

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

**Estudo da formação do inflamassoma durante a infecção
por *Plasmodium*: implicações na patogênese da malária.**

Marco Antônio Ataíde Silva.

Belo Horizonte - MG

2014

Marco Antônio Ataíde Silva

**Estudo da formação do inflamassoma durante a infecção
por *Plasmodium*: implicações na patogênese da malária.**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Belo Horizonte - MG

2014

DEDICATÓRIA

A Fabrícia e ao Davi,
por alegrarem os meus dias.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Fabricia, pelo seu companheirismo inestimável.

Ao Prof. Ricardo Gazzinelli pelos muitos ensinamentos e pela confiança.

A Dra. Catherine Ropert pelas discussões científicas muito enriquecedoras.

Ao Prof. Dario Zamboni pelo seu apoio e disponibilidade constante.

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

Aos amigos do LAIM e IMPAR.

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

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

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

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

Ao povo Brasileiro pelos impostos pagos, e as agências de fomento que gerenciam esses recursos, sendo esses imprescindíveis para o progresso da ciência em nosso país.

O meu muito obrigado!

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Freedom is not worth having if it does not include the freedom to make mistakes.”

Mahatma Gandhi

“Imagination is more important than knowledge.”

“It is a miracle that curiosity survives formal education.”

Albert Einstein

RESUMO.

Anualmente a infecção por *Plasmodium* causa a morte de aproximadamente 600.000 indivíduos em todo o mundo. Vários estudos relacionados a patogênese da malária indicam que essa é uma doença altamente inflamatória, sendo as manifestações clínicas relacionadas com a produção exagerada de mediadores pró-inflamatórios durante a fase eritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium*. Nesse trabalho foi demonstrado que a infecção por *Plasmodium chabaudi* promove a formação de uma plataforma multiproteica conhecida como inflamassoma, e conseqüentemente a ativação da caspase-1, sendo essa responsável pela maturação da citocina pirogênica IL-1 β . Esse evento mostrou-se dependente da sinalização por TLR9/MyD88, P2X₇ e também da expressão de IFN- γ , ASC, NLRP3 e/ou NLRP12. Animais selvagens infectados com *P. chabaudi*, tornaram-se hipersensíveis ao estímulo de LPS ou a coinfeção com *S. typhimurium*, secretando níveis elevados de IL-1 β , e sucumbindo dentro de poucas horas. No entanto, a administração de um antagonista do receptor de IL-1, aumentou a resistência desses animais ao choque induzido por LPS ou pela coinfeção bacteriana. É importante notar que camundongos deficientes em moléculas envolvidas na formação do inflamassoma, como ASC, NLRP3, NLRP12 e Casp-1, também foram menos susceptíveis ao choque induzido por LPS durante a infecção com *P. chabaudi*. Finalmente, também foi encontrado caspase-1 ativa em monócitos de pacientes infectados com *P. vivax*, além de oligômeros de ASC, NLRP3 e NLRP12, indicando assim um possível envolvimento desses elementos na formação do inflamassoma durante a malária humana. Desse modo, conclui-se que a infecção por *Plasmodium* fornece sinais suficientes para a montagem do inflamassoma e ativação de caspase-1, sendo esse fenômeno extremamente perigoso para o hospedeiro se o mesmo for exposto a um potente indutor de pró-IL-1 β , como o LPS. Assim, visto a alta frequência de casos de coinfeções entre *Plasmodium* e bactérias Gram-negativa em áreas endêmicas, a ativação da caspase-1 durante a malária pode ser considerada como mais um fator de predisposição à gravidade.

Palavras chave: caspase-1, interleucina 1 beta, Plasmodium e bactéria

ABSTRACT.

Plasmodium infection causes about 600,000 deaths annually. Several studies related to the pathogenesis of malaria indicate that this is a highly inflammatory disease, and the clinical manifestations are close related to the overproduction of proinflammatory mediators during the erythrocytic stage of *Plasmodium* life cycle. It was demonstrated that *P. chabaudi* infection promotes the formation of the multiprotein platform known as inflammasome, and consequently activation of caspase-1, which is responsible for the maturation of the IL-1 β , a pyrogenic cytokine. This event is dependent on TLR9 / MyD88 signaling, and expression of P2X₇, IFN- γ , ASC, NLRP3 and / or NLRP12. Wild type mice infected with *P. chabaudi* become hypersensitive to LPS or to co-infection with *S. typhimurium*, secreting high levels of IL-1 β , and succumbing within a few hours later. However, a treatment using an IL-1 receptor antagonist increased the resistance of these animals to LPS-induced shock or to bacterial co-infection. It is important to point that mice deficient in molecules involved in the inflammasome assembly, as ASC, NLRP3, NLRP12 and Casp-1 were also less susceptible to shock induced by LPS. Finally, it has also been found active caspase-1 within monocytes from patients infected with *P. vivax*, and oligomers of ASC, NLRP3 and NLRP12, indicating a possible involvement of these elements in the formation of the inflammasome during malaria. Thus, we conclude that the infection by *Plasmodium* is sufficient to provide signals for inflammasome assembly and caspase-1 activation. In addition, this phenomenon is highly deleterious to the hosts, if they are exposed to microbial stimuli, as a TLR agonist, capable to induce the expression of pro-IL-1 β . Therefore, once episodes of co-infection between *Plasmodium* and Gram-negative bacteria are very common, caspase-1 activation during malaria must be considered a severity factor.

Key words: caspase-1, interleukin 1 beta, Plasmodium and bactéria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa descrevendo a distribuição estimada dos casos de malária no mundo.....	15
Figura 2: Mapa de risco de infecção por <i>Plasmodium</i> no Brasil atualizado até 2013	17
Figura 3: Casos de malária na região amazônica do Brasil.....	19
Figura 4: O ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> , o agente causador da malária.	23
Figura 5: Os três principais modelos propostos para explicar a formação do NLRP3 inflamassoma.....	38
Figura 6: Caspase-1 é ativada durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	58
Figura 7: Células CD11c ⁺ e CD11b ⁺ provenientes de animais infectados são capazes de secretar altos níveis de IL-1 β após o estímulo com LPS.	60
Figura 8: Expressão de caspase-1 ativa e produção de IL-1 β em animais deficientes para moléculas MyD88.....	63
Figura 9: Expressão de caspase-1 ativa e produção de IL-1 β em animais deficientes para TLRs endossomais	66
Figura 10: Citocinas pró-inflamatórias envolvidas na ativação da caspase-1 e secreção da IL-1 β durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	70
Figura 11: Os receptores citosólicos NLRP3 e NLRP12, e o receptor purinérgico P2X ₇ , controlam a ativação da caspase-1 durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	74
Figura 12 : Consequências da predisposição para alta produção de IL-1 β durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	78
Figura 13: Tratamento com um antagonista de IL-1R diminui a susceptibilidade dos animais infectados com <i>P. chabaudi</i> ao choque induzido por uma infecção secundária bacteriana.	82
Figura 14: A malária humana também leva a ativação da caspase-1 e a produção de IL-1 β	84
Figura 15: Monócitos são a principal fonte de caspase-1 ativa durante a infecção por <i>P. vivax</i>	87
Figura 16: Oligomerização de ASC durante a infecção por <i>P. vivax</i>	89
Figura 17: Monócitos de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> apresentam agregados (<i>specks</i>) de alguns receptores citosólicos e ASC.	93
Figura 18: Ativação da caspase-1 dependente do NLRP3 e do NLRP12-inflamassoma, predis põem o hospedeiro ao choque induzido por uma coinfeção bacteriana.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Liberação de IL-1 β e a alta susceptibilidade ao choque endotóxico.	80
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AIM2** - Ausente em melanoma do tipo 2
- ASC** - Proteína associada a apoptose contendo o domínio CARD
- ATP** - Adenosina trifosfato
- CAPS** - Síndrome periódica associada ao “Cryopyrin”
- CARD** - Domínio de recrutamento e ativação de caspase
- Casp-1** – caspase-1
- CM** – Malária cerebral
- CPPD** - Pirofosfato de cálcio dihidratado
- DAMPs** - Padrão molecular associado a dano
- dNTP** - dinucleotídeo trifosfato
- DSS** - Dissuccinimidil suberato
- IFN- γ R** – Receptor de Interferon-gamma
- IL-18** – Interleucina dezoito
- IL-1Ra** - Antagonista do receptor de interleucina 1
- IL-1 β** - Interleucina 1 beta
- iRBC** - Células vermelhas infectadas
- MDP** - Muramil dipeptídeo
- MSU** - Monossódio de urato
- MyD88** - Gene de resposta a diferenciação mielóide primária
- NLRC4** - Receptor da família dos NLRs contendo o domínio CARD 4
- NLRP1** - Receptor da família dos NLRs contendo o domínio Pyrin 1
- NLRP3** - Receptor da família dos NLRs contendo o domínio Pyrin 3
- NLRP12** - Receptor da família dos NLRs contendo o domínio Pyrin 12
- NLRs** - Receptores do Tipo NOD
- PAMPs** - Padrões moleculares associados a patógenos
- PfEMP1** - Proteína 1 do *P. falciparum* presente na superfície de eritrócitos
- PGN** - Peptídeoglicano
- PMSF** - Phenylmethanesulfonyl fluoride **NO** - óxido nítrico
- PRR** - Receptor reconhecedor de padrões
- PYD** - Domínio pyrin
- TLRs** - Receptores do Tipo Toll
- TNF- α** - Fator de necrose tumoral- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*)
- TNFR** - Receptor do fator de necrose tumoral alpha
- TRIF** - TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	12
1.1 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA	13
1.2 CICLO DE VIDA DO <i>PLASMODIUM</i>	21
1.3 AQUISIÇÃO DE IMUNIDADE CONTRA O <i>PLASMODIUM</i>	24
1.4 IMUNIDADE INATA E A IMUNOPATOGÊNESE DA MALÁRIA.	27
1.5 O INFLAMASSOMA: ATIVAÇÃO, REGULAÇÃO E FUNÇÃO.....	33
1.6 CASPASE-1 ATIVA, DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS E A MALÁRIA.	40
1.7 COINFEÇÕES: <i>PLASMODIUM</i> VS BACTÉRIAS	42
2 - JUSTIFICATIVA	44
3-OBJETIVOS	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	47
4-MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 REAGENTES.	49
4.2 PACIENTES.....	50
4.3 MODELO MURINO DE MALÁRIA E LINHAGENS DE CAMUNDONGOS.	51
4.4 LIGADURA E PUNÇÃO SUB-LETAL DO CECO (<i>SUB-LETHAL CECAL LIGATION AND PUNCTURE</i>) (SL-CLP) E A INFEÇÃO COM <i>S. TYPHIMURIUM</i>	51
4.5 SEPARAÇÃO DE PBMCs E MONÓCITOS.....	52
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
4.7 PREPARAÇÃO DO LISADO CELULAR.	53
4.8 ELETROFORESE E <i>WESTERN BLOT</i>	53
4.9 AVALIAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO DE ASC EM PBMCs DE PACIENTES.	54
4.10 DOSAGEM DE CITOCINAS.	54
5-RESULTADOS	55
5.1 A CASPASE 1 É ATIVADA EM MACRÓFAGOS E EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DURANTE A INFEÇÃO POR <i>P. CHABAUDI</i> , SENDO ESSE FENÔMENO DEPENDENTE DE ASC.....	56
5.2 A SINALIZAÇÃO VIA TLR9/MYD88 É UM EVENTO FUNDAMENTAL PARA A FORMAÇÃO DO INFLAMASSOMA, ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 E SECREÇÃO DE IL-1B DURANTE A INFEÇÃO POR <i>P. CHABAUDI</i>	62
5.3. IFN- γ E TNF-A, MOLÉCULAS-CHAVE NO PROCESSO DE PATOGÊNESE DA MALÁRIA, REGULAM A ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 E A LIBERAÇÃO DE IL-1 β DURANTE A INFEÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i>	67

5.4 A INFECÇÃO POR <i>P. CHABAUDI</i> PROMOVE A ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 DE MODO DEPENDENTE DO RECEPTOR PURINÉRGICO P2X ₇ E DOS RECEPTORES CITOSÓLICOS NLRP3 E NLRP12.....	71
5.5 A ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 PODE SE TORNAR EM UM EVENTO LETAL PARA O HOSPEDEIRO, SE UM INDUTOR DE PRÓ-IL-1 β ESTIVER DISPONÍVEL DURANTE A INFECÇÃO POR <i>P. CHABAUDI</i>	75
5.5 ANIMAIS INFECTADOS COM <i>P. CHABAUDI</i> SE TORNAM HIPERSENSÍVEIS A UMA INFECÇÃO BACTERIANA SECUNDÁRIA, SENDO ESSE FENÔMENO REVERTIDO PELO TRATAMENTO COM IL-1RA.....	81
5.6 A CASPASE-1 TAMBÉM É ATIVADA EM HUMANOS DURANTE A INFECÇÃO CAUSADA POR <i>P. VIVAX</i> E TAMBÉM <i>P. FALCIPARUM</i>	83
5.7 MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS (CD14 ^{LOW} CD16 ⁺) E OS MONÓCITOS CLÁSSICOS (CD14 ⁺ CD16 ⁻) SÃO A FONTE DE CASPASE-1 ATIVA DURANTE A INFECÇÃO POR <i>P. VIVAX</i>	85
5.8 A INFECÇÃO POR <i>P. VIVAX</i> PROMOVE A OLIGOMERIZAÇÃO DA MOLÉCULA ADAPTADORA ASC.....	88
5.9 A INFECÇÃO POR <i>P. VIVAX</i> LEVA FORMAÇÃO DE “SPECKS” DE NLRP3, NLRP12 E AIM2.....	90
6-DISSCUSSÃO.....	95
6.1 ASC E A ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 DURANTE A MALÁRIA.....	96
6.2 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS Vs ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 E A SECREÇÃO DE IL-1 β	98
6.3 SECREÇÃO DA IL-1 β E A ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 EM MONÓCITOS HUMANOS.....	100
6.4 TLRs Vs NLRs, E A ATIVAÇÃO DA CASPASE-1.....	101
6.5 O PAPEL DO NLRP12 NA RESPOSTA IMUNE INATA, DESORDENS INFLAMATÓRIAS E A MALÁRIA.....	104
6.6 CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO DA CASPASE-1 E SECREÇÃO DA IL-1 β DURANTE MALÁRIA.....	106
7-RESUMO DOS RESULTADOS.....	111
7-CONCLUSÕES.....	114
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
9-APÊNDICE.....	132

1-Introdução

1.1 Epidemiologia da malária

De acordo com o último Relatório Mundial de Malária (*World Malaria Report 2013*) 103 países integram a área endêmica de infecção por *Plasmodium* e cerca 3,4 bilhões de pessoas correm o risco de serem infectadas. Estima-se que 207 milhões de pessoas são de fato infectadas e cerca de 627 000 sucumbem à essa doença todos os anos (WHO 2013).

A malária humana pode ser causada por cinco diferentes espécies de *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malarie*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*, sendo essa última considerada a espécie mais virulenta e também a mais prevalente, seguida pelo *P. vivax* [1]. O *Plasmodium* é transmitido pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* durante o seu repasto sanguíneo, principalmente durante o entardecer ou ao amanhecer [2]. Existem outras formas de infecção pelo *Plasmodium*, porém consideradas raras, como a infecção congênita, transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas contaminadas e também durante o transplante de órgãos [3,4].

Os casos de malária são distribuídos por toda a região tropical do globo (**Figura 1**). O continente Africano detém mais de 80% desses casos e também 90% das mortes. Felizmente, os dados publicados no último Relatório Mundial de Malária, indicam que 8 países desse continente apresentaram uma redução de 75% no índice de novos casos, provavelmente devido aos vários programas de controle da infecção (WHO 2013). O continente Africano é seguido pelo Oriente Médio e Ásia em termos de número de pessoas expostas ao *Plasmodium*, sendo 10 países integrantes dessa região endêmica de malária. Além disso, também é possível se infectar com o *Plasmodium* em 10 países do Mediterrâneo Oriental e em 21 países das Américas, incluindo o Brasil (WHO 2013).

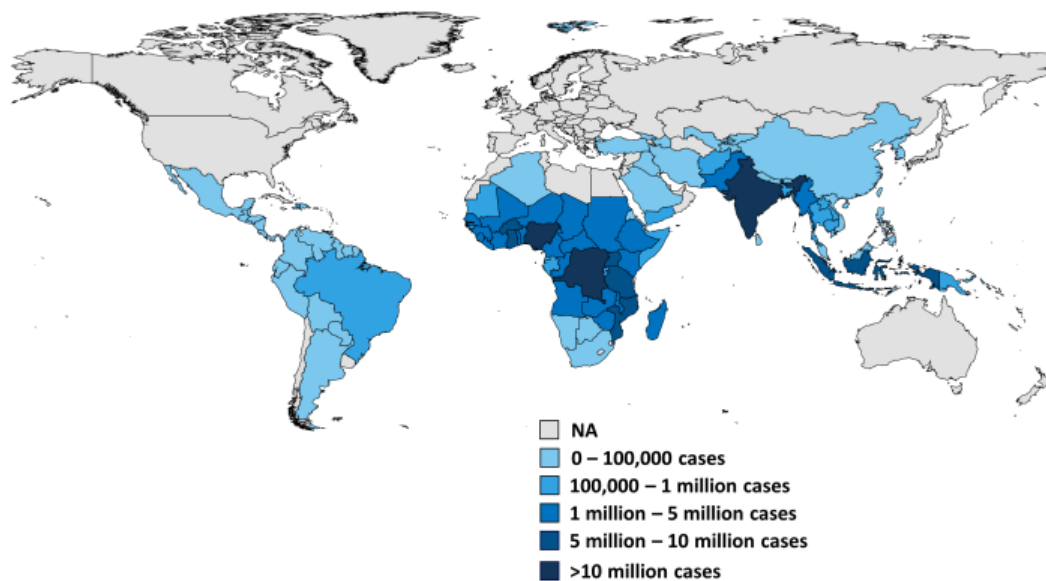
A malária é caracterizada pelo seu padrão cíclico de febre e calafrios, o que está relacionado com a fase intraeritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium*. Nessa fase, ocorre a ruptura das hemácias infectadas, liberação de novas formas infectantes (merozoítos) e conseqüentemente a invasão de novos eritrócitos. Além de febre e calafrios, a malária grave é acompanhada de hipoglicemia, anemia acentuada e perda da consciência [5]. Habitantes de áreas endêmicas só deixam de apresentar esses sintomas, portando ainda uma carga parasitária na circulação, após anos de sucessivas exposições. [6,7]. Por esse motivo, crianças

africanas com idade entre 6 meses a 5 anos, compõem um grupo de alto risco com grande possibilidade de progredir para malária grave e morte. Um outro grupo de risco é composto por mulheres grávidas. Estima-se que cerca de 10 milhões de mulheres grávidas são infectadas pelo *Plasmodium* anualmente [8]. O processo de imunossupressão que ocorre naturalmente durante a gravidez, pode impedir a resposta imunológica adequada contra o *Plasmodium*, aumentando assim o risco do desenvolvimento da malária grave no hospedeiro. Além disso, a malária durante o período gestacional também aumenta o risco de aborto espontâneo [8]. Pessoas com HIV/AIDS, viajantes internacionais provenientes de áreas não endêmicas, ou mesmo àqueles provenientes de áreas endêmicas, e que regressam para o seu país de origem após anos ausente, estão sujeitos ao desenvolvimento de quadros de malária grave (WHO 2013).

Nas últimas seis décadas, a malária tem sido alvo de intensas campanhas no intuito de erradicar a transmissão do parasito por meio do controle do vetor e quimioterapia [9]. Embora tenha diminuído o número de áreas propensas a transmissão dessa doença, o número de casos aumentou significativamente nesse período. Os antimaláricos são grandes aliados dos profissionais da saúde no combate à malária. Atualmente, existem uma série de classes de drogas utilizadas no tratamento, sendo o estágio intraeritrocítico o alvo de todas elas [10]. Embora o tratamento da malária seja eficiente quando administrado antimaláricos logo após o surgimento dos primeiros sintomas, ainda existe um risco considerável do agravamento da doença, devido a presença de cepas resistentes [11,12]. Desde que foi reportado o primeiro caso de *P. vivax* resistente à cloroquina em Papua Nova Guiné em 1989, vários relatórios mostraram que esse tipo de caso vem aumentando em outras áreas endêmicas [13]. Além disso, o surgimento de cepas resistentes à primaquina, a única droga disponível até o momento capaz de impedir a reativação de formas latentes alojadas no fígado, causando assim o reaparecimento da malária vivax, tem causado preocupação na comunidade científica. [14-16]. Desse modo torna-se urgente o desenvolvimento de uma vacina eficaz, que confira proteção em hospedeiros que vivem em áreas endêmicas.

FIGURA 1

Estimated Malaria Cases, 2012



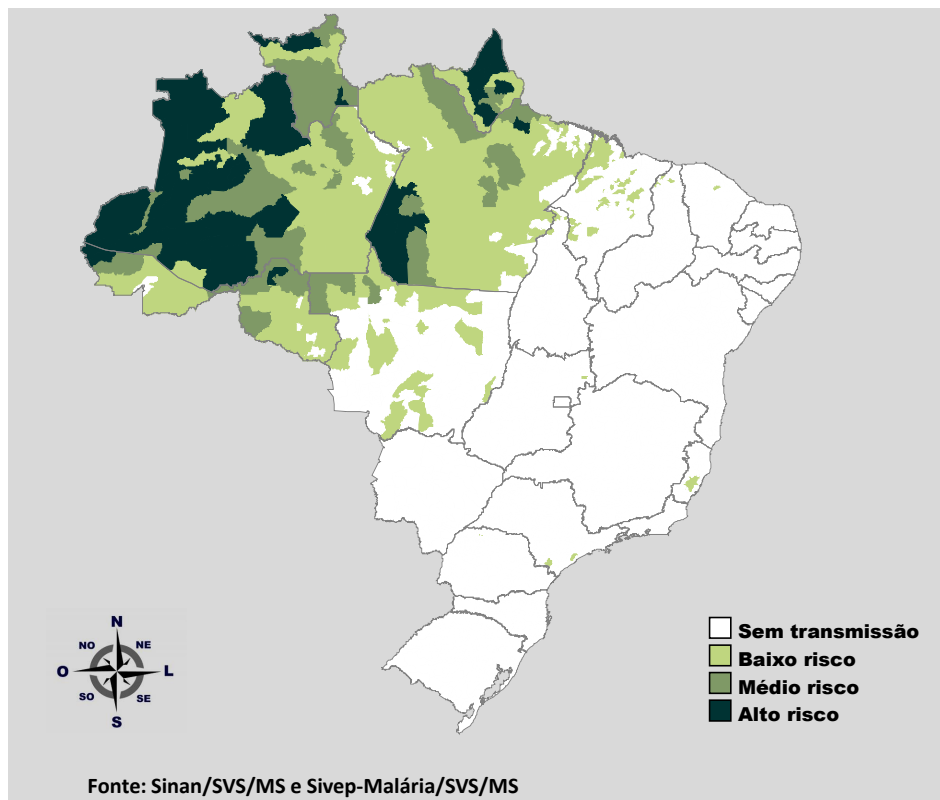
SOURCE: Kaiser Family Foundation, <http://kff.org/globaldata/>, based on WHO, World Malaria Report 2013; December 2013.



Figura 1: Mapa descrevendo a distribuição estimada dos casos de malária no mundo

No final da década de 30, navios de guerra franceses viajavam por 70h de Dakar (Senegal) até Natal (Brasil) no intuito de obter informações meteorológicas para montagem de um plano de vôo seguro para futuros vôos comerciais à região nordeste do Brasil. Nesse período, o Brasil foi invadido pelo mosquito *Anopheles gambiae*, provavelmente importados por esses navios. Nessa mesma época, os casos de malária grave e a taxa de mortalidade aumentaram significativamente, causando preocupação entre os malariologistas brasileiros e também nas autoridade de saúde local [17]. Assim, no início da década de 40, a malária foi considerada um problema de saúde nacional, com cerca 6 milhões de pessoas infectadas pelo *Plasmodium*, aproximadamente 20% da população da época [17]. Felizmente, no final dos anos 50, uma campanha nacional contra a malária, baseada na pulverização de DDT nas paredes internas das casas e no uso de cloroquina para tratar casos de febre, seguindo as diretrizes definidas pela Organização Mundial de Saúde, resultou em uma queda acentuada nos números de casos no Brasil [17]. Embora esse esforço tenha conseguido reduzir o risco de infecção pelo *Plasmodium* na maior parte do país já final da década de 60, isso não foi suficiente para conter a rápida dispersão desse parasita em toda Bacia Amazônica (**Figura 2**) Loiola, 2002 #6506}.

Figura 2:



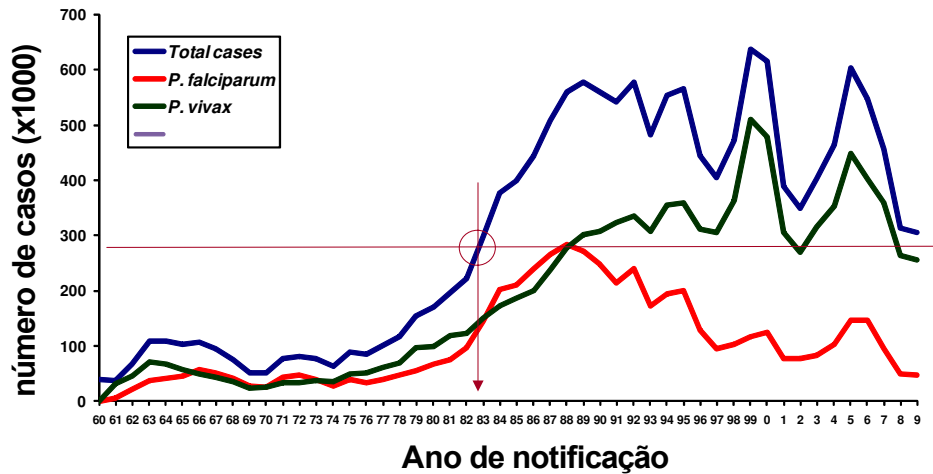
Mapa de risco de infecção por *Plasmodium* no Brasil atualizado até 2013

Em meados da década de 60, os programas de incentivo para colonização da região norte do país, sendo esses patrocinados pelo Governo Federal, resultaram na migração massiva e descontrolada de pessoas para a região da Bacia Amazônica do Brasil. Esse movimento migratório promoveu um aumento progressivo do número de casos notificados no país, que passou de 52 000 em 1970 para 578 000 em 1989 [18]. O maior número de casos foi registrado em 1999 (637 470 casos), quando o governo então decidiu implementar o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM). Esse novo plano teve como principais metas a redução da incidência da malária, a morbidade (incluindo as formas graves da doença) e a mortalidade. Além disso, o (PIACM) teve como objetivo eliminar a transmissão da malária em áreas urbanas das capitais dos estados da Amazônia Legal, além de manter a interrupção da transmissão da doença em locais onde essa meta já havia sido atingida.[17].

No Brasil, a malária é causada pela infecção por *P. vivax*, a qual representa cerca de 85% dos casos, sendo o restante dos casos em sua maioria causados pelo *P. falciparum* e uma proporção muito pequena de casos devido à infecção pelo *P. malariae* [18]. A predominância dos casos de malária vivax no Brasil é um fenômeno relativamente recente, como resultado ou provavelmente potencializado, pelo Programa Nacional de Combate a Malária, o qual intensificou a busca do diagnóstico rápido, seguido do tratamento. Isso parece controverso, porém pode ser explicado com base no ciclo de vida do parasita. Os gametócitos do *P. falciparum* aparecem na circulação do hospedeiro vertebrado somente 8-10 dias após a infecção. Com o diagnóstico rápido, e o hospedeiro então tratado, a transmissão do *P. falciparum* pode ser impedida de modo eficiente. Os gametócitos do *P. vivax* por outro lado, estão presentes na corrente sanguínea por volta de 3 dias após a infecção. Nesse momento, o hospedeiro não apresenta nenhum sintoma. Assim, a disponibilidade precoce dos gametócitos do *P. vivax* na circulação do hospedeiro vertebrado, permite a infecção de novos mosquitos mesmo antes do diagnóstico do indivíduo, e assim dificultando o controle dessa doença [19]. Desse modo, desde o início dos anos 90 até os dias atuais, a incidência do *P. vivax* na Bacia Amazônica do Brasil tem prevalecido (**Figura 3**) [17]

FIGURA 3

A



B

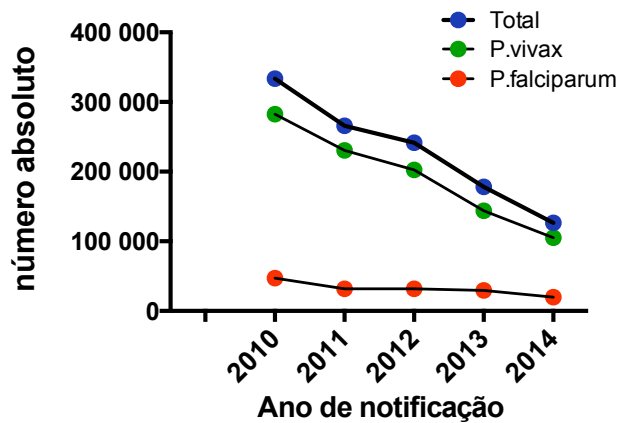


Figura 3: Casos de malária na região amazônica do Brasil.

(A) Número de casos de malária registrados na Bacia Amazônica desde 1960 até 2009. Adaptado de Oliveira-Ferreira et al. *Malaria Journal* 2010 (B) Dados epidemiológicos atualizados referentes ao números de casos de malária registrados na região amazônica do Brasil e depositados no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica - Notificação de Casos (SIVEP - Malária). Gráfico adaptado a partir dos dados disponíveis no site <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a->

z/malaria/11346 situacao-epidemiologica-dados>. Os dados de 2014 são referentes aos meses de Janeiro a Outubro

A malária causada pela infecção por *P. vivax*, é geralmente definida na literatura como uma doença benigna, mesmo elicitando febre alta com uma carga parasitária no sangue periférico muito menor quando comparado com o *P. falciparum* [20]. No entanto, nos últimos anos tem se observado no Brasil um padrão não muito comum de complicações clínicas, até mesmo casos fatais associados com a infecção por *P. vivax*. Além do Brasil, também foram identificados casos de malária vivax grave na Tailândia, Indonésia, Papua Nova Guiné e na Índia [16,21-23]

Dados históricos já alertavam para o fato de que a infecção por *P. vivax* poderia não ser tão branda o quanto era admitido. Em 1917, o Dr. Julius Wagner-Jauregg propôs uma nova metodologia para o tratamento de pacientes com neurosífilis, doença causada pela infecção por *Treponema pallidum*, uma bactéria Gram-negativa do grupo das espiroquetas. Ele passou a utilizar a infecção experimental com *P. vivax* para induzir febre e assim eliminar o agente causador da neurosífilis [24]. No entanto, existem relatos de que nos 5 primeiros anos de aplicação da “malarioterapia” 34% dos pacientes morreram [25].

Recentemente foi publicado um trabalho de meta análise, cujo objetivo era sintetizar as evidências de malária grave durante a infecção por *P. vivax*, em comparação com a doença causada pela infecção por *P. falciparum*. Os autores concluíram que: (i) a taxa de mortalidade e casos de malária grave em recém nascidos e crianças menores de 5 anos são equivalentes nos dois tipos de infecções; (ii) a infecção por *P. vivax* pode desencadear a angústia respiratória aguda de modo similar a infecção causada por *P. falciparum*; (iii) finalmente, não há diferença nos níveis de incidências de malária cerebral em crianças infectadas com *P. vivax* e *P. falciparum* [26-29]. Assim, a malária vivax tem ganhado destaque diante da comunidade científica, e a quantidade de recursos alocados para pesquisas envolvendo a infecção por *P. vivax*, embora ainda esteja longe do ideal, têm aumento nos últimos anos (WHO 2013).

1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium*.

A fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* é a responsável pela transmissão das formas infectantes do *Plasmodium* ao hospedeiro vertebrado, sendo essas conhecidas como esporozoítos (**Figura 4**). Essas formas são capazes de se movimentarem e rapidamente acessarem a corrente sanguínea em busca do fígado, onde invadem os hepatócitos. O estágio hepático da doença é assintomático e dura por volta de 6 dias. Nesse momento, ocorre a multiplicação dos esporozoítos gerando milhares das formas conhecidas como merozoítos. A etapa hepática encerra-se com a liberação dos merozoítos para a corrente sanguínea onde esses invadem e se desenvolvem dentro dos eritrócitos.

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

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

Um conjunto de mais de 5000 genes permite que esse parasito peculiar passe por metamorfoses dramáticas tornando possível a sua sobrevivência em diferentes ambientes, além de capacitá-lo para ultrapassar as mais distintas barreiras. Cada fase do desenvolvimento do *Plasmodium* representa um alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos e vacinas no intuito de interromper o seu ciclo de vida que é extremamente complexo e ainda parcialmente compreendido. [30] [31].

FIGURA 4

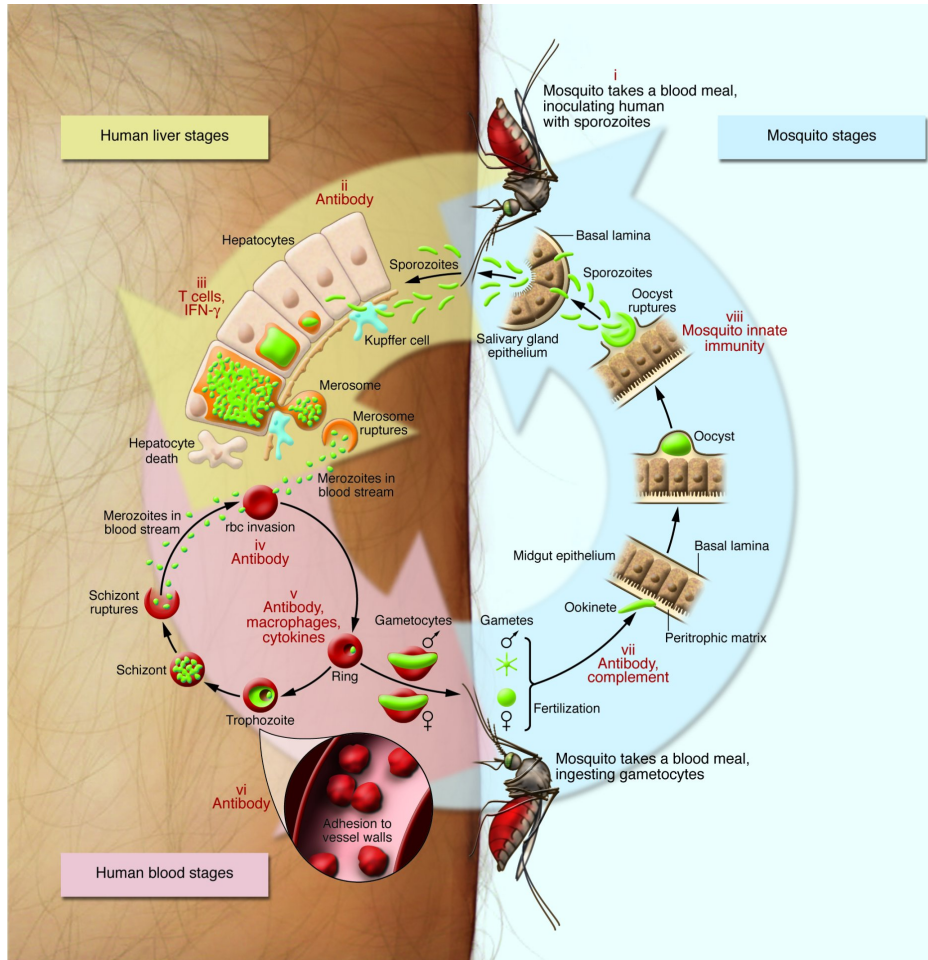


Figura 4: O ciclo de vida do *Plasmodium*, o agente causador da malária.

(i) Depois de ser inoculado na derme humana pelo *Anopheles*, uma forma alongada e móvel do *Plasmodium* conhecida como esporozoíto, consegue escapar dos anticorpos ganhando então a corrente sanguínea. (ii) Posteriormente, essas formas circulam por entre macrófagos e hepatócitos iniciando então o ciclo hepático da infecção. (iii) Os parasitos presentes no interior dos hepatócitos são susceptíveis a atividade citotóxica de células citolíticas (CTLs). (iv) Depois de uma semana aproximadamente, os hepatócitos infectados se rompem liberando merozoítos envoltos por estruturas vesiculares conhecidas como merozossomos. A liberação desses merozoítos “escondidos” dentro dos merozossomos permite que essas formas escapem dos anticorpos, culminando na infecção dos eritrócitos. (v) Durante o estágio intraeritrocítico, os parasitas são susceptíveis a opsonização por anticorpos e fagocitose por macrófagos. A resposta mediada por citocinas tem sido relacionado tanto com a proteção quanto com a severidade da doença durante esse estágio do ciclo de vida do *Plasmodium*. Anticorpos capazes de bloquear a ligação de eritrócitos infectados por *P. falciparum* ao endotélio (vi) podem prevenir a malária cerebral e controlar a parasitemia. Anticorpos humanos específicos para gametócitos (vii) podem ser ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. Esses anticorpos aliados às proteínas do complemento, podem bloquear a transmissão para o mosquito ao eliminar o parasito. A resposta imune inata do mosquito também pode matar o parasito durante a fase de tardia de esporogonia (viii). Caso isso não ocorra, o mosquito estará pronto para infectar um novo indivíduo. (Greenwood, Fidock et al. 2008). 1.3 Resposta imunológica contra o *Plasmodium*.

1.3 Aquisição de imunidade contra o *Plasmodium*.

Uma das características mais intrigantes e peculiares da resposta imunológica durante a malária se refere ao longo tempo em que os seres humanos expostos ao *Plasmodium* demoram para se tornarem resistentes contra os sintomas da infecção, mesmo em áreas endêmicas, onde crianças são expostas a centenas de picadas infectantes anualmente [32]. Em áreas de intensa transmissão, as crianças tornam-se resistentes a forma mais grave da malária somente após os 5 anos de idade. No entanto, essas ainda são susceptíveis a infecção por *Plasmodium*, apresentando episódios febris de malária não grave até atingirem a adolescência. Finalmente, da adolescência à fase adulta, esses indivíduos tornam-se resistentes a malária, e raramente apresentam sintomas clínicos [33]. O longo tempo e o número de episódios necessários para se adquirir resistência contra os sintomas clínicos da malária, torna-se mais marcante quando comparamos a rápida aquisição de imunidade contra vários tipos de infecções virais, (ex, sarampo, rubéola, varíola) após uma única infecção. É importante ressaltar que mesmo adquirindo resistência contra as manifestações clínicas da malária, a resistência a infecção por si, raramente é observada, sendo possível encontrar em indivíduos assintomáticos formas do parasito circulando pelo sangue [33]. Assim, a aquisição de imunidade contra a malária em humanos é complexa, envolvendo um estágio inicial de resistência contra a forma grave da doença, seguido por episódios menos complicados da doença até quadros assintomáticos sem que haja uma imunidade estéril.

Nos últimos 30 anos, um grande esforço tem sido empregado em pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas que confirmam proteção contra a infecção por *Plasmodium* (WMR 2013). Os candidatos vacinais utilizados para desenvolvimento de vacinas contra a malária, são categorizados de acordo com o ciclo de vida do *Plasmodium*, uma vez que a expressão de proteínas de superfície também variam de acordo com a forma de vida desse parasita [34]. Assim, existem candidatos vacinais contra as formas conhecidas como esporozoítas, sendo essas as formas infectantes inoculadas pelo mosquito, e também contra as formas encontradas no fígado. Essa seria a primeira classe de vacina, sendo ela conhecida por alvejar as formas pré-eritrocítica do parasito. Também existem candidatos vacinais contra as formas conhecidas como

merozoítos, as quais são encontradas durante a fase eritrocítica do ciclo de vida do *Plasmodium*. Além disso, estão disponíveis também alguns candidatos vacinais contra o estágio gametocítico do *Plasmodium*, o que em tese poderia prevenir a infecção dos mosquitos, interrompendo assim o ciclo de vida desse parasita [35,36].

Atualmente, a maioria dos recursos têm sido empregado no desenvolvimento de vacinas cujo o alvo são as formas observadas durante a fase pré-eritrocítica, principalmente contra os esporozoítos [37]. Uma resposta imune protetora pode ser prontamente induzida em camundongos [38] em primatas não humanos [39] e também em humanos [40] por meio da exposição do hospedeiro a esporozoítos atenuados por irradiação. Esses esporozoítos irradiados são aptos a infectar os hepatócitos, porém são incapazes de se replicarem, resultando na perda da fase eritrocítica da infecção. Esse mesmo tipo de imunidade estéril também pode ser induzida com esporozoítos atenuados por manipulação genética [41]. Um outro fator que influencia a resposta imune aos esporozoítos, é o número de parasitas e a via de exposição. Mais de 1.000 picadas infectantes são necessárias para o desenvolvimento de uma imunidade esterilizante nos hospedeiros, como descrito nos primeiros estudos com esporozoítos atenuados [40]. Recentemente, foi demonstrado que a inoculação de esporozoítos atenuados por via subcutânea, não é capaz de induzir proteção em humanos [42]. No entanto, se utilizada a via intravenosa, essa exposição pode conferir proteção em modelos animais [42] e em humanos [43]. Os protocolos de imunizações que utilizam esporozoítos atenuados têm conferido proteção somente quando os indivíduos são desafiados com esporozoítos homólogos. Entretanto, é importante considerar que em áreas endêmicas, os hospedeiros raramente são infectados com o mesmo clone do parasita, isso devido a enorme diversidade genética [44].

Em humanos, a infecção experimental com esporozoítos atenuados, induz a produção de anticorpos e também uma resposta celular mediada por linfócito T CD4 e CD8 [43], contra esporozoítos e contra antígenos de fase hepática [45-47]. Os voluntários expostos a esporozoítos e tratados com cloroquina desenvolvem uma proteção completa contra o desafio com esporozoítos, sendo essa proteção observada até 28 meses após a imunização [48,49]. Essa exposição promove a produção de anticorpos, e também uma resposta de células T contra antígenos de

esporozoítos e contra àqueles presentes nas formas de fase sanguínea. Essa proteção tem sido associada com presença de células T de memória efetora produzindo IFN- γ , TNF- α e Interleucina-2 (IL-2) [48,50].

Os resultados positivos observados com imunizações utilizando esporozoítos irradiados, como já descrito acima, estimulou a busca não só de vacinas baseadas em esporozoítos inteiros, mas também baseada em sub-unidades de proteínas provenientes dessa forma do parasita. Até o momento, o melhor candidato vacinal é o composto conhecido como RTS,S/AS01. RTS,S/AS01 é o nome dado à vacina concebida pela fusão da porção C-terminal da proteína de circunsporozoíto do *P. falciparum* com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B [51,52]. No campo, a RTS,S confere uma proteção estéril em 50% dos indivíduos que nunca foram expostos ao *Plasmodium*. No entanto, somente 30% dos recém nascidos e 50% das crianças são protegidas contra a os sinais clínicos da doença, não sendo observada uma proteção duradoura nesses indivíduos [51,52].

Uma questão que surge a partir dessas observações é: por qual motivo os candidatos vacinais, que têm como alvo esporozoítos ou formas da fase hepática, parecem ser mais efetivos em adultos nunca expostos ao *Plasmodium* do que na população até então vista como alvo, ou seja crianças africanas. Existem algumas possíveis explicações, porém nenhuma resposta real. Em primeiro lugar, os indivíduos adultos nunca expostos ao *Plasmodium* que foram estudados, são americanos ou europeus. Deve-se considerar a diferença genética entre indivíduos, principalmente em relação aos alelos de HLA e outros genes associados a resposta imunológica, como por exemplo os genes do Receptores do tipo Toll (TLRs), os quais serão discutidos adiante [53]. Além disso, as coinfeções com outros patógenos (exemplo: helmintos) são comuns em área endêmica de malária, podendo esse fator estar relacionado com a modulação da resposta imunológica específica contra o *Plasmodium* [54]. Também deve ser levado em consideração o estado nutricional bem como a composição da microbiota intestinal das crianças africanas estudadas, sendo esse um aspecto importante em termos de imunomodulação [55].

1.4 Imunidade inata e a imunopatogênese da malária.

As pesquisas no campo da Imunologia voltadas para a infecção por *Plasmodium*, têm sido direcionadas para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz, como descrito no tópico anterior. Assim, os estudos relacionados a imunidade adaptativa durante a malária, têm recebido um foco muito maior do que aqueles associados à imunidade inata. No entanto, é interessante lembrar que os mecanismos da imunidade inata representam a primeira linha de defesa contra os patógenos. Em infecções graves e agudas, tal como a malária, a capacidade do hospedeiro em montar uma resposta imunológica inata eficaz, pode significar a diferença entre a vida e a morte.

Estudos utilizando infecções experimentais em camundongos e em humanos, têm evidenciado que a imunidade inata é essencial para o controle do *Plasmodium*, em sua fase inicial de replicação [56,57]. Durante a infecção por *P. chabaudi*, modelo de malária muito utilizado para estudar a resposta imunológica contra os parasitos da fase sanguínea, esse controle inicial acontece mesmo antes da produção de IgG específicas. Dentro desse contexto, tanto linfócitos T CD4 quanto IFN- γ e IL-12 são imprescindíveis para o controle do parasita na fase aguda [58]. Finalmente, o controle da parasitemia na fase crônica da infecção por *P. chabaudi*, requer tanto linfócitos T CD4 quanto anticorpos específicos, uma vez que a deficiência em linfócitos B, não causa nenhum impacto no controle da parasitemia durante a fase aguda, porém impede a eliminação completa desse parasita da circulação [32].

Um questão chave que ainda precisa ser melhor esclarecida no contexto da malária, é a identidade e o estado funcional da células apresentadoras de antígeno (APCs). Tem sido demonstrado que as células dendríticas (DCs), macrófagos e células B isoladas de camundongos imunes a malária, são capazes de apresentar antígenos para células T [59]. Além disso, durante a infecção por *P. yoelii*, um outro modelo de malária, ocorre um aumento da expressão do Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II (MHC-II) e das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, em macrófagos e DCs provenientes do baço [60]

Visto a importância das DCs como um agente integrador do sistema imune inato e adaptativo, vários estudos tem procurado estabelecer o papel dessas células na resposta natural contra o *Plasmodium* [61]. É válido salientar que o

entendimento desse processo é de fundamental relevância para o desenvolvimento de uma vacina racional. Entretanto, os estudos que relatam o estado funcional dessas células durante a infecção pelo *Plasmodium* (em humanos e roedores) ainda são contraditórios, [62-64] indicando assim, a necessidade do aprimoramento do nosso entendimento a respeito da resposta imune inata durante a malária. Boa parte dessa contradição está associada com o fato de que o tipo de resposta imunológica, pode variar de acordo com a cepa de *Plasmodium* [61]. O estado de maturação e ativação dessas APCs, estão inteiramente relacionados como a sua capacidade em reconhecer moléculas derivadas dos patógenos. Como essas células conseguem fazer esse reconhecimento? Para responder a essa pergunta, é necessário descrever uma das narrativas mais importantes da história recente da imunidade inata.

Como proposto por Janeway em 1989, células do sistema imune inato deveriam apresentar receptores de membrana, os quais seriam capazes de reconhecer moléculas provenientes de patógenos [65,66]. Na verdade, ainda de acordo com as ideias de Janeway, esses receptores deveriam reconhecer padrões moleculares, e com isto, surgiu o termo Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Posteriormente, com a descoberta da proteína *Toll*, descrita inicialmente como responsável pelo estabelecimento do padrão dorso ventral de larvas de *Drosophila melanogaster* [67], foi possível identificar uma nova classe de receptores de membrana sendo eles então chamados de Receptores semelhantes a Toll (TLRs - *Toll-like Receptors*) [68-70]. A partir da observação da semelhança entre a proteína Toll de *D. melanogaster* com o receptor da IL-1 (IL-1R) [71], molécula presente na superfície de membrana de células do sistema imunológico, surgiu a hipótese de que talvez a molécula *Toll* pudesse ter alguma função associada à resposta imunológica. Em 1996, um trabalho liderado pelo Dr. Jules Hoffmann, demonstrou que essa molécula estava associada com a resistência de *D. melanogaster* contra infecções fúngicas [72]. Em 1997, Janeway e Medzhitov demonstraram que um TLR, agora conhecido como TLR4, poderia desencadear a ativação de alguns genes necessários para iniciar uma resposta imune adquirida [73]. Em 1998 Bruce Beutler e colaboradores demonstraram que esse receptor era capaz de reconhecer lipopolisacarídeo (LPS), um PAMP presente na parede de bactérias Gram-negativa, capaz de se

ligar a um receptor de reconhecimento de padrão (PRR) [74]. Acredita-se que a maioria dos mamíferos apresentam de 10 a 15 tipos de TLRs. Até o momento já foram descritos 13 TLRs em humanos e em camundongos [75-77]. Além dos TLRs, existem outros tipos de PRRs como os *NOD-like Receptors* (NLRs) [78], *RIG-I-like Receptors* (RLR) [79] ambos citoplasmáticos, além dos C-Type lectin Receptors (CLRs) [80].

Recentemente foram identificado alguns PAMPs provenientes do *Plasmodium* que podem desencadear uma resposta imunológica quando reconhecidos por PRRs presentes em macrófagos e DCs. Dentre esses, podemos citar as ancôras de GPI, que são reconhecidas por TLR2 [81], e o DNA associado a hemozoína, os quais são reconhecidos por TLR9 [82]. A hemozoína é um produto gerado a partir da biocristalização da alpha hematina liberada após a digestão da hemoglobina pelo *Plasmodium* [83]. Esse cristal além de carrear DNA, também pode ser sentido por NLRP3, um receptor pertencente a família dos NLRs, que serão discutidos mais adiante [84] [85]. A inflamação induzida pelo *Plasmodium*, principalmente em resposta a agonistas de TLRs, tem um papel fundamental no controle da replicação do parasito. No entanto, a resposta inflamatória excessiva tem sido associada com a malária grave e com os casos de mortalidade [86]. Como já dito anteriormente, agonistas de TLR2 e TLR9 foram identificados em *P. falciparum* [81,82] e de modo interessante, pacientes com mutações no gene de TLR2, TLR9 e Mal/Tirap, uma molécula adaptadora responsável por amplificar os sinais provenientes de alguns TLRs, apresentaram uma maior resistência à infecção por *Plasmodium*. Ademais, camundongos deficientes em TLR9 e MyD88, sendo essa última uma outra molécula adaptadora utilizada pela grande maioria dos TLRs, apresentaram uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias. [87-90]. Em 2011 foi demonstrado que o uso terapêutico de antagonistas de TLRs pode aumentar a resistência de camundongos à malária cerebral [91].

As manifestações clínicas da malária são observadas durante o período de reprodução assexuada do *Plasmodium*. Apesar da complexidade e também do nosso pouco entendimento dos mecanismos associados à patogênese da malária, acredita-se que dois processos dirigem esse fenômeno: o sequestro de hemácias infectadas (iRBCs) e a inflamação sistêmica [92]. O sequestro de iRBCs acontece

quanto essas células parasitadas se ligam a receptores do endotélio vascular, via interações específicas, causando obstrução da microvasculatura, isquemia local e inflamação no cérebro e em outros órgãos vitais [93,94]. A infecção por *Plasmodium* também induz uma resposta inflamatória sistêmica semelhante a sepse bacteriana, [95,96] a qual pode exacerbar o sequestro de iRBCs por levar a um aumento da expressão das moléculas de adesão como ICAM-1 [97,98]

Indivíduos que são expostos ao *Plasmodium* pela primeira vez, inevitavelmente respondem a esse processo infeccioso com febre alta, evento o qual é guiado pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12, bem como TNF- α e IFN- γ [99-101].

O termo tempestade de citocinas (*cytokine storm*) foi empregado pela primeira vez em 1994 [102] descrevendo a ideia de que a patologia da malária está intrinsicamente associada à produção descontrolada e sistêmica de mediadores inflamatórios. A relação entre esses mediadores e a malária cerebral tem sido extensivamente estudada, sendo sugerido o TNF- α como o grande vilão [102,103].

O TNF- α induz a expressão das moléculas de adesão intercelular (como ICAM-1) no endotélio cerebral que se ligam à molécula PfEMP1, expressa pelo *P. falciparum* e transferida para a superfície dos eritrócitos infectados [93,104,105]. Esse é um fenômeno chave associado ao sequestro das iRBCs durante a malária cerebral [106-112]. No soro de pacientes infectados com *Plasmodium*, são encontrados níveis elevados de TNF- α e também dos seus receptores 1 e 2 (TNFR1/2) [98,113].

Estudos genéticos mostraram que polimorfismos encontrados no gene de TNF- α estariam associados com alguns aspectos patológicos da malária. Assim, determinados polimorfismos relacionam-se com susceptibilidade à malária cerebral, enquanto outros gerariam resistência à essa condição, mas aumentariam a susceptibilidade à anemia grave [114-118]. Estudos utilizando um inibidor transcricional de TNF- α , o LMP-420, capaz de inibir os efeitos de TNF- α e também da linfotóxina- α (LT α), demonstraram um aumento da resistência à malária cerebral experimental em camundongos [119]. Assim, o TNF- α tem sido

considerado como um dos elementos chave para o desenvolvimento do estado patológico da malária.

Outro mediador inflamatório que também tem sido associado com a patogênese da malária, é o receptor do tipo 1 da citocina IFN- γ (IFN γ R1). Acredita-se que as células *natural killer* (NK) e células T gamma delta ($\gamma\delta$) sejam a principal fonte de IFN- γ durante a malária [120] [121,122] e que essa citocina estaria intimamente ligada com a produção de TNF- α [98,123]. O polimorfismo no receptor IFN- γ R1 foi relacionado com a resistência a malária cerebral em um estudo realizado com pacientes do Gambia [124]. Em camundongos, a proteção contra a malária cerebral experimental foi observada em animais deficientes de IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) ou IFN- γ R1 (IFN- γ R1 $^{-/-}$), e também após o tratamento com anti-IFN- γ [125,126]

Um outro aspecto patológico associado ao distúrbio inflamatório durante a malária é a anemia, que tem sido apontada como a principal causa de internações em hospitais da África. Além disso, esse tipo de quadro patológico desencadeado pela malária, é responsável por mais da metade dos casos de morbidade e mortalidade em crianças abaixo dos cinco anos de idade em regiões endêmicas [127,128]. A anemia observada durante a infecção por *Plasmodium* pode ser classificada da seguinte maneira: (i) anemia não complicada (hemoglobina < 110g/L, hematócrito < 30% e parasitemia periférica) (ii) anemia grave (hemoglobina < 50g/L, hematócrito < 15% e parasitemia periférica). Recentemente foi demonstrado que própria a resposta imunológica é o principal fator da anemia grave observada em crianças infectadas por *P. vivax*, devido ao efeito inibitório das citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α na eritropoiese [129,130]

Muito já tem sido feito no intuito de compreender os mecanismos associados à patogênese da malária, porém ainda há bastante a ser desvendado. O que se pode dizer com segurança é que um dos aspectos relacionados com a morbidade e morte do hospedeiro, é a resposta inflamatória exagerada [110,131], a qual alguns componentes da imunidade inata estão associados [87,88] [82]. Nesse contexto, desvendar a imunopatogênese da malária, bem como os

mecanismos relacionados ao distúrbio inflamatório observado durante a doença, podem gerar uma fonte valiosa de informações e indicar possíveis alvos terapêuticos [91].

1.5 O Inflamassoma: ativação, regulação e função.

Estudos que buscavam identificar genes conservados evolutivamente, indentificaram uma grande família de genes que codificam proteínas com estruturas similares tanto em plantas quanto em animais. Essas moléculas, conhecidas como Receptores do Tipo NOD (NLRs) estão relacionadas com a resistência de plantas à determinadas doenças. [132]. Em animais, os NLRs foram encontrados em uma diversidade de espécies, desde ouriços-do-mar ao seres humanos [133]. Esses receptores são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). São compostos geralmente por três domínios descritos, assim: (i) domínio “pyrin” (PYD) contido na porção N-terminal responsável por interagir com a molécula adaptadora ASC; (ii) domínio ligador de nucleotídeo (NACHT) presente na porção central, responsável pela atividade de dNTPase e oligomerização; (iii) e na região C-terminal encontra-se uma região rica em leucina (LRRs), a qual acredita-se estar relacionada com o reconhecimento dos PAMPs e DAMPs bem como a autorregulação dos NLRs [84,133].

Os NLRs também fazem parte de uma plataforma proteica de grande potencial inflamatório presente no citoplasma celular denominada inflamassoma [134-136]. A ativação da caspase-1, uma cisteína protease, é regulada por essas estruturas multiméricas que são formadas quando cada componente, receptor NLR, molécula adaptadora ASC e pró-caspase-1, são super expressos no citosol [134,136].

ASC é uma molécula adaptadora de 22kd que apresenta um domínio PYD na região N-terminal, e interage com o domínio de PYD do NLR. Na região C-terminal, ASC apresenta um domínio CARD, pelo qual promove o recrutamento de pró-caspase-1, também por meio de uma interação homotípica do tipo CARD-CARD. [137,138]. A deleção de ASC em camundongos revelou que essa molécula é essencial para ativação de caspase-1 e conseqüentemente para geração de IL-1 β em sua forma ativa. Esses achados sugerem que ASC seja um componente efetor chave da via de ativação da caspase-1 [139-144].

Alguns NLRs tem a capacidade de induzir a formação de inflamassoma *in vitro*. Vários estudos tem demonstrado que NLRP1, 2, 3, 6, 12, NLRC4, NOD2 quando super expressos ectopicamente com a caspase-1 e com a molécula

adaptadora ASC, levam a ativação de caspase-1 e ao processamento da pró-IL-1 β . Entretanto, somente alguns “NLRPs-inflamassoma” têm sido bem caracterizados como por exemplo, NLRP1, NLRC4 e NLRP3 sendo esse último o mais estudado [134,137,145,146].

O receptor NLRP3 é constitutivamente expresso em células da linhagem mielóide e tem a sua expressão aumentada em resposta a estímulos provenientes de PAMPs [147]. Uma outra característica desse receptor é a incapacidade de recrutar a pró-caspase-1 sem o auxílio de ASC, pois não possui o domínio CARD [148].

Dentre os ativadores do NLRP3 inflamassoma, pode ser citado o ATP, monossódio de urato (MSU), pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD), cristais de colesterol, polímeros de β -amilóide e possivelmente a glicose [149]. Atualmente, alguns autores descrevem que NLRP3 é capaz de detectar alterações na concentração de componentes intracelulares, porém o mecanismo ainda é desconhecido. Dentre esses componentes pode-se citar o ATP e ácido úrico, que são normalmente observados no citosol das células, e podem gerar uma resposta inflamatória a partir do momento em que são liberados para o meio extracelular. Ao mesmo tempo, NLRP3 parece funcionar como um sensor de moléculas endógenas presentes em locais indevidos, como é o caso de cristais de colesterol e β -amilóide encontrados no citoplasma celular [150].

Além da inflamação estéril, o NLRP3 inflamassoma pode ser observado durante a infecção por bactérias intracelulares como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* [151-153]. Compostos antivirais como R837, R847, RNA bacteriano bem como RNA viral, também são capazes de promover a ativação de caspase-1 utilizando NLRP3 como receptor na formação do inflamassoma [139,154].

Ainda há muito a ser desvendado, no que se refere aos mecanismos associados à formação dos inflamassomas. Atualmente, existem 3 modelos propostos para explicar a formação do NLRP3 inflamassoma, revisado por Kate Schroder e Jurg Tschopp [84] (**Figura 5**).

O primeiro mecanismo proposto, sugere a presença do ATP no meio extracelular como um ponto chave. O ATP extracelular estimula o receptor purinérgico P2X₇ promovendo o efluxo de potássio (K⁺), o que por consequência

leva ao recrutamento de panexina-1 e formação de poro na membrana [155]. Esse poro formado na membrana seria responsável pela entrada de possíveis agonistas do receptor NLRP3, que até então estaria inacessível no meio extracelular [156]. Além disso, eletrólitos como sódio e potássio, tem sido relacionados com a intensa repulsão intermolecular entre monômeros de proteínas em concentrações fisiológicas, uma vez que esses monômeros estão aprisionados em “jaulas” de água devido ao efeito hidrófobo [157]. Desse modo, a diminuição da concentração de potássio pode então favorecer a formação de oligômeros de NLRP3 e ASC. De fato, células cultivadas na presença de concentrações elevadas de KCL não são capazes de ativar caspase-1 tampouco liberar IL-1 β [158]. Talvez a influência de K⁺ na repulsão intermolecular e a diminuição desse eletrólito em resposta a ATP, seja uma explicação possível para a formação do NLRP3 inflamassoma, uma vez que também foi demonstrado que macrófagos derivados de animais deficientes em panexina-1 não apresentam falha na ativação de caspase-1, mediante estímulo com o ATP [159].

O segundo modelo está relacionado com ativadores do NLRP3 inflamassoma, que formam cristais ou estruturas particuladas, como por exemplo MSU, sílica, asbestos, β -amiloide e alum, onde a ingestão dessas partículas por fagócitos, pode levar ao dano lisossomal resultando na liberação de componentes presentes nesse compartimento para o citosol. Desse modo surge a seguinte pergunta, haveria alguma molécula, até então aprisionada no lisossomo, capaz de “despertar” o receptor NLRP3?. A catepsina B, uma protease presente no lisossomo, foi indicada como um possível ligante direto de NLRP3 capaz de levar a formação do inflamassoma [160,161]. No entanto, macrófagos deficientes em catepsina B são plenamente capazes de ativar caspase-1 e maturar IL-1 β em resposta à estruturas particuladas ou cristais [162].

O terceiro modelo leva em consideração um componente microbicida altamente conservado evolutivamente, conhecido como espécies reativas de oxigênio (ROS) [163]. Todas as moléculas que são capazes de promover formação do NLRP3 inflamassoma, também levam à produção de ROS *in vitro*. Por outro lado, se ROS é bloqueado por inibidores químicos, a ativação de caspase-1 é suprimida. [85,162,164-167]. Deste modo, qual é a influência de ROS na ativação do NLRP3 e conseqüentemente na montagem do inflamassoma? A

fonte de ROS nesse modelo ainda não foi bem definida, no entanto a supressão de uma subunidade comum (p22) à NADPH oxidases, pode inibir a ativação do inflamassoma em ensaios *in vitro* [162]. Apesar da forte evidência de que a produção de ROS seja uma peça chave desse quebra cabeça, ainda há uma série de aspectos que precisam de resolução. Por exemplo, alguns agentes indutores de ROS como citocinas, não são incapazes de engatilhar a formação dos inflamassomas por si só. [168]. Além disso, apesar de alguns estudos sugerirem que ROS teria um papel crucial na secreção de IL-1 β , através da ativação do inflamassoma *in vitro*, como descrito acima, estudos *in vivo*, tanto em humanos quanto em animais deficientes na produção de ROS, culminam em um fenótipo inflamatório dependente de IL-1 β . Assim, ROS também começa a ser visto como um agente regulador do processo de ativação do inflamassoma [169,170].

Acredita-se que o domínio LRR do NLRP3 possui um importante papel na atividade de autoinibição desse receptor de modo semelhante ao NLRC4 [171]. Essa inibição parece estar relacionada com a presença das proteínas chaperonas SGT1 HSP90 ligadas ao domínio LRR, evento o qual torna o receptor NLRP3 inativo, porém pronto para responder quando requisitado [172].

Após a ativação do NLRP3, como proposto nos três modelo acima citados, esses receptores se oligomerizam levando ao agrupamento dos domínios PYD, os quais então tornam-se disponíveis para uma interação homotípica com o domínio PYD da molécula adaptadora ASC, que por sua vez, utiliza o seu domínio CARD para recrutar a pró-caspase-1 que sofre uma auto-clivagem, tornando-se então ativa. A caspase-1 ativa é vista sob a forma de um tetrâmero contendo as sub-unidades p10/p20, que agora podem clivar os seus substratos, por exemplo IL-1 β , sendo essa liberada em sua forma madura [84].

Alguns receptores da família dos NLRPs, como o NLRP6 e o NLRP12 ainda não foram bem caracterizados no que se refere a sua capacidade de promover a ativação de inflamassoma. De fato, o que se sabe até o momento é que NLRP12 pode funcionar como um regulador positivo no processo de migração de células dendríticas e como um regulador negativo na via de sinalização não canônica de NF-kB [173,174], enquanto o NLRP6 pode regular negativamente a imunidade inata, principalmente na lamina própria em resposta a microbiota intestinal [175]

Outros dois receptores citosólicos não pertencentes a família dos NLRPs foram descritos como sendo capazes de promover a ativação do inflamassoma e consequentemente ativar a caspase-1 [176]. Esses receptores são conhecidos como “*absent in melanoma 2*” (AIM2) e “*IFN γ -inducible protein 16*” (IFI16). O receptor AIM2 é composto por um domínio pyrin, responsável pelo recrutamento de ASC, e um domínio HIN, sendo esse capaz de se ligar a DNA, ao passo que o receptor IFI16 tem um domínio pyrin e dois domínios HIN. Uma outra molécula conhecida como RIG-I “retinoic acid-inducible gene I” também é capaz de levar à formação do inflamassoma via recrutamento de ASC em resposta a RNA viral [177].

Em 2011, foi demonstrado que a ativação da caspase-1 em decorrência da infecção causada por bactérias Gram-negativa depende da pró-caspase-11 [178], fenômeno o qual foi batizado como a via não canônica da ativação do inflamassoma. O mecanismo pelo qual a caspase-11 promove a ativação de caspase-1 em resposta a infecções bacterianas (Gram - negativa), e também qual seria a sequência de sinais intracelulares necessários, são elementos que ainda precisam ser melhor investigados. Foi demonstrado que a caspase-11 interage com a cofilina, proteína responsável pela polimerização/despolimerização do filamentos de actina, regulando assim a fusão do fagossomo com o lisossomo, culminando na degradação das bactérias. Esse evento então favorece a liberação da flagelina no citoplasma, e consequentemente a ativação do NLRC4 inflamassoma e amaturação da caspase-1 [179]. A via não canônica da formação do inflamassoma é ativada por uma grande variedade de bactérias Gram-negativa, mas não por Gram-positiva, sugerindo que esse possa ser um mecanismo conservado para detectar esse tipo específico de patógeno.

FIGURA 5

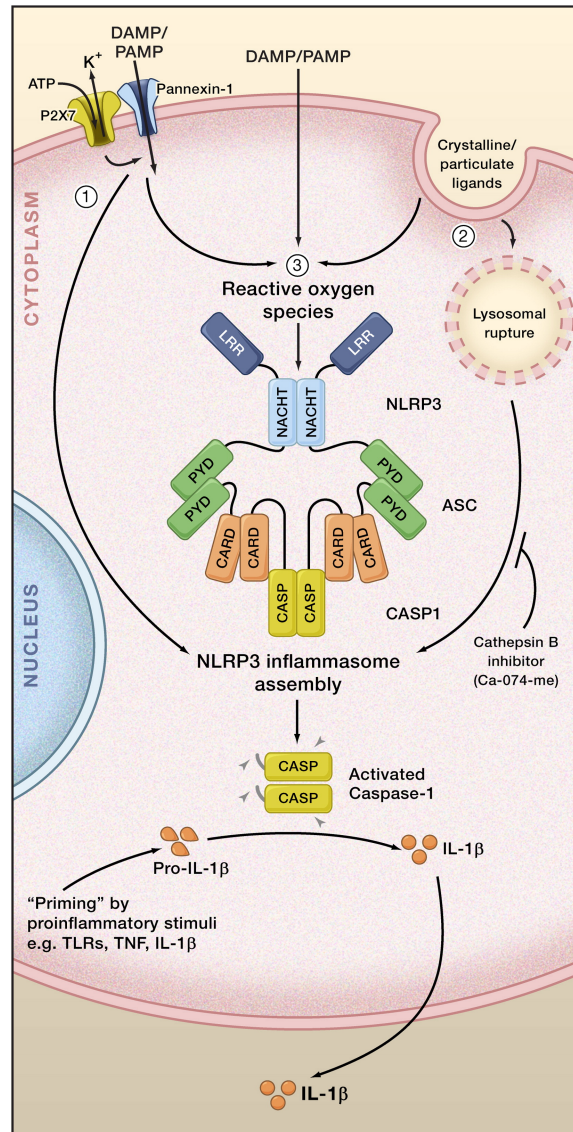


Figura 5: Os três principais modelos propostos para explicar a formação do NLRP3 inflamassoma.

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

ativação de caspase-1 de modo dependente de NLRP3, apesar desse evento ainda ser bem contraditório [84].

1.6 Caspase-1 ativa, distúrbios inflamatórios e a malária.

Mais de 70 mutações no gene NLPR3 foram identificadas, sendo essas relacionadas com as conhecidas “cryopyrinopatias” ou síndromes da febre periódica associado a “cryopyrin” (CAPS) [180,181]. PBMCs de pacientes que sofrem de CAPS secretam uma grande quantidade de IL-1 β espontaneamente ou após determinado estímulo ativador de NLRP3 [182]. Os sintomas característicos observados em pacientes com algum tipo de CAPS, como a recorrente urticária, artralgia, perda auditiva, conjuntivite e febre, são praticamente eliminados com o tratamento feito com o Anakinra, um antagonista de IL-1R, ou qualquer outra estratégia que possa impedir a sinalização de IL-1 β [183-185] [186]. Essas mutações são observadas em maior frequência no domínio relacionado com a regulação da montagem dos inflamassomas, NACHT, e em uma pequena porcentagem na porção LRR. Uma mutação nesse domínio proporciona a desregulação da montagem dessas estruturas podendo levar a um aumento dessas plataformas no citosol de modo espontâneo [187].

Animais contendo algumas mutações no NLPR3 foram gerados para disponibilizar modelos para o estudo de CAPS. O fenótipo comum entre todas as linhagens desenvolvidas foi o aparecimento de eritema e abscesso marcado por uma intensa atividade inflamatória. Os níveis de IL-1 β , TNF- α bem como a produção de IL-17, mostraram-se elevados nos sítios de inflamação. A importância da IL-1 β nesse processo patológico, foi revelada quando esses animais tiveram a sinalização dessa citocina inibida, seja por fármaco ou por manipulação genética, e apresentaram uma consequente melhora nos sintomas clínicos [188,189].

A hiperuricemia crônica e, conseqüentemente, a deposição de cristais de MSU nas articulações, características da doença gota, induzem uma potente resposta inflamatória caracterizada pelos níveis elevados de IL-1 β , TNF α e IL-18 [190,191]. Foi observado que a injeção de cristais de MSU no peritônio de camundongos induz uma forte inflamação de modo dependente de neutrófilo, NLRP3 e IL-1R [190]. Além disso, ensaios clínicos utilizando um antagonista de IL-1R em pacientes sofrendo de gota aguda, levou a uma significativa melhora dos sintomas [192].

Agregados insolúveis de β -amiloide estão associados com doenças neurodegenerativas, como por exemplo a Doença de Alzheimer [193,194]. Em 2008 foi constatado que a presença extracelular dessa proteína mal dobrada em placas senis, e somente sob a forma fibrilar, induz uma resposta inflamatória por macrófagos residentes de modo dependente do NLRP3 [160].

Um outro exemplo de um indutor de inflamação estéril são os cristais de colesterol, funcionando como DAMPs quando capturados por macrófagos. Estudos recentes, têm mostrado que a deposição de cristais de colesterol coincide com a infiltração de macrófagos para o interior da placa aterosclerótica. Ademais, a produção de IL-1 β por macrófagos em resposta a cristais de colesterol ocorre de maneira dependente do NLRP3 [195].

Recentemente foi demonstrado que a molécula adaptadora ASC tem uma atividade extracelular funcionando de modo semelhante a um “*prion*”, sendo capaz de propagar a inflamação [196,197]. Foi demonstrado que após a morte celular inflamatória conhecida como piroptose, os aglomerados de ASC acumulam no espaço extracelular, local onde esse agregado ainda consegue ativar IL-1 β . Além disso, foi demonstrado que a fagocitose do ASC oligomerizado induz dano lisossomal e conseqüentemente a oligomerização de novas moléculas de ASC, que até então estavam difundidas no citoplasma. Finalmente, foi demonstrado que esses agregados e auto-anticorpos contra ASC, podem ser encontrados em fluídos corpóreos de tecidos inflamados de pacientes, e de camundongos como algum tipo de patologia autoimune [196].

Estruturas cristalinas ou particuladas provenientes de fontes exógenas também são capazes de promover inflamação estéril de modo dependente do NLRP3. Isso tem sido observado, por exemplo, durante a exposição ocupacional à asbesto e sílica que são responsáveis pela indução da inflamação nos pulmões, podendo levar a doenças crônicas e debilitantes. Essas partículas são fagocitadas por macrófagos desencadeando a secreção de altos níveis de IL-1 β proveniente da ativação da caspase-1, em um fenômeno que possui o receptor NLRP3 com um ponto chave. Corroborando com esses dados, foi observado que animais deficientes em NLRP3 (NLRP3^{-/-}) são menos susceptíveis à lesão pulmonar induzida por sílica e asbestos, diminuindo a infiltração de neutrófilos e a produção de citocinas [161,162,164,198].

A hemozoína é um cristal formado a partir da biocristalização dos grupamentos heme, em decorrência da digestão da hemoglobina pelo *Plasmodium* [199,200]. Dostert e colaboradores mostraram que essa estrutura poderia providenciar sinais de perigo levando a ativação de caspase-1 de modo dependente de NLRP3 *in vitro*. Foi demonstrado que a fagocitose, a produção de ROS e o efluxo de K^{2+} são fatores limitantes para ativação de caspase-1 por hemozoína [85,201]. No entanto, até o momento não havia ainda nenhuma evidência de que a infecção por *Plasmodium in vivo* poderia levar a formação do inflamassoma.

1.7 Coinfecções: *Plasmodium* Vs Bactérias

Infecções bacterianas invasivas têm sido associadas com o aumento da frequência de mortalidade de crianças com malária grave na África Subsaariana [202-206]. Recentemente foi demonstrado que a malária aumenta a predisposição de crianças residentes de áreas endêmicas a infecções bacterianas [207]. Visto o risco desse tipo de coinfecção, a combinação de antibióticos e anti-maláricos, tem sido empregada em pacientes que apresentam um quadro de malária grave. No intuito de evitar a progressão negativa do quadro clínico, os antibióticos também têm sido utilizados em pacientes cujo sintomas não apontam para o quadro de malária grave [208] (WHO 2010).

Os patógenos encontrados com maior frequência no sangue dos pacientes com malária grave durante infecção por *P. falciparum*, são diferentes espécies de *Salmonella* não tifóide e outros tipos de bactérias Gram-negativa [203-206]. Até que ponto existe uma relação causa e efeito entre esse dois tipos de infecções, é algo ainda praticamente desconhecido. Em modelos experimentais utilizando animais como hospedeiro, foi demonstrado que a produção da molécula heme oxigenase 1 (HO-1) resulta em uma diminuição da produção de ROS e consequentemente aumenta a predisposição do hospedeiro a *Salmonella* [209]. Em humanos, os dados disponíveis são provenientes de relatos de episódios de coinfecções em áreas endêmicas, os quais são difíceis de interpretar, uma vez que não se sabe exatamente qual infecção foi a primeira a se instalar. Enfim, como já dito, episódios de coinfecções normalmente estão associados com as complicações clínicas progredindo para malária grave, sendo um terço das

mortes atribuídas a alta taxa de bacteremia [210]. Ainda é preciso entender melhor qual é a natureza dessa relação e seus aspectos celulares e moleculares e também se a infecção por *Plasmodium* pode realmente favorecer a infecção por esses organismos oportunistas [211,212]

2 - Justificativa

A malária é uma das doenças mais devastadoras do mundo, causando a morte de mais 600.000 pessoas anualmente. Os sintomas clínicos, bem como a morbidade e a mortalidade do hospedeiro, estão intimamente associados com liberação de citocinas pró-inflamatórias, em decorrência da resposta imunológica contra moléculas derivadas desse parasita. Além disso, existem vários relatos onde os episódios de coinfeções bacterianas, principalmente aqueles causados por bactérias Gram-negativa, têm aumentado significativamente o grau de morbidade e a taxa de mortalidade dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas de malária. É importante ressaltar que a relação entre esses dois tipos de infecções ainda não está bem esclarecida.

O inflamassoma é uma plataforma multiproteica de alto potencial inflamatório, que é ativado no citoplasma celular em resposta a uma grande variedade de estímulos. Alguns dados secundários da literatura indicam a hemozoína como mais uma estrutura capaz de promover ativação do NLRP3 – inflamassoma. Assim, esse trabalho foi concebido no intuito de compreender melhor a biologia dessa estrutura durante a infecção *in vivo* por *Plasmodium*, tanto no modelo experimental murino quanto na infecção natural em seres humanos. Além disso, esse projeto pretende investigar as reais implicações da ativação da caspase-1 durante a malária, e também em episódios de coinfeções bacteriana. Assim, esse estudo busca decifrar mais uma peça desse enorme quebra cabeça que é a resposta imune inata contra o *Plasmodium*, e sua relação com o processo de patogênese da malária

3-Objetivos

3.1 Objetivo geral.

Investigar o processo de formação do inflamassoma e a consequente ativação da caspase-1 durante a infecção por *Plasmodium*, definindo os mecanismos e as moléculas envolvidas, bem como o seu impacto na patogênese da malária.

3.2 Objetivos específicos.

- Verificar se a infecção experimental por *P. chabaudi* pode desencadear a ativação de caspase-1.
 - Identificar as possíveis moléculas envolvidas na formação do inflamassoma;
 - Definir qual seria a população celular envolvida nesse evento.

- Verificar o papel dos TLRs na formação do inflamassoma e consequentemente na ativação da caspase-1, bem como na produção de IL-1 β durante a infecção por *P. chabaudi*

- Verificar se as citocinas chave do processo de imunopatogênese da malária, IFN- γ e TNF- α , tem alguma função reguladora na ativação da caspase-1 e na produção de IL-1 β durante a infecção por *P. chabaudi*.

- Verificar se a malária humana causada pelo *P. vivax* e pelo *P. falciparum*, é capaz de desencadear a ativação da caspase-1.

- Definir fonte celular de caspase-1 ativa, além de identificar quais moléculas estariam associadas à formação do inflamassoma em humanos infectados por *Plasmodium*.

- Investigar as possíveis implicações da ativação da caspase-1 e a produção de IL-1 β , durante a malária experimental, e em episódios de coinfeções bacterianas.

4-Materiais e Métodos

4.1 Reagentes.

O LPS O55:B55, proveniente de *E.coli*, a nigericina e o tampão de lise RIPA para *western blot* foram adquiridos junto a SIGMA. O kit para detecção de caspase-1 em sua forma ativa, por citometria de fluxo, foi adquirido junto a ImmunoChemistry Technologies, LLC (número de catálogo 98). Os anticorpos anti-caspase-1 humano (SC-515) e de camundongo subunidade p10 (SC-514), anti-ASC (SC-22514-R e SC-271054) foram comprados da Santa Cruz Biotechnology, e o anti-actina (A2066), foi comprado da SIGMA. O anti-caspase-1 (p20) foi doado pela Genentech. O anti-NLRP3 (ab4207 e ab17267), -NLRP12 (ab64928 e ab57906), -NLRC4 (ab99860), e os anticorpos secundários anti-IgG de coelho Texared (ab6800), de anti-IgG de cabra Texared (ab6883), anti-IgG de cabra FITC (ab6881), e anti-IgG de rato FITC (ab7057) foram adquiridos junto a Abcam. Os anticorpos secundários utilizados nos ensaios de *western blot* foram comprados da KPL. O Ficoll-Paque foi comprado junto a GE Healthcare, e o agente “crosslinker disuccinimidyl suberate” foi obtido junto a Thermo Scientific (número de catálogo 21658). Inibidor de protease (livre de EDTA) foi comprado da Roche e os meio de cultura RPMI e DMEM comprados da Gibco. Kits para dosagem de citocinas por ELISA e por citometria de Fluxo (Kits CBA) foram obtidos a partir da R & D Systems e BD Biosciences, respectivamente. Para citometria de fluxo, alguns anticorpos monoclonais (mAbs) utilizados em amostras de camundongos foram comprados da BD Biosciences sendo eles: CD11c-PE (cat-557401), CD11b-PE (cat-557397), CD3-FITC (cat-553062), B220-APC (cat-561880) e outros da eBioscience: MHC-II-PercpCy5 (cat 15-5321-82) e F4 / 80-APC (cat 17-4801-82) CD4-PE (Cat 12-0041), CD8-PE (cat-12 008-81) e NKG2D-PE (cat-12-5872). Os mAbs utilizados em citometria de fluxo para avaliação de amostras humanas são provenientes da BD Biosciences: CD16-FITC (cat-555969), CD14-APC (cat-561708), CD19-FITC (cat-555412) e também da eBioscience: CD3-FITC (cat-55332), CD4-PE-Cy5 (cat-555348), CD8-PE-Cy5 (cat-555368), CD1c-APC (cat-17-0015), CD123-PercpCy5. 5 (cat-45-1239), CD303-FITC (cat-11-9818-42), CD56-PE (cat-9.012-0.567). Para purificação de monócitos humanos foi utilizado o “EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 Depletion” adquirido junto a STEMCELL Technologies (número de catálogo: 19058). Para o enriquecimento de células CD11b e CD11c positivas de

camundongos foram utilizado os kits “EasySep™ Mouse CD11b Positive Selection Kit” (catálogo: 18770) e o EasySep™ Mouse CD11c Positive Selection Kit II” (catálogo: 18780) respectivamente, ambos provenientes da STEMCELL Technologies.

4.2 Pacientes.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou e também pelo Comitê de Ética e Pesquisa Brasileiro (CEP 096/09 CONEP: 15653). Pacientes infectados por *Plasmodium* foram atendidos na clínica de malária, sendo essa parte do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Porto Velho, Brasil. Essa é uma região endêmica de malária pertencente a bacia amazônica. A constatação da infecção por *Plasmodium* foi definida por meio da avaliação microscópica convencional utilizando lâminas de gota espessa. Essa avaliação foi feita por microscopistas com experiência em diagnósticos de malária em área endêmica. Além disso, a confirmação da infecção foi feita por PCR, não sendo identificado casos de infecções mista. O número de pacientes utilizados está descrito nas figuras correspondentes. Os pacientes que apresentaram no mínimo 100 formas de *Plasmodium* por gota espessa foram convidados a participar do estudo. Imediatamente após a confirmação da infecção por *Plasmodium*, o sangue era coletado para obtenção de células mononucleares do sangue periférico. No caso da infecção por *P. vivax*, os pacientes foram tratado com cloroquina (150mg) a cada 8 horas durante 3 dias. Em associação ao uso da cloroquina, os pacientes também foram tratados com primaquina (15mg) durante duas semanas. No caso de pacientes infectados com *P. falciparum* os mesmos foram tratados pela associação das drogas Arteméter (20mg) e Lumefantrina (120mg) a cada 8 horas durante 3 dias. Entre 30-40 dias após o início do tratamento os pacientes retornavam para verificação da cura parasitológica, avaliada por microscopia. Imediatamente após essa confirmação o sangue desses pacientes eram coletados e utilizados como controle. Indivíduos saudáveis residentes de Porto Velho foram incluídos como controles adicionais.

4.3 Modelo murino de malária e linhagens de camundongos.

Todos os experimentos envolvendo animais estão em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela Associação Americana para Uso de Animais de Laboratório (AALAS) e também com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Conselho Nacional de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br/>) e da Lei Federal 11.794 (08 de outubro de 2008). Todos os protocolos desenvolvidos para este trabalho foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais Institucional (IACUC) no UMMS (ID - 2371-12), (ID - 1369-1311) e também foram aprovados pelo Conselho de Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo Ceua 38 / 10-3). Um modelo não letal de malária foi utilizado em todo estudo envolvendo camundongos. A cepa *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS é mantida congelada em nitrogênio líquido. Esse parasito foi mantido viável por passagens semanais. Após 12 passagens consecutivas uma nova alíquota era descongelada. Os animais utilizados nos experimentos foram infectados por via intraperitoneal com 10^5 hemácias parasitadas [213]. Os animais C57BL/6 bem como IFN- $\gamma^{-/-}$ TNFR1 $^{-/-}$ foram originalmente adquiridos junto aos Laboratórios Jackson. Os camundongos MyD88 $^{-/-}$ foram gentilmente disponibilizados pelo Prof. S. Akira (Universidade de Osaka). Os camundongos ASC $^{-/-}$, Casp-1 $^{-/-}$ e NLRC4 $^{-/-}$ foram doados pelo Prof. D. Zamboni (Universidade de São Paulo). Os animais NLRP3 $^{-/-}$, NLRP12 $^{-/-}$ e AIM2 $^{-/-}$ foram disponibilizados pelos colaboradores desse trabalho, sendo esses parte do corpo docente da Escola de Medicina da Universidade de Massachusetts. Os camundongos B6.129 foram comprados diretamente dos Laboratórios Jackson (Maine-USA). A idade desses animais sempre estava em torno de 8-12 semanas. Todos os animais foram acondicionados sob condições livres de patógenos do biotério do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG e também no biotério da Escola de Medicina de Universidade de Massachusetts, UMASSmed.

4.4 Ligadura e punção sub-letal do ceco (*sub-lethal cecal ligation and puncture*) (SL-CLP) e a infecção com *S. typhimurium*

Para o processo de ligadura e punção sub-letal do ceco (SL-CLP), os camundongos foram anestesiados com xilazina e quetamina, e posteriormente

submetidos a uma incisão na região anterior do abdômem para a exposição e ligação do ceco, o qual foi posteriormente furado 2 vezes com uma agulha de 22-gauge. A carga bacteriana no exsudato peritoneal e no sangue foi avaliada 24 horas depois do SL-CLP de acordo com a contagem de cfu em placas de petri com ágar Mueller – Hinton [214]. Para infecção com *Salmonella*, os camundongos foram infectados por via oral (gavagem) com 10^8 cfu de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028). Três dias após a infecção, foi feita a contagem de cfu em placas ágar MacConkey onde foi adicionado 100µl de sangue previamente diluído (diluição logarítmica) [215].

4.5 Separação de PBMCs e monócitos

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes foram obtidas por meio de separação por densidade utilizando Ficoll-Paque Plus de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). As células foram acondicionadas em placas de cultura de 96 poços sendo a densidade de 2×10^5 células/poço em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 10µg de ciprofloxacina (Cellofarm) para cada ml. O sobrenadante da cultura foi coletado para dosagem citocinas 24 horas após o estímulo, como indicado na figura. Os monócitos utilizados em ensaios de microscopia confocal foram selecionados negativamente em um ensaio baseado em imunomagnetismo com micropartículas e anticorpos, seguindo as recomendações do fabricante STEMCELL Technologies (número de catálogo: 19058).

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

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

Células do baço de camundongos infectados foram marcados com as seguintes combinações de anticorpos: Macrófagos (CD11b/F480), células dendríticas (CD11C/MHC-II) linfócitos T ($CD4^+$) e ($CD8^+$), linfócitos B ($B220^+$) e células NK ($NKG2d^+$). Todas as amostras também foram marcadas com o reagente FLICA para avaliar a presença da caspase-1 ativa. A aquisição dos

dados foi feita por citometria de fluxo, sendo os dados analisados com o auxílio do software Flowjo. Utilizando os parâmetros de tamanho e granulidade a população de PBMC foi delimitada de modo que se pudesse excluir a contaminação de PMN.

4.7 Preparação do lisado celular.

O baço de animais infectados foram assepticamente removidos e macerados mecanicamente passando por uma malha de nylon (70 μ m), nos dias de infecção indicados nas figuras. Após a lise das hemácias, as células totais foram ressuspendidas em 1 ml de RPMI com 1% de gentamicina (Schering Plough) sendo feita a quantificação utilizando uma câmara de Neubauer. Para cada "pellet" contendo 40 x 10⁶ células foi adicionado 250 μ l de Ripa buffer enriquecido com inibidor de protease livre de EDTA seguindo as orientações do fabricante. PBMCs isolados de pacientes também foram lisados utilizando Ripa buffer enriquecido, seguindo as mesmas proporções número de células/volume de RIPA. Após 15 minutos em descanso no gelo, os lisados foram coletados e acondicionados em tubos Eppendorf e centrifugados a 13 000g durante 20min a 4°C. A quantidade de proteína total foi quantificada pelo método de Bradford seguindo as orientações do fabricante.

4.8 Eletroforese e *Western blot*.

As proteínas presentes nos lisados celulares foram separadas em gel de 15% ou 12% de acrilamida por SDS-PAGE e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, U.K.). As membranas foram bloqueadas *overnight* à 4°C em PBS contendo 5% (w/v) de leite em pó desnatado e 0.1% de Tween 20. Essas membranas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0.1% de Tween 20 e então incubadas com o anticorpo primário indicado em cada figura. Os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 5% (w/v) de leite em pó desnatado e 0.1% de Tween 20. Depois de lavadas, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP e reveladas utilizando-se o sistema quimioluminescente ECL Plus de acordo com as orientações do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

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

Os PBMCs isolados de pacientes foram ressuspensos em 250µl de uma solução hipotônica (10mM Hepes pH7.9; 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.2mM PMSF, 0.5mM DTT, mais o inibidor de protease Roche). As amostras foram incubadas durante 15 minutos no gelo e submetidas a 80 ciclos de homogeneização no homogeneizador Kontes (22mm). Posteriormente essas amostras foram centrifugadas a 1800g por 30seg, e o sobrenadante coletado. Adicionou-se o mesmo volume da solução hipotônica nesses sobrenadantes os quais então foram centrifugados novamente durante 8 minutos a 10.000g. Depois da centrifugação, os *pellets* foram ressuspensos em 500µl de solução CHAPs *buffer* (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, e 0.1% CHAPs, 0.1 mM PMSF, mais inibidor de protease da Roche) e novamente centrifugados durante 8min a 10.000g. Esse processo foi repetido por duas vezes. Finalmente os *pellets* foram ressuspensos em 200µl de CHAPs *buffer* onde foi adicionado 4µl do agente *crosslinker* DSS à 100mM, chegando então na concentração final de 2mM. As amostras foram então incubadas por 30 minutos protegidas da luz e a temperatura ambiente. A reação foi parada quando adicionado 20ul de tampão de amostra 6x. Os oligômeros de ASC foram então resolvidos em gel de acrilamida 12% e 15% em SDS-PAGE.

4.10 Dosagem de citocinas.

Todas as citocinas de camundongos foram dosadas utilizando kits comerciais de ELISA (R&D Systems). Os limites de detecção variaram de 15,6 – 1000 pg/ml para IL-1β; e 31,2 – 2000 pg/ml para TNF-α e IFN-γ. Para dosagem de IL-1β humana foi utilizado um kit de ELISA da Ebioscience no qual o limite de detecção variou de 4 - 500pg/ml.

5-Resultados

5.1 A caspase 1 é ativada em macrófagos e em células dendríticas durante a infecção por *P. chabaudi*, sendo esse fenômeno dependente de ASC.

No intuito de verificar se a infecção por *Plasmodium* poderia levar a ativação da caspase-1, foi utilizado um modelo não letal de malária murina, *P. chabaudi*. Inicialmente, os esplenócitos dos animais no 7º dia de infecção, foram utilizados para o preparo dos lisados celulares, os quais foram empregados em ensaios de *western blot*. De modo consistente, os ensaios de *western blot* evidenciaram que a infecção *in vivo* com *P. chabaudi*, fornece sinais suficientes para ativação de caspase-1, sendo esse fato dependente da molécula adaptadora ASC (**Figura 6A**). Como os ensaios de *western blot* foram realizados utilizando amostras provenientes do lisado de esplenócitos, não se poderia dizer em qual população celular essa protease estaria sendo ativada. Assim, visando investigar tal aspecto, foram utilizados marcadores para linfócitos T e B, células NK, macrófagos e células dendríticas, e também um inibidor de caspase-1 ativa acoplado a carboxifluoresceína (FAM-YVAD-FMK), que chamamos aqui como reagente FLICA. As marcações de superfície, associadas ao reagente FLICA, permitiu identificar em qual população celular essa protease estava sendo ativada, em ensaios de citometria de fluxo. Foi possível observar que durante a infecção por *P. chabaudi* a caspase-1 é ativada somente em macrófagos (CD11b⁺/F480⁺) e em células dendríticas (CD11c⁺/MHC-II⁺) (**Figura 6B**), não havendo diferença nas demais populações avaliadas quando se compara o perfil dos animais selvagens infectados ou não (**Figura 6C**).

FIGURA 6

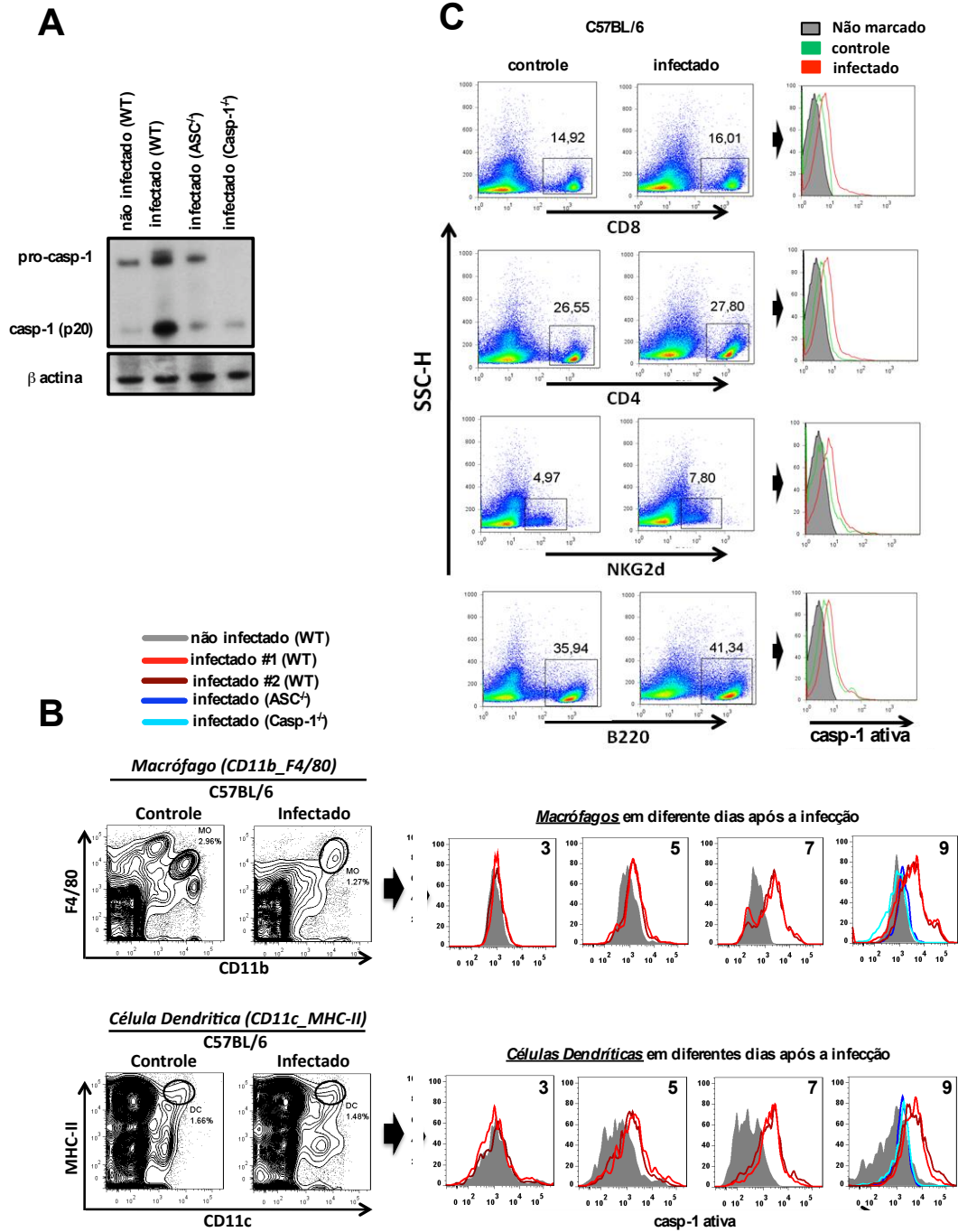


Figura 6: Caspase-1 é ativada durante a infecção por *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} foram infectados via i.p. com 10⁵ hemácias parasitadas (iRBCs) por *P. chabaudi*. **(A)** Sete dias após a infecção os esplenócitos desses animais foram lisados, gerando assim as amostras que foram utilizadas em ensaios de *western blot*. Esses resultados são representativos de 2 ensaios diferentes, com resultados similares, onde foram utilizados 3 animais por grupo. **(B)** Em diferentes dias após a infecção (3, 5, 7 e 9) e **(C)** no 7 dia de infecção, células do baço dos animais infectados foram marcadas no intuito de identificar macrófagos (CD11b⁺_F4/80⁺), células dendríticas (CD11c⁺_MHC-II⁺), linfócitos T (CD8⁺ ou CD4⁺), células NK (NKG2d⁺) linfócitos B (B220⁺). Essas células também foram marcadas com o reagente FLICA no intuito de identificar a presença de caspase-1 ativa. Esses resultados são representativos de 3 experimentos independentes nos quais foram utilizados 3 animais por grupo.

No intuito de definir se as células que estariam ativando caspase-1, também teriam a capacidade de produzir e secretar IL-1 β em sua forma ativa, foi utilizado um kit de purificação baseado em micropartículas magnéticas (EasySep), para obtenção de células CD11c⁺ bem como células CD11b⁺ do baço de animais infectados. Após o processo de enriquecimento, o grau de pureza dessas células foi checado por citometria de fluxo (**Figura 7A lado esquerdo**). Posteriormente, essas células foram colocadas em cultura por 18h, e a dosagem de IL-1 β foi feita a partir do sobrenadante dessa cultura. Diferente das células CD11c⁺, as células CD11b⁺ foram capazes de secretar IL-1 β sem a necessidade de um segundo estímulo *in vitro*. No entanto, na presença de um potente indutor de pró-IL-1 β , as duas populações celulares quando provenientes de animais infectados, foram capazes de secretar níveis elevados dessa citocina na sua forma ativa (**Figura 7A lado direito**)

Em ensaios *in vivo*, a presença de IL-1 β no soro em sua forma ativa, mostrou-se aumentada quando se compara animais não infectados com animais infectados com *P. chabaudi* (**Figura 7B**). Curiosamente, esse aumento causado somente pela infecção por *P. chabaudi*, não foi significativo ao se comparar animais C57BL/6 com os animais deficientes para ASC (ASC^{-/-}) e Caspase-1 (Casp-1^{-/-}) (**Figura 7B**). No entanto, quando foi inoculado baixos níveis de LPS (10 μ g) em camundongos C57BL/6 infectados, pode-se observar altos níveis de IL-1 β circulante nove horas após à esse desafio. Por outro lado, animais deficientes em componentes do inflamassoma como ASC (ASC^{-/-}) e a Caspase-1 (Casp-1^{-/-}) e animais selvagens não infectados, apresentaram baixos níveis dessa citocina, mesmo após o inóculo de LPS (**Figura 7B**). Finalmente, foi demonstrado que o inóculo de LPS *in vivo* de fato promove a expressão de pró-IL-1 β que agora, frente a presença da caspase-1 ativada pela malária, pode ser maturada e secretada para o plasma (**Figura 7C**). É importante lembrar que LPS é um dos componentes da parede celular de bactérias Gram-negativa, sendo esse tipo de patógeno frequentemente encontrado no sangue de pacientes com malária grave [216].

FIGURA 7

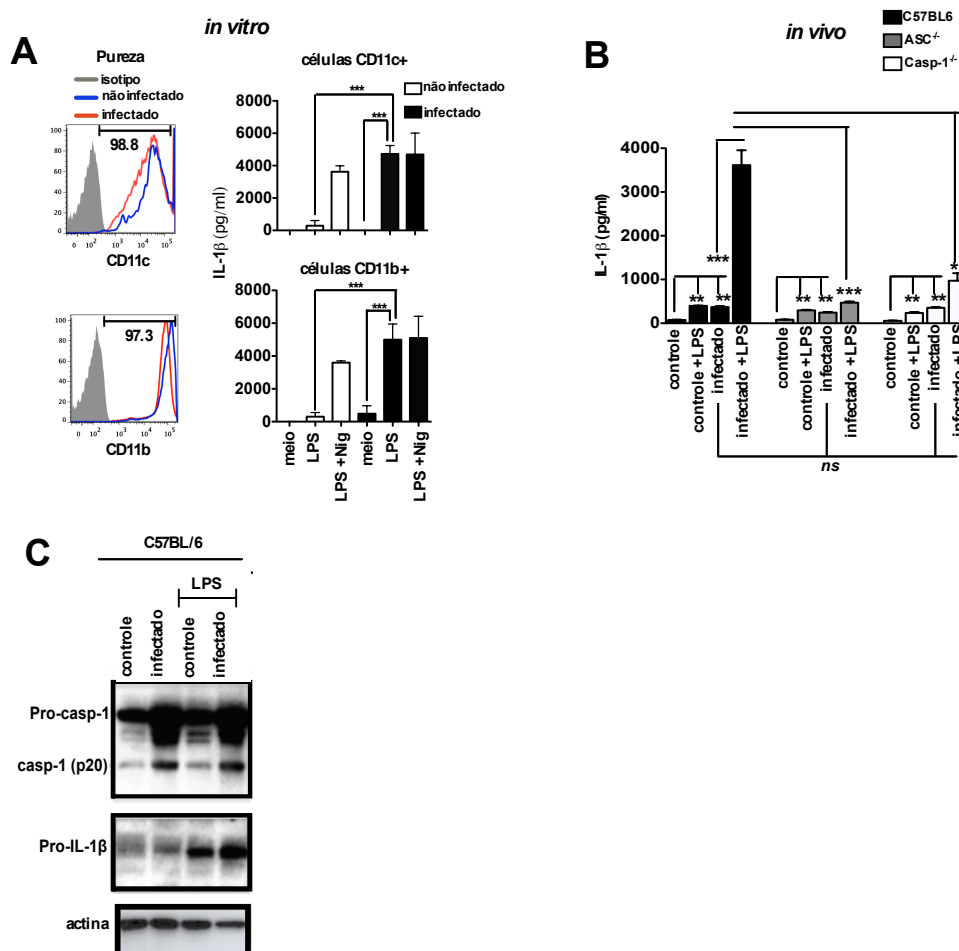


Figura 7: Células CD11c⁺ e CD11b⁺ provenientes de animais infectados são capazes de secretar altos níveis de IL-1 β após o estímulo com LPS.

(A) Após 7 dias de infecção com *P. chabaudi*, células CD11c⁺ e CD11b⁺ do baço de animais C57BL/6 foram enriquecidas utilizando o sistema “EasySep” onde foram empregado micropartículas magnéticas. Posteriormente, essas células foram incubadas por 18h com LPS (1 μ g/ml) e o sobrenadante da cultura utilizado para dosagem de IL-1 β . Como controle positivo foi utilizado o estímulo de LPS, na mesma concentração e tempo descrito acima + nigericina a 5 μ M durante 30min. Esse resultado é representativo de dois experimentos independentes com resultados similares. As diferenças estatísticas são indicadas por (***) p -value < 0.0005 obtido pelo teste *t student*. Foram utilizados 5 animais por grupo.

(B) Animais infectados por *P. chabaudi* receberam um inóculo de 10 μ g de LPS no 7º dia de infecção. Nove horas após à esse inóculo, o soro desse animais foram coletados para a dosagem de IL-1 β . Esses resultados são a média de 15 animais provenientes de 3 experimentos independentes. As diferenças significativas são

indicadas por (***) $p\text{-value}=0.0008$) e (** $p\text{-value}=0.0023$) obtido pelo teste *t student*. **(C)** Animais no 7° dia infecção com *P. chabaudi* ou não infectados, foram desafiados com 10 μ g de LPS (i.v). Duas horas após à esse desafio, os baços desses animais foram coletados e então lisados para obtenção de amostras para ensaios de *western blot* para detecção de caspase-1 e pró-IL-1 β .

5.2 A sinalização via TLR9/MyD88 é um evento fundamental para a formação do inflamassoma, ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 β durante a infecção por *P. chabaudi*.

A atividade do inflamassoma bem como a disponibilidade da pró-IL-1 β , são altamente influenciados pela integração das vias de sinalização pró-inflamatórias, como aquelas dirigidas por TLRs [217]. Normalmente, quando se estuda a ativação do inflamassoma, principalmente *in vitro*, é utilizado o efeito *priming* [218], para garantir a disponibilidade dos elementos do inflamassoma no citoplasma celular. Esse efeito pode ser obtido por meio do estímulo prévio com agonistas de TLRs, como o LPS, ou citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α [84]. Além de aumentar a expressão da pró-IL-1 β , existem evidências de que o *priming* também pode potencializar a atividade do inflamassoma NLRP3, por garantir a translocação do NF- κ B, fator de transcrição que controla a expressão desse componente do inflamassoma [168]. Além disso, um segundo sinal é requerido para que ocorra a oligomerização desse receptor com os demais componentes do inflamassoma, como por exemplo, sinais de perigo emitidos por ATP ou nigericina. No entanto, ainda há muito a ser investigado no que se refere a sinergia entre os sinais promovidos pelos PAMPs e DAMPs na formação do inflamassoma.

A sinalização via Myd88 requerida por todos os TLRs, com exceção do TLR3, culmina com a translocação de NF- κ B para o núcleo [219]. Sendo assim, foi avaliado se a perda dessa via poderia influenciar de alguma maneira na ativação da caspase-1 durante a malária murina.

Inicialmente, lisados de esplenócitos provenientes de animais MyD88^{-/-} foram empregados em ensaios de *western blot*, onde pode-se verificar a ausência dessa protease em sua forma ativa e níveis reduzidos de sua forma pró (**Figura 8A e 8B**). Esses animais também deixaram de apresentar caspase-1 ativa em macrófagos e em células dendríticas durante a infecção por *P. chabaudi* (**Figura 8C**). Finalmente, os animais MyD88^{-/-} apresentaram baixos níveis de IL-1 β circulante no soro quando comparados com os níveis produzidos pelos animais selvagens nove horas após o inóculo de LPS *in vivo* (**Figura 8D**).

FIGURA 8

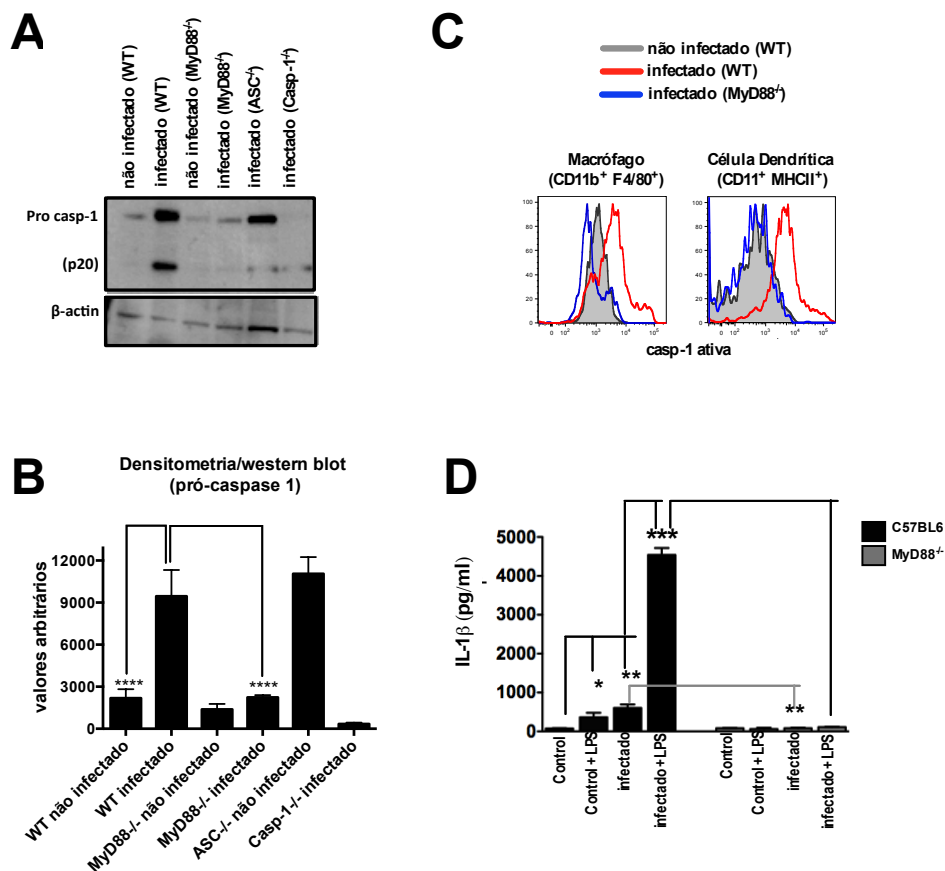


Figura 8: Expressão de caspase-1 ativa e produção de IL-1β em animais deficientes para moléculas MyD88.

(A) Camundongos C57BL/6, MyD88^{-/-}, ASC^{-/-} e Casp-1^{-/-} tiveram os seus baços coletados 7 dias após a infecção com *P. chabaudi*, sendo que as células totais desse órgão foram lisadas e utilizadas em ensaios de *western blot*. Esses resultados são representativos de 2 ensaios diferentes, com resultados similares, onde foram utilizados 3 animais por grupo. (B) Foi feito uma densitometria (Image J) das bandas correspondentes a pró-caspase-1. Foi calculado a média dos valores arbitrários dos 2 experimentos (C) 7 dias após a infecção, células do baço provenientes de animais C57BL/6, MyD88^{-/-} foram marcadas com anticorpos monoclonais de modo a identificar macrófagos (CD11b⁺_F4/80⁺) e células dendríticas (CD11c⁺_MHC-II⁺). A presença de caspase-1 ativa foi identificada por meio do reagente FLICA. Esses resultados são representativos de 2 experimentos com resultados similares onde foram utilizados 4 animais por grupo. (D) Animais infectados por *P. chabaudi* receberam um inóculo de 10μg de LPS no 7º dia de infecção. Nove horas após a esse inóculo, o soro desses animais foram coletados para a dosagem de IL-1β por ELISA. Esses resultados são a média de 10 animais

provenientes de 2 experimentos independentes. As diferenças significativas são indicadas por (***) $p\text{-value}=0.0008$) obtido pelo teste *t student*.

Visto os resultados obtidos com os animais *Myd88^{-/-}*, o próximo ponto a ser investigado foi o envolvimento dos TLRs no processo de formação e ativação do inflamassoma durante a malária. É importante notar que existem vários relatos na literatura documentando a importância do TLR9, um TLR endossomal, no reconhecimento de moléculas derivadas do *Plasmodium* [82,89] e o seu impacto no desenvolvimento de uma resposta inflamatória robusta associada a patogênese da malária [88,89,91,220]. Desse modo, foi utilizado animais deficientes para TLRs endossomais no intuito de verificar a importância dos TLRs no processo de ativação de caspase-1.

Animais deficientes para a molécula UNC93b (3D), sendo essa molécula responsável pela translocação dos TLRs do retículo endoplasmático para o endossomo [221,222], bem como animais triplo deficientes em TLR3,7 e 9 (*TLR3/7/9^{-/-}*), duplo deficientes (*TLR7/9^{-/-}*) ou deficiente somente para o TLR11 (*TLR11^{-/-}*), foram utilizados para o preparo de amostras utilizadas em experimentos de *western blot*. Em todos os casos em que houve a falta do TLR9 não foi possível observar a presença da caspase-1 ativa (**FIGURA 9A**) De acordo com esses dados, quando foi utilizado animais deficientes somente para TLR9 (*TLR9^{-/-}*), praticamente não foi possível identificar a caspase-1 ativa nos lisados de esplenócitos (**Figura 9B**). Além disso, houve uma redução significativa de IL-1 β circulante após o estímulo como LPS *in vivo* nesses animais (**Figura 9C**).

FIGURA 9

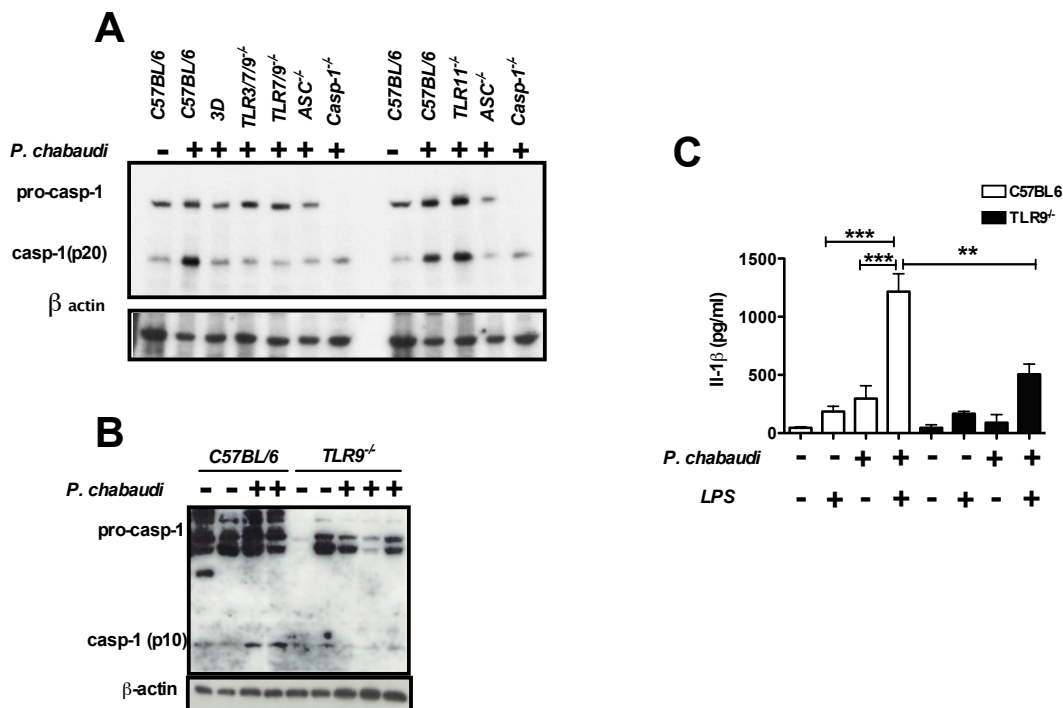


Figura 9: Expressão de caspase-1 ativa e produção de IL-1β em animais deficientes para TLRs endossomais

(A - B) Animais deficientes em TLRs endossomais foram infectados com *P. chabaudi* e seus baços coletados 7 dias após a infecção. Amostras provenientes do lisado total do baço foram utilizadas em ensaios de *western blot* para detecção de caspase-1 ativa. (F) Animais TLR9^{-/-} infectados por *P. chabaudi* receberam um inóculo de 10μg de LPS no 7° dia de infecção. 9 horas após a esse inóculo, o soro desses animais foram coletados para a dosagem de IL-1β por ELISA. As diferenças significativas são indicadas por (** $p = 0.0032$ and *** $p < 0.0001$) obtidas pelo teste *t student*. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com resultados similares. Foram utilizados 5 animais por grupo.

5.3. IFN- γ e TNF- α , moléculas-chave no processo de patogênese da malária, regulam a ativação da caspase-1 e a liberação de IL-1 β durante a infecção por *Plasmodium*.

Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , são comumente relacionadas com a morbidade causada pela malária, sendo essas encontradas em níveis elevados no plasma de pacientes infectados por *P. falciparum* [223]. Desse modo, foi questionado se tais citocinas poderiam ter algum papel na regulação e ativação da caspase-1 durante a infecção por *P. chabaudi*. Assim, células do baço de animais infectados e deficientes para IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) e TNFR1 (TNFR1 $^{-/-}$) foram obtidas no intuito de avaliar a presença da caspase-1 ativa. Na **Figura 10A**, observamos a dependência de IFN- γ para a ativação dessa protease. De modo similar aos resultados observados em animais deficientes em MyD88, a sinalização via IFN- γ parece estar envolvida no controle da expressão de pró-caspase-1 (**Figura 10B**).

Bauernfeind e colaboradores [168] demonstraram que o *priming* por meio da sinalização via TNFR pode ser um fator crítico na ativação de NLRP3-inflamassoma *in vitro*. Entretanto, *in vivo*, a ativação da caspase-1 durante a malária murina não requer a sinalização por TNFR1 (**Figura 10B**).

Como era esperado, baseado em resultados obtidos pelo ensaio de *western blot*, a caspase-1 ativa aparece em macrófagos e em células dendríticas de animais TNFR1, mas não está presente nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ (**Figura 10C**).

De modo curioso, animais TNFR1 $^{-/-}$ não apresentaram níveis elevados de IL-1 β circulante, mesmo nove horas após o inóculo de LPS (**Figura 10D**). É importante lembrar que a ativação da caspase-1 ocorre normalmente nesses animais, inclusive a falta de sinalização via TNFR1 não comprometeu a produção de IFN- γ (**Figura 10E**), sendo essa citocina um componente limitante para ativação da caspase-1 durante a malária murina como já descrito na **Figura 10B e 10C**. Após esses resultados, surgiu a seguinte pergunta: por qual motivo IL-1 β não é vista no soro de animais TNFR1 $^{-/-}$ mesmo após o desafio com LPS? Como hipótese baseada em dados secundários, [224,225] foi proposto que a sinalização via TNFR1 também poderia controlar a expressão da pró-IL-1 β no contexto da malária. Como pode ser observado na **Figura 10F** os animais deficientes para

TNFR1 bem como os $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ não são capazes de expressar pró-IL-1 β , mesmo após o inóculo de LPS. Provavelmente a falta de pró-IL-1 β em animais deficientes em IFN- γ se deve a incapacidade desses animais secretarem níveis elevados de TNF- α durante a infecção por *P. chabaudi*, mesmo após ao estímulo como LPS *in vivo* (**Figura 10G**).

FIGURA 10

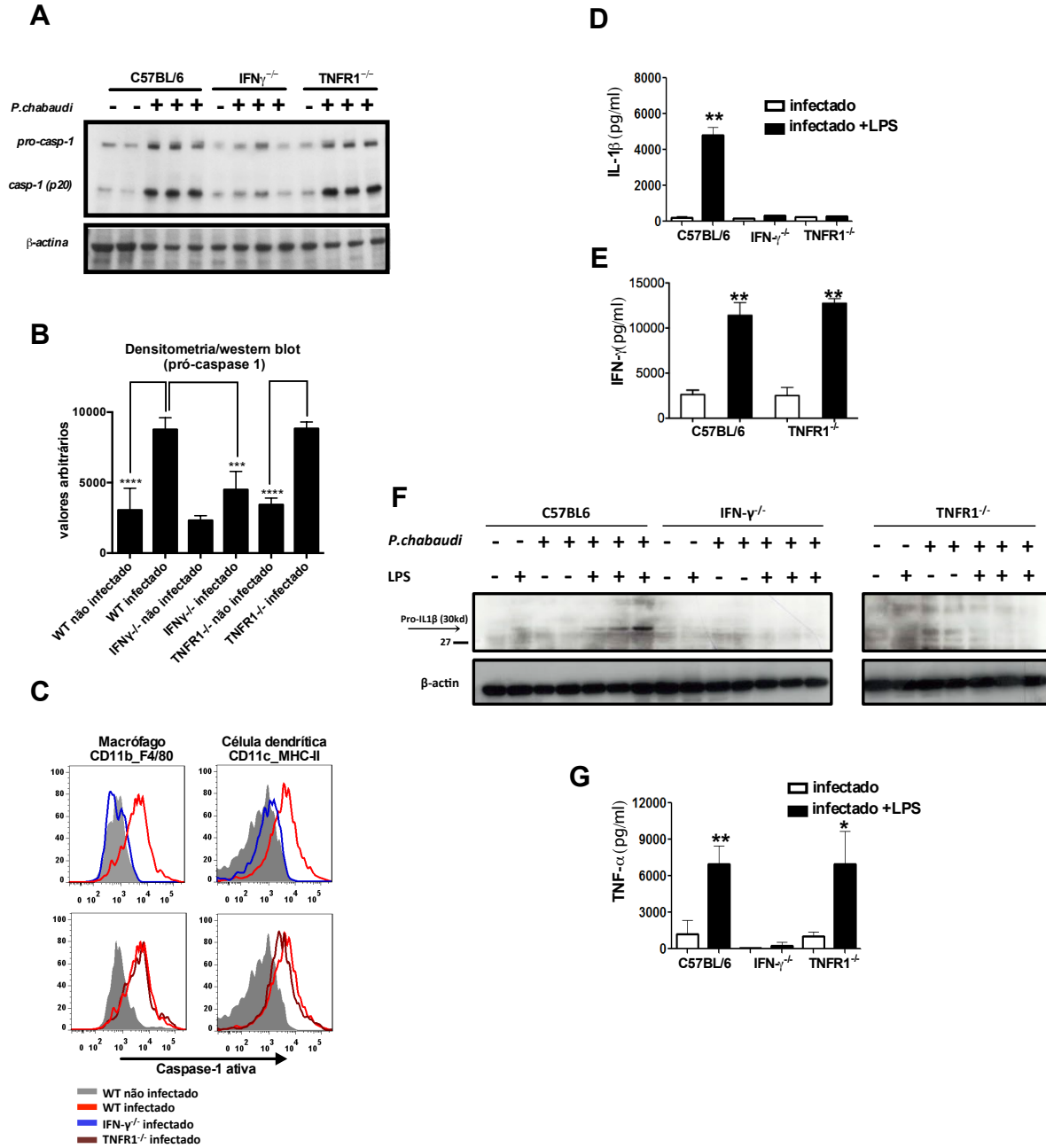


Figura 10: Citocinas pró-inflamatórias envolvidas na ativação da caspase-1 e secreção da IL-1 β durante a infecção por *P. chabaudi*.

Camundongos C57BL/6, IFN γ ^{-/-} e TNFR1^{-/-} foram infectados via i.p com 10⁵ hemácias parasitadas (iRBCs) por *P. chabaudi*. **(A)** Sete dias após a infecção, as células do baço desses animais foram lisadas e utilizadas em ensaios de *western blot*. Esses resultados são representativos de 3 ensaios diferentes, com resultados similares, onde foram utilizados 3 animais por grupo. **(B)** Foi feita uma densitometria (Image J software) das bandas correspondentes a pró-caspase-1. Esses dados são a média dos valores arbitrários, obtidos pelo *Image J*, provenientes dos 3 experimentos. **(C)** Também 7 dias após a infecção por *P. chabaudi*, células do baço provenientes de animais C57BL/6, IFN γ ^{-/-} e TNFR1^{-/-} foram marcadas tornando possível a identificação de macrófagos (CD11b⁺_F4/80⁺) e células dendríticas (CD11c⁺_MHC-II⁺). A presença de caspase-1 ativa foi identificada por meio do reagente FLICA. Esses resultados são representativos de 2 experimentos com resultados similares onde foram utilizados 4 animais por grupo. Animais C57BL/6, IFN γ ^{-/-} e TNFR1^{-/-} receberam um inóculo de 10 μ g de LPS no 7^o de infecção com *P. chabaudi*. Nove horas após a esse inóculo **(D, E, G)** o soro desses animais foram coletados para a dosagem de IL-1 β , IFN γ e TNF α por ELISA. Esses resultados são a média de 10 animais provenientes de 2 experimentos independentes. As diferenças significativas são indicadas por (**) e (*) com o *p-value* variando entre (0.0034-0.001) obtido pelo teste *t student*. **(F)** Também no 7^o dia de infecção esses animais receberam um inóculo de 10 μ g de LPS. Duas horas após ao desafio com LPS os baços desses animais foram então coletados e seus leucócitos lisados, os quais foram empregados em ensaios de *western blot* para visualização de pró-IL-1 β .

5.4 A infecção por *P. chabaudi* promove a ativação da caspase-1 de modo dependente do receptor purinérgico P2X₇ e dos receptores citosólicos NLRP3 e NLRP12.

Como já descrito anteriormente, durante a malária ocorre a produção de um cristal inorgânico conhecido como hemozoína, em resposta a alta disponibilidade dos tóxicos grupos heme, sendo esses liberados pela digestão da hemoglobina pelo *Plasmodium*. Em 2009, foi demonstrado que esse biocristal poderia promover a formação do inflamassoma NLRP3 e conseqüentemente a ativação da caspase-1 *in vitro* [226]. A ocorrência desse fenômeno foi prontamente abolida em resposta a inibição do efluxo de K⁺. Desse modo, foi levantando a hipótese de que o receptor purinérgico P2X₇ poderia controlar a ativação de caspase-1 *in vivo* em resposta a infecção por *P. chabaudi*. É importante lembrar que o receptor P2X₇ é um canal iônico, que em resposta ao ATP extracelular, permite a entrada de Na⁺ e Ca²⁺ e a saída de K⁺, sendo esse evento importante para ativação da caspase-1 em resposta a diferentes estímulos. [140,155,158]. Desse modo, animais P2X₇^{-/-} foram utilizados para testar essa hipótese. Como pode ser observado na **Figura 11A** esses animais não foram capazes de ativar caspase-1 durante a infecção por *P. chabaudi*.

Ainda baseado nos dados secundários que apontavam o NLRP3 [201], mas não o NLRC4 [85] como sensor da hemozoína para ativação da caspase-1 *in vitro*, foram testados animais deficientes para alguns receptores de inflamassoma, no intuito de identificar um possível receptor envolvido na ativação da caspase-1 durante a infecção *in vivo* por *Plasmodium*. Os animais deficientes para NLRP3 (NLRP3^{-/-}), NLRP12 (NLRP12^{-/-}), NLRC4 (NLRC4^{-/-}) e AIM2 (AIM2^{-/-}) foram empregados nesse modelo. Como pode ser visto na **Figura 11B** a ativação de caspase-1 durante a infecção por *P. chabaudi* ocorre de modo dependente de NLRP3 e NLRP12. Em contrapartida, animais deficientes para os receptores AIM2 (**Figura 11C**) e NLRC4 (dados não mostrados) são capazes de ativar caspase-1 normalmente em resposta a infecção por *P. chabaudi*. Esses resultados foram reproduzidos em ensaios de *western blot* (**Figura 11D-E**).

Confirmando mais um vez que os elevados níveis de IL-1β circulante, observados após o inóculo de LPS, são dependente da ativação da caspase-1 durante a malária, animais NLRP3^{-/-} e NLRP12^{-/-}, mas não os AIM2^{-/-} e NLRC4^{-/-},

apresentaram uma diminuição na produção dessa citocina (**Figura 11F**). Os níveis de TNF- α no soro desses animais foram similares ao observados em animais selvagens, nove horas após o inóculo de LPS (**Figura 11F**).

FIGURA 11

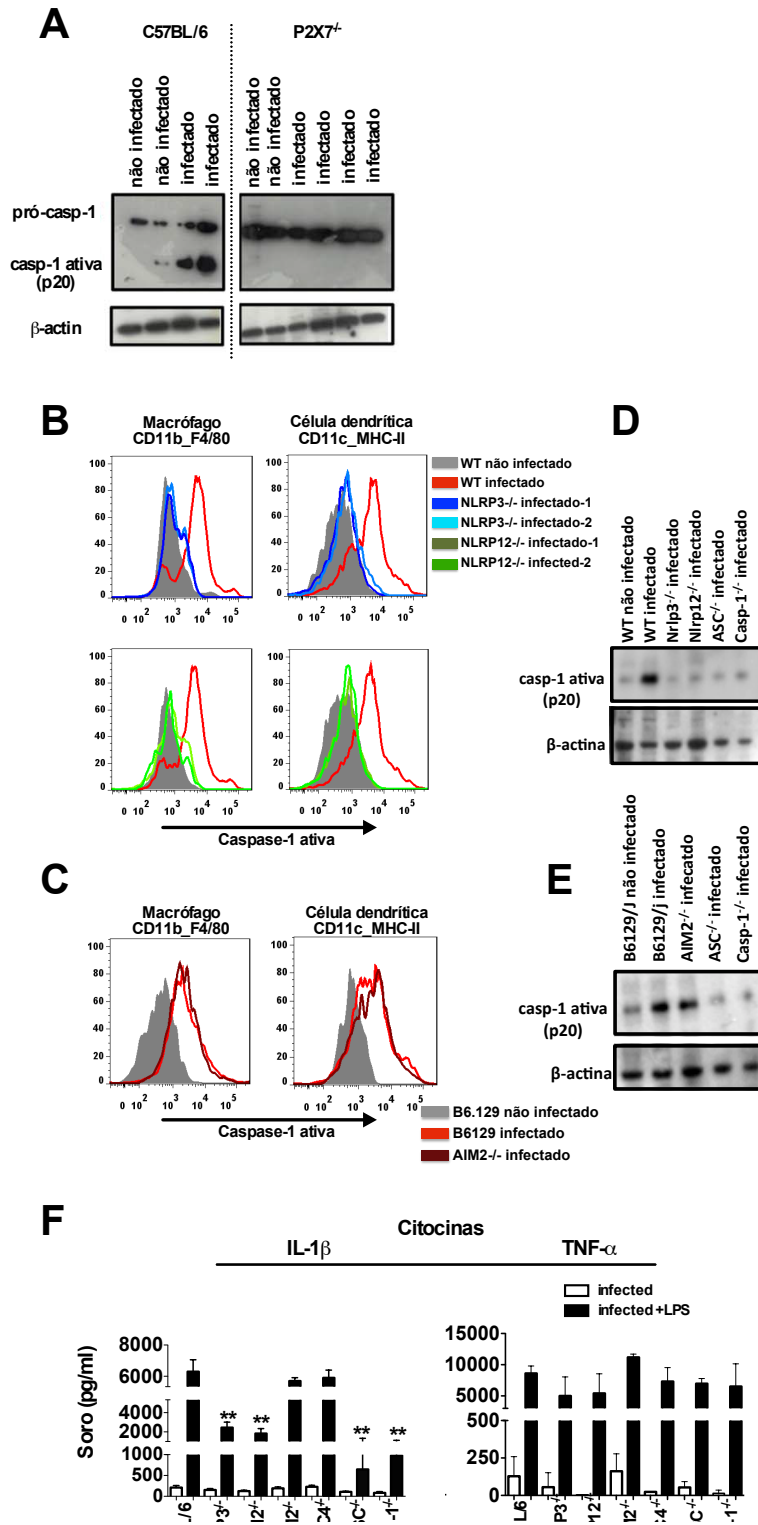


Figura 11: Os receptores citosólicos NLRP3 e NLRP12, e o receptor purinérgico P2X₇, controlam a ativação da caspase-1 durante a infecção por *P. chabaudi*.

Camundongos foram infectados via i.p com 10^5 hemácias parasitadas (iRBCs) por *P. chabaudi*. **(A)** Sete dias após a infecção, os esplenócitos dos animais P2X₇R^{-/-} e C57BL/6 foram coletados e utilizados no preparo de amostras, as quais foram aplicadas nos ensaios de *western blot* para detecção de caspase-1. **(B-C)** Sete dias após infecção, o baço dos camundongos C57BL/6, B6.129, NLRP3^{-/-}, NLRP12^{-/-} e AIM2^{-/-} foram coletados, sendo as células marcadas no intuito de identificar macrófagos (CD11b⁺_F4/80⁺) e células dendríticas (CD11c⁺_MHC-II⁺). A presença de caspase-1 ativa foi avaliada por meio do reagente FLICA. **(D-E)** Os esplenócitos desses animais também foram lisados gerando amostras, as quais foram utilizadas em ensaios de *western blot*. Esses resultados são representativos de 2 experimentos com resultados similares onde foram utilizados 4 animais por grupo. **(F)** Também no 7° dia de infecção, porém 9 horas após à um inóculo de LPS (10µg/animal), o soro desses animais foram coletados para dosagem de IL-1β e TNFα por ELISA. Esses resultados são a média de 10 animais provenientes de 2 experimentos independentes. As diferenças significativas são indicadas por (** *p-value*=0.0013) obtido pelo teste *t student*.

5.5 A ativação da caspase-1 pode se tornar em um evento letal para o hospedeiro, se um indutor de pró-IL-1 β estiver disponível durante a infecção por *P. chabaudi*.

No início desse estudo foi observado a presença da caspase-1 ativa durante a infecção por *Plasmodium*, porém fazia-se necessário também a presença de um indutor exógeno de pró-IL-1 β para que se pudesse então detectar essa citocina em níveis elevados no soro dos animais. Na **Figura 12A** pode ser observado a produção de IL-1 β e TNF- α , em diferentes tempos (0, 3, 6 e 9 horas) após o inóculo de LPS, em quatro diferentes grupos de animais selvagens em diferentes dias após a infecção (7°, 14°, 21° e 28°). Ainda na **Figura 12A**, pode ser visto a taxa de mortalidade dos animais selvagens, 12 horas após o inóculo de LPS. Curiosamente, 100% dos animais com 7 ou 14 dias de infecção sucumbiram ao inóculo de LPS, 12 horas após à esse desafio. Esse fenômeno não foi visto em animais não infectados (**Tabela. 1**). Vale a pena ressaltar que o *P. chabaudi* não é uma cepa letal para os animais C57BL/6, sendo observado dois picos de parasitemia um no 7° e outro no 14° dia de infecção. Após 16 dias de infecção, o número de hemácias infectadas começam a diminuir até que não se possa mais observar hemácias infectadas no sangue periférico por volta do 28° de infecção (**Figura 12B**). Animais deficientes para os elementos formadores do inflamassoma, como ASC e Casp-1, apresentam uma curva de parasitemia muito similar a curva dos C57BL/6 (**Figura 12B**) sugerindo que a ativação de caspase-1 ou a falta dela não tem nenhuma influência no curso da infecção.

Nesse contexto, foi questionado qual seria o papel biológico do inflamassoma e também da presença da caspase-1 ativa durante a malária. Visto que a circulação de IL-1 β está associada a vários distúrbios inflamatórios, como já discutido previamente, e que no modelo experimental utilizado nesse trabalho, camundongos sucumbem a baixas dose de LPS, coincidindo esse evento com a presença de IL-1 β circulante (**Figura 12A**), algumas perguntas foram levantadas: Por qual motivo a infecção por *P. chabaudi* poderia se tornar letal para o hospedeiro após uma baixa dose de LPS? A ativação da caspase-1 e por consequência a liberação de altos níveis de IL-1 β após a esse desafio, poderia

estar relacionada com essa letalidade? Poderia a interferência na via de sinalização de IL-1R promover alguma resistência ao choque induzido por LPS? Contudo, é interessante lembrar que existem vários relatos sobre coinfeções entre *Plasmodium* e bactérias Gram-negativa, durante quadros de malária grave, coma e morte de hospedeiros provenientes de áreas endêmicas [211]

Para responder a esses questionamentos, animais deficientes para o receptor de IL-1R (IL-1R^{-/-}) foram infectados com *P. chabaudi* e 7 dias após a infecção receberam um inóculo de 10 μ g de LPS. Como pode ser observado na **Figura 12C**, a perda da sinalização pelo IL-1R, aumentou a resistência dos animais ao inóculo de LPS. É interessante notar que os níveis de TNF- α , IL-1 β bem como o perfil de caspase-1 ativa são similares entre os animais C57BL/6 e IL-1R^{-/-} (**Figura 12C-D**). Os dados mostrados na **Figura 7** deixa claro que a infecção por *P. chabaudi* fornece sinais suficientes para levar a ativação de caspase-1, mas não para expressão elevada de pró-IL-1 β , sendo necessário um estímulo adicional o que torna presença da caspase-1 ativa algo perigoso para o hospedeiro.

Os resultados apresentados na **Tabela 1** mostram que animais MyD88^{-/-} IFN γ ^{-/-} e TNFR1^{-/-} são completamente resistentes a esse “choque séptico” induzido por uma baixa dose de LPS durante a malária murina. Por outro lado, animais deficientes em alguns componentes que constituem o inflamassoma, por exemplo Casp-1^{-/-}, ASC^{-/-}, NLRP3^{-/-} e NLRP12^{-/-}, além do IL-1R^{-/-} foram parcialmente resistentes ao inóculo de LPS, com a letalidade variando entre 12,5% a 40% nesses animais e acometendo 100% dos animais selvagens. É importante apontar que os animais AIM2^{-/-} e NLRC4^{-/-}, os quais apresentaram caspase-1 ativa e IL-1 β circulante de modo similar ao que foi observado em animais selvagens infectados (**Figura 11**), também foram susceptíveis a esse inóculo de LPS.

Finalmente, quando animais C57BL/6 infectados com *P. chabaudi*, são tratados com um antagonista de IL-1R (IL-1Ra) 30 minutos antes do desafio com LPS, os mesmos tornaram-se mais resistentes a esse choque induzido (**Figura 12E**).

FIGURA 12

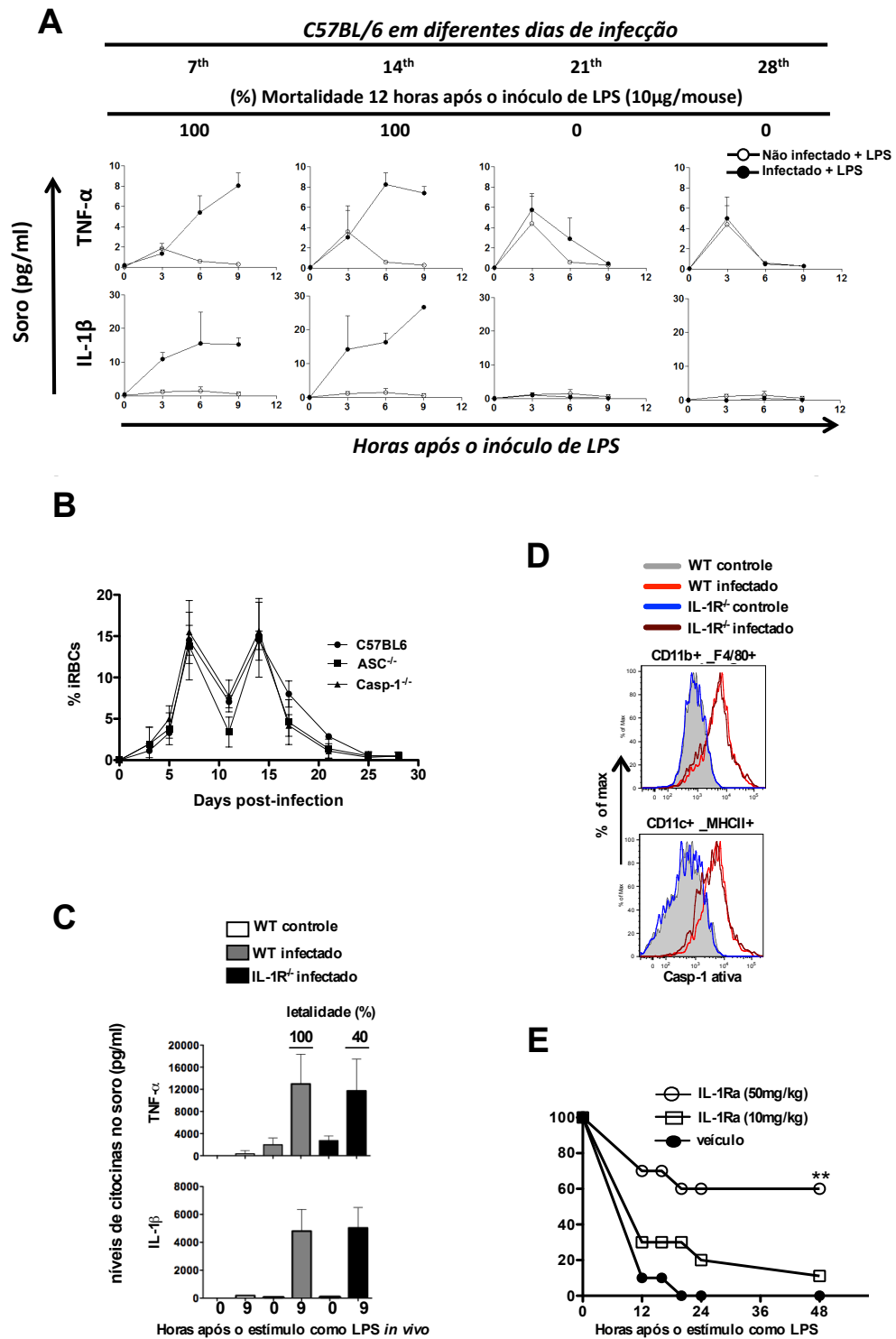


Figura 12 : Consequências da predisposição para alta produção de IL-1 β durante a infecção por *P. chabaudi*.

(A) 4 grupos de camundongos C57BL/6 foram infectados via i.p com 10^5 hemácias parasitadas (iRBCs) por *P. chabaudi*. Esses grupos foram utilizados em diferentes dias após a infecção (7°, 14°, 21° e 28°). Os animais desses grupos foram submetidos a um inóculo de LPS (10 μ g/animal), e o soro coletado nos tempos (0, 3, 6, 9) horas após ao desafio. Foram utilizados 5 animais diferentes para cada ponto (0, 3, 6, 9h). Os níveis de IL-1 β e TNF α , no soro desses animais, foram mensurados por ELISA. O ponto de (0 hora) corresponde aos animais não infectados. Foram realizados 2 ensaios com resultados similares. A taxa de mortalidade foi avaliada 12 horas após ao inóculo de LPS (10 μ g/animal) em animais diferentes dos utilizados na curva de citocina. **(B)** Animais C57BL/6, ASC^{-/-} e Casp1^{-/-} infectados por *P. chabaudi*, foram acompanhados durante 4 semanas, e a parasitemia verificada a cada 2-3 dias depois infecção. A taxa de parasitemia foi definida por meio da contagem de hemácias infectadas em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. **(C)** Também no 7° dia de infecção, os animais IL-1R^{-/-} receberam um inóculo de LPS (10 μ g/animal). Nove horas após a esse inóculo, o soro foi obtido para dosagem de IL-1 β e TNF α por ELISA, sendo a mortalidade avaliada 12 horas após ao desafio. **(D)** Macrófagos (CD11b⁺_F4/80⁺) e células dendríticas (CD11c⁺_MHC-II⁺) foram marcados utilizando o reagente FLICA no intuito de avaliar a presença de caspase-1 ativa em animais IL-1R^{-/-} no 7° dia de infecção por *P. chabaudi* **(E)** Animais C57BL/6 no 7° de infecção com *P. chabaudi* foram tratados com IL-1Ra 30min antes do desafio com LPS (10 μ g/animal) e a taxa de sobrevivência foi avaliada por 48h após o desafio.

Tabela 1 - Associação entre os altos níveis de IL-1 β circulante, com a susceptibilidade ao choque endotóxico em camundongos infectados com *P. chabaudi*

Camundongos (linhagem)	N	Parasitemia (%)	Sobrevivência (%)	casp-1 ativa MFI ($\times 1000$)	IL-1 β (ng/ml)	sobrevivência - Fischer's exact test WT vs KO
C57BL6						
Controle não infectado	15	-	100	1.57 \pm 0.17	0.35	
<i>P. chabaudi</i> infectado	30	16	0	4.21 \pm 0.64	6.36	
Camundongos deficientes na molécula adaptadora para TLR (infectados com <i>P. chabaudi</i>)						
MyD88 ^{-/-}	5	19	100	1.23 \pm 0.13	0.25	<i>P</i> < 0.0001
Camundongos deficientes para citocina e receptor de citocina (infectados com <i>P. chabaudi</i>)						
IFN- γ ^{-/-}	12	23	100	1.29 \pm 0.11	0.31	<i>P</i> < 0.0001
TNFR1 ^{-/-}	12	20	100	3.65 \pm 0.49	0.23	<i>P</i> < 0.0001
IL-1R ^{-/-}	10	18.5	60	3.89 \pm 0.15	5.40	<i>P</i> =0.0012
Camundongo deficiente para elementos formadores de inflamassomos (infectados com <i>P. chabaudi</i>)						
ASC ^{-/-}	8	17	78.5	1.12 \pm 0.23	0.47	<i>P</i> =0.0003
Casp-1 ^{-/-}	9	16	66.6	1.25 \pm 0.17	1.27	<i>p</i> = 0.0006
NLRP3 ^{-/-}	10	17	70	1.18 \pm 0.27	2.61	<i>P</i> =0.0002
NLRP12 ^{-/-}	5	17.5	60	1.28 \pm 0.36	1.89	<i>P</i> =0.0088
AIM2 ^{-/-}	5	18	0	4.19 \pm 0.42	5.49	<i>P</i> =1.00
NLRCA4 ^{-/-} (lpaf ^{-/-})	4	14.5	0	3.93 \pm 0.32	4.38	<i>P</i> =1.00

Tabela 1 : Liberação de IL-1 β e a alta susceptibilidade ao choque endotóxico.

Os camundongos foram infectados com 10^5 hemácias infectadas com *P. chabaudi* (IRBCs). Sete dias após a infecção, os animais foram desafiados com LPS 10 μ g/mouse e taxa de sobrevivência avaliada 24h após ao desafio. Os níveis de parasitemia foram definidos pela contagem de hemácias infectadas em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Para avaliar os níveis de caspase-1 ativa, foi calculado a mediana da intensidade de fluorescência em células totais do baço de animais no 7 dia infecção, sendo os dados obtidos por citometria de fluxo. Os níveis de IL-1 β foram avaliados no soro dos animais 9h após o estímulo com LPS por ELISA.

5.5 Animais infectados com *P. chabaudi* se tornam hipersensíveis a uma infecção bacteriana secundária, sendo esse fenômeno revertido pelo tratamento com IL-1Ra.

Vários estudos de campo em áreas endêmicas têm demonstrado que a coinfeção entre o *Plasmodium* e bactérias Gram-negativa, principalmente *Salmonella*, é um fator de gravidade sendo associado com o aumento da morbidade e taxa de mortalidade [206,211,212]. A relação biológica entre esses dois tipos de infecção é algo que ainda está longe de ser compreendido.

Baseado nos resultados obtidos com a associação entre a infecção por *P. chabaudi* + LPS, intuitivamente surge a hipótese de que uma coinfeção entre *P. chabaudi* e bactérias Gram-negativa poderia levar ao mesmo fenótipo de choque induzido por LPS. Desse modo, animais C57BL/6 foram infectados como *P. chabaudi*, e após 5 dias de infecção, eles receberam um inóculo de 10^8 cfu de *S. typhimurium* por via oral. Diferentemente dos animais que não foram infectados previamente com *P. chabaudi*, os animais coinfectados começaram a morrer 72h após o desafio com *S. typhimurium* (**Figura 13A**). Nesse mesmo instante, foi detectado elevados níveis de bactérias (**Figura 13B**), e também de IL-1 β , sob a sua forma ativa, circulando no sangue (**Figura 13C**). Esse fenômeno foi revertido pelo tratamento com IL-1Ra (**Figura 13A**). É importante ressaltar que o tratamento com IL-1Ra não ocasionou nenhuma alteração na carga bacteriana no sangue (**Figure 13B**).

Uma outra técnica utilizada para expor o hospedeiro a presença de bactérias, conhecida ligadura e punção sub-letal do ceco (SL-CLP) (*sub-lethal cecal ligation and puncture*), foi utilizada em animais previamente infectados com *P. chabaudi*. De modo similar aos dados obtidos pela coinfeção entre *P. chabaudi* + *Salmonella*, esses animais começaram a morrer 24h após ao desafio com SL-CLP (**Figura 13D**). Finalmente, o tratamento com IL-1Ra conseguiu subverter o quadro de susceptibilidade dos animais infectados e submetidos a SL-CLP (**Figure 13D**), não havendo nenhuma diferença no que se refere aos níveis de bactérias no sangue entre os animais infectados com *P. chabaudi* ou não (**Figure 13E**).

FIGURA 13

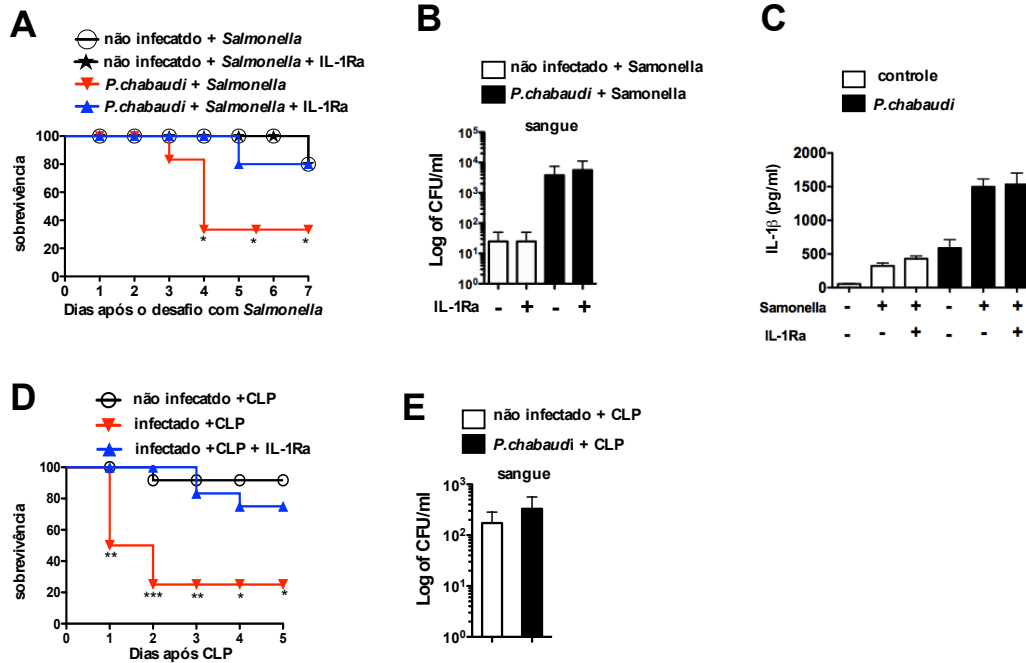


Figura 13: Tratamento com um antagonista de IL-1R diminui a susceptibilidade dos animais infectados com *P. chabaudi* ao choque induzido por uma infecção secundária bacteriana.

(A - C) Camundongos C57BL/6 foram infectados com *S. typhimurium* (10^8 cfu via oral) 5 dias após a uma infecção previa com *P. chabaudi*, tornando-se assim coinfetados. Um outro grupo de animais coinfetados (*P. chabaudi* + *S. typhimurium*) começaram a ser tratados com IL-1RA (100mg/kg/day) por via endovenosa, 48h antes do desafio com *S. typhimurium*. Esses animais foram tratados diariamente até o final do experimento. Os níveis de IL-1 β e a carga de *S. typhimurium* no sangue foram avaliados 3 dias após a coinfeccção bacteriana. (D - E) Sete dias após a infecção por *P. chabaudi*, camundongos C57BL/6 foram submetidos a um procedimento cirúrgico no qual pôde-se furar e ligar o ceco (SL-CLP), processo o qual permitiu o extravasamento de bactérias da microbiota na cavidade peritoneal. Um grupo de animais foi tratado IL-1RA (100mg/kg/day) 24h antes do desafio com SL-CLP e continuaram a ser tratados diariamente até o fim do experimento, no qual foi avaliado a taxa de sobrevivência. A quantificação de bactérias aeróbicas na circulação foi realizada 24h depois do SL-CLP.

5.6 A caspase-1 também é ativada em humanos durante a infecção causada por *P. vivax* e também *P. falciparum*.

Como já descrito amplamente na sessão destinada a introdução desse trabalho, a maioria dos casos de malária no Brasil acontece na região norte do Brasil, com uma incidência de mais de 80% dos casos relacionados a infecção por *P. vivax*. Desse modo, o objetivo inicial nessa etapa do estudo foi verificar a capacidade da malária vivax em induzir a ativação da caspase-1 e produção de IL-1 β . No entanto, em uma das seis campanhas feitas na área endêmica (Porto Velho - RO), foi possível coletar amostras de 2 pacientes infectados com *P. falciparum*, as foram empregadas nos ensaios de *western blot*. Além disso, o laboratório de Imunopatologia, local onde foi realizado parte desse estudo, dispunha de amostras de sobrenadante de cultura de PBMCs de pacientes infectados por *P. falciparum* armazenados a -80C, sendo essas utilizadas para dosagem de citocinas. Desse modo, foi possível investigar não só a capacidade da infecção por *P. vivax*, mas da infecção por *P. falciparum* em induzir ativação da caspase-1 e a produção de IL-1 β .

Para isso, foram utilizadas amostras do lisados de PBMCs de pacientes infectados com *P. vivax* (**Figura 14A**) e *P. falciparum* (**Figura 14C**), em ensaios de *western blot*. Em ambos os casos foi possível detectar a presença dessa protease sob a sua forma ativa. Além disso, PBMCs provenientes de pacientes infectados como *P. vivax* (**Figura 14B**) e *P. falciparum* (**Figura 14D**) são capazes de secretar IL-1 β ativa, sendo essa produção potencializada pela presença de LPS no cultivo celular.

FIGURA 14

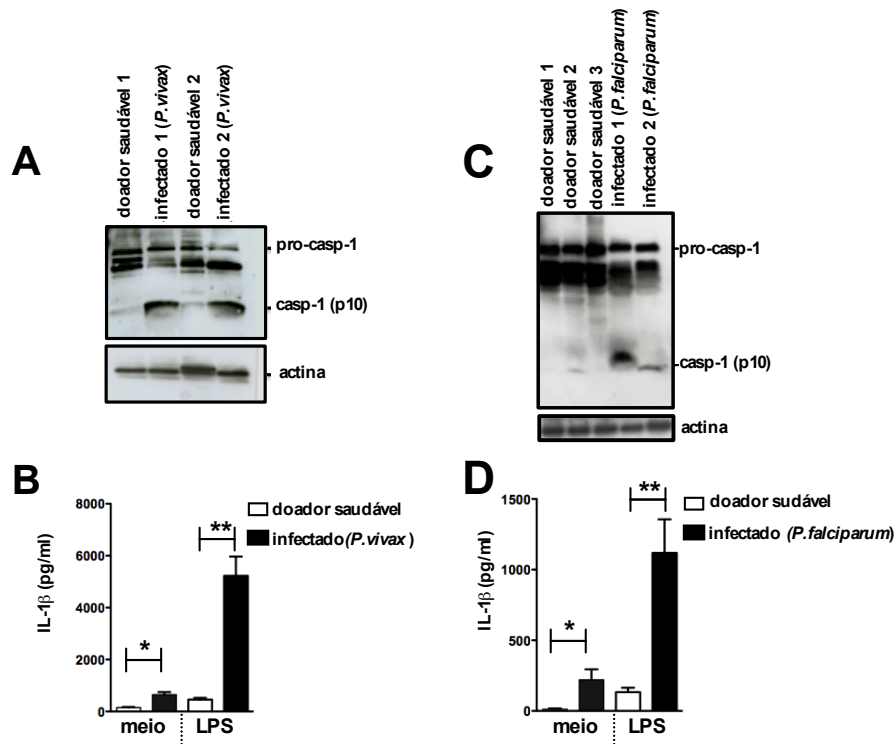


Figura 14: A malária humana também leva a ativação da caspase-1 e a produção de IL-1 β .

(A) PBMCs de pacientes infectados como *P. vivax* e (C) *P. falciparum* foram lisados e utilizados em ensaios de *western blot* no intuito de detectar caspase-1 ativa. (B) PBMCs de pacientes infectados com *P. vivax* (n=18) e (D) *P. falciparum* (n=8) foram cultivados por 24h na presença ou não de LPS (100ng/ml) e o sobrenadante da cultura utilizado para dosagem de IL-1 β por ELISA. As diferenças estatísticas são representadas por (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.005$) como indicado pelo teste t pareado com correção de Welch.

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

Monócitos presentes no sangue periférico são células fagocíticas derivadas da medula óssea envolvidas na resposta imune inata a um grande número de micro-organismos como bactérias, fungos, protozoários e também a infecção viral [227-230]. No entanto, a nossa compreensão a respeito do espectro funcional dos monócitos e de suas subpopulações ainda é incompleta. Vários trabalhos tem revelado uma heterogeneidade dentro da população de monócitos, sendo bem definido duas subpopulações distintas [231-236]. Curiosamente, observamos o aumento de uma dessas subpopulações em pacientes infectados com *P. vivax*, caracterizada pela expressão de baixos níveis de CD14 além de ser positiva para CD16 (CD14^{low}CD16⁺). No entanto, quarenta dias após o início do tratamento contra o *P. vivax*, essa subpopulação de monócitos praticamente desaparece e assim, o perfil desses pacientes, passa a ser semelhante ao encontrado em indivíduos saudáveis (**Figura 15A**) e (**Figura 15B gráfico de baixo**). É interessante notar que essa subpopulação celular foi descrita como sendo a principal fonte de IL-1 β e TNF- α em resposta a LPS [237].

Monócitos clássicos definidos por apresentarem CD14, mas não CD16 na superfície (CD14⁺CD16⁻) também foram observados em maior quantidade no sangue de pacientes antes do tratamento (**Figura 15A**) e (**Figura 15B gráfico de baixo**). Dentre as subpopulações avaliadas no PBMC, somente os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), e os também conhecidos como monócitos patrulhadores (CD14^{low}CD16⁺) [235], apresentaram a caspase-1 em sua forma ativa (**Figura 15A - histogramas**) e (**Figura 15C**). É importante ressaltar que a ativação da caspase-1 ocorreu de modo diferencial apenas nos monócitos inflamatórios (CD14^{low}CD16⁺) ao comparar os pacientes antes e após o tratamento (**Figura 15A**) e (**15B - gráficos de cima**).

FIGURA 15

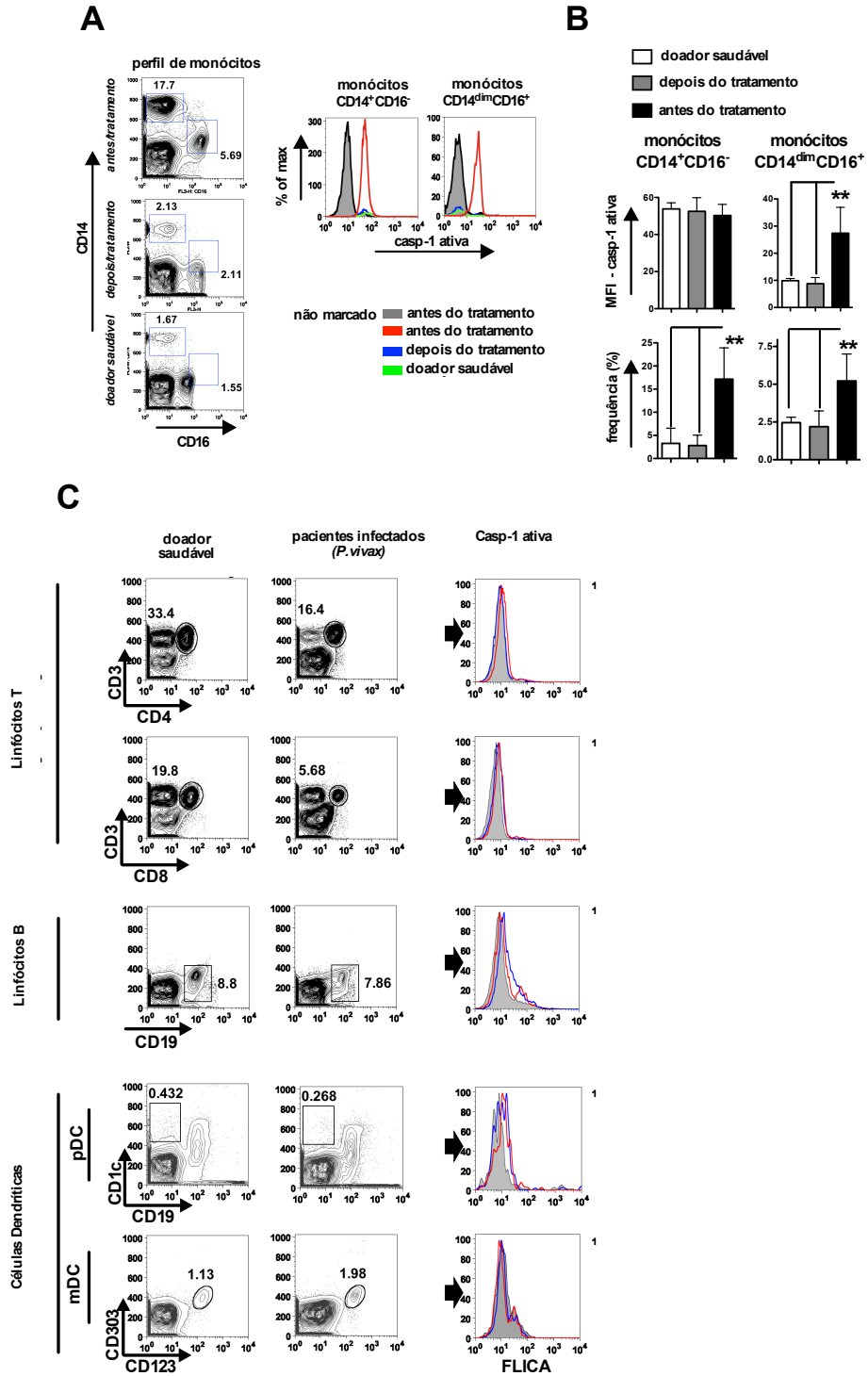


Figura 15: Monócitos são a principal fonte de caspase-1 ativa durante a infecção por *P. vivax*.

(A) PBMCs obtidos de indivíduos infectados por *P. vivax*, antes e 30-40 dias após o tratamento contra o Plasmodium, ou provenientes de doadores saudáveis, foram marcados utilizando anticorpos anti- CD14 e -CD16 para determinar o perfil de monócitos. Os monócitos clássicos foram definidos como (CD14⁺ CD16⁻) e os patrulhadores como (CD14^{low}CD16⁺). Um inibidor de caspase-1 ativa acoplado a carboxifluoresceína ([FAM-YVAD-FMK] reagente FLICA) foi utilizado para avaliar a presença de caspase-1 ativa nesses monócitos por citometria de fluxo (ver histogramas no lado direito na figura 15A). (B) Mediana da intensidade de fluorescência emitida pela presença da caspase-1 ativa, e a média da frequência de células expressando caspase-1 ativa (5 pacientes infectados por *P. vivax* antes e após o tratamento e 8 pacientes saudáveis). As diferenças estatísticas são indicadas por (**) com o p-value variando de (0.0025-0.0055). Esses valores foram obtidos por meio do test t student. (C) Outras populações celulares do PBMC desses pacientes, como Linfócitos T e B e células dendríticas, também foram avaliadas na tentativa de detectar caspase-1 ativa, porém não foi observado a presença dessa protease em nenhuma dessas populações.

5.8 A infecção por *P. vivax* promove a oligomerização da molécula adaptadora ASC.

Durante a formação do inflamassoma a maioria dos receptores citosólicos, como NLRP3, utilizam a molécula adaptadora ASC para recrutar a pró-caspase-1, enquanto outros (ex, NLRC4), têm a capacidade de fazer esse recrutamento ligando diretamente no domínio CARD da molécula pró-caspase-1 [84]. Após a formação do inflamassoma, a molécula ASC pode ser detectada sob a forma de um grande complexo proteico, localizado na região perinuclear, conhecido como *ASC-specks*. Esse aglomerado de ASC pode ser observado nas células ao atingirem 1µm [238]. Na maioria das células em que o inflamassoma é ativado, é possível ver somente um único aglomerado de ASC [238].

A ativação da caspase-1 resulta em um tipo de morte celular programada conhecida como piroptose, processo o qual permite a liberação de citocinas pró-inflamatórias [239,240]. Esses agregados de ASC descritos acima também são chamados de piroptossomos, os quais são em sua grande maioria formado por dímeros de ASC [241]. Assim, a presença de dímeros/multímeros de ASC podem indicar a formação do inflamassoma e a ativação da caspase-1 [238]. Visto isso, o próximo passo foi tentar encontrar oligômeros de ASC em células de pacientes infectados como *P. vivax*. Como pode ser observado na **Figura 16**, é possível encontrar oligômeros de ASC em PBMCs de pacientes infectados com *P. vivax*.

FIGURA 16

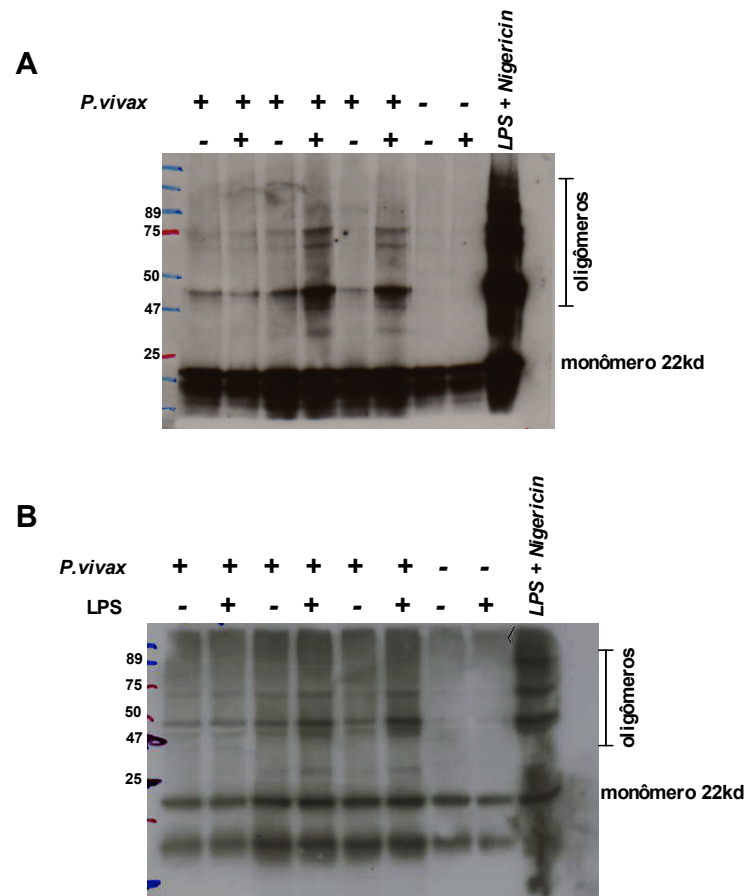


Figura 16: Oligomerização de ASC durante a infecção por *P. vivax*.

Lisados de PBMCs (estimulados ou não como LPS 100ng/ml durante 3 horas) provenientes de pacientes infectados com *P. vivax*, foram tratados com *disuccinimidyl suberate* um agente *crosslinker* o qual permitiu estabilizar interações proteicas pré-existent, facilitando assim a observação dos agregados de ASC nessas amostras. O mesmo processo foi feito com PBMCs de doadores saudáveis. Como controle positivo, PBMCs de pacientes saudáveis foram estimulados com LPS (100ng/ml) durante 3h + nigericina (5 μ M) durante 30min. **(A)** Pode ser observado um western blot proveniente de um gel de 15% e em **(B)** observar-se um western blot de amostras provenientes de uma segunda campanha de área endêmica, as quais foram aplicadas em um gel de 12%.

5.9 A infecção por *P. vivax* leva formação de “specks” de NLRP3, NLRP12 e AIM2

Uma vez que já havia sido observado a presença de oligômeros de ASC em lisados de PBMCs de pacientes com malária vivax, e também a presença de caspase-1 ativa em monócitos, faltava ainda definir se haveria algum receptor citosólico envolvido nesse fenômeno em humanos. Assim, os monócitos de pacientes infectados com *P. vivax* foram isolados e utilizados em ensaios de microscopia de fluorescência. Aproximadamente 7% dos monócitos apresentaram agregados de NLRP3, 10% agregados de NLRP12, e uma pequena proporção (0.25%) apresentavam oligômeros de AIM2, não sendo possível encontrar aglomerados de NLRC4 (**Figura 17A e 17B**). Na **Figura 17B** é possível também observar oligômeros de ASC em monócitos, confirmando assim os dados apresentados na **Figura 16**. Além disso, os oligômeros de NLRP3 bem como os oligômeros de AIM2, colocalizam com os oligômeros de ASC (**Figura 17B**). De modo curioso, não foi detectado nenhum oligômero de NLRP12 colocalizado com oligômeros de ASC (**Figura 17B**). Esses dados sugerem que provavelmente NLRP3, AIM2, mas não NLRP12 utilizam a molécula adaptadora ASC para recrutar caspase-1 durante a malária vivax. Visto que os oligômeros de NLRP3 e NLRP12 foram os mais abundantes, foi verificado se esses dois receptores poderiam em algum momento compor o mesmo inflamassoma, porém não foi detectado nenhuma colocalização entre os oligômeros de NLRP3 e NLRP12 (**dados não mostrados**). Controles experimentais internos são mostrados nas **Figuras 17C e 17D**, como células estimuladas com (LPS + ATP) e células transfectadas, garantindo assim que todos os anticorpos estavam funcionando, mesmo quando não era observado os oligômeros, como foi o caso do NLRC4 na **Figura 17B**. É importante ressaltar que, na falta do estímulo adequado para promover a oligomerização dos elementos do inflamassoma, esses são encontrados de modo difuso no citoplasma de células transfectadas (**Figura 17C**) mas não em células de doadores saudáveis (**Figura 17D**).

Finalmente, na **Figura 18** é mostrado um diagrama detalhando a sequência de eventos necessários para que se possa ter a formação do inflamassoma,

ativação de caspase-1 e conseqüentemente a liberação de níveis elevados de IL-1 β durante a infecção por *Plasmodium*.

FIGURA 17

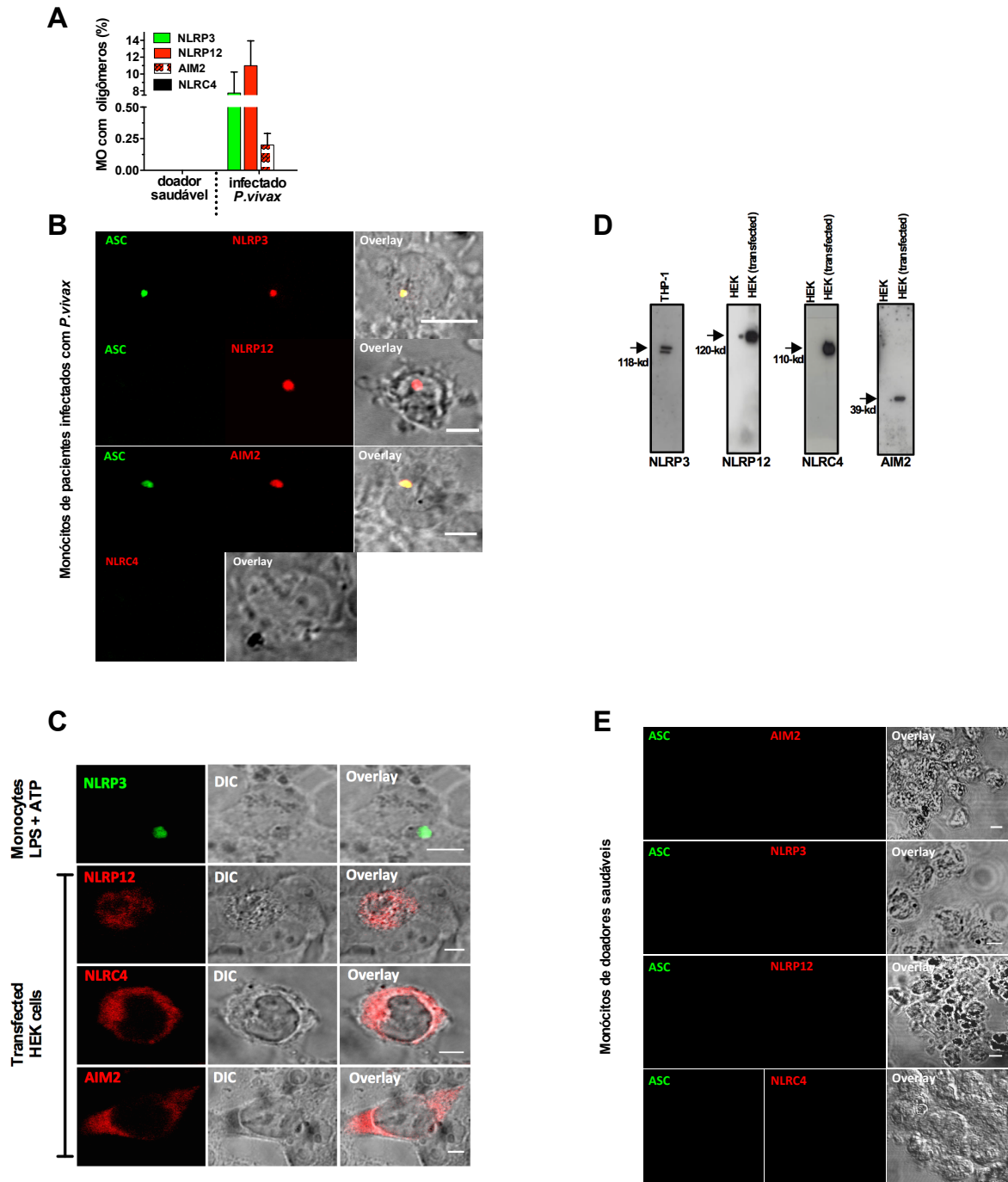


Figura 17: Monócitos de pacientes infectados com *P. vivax* apresentam agregados (*specks*) de alguns receptores citosólicos e ASC.

Monócitos de pacientes infectados com *P. vivax* foram enriquecidos utilizando um sistema de micropartículas magnéticas da *EasySep*. Todos os monócitos, incluindo os CD16 positivos foram contemplados nesse enriquecimento. Posteriormente os *specks* de alguns receptores citosólicos foram visualizados sob o auxílio de um microscópio confocal. Foram utilizados 5 pacientes infectados e 4 doadores saudáveis. **(A)** A frequência de monócitos apresentando *specks* foi definida pela contagem de 500 células em 5-6 campos diferentes da lâmina de cada paciente, e então calculado a média. Não foi possível observar *specks* em monócitos de doadores saudáveis. **(B)** Foram observados também *specks* de ASC, os quais colocalizaram com os *specks* de NLRP3, AIM2, mas não NLRP12. **(C)** Para verificar a qualidade dos anticorpos empregados nos ensaios de microscopia confocal, foi utilizado como controle positivo para NLRP3-inflamassoma, monócitos provenientes de doadores saudáveis estimulados com LPS (100ng/ml) por 3h + nigericina (5µM) durante 30min. Além disso, células HEK foram transfectadas e passaram então a expressar transientemente os receptores NLRP12, NLRC4 e AIM2, os quais puderam ser observados de modo difuso no citoplasma das células. **(D)** Essas mesmas células HEK transfectadas, foram lisadas para verificação da expressão proteica dos receptores NLRP12, NLRC4 e AIM2 por *western blot*, no qual foi utilizado o mesmo anticorpo empregado nos ensaios de microscopia confocal. Para a validação do anticorpo anti-NLRP3 por *western blot*, foi utilizado lisado de células THP1. **(E)** Monócitos de doadores saudáveis foram enriquecidos e analisados por microscopia confocal, os quais não apresentaram nenhum tipo de *speck*.

FIGURA 18

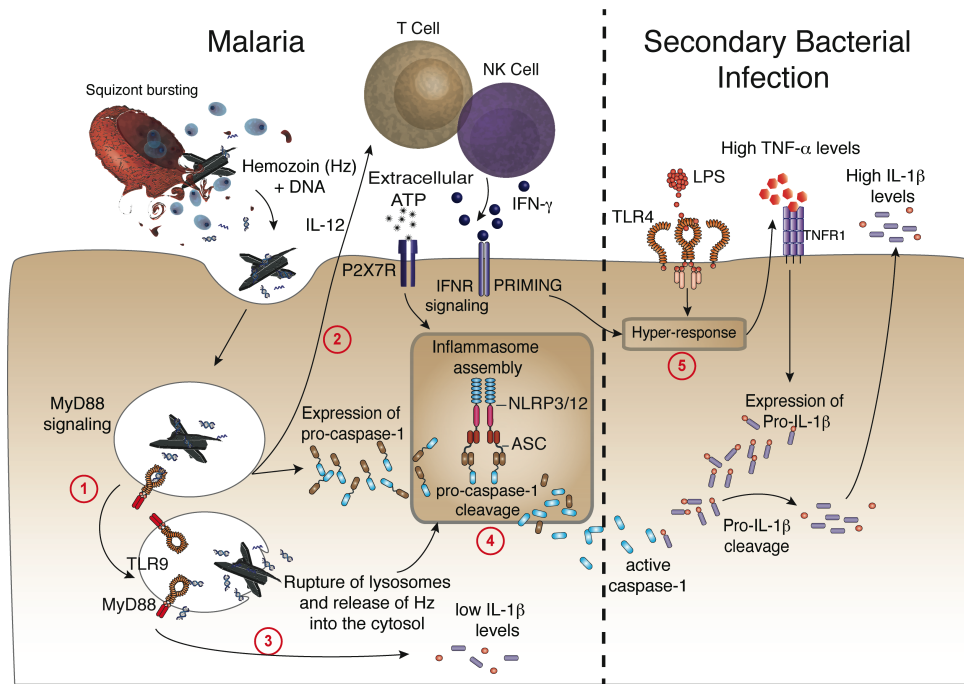


Figura 18: Ativação da caspase-1 dependente do NLRP3 e do NLRP12-inflamassoma, predispõem o hospedeiro ao choque induzido por uma coinfeção bacteriana.

(1) O complexo DNA/hemozoína internalizados por fagócitos promove a sinalização de TLR9 via MyD88 o que (2) culmina na expressão de IL-12, citocina a qual inicia leva a expressão de IFN- γ por linfócitos T e células NK. (3) Baixos níveis de IL-1 β são secretados de modo independente de caspase-1 durante a malária. (4) A sensibilização, *priming*, mediado pela sinalização via Myd88 e IFN- γ promove um aumento da expressão de pró-caspase-1 em fagócitos. A ruptura do fagolisossomo bem como o a liberação do seu conteúdo, pode levar a montagem dos inflamassomas contendo ASC, NLRP3 e NLP12 e conseqüentemente a ativação de caspase-1. (5) Finalmente, uma coinfeção bacteriana pode desencadear a expressão de altos níveis de pró-IL-1 β , de modo dependente da sinalização por TNFR1. Assim, essa grande quantidade pró-IL-1 β agora pode ser clivada pela caspase-1 gerada no passo 4 e finalmente níveis elevados dessa citocina em sua forma ativa pode ser liberado por esses fagócitos.

6-Discussão

6.1 ASC e a ativação da caspase-1 durante a malária.

A caspase-1 é ativada por complexos citosólicos conhecidos como inflamassomas [134,242]. Durante a formação desses complexos, receptores pertencentes à família dos *Nod-Like receptors* participam do recrutamento da caspase-1 diretamente, como por exemplo NLRC4 e NLRP1 [171,243], ou por meio da molécula adaptadora ASC, por exemplo NLRP2, NLRP3 e AIM2, sendo o último não pertencente à família dos NLRs [145,148,244]. Estudos recentes revelaram que diferentes sinais podem levar a formação dos inflamassomas, porém, pouco se sabe a respeito dos mecanismos associados a montagem dessas estruturas [243,245] [246] [247].

O inflamassoma mais estudado, e por isso melhor compreendido, é aquele que apresenta em sua estrutura o receptor NLRP3, sendo esse ativado por um grande número de estímulos que vão desde uma infecção bacteriana a sinais gerados por cristais de natureza distintas [139-141,151-154,160-162,195].

Em 2009 foi demonstrado que o NLRP3 inflamassoma, ou seja, o inflamassoma que utiliza o receptor NLRP3, também poderia ser montado por macrófagos diferenciados a partir da medula óssea de camundongos, em resposta a presença da hemozoína sintética [85,201]. Adicionalmente, foi demonstrado que o efluxo de K^+ é um dos elementos chave na ativação da caspase-1 por hemozoína. Entretanto, nada havia sido demonstrado durante a infecção por *Plasmodium in vivo*, a não ser dados contraditórios onde Dostert e colaboradores encontraram certa resistência em animais NLRP3^{-/-} à malária cerebral murina, enquanto Reimer e colaboradores demonstram exatamente o contrário [201] [248]. Assim, a pergunta fundamental ainda não havia sido respondida: a infecção por *Plasmodium* poderia levar a ativação da caspase-1? Nesse trabalho foi comprovado que de fato a caspase-1 é ativada durante a malária tanto humana quanto murina, sendo esse fenômeno dependente não apenas do receptor NLRP3, mas também do NLRP12. Além disso, foi encontrado uma frequência muito baixa de monócitos contendo aglomerados de AIM2 em pacientes infectados com *P. vivax*, enquanto no modelo murino a deficiência em AIM2 não impactou a ativação de caspase-1. Recentemente foi descrito que o complexo hemozoína + CpG pode levar ativação de NLRP3 e também do AIM2 inflamassoma *in vitro* [249]. Assim, no contexto da malária, podemos concluir que

o AIM2 inflamassoma pode ser ativado dependendo da circunstância do estímulo dado, *in vitro* ou *in vivo*, e nesse último caso, o tipo de cepa utilizada pode ser um fator condicionante.

Em 2007, Fernandes-Alnemri e colaboradores elucidaram uma plataforma molecular que se forma em células THP1 (*Human acute monocytic leukemia cell line*) após o estímulo com LPS, sendo essa capaz de clivar pró-IL-1 β . Essa plataforma é conhecida como piroptossomo sendo ela constituída por dímeros de ASC os quais são capazes de recrutar a pró-caspase-1. Curiosamente, essa estrutura não requer a presença de nenhum receptor citosólico, seja ele pertencente a família dos NLRs ou não. Os autores citados acima avaliaram o estado oligomérico de ASC, por meio de um protocolo com o qual foi possível estabilizar as interações proteicas pré-estabelecidas, o que permitiu observar que grande parte dessa estrutura estava sob a forma de dímeros além de alguns multímeros [241]. De fato, a presença dos aglomerados de ASC pode ser utilizada como um indicativo da formação do inflamassoma e/ou piroptossomo, o que impreterivelmente culmina na ativação de caspase-1 [238].

Desse modo, durante o desenvolvimento desse estudo, buscou-se identificar aglomerados de ASC no PBMCs de pacientes infectados com *P. vivax*. Ao empregar o mesmo tipo de técnica utilizada por Fernandes-Alnemri e colaboradores para descrever o piroptossomo, foi possível observar a presença desses dímeros em amostras provenientes de pacientes infectados por *P. vivax*. É importante ressaltar que a infecção causada por *P. vivax* fornece sinais suficientes para levar a oligomerização de ASC, dispensando o estímulo de LPS.

De modo semelhante à infecção por *P. vivax*, a ativação de caspase-1 em macrófagos e células dendríticas murinas, bem como a secreção elevada de IL-1 β durante a infecção por *P. chabaudi*, também exigiram a presença da molécula adaptadora ASC. Baseado nos resultados observados em humanos e em camundongos, pode-se concluir que a molécula ASC é um elemento crucial na ativação de caspase-1 durante a malária.

6.2 Citocinas pró-inflamatórias Vs ativação da caspase-1 e a secreção de IL-1 β .

Durante a malária, várias síndromes podem ser desencadeadas, como a anemia grave, acidose metabólica, sepse e, finalmente, a malária cerebral. Todos esses eventos estão relacionados com a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias [110,223,250].

O TNF- α tem sido colocado em destaque quando o assunto é a patogênese da malária [251]. Níveis elevados dessa citocina, e de outras induzidas por ela (ex, IL-1 β e IL-6), têm sido encontrados em fluidos cérebro-espinais de pacientes infectados com *P. falciparum*, sendo observado uma correlação com a cefalopatia incluindo a perda neuro-funcional ao longo do tempo [252,253]. A infecção por *P. vivax* também pode levar a quadros de encefalopatia em casos não tratados ou em regiões de resistência a cloroquina [16]. Ademais, níveis elevados de TNF- α também podem ser observados em pacientes durante a malária vivax [254].

Recentemente, foi demonstrado que macrófagos de camundongos selvagens estimulados com TNF- α , culminando assim na ativação de NF κ B, e logo após expostos à ATP, são capazes de ativar caspase-1 e secretar IL-1 β de modo dependente do NLRP3-inflamassoma [168]. Desse modo, poderia então TNF- α regular a formação do inflamassoma durante a malária? Como foi descrito na seção de resultados, animais deficientes para o receptor 1 do TNF (TNFR1 $^{-/-}$) são plenamente capazes de ativar caspase-1, enquanto a ativação da caspase-1 em animais deficientes para IFN- γ (IFN γ $^{-/-}$) foi praticamente abolida. É importante ressaltar que, no modelo proposto por Bauernfeind descrito acima, a sinalização via TNFR é apenas uma das possibilidades de regulação do NLRP3-inflamassoma por meio da ativação de NF κ B, ao passo que macrófagos oriundos de animais TNFR1/2 $^{-/-}$ quando estimulados com LPS + ATP, são plenamente capazes de ativar caspase-1. Nesse caso a sinalização via TLR4 foi quem desencadeou o primeiro sinal, o *priming*, e não a sinalização via TNFR [168].

Um trabalho publicado pelo nosso grupo, demonstrou que durante a infecção por *Plasmodium*, ocorre um aumento da expressão e responsividade dos TLRs, sendo esse fenômeno dependente de IFN- γ [88]. Isso pode ser uma

possível explicação para o fato de não ser observado caspase-1 ativa em animais IFN- γ ^{-/-}, mas sim em animais TNFR1^{-/-}, no qual a produção de IFN- γ é normal. É interessante lembrar que a ativação da caspase-1 durante a malária murina foi completamente dependente de MyD88. Também foi observado que na ausência do receptor TLR9 não é possível detectar essa molécula na sua forma ativa durante a infecção por *P. chabaudi*. Assim, a integração entre as vias de sinalização do IFN- γ e dos TLRs podem regular a atividade do inflamassoma durante a malária.

As vias de sinalização que controlam a expressão dos elementos do inflamassoma, bem como a sua ativação, ainda são parcialmente compreendidas. Podemos dizer que pelo menos dois fatos dificultam esse entendimento: (i) a diversidade dos receptores citosólicos que são capazes de promover a formação do inflamassoma, e (ii) a diversidade dos estímulos que conseguem promover essa ativação [255]. Além disso, os estudos *in vitro* podem não elucidar fielmente o que está acontecendo *in vivo*. Um exemplo desse tipo de situação foi descrita nesse trabalho. Como já dito, o *priming* promovido por TNF, possibilita a ativação de caspase-1 *in vitro* [168]. No entanto, durante a malária murina, a falta da sinalização por TNFR1 não impactou a ativação dessa protease. Por outro lado, existem relatos de que a produção de IFN- γ por linfócitos T, pode diminuir a atividade do NLRP3-inflamassoma. Nesse caso, IFN- γ seria responsável por promover a expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS), culminando na disponibilidade de Óxido Nítrico (NO), o qual levaria a nitrosilação do NLRP3 em modelos de tuberculose [256]. Entretanto, animais deficientes em IFN- γ , quando infectados por *P. chabaudi*, são incapazes de expressar caspase-1 sob sua forma ativa, provavelmente devido a baixa disponibilidade de sua forma pró. Desse modo, podemos concluir que durante a malária, o papel do IFN- γ na regulação do inflamassoma, é pelo menos em parte associado ao controle da expressão de caspase-1. Finalmente, para aumentar ainda mais complexidade das vias de regulação do inflamassoma, alguns trabalhos sugerem que o IFN- γ pode perder a sua atividade inibitória na presença simultânea de agonistas de TLRs [257,258]. Talvez esse seja o mecanismo utilizado durante a malária

Em contrapartida, mesmo apresentando caspase-1 ativa, animais TNFR1^{-/-} foram incapazes de secretar IL-1 β , mesmo após o estímulo com um potente

indutor da pró-IL-1 β , o LPS. Como a falta da sinalização por TNFR1 poderia afetar a secreção de IL-1 β em sua forma ativa? Normalmente, não se observa a expressão de pró-IL-1 β de modo constitutivo nas células. Entretanto, a sua expressão pode ser fortemente induzida por sinais pró-inflamatórios que levam a ativação de NF κ B, como o LPS e o TNF- α [224,225]. De fato, animais TNFR1^{-/-} assim como IFN- γ ^{-/-} não são capazes de expressar pró-IL-1 β . É importante notar que a produção de TNF- α em animais IFN- γ ^{-/-} é quase inexistente mesmo após o desafio com LPS, ao passo que animais TNFR1^{-/-} são plenamente capazes de produzir IFN- γ . Desse modo, podemos concluir que durante a malária murina, a produção de IFN- γ , devido a sinalização via TLR/Myd88, torna possível a produção de TNF- α , que agora habilita as células a expressarem pró-IL-1 β .

6.3 Secreção da IL-1 β e a ativação da caspase-1 em monócitos humanos.

Existe uma discussão calorosa a respeito da capacidade do LPS levar a secreção de IL-1 β sem depender de outro estímulo em cultura de células THP1. Recentemente, alguns trabalhos mostraram que contaminantes presentes no LPS, como por exemplo lipoproteínas, seriam os responsáveis pela ativação da caspase-1, e conseqüentemente pela maturação de IL-1 β . Quando utilizado LPS ultra puro para estimular células THP1 esse fenômeno não foi mais observado [145,259]. Curiosamente, Fernandes-Alnemri e colaboradores [241] só puderam observar a formação do piroptossomo em células THP1 após o estímulo com LPS bruto ou com Pam3CSK4, um análogo do lipopeptídeo bacteriano. Desse modo, pode-se concluir que ao utilizar o LPS bruto, são fornecidos 2 sinais; um via TLR dado pelo LPS e o outro pelo contaminante, por exemplo muramíl dipeptídeo (MDP), um produto da degradação de peptidoglicanos (PGN), que agora pode ser sentido pela célula como um DAMP, promovendo a ativação do inflamassoma *in vitro*. A sinergia desses dois sinais culmina na ativação da caspase-1 e conseqüentemente na secreção de IL-1 β [259-261].

No entanto, essa discussão ainda está longe de acabar. Trabalhos clássicos tem mostrado que o LPS purificado tem a capacidade de promover a maturação de IL-1 β , sem depender de outro estímulo [262,263]. Além disso, recentemente foi demonstrado que monócitos humanos CD14⁺, purificados a

partir de PBMCs, apresentam caspase-1 ativa constitutivamente, e quando estimulados com LPS purificado são plenamente capazes de secretar IL-1 β . Por outro lado, macrófagos diferenciados a partir da medula óssea ou presentes em tecidos, necessitam de um sinal adicional, por exemplo ATP, para secretar IL-1 β [264].

De modo semelhante aos achados de Netea, monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) provenientes tanto de pacientes saudáveis quanto de pacientes infectados por *P. vivax*, apresentaram caspase-1 ativa. No entanto, os pacientes infectados apresentaram em média 3 vezes mais monócitos (CD14⁺CD16⁻) quando comparados com pacientes saudáveis. Uma outra população de monócitos conhecidos por apresentarem baixos níveis de expressão de CD14 na superfície, porém positivos para CD16 (CD14^{low}CD16⁺), descrita em 2003 por [231], também teve a sua frequência aumentada no PBMC de pacientes infectados por *P. vivax*. Além disso, quando foi avaliado os níveis de caspase-1 ativa nessa subpopulação, foi observado que somente as células provenientes dos pacientes infectados apresentavam essa protease em sua forma ativa. Desse modo, pode-se concluir que os monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), população que está significativamente aumentada, bem como a ativação diferencial da caspase-1 em monócitos patrulhadores (CD14^{low}CD16⁺), são as principais fontes de caspase-1 e IL-1 β durante a infecção por *P. vivax*.

É importante notar que os monócitos não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) vêm sendo associados à respostas inflamatórias desencadeadas por componentes liberados em decorrência de danos teciduais, uma grande fonte de DAMPs [234-236]. Além disso, inúmeros trabalhos têm mostrado o envolvimento desse tipo celular em doenças autoimunes e desordens inflamatórias [265-267], sendo esse tipo de monócito (CD14^{low}CD16⁺) especializado em produzir TNF α e IL-1 β [235]

6.4 TLRs Vs NLRs, e a ativação da caspase-1.

A grande maioria dos trabalhos que estudam a formação do inflamassoma, a ativação da caspase-1 e a secreção de IL-1 β , utilizam como controle positivo a combinação de agonistas de TLRs mais DAMPs, sendo esse último “sentido” pelos NLRs. No entanto, ainda não é totalmente compreendido como o *priming*

causado pelos agonistas de TLRs influencia na formação de alguns inflamassomas .

Os TLRs emitem sinais em resposta a moléculas derivadas de microorganismos, quando essas são disponibilizadas no meio extracelular ou no compartimento endolisossomal [70,268]. A sinalização desses receptores é de certo modo restrita a um espectro limitado de ligantes [269]. Por outro lado, uma imensa variedade de entidades como bactéria, vírus, produtos microbianos purificados, componentes provenientes de células necróticas, cristais ou agregados de materiais (orgânicos ou inorgânicos) podem ativar os NLRs e desencadear uma resposta inflamatória robusta [270]. Assim, poderia a sinergia entre essas duas frentes da imunidade inata, TLRs e NLRs (e também outros receptores citosólicos), prevenir uma resposta inflamatória acidental, como é o caso das “cryopyrinopatias” devido a mutações do NLRP3? [271,272].

Recentemente foi demonstrado que a ativação de NF κ B, em decorrência da sinalização dos TLRs e também do receptor de TNF (TNFR), estaria relacionada com o “licenciamento” da formação do NLRP3-inflamassoma, uma vez que esse fator de transcrição regula a expressão do NLRP3. É importante observar que somente a ativação de NF κ B é insuficiente para levar a ativação de caspase-1, sendo necessário um sinal adicional para que ocorra oligomerização dos componentes desse inflamassoma [168]. Bauernfeind e colaboradores só conseguiram abolir a ativação da caspase-1, quando utilizado LPS ou poly I:C como primeiro sinal, em animais duplo deficientes para as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF (MyD88^{-/-}/TRIF^{-/-}).

Considerando que a ativação da caspase-1 durante a malária murina acontece de modo similar ao mecanismo proposto por Bauernfeind, o primeiro sinal, deve ser dirigido por algum PAMP derivado do *Plasmodium*, o qual estimularia algum receptor, provavelmente TLR, que utiliza somente MyD88 como molécula adaptadora. Como foi descrito na seção de resultados, a falta de MyD88, bem como a falta de TLR9, foram suficientes para diminuir a disponibilidade da caspase-1 ativa, e também da produção de IL-1 β durante a malária murina.

É importante notar que já foi demonstrado que a hemozoína (Hz) teria a capacidade de carrear DNA de *Plasmodium*, sendo esse responsável pela sinalização via TLR9 [82]. Desse modo, seria a sinalização via TLR9, em resposta

ao DNA do *Plasmodium*, juntamente com o sinal de perigo emitido pela hemozoína, os dois sinais requeridos para ativação da caspase-1 durante a malária? Recentemente foi descrito que a Hz aparece colocalizada com DNA dentro dos eritrócitos infectados mesmo antes da digestão pelo fagolisossomo [249]. Em ensaios *in vitro*, eles demonstraram que a Hz associada ao DNA genômico do *Plasmodium*, ou a oligonucleotídeos contendo regiões ricas em CpG, produzem sinais suficientes tanto para levar a expressão dos elementos do inflamassoma, o *priming*, quanto para promover a oligomerização desses elementos, ou seja, ativação do inflamassoma. Ainda de acordo com Kalantari e colaboradores, o *priming* ocorre por meio da sinalização via TLR9, e o sinal de oligomerização surge quando a Hz, que nesse momento já se encontra desassociada do DNA, leva a uma desestabilização do fagolisossomo e ao extravasamento do seu conteúdo no citoplasma. Eles demonstraram que esse processo culmina na formação dos inflamassomas que requerem os receptores NLRP3 e AIM2 [249].

De modo semelhante aos dados *in vitro* obtidos por Kalantari e colaboradores, a infecção por *P. vivax* leva a ativação não só do NLRP3 e AIM2, mas também do NLRP12 inflamassoma. No entanto, durante a infecção *in vivo* por *P. chabaudi*, animais AIM2^{-/-}, mas não NLRP3^{-/-} e NLRP12^{-/-} conseguem ativar caspase-1 e secretar IL-1β sob sua forma ativa. Além disso, a frequência de monócitos provenientes de pacientes infectados com *P. vivax*, que apresentaram aglomerados de AIM2, foi relativamente baixa quando comparado com frequência de monócitos contendo aglomerados de NLRP3 e NLRP12. Desse modo, talvez seja razoável dizer que o inflamassoma que utiliza AIM2 como receptor, tenha uma importância menor no processo de ativação de caspase-1, bem como na liberação de IL-1β durante a infecção *in vivo* por *Plasmodium*.

Embora seja tentador dizer que a hemozoína é responsável por desencadear o processo de oligomerização dos elementos do inflamassoma, durante a infecção *in vivo* por *Plasmodium*, isso ainda não passa de uma hipótese. Visto que durante a infecção por *P. chabaudi* os animais P2x7^{-/-} não foram capazes de ativar caspase-1, deve-se considerar a possibilidade do ATP extracelular ser um dos sinais responsáveis pela oligomerização dos elementos do inflamassoma. É interessante lembrar que durante o ciclo intraeritrocítico do

Plasmodium, as hemácias infectadas (iRBCs) tornam-se menos densas devido a digestão da hemoglobina pelo parasito. Além disso, as iRBCs perdem a sua morfologia característica, tornando-se mais esféricas, rígidas, e também mais permeável a uma grande variedade de moléculas [273]. Essas células perdem vários componentes celulares, como ácido siálico, glutatona e especialmente ATP, o qual é liberado no meio extracelular [274]. Ademais, a hipóxia tecidual, um evento central na patogênese da malária [275] também pode levar a liberação de ATP em resposta ao estresse causado pela baixa oxigenação [276].

Finalmente, é importante apontar que durante a malária, ocorre a hemólise das iRBCs, sendo liberado nesse momento elevados níveis dos grupamentos heme na circulação [277]. Esses grupos têm sido associado com a incidência de malária grave [278] e também com quadros de sepse grave [279]. Recentemente, foi demonstrado que o grupo heme é capaz de promover a ativação de caspase-1 e produção de IL-1 β em macrófagos. Esse evento foi dependente de NLRP3, ASC, efluxo de K⁺ e produção de ROS [280]. Assim, além da hemozoína, o ATP extracelular e também os grupos heme circulantes devem ser considerados como possíveis elementos desencadeadores da ativação do inflamassoma durante a malária.

6.5 O papel do NLRP12 na resposta imune inata, desordens inflamatórias e a malária.

Em humanos, o receptor NLRP12 também conhecido como (NALP12, MONARCH-1 ou PYPAF7) é expresso em leucócitos do sangue periférico, incluindo granulócitos, monócitos e células dendríticas [281,282]. De modo similar, esse receptor também é encontrado em neutrófilos, macrófagos e células dendríticas de camundongos [283,284]. No entanto, o papel do NLRP12 na resposta imune inata ainda é controverso, havendo evidências de sua participação em processos inflamatórios e ao mesmo tempo em processos reguladores da inflamação [285].

Alguns trabalhos têm sugerido que o NLRP12 pode funcionar como um “antagonista” dos sinais inflamatórios induzidos pela sinalização dos TLRs, TNF- α e também pela infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis* [286] Além disso, esse receptor parece participar da manutenção da homeostasia intestinal,

atenuando a inflamação do cólon e regulando o processo de tumorigênese colorretal, por controlar a ativação de NF- κ B e ERK em macrófagos [283]. Esse receptor também tem sido envolvido no controle da migração de células dendríticas para linfonodos, potencializando o processo inflamatório observado em episódios de hipersensibilidade de contato [173], porém sendo dispensável para a ativação de caspase-1 em resposta a uma grande variedade de estímulos *in vitro*, incluindo *S. typhimurium*, várias espécies de *Listeria* e ATP [283].

No entanto, o NLRP12 foi o primeiro receptor da família dos NLRs, que demonstrou a capacidade de se associar a molécula adaptadora ASC, em células transfectadas, culminando na ativação de IL-1 β de modo dependente do inflamassoma e caspase-1 [281]. No modelo de infecção por *P. chabaudi*, descrito nesse estudo, tanto ASC quanto NLRP12, foram fatores limitantes para ativação de caspase-1 em macrófagos e células dendríticas. Além disso, a infecção causada por *P. vivax* foi capaz de promover a oligomerização de ASC e também do NLRP12, porém não foi possível detectar essas duas estruturas colocalizadas no interior dos monócitos. Assim, ainda não é possível dizer se ASC está sendo recrutado por NLRP12 para formação do inflamassoma durante a malária.

O papel do NLRP12 na formação do inflamassoma e na ativação da caspase-1, é algo praticamente desconhecido, principalmente no que se refere a doenças infecciosas. Em 2012 foi publicado um trabalho descrevendo a importância da formação do NLRP12 inflamassoma, na maturação de IL-18 e IL-1 β , em resposta a infecção por *Yersinia pestis* [287]. Agora, pela primeira vez, o presente estudo também descreve a dependência do NLRP12 no processo de formação do inflamassoma e da ativação de caspase-1, durante a malária.

Finalmente, é interessante notar que febres recorrentes, inflamação sistêmica, peritonite estéril, além de manifestações cutâneas e artrites, não são sintomas encontrados somente em pacientes que sofrem de “cryopyrinopatias” associadas a mutação de NLRP3. Uma nova classe de síndromes auto-inflamatórias conhecida como “desordens associadas ao receptor NLRP12” (NLRP12AD) tem sido relacionada com mutações nesse receptor. [288-291]. As células mononucleares do sangue periférico provenientes de pacientes com mutações no receptor NLRP12, secretam altos níveis de IL-1 β espontaneamente. Quando esses pacientes foram submetidos ao tratamento utilizando um

antagonista do receptor de IL-1, e assim apresentando uma melhora dos sintomas clínicos, pôde-se observar também uma diminuição significativa nos níveis de IL-1 β secretados por seus PBMCs [289,292,293]. É relevante notar que a sinalização via IL-1R culmina em *feedback* positivo, ou seja mais IL-1 β é produzido [294,295]. As similaridades entre as “cryopyrinopatias” e a síndrome NLRP12AD ocorrem desde a mutação nos genes dos NLRs e dependência do ASC, até a secreção anormal de IL-1 β . A síndrome NLRP12AD representa um nova classe de desordem, com poucos casos relatados no mundo até o momento.

Desse modo, ainda há muito a ser investigado no que se refere ao papel do NLRP12 na ativação de caspase-1, principalmente durante processos infecciosos. Esse trabalho abre agora precedentes para investigação do envolvimento do NLRP12 na formação do inflamassoma durante infecções parasitárias.

6.6 Consequências da ativação da caspase-1 e secreção da IL-1 β durante malária.

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

Um espectro cada vez maior de doenças inflamatórias, não infecciosas, agudas ou crônicas, são simplesmente controladas pela neutralização da IL-1 β . Essas doenças normalmente são chamadas de autoinflamatórias, onde predominantemente a IL-1 β é secretada por monócitos ou macrófagos em resposta à moléculas endógenas. O termo autoinflamação foi inicialmente utilizado no intuito de descrever uma doença rara, caracterizada por recorrentes surtos de febre e inflamação sistêmica, devido a uma mutação na região codificante da subunidade p55 do receptor de TNF [296]. A mutação observada nessa doença, conhecida como síndrome periódica associada ao receptor de TNF (TRAPS), culmina em baixos níveis do TNFR solúvel devido a um mal dobramento dessa molécula no retículo endoplasmático. De modo curioso, a

inflamação causada por TRAPS pode ser controlada com o uso do Anakinra, um antagonista do IL-1R [297,298]. Assim, TRAPS emerge como uma doença mediada por IL-1R.

Não é a primeira vez que a história dessas duas citocinas (TNF e IL-1 β) se cruzam, a produção de uma, estimula a produção de outra, entrando em um *loop* que, quando não controlado, pode ser extremamente perigoso [224,299]. A infecção causada por *P. chabaudi* fornece sinais suficientes para levar a formação do inflamassoma de modo dependente de NLRP3 e NLRP12, culminando na ativação da caspase-1. Entretanto, a presença dessa estrutura, por si só, não garante elevados níveis de IL-1 β na circulação. Além disso, somente a presença dessa protease sob a sua forma ativa, não oferece nenhum risco ao hospedeiro, o qual consegue resolver a sua parasitemia, obtendo a cura parasitológica sem maiores complicações em torno de 4 semanas após a infecção. Além disso, a falta de caspase-1 ativa, vista em animais Casp-1^{-/-} bem como ASC^{-/-}, também não impede que a infecção por *P. chabaudi* siga o seu curso normal.

É importante ressaltar que o *P. chabaudi* é uma cepa não letal, porém quando inoculado baixos níveis de LPS em animais C57BL/6 infectados por ela, os mesmos sucumbem dentro de 12 horas após a esse desafio. Esse fenômeno não é observado em animais não infectados. De modo interessante, essa letalidade é acompanhada pela produção descontrolada de TNF- α e IL-1 β . É interessante notar que a partir do 21º de infecção, os animais selvagens são completamente resistentes ao desafio feito com LPS, e coincidentemente são capazes de controlar a produção de TNF- α e IL-1 β , ou talvez simplesmente incapazes de produzi-las. É interessante lembrar que em casos de choque endotóxico, TNF- α e IL-1 β são secretados de forma rápida e descontrolada [300].

No intuito de avaliar se os níveis elevados de IL-1 β na circulação disponibilizado após o inóculo de LPS, estariam relacionados com essa susceptibilidade ao choque, animais IL-1R^{-/-} foram então desafiados com LPS no sétimo dia de infecção com *P. chabaudi*. De fato, a ativação da caspase-1 pode se transformar em um evento perigoso para o hospedeiro durante a infecção por *P. chabaudi* se um potente indutor de TNF- α e conseqüentemente de IL-1 β estiver disponível. Os animais IL-1R^{-/-} tornaram se mais resistentes a esse choque induzido por LPS, mesmo com a produção de TNF α equivalente aos níveis

observados em animais selvagens. De modo surpreendente, o tratamento com um antagonista do receptor de IL-1, possibilitou a reversão do quadro de inteira susceptibilidade, a uma resistência quase completa ao desafio com LPS. A resistência total a esse choque só foi possível quando eliminado a produção de IFN- γ e TNF- α , fato observado em animais MyD88^{-/-} e IFN γ ^{-/-}, ou impedindo a sinalização por TNFR1, como foi visto em animais TNFR1^{-/-}. Por outro lado, animais deficientes em alguns componentes do inflamassoma apresentaram uma resistência similar aos animais IL-1R^{-/-}. A sinalização via TNFR1 é um componente chave nesse fenômeno, uma vez que além de permitir a produção de IL-1 β , também pode ser “tóxica” por si só [108].

Visto os resultados obtidos com o modelo (*P. chabaudi* + LPS), a seguinte pergunta foi levantada: o que pode acontecer com indivíduos coinfectados por *Plasmodium* e algum tipo de bactéria Gram-negativa? Recentemente foi demonstrado que a coinfeção por *Plasmodium berghei* NK65 e uma bactéria Gram-negativa, *Borrelia duttonii*, aumenta a mortalidade dos animais. A infecção por *P. berghei* NK65 não causa malária cerebral, porém causa anemia grave levando a morte do seu hospedeiro em torno do 21º dia de infecção. No entanto, durante o episódio de coinfeção descrito acima, esses animais passaram a morrer em torno do 10º dia, apresentando baixas taxas de parasitemia quando comparado com os níveis observados durante a infecção causada somente por *P. berghei* NK65 [301]. De modo similar a esses dados secundários, foi demonstrado nesse trabalho que animais selvagens infectados com *P. chabaudi* e posteriormente desafiados com *S. typhimurium*, tornando-se assim coinfectados, morrem dentro de poucas horas. Por outro lado, se a sinalização via IL-1R for bloqueada esse animais tornam-se resistentes.

Recentemente foi demonstrado que a infecção por *P. chabaudi* diminui a resistência do hospedeiro frente a infecção por *Salmonella* [209]. Eles propuseram que a indução de heme oxygenase -1 (HO-1) mediada pela infecção por *Plasmodium*, limita a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo esse um elemento importante no mecanismo de controle da *Salmonella*, o que provocaria então uma alta carga bacteriana sistêmica e morte do hospedeiro. [302,303].

Os estudos iniciais (*in vitro*) relacionados aos mecanismos de ativação dos inflamassomas, propuseram que ROS poderia atuar a “montante” da via de sinalização do NLRP3-inflamassoma, e de modo indireto levar a ativação de caspase-1 [162,164,167]. No entanto, a conexão entre a via da produção de ROS com o processo de formação de inflamassoma e ativação de caspase-1 é praticamente desconhecida. Na verdade, o que se tem demonstrado é que ROS pode inibir a ativação de caspase-1 por meio do processo de oxidação, sendo necessário ainda a redução dos seus níveis via SOD1 para que então ocorra a maturação de IL-1 β [170,304,305]. Além disso, pacientes com mutações que levam a uma baixa produção de ROS, sendo esses portadores da doença conhecida como CGD (Doença Granulomatosa Crônica), apresentam elevados níveis de caspase-1 em seu fagócitos, bem como episódios de hiper-inflamação acompanhada da liberação de altos níveis de IL-1 β [169,306,307].

Desse modo, a limitação da produção de ROS por HO-1 induzida pela infecção por *P. chabaudi* [209], poderia então habilitar a formação do inflamassoma, bem como a ativação de caspase-1, e assim predispondo o hospedeiro a secretar elevados níveis de IL-1 β durante uma coinfeção com bactérias Gram-negativa. De fato, como observado por Cunnington e colaboradores, nesse trabalho também foi observado um aumento significativo de *S. typhimurium* no sangue quando se compara os animais coinfectados com *P. chabaudi* + *S. typhimurium* com aqueles somente infectados com *S. typhimurium*. No entanto, o tratamento com o antagonista de IL-1R, que aumentou a resistência dos animais coinfectados, não promoveu nenhuma diminuição dos níveis de bactérias no sangue. Assim, o choque induzido por elevados níveis de IL-1 β circulando em resposta a alta carga de *S. typhimurium* no sangue, parece ser o elemento chave nesse fenômeno, e não simplesmente o aumento da carga bacteriana.

Além do modelo de coinfeção com *S. typhimurium*, um outro modelo que permite a entrada deliberada de bactérias na corrente sanguínea, SL-CLP, foi utilizado para desafiar animais infectados com *P. chabaudi*. Diferentemente dos animais não infectados, aqueles que já se encontravam na fase aguda da infecção por *P. chabaudi*, começaram a morrer 24h após o desafio com SL-CLP.

É importante salientar que o tratamento com IL-1Ra também foi capaz de promover resistência, mesmo não alterando os níveis de bactéria no sangue.

Finalmente é importante ressaltar que áreas endêmicas de malária apresentam uma alta incidência de infecções bacterianas como por exemplo *Salmonella*, *Pneumococcus* e *Meningococcus* [203,308]. O número de casos de coinfeções por *Plasmodium* e algum tipo de bactéria, é extremamente elevado nessas regiões. Pacientes coinfectados apresentam uma redução nos níveis de parasitemia, porém também apresentam uma piora do quadro clínico, associada a angústia respiratória e anemia grave. A taxa de mortalidade é 8,5 vezes maior nesses casos, principalmente durante episódios de coinfeções por bactérias Gram-negativa [204,206,309,310]. Ademais, níveis elevados de IL-1 β , IL1Ra e do TNFR1 solúvel (sTNFR1p55) são encontrados no soro e no fluido cérebro-espinal de pacientes com malária cerebral causada por *P. falciparum* [311,312].

7-Resumo dos Resultados

Com base nos resultados obtidos por esse estudo, é possível concluir que :

Em modelo experimental de infecção por *Plasmodium*,

- A caspase-1 é ativada em células dendríticas e macrófagos, sendo fenômeno dependente da molécula adaptadora ASC.
- A produção de elevados níveis de IL-1 β requer um segundo sinal emitido por LPS.
- A ativação da caspase-1 e conseqüentemente a produção da IL-1 β , requer uma sinalização via TLR9/Myd88.
- IFN- γ é um elemento limitante no processo de formação do inflamassoma e conseqüentemente da ativação de caspase-1.
- IFN- γ é essencial para produção TNF- α , que por sua vez controla a expressão da pró-IL-1 β .
- Os receptores citosólicos NLRP3 e NLRP12 são críticos no processo de formação do inflamassoma e ativação da caspase-1.
- A ativação da caspase-1 em resposta a infecção por *P. chabaudi*, pode ser tornar perigosa para o hospedeiro, se o mesmo for exposto a um indutor de TNF- α e conseqüentemente pró-IL-1 β .
- A sinalização via IL-1R está associada com a susceptibilidade dos animais infectados ao choque induzido por LPS ou por coinfeções bacteriana.

Durante a malária humana:

- A infecção por *P. vivax* ou *P. falciparum* leva ativação da caspase-1.
- Monócitos são a principal fonte de caspase-1 ativa no sangue periférico de pacientes com malária.
- A infecção por *P. vivax* induz a oligomerização de ASC, NLRP3, NLRP12, e em menor extensão também promove a oligomerização do receptor AIM2.
- O NLRP3 e o NLRP12 levam a formação do inflamassoma de modo dependente e independente de ASC, respectivamente.
- Os agregados de NLRP3 e NLRP12 não se colocizam no interior da célula, sugerindo então que essas são plataformas independentes

7-Conclusões

Esse estudo mostra que de fato, a infecção *in vivo* por *Plasmodium* culmina na formação do inflamassoma contendo principalmente NLRP3, NLRP12 e ASC, e conseqüentemente na ativação da caspase-1. Esse fenômeno culmina na produção elevada de IL-1 β durante episódios de coinfeções. Além disso, o papel de IFN- γ , TNF- α e a sinalização via TLR/MyD88, classicamente já conhecida no processo de instauração do estado hiper-responsivo do hospedeiro durante a malária, é pelo menos em parte mediada pela formação do inflamassoma, ativação da caspase-1 e finalmente liberação de IL-1 β . Contudo, em decorrência dos altos índices de casos de coinfeções entre o *Plasmodium* e bactérias Gram-negativa, a ativação da caspase-1 durante a malária deve ser considerada como um fator que pode potencializar o grau de morbidade e a taxa de mortalidade dos indivíduos residentes de áreas endêmicas.

8-Referências Bibliográficas

-
1. Gething PW, et al. (2011) Modelling the global constraints of temperature on transmission of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Parasit Vectors* 4: 92.
 2. Crompton PD, et al. (2014) Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol* 32: 157-187.
 3. Filler S, et al. (2003) Malaria surveillance--United States, 2001. *MMWR Surveill Summ* 52: 1-14.
 4. Owusu-Ofori AK, et al. (2013) Transfusion-transmitted malaria in Ghana. *Clin Infect Dis* 56: 1735-1741.
 5. Weatherall DJ, et al. (2002) Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 35-57.
 6. Boutlis CS, et al. (2003) Immunoglobulin G (IgG) responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols are short-lived and predominantly of the IgG3 subclass. *J Infect Dis* 187: 862-865.
 7. Morahan G, et al. (2002) A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. *Genes Immun* 3: 414-418.
 8. Dellicour S, et al. (2010) Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLoS Med* 7: e1000221.
 9. WHO (2010) World Malaria Report.
 10. Sullivan DJ, Jr., et al. (1996) On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11865-11870.
 11. Le Bras J, et al. (2003) The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 147-153.
 12. Hyde JE (2002) Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microbes Infect* 4: 165-174.
 13. Price RN, et al. (2014) Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 14: 982-991.
 14. Arias AE, et al. (1989) Low response of Colombian strains of *Plasmodium vivax* to classical antimalarial therapy. *Trop Med Parasitol* 40: 21-23.
 15. Baird JK (2004) Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4075-4083.
 16. Tjitra E, et al. (2008) Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* 5: e128.
 17. Oliveira-Ferreira J, et al. (2010) Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115.
 18. Loiola CC, et al. (2002) [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. *Rev Panam Salud Publica* 11: 235-244.
 19. Leggat PA (2003) *Essential malariology* David A. Warrell, Herbert M. Gilles (Eds.), 4th ed.; Arnold, London, June 2002, (xii)+348 pages with illustrations, Hardcover, ISBN 0-340-74064-7 (US\$ 98.50). *Travel Med Infect Dis* 1: 59.
 20. Hemmer CJ, et al. (2006) Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* 11: 817-823.
 21. Luxemburger C, et al. (1997) The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 256-262.
 22. Lomar AV, et al. (2005) Acute respiratory distress syndrome due to *vivax* malaria: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 9: 425-430.
 23. Price RN, et al. (2009) Antimalarial therapies in children from Papua New Guinea. *N Engl J Med* 360: 1254; author reply 1255.
 24. Nicol WD (1956) General paralysis of the insane. *Br J Vener Dis* 32: 9-16.

-
25. Martin JP (1972) Conquest of general paralysis. *Br Med J* 3: 159-160.
 26. Mueller I, et al. (2009) Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* 9: 555-566.
 27. Bassat Q, et al. Defying malaria: Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. *Nat Med* 17: 48-49.
 28. Anstey NM, et al. (2009) The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* 25: 220-227.
 29. Naing C, et al. (2014) Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3071.
 30. Aravind L, et al. (2003) *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell* 115: 771-785.
 31. Haldar K, et al. (2007) Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol* 2: 217-249.
 32. Langhorne J, et al. (2008) Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 9: 725-732.
 33. Marsh K, et al. (2006) Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 28: 51-60.
 34. Sauerwein RW, et al. (2011) Experimental human challenge infections can accelerate clinical malaria vaccine development. *Nat Rev Immunol* 11: 57-64.
 35. Graves P, et al. (2006) Vaccines for preventing malaria (pre-erythrocytic). *Cochrane Database Syst Rev*: CD006198.
 36. Graves P, et al. (2006) Vaccines for preventing malaria (blood-stage). *Cochrane Database Syst Rev*: CD006199.
 37. Zhang Q, et al. (2007) Construction and evaluation of a multistage combination vaccine against malaria. *Vaccine* 25: 2112-2119.
 38. Nussenzweig RS, et al. (1967) Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *plasmodium berghei*. *Nature* 216: 160-162.
 39. Gwadz RW, et al. (1979) Preliminary studies on vaccination of rhesus monkeys with irradiated sporozoites of *Plasmodium knowlesi* and characterization of surface antigens of these parasites. *Bull World Health Organ* 57 Suppl 1: 165-173.
 40. Hoffman SL, et al. (2002) Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 185: 1155-1164.
 41. Vaughan AM, et al. (2010) Genetically engineered, attenuated whole-cell vaccine approaches for malaria. *Hum Vaccin* 6: 107-113.
 42. Epstein JE, et al. (2011) Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8(+) T cell immunity. *Science* 334: 475-480.
 43. Seder RA, et al. (2013) Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science* 341: 1359-1365.
 44. Barry AE, et al. (2009) Contrasting population structures of the genes encoding ten leading vaccine-candidate antigens of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 4: e8497.
 45. Trieu A, et al. (2011) Sterile protective immunity to malaria is associated with a panel of novel *P. falciparum* antigens. *Mol Cell Proteomics* 10: M111 007948.
 46. Krzych U, et al. (1995) T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens. *J Immunol* 155: 4072-4077.
 47. Doolan DL, et al. (2003) Identification of *Plasmodium falciparum* antigens by antigenic analysis of genomic and proteomic data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9952-9957.

-
48. Roestenberg M, et al. (2009) Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med* 361: 468-477.
 49. Roestenberg M, et al. (2011) Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet* 377: 1770-1776.
 50. Bijker EM, et al. (2013) Protection against malaria after immunization by chloroquine prophylaxis and sporozoites is mediated by preerythrocytic immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7862-7867.
 51. Agnandji ST, et al. (2011) First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* 365: 1863-1875.
 52. Rts Sctp, et al. (2012) A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N Engl J Med* 367: 2284-2295.
 53. Zevering Y, et al. (1990) Major population differences in T cell response to a malaria sporozoite vaccine candidate. *Int Immunol* 2: 945-955.
 54. Hartgers FC, et al. (2006) Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria. *Parasite Immunol* 28: 497-506.
 55. Molloy MJ, et al. (2012) Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses. *Semin Immunol* 24: 58-66.
 56. Fell AH, et al. (1998) Immunity to asexual blood stages of Plasmodium: is resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitol Today* 14: 364-369.
 57. Molineaux L, et al. (2002) Malaria therapy reinoculation data suggest individual variation of an innate immune response and independent acquisition of antiparasitic and antitoxic immunities. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 205-209.
 58. Su Z, et al. (2000) Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection. *Infect Immun* 68: 4399-4406.
 59. Quin SJ, et al. (2001) Low CD4(+) T cell responses to the C-terminal region of the malaria merozoite surface protein-1 may be attributed to processing within distinct MHC class II pathways. *Eur J Immunol* 31: 72-81.
 60. Luyendyk J, et al. (2002) Antigen-presenting cell function during Plasmodium yoelii infection. *Infect Immun* 70: 2941-2949.
 61. Wykes MN, et al. (2009) What have we learnt from mouse models for the study of malaria? *Eur J Immunol* 39: 2004-2007.
 62. Urban BC, et al. (2006) Malaria pigment paralyzes dendritic cells. *J Biol* 5: 4.
 63. Seixas E, et al. (2001) Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, Plasmodium chabaudi chabaudi. *Eur J Immunol* 31: 2970-2978.
 64. Perry JA, et al. (2004) Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. *J Immunol* 172: 475-482.
 65. Janeway CA, Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13.
 66. Medzhitov R (2009) Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 30: 766-775.
 67. Anderson KV, et al. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42: 791-798.
 68. Takeda K, et al. (2004) TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16: 3-9.
 69. Takeda K, et al. (2004) Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 34: 73-82.
 70. Takeda K, et al. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376.
 71. Gay NJ, et al. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351: 355-356.

-
72. Lemaitre B, et al. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983.
 73. Medzhitov R, et al. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
 74. Poltorak A, et al. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282: 2085-2088.
 75. Du X, et al. (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 11: 362-371.
 76. Chuang TH, et al. (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 11: 372-378.
 77. Tabeta K, et al. (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3516-3521.
 78. Jones JD, et al. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
 79. Loo YM, et al. (2011) Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34: 680-692.
 80. Geijtenbeek TB, et al. (2009) Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 465-479.
 81. Krishnegowda G, et al. (2005) Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 280: 8606-8616.
 82. Parroche P, et al. (2007) Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1919-1924.
 83. Rosenthal PJ, et al. (1996) Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 83: 131-139.
 84. Schroder K, et al. (2010) The inflammasomes. *Cell* 140: 821-832.
 85. Shio MT, et al. (2009) Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog* 5: e1000559.
 86. Schofield L, et al. (2006) Clinical immunity to malaria. *Curr Mol Med* 6: 205-221.
 87. Franklin BS, et al. (2007) MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes Infect* 9: 881-890.
 88. Franklin BS, et al. (2009) Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5789-5794.
 89. Coban C, et al. (2007) Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol* 19: 67-79.
 90. Coban C, et al. (2005) Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201: 19-25.
 91. Franklin BS, et al. (2011) Therapeutic targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3689-3694.
 92. Miller LH, et al. (2013) Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med* 19: 156-167.
 93. Kraemer SM, et al. (2006) A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol* 9: 374-380.

-
94. Turner L, et al. (2013) Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* 498: 502-505.
 95. Clark IA, et al. (2004) Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. *Clin Microbiol Rev* 17: 509-539, table of contents.
 96. Vincent JL, et al. (2013) Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 381: 774-775.
 97. Hunt NH, et al. (2006) Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol*.
 98. Hunt NH, et al. (2003) Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 24: 491-499.
 99. Day NP, et al. (1999) The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis* 180: 1288-1297.
 100. Lyke KE, et al. (2004) 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* 72: 5630-5637.
 101. Walther M, et al. (2006) Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. *J Immunol* 177: 5736-5745.
 102. Clark IA, et al. (1994) The cytokine theory of human cerebral malaria. *Parasitol Today* 10: 410-412.
 103. Grau GE, et al. (1989) Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev* 112: 49-70.
 104. Baratin M, et al. (2007) Dissection of the role of PfEMP1 and ICAM-1 in the sensing of *Plasmodium-falciparum*-infected erythrocytes by natural killer cells. *PLoS One* 2: e228.
 105. Freitas-Junior LH, et al. (2000) Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* 407: 1018-1022.
 106. Newbold C, et al. (1999) Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 29: 927-937.
 107. Clark IA (2007) The advent of the cytokine storm. *Immunol Cell Biol* 85: 271-273.
 108. Clark IA (2007) How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 335-343.
 109. Clark IA (2009) Along a TNF-paved road from dead parasites in red cells to cerebral malaria, and beyond. *Parasitology* 136: 1457-1468.
 110. Schofield L, et al. (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5: 722-735.
 111. Wassmer SC, et al. (2003) [Pathogenesis of cerebral malaria: facts and hypotheses]. *Med Trop (Mars)* 63: 254-257.
 112. Wassmer SC, et al. (2003) Pathophysiology of cerebral malaria: role of host cells in the modulation of cytoadhesion. *Ann N Y Acad Sci* 992: 30-38.
 113. Gimenez F, et al. (2003) Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* 60: 1623-1635.
 114. Kwiatkowski D (2000) Genetic dissection of the molecular pathogenesis of severe infection. *Intensive Care Med* 26 Suppl 1: S89-97.
 115. Aidoo M, et al. (2001) Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX. *Genet Epidemiol* 21: 201-211.
 116. Knight JC, et al. (1999) A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 22: 145-150.

-
117. McGuire W, et al. (1999) Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 179: 287-290.
 118. Wattavidanage J, et al. (1999) TNF α *2 marks high risk of severe disease during *Plasmodium falciparum* malaria and other infections in Sri Lankans. *Clin Exp Immunol* 115: 350-355.
 119. Wassmer SC, et al. (2005) Inhibition of endothelial activation: a new way to treat cerebral malaria? *PLoS Med* 2: e245.
 120. Hansen DS, et al. (2003) Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* 18: 391-402.
 121. Hensmann M, et al. (2001) Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 69: 2364-2371.
 122. Artavanis-Tsakonas K, et al. (2002) Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- γ from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 169: 2956-2963.
 123. Clark IA, et al. (1992) Roles of TNF in malaria and other parasitic infections. *Immunol Ser* 56: 365-407.
 124. Koch O, et al. (2002) IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria. *J Infect Dis* 185: 1684-1687.
 125. Yanez DM, et al. (1996) Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol* 157: 1620-1624.
 126. Amani V, et al. (2000) Involvement of IFN- γ receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. *Eur J Immunol* 30: 1646-1655.
 127. Murphy SC, et al. (2001) Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 64: 57-67.
 128. Snow RW, et al. (1999) Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ* 77: 624-640.
 129. Rodriguez-Morales AJ, et al. (2006) Is anemia in *Plasmodium vivax* malaria more frequent and severe than in *Plasmodium falciparum*? *Am J Med* 119: e9-10.
 130. Ru YX, et al. (2009) Invasion of erythroblasts by *Plasmodium vivax*: A new mechanism contributing to malarial anemia. *Ultrastruct Pathol* 33: 236-242.
 131. Erdman LK, et al. (2008) Inflammatory pathways in malaria infection: TLRs share the stage with other components of innate immunity. *Mol Biochem Parasitol* 162: 105-111.
 132. Ausubel FM (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6: 973-979.
 133. Ting JP, et al. (2005) CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* 23: 387-414.
 134. Martinon F, et al. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell* 10: 417-426.
 135. Martinon F, et al. (2007) NALP Inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol*.
 136. Lamkanfi M, et al. (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157: 1013-1022.
 137. Srinivasula SM, et al. (2002) The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* 277: 21119-21122.

-
138. Masumoto J, et al. (1999) ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 274: 33835-33838.
 139. Kanneganti TD, et al. (2006) Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440: 233-236.
 140. Mariathasan S, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-232.
 141. Martinon F, et al. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-241.
 142. Sutterwala FS, et al. (2006) Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24: 317-327.
 143. Mariathasan S, et al. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430: 213-218.
 144. Mariathasan S, et al. (2005) Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J Exp Med* 202: 1043-1049.
 145. Agostini L, et al. (2004) NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20: 319-325.
 146. Grenier JM, et al. (2002) Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett* 530: 73-78.
 147. O'Connor W, Jr., et al. (2003) Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. *J Immunol* 171: 6329-6333.
 148. Yu JW, et al. (2006) Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ* 13: 236-249.
 149. Rock KL, et al. (2010) The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* 28: 321-342.
 150. Iyer SS, et al. (2009) Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20388-20393.
 151. Cervantes J, et al. (2008) Intracytosolic *Listeria monocytogenes* induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. *Cell Microbiol* 10: 41-52.
 152. Monack DM (2008) The inflammasome: a key player in the inflammation triggered in response to bacterial pathogens. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46 Suppl 1: E14.
 153. Kim S, et al. (2010) *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 40: 1545-1551.
 154. Kanneganti TD, et al. (2006) Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 281: 36560-36568.
 155. Kahlenberg JM, et al. (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1100-1108.
 156. Kanneganti TD, et al. (2007) Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 26: 433-443.
 157. Petsev DN, et al. (2000) Interactions and aggregation of apoferritin molecules in solution: effects of added electrolytes. *Biophys J* 78: 2060-2069.
 158. Franchi L, et al. (2007) Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem* 282: 18810-18818.

-
159. Qu Y, et al. (2011) Pannexin-1 Is Required for ATP Release during Apoptosis but Not for Inflammasome Activation. *J Immunol* 186: 6553-6561.
 160. Halle A, et al. (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 9: 857-865.
 161. Hornung V, et al. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9: 847-856.
 162. Dostert C, et al. (2008) Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science*.
 163. Bolwell GP (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 2: 287-294.
 164. Cassel SL, et al. (2008) The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9035-9040.
 165. Cruz CM, et al. (2007) ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 282: 2871-2879.
 166. Gross O, et al. (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459: 433-436.
 167. Petrilli V, et al. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14: 1583-1589.
 168. Bauernfeind FG, et al. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183: 787-791.
 169. van de Veerdonk FL, et al. (2010) Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1beta inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3030-3033.
 170. Meissner F, et al. (2008) Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol* 9: 866-872.
 171. Poyet JL, et al. (2001) Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 276: 28309-28313.
 172. Mayor A, et al. (2007) A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol* 8: 497-503.
 173. Arthur JC, et al. (2010) Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. *J Immunol* 185: 4515-4519.
 174. Allen IC, et al. (2012) NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF-kappaB signaling. *Immunity* 36: 742-754.
 175. Anand PK, et al. (2012) NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature* 488: 389-393.
 176. Hornung V, et al. (2010) Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* 10: 123-130.
 177. Poeck H, et al. (2010) Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol* 11: 63-69.
 178. Kayagaki N, et al. (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341: 1246-1249.
 179. Akhter A, et al. (2012) Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. *Immunity* 37: 35-47.

-
180. Hoffman HM, et al. (2010) Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders. *Curr Allergy Asthma Rep* 10: 229-235.
 181. Hoffman HM, et al. (2011) Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. *J Biol Chem* 286: 10889-10896.
 182. Willingham SB, et al. (2007) Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* 2: 147-159.
 183. Muckle TJ, et al. (1962) Urticaria, deafness, and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *Q J Med* 31: 235-248.
 184. Montealegre Sanchez GA, et al. (2009) Neurological manifestations of the Mendelian-inherited autoinflammatory syndromes. *Dev Med Child Neurol* 51: 420-428.
 185. Stych B, et al. (2008) Familial cold auto-inflammatory syndrome (FCAS): characterization of symptomatology and impact on patients' lives. *Curr Med Res Opin* 24: 1577-1582.
 186. Masters SL, et al. (2009) Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu Rev Immunol* 27: 621-668.
 187. Duncan JA, et al. (2007) Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8041-8046.
 188. Meng G, et al. (2009) A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity* 30: 860-874.
 189. Brydges SD, et al. (2009) Inflammasome-mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptive immunity. *Immunity* 30: 875-887.
 190. Martinon F (2010) Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation. *Immunol Rev* 233: 218-232.
 191. Martinon F (2010) Update on biology: uric acid and the activation of immune and inflammatory cells. *Curr Rheumatol Rep* 12: 135-141.
 192. So A, et al. (2007) A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther* 9: R28.
 193. Hardy J, et al. (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12: 383-388.
 194. Mudher A, et al. (2002) Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci* 25: 22-26.
 195. Duewell P, et al. (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464: 1357-1361.
 196. Franklin BS, et al. (2014) The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 15: 727-737.
 197. Baroja-Mazo A, et al. (2014) The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* 15: 738-748.
 198. Dostert C, et al. (2008) [Asbestos triggers inflammation by activating the Nalp3 inflammasome]. *Med Sci (Paris)* 24: 916-918.
 199. Sherman IW, et al. (1968) Characterization of the malaria pigment (hemozoin) from the avian malaria parasite *Plasmodium lophurae*. *J Protozool* 15: 158-164.
 200. Egan TJ (2008) Haemozoin formation. *Mol Biochem Parasitol* 157: 127-136.
 201. Dostert C, et al. (2009) Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One* 4: e6510.

-
202. Berkley J, et al. (1999) Bacteraemia complicating severe malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 283-286.
 203. Bronzan RN, et al. (2007) Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. *J Infect Dis* 195: 895-904.
 204. Bassat Q, et al. (2009) Severe malaria and concomitant bacteraemia in children admitted to a rural Mozambican hospital. *Trop Med Int Health* 14: 1011-1019.
 205. Berkley JA, et al. (2009) HIV infection, malnutrition, and invasive bacterial infection among children with severe malaria. *Clin Infect Dis* 49: 336-343.
 206. Were T, et al. (2011) Bacteremia in Kenyan children presenting with malaria. *J Clin Microbiol* 49: 671-676.
 207. Scott JA, et al. (2011) Relation between falciparum malaria and bacteraemia in Kenyan children: a population-based, case-control study and a longitudinal study. *Lancet* 378: 1316-1323.
 208. Lalloo DG, et al. (2007) UK malaria treatment guidelines. *J Infect* 54: 111-121.
 209. Cunnington AJ, et al. (2012) Malaria impairs resistance to Salmonella through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nat Med* 18: 120-127.
 210. Nadjm B, et al. (2010) WHO guidelines for antimicrobial treatment in children admitted to hospital in an area of intense Plasmodium falciparum transmission: prospective study. *BMJ* 340: c1350.
 211. Church J, et al. (2014) Invasive bacterial co-infection in African children with Plasmodium falciparum malaria: a systematic review. *BMC Med* 12: 31.
 212. Gomez-Perez GP, et al. (2014) Plasmodium falciparum malaria and invasive bacterial co-infection in young African children: the dysfunctional spleen hypothesis. *Malar J* 13: 335.
 213. Stevenson MM, et al. (1990) Role of interferon-gamma and tumor necrosis factor in host resistance to Plasmodium chabaudi AS. *Immunol Lett* 25: 115-121.
 214. Rittirsch D, et al. (2009) Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4: 31-36.
 215. Martins FS, et al. (2010) Interaction of Saccharomyces boulardii with Salmonella enterica serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS One* 5: e8925.
 216. Sandlund J, et al. (2013) Bacterial coinfections in travelers with malaria: rationale for antibiotic therapy. *J Clin Microbiol* 51: 15-21.
 217. Lamkanfi M (2011) Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol* 11: 213-220.
 218. Mansour M, et al. (1997) The priming effects of some human interleukins on the production of leukotrienes by calcium ionophore stimulated leukocytes. *Biochem Mol Biol Int* 42: 817-824.
 219. Medzhitov R, et al. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2: 253-258.
 220. Sam-Agudu NA, et al. (2010) TLR9 polymorphisms are associated with altered IFN-gamma levels in children with cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 82: 548-555.
 221. Tabeta K, et al. (2006) The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 7: 156-164.
 222. Brinkmann MM, et al. (2007) The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 177: 265-275.

-
223. Clark IA, et al. (2008) Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. *Travel Med Infect Dis* 6: 67-81.
 224. Dinarello CA, et al. (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 163: 1433-1450.
 225. Hiscott J, et al. (1993) Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 13: 6231-6240.
 226. Shio MT, et al. (2010) Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. *Microbes Infect* 12: 889-899.
 227. Gupta M, et al. (2001) Monocyte-derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with ebola virus secrete MIP-1alpha and TNF-alpha and inhibit poly-IC-induced IFN-alpha in vitro. *Virology* 284: 20-25.
 228. Stroher U, et al. (2001) Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J Virol* 75: 11025-11033.
 229. Serbina NV, et al. (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-452.
 230. Serbina NV, et al. (2009) Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J Immunol* 183: 2678-2687.
 231. Geissmann F, et al. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71-82.
 232. Auffray C, et al. (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666-670.
 233. Geissmann F, et al. (2008) Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86: 398-408.
 234. Auffray C, et al. (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669-692.
 235. Cros J, et al. (2010) Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375-386.
 236. Geissmann F, et al. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656-661.
 237. Belge KU, et al. (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536-3542.
 238. Stutz A, et al. (2013) ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol* 1040: 91-101.
 239. Fink SL, et al. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73: 1907-1916.
 240. Fink SL, et al. (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* 8: 1812-1825.
 241. Fernandes-Alnemri T, et al. (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 14: 1590-1604.
 242. Mariathasan S (2007) ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect* 9: 664-671.
 243. Faustin B, et al. (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* 25: 713-724.
 244. Burckstummer T, et al. (2009) An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 10: 266-272.

-
245. Boyden ED, et al. (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 38: 240-244.
 246. Mariathasan S, et al. (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 31-40.
 247. McCoy AJ, et al. (2010) Differential regulation of caspase-1 activation via NLRP3/NLRC4 inflammasomes mediated by aerolysin and type III secretion system during *Aeromonas veronii* infection. *J Immunol* 185: 7077-7084.
 248. Reimer T, et al. (2010) Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome. *Eur J Immunol* 40: 764-769.
 249. Kalantari P, et al. (2014) Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep* 6: 196-210.
 250. Clark IA, et al. (2009) Is human malarial coma caused, or merely deepened, by sequestration? *Trends Parasitol* 25: 314-318.
 251. Clark IA, et al. (2010) The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacol Ther* 128: 519-548.
 252. John CC, Panoskaltis Mortari, A., Opoka, R. O., Park, G. S., Orchard, P. J., Jurek, A. M., (2008) Cerebrospinal fluid cytokine levels and cognitive impairment in cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 78: 198-205.
 253. John CC, Bangirana, P., Byarugaba, J., Opoka, R. O., Idro, R., Jurek, A. M., (2009) Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatr Cardiol* 122: 92-99.
 254. Karunaweera ND, et al. (1992) Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. *Clin Exp Immunol* 88: 499-505.
 255. Latz E, et al. (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13: 397-411.
 256. Mishra BB, et al. (2013) Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta. *Nat Immunol* 14: 52-60.
 257. Guarda G, et al. (2009) T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature* 460: 269-273.
 258. Guarda G, et al. (2011) Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 34: 213-223.
 259. Martinon F, et al. (2004) Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol* 14: 1929-1934.
 260. Martinon F, et al. (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* 26: 447-454.
 261. Martinon F, et al. (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14: 10-22.
 262. Bernaudin JF, et al. (1988) Demonstration by in situ hybridization of dissimilar IL-1 beta gene expression in human alveolar macrophages and blood monocytes in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 140: 3822-3829.
 263. Hoffmann P, et al. (1988) Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiology* 177: 158-170.
 264. Netea MG, et al. (2009) Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 113: 2324-2335.

-
265. Santiago-Raber ML, et al. (2009) Fcγ receptor-dependent expansion of a hyperactive monocyte subset in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum* 60: 2408-2417.
 266. Nakatani K, et al. (2010) Fractalkine expression and CD16⁺ monocyte accumulation in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F207-216.
 267. Evans HG, et al. (2009) In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6232-6237.
 268. Meylan E, et al. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442: 39-44.
 269. Akira S, et al. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
 270. Martinon F, et al. (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27: 229-265.
 271. Church LD, et al. (2008) Primer: inflammasomes and interleukin 1β in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 34-42.
 272. Matzinger P (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305.
 273. McQueen PG, et al. (2004) Age-structured red blood cell susceptibility and the dynamics of malaria infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9161-9166.
 274. Sherman IW, et al. (2004) Erythrocyte aging and malaria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50: 159-169.
 275. Clark IA, et al. (2006) Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J* 5: 85.
 276. Akkaya C, et al. (2009) The Plasmodium falciparum-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. *Pflugers Arch* 457: 1035-1047.
 277. Cunnington AJ, et al. (2012) Prolonged neutrophil dysfunction after Plasmodium falciparum malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction. *J Immunol* 189: 5336-5346.
 278. Seixas E, et al. (2009) Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15837-15842.
 279. Larsen R, et al. (2010) A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med* 2: 51ra71.
 280. Dutra FF, et al. (2014) Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E4110-4118.
 281. Wang L, et al. (2002) PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-κB and caspase-1-dependent cytokine processing. *J Biol Chem* 277: 29874-29880.
 282. Williams KL, et al. (2003) Cutting edge: Monarch-1: a pyrin/nucleotide-binding domain/leucine-rich repeat protein that controls classical and nonclassical MHC class I genes. *J Immunol* 170: 5354-5358.
 283. Zaki MH, et al. (2011) The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell* 20: 649-660.
 284. Allen IC, et al. (2013) Characterization of NLRP12 during the in vivo host immune response to *Klebsiella pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 8: e60842.
 285. Rathinam VA, et al. (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol* 13: 333-342.
 286. Williams KL, et al. (2005) The CATERPILLER protein monarch-1 is an antagonist of toll-like receptor-, tumor necrosis factor α-, and *Mycobacterium tuberculosis*-induced pro-inflammatory signals. *J Biol Chem* 280: 39914-39924.

-
287. Vladimer GI, et al. (2012) The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity* 37: 96-107.
 288. Jeru I, et al. (2008) Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1614-1619.
 289. Jeru I, et al. (2011) Identification and functional consequences of a recurrent NLRP12 missense mutation in periodic fever syndromes. *Arthritis Rheum* 63: 1459-1464.
 290. Gattorno M, et al. (2009) An update on autoinflammatory diseases. New concepts for new and old diseases. *Clin Exp Rheumatol* 27: 354-365.
 291. Goldbach-Mansky R (2011) Current Status of Understanding the Pathogenesis and Management of Patients With NOMID/CINCA. *Curr Rheumatol Rep* 13: 123-131.
 292. Borghini S, et al. (2011) Clinical presentation and pathogenesis of cold-induced autoinflammatory disease in a family with recurrence of an NLRP12 mutation. *Arthritis Rheum* 63: 830-839.
 293. Jeru I, et al. (2011) Role of interleukin-1beta in NLRP12-associated autoinflammatory disorders and resistance to anti-interleukin-1 therapy. *Arthritis Rheum* 63: 2142-2148.
 294. Dinarello CA, et al. (1987) Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 139: 1902-1910.
 295. Dinarello CA (2010) IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol* 40: 599-606.
 296. McDermott MF, et al. (1999) Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 97: 133-144.
 297. Simon A, et al. (2004) Beneficial response to interleukin 1 receptor antagonist in traps. *Am J Med* 117: 208-210.
 298. Gattorno M, et al. (2008) Persistent efficacy of anakinra in patients with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Arthritis Rheum* 58: 1516-1520.
 299. Dinarello CA (2011) A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* 41: 1203-1217.
 300. Dinarello CA (1997) Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112: 321S-329S.
 301. Lundqvist J, et al. (2010) Concomitant infection decreases the malaria burden but escalates relapsing fever borreliosis. *Infect Immun* 78: 1924-1930.
 302. Mastroeni P, et al. (2000) Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J Exp Med* 192: 237-248.
 303. Vazquez-Torres A, et al. (2000) Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med* 192: 227-236.
 304. Meissner F, et al. (2010) Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1beta accelerates ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13046-13050.
 305. Kuijk LM, et al. (2008) HMG-CoA reductase inhibition induces IL-1beta release through Rac1/PI3K/PKB-dependent caspase-1 activation. *Blood* 112: 3563-3573.
 306. van Bruggen R, et al. (2010) Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood* 115: 5398-5400.

-
307. Meissner F, et al. (2010) Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood* 116: 1570-1573.
 308. Berkley JA, et al. (2005) Use of clinical syndromes to target antibiotic prescribing in seriously ill children in malaria endemic area: observational study. *Bmj* 330: 995.
 309. Ukaga CN, et al. (2006) Concomitant bacteria in the blood of malaria patients in Owerri, southeastern Nigeria. *Tanzan Health Res Bull* 8: 186-188.
 310. Mtove G, et al. (2010) Invasive salmonellosis among children admitted to a rural Tanzanian hospital and a comparison with previous studies. *PLoS One* 5: e9244.
 311. Jakobsen PH, et al. (1994) Increased concentrations of interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist and decreased concentrations of beta-2-glycoprotein I in Gambian children with cerebral malaria. *Infect Immun* 62: 4374-4379.
 312. Armah HB, et al. (2007) Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J* 6: 147.
-