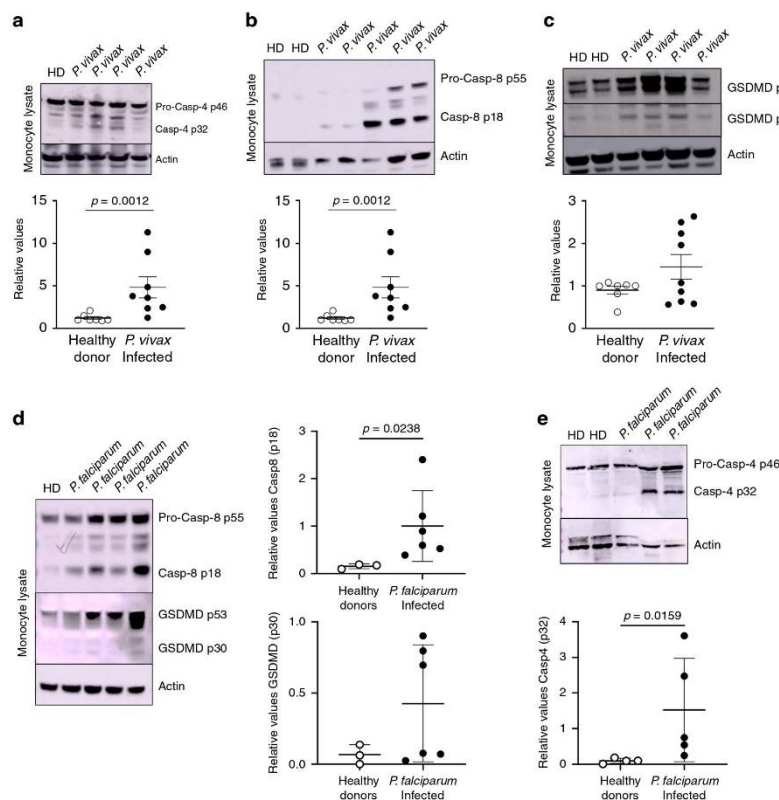


Fig. 7 Activation of caspases-4 and -8 in monocytes from malaria patients. CD14⁺ monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors (HD) and malaria patients (*P. vivax*), lysed with RIPA buffer and analyzed by western blot. **a** Western blot was performed with an anti-caspase-4 antibody. The levels of caspase-4 p32 expression were analyzed by densitometry and shown in the bottom panel (HD $n = 7$ and *P. vivax* $n = 8$). **b** Western blot was performed with CD14⁺ monocytes lysates from two HD and five *P. vivax* malaria patients, and expression of caspase-8 (p55) and cleaved caspase-8 (p18) detected using an anti-caspase-8 antibody. The levels of caspase-8 p18 expression were analyzed by densitometry and shown in the bottom panel (HD $n = 4$ and *P. vivax* $n = 9$). **c** Western blot was performed with CD14⁺ monocytes lysates from HD as well as *P. vivax* malaria patients and revealed with an anti-GSDM-D antibody. The levels of cleaved GSDM-D p30 expression were analyzed by densitometry and shown in the bottom panel (HD $n = 7$ and *P. vivax* $n = 9$). **d** CD14⁺ monocytes lysate isolated from healthy donors (HD) and malaria patients (*P. falciparum*) were analyzed by western blot performed against caspase-8 and GSDM-D. The levels of caspase-8 and GSDM-D expression were analyzed by densitometry and shown in the side panels (HD $n = 3$ and *P. falciparum* $n = 6$). **e** CD14⁺ monocytes lysate isolated from healthy donors (HD) and malaria patients (*P. falciparum*) were analyzed by western blot performed against caspase-4. The levels of caspase-4 expression were analyzed by densitometry and shown in the bottom panel (HD $n = 4$ and *P. falciparum* $n = 5$). Statistical analysis was performed by two-tailed unpaired Mann-Whitney test at 95% CI. Densitometry graphs show mean \pm s.e.m. of samples from patients run on two to three representative gels with similar results.

seem to be IL-1 β specific, since its deficiency also impairs the synthesis of other cytokines, such as TNF α and IL-6⁴⁶. Consistently, we found that the release of both IL-1 β and TNF α was highly impaired in the caspase-8-deficient mice infected with *Pc* or *PbA*.

Caspase-8 was also shown to be involved in GSDM-D cleavage³⁰. However, in our experiments, caspase-8 was not required for caspase-1 or caspase-11 cleavage. Importantly, the *Pc*-infected *Gsdmd*^{-/-} phenocopied the *Casp1*^{-/-} mice, which were slightly more resistant to the LPS-induced shock. Intriguingly, *Plasmodium*-infected *Gsdmd*^{-/-} mice showed severe impairment of IL-1 β release, but remained susceptible to the low-dose LPS challenge or ECM. Therefore, the lethality in these models cannot be

explained solely based on cleavage and release of IL-1 β . Furthermore, either *Casp1/11*^{-/-}^{50,51} or *Gsdmd*^{-/-} mice were highly susceptible to ECM. Nevertheless, like *Ripk3*^{-/-}/*Casp8/11*^{-/-}, the *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*Gsdmd*^{-/-} mice were highly resistant to ECM. Together, these results indicate that while redundant in these malaria models, the role of caspase-8 is complementary but distinct from the canonical inflammasome that involves caspases-1 and GSDM-D activation.

Infection with *P. vivax* elicits high fever and paroxysm thought to be dependent on IL-1 β , whereas *P. falciparum* infection is the most lethal species and the cause of cerebral malaria in humans, which is dependent on TNF α ⁴⁷. Hence, we evaluated whether inflammatory caspases and GSDM-D are activated in monocytes

from malaria patients. We have previously shown that AIM2 and NLRP3 inflammasomes, as well as caspase-1, are activated in monocytes from malaria patients¹⁸. Here, we found that in vivo infection with either *P. vivax* or *P. falciparum* is sufficient to activate caspase-4 and cleave GSDM-D in monocytes without exposure to LPS. In addition, we found that monocytes from patients infected with *Plasmodium* spp. process caspase-8, indicating their potential role in IL-1 β release and pathogenesis of malaria.

In conclusion, our results demonstrate that caspase-1, caspase-8, the mouse caspase-11, and its human ortholog caspase-4 are all activated in monocytes from *P. vivax* and *P. falciparum* malaria patients and mouse malaria models. The important role of the canonical activation of the inflammasome is revealed in caspase-8-deficient mice. While redundant, our data indicate that in these malaria models the mechanism by which caspases-1/11 promotes IL-1 β release involves GSDM-D, whereas caspase-8 seems to mediate expression of pro-IL-1 β and TNF α . As caspase-8 controls the release/expression of two key cytokines on *Plasmodium*-induced disease, it should be considered a potential target for therapeutic intervention in malaria patients.

Methods

Ethics statement. The Ethical Committee on Human Experimentation from Centro de Pesquisas em Medicina Tropical (CEP-CEPEM 096/2009), the Brazilian National Ethical Committee (CONEP 15653) from Ministry of Health and the Institutional Review Board from the University of Massachusetts Medical School (UMMS, IRB-ID11116) approved this study performed with malaria patients. Experiments with mice were conducted according to institutional guidelines for animal ethics and approved by the Institutional Ethics Committees from Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz-Minas, CEUA/LW15/14, and LW16/18) and UMMS (IACUC/A-2371-15), respectively.

Malaria patients. Healthy donors volunteers ($n = 8$) from Porto Velho or Belo Horizonte were used as negative controls. Symptomatic febrile patients with acute uncomplicated *P. vivax* ($n = 9$) and *P. falciparum* malaria ($n = 6$) were recruited at CEPPEM, an outpatient malaria clinic in Porto Velho, an endemic malaria area in the Amazon region of Brazil. Written informed consent was obtained before enrollment of all subjects. Up to 100 mL of peripheral blood was collected immediately after confirmation of *P. vivax* or *P. falciparum* infection by a standard thick blood smear. Peripheral blood was also collected from healthy donors living in an endemic area.

Experimental infections. All mouse lineages used in this study have been backcrossed for at least ten generations into the C57BL/6 genetic background. *Casp1*^{-/-}, *Casp1*^{-/-}/*Il18*^{-/-}, and *Gsdm*^{-/-} were provided by Dr. Vishva Dixit from Genentech (San Francisco, CA). *Caspase-1*^{-/-}/*Il11*^{-/-} and *Tr3*^{-/-} mice were provided by Dr. Richard Flavell from Yale University (New Haven, CT). The *Casp1*^{-/-} mice were provided by Dr. Devi Kanneganti Thirumala from St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN). *Ripk3*^{-/-}, *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}, and *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*Il11*^{-/-} were provided by Egil Lien. The *Tr9*^{-/-}, *Tr4*^{-/-}, and *Tr7*^{-/-} mice were provided by Dr. Shizuo Akira from Osaka University (Osaka, Japan). The *Ripk3*^{-/-}/*Casp8*^{-/-}/*Gsdm*^{-/-} and *Tr3/7/9*^{-/-} mice were generated in our laboratory by genetic crosses. The C57BL/6, *Ifng*^{-/-}, *Tnfr*^{-/-}, *Ifnar1*^{-/-}, and 129S6 were originally obtained from Jackson Labs. All mouse lineages mentioned above were bred and maintained in microisolators at Fiocruz-Minas and UMMS on a 12 h dark/light cycle, temperature range was 68–79 °F, and humidity between 30 and 70%. Female and male mice between 6 and 10 weeks old were used in all experiments.

The *P. chabaudi* *chabaudi* AS and *P. berghei* ANKA strains were used for experimental infection and kept in our laboratory as previously described^{31,64}. Briefly, *P. chabaudi* and *P. berghei* strains were maintained in C57BL/6 mice by passages once and twice a week, respectively. For experimental infection, wild-type and various knockout mice were infected i.p. with 10⁵ infected red blood cells diluted in PBS 1 \times . In some experiments, mice 0 (uninfected controls) and 8 days post infection with *P. chabaudi* were challenged with LPS (serotypes O55:B55 or O111:B4 from *E. coli* —Sigma and InvivoGen, respectively) and plasma collected 8 h later. LPS was used at a concentration 10 μ g/mouse, as indicated. In experiments with *P. berghei* ANKA, mice were followed daily for survival and to score clinical symptoms. ECM signs included ruffled fur, abnormal postural responses, reduced reflexes, reduced grip strength, coma, and convulsions. Mice that demonstrated complete disability in all parameters or died between days 7 and 12 post infection were considered as having ECM^{31,44}.

Human monocyte lysates. PBMCs were isolated from whole blood on Ficoll-paque Plus (GE Healthcare). Monocytes were purified from PBMCs of *P. vivax* and *P. falciparum*-infected patients or healthy donors by using immunomagnetic beads for positive selection of CD14⁺ cells (Miltenyi Biotec). Cells were lysed with RIPA buffer (Sigma) solution with a protease inhibitor cocktail (ThermoFisher).

Splenocytes and CD11b⁺ cells. Splens from control and infected mice were passed through a 100- μ m nylon cell strainer. After the first centrifugation (5 min 400 \times g), tissue supernatant was collected. Erythrocytes were then lysed, washed, and splenocytes resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin, streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, ThermoFisher). In some experiments, splenocytes (2 \times 10⁶ cells) were stimulated in vitro with 1 μ g/ml of LPS for 24–48 h. For experiments with CD11b⁺ cells purified from splenocytes, immunomagnetic beads for positive selection of CD11b⁺ cells (Miltenyi Biotec) were used.

Bone marrow-derived monocytes (BMDMs). Bone marrow cells from C57BL/6 mice were cultured in DMEM (Corning) with 10% FBS, 10 mM L-glutamine (Gibco, ThermoFisher), and 20% L929 supernatants. After 7 days 2 \times 10⁶ BMDMs were cultured in 48-wells plate in 300 μ l of medium without FBS. The BMDM were stimulated with 1.5 of red blood cells (RBC) or infected RBCs (iRBC), 40 ng/ml of IFN γ (Sigma), and 500 U/ml of IFN-1 (Pbl Assay Science), as indicated in the figure legends. Between 16 and 24 h of in vitro stimulation, BMDMs were lysed with RIPA buffer (Sigma) solution. Culture supernatants were collected, and the soluble proteins were precipitated using chloroform (25% of supernatant volumes) and methanol (same supernatant volumes). After centrifugation at 20,000 \times g for 10 min at 4 °C, the proteins pellet was dried in 56 °C and suspended in sample buffer.

Western blotting. Total of mouse splenocytes, CD11b⁺ cells, BMDM, or monocytes from patients were lysed with RIPA buffer solution with a protease inhibitor cocktail. After 15 min on ice, lysates were centrifuged at 13,000 \times g for 10 min at 4 °C. The proteins were separated in a 12% acrylamide (caspase-11 and caspase-8) or 4–12% acrylamide (caspase-1/caspase-4/GSDM-D) NUPAGE Bis-tris Protein gels (Invitrogen) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with caspase-11 (Novus Biologicals, 1:1000), caspase-1 (Adipogen, 1:1000), caspase-4 (Cell Signaling, 1:1000), anti-mouse and anti-human caspase-8 (Enzo Life Science, 1:1000), anti-mouse cleaved caspase-8 (Cell Signaling, 1:500), anti-GSDM-D (sigma, 1:1000) and β -actin (Sigma, 1:2000) specific antibodies, then incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 1:25,000) and detected with Clarity Max ECL Substrate (BioRad) using ImageLab Touch Software V6.0.1 (Bio-Rad). Bands quantification was performed with ImageStudio V5.2. Uncropped western blot is available in the Supplementary Information file (Supplementary Figs. 5–11).

Cytokine measurements. Measurements of mouse IL-1 β and TNF α in plasma or supernatant of splenocyte cultures were performed using commercially available ELISA Duoset kit (ThermoFisher). Absorbance was read with SOFTmaxPRO V4.3.1 LS.

Flow cytometry. Splenocytes (5 \times 10⁶ cells) from mice at 0 (uninfected controls) and 8 days post infection were harvested 2 h after challenge with LPS and stained with fluorescein-labeled monoclonal antibodies (mAbs) specific for cell surface markers or cytokines. The following flow cytometry mAbs specific were used: CD11c-Alexa fluor 700 (1:100), MHC II-APCCy7 (1:200), F4/80- APC (Biolegend, 1:200), CD11b-PECy7 (1:4000), pro-IL-1 β -FITC (eBioscience, 1:100), and AmCyan (Live/Dead kit, ThermoFisher). The intracellular fixation and permeabilization buffer set of eBioscience (ThermoFisher) were used to perform pro-IL-1 β stain.

Cell sorting. Splens from the C57BL/6 control uninfected and *Pba*-infected mice, at 5 days post infection, were harvested, and splenocytes stained with Ly6G (FITC, 1:400) CD11b (PECy7, 1:4000), F4/80 (PECy5, 1:200), CD11c (Alexa fluor 700, 1:100), MHC II (APCCy7, 1:200), and DC-SIGN (APC e-fluor 660, 1:800) and then submitted to purification by using a cell sorting ARIA (BD). These cells were first gated on FSC-H/FSC-A, to avoid doublets. Next, we gated on Ly6G⁻, then CD11b⁺F4/80⁺. Cells from noninfected controls were then gated on MHC II⁺ DC-SIGN⁻ and from infected mice on MHC II^{high} DC-SIGN^{high}. The gated cells were sorted, collected into fresh new tubes, the MO-DCs were confirmed to be CD11c⁺ and then used for RNA extraction and RNA-Seq.

RNA-Seq samples and library preparation. RNA-seq was performed in biological replicates (three mice per group). Monocytes and MO-DCs were purified from splenocytes using a cell sorting ARIA (BD). Since *Pba* infection leads to severe cerebral symptoms and death after the 6th day of infection, MO-DCs (CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁺DC-Sign⁺MHC II⁺) were collected from *Pba*-infected C57BL/6 mice at day 5 post infection and monocytes (CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁻DC-Sign⁻MHC II⁻) collected from noninfected mice. The total RNA was extracted using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen), and was cleaned and treated with DNase I (Qiagen). RNA-seq libraries were prepared using the TruSeq Stranded mRNA Kit (ILLUMINA)

following the manufacturer's instructions. The total RNA and library quality were verified by fragmentation analysis (Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer) and submitted for sequencing on the Illumina NextSeq 500 (Bauer Core Facility Harvard University).

RNA-Seq analysis. Reads previously trimmed with Trimmomatic (Bolger et al.⁶⁵) were mapped to the Genome Reference Consortium Mouse Build 38 patch release 5 (GRCm38.p5) using STAR aligner (Dobin et al.⁶⁶) and the Fragments Per Kilobase of transcript per million mapped read (FPKM) values and the differential analysis were calculated with CUFFLINKS (Trapnell et al.⁶⁷). Genes which were differentially expressed in response to the infection with fold change ≥ 1.5 were analyzed for pathway enrichment and network analysis with IPA—Ingenuity Pathway Analysis from Qiagen (USA); and graphs were done in R statistical environment, version 3.4.3 (R Core Team, 2019) and Cytoscape software (Shannon et al.⁶⁸).

Reagents and softwares. Please see Supplementary Table 1.

Statistical analysis. All data were analyzed using Graphpad Prism V7.0 Software. The differences between two groups were verified using *t* test or the Mann–Whitney test for parametric or nonparametric data, respectively, at 95% confidence interval (CI). For analysis of multiple groups, we used one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) with additional Bonferroni's test at 95% CI. Differences were considered statistically significant when the $P < 0.05$.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary information files). RNA-seq data are available at the Gene Expression Omnibus Database, GEO accession number is: GSE126381. All data from this study are available in figshare with the identifier: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12751163.v1>. Source data are provided with this paper.

Received: 21 February 2019; Accepted: 8 August 2020;

Published online: 14 September 2020

References

- Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A. & Golenbock, D. T. Innate sensing of malaria parasites. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 744–757 (2014).
- Parroche, P. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 1919–1924 (2007).
- Krishnegowda, G. et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 8606–8616 (2005).
- Dostert, C. et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS ONE* **4**, e6510 (2009).
- Shio, M. T. et al. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog.* **5**, e1000559 (2009).
- Kalantari, P. et al. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Plasmodium*-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep.* **6**, 196–210 (2014).
- Orengo, J. M. et al. *Plasmodium*-induced inflammation by uric acid. *PLoS Pathog.* **4**, e1000013 (2008).
- Gallego-Marin, C. et al. Cyclic GMP-AMP synthase is the cytosolic sensor of *Plasmodium falciparum* genomic DNA and activates type I IFN in malaria. *J. Immunol.* **200**, 768–774 (2018).
- Cunnington, A. J., de Souza, J. B., Walther, M. & Riley, E. M. Malaria impairs resistance to *Salmonella* through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nat. Med.* **18**, 120–127 (2012).
- Lacerda, M. V. et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin. Infect. Dis.* **55**, e67–e74 (2012).
- Scott, J. A. et al. Relation between *falciparum* malaria and bacteraemia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *Lancet* **378**, 1316–1323 (2011).
- Were, T. et al. Bacteremia in Kenyan children presenting with malaria. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 671–676 (2011).
- Martino, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
- Bauernfeind, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791 (2009).
- Harder, J. et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J. Immunol.* **183**, 5823–5829 (2009).
- Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 397–411 (2013).
- Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. *J. Immunol.* **187**, 597–602 (2011).
- Ataide, M. A. et al. Malaria-Induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS Pathog.* **10**, e1003885 (2014).
- Hirako, I. C. et al. DNA-containing immunocomplexes promote inflammasome assembly and release of pyrogenic cytokines by CD14+ CD16+ CD64high CD32low inflammatory monocytes from malaria patients. *mBio* **6**, e01605–e01615 (2015).
- Casson, C. N. et al. Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. *PLoS Pathog.* **9**, e1003400 (2013).
- Kayagaki, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117–121 (2011).
- Casson, C. N. et al. Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 6688–6693 (2015).
- Kayagaki, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666–671 (2015).
- Liu, X. et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
- Aglietti, R. A. et al. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 7858–7863 (2016).
- Sborgi, L. et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* **35**, 1766–1778 (2016).
- Ketelut-Carneiro, N., Ghosh, S., Levitz, S. M., Fitzgerald, K. A. & da Silva, J. S. A dectin-1-caspase-8 pathway licenses canonical caspase-1 inflammasome activation and interleukin-1beta release in response to a pathogenic fungus. *J. Infect. Dis.* **217**, 329–339 (2018).
- Man, S. M. et al. *Salmonella* infection induces recruitment of caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1beta production. *J. Immunol.* **191**, 5239–5246 (2013).
- Weng, D. et al. Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 7391–7396 (2014).
- Orning, P. et al. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science* **362**, 1064–1069 (2018).
- Franklin, B. S. et al. Therapeutic targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 3689–3694 (2011).
- Franklin, B. S. et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 5789–5794 (2009).
- Broz, P., von Moltke, J., Jones, J. W., Vance, R. E. & Monack, D. M. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* **8**, 471–483 (2010).
- Hagar, J. A., Powell, D. A., Aachoui, Y., Ernst, R. K. & Miao, E. A. Cyttoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxemic shock. *Science* **341**, 1250–1253 (2013).
- Kayagaki, N. et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* **341**, 1246–1249 (2013).
- Rathinam, V. A. et al. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* **150**, 606–619 (2012).
- Gurung, P. et al. Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon-beta (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates Toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. *J. Biol. Chem.* **287**, 34474–34483 (2012).
- Wu, X., Gowda, N. M., Kumar, S. & Gowda, D. C. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J. Immunol.* **184**, 4338–4348 (2010).
- Sharma, S. et al. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity* **35**, 194–207 (2011).
- Wu, J. et al. Strain-specific innate immune signaling pathways determine malaria parasitemia dynamics and host mortality. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E511–E520 (2014).

41. Aachoui, Y. et al. Canonical inflammasomes drive IFN- γ to prime caspase-11 in defense against a cytosol-invasive bacterium. *Cell Host Microbe* **18**, 320–332 (2015).
42. Chimma, P. et al. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog.* **5**, e1000631 (2009).
43. Antonelli, L. R. V. et al. The CD14⁺CD16⁺ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Pathog.* **10**, e1004393 (2014).
44. Hirako, I. C. et al. Splenic differentiation and emergence of CCR5(+)CXCL9(+)CXCL10(+) monocyte-derived dendritic cells in the brain during cerebral malaria. *Nat. Commun.* **7**, 13277 (2016).
45. Shi, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
46. Monie, T. P. & Bryant, C. E. Caspase-8 functions as a key mediator of inflammation and pro-IL-1 β processing via both canonical and non-canonical pathways. *Immunol. Rev.* **265**, 181–193 (2015).
47. Grau, G. E. et al. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* **237**, 1210–1212 (1987).
48. Kwiatkowski, D. et al. Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q. J. Med.* **86**, 91–98 (1993).
49. Galvao-Filho, B. et al. The emergence of pathogenic TNF/iNOS producing dendritic cells (Tip-DCs) in a malaria model of acute respiratory distress syndrome (ARDS) is dependent on CCR4. *Mucosal Immunol.* **12**, 312–322 (2018).
50. Reimer, T. et al. Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome. *Eur. J. Immunol.* **40**, 764–769 (2010).
51. Kordes, M., Matuschewski, K. & Hafalla, J. C. Caspase-1 activation of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 is dispensable for induction of experimental cerebral malaria. *Infect. Immun.* **79**, 3633–3641 (2011).
52. Rosenthal, P. J. & Meshnick, S. R. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**, 131–139 (1996).
53. Zhou, J., Ludlow, L. E., Hasang, W., Rogerson, S. J. & Jaworowski, A. Opsonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and enhances inflammatory cytokine secretion by human macrophages. *Malar. J.* **11**, 343 (2012).
54. Gross, O. et al. Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* **36**, 388–400 (2012).
55. Py, B. F. et al. Caspase-11 controls interleukin-1 β release through degradation of TRPC1. *Cell Rep.* **6**, 1122–1128 (2014).
56. Ruhl, S. & Broz, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁽⁺⁾ efflux. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2927–2936 (2015).
57. Schmid-Burgk, J. L. et al. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2911–2917 (2015).
58. Rivers-Auty, J. & Brough, D. Potassium efflux fires the canon: potassium efflux as a common trigger for canonical and noncanonical NLRP3 pathways. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2758–2761 (2015).
59. Yang, J., Zhao, Y. & Shao, F. Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 78–83 (2015).
60. Gowda, N. M., Wu, X. & Gowda, D. C. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J. Immunol.* **188**, 5073–5085 (2012).
61. Yu, X. et al. Cross-regulation of two type I interferon signaling pathways in plasmacytoid dendritic cells controls anti-malaria immunity and host mortality. *Immunity* **45**, 1093–1107 (2016).
62. Franklin, B. S. et al. 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**, 881–890 (2007).
63. Wang, S. et al. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* **92**, 501–509 (1998).
64. Stevenson, M. M., Tam, M. F., Belosevic, M., van der Meide, P. H. & Podoba, J. E. Role of endogenous gamma interferon in host response to infection with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect. Immun.* **58**, 3225–3232 (1990).
65. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
66. Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
67. Trapnell, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578 (2012).
68. Shannon, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).

Acknowledgements

We thank Dr. Milton Pereira for his assistance on this paper. We are grateful to the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS its facilities at Fiocruz-Minas, to the clinic, laboratory and administrative staff, field workers, and subjects who participated in the study. This work was supported by the National Institutes of Health (R01NS098747, R01AI079293, and U19 AI089681—Amazonian Center of Excellence in Malaria Research); Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (Fapesp, 2016/23618-8), Rede Mineira de Biomoléculas from Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig, REID-00012-14), Brazilian National Institute of Science and Technology for Vaccines granted by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig)/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (465293/2014-0). N.M.A. received CAPES and LMNP CNPq/CAPES fellowships. R.T.G. and D.S.Z. are research fellows from CNPq.

Author contributions

Wrote the paper: R.T.G., L.M.N.P., and D.T.G. Designed experiments and analyzed the results: R.T.G., L.M.N.P., P.A.A., N.M.A., D.S.Z., and D.F.D. Performed experiments: L.M.N.P., P.A.A., N.M.A., D.F.D., C.J., and M.A.A. Contributed with reagents/materials/samples: D.B.P., K.A.F., E.L., and D.S.Z.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information


Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18295-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to R.T.G.

Peer review information *Nature Communications* thanks Clare Bryant and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020, corrected publication 2020