

NATALIA MARTINEZ DE ARAÚJO

**ATIVACÃO DA CASPASE-11 DURANTE A INFECÇÃO POR *PLASMODIUM*
*CHABAUDI***

Belo Horizonte – MG

2015

NATALIA MARTINEZ DE ARAÚJO

**ATIVACÃO DA CASPASE-11 DURANTE A INFECÇÃO POR *PLASMODIUM*
*CHABAUDI***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli (Orientador)

Laboratório de Imunoparasitologia – Depto de Bioquímica e Imunologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2015

Dedico mais essa conquista em minha vida acadêmica aos meus pais, que sempre me incentivaram e tanto se esforçaram para garantir a melhor qualidade dos meus estudos. Também dedico a minha dissertação ao meu companheiro de vida Diego, pela compreensão da minha rotina e estresse, durante a laboração do meu projeto de mestrado.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador por tentar ser paciente com as minhas dificuldades, pela orientação e discussão sobre o ordenamento dos resultados, pelas oportunidades concedidas durante o mestrado e por disponibilizar recurso para execução do projeto. Além disso, agradeço o Ricardo pela sua exigência, que faz com que eu sempre busque fazer o melhor no meu trabalho e pelo crescimento profissional que adquiri durante o mestrado.

Agradeço a todos os colegas do laboratório pelas discussões sobre ciência, por me ensinarem técnicas novas, dividirem protocolos e pelas críticas construtivas sobre meu trabalho. Em especial, agradeço ao Marco Ataíde, que praticamente me co-orientou, me ensinou muitas técnicas e foi muito importante para o desenvolvimento do meu raciocínio científico. Além disso, agradeço por estar em um laboratório em que pude fazer amigos, com ambiente de trabalho saudável.

Agradeço a todas as pessoas que trabalham diariamente na fiocruz-CPqRR: técnicos do laboratório, bolsistas da plataforma e técnicos do biotério. A realização do meu projeto de mestrado só foi possível com o trabalho de todos.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada pelo parasito *Plasmodium* spp., que é transmitido para seres humanos durante o repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos *Anopheles* spp. infectados. As principais características da malária são a alta parasitemia e a produção de citocinas pirogênicas, como IL-1 β e TNF, que originam a febre e os calafrios. As citocinas pirogênicas e inflamatórias são produzidas por monócitos fagocíticos ativadas por toxinas maláricas, como glicosil fosfatidilinositol (GPI) e hemozoína. Essas toxinas são agonistas para receptores de membrana e citoplasmáticos, como os receptores do tipo NOD (NLRs). O inflamassoma, formado por NLRs é importante para a ativação de caspase-1, enzima que cliva pró-IL-1 β em sua forma ativa. Recentemente, foi descrita a via não canônica do inflamassoma, na qual a ativação de caspase-1 é dependente de caspase-11. Nós demonstramos que, durante a infecção por *P. chabaudi* a caspase-11 é induzida e ativada, porém não é importante para a ativação de caspase-1. Os animais infectados com *P. chabaudi* tornam-se hipersensibilizados ao desafio por lipopolissacarídeo (LPS), devido à produção de altos níveis de IL-1 β e morrem poucas horas depois. Entretanto, demonstramos que a caspase-11 é importante para os altos níveis de IL-1 β , sendo os animais caspase-11 nocautes resistentes ao desafio com LPS.

Palavras chave: caspase-11, malária, *Plasmodium chabaudi*, IL-1 β

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by the parasite *Plasmodium*, which is transmitted through a bite from infected *Anopheles* mosquitoes. The main features of malaria disease are high parasitemia and systemic production of cytokines like IL-1 β and TNF, which cause fever and chills. Pyrogenic and inflammatory cytokines production is initiated by phagocytic monocytes, which recognize malaria toxins like glycosylphosphatidylinositol (GPI) and hemozoin. These toxins are agonists of surface receptors and cytoplasmic receptors such as the NOD receptors (NLRs). The inflammasome that is composed by NLRs is important for caspase-1 activation, which in turn cleaves pro-IL-1 beta into its active form. Recently it was described non-canonical pathway caspase-1 activation by inflammasome, which is dependent of caspase-11. We demonstrated that during *P. chabaudi* infection, the caspase-11 is induced and activated, but caspase-11 wasn't important to caspase-1 activation. The infected animals are hypersensitive, after lipopolysaccharide (LPS) challenge. This occurs because the infected and challenged animals show high levels of IL-1 β and died a few hours later. However, we showed that caspase-11 can be important to IL-1 β levels in infected animals that were challenged with LPS. Moreover, the infected animals caspase-11 knockout showed great number of survivals than wild type mice, after LPS challenge.

Keywords: caspase-11, malaria, *Plasmodium chabaudi*, IL-1 β

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo de ativação do inflamassoma.....	13
Figura 2. A infecção por <i>P. chabaudi</i> induz a ativação de caspase-1 e a hiper-reatividade após desafio por LPS.. ..	24
Figura 3. A caspase-11 é induzida e ativada durante a infecção por <i>P. chabaudi</i>	25
Figura 4. A infecção por <i>P. chabaudi</i> não induz a via não canônica do inflamassoma.. ..	27
Figura 5. Animais caspase-11 ^{-/-} apresentam menores níveis de IL-1 β e são mais resistentes ao choque endotóxico.....	29
Figura 6. A sinalização via TLR4 não é importante para indução e a ativação de caspase-11.. ..	31
Figura 7. A sinalização via TLR4 induz IL-1 β	32
Figura 8. A caspase-11 não modula os níveis de pró-IL-1 β . - . ..	33

Lista de Abreviatura

ATP Adenosina trifosfato

Células NK Células natural killer

DAMP Padrões moleculares associados ao dano

GPI proteína glicosil fosfatidilinositol

IFN-I Interferon tipo I

IFN- γ Interferon gama

IL-1 Interleucina 1

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

IL-18 Interleucina 18

IL-4 Interleucina 4

IL-6 Interleucina 6

LPS lipopolissacarídeo

MAVs Sinalizador de proteína viral

NACHT Núcleo central de ligação e oligomerização

NLRs Receptores tipo nod

PAMPs Padrões moleculares associados a patógenos

PRRs Receptor de reconhecimento padrão

RNA Ácido ribonucléico

Th1 Células T CD4⁺ helper tipo 1

Th2 Células T CD4⁺ helper tipo 2

TLRs Receptores tipo toll

TNF Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Plasmodium spp</i> : Aspectos Gerais e Distribuição Geográfica.....	1
1.2. Ciclo do Parasito	2
1.3. Malária: Patogênese e Manifestações Clínicas	4
1.4. O Modelo Experimental de Malária Murina	5
1.5. Resposta Imune na Malária	6
1.6. Ativação de Receptores TLRs e NLRs na Malária	8
1.7. Caspase-11 e o Inflamassoma (Via Não Canônica)	11
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo Geral	15
3.2. Objetivos Específicos	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. Comitê de Ética	16
4.2. Animais	16
4.3. Parasito e Infecção.....	16
4.4. Desafio com LPS/ Curva de Sobrevida.....	17
4.5. Coleta de Plasma e Dosagem de IL-1 β	17
4.6. Eutanásia e Extração de Esplenócito.....	18
4.7. Cultura de Esplenócito e Coleta de Sobrenadante.....	18
4.8. Cultura de macrófago peritoneal	19
4.9. Lisado de Esplenócito e Método de Bradford	19
4.10. SDS-PAGE e Western Blotting.....	20
4.11. Citometria de Fluxo.....	21
4.12. Análise Estatística	22

5. RESULTADOS	23
5.1. A infecção por <i>P. chabaudi</i> induz a ativação de caspase-1 e proporciona uma hipersensibilidade ao LPS.	23
5.2. A infecção por <i>P. chabaudi</i> induz a ativação de caspase-11.....	25
5.3. A caspase-11 não é importante para a ativação de caspase-1, durante a malária experimental murina.....	26
5.4. A caspase-11 é importante para as concentrações plasmáticas de IL-1 β e para a letalidade no choque endotóxico	28
5.5. A sinalização via TLR4 induz IL-1 β , mas não é importante para ativação de caspase-11	30
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Plasmodium spp*: Aspectos Gerais e Distribuição Geográfica

O *Plasmodium spp.*, agente etiológico da malária, pertence ao filo Apicomplexa. Esses organismos originaram-se filogeneticamente de duas simbioses que culminaram com a aquisição de mitocôndria e de apicoplasto (Kohler, S. *et al.*, 1997). A presença dessas organelas, juntamente com diversos mecanismos reprodutivos, contribuiu para a diversidade morfológica, bioquímica e molecular desses organismos (Banuls, A.L. *et al.*, 2013; Garcia, L.S. 2010). Isso explica a grande dificuldade no desenvolvimento de fármacos e vacinas que eficazes contra o parasito (Banuls, A.L. *et al.*, 2013). Atualmente são conhecidas cinco espécies que provocam morbidade em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, sendo a última recentemente descoberta em reservatórios primatas não humanos (Sabbatani, S. *et al.*, 2010). O *P. falciparum* é o principal agente causador de malária no mundo, apresentando relatos de morbidade na África (60-70% dos casos), no sudeste asiático (25-39% dos casos) e na América (1% dos casos) (Hay, S.I. *et al.*, 2010; Snow, R.W. *et al.*, 2005). Já o *P. vivax*, segunda espécie mais relatada em casos clínicos, apresenta incidência na Ásia Central (82% dos casos), no sudeste da Ásia (9% dos casos), na América (6% dos casos) e África (3% casos) (Gething, P.W. *et al.*, 2012). Os casos de malária devido à infecção por *P. ovale* e *P. malariae* são considerados eventos raros (1 a 2% de todos os casos de malária) e encontram-se distribuídos em diversas áreas endêmicas. (Mueller, I. *et al.*, 2007).

Atualmente estima-se a ocorrência de 219 milhões de novos casos de malária com 660 mil óbitos todos os anos. Aproximadamente, 80-90% dessa mortalidade ocorre em regiões tropicais e subtropicais da África, sendo as crianças com menos de cinco anos e mulheres grávidas os grupos mais afetados. (World Health Organization 2012). Aproximadamente 60%

dos casos de malária na América do Sul derivam de áreas endêmicas no Brasil (Arevalo-Herrera, M. *et al.*, 2012), dentre esses, 99,5% dos casos brasileiros ocorrem na Amazônia (de Pina-Costa, A. *et al.*, 2014). O sudeste brasileiro é a segunda região de maior incidência de malária, devido às áreas endêmicas na região de mata atlântica, onde há o mosquito vetor. Porém, a maior parte dos casos fora da região amazônica é proveniente de importações de malária da Amazônia e de outros países (Arevalo-Herrera, M. *et al.*, 2012). Os casos de malária no sudeste são considerados raros. Isso implica numa letalidade proporcional muito maior nessa região, devido à dificuldade de diagnóstico e consequente falta de tratamento adequado (de Pina-Costa, A. *et al.*, 2014).

1.2. Ciclo do Parasito

O *Plasmodium* spp. é um organismo unicelular, eucarioto, transmitido durante a picada de insetos fêmeas da família culicidae. A infecção ocorre durante o repasto sanguíneo de mosquitos do gênero *Anopheles*, pelo parasito na forma denominada esporozoíto (Beier, J.C. *et al.*, 1992). Os esporozoítos localizados no ducto salivar do vetor penetram na derme ativamente, por movimentos ativos dependentes de actina e/ou pela injeção de saliva do vetor (Frischknecht, F. *et al.*, 2004; Matuschewski, K. 2006). Após o inóculo, os esporozoítos migram para vasos sanguíneos e linfáticos, próximos ao local da picada e atingem linfonodos e o fígado (Amino, R. *et al.*, 2006). Pelo fluxo sanguíneo da artéria hepática ou da veia porta, o esporozoíto chega ao fígado, onde aderem às células endoteliais dos sinuzóides (interação via heparan sulfato proteoglicanos), até serem encontrados por células de Kupffer. Assim, após serem fagocitados, os esporozoítos atravessam as células de Kupffer e ganham o espaço de Disse, onde facilmente podem penetrar em hepatócitos (Frevort, U. *et al.*, 2005).

Os esporozoítos permanecem nos hepatócitos, dentro de vacúolos parasitóforos, em uma forma mais arredondada denominada trofozoíto. Em seguida, inicia-se um processo de

multiplicação de material genético, sem divisão celular, denominado cariocinese. Como consequência da cariocinese, há a formação de uma célula com vários núcleos circulares, denominada esquizonte. Então, cada núcleo adquire uma membrana celular e ocorre a diferenciação do parasito para a forma de merozoíto. Nesse estágio, não há mais a presença de vacúolo parasitóforo, sendo os merozoítos encontrados imersos no citoplasma dos hepatócitos (Menard, R. *et al.*, 2013; Sturm, A. *et al.*, 2009). Finalmente, ocorre o processo de liberação dos merozoítos do hepatócito, via formação de merossomos (vesículas formadas pela membrana celular do hepatócito, sem a presença do núcleo) (Sturm, A. *et al.*, 2009).

Após o rompimento do esquizonte, os merozoítos são liberados na circulação sanguínea e rapidamente infectam eritrócitos. Esse processo consiste inicialmente na adesão dos merozoítos à membrana dos eritrócitos, seguido de penetração pela membrana celular e equinocitose momentânea do eritrócito. Essa equinocitose momentânea ocorre devido à formação de poro na membrana eritrocítica, após a penetração do merozoíto (Gilson, P.R. *et al.*, 2009). No eritrócito o parasito se multiplica novamente por esquizogonia, que culmina com o rompimento das células vermelhas e liberação de merozoítos ou gametócitos. Os merozoítos liberados na corrente sanguínea infectam outras hemácias e continuam o ciclo eritrocítico da malária. Já os gametócitos, formas sexuadas e diferenciadas em gametócitos feminino e masculino, podem dar continuidade ao ciclo da malária ao infectarem anofelinos durante o repasto sanguíneo (Arnot, D.E. *et al.*, 1998).

Após o repasto sanguíneo, os gametócitos encontram-se no intestino do vetor e promovem a fertilização. Após a fertilização, cada zigoto se transforma em um oocineto móvel que atravessa a parede do intestino médio e invade o epitélio intestinal do vetor. Nessa fase, cada oocineto se diferencia em um oocisto e se divide assexuadamente para produzir milhares de esporozoítos que são liberados na hemocele e posteriormente migram para as glândulas salivares (Pollitt, L.C. *et al.*, 2010).

1.3. Malária: Patogênese e Manifestações Clínicas

O período de incubação do parasito depende da espécie de *Plasmodium* spp., mas varia em média de 12 a 14 dias e está relacionado com a fase de reprodução assexuada no fígado. Após um período de 6 a 8 dias da fase hepática, o parasito pode ser detectado por microscopia óptica, como consequência da esquizogonia em hemácias. Após esse intervalo, inicia-se a fase sintomática da infecção. Os sintomas da malária estão relacionados diretamente com os efeitos do parasitismo eritrocítico e a resposta do hospedeiro a esses efeitos (White, N.J. *et al.*, 2014). Essa resposta do hospedeiro ao parasitismo eritrocítico é caracterizada pelo sequestro de hemácias e pela inflamação sistêmica (Miller, L.H. *et al.*, 2013). Dessa forma, dentre as principais manifestações clínicas temos: mal-estar generalizado, cefaleia, cansaço e mialgia. Esses sintomas inespecíficos precedem a febre da malária, caracterizada por iniciar-se com calafrios e atingir a temperatura corpórea de 40°C. Posteriormente, a febre assume caráter intermitente que varia com o ciclo eritrocítico de cada espécie de *Plasmodium* spp. (Ministério da Saúde 2006). Em exames hematológicos e bioquímicos observa-se durante a malária, leucopenia, linfopenia, plaquetopenia e aumento de transaminases, devido às lesões hepáticas (Kochar, D.K. *et al.*, 2010; Ministério da Saúde 2006). Além disso, pacientes com malária podem apresentar esplenomegalia, hepatomegalia, icterícia e anemia crônica em áreas endêmicas (White, N.J. *et al.*, 2014).

A infecção por *Plasmodium* spp. pode evoluir para os casos graves de malária. A malária grave por definição está associada à alta letalidade e era atribuída às infecções por *P. falciparum*. Porém, recentemente muitos trabalhos vêm descrevendo casos de malária grave durante a infecção por *P. vivax* (Rahimi, B.A. *et al.*, 2014). Dentre as manifestações de malária grave temos: hiperparasitemia, hipoglicemia, anemia grave, lesão renal, estresse respiratório, edema pulmonar, choque endotóxico e coma (malária cerebral).

As co-infecções bacterianas estão relacionadas com o aumento da letalidade causada por malária grave (Berkley, J. *et al.*, 1999). Um terço desses casos de letalidade apresenta alta bacteremia (Bronzan, R.N. *et al.*, 2007). Sabe-se ainda, que a malária aumenta a predisposição às infecções bacterianas, mas não é bem descrito a ordem dos eventos que acarreta em piores prognósticos. Bactérias gram-negativas, como diferentes espécies de *Salmonella* spp., estão entre as bactérias mais encontradas nesses casos (Bassat, Q. *et al.*, 2009). Dessa forma, em algumas regiões endêmicas têm-se utilizado a combinação de antimaláricos e antibióticos como medida profilática (Nadjm, B. *et al.*, 2010). Porém, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos moleculares e biológicos dessa interação (Church, J. *et al.*, 2014).

A malária grave tem uma correlação negativa com a idade do paciente, ou seja, acomete com mais frequência crianças (Grobusch, M.P. *et al.*, 2005; Snow, R.W. *et al.*, 1997). Mulheres grávidas e adultos imunodeficientes também pertencem ao grupo de risco para o desenvolvimento de malária grave (Poespoprodjo, J.R. *et al.*, 2014; Tan, S.O. *et al.*, 2008). Além disso, o desenvolvimento de sintomas, desde malária grave à malária assintomática, pode estar relacionado com a quantidade de infecções contraídas (Trape, J.F. *et al.*, 1987), à variabilidade genética dos pacientes e com a cepa de *Plasmodium* spp. (Gupta, S. *et al.*, 1999).

1.4. O Modelo Experimental de Malária Murina

O estudo da malária humana envolve diversos métodos, tais como a análise epidemiológica, genética populacional, estudos clínicos de pacientes, além de análises *post-mortem*. No entanto, há limitações quanto à realização de pesquisa com amostras humanas, como: o difícil acesso a cadáveres devido à cultura e religião e falta de amostras controles adequadas. Além disso, os dados obtidos a partir de estudos *post-mortem* representam apenas

a etapa final da etiopatogênese da doença. Assim, não é possível realizar a análise da sequência de eventos que levam a patologia. Por exemplo, não é possível realizar o estudo do fígado durante a primeira fase da infecção ou do cérebro durante a malária cerebral (Zuzarte-Luis, V. *et al.*, 2014).

O uso do modelo experimental da malária tem sido conscientemente aplicado e sua comparação com a infecção por *Plasmodium spp.* em humanos tem apresentado importantes descobertas, principalmente vinculadas à compreensão da patogênese da malária, da biologia do parasito e da resposta imune do hospedeiro (Langhorne, J. *et al.*, 2011; Zuzarte-Luis, V. *et al.*, 2014). Dentre os parasitos *Plasmodium spp.* que infectam camundongos temos: *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* e *P. vinckei*. Cada cepa de *Plasmodium spp.* causa diferentes manifestações clínicas em diferentes linhagens de camundongos. Isso varia principalmente em relação ao perfil imunológico dos animais. Além disso, os animais geneticamente modificados permitem o estudo do sistema imune do hospedeiro, o que torna o modelo murino de malária uma importante ferramenta (Zuzarte-Luis, V. *et al.*, 2014).

1.5. Resposta Imune na Malária

A imunidade na malária caracteriza-se pela sua complexidade, devido ao parasito apresentar diversidade antigênica em suas diferentes formas, durante seu ciclo no hospedeiro. Além disso, a imunidade ao *Plasmodium spp.* é variável, devido a diversidade de formas entre as espécies, por exemplo, a forma de hipnozoíto, presente somente em *P. vivax* (Zevering, Y. *et al.*, 1994).

Durante o início da infecção, parte dos esporozoítos permanecem na derme e em linfonodos drenantes locais (Amino, R. *et al.*, 2006). Dessa forma, o parasito induz a migração células dendríticas para a região de inóculo dos esporozoítos. Muitos dessas células dendríticas migram para os linfonodos locais, onde há o desenvolvimento de resposta Th1

(Mac-Daniel, L. *et al.*, 2014). Além do desenvolvimento dessa resposta celular, o esporozoíto possui uma proteína de superfície, denominada proteína cicunsporozoíto, que induz a produção de anticorpos independente de célula TCD4⁺ (Good, M.F. *et al.*, 1988). Essa produção de anticorpos está relacionada com aquisição de imunidade à malária. Muitos trabalhos realizados em áreas endêmicas mostram que o aumento dessa imunidade humoral é diretamente proporcional à idade do paciente e a quantidade de infecções sofridas (Chelimo, K. *et al.*, 2005; Esposito, F. *et al.*, 1986; Zavala, F. *et al.*, 1985). Estudos utilizando esporozoítos atenuados para desenvolvimento de vacinas mostram que a resposta de células TCD8⁺, somada a essa produção de anticorpos é importante para a imunidade contra os esporozoítos (Weiss, W.R. *et al.*, 1988).

Na fase de reprodução nos vacúolos parasitóforos, nos hepatócitos, há o reconhecimento do RNA do parasito via ativação da proteína associada á melanoma 5 (MDA5), que por sua vez é reconhecida pela proteína adaptadora da mitocôndria (MAVs). (Liehl, P. *et al.*, 2014). Esse reconhecimento via MAVs e outros PRRs, culmina com a produção de IFN-I, que promove o recrutamento de leucócitos, como células NK. Assim, há a produção de IFN- γ que resulta na limitação da proliferação desse estágio do parasito. (Miller, J.L. *et al.*, 2014).

Durante o ciclo eritrocítico da malária são induzidas altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, principalmente, IL-12, TNF- α e IFN- γ (Bakir, H.Y. *et al.*, 2011). Inicialmente monócitos/macrófagos e células dendríticas produzem IL-12, que induz a produção de TNF- α e IFN- γ por células NK e células T. A produção dessas citocinas é tão importante que a administração de IL-12 recombinante aumenta a proteção de animais infectados com *P. chabaudi* (Mohan, K. *et al.*, 1997; Stevenson, M.M. *et al.*, 1995). Essa proteção ocorre devido ao controle da parasitemia por produção de reativos de nitrogênio e aumento de células TCD4⁺ (Jones, I.W. *et al.*, 1996; Stevenson, M.M. *et al.*, 1995). Além

disso, a produção de TNF- α e IFN- γ por células TCD4⁺, caracteriza a polarização de resposta Th1. (Taylor-Robinson, A.W. *et al.*, 1993), mostraram que animais susceptíveis à infecção por *P. chabaudi*, desenvolvem a polarização da resposta imune para um padrão Th2 e, apresentam baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-4 e IL-10 no soro. Durante a fase eritrocítica também ocorre a ativação de células TCD8⁺ pela apresentação de antígeno, via células dendríticas CD8⁺ (Lundie, R.J. *et al.*, 2008). Sabe-se que as células TCD8⁺ estão relacionadas com o desenvolvimento de malária cerebral. Porém, ainda pouco é conhecido sobre esse mecanismo (Poh, C.M. *et al.*, 2014).

A produção de anticorpos, também é uma importante forma de controle dos estágios eritrocíticos do parasito. Nessa fase há a produção de anticorpos específicos para proteínas de superfície do merozoíto, que levam ao aumento da proteção por opsonização do merozoíto, impedindo a penetração em eritrócitos, lise pelo complemento e fagocitose dependente de anticorpos (McCallum, F.J. *et al.*, 2008; Shi, Y.P. *et al.*, 1999). Entretanto, a diversidade de antígenos provenientes do merozoíto e o polimorfismo genético desses antígenos associados com os mecanismos de escape do *Plasmodium spp.*, dificultam o desenvolvimento de vacinas eficazes a esse estágio (Fowkes, F.J. *et al.*, 2010; Richards, J.S. *et al.*, 2009).

1.6. Ativação de Receptores TLRs e NLRs na Malária

Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) são estruturas sentinelas, presentes no citoplasma, na membrana endossomoal ou na superfície de células epiteliais, neutrófilos, monócitos/macrófagos e células dendríticas. Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são estruturas conservadas em micróbios e ausentes em organismos que possuem PRRs. Além disso, os PRRs são capazes de reconhecer moléculas endógenas, provenientes de lesão celular denominadas de padrões moleculares associados ao dano (DAMP) (Takeuchi, O. *et al.*, 2010). Dentre as famílias de PRRs mais

descritas como ativadas na malária temos os receptores tipo toll (TLRs) e os receptores tipo NOD (NLRs) (Gazzinelli, R.T. *et al.*, 2014).

O glicosil fosfatidilinositol (GPI), proveniente do parasito é um importante indutor da resposta imune ao *Plasmodium spp.*, capaz de ativar heterodímeros de TLR2-TLR6 e TLR1-TLR2 e homodímero de TLR4 (Krishnegowda, G. *et al.*, 2005). Essa ativação de receptores TLR é controlada pela degradação da própria GPI, como forma de controle dessa ativação celular (Krishnegowda, G. *et al.*, 2005). Após a ativação desses TLRs na superfície celular, principalmente macrófagos e células dendríticas sintetizam óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 (Franklin, B.S. *et al.*, 2011; Schofield, L. *et al.*, 1993).

Outro importante indutor de TLR decorrente da infecção por *Plasmodium spp.* é a hemozoína. A hemozoína é um metabólito da hemoglobina presente nos eritrócitos que é consumida pelo parasito como fonte de aminoácidos (Goldie, P. *et al.*, 1990). Dessa forma, a hemozoína é um indutor de citocinas pró-inflamatórias, via sinalização TLR9, em monócitos/macrófagos e células dendríticas (Gazzinelli, R.T. *et al.*, 2014). O cristal de hemozoína é naturalmente carreador de proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, que podem ser provenientes do parasito ou hospedeiro (Goldie, P. *et al.*, 1990; Parroche, P. *et al.*, 2007; Skorokhod, O.A. *et al.*, 2007). Dessa forma, parte dos autores defende que o cristal de hemozoína purificado não é agonista de TLR9, sendo o DNA a molécula mais indicada para essa função (Kalantari, P. *et al.*, 2014; Parroche, P. *et al.*, 2007; Wu, X. *et al.*, 2010). Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado que a hemozoína purificada (sintética) é capaz de induzir a modificação conformacional e a ativação de TLR9 (Coban, C. *et al.*, 2005; Coban, C. *et al.*, 2010). Além disso, a hemozoína induz a produção de IL-1 β dependente da ativação de inflamassoma em cultura de macrófagos humano e murino, previamente estimulados com LPS (Shio, M.T. *et al.*, 2009).

O inflamassoma é um complexo multiprotéico formado pela subfamília de NLRs denominada NLRPs (Martinon, F. *et al.*, 2002). Os NLRPs são constituídos por um núcleo central de ligação e oligomerização (NACHT), um domínio rico em repetições de leucina na região C-terminal e um domínio PYD ou CARD (domínio de recrutamento de caspase) na região N-terminal da proteína (Koonin, E.V. *et al.*, 2000; Schroder, K. *et al.*, 2010). Assim, o inflamassoma é constituído por várias moléculas de NLR interligadas pela região NACHT por um processo de oligomerização dependente de ATP (Jaroszewski, L. *et al.*, 2000). Além disso, as regiões ricas em leucinas são responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs e DAMPs, que desencadeiam a oligomerização. Já a região de domínio PYD ou CARD é responsável pelo recrutamento e interação com outras proteínas (Martinon, F. *et al.*, 2001).

A principal função da oligomerização e ativação do inflamassoma é o recrutamento de caspase-1, que tem como consequência a clivagem dessa enzima (Martinon, F. *et al.*, 2002). A caspase-1 é uma cisteína protease que contém duas subunidades (p20 e p10) e um domínio CARD (Thornberry, N.A. *et al.*, 1995). Assim, ao ser recrutada pelo inflamassoma, via interação CARD/CARD, a caspase-1 sofre autoclivagem que resulta em sua ativação (Martinon, F. *et al.*, 2002; Wilson, K.P. *et al.*, 1994). Essa protease é ativa em forma de tetrâmero e catalisa a clivagem da citocina pró-IL-1 β em sua forma biologicamente ativa, IL-1 β (Thornberry, N.A. *et al.*, 1995). Além disso, a caspase-1 é importante para a piroptose, evento em que ocorre a morte celular, clivagem e liberação de IL-1 β e IL-18 (Cookson, B.T. *et al.*, 2001).

A ativação do inflamassoma é dependente de dois estímulos (Figura 1). O estímulo primário, que geralmente é proveniente de ativação de PRRs, como TLRs, é necessário para o aumento da expressão das moléculas constituintes do inflamassoma e da pró-caspase-1 e pró-IL-1 β (Bauernfeind, F.G. *et al.*, 2009; Kayagaki, N. *et al.*, 2013). Posteriormente, ocorre o estímulo secundário captado pelos domínios de repetição de leucina das moléculas de NLRPs.

Dentre as moléculas de estímulos secundários mais estudadas temos: ATP (via efluxo de K^+), nigericina, cristais de urato e intermediários de oxigênio (por dano mitocondrial) (Ferrari, D. *et al.*, 2006; So, A. *et al.*, 2007; Zhou, R. *et al.*, 2011). Além disso, o inflamassoma é ativado durante infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias (Coutinho-Silva, R. *et al.*, 2012; Eldridge, M.J. *et al.*, 2014; Lamkanfi, M. *et al.*, 2011; Tavares, A.H. *et al.*, 2013).

Na malária, inicialmente foi demonstrado *in vitro* que a hemozoína induz a ativação de inflamassoma. Também foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de hemozoína, em camundongos, induz a migração de neutrófilos (Shio, M.T. *et al.*, 2009). Posteriormente, nosso grupo foi o primeiro a demonstrar a ativação de caspase-1 dependente de inflamassoma, durante a malária murina e humana (Ataide, M.A. *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que a malária pré-dispõe o hospedeiro a uma hipersensibilidade a infecções secundárias por bactérias gram-negativas ou LPS (constituente de parede celular de bactérias gram-negativa). Foi demonstrado ainda que, essa hipersensibilidade é decorrente de choque endotóxico, devido ao aumento de pró-IL1 β induzida pelo LPS (Ataide, M.A. *et al.*, 2014). O choque endotóxico em camundongos é caracterizado por apatia, pelagem arrepiada, conjuntivite, diarreia e severa hipotensão (Yamashita, T. *et al.*, 2000)

1.7. Caspase-11 e o Inflamassoma (Via Não Canônica)

(Kayagaki, N. *et al.*, 2011), descreveram a ativação de caspase-1 dependente de caspase-11 e denominaram esse processo de via não canônica do inflamassoma (Figura 1). Assim como na via canônica, durante a via não canônica a ativação de caspase-1 é dependente da oligomerização do inflamassoma. Entretanto, o inflamassoma não é importante para a ativação de caspase-11 e pouco é conhecido sobre o mecanismo de atuação da caspase-11. Isso foi demonstrado em um modelo *in vitro* de infecção de macrófagos por *E. coli*, após estímulo com toxina colérica B. Posteriormente, foi descrito que a toxina colérica B atuava

apenas como um carreador de LPS para o citoplasma, sendo sua função substituída por eletroporação do LPS. Isso indica que a caspase-11 atua como proteína sentinela no citoplasma, desencadeando a ativação de caspase-1 e da piroptose (Kayagaki, N. *et al.*, 2013). Recentemente foi descrito que o LPS, quando presente no citoplasma, liga-se diretamente à caspase-11, promovendo sua oligomerização e ativação (Kayagaki, N. *et al.*, 2013; Shi, J. *et al.*, 2014). Além disso, foi descrito que a caspase-11 tem grande importância na resposta imune inata frente a infecções por bactérias gram-negativas citosólicas (Aachoui, Y. *et al.*, 2013). A caspase-11 além de ser importante para a clivagem de IL-1 β , pode promover a clivagem de IL-1 α e a piroptose independente do inflamassoma e de caspase-1 (Casson, C.N. *et al.*, 2013), além de modular a polimerização de fibras de actina (Li, J. *et al.*, 2007).

A pró-caspase-11 pode ser induzida pela sinalização de TLRs, como TLR3 e TLR4 (Kayagaki, N. *et al.*, 2013) e pode ser dependente da sinalização por Trif, via IFN-tipo I (Rathinam, V.A. *et al.*, 2012). Entretanto, ainda há divergências sobre a indução dessa caspase, pois em outro modelo foi observado que IFN- γ e IFN tipo I têm pouca importância no aumento de pró-caspase-11 (Broz, P. *et al.*, 2012).

Durante o desenvolvimento do trabalho do nosso grupo (Ataide, M.A. *et al.*, 2014), foram utilizados animais caspase-1 nocaute, provenientes da Universidade de Yale. Entretanto, foi demonstrado que esses animais eram caspase-1/11 nocaute, por terem sido modificados utilizando-se células de camundongos 129, naturalmente deficientes em caspase-11 (Kayagaki, N. *et al.*, 2011; Kuida, K. *et al.*, 1995). Dessa forma, surgiram muitos questionamentos sobre a importância da via não canônica e da caspase-11 durante a infecção pelo *Plasmodium spp.*

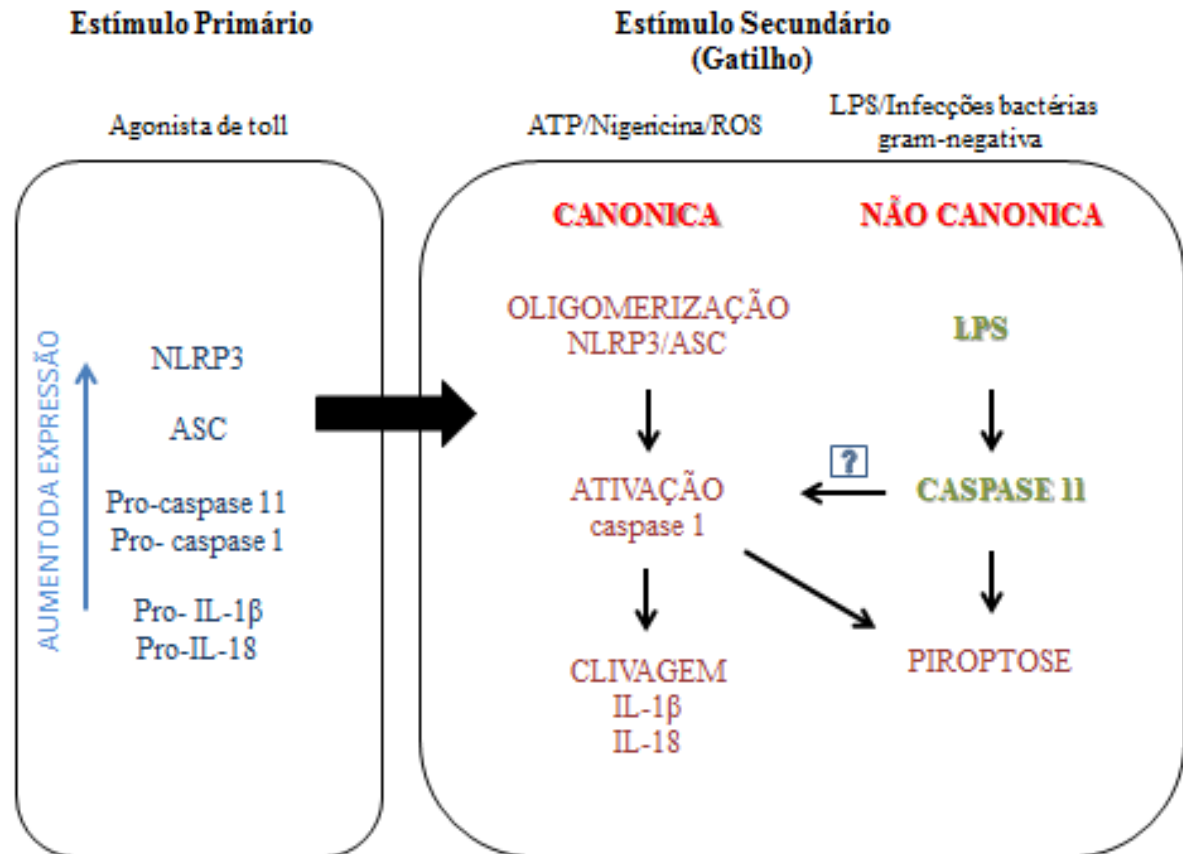


Figura 1. Modelo de ativação do inflamassoma. O estímulo primário promove o aumento da expressão dos componentes do inflamassoma e das formas pró das moléculas de caspase-1 e 11 e das citocinas IL-1 β e IL-18. O estímulo secundário promove a ativação de caspase-1, dependente de caspase-11 na via não canônica. Como consequência, há a clivagem das citocinas e a piroptose.

2. JUSTIFICATIVA

O *Plasmodium spp.* é um parasita capaz de induzir no hospedeiro uma resposta imunológica sistêmica potente. Embora essa resposta possa levar ao controle da infecção, também gera um quadro de inflamação que pode ser debilitante ao indivíduo, sendo esta a grande causa da sintomatologia. Sabendo que a IL-1 β tem importante papel nessa resposta imune, é pertinente investigar as vias de ativação celular responsáveis pela produção dessa citocina. A ativação do inflamassoma é o mecanismo principal de geração de IL-1 β , e sua importância já vem sendo descrita na infecção por *Plasmodium spp.* No entanto, não há relatos da participação da via não canônica do inflamassoma e da ativação de caspase-11 para o desenvolvimento dessa inflamação. Assim, é de extrema relevância avaliar um possível fator de resistência dos animais deficientes para caspase-11, frente à infecção por *Plasmodium chabaudi*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o papel da caspase-11 durante a infecção por *P. chabaudi*.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar se a pró-caspase-11 é induzida e se a caspase-11 é ativada na infecção por *P. chabaudi*.
- Averiguar a importância da via não canônica durante a infecção por *P. chabaudi*.
- Avaliar a importância da caspase-11 para o desenvolvimento da hipersensibilidade ao desafio por LPS, em animais infectados com *P. chabaudi*.
- Verificar a contribuição da sinalização via TLR4 na ativação de caspase-11 e no desenvolvimento da hipersensibilidade ao desafio por LPS, durante a infecção por *P. chabaudi*.
- Verificar o papel da caspase-11 na indução de pró-IL-1 β .

4. METODOLOGIA

4.1. Comitê de Ética

Esse projeto foi submetido para avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz e aprovado sob a licença de número LW-15/14. Assim, atende as normas dispostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e pela Lei 11794/08.

4.2. Animais

Os animais C57BL/6 e 129S6, fêmeas de 6 a 8 semanas, foram adquiridos do biotério de produção do Centro de Pesquisas René Rachou. Os animais caspase-11^{-/-} e caspase-1/11^{-/-} foram adquiridos do laboratório do Professor Dr. Dario Simões Zamboni, após a aprovação de acordos com a Universidade de Yale (origem dos animais caspase-1/11^{-/-}) e a empresa Genentech (origem dos animais caspase-11^{-/-}).

4.3. Parasito e Infecção

Os animais foram infectados com a cepa *P. chabaudi chabaudi* AS (*P. chabaudi*). O inóculo da infecção foi realizado via injeção de 100µl intraperitoneal de 10⁵ hemácias infectadas diluídas em PBS. Os parasitos foram mantidos previamente em animais infectados, destinados exclusivamente para passagens de cepa semanais. O sangue para confecção de solução de inóculo era coletado, via plexo oftálmico, no sexto ou sétimo dia de infecção dos animais de passagem. Os parasitos são mantidos em animais somente até a décima passagem. Posteriormente, realizamos alíquotas de sangue diluído em glicerol para o congelamento da cepa em nitrogênio líquido. Dessa maneira, garantimos a estabilidade da virulência e patogenicidade da cepa utilizada em experimentos.

4.4. Desafio com LPS/ Curva de Sobrevida

No oitavo dia de infecção tanto o grupo de animais destinado à letalidade como os animais destinados a coleta de plasma para dosagem de citocinas, receberam 10µg de LPS sorotipo O111:B4 (SIGMA) diluído em 100µl de PBS, via injeção intraperitoneal. Os animais destinados à coleta de plasma foram eutanasiados para a coleta do volume sanguíneo nos pontos de 8, 12, 24 ou 36 horas após o desafio.

Para a construção da curva de sobrevida, os animais foram observados nas 72 horas posteriores ao desafio e os eventos de mortalidade foram contabilizados durante esse período. Dessa forma, avaliamos a susceptibilidade de cada linhagem.

4.5. Coleta de Plasma e Dosagem de IL-1β

Para a coleta de plasma, coletamos o sangue dos animais via plexo retro orbital com pipeta Pasteur de vidro contendo 5µl de heparina e posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia com dose 2 vezes maior (60mg/kg) que a anestésica de pentobarbital sódico. Na sequência, o sangue foi centrifugado a 300 g por 15 minutos. Assim, foi possível a separação do plasma do restante do sangue. Então, o plasma dos animais foi congelado a -20 graus Celsius para posterior realização ensaio imuno enzimático (ELISA).

O ELISA (B&D) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Assim, as placas foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão de sensibilização (0,1 M de carbonato de sódio, pH 9,5) a 4 graus Celsius por toda a noite. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (10% de soro fetal bovino em PBS 1X), e as amostras, incluindo o padrão, foram diluídas com essa mesma solução e incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Após lavagem com tampão de lavagem (0,05% tween em PBS1X), as placas foram incubadas com anticorpo de detecção por 2 horas e estreptavidina por 30 minutos. Sempre foram realizadas lavagens dos poços entre os períodos de incubação.

A revelação foi feita com 10 ml de tampão citrato-fosfato (0.05M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.05M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) contendo 100 μL de TMB à 10mg/ml e 30 μL de H_2O_2 40volumes. A reação foi parada com 2 N H_2SO_4 e a leitura foi feita a 450nm em espectrofotômetro.

4.6. Eutanásia e Extração de Esplenócito

No oitavo dia de infecção os animais receberam uma dose de 60 mg/kg, dose 2 vezes maior que a anestésica de pentobarbital sódico para serem eutanasiados. Posteriormente, os animais tiveram o pelo embebido em álcool 70% e tiveram suas cavidades abdominais abertas para coleta do baço e de outros órgãos que foram coletados para realização de outros projetos. Esse procedimento foi realizado em fluxo laminar para manter a esterilidade dos órgãos coletados.

Os baços foram armazenados em tubos de 2ml contendo meio de cultura RPMI incompleto (SIGMA), até o final da eutanásia. Então, os baços foram macerados e centrifugados à 500g, 5 minutos a 4°C. O sobrenadante dessa primeira centrifugação, após a maceração do tecido foi coletado e congelado para avaliação de caspase-11 no meio extracelular. Após a lise de hemácias, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo (10% soro fetal bovino), contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placa de cultura de 96 poços.

4.7. Cultura de Esplenócito e Coleta de Sobrenadante

Para cultura de esplenócitos, após a extração, foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ células por poço. As amostras foram cultivadas no volume final de 200 μl de meio com estímulo de 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. As amostras foram pipetadas em duplicata para obtenção de uma amostra com estímulo e outra controle sem estímulo, somente com meio de cultura. Após o período de

12 e 24 horas em estufa de cultivo celular a 37 °C, as placas de cultura foram centrifugadas à 500g, 5 minutos a 4°C e então, o sobrenadante de cada amostra foi coletado e congelado à -20 °C para dosagem de Il-1 β por ELISA.

4.8. Cultura de macrófago peritoneal

Células peritoneais foram obtidas pela injeção e coleta de 5 ml de PBS, utilizando uma seringa com agulha de 21 Gauge. Essas células foram isoladas, contadas e posteriormente, plaqueadas em triplicata em meio RPMI completo. Assim, 1x10⁶ células por poço foram incubadas em estufa a 37 °C , durante toda a noite para completa aderência dos macrófagos peritoneais. Após esse período, as células não aderentes e o soro fetal bovino foram lavados 2 vezes com meio incompleto. As células foram estimuladas com 1 μ g/ml de LPS em meio incompleto por 5 horas e 30 minutos. Então, as células foram estimuladas com 5mM de ATP (SIGMA) por 30 minutos. Após os estímulos, coletamos e realizamos a precipitação de proteínas do sobrenadante de cultura com clorofórmio e metanol. As proteínas precipitadas do sobrenadante foram ressuspensas em tampão de amostra e fervidas a 99° por 5 minutos. Essas proteínas foram separadas durante a corrida de gel de SDS e marcadas para caspase-1 por western blotting como controle positivo.

4.9. Lisado de Esplenócito e Método de Bradford

Depois de extrair os esplenócitos, centrifugamos as células à 500g, 5 minutos a 4°C e descartamos o sobrenadante para ressuspê-las em 300 μ l de tampão ripa (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, com 150 mM NaCl, 1.0% Igepal, 0.5% deoxicolato de sódio e 0.1% dodecilsulfato de sódio) (SIGMA) com inibidores de protease (Roche). Esse tampão contém SDS para lise das

células, permite a solubilização e inibe a degradação das proteínas, juntamente com o inibidor de protease.

As amostras foram deixadas 15 minutos em gelo para total lise das células, após terem sido ressuspensas em tampão ripa. Posteriormente, as amostras de lisado de esplenócito foram centrifugadas a 13000 g, a 4 °C por 10 minutos. Isso permite que os fragmentos celulares desçam para o fundo do tubo para obtermos uma solução somente das proteínas dos esplenócitos.

O método de Bradford foi aplicado em todas as amostras de lisado de esplenócito e sobrenadante de tecido para a quantificação e normatização da concentração de proteínas, que foram aplicadas no gel de SDS. Primeiramente, diluímos todas as amostras, incluindo a curva da proteína padrão (realizada com albumina bovina) em água de injeção. Em seguida, iniciamos o ensaio ao diluir as amostras 10 vezes no reagente de Bradford (SIGMA) e realizamos a leitura à 595nm por espectrometria. A concentração das amostras é definida por interpolação dos valores de absorvância da curva padrão de concentrações conhecidas.

4.10. SDS-PAGE e Western Blotting

As proteínas do lisado de esplenócito e do sobrenadante de tecido foram inicialmente separadas em gel de 15% de poliacrilamida por SDS-PAGE. Foram aplicados 60µg de proteína para as amostras de lisado de esplenócito e 30µg para as amostras de sobrenadante de tecido. Para as amostras de controle positivo de caspase-1, proveniente de sobrenadante de cultura de macrófago peritoneal, aplicou-se o maior volume possível, pois pela escassez de amostra, não foi realizada a quantificação de proteína. A corrida em gel de SDS foi realizada à 80V por 30 minutos e posteriormente, à 150V por 1 hora, em cuba de eletroforese (sistema BIORAD). Após a corrida do gel de SDS, realizamos a transferência úmida (sistema BIORAD) das proteínas para a membrana de nitrocelulose (GE), por 2 horas a 300mA.

As membranas foram bloqueadas com solução 0,5% de leite desnatado (Molico) em TBS Tween 0,05% por 1 hora em agitação. O anticorpo para caspase-11 (Novus Biological) foi diluído 1:1000 na mesma solução de bloqueio. Já o anticorpo para caspase-1 (Genentech) foi diluído 1:3000 em solução 0.1% de leite desnatado em TBS Tween 0.05%. Para controle de carregamento utilizamos o anticorpo anti β -actina (SIGMA) na diluição de 1:1000. Para o controle de carregamento das amostras de sobrenadante de tecido utilizamos a coloração por coomassie, após a eletroforese das proteínas.

4.11. Citometria de Fluxo

Para avaliarmos a importância da caspase-11 na indução de pro-IL-1 β , realizamos a marcação intracelular dessa citocina. Juntamente, realizamos a marcação de superfície celular para a caracterização das populações celulares, já descritas como produtoras de IL-1 β . Assim, primeiramente realizamos a marcação de 5×10^6 com o marcador de viabilidade celular VIOLET (Life Technologies) diluído em PBS, por 15 minutos. Em seguida, realizamos 1 lavagem com solução de citometria (PBS 2% soro fetal bovino). Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos de superfície, específicos para os seguintes marcadores: CD11b, F4/80, CD11c e MHCII (eBioscience), diluídos em solução de citometria. Após essa marcação, as células foram fixadas e permeabilizadas, seguindo o protocolo do kit de marcação intracelular da eBioscience. Então, o anticorpo específico para pró-IL-1 β foi diluído em solução de permeabilização e incubado com as células por 45 minutos. Novamente as células foram lavadas três vezes e ressuspendidas com o tampão de citometria e lidas no citômetro Fortessa (BD Bioscience). Os dados foram adquiridos com software DIVA (BD Bioscience) e analisados no FlowJo (Tree Star).

4.12. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa Prisma da GraphPad (<http://www.graphpad.com>). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea utilizou-se testes paramétricos através do teste t não pareado e do teste ANOVA com comparação múltipla de Tukey. Os resultados foram expressos em média \pm EPM. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana, utilizou os testes não paramétricos pelo Teste Mann Whitney e do teste "Kruskal-Wallis" com comparação múltipla de Dunn.

5. RESULTADOS

5.1. A infecção por *P. chabaudi* induz a ativação de caspase-1 e proporciona uma hipersensibilidade ao LPS.

Conforme demonstrado previamente por nosso grupo (Ataide, M.A. *et al.*, 2014), a infecção por *P. chabaudi* é capaz de induzir a ativação de caspase-1 (Figura 2A). Além disso, os animais infectados são extremamente susceptíveis ao desenvolvimento de choque endotóxico após serem desafiados com LPS (Figura 2B). Condizente com o período de letalidade dos camundongos de até 12 horas, observamos que o plasma dos animais infectados e desafiados, contém alta concentração da citocina inflamatória e pirogênica IL-1 β (Figura 2C). Isso explica a alta mortalidade pelo desenvolvimento de choque endotóxico. Já os animais infectados não desafiados, apresentam concentrações significantes de IL-1 β circulante, porém concentrações não letais, que são induzidas apenas após o desafio por LPS.

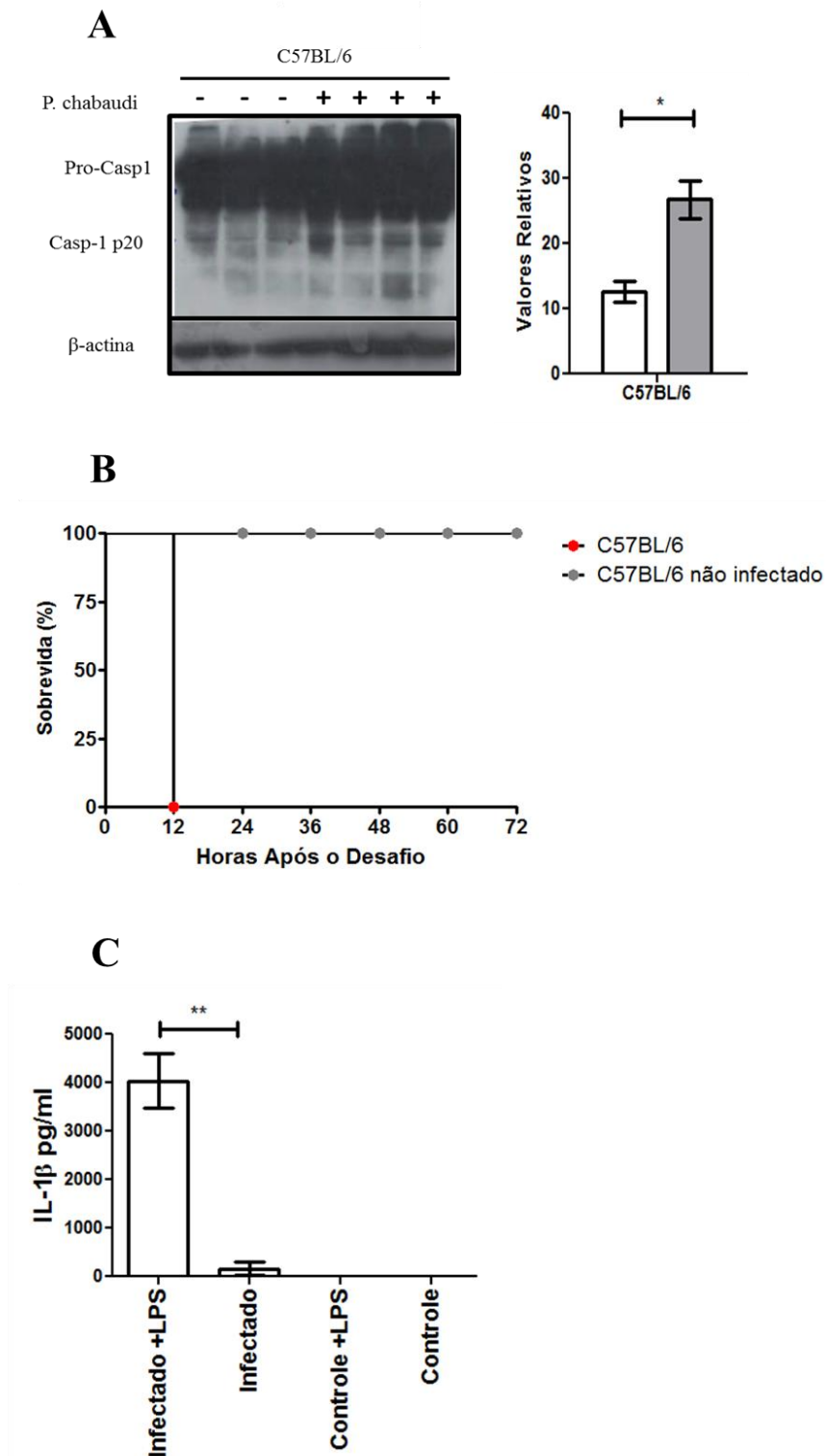


Figura 2. A infecção por *P. chabaudi* induz a ativação de caspase-1 e a hiper-reatividade após desafio por LPS. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^5 hemácias infectadas por *P. chabaudi*. Western Blotting para caspase-1 de proteínas de lisado de esplenócitos após o oitavo dia de infecção. Western Blotting para β -actina como controle de carregamento e gráfico de barras exibindo os valores de densitometria das bandas. (A). Curva de sobrevivência dos camundongos infectados e controles não infectados, desafiados com $10\mu\text{g}$ de LPS no oitavo dia de infecção (B). Quantificação de IL-1 β no plasma (ELISA) de camundongos após oito horas de infecção, desafiados com LPS ou não e seus respectivos controles não infectados (C). * $0.01 < p < 0.05$, ** $0.001 < p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.2. A infecção por *P. chabaudi* induz a ativação de caspase-11.

O principal objetivo desse trabalho foi a avaliação da ativação de caspase-11. Assim, observamos que no modelo murino da malária a infecção por *P. chabaudi* induz um aumento da expressão da pró-caspase-11 no baço, após oito dias de infecção (Figura 3A). Além disso, ao avaliarmos o sobrenadante do macerado do baço, detectamos a subunidade p26 da caspase-11 ativa (Figura 3B). Isso sugere que a caspase-11 tenha um papel biológico, durante a infecção.

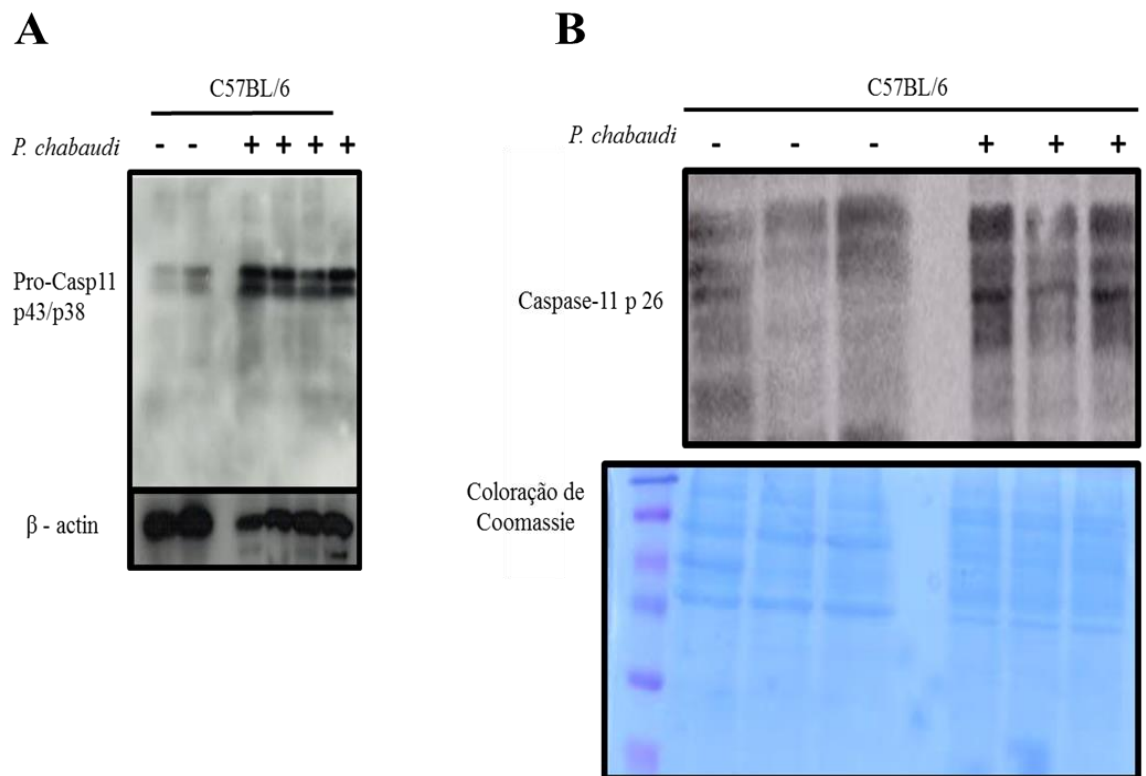


Figura 3. A caspase-11 é induzida e ativada durante a infecção por *P. chabaudi*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^5 hemácias infectadas por *P. chabaudi* e após 8 dias de infecção os baços foram coletados e o lisado proteico total analisado. Western Blotting para caspase-11 e β -actina como controle de carregamento do gel corado com coomassie (A). Western Blotting para caspase-11 e coloração de coomassie como controle de carregamento. Proteínas do sobrenadante tecidual (B).

5.3. A caspase-11 não é importante para a ativação de caspase-1, durante a malária experimental murina.

Como esperado, ao compararmos animais caspase-11^{-/-} e caspase-1/11^{-/-} ou animais 129, naturalmente deficientes para caspase-11 com animais C57BL/6, confirmamos que a infecção por *P. chabaudi* induz o aumento da expressão e a clivagem de caspase-11 (Figura 4A e 4B). Porém, diferente do que foi relatado em outros modelos de infecção, observamos a presença da subunidade p20 da caspase-1 ativada em animais caspase-11^{-/-} (Figura 4C), sugerindo que durante a malária a ativação de caspase-1 não é dependente de caspase-11.

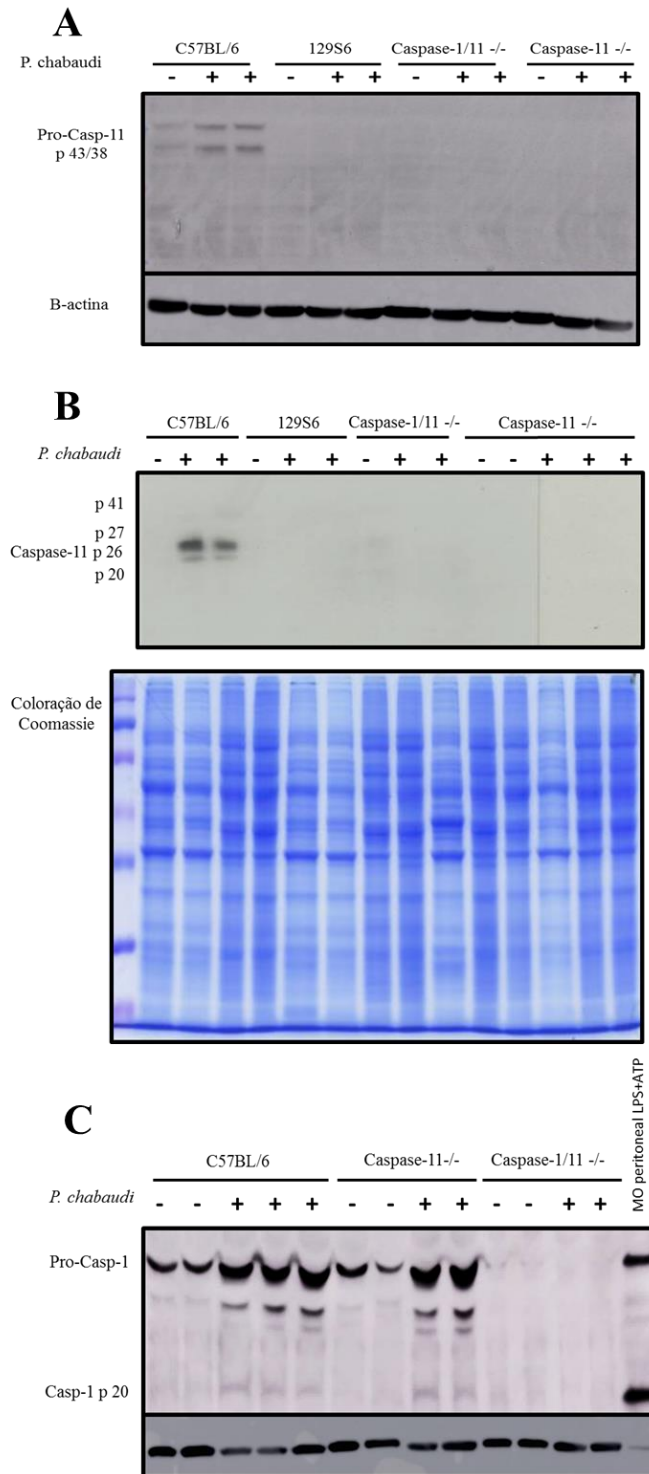


Figura 4. A infecção por *P. chabaudi* não induz a via não canônica do inflamassoma. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^5 hemácias infectadas por *P. chabaudi* e após 8 dias de infecção as amostras de baço foram coletadas. Western Blotting para caspase-11 de proteínas de lisado de esplenócitos (A). Western Blotting para caspase-11 de proteínas contidas no sobrenadante do macerado do baço (B). Western Blotting para caspase-1 de proteínas de lisado de esplenócitos (C), Western blotting para β -actina ou coloração de coomassie foram usados como controle de carregamento. Animais C57BL/6, 129S6 (naturalmente deficientes para caspase-11), Caspase-1/11 -/- (nocaute para caspase-1 e caspase-11) e Caspase-11 -/- (nocaute para caspase-11). O controle positivo para caspase-1 foi obtido de sobrenadante de cultura de macrófago peritoneal residente. Essas células foram estimuladas por 5 horas e 30 minutos com $1\mu\text{g/ml}$ de LPS e 30 minutos de estímulo por ATP (5mM).

5.4. A caspase-11 é importante para as concentrações plasmáticas de IL-1 β e para a letalidade no choque endotóxico

Apesar da caspase-11 não interferir na ativação da caspase-1 (Figura 4C), em nosso modelo de infecção observamos menores concentrações plasmáticas de IL-1 β em camundongos 129 e caspase-11 $^{-/-}$, após o desafio com LPS (Figura 5A e 5B). Além disso, observamos menores concentrações de IL-1 β no sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais infectados, estimulados com 1 μ g/ml de LPS por 12 e 24 horas (Figura 5C).

Como mostrado nas Figuras 5A e 5B, após oito horas do desafio por LPS, o plasma dos animais C57BL/6 apresentaram em média 4 vezes mais IL-1 β do que animais 129 ou animais caspase-11 $^{-/-}$. Já a concentração de IL-1 β em animais caspase-1/11 $^{-/-}$ não foram detectadas por estarem abaixo do limite de detecção do ELISA utilizado. Isso indica uma provável produção e/ou liberação de IL-1 β parcialmente dependente de caspase-11. Não foi possível coletar o sangue dos animais C57BL/6 após o período de 8 horas de desafio, devido à alta taxa de mortalidade desses animais por choque endotóxico. Como consequência dos menores níveis de IL-1 β , os animais caspase-11 $^{-/-}$ foram mais resistentes e apresentaram maior porcentagem de sobrevivência à letalidade por choque endotóxico, como observado na Figura 5D.

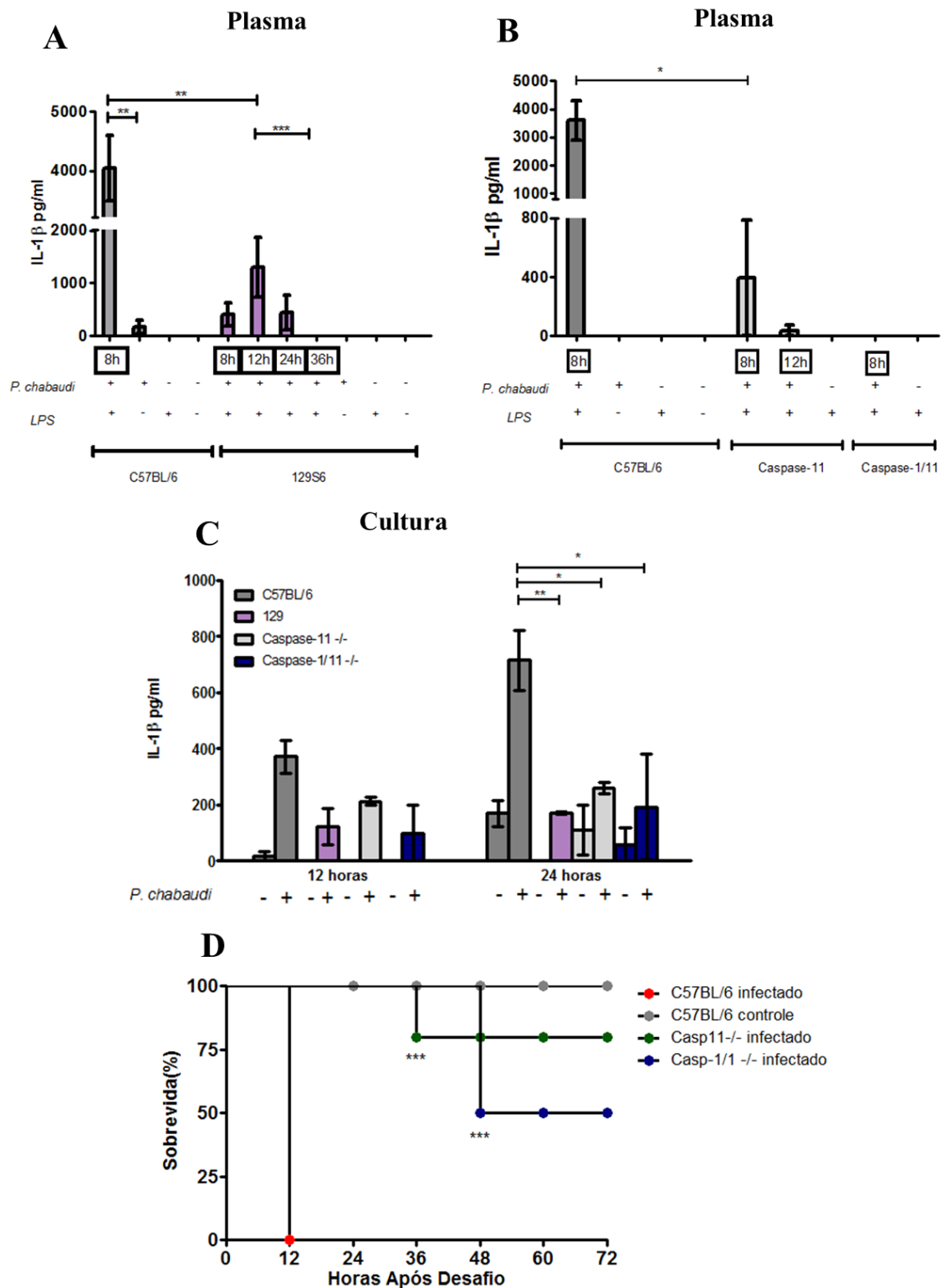


Figura 5. Animais caspase-11 $^{-/-}$ apresentam menores níveis de IL-1 β e são mais resistentes ao choque endotóxico. Quantificação de IL-1 β por ELISA do plasma de animais C57BL/6, 129S6 caspase-1 $^{-/-}$ e caspase-1/11 $^{-/-}$, desafiados com 10 μ g de LPS, após oito dias de infecção com 10 5 hemácias infectadas. O plasma foi coletado nos tempos de 8, 12, 24 ou 36 horas após desafio (A e B). Quantificação de IL-1 β por ELISA do sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais infectados ou controles não infectados. Os esplenócitos foram estimulados com 1 μ g/ml de LPS por 12 e 24 horas (C). Curva de sobrevivência de animais desafiados com 10 μ g de LPS no oitavo dia de infecção e animais controles não infectados (D). *0.01 < p < 0.05, **0.001 < p < 0.01, ***p < 0.001.

5.5. A sinalização via TLR4 induz IL-1 β , mas não é importante para ativação de caspase-11

(Kayagaki, N. *et al.*, 2013), descreveram em seu modelo de infecção bacteriana que a sinalização via TLR4 poderia participar da indução de pró-caspase-11. Porém, durante a malária experimental murina observamos uma indução de pró-caspase-11 independente de TLR4 (Figura 6A). Além disso, vimos que a ativação da caspase-11 não é prejudicada nos animais TLR4^{-/-} (Figura 6B). Entretanto, esses animais apresentam baixos níveis plasmáticos de IL-1 β e no sobrenadante de cultura de esplenócitos, semelhante aos níveis encontrados nas amostras de animais caspase-11^{-/-} (Figura 7A e 7B). Além disso, os animais TLR4^{-/-} mostraram-se extremamente resistentes à morte por choque endotóxico (Figura 7C).

Para avaliarmos a importância da caspase-11 na produção de IL-1 β , realizamos a marcação intracelular de pró-IL-1 β em células de animais infectados, desafiados ou não com LPS, após 2 horas de desafio. A Figura 8 A-B mostra que a caspase-11 não interfere na indução de pró-IL-1 β em monócitos e células dendríticas. É importante ressaltarmos o quanto o desafio com LPS aumenta a quantidade de pró-IL-1 β nos animais infectados em relação aos animais infectados não desafiados (Figura 8A-B), sendo esse evento temporalmente relacionado com a letalidade por choque endotóxico.

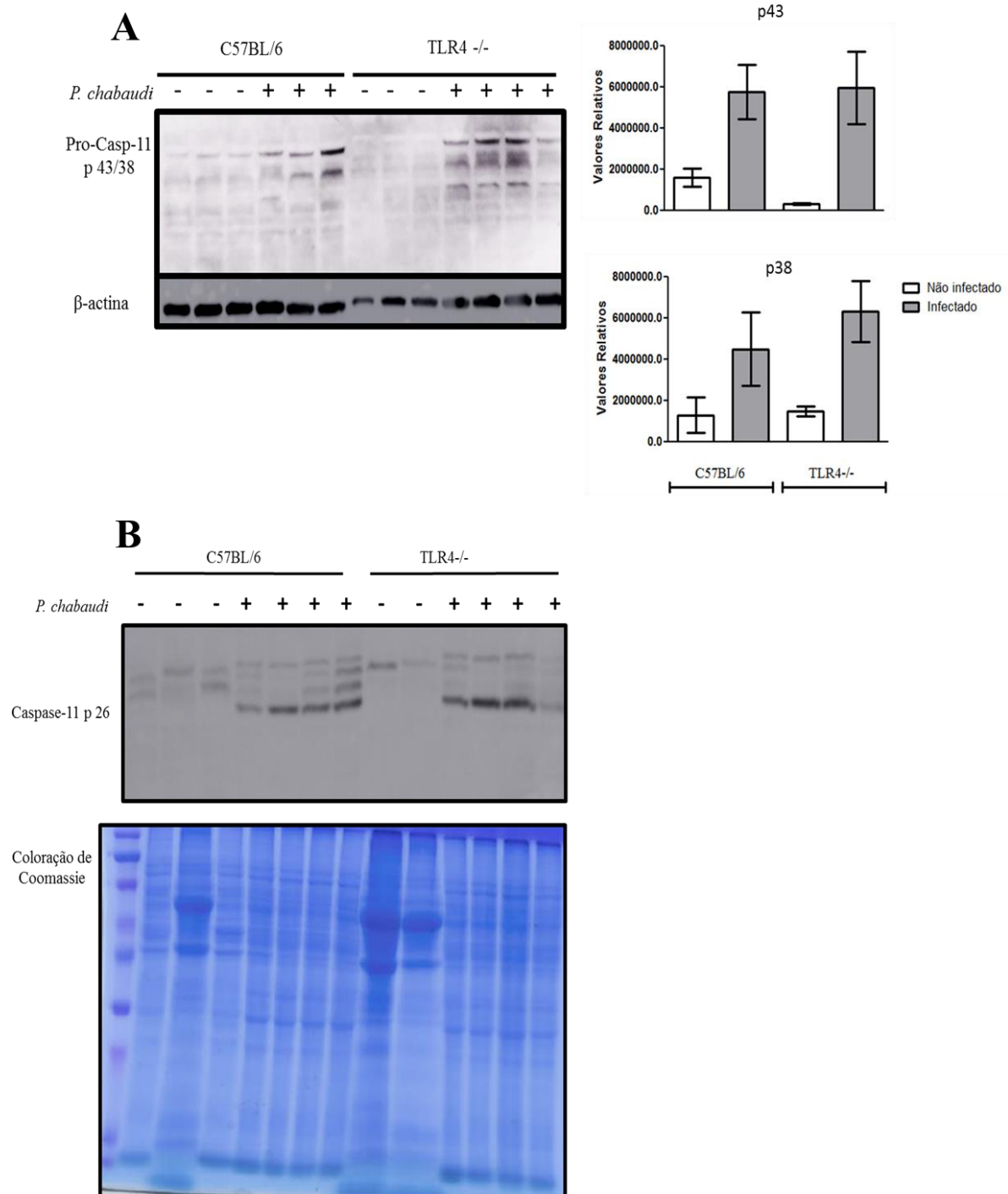


Figura 6. A sinalização via TLR4 não é importante para indução e a ativação de caspase-11. Camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} foram infectados com 10⁵ hemácias infectadas por *P. chabaudi* e após 8 dias de infecção as amostras de baço foram coletadas. Western Blotting para caspase-11 e β-actina como controle de carregamento de proteínas de lisado de esplenócito. O gráfico de barras exibe os valores de densitometria das bandas p43 e p38 de pró-caspase-11 (A). Western Blotting para caspase-11 e coloração de coomassie como controle de carregamento de amostras de sobrenadante do macerado do baço (B).

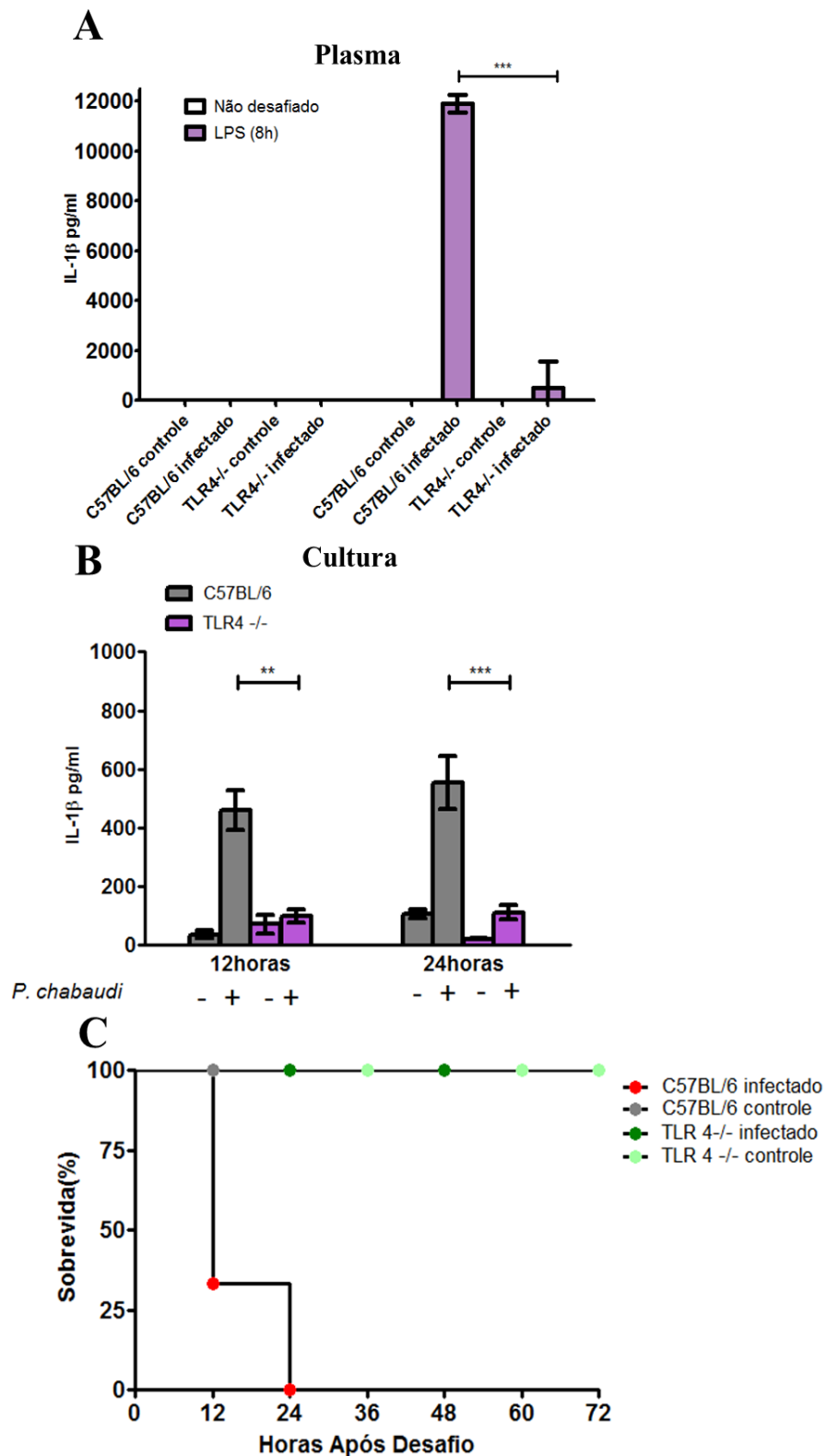


Figura 7. A sinalização via TLR4 induz IL-1 β . Quantificação de IL-1 β no plasma (ELISA) de camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} infectados no oitavo dia de infecção e camundongos controles não infectados, após 8 horas de desafio com de 10 μ LPS (A). Quantificação de IL-1 β (ELISA) do sobrenadante de cultura de esplenócito de animais infectados ou controles não infectados. Os esplenócitos foram estimulados com 1 μ g/ml de LPS por 12 e 24 horas (B). Curva de sobrevivência de animais desafiados com 10 μ g de LPS no oitavo dia de infecção e animais controles não infectados (C). As amostras de baço foram coletadas, após o oitavo dia de infecção com 10⁵ hemácias infectadas *0.01 < p < 0.05, **0.001 < p < 0.01, ***p < 0.001.

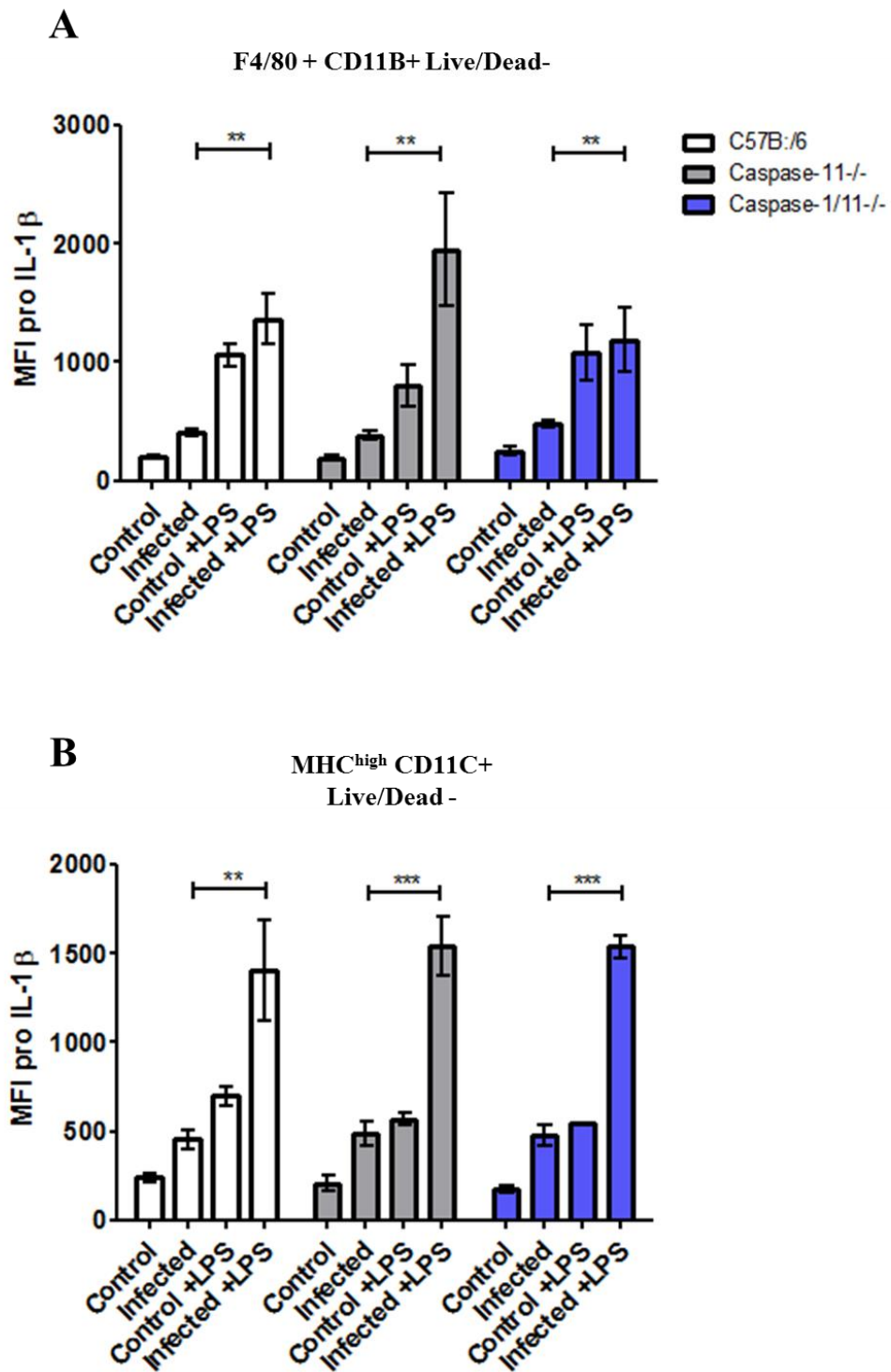


Figura 8. A caspase-11 não modula os níveis de pró-IL-1 β . Intensidade mediana de fluorescência para a marcação de pró-IL-1 β , em células F4/80+ CD11b+ Live/Dead- (marcador de células mortas) de esplenócitos de animais infectados, desafiados ou não com LPS e seus respectivos controles (A). Intensidade mediana de fluorescência para a marcação de pró-IL-1 β , em células MHCII^{high} CD11b+ Live/Dead- (marcador de células mortas) de esplenócitos de animais infectados, desafiados ou não com LPS e seus respectivos controles (B). O desafio de 10 μ g de LPS foi realizado após oito dias de infecção e os baços dos animais foram coletados após 2 horas de desafio. Foram utilizados animais C57BL/6, caspase-1^{-/-} e caspase-1/11^{-/-}.

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho nós demonstramos que, assim como a caspase-1, a caspase-11 é induzida e ativada pela infecção por *P. chabaudi* (Figuras 2A, 3A-B e 4A-B). Isso indica que durante a malária murina ocorrem os mecanismos de primeiro sinal (indução) e segundo sinal (ativação) necessários para a oligomerização do inflamassoma (Bauernfeind, F.G. *et al.*, 2009). A caspase-11 não necessita de sinalização via NLR para ser induzida, entretanto, também são necessários dois estímulos para que seja ativada (Kayagaki, N. *et al.*, 2011). O primeiro sinal, proveniente de um PAMP do *Plasmodium spp.*, provavelmente um agonista de TLR, que promove sinalização somente via MyD88 (Ataide, M.A. *et al.*, 2014; Bauernfeind, F.G. *et al.*, 2009). Isso pelo fato de animais MyD88^{-/-} apresentarem diminuídas as formas pró e ativa da caspase-1, além de apresentarem baixas concentrações de IL-1 β (Ataide, M.A. *et al.*, 2014). Sabe-se que durante a malária, o cristal de hemozoína fagocitado, leva ao rompimento do fagolisossomo e acarreta na exposição de PAMPs no citosol. Dessa forma, sugere-se que o DNA do parasito carregado pela hemozoína seja um primeiro sinal. Isso devido ao fato do DNA livre no citoplasma ativar TLR9, levando à indução do fator de transcrição NF κ -B e consequente indução de IFN-tipo I. Então, o IFN-tipo I, numa ação autócrina e parácrina, desencadeia o aumento da expressão das moléculas de NLR, pró-caspases e pró-IL1 β . Posteriormente, o próprio cristal de hemozoína, atua como um segundo sinal ao induzir a oligomerização do inflamassoma (Kalantari, P. *et al.*, 2014; Parroche, P. *et al.*, 2007).

Reforçando a hipótese da sinalização de TLR9 como primeiro sinal na malária, modelos de infecção bacteriana demonstraram que a indução da pró-caspase-11 pode ser mediada por IFN-tipo I (Case, C.L. *et al.*, 2013; Yang, Q. *et al.*, 2014), induzido via sinalização TLR4-Trif (Rathinam, V.A. *et al.*, 2012). Já em nosso modelo pela infecção por *P.*

chabaudi, vimos que a sinalização via TLR4 não é importante para a indução e ativação de caspase-11 (Figura 6A-B). Isso corrobora com a importância da ativação de TLR9 como primeiro sinal na malária. Além disso, outro estudo mostra que macrófagos Trif^{-/-}, infectados com *Salmonella* spp., apresentaram um atraso na indução da expressão de caspase-11, porém mantinham os níveis dessa proteína (Broz, P. *et al.*, 2012). Essas observações indicam que o papel do Trif na indução de caspase-11 pode variar com o modelo de infecção utilizado. Além do IFN-tipo I o IFN- γ também gera aumento da caspase-11. Isso pelo fato, do IFN- γ induzir a ligação de STAT 1 ao promotor e levar ao aumento da transcrição do gene da caspase-11 (Schauvliege, R. *et al.*, 2002). O IFN- γ é uma citocina muito importante na patogênese da malária, já que é produzido em resposta ao parasito tanto na fase de esporozoíto, quanto durante o ciclo eritrocitário (Bakir, H.Y. *et al.*, 2011; Mac-Daniel, L. *et al.*, 2014). Assim, tanto IFN-tipo I quanto o IFN- γ , podem ser importantes mecanismos para a indução de caspase-11 na malária.

Nosso trabalho também mostra que a malária deixa o hospedeiro susceptível ao choque endotóxico, sendo a alta concentração de IL-1 β relacionada com a alta mortalidade de animais C57BL/6 (Figura.2B-C). Interessante, que os animais infectados apresentaram baixos níveis de IL-1 β , quando comparados com os animais infectados desafiados com LPS. Sabe-se que a indução de mRNA de pró-IL-1 β é transiente, ou seja, a ativação é imediatamente seguida da repressão da transcrição (Fenton, M.J. *et al.*, 1987; Fenton, M.J. *et al.*, 1988). Além disso, a pró-IL-1 β necessita ser clivada pela caspase-1, sendo secretada durante a piroptose, independente do retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Eder, C. 2009). Isso implica em um processo de produção e liberação de IL-1 β muito controlado e, por isso, sugere-se que não são necessárias altas concentrações dessa citocina para que ocorra seu efeito biológico (Eder, C. 2009). Durante a malária, o primeiro e segundo sinais já foram acionados e as células já têm toda a maquinaria para a clivagem e liberação de IL-1 β . Dessa

forma, o desafio com LPS, principal indutor dessa citocina (Fantuzzi, G. *et al.*, 1996), promove a transcrição de mRNA que leva a uma exorbitante liberação de IL-1 β e culmina com o choque endotóxico e morte dos animais. Como o LPS é o principal agonista de TLR4, vimos que os animais TLR4 $^{-/-}$ apresentam baixas concentrações de IL-1 β e por isso são mais resistentes à morte por choque endotóxico, que animais C57BL/6 (Figura 7A-C). Isso ressalta que a letalidade nos animais infectados e desafiados, ocorra devido ao aumento de IL-1 β induzida por LPS, sendo essa citocina clivada e liberada por uma prontificada maquinaria de caspases. É importante destacar que o *P. chabaudi* é uma cepa não letal, porém após o desafio a essa baixa dose de LPS, os animais infectados sucumbem num curto período de 12 horas. Além disso, esse fenômeno não é observado em animais não infectados, mostrando que somente o LPS, que induz pró-IL-1 β , não é suficiente para levar à mortalidade. Recentes publicações com modelo experimental tratam da susceptibilidade dos animais durante co-infecções entre bactérias gram-negativas e *Plasmodium spp.*. Sabe-se que a malária leva ao aumento da bacteremia e, por isso, os animais morrem rapidamente (Lundqvist, J. *et al.*, 2010; Mastroeni, P. *et al.*, 2000). Entretanto, sendo o LPS um importante componente da parede celular dessas bactérias, é possível que a indução de pró-IL-1 β , seja o fenômeno desencadeador da morte e não somente o aumento da bacteremia.

Diversos modelos de infecção bacteriana *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a ativação de caspase-1 dependente da via não canônica do inflamassoma, ou seja, dependente de caspase-11 (Casson, C.N. *et al.*, 2013a; Casson, C.N. *et al.*, 2013b; Hagar, J.A. *et al.*, 2014; Meunier, E. *et al.*, 2014; Oficjalska, K. *et al.*, 2014). Entretanto em nosso modelo de malária murina, nós demonstramos que a caspase-11 não é importante para a ativação de caspase-1 (Figura 4C). Isso pelo fato dos animais caspase-11 $^{-/-}$ apresentarem a subunidade p20 da caspase-1 ativa. Entretanto, diferente do esperado, os animais 129 deficientes para caspase-11 e os animais caspase-11 $^{-/-}$, apresentaram baixas concentrações de IL-1 β circulante (Figura

5A-C). Além disso, animais caspase-11^{-/-} mostraram-se mais resistentes à letalidade, após o desafio por LPS (Figura 5D). Entretanto, os animais caspase-11^{-/-} apresentaram níveis semelhantes de pró-IL-1 β , ou seja, a caspase-11 não é necessária para a indução de pró-IL-1 β (Figura 8A-B). Dessa forma, sendo a atividade da caspase-11 irrelevante para a ativação de caspase-1 e para indução de pró-IL-1 β , essa protease pode estar agindo diretamente na clivagem ou na liberação dessa citocina. A primeira hipótese da clivagem de IL-1 β ser dependente de caspase-11 é a menos provável. Isso porque a caspase-11 apresenta uma sequência de aminoácidos distinta da presente na caspase-1 na região de ligação com o substrato. Apesar disso, a caspase-11 apresenta os resíduos de aminoácidos no sítio catalítico conservado, como na caspase-1, o que caracteriza essa enzima como cisteína protease (Wang, S. *et al.*, 1996). Além disso, um modelo *in vitro* com células nocautes para os genes da IL-1 β , caspase-1 e caspase-11, mostrou que ao realizar a co-transfecção de pró-IL-1 β e caspase-1, a citocina era liberada no sobrenadante na sua forma clivada. Já após a co-transfecção de pró-IL-1 β e caspase-11, não foi possível detectar a citocina no sobrenadante (Yang, Q. *et al.*, 2014).

Existem duas vias de secreção de citocinas a via clássica e a não-clássica. A maior parte das citocinas é secretada pela via clássica, que consiste na translocação da citocina pela membrana do retículo endoplasmático e então, secreção por vesículas do complexo de Golgi (Halban, P.A. *et al.*, 1994). Outras proteínas perdem a sequência hidrofóbica, denominada sequência sinal e são excretadas independentemente de retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Eder, C. 2009). A IL-1 β compõe o grupo de citocinas secretada pela via não clássica e para explicar a liberação dessa importante citocina pirogênica, existem três modelos. O primeiro modelo consiste na hipótese de que a liberação de IL-1 β seja feita por um subtipo de lisossomos secretórios. Esses lisossomos secretórios promovem a liberação da citocina mediada por Ca²⁺, e se movimentam até a membrana plasmática por mecanismo dependente de microtúbulos e actina (Rubartelli, A. *et al.*, 1990). Recentes estudos

demonstraram que a caspase-11 pode promover a migração celular por induzir a polarização de actina (Li, J. *et al.*, 2007). Também por modulação de actina, já foi demonstrado que em modelo de bactérias intracelulares, a caspase-11 é capaz de promover a fusão do fagolisossomo (Akhter, A. *et al.*, 2012). Assim, podemos hipotetizar que a caspase-11 pode ser importante para a movimentação dos lisossomos secretórios até a membrana celular para a promoção da liberação de IL-1 β .

O segundo mecanismo proposto para a liberação de IL-1 β , sugere que o processamento ocorra diretamente no citoplasma e que a citocina atravesse a membrana plasmática por transportadores transmembranânicos (Brough, D. *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que a caspase-11 cliva um canal catiônico e dessa forma, modifica sua conformação e permite a saída de IL-1 β da célula (Py, B.F. *et al.*, 2014). Já o último modelo proposto relaciona a liberação de IL-1 β com a lise celular, durante a piroptose. Sabe-se que a ativação da caspase-1 leva à formação de poros na membrana, que causa aumento de volume celular e subsequente lise celular com extravasamento de alarminas e das citocinas pirogênicas (Fink, S.L. *et al.*, 2006). Desde os primeiros estudos, a caspase-11 é relacionada com a morte celular, sendo que esse processo induz o aumento de caspase-11 (Kang, S.J. *et al.*, 2002; Yang, Q. *et al.*, 2014). Consequentemente, células caspase-11 $^{-/-}$, estimuladas com LPS, são mais resistentes do que células que possuem caspase-11 (Kang, S.J. *et al.*, 2002). A supressão de caspase-11 também foi acompanhada da diminuição de HMGB1, uma alarina associada à piroptose (Kayagaki, N. *et al.*, 2011). Além disso, outros trabalhos mostram que a citotoxicidade é mediada por caspase-11 e independente de caspase-1 e de componentes do inflamassoma, mesmo durante modelos de ativação da via não canônica *in vitro* (Aachoui, Y. *et al.*, 2013; Case, C.L. *et al.*, 2013; Kayagaki, N. *et al.*, 2011) e *in vivo* (Broz, P. *et al.*, 2012). Nesse trabalho mostramos que, durante a infecção por *P. chabaudi*, a ativação de caspase-1 e a indução de pró-IL-1 são independentes de caspase-11. Entretanto, os animais caspase-11 $^{-/-}$

infectados e desafiados com LPS, apresentam baixos níveis de IL-1 circulante e são mais resistentes ao desenvolvimento de choque endotóxico. Dessa forma, é possível considerar que a caspase-11 possa mediar a liberação de IL-1 β via controle de polarização de actina, mudança conformacional de canais transmembrânicos ou indução da piroptose.

7. CONCLUSÃO

Esse estudo mostra que, além da caspase-1, durante a malária experimental ocorre a indução e ativação da caspase-11. Entretanto, a ativação de caspase-1 não é dependente de caspase-11. Além disso, a infecção por *P. chabaudi*, leva à hipersensibilidade ao desafio com LPS, que resulta na morte por choque endotóxico. Isso porque a infecção por *P. chabaudi* ativa e mantém a maquinaria protéica e enzimática necessária para clivagem de pró-IL-1 β , rapidamente induzida pelo LPS, via sinalização por TLR4. Podemos concluir ainda, que a caspase-11 regula os níveis de IL-1 β circulante em animais infectados, após o desafio com LPS. Isso reflete em uma importante resistência dos camundongos caspase-11 $^{-/-}$ ao desenvolvimento de choque endotóxico. Assim, possivelmente a caspase-11 promova a modulação da liberação de IL-1 β , entretanto, esse mecanismo permanece desconhecido e requer estudos futuros.

8. REFERÊNCIAS

1. Aachoui, Y; Leaf, IA; Hagar, JA; Fontana, MF; Campos, CG; Zak, DE; Tan, MH; Cotter, PA; Vance, RE; Aderem, A and Miao, EA. Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. **Science**. 339, 975-978, Feb./2013.
2. Akhter, A; Caution, K; Abu, KA; Tazi, M; Abdulrahman, BA; Abdelaziz, DH; Voss, OH; Doseff, AI; Hassan, H; Azad, AK; Schlesinger, LS; Wewers, MD; Gavrilin, MA and Amer, AO. Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. **Immunity**. 37, 35-47, July/2012.
3. Amino, R; Thiberge, S; Martin, B; Celli, S; Shorte, S; Frischknecht, F and Menard, R. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nat.Med.** 12, 220-224, Feb./2006.
4. Arevalo-Herrera, M; Quinones, ML; Guerra, C; Cespedes, N; Giron, S; Ahumada, M; Pineros, JG; Padilla, N; Terrientes, Z; Rosas, A; Padilla, JC; Escalante, AA; Beier, JC and Herrera, S. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. **Acta Trop.** 121, 303-314, Mar./2012.
5. Arnot, DE and Gull, K. The Plasmodium cell-cycle: facts and questions. **Ann.Trop.Med.Parasitol.** 92, 361-365, June/1998.
6. Ataide, MA; Andrade, WA; Zamboni, DS; Wang, D; Souza, MC; Franklin, BS; Elian, S; Martins, FS; Pereira, D; Reed, G; Fitzgerald, KA; Golenbock, DT and Gazzinelli, RT. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. **PLoS.Pathog.** 10, e1003885-Jan./2014.
7. Bakir, HY; Tomiyama, C and Abo, T. Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. **Biomed.Res.** 32, 203-208, June/2011.
8. Banuls, AL; Thomas, F and Renaud, F. Of parasites and men. **Infect.Genet.Evol.** 20, 61-70, Dec./2013.
9. Bassat, Q; Guinovart, C; Sigauque, B; Mandomando, I; Aide, P; Sacarlal, J; Nhampossa, T; Bardaji, A; Morais, L; Machevo, S; Letang, E; Macete, E; Aponte, JJ; Roca, A; Menendez, C and Alonso, PL. Severe malaria and concomitant bacteraemia in children admitted to a rural Mozambican hospital. **Trop.Med.Int.Health.** 14, 1011-1019, Sept./2009.
10. Bauernfeind, FG; Horvath, G; Stutz, A; Alnemri, ES; MacDonald, K; Speert, D; Fernandes-Alnemri, T; Wu, J; Monks, BG; Fitzgerald, KA; Hornung, V and Latz, E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J.Immunol.** 183, 787-791, July/2009.

11. Beier, JC; Beier, MS; Vaughan, JA; Pumpuni, CB; Davis, JR and Noden, BH. Sporozoite transmission by *Anopheles freeborni* and *Anopheles gambiae* experimentally infected with *Plasmodium falciparum*. **J.Am.Mosq.Control Assoc.** 8, 404-408, Dec./1992.
12. Berkley, J; Mwarumba, S; Bramham, K; Lowe, B and Marsh, K. Bacteraemia complicating severe malaria in children. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.** 93, 283-286, May/1999.
13. Bronzan, RN; Taylor, TE; Mwenechanya, J; Tembo, M; Kayira, K; Bwanaisa, L; Njobvu, A; Kondowe, W; Chalira, C; Walsh, AL; Phiri, A; Wilson, LK; Molyneux, ME and Graham, SM. Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. **J.Infect.Dis.** 195, 895-904, Mar./2007.
14. Brough, D and Rothwell, NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. **J.Cell Sci.** 120, 772-781, Mar./2007.
15. Broz, P; Ruby, T; Belhocine, K; Bouley, DM; Kayagaki, N; Dixit, VM and Monack, DM. Caspase-11 increases susceptibility to *Salmonella* infection in the absence of caspase-1. **Nature.** 490, 288-291, Oct./2012.
16. Case, CL; Kohler, LJ; Lima, JB; Strowig, T; de Zoete, MR; Flavell, RA; Zamboni, DS and Roy, CR. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 110, 1851-1856, Jan./2013.
17. Casson, CN; Copenhaver, AM; Zwack, EE; Nguyen, HT; Strowig, T; Javdan, B; Bradley, WP; Fung, TC; Flavell, RA; Brodsky, IE and Shin, S. Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. **PLoS.Pathog.** 9, e1003400-2013a.
18. Casson, CN and Shin, S. Inflammasome-mediated cell death in response to bacterial pathogens that access the host cell cytosol: lessons from *legionella pneumophila*. **Front Cell Infect.Microbiol.** 3, 111-2013b.
19. Chelimo, K; Ofulla, AV; Narum, DL; Kazura, JW; Lanar, DE and John, CC. Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens vary by age and antigen in children in a malaria-holoendemic area of Kenya. **Pediatr.Infect.Dis.J.** 24, 680-684, Aug./2005.
20. Church, J and Maitland, K. Invasive bacterial co-infection in African children with *Plasmodium falciparum* malaria: a systematic review. **BMC.Med.** 12, 31-2014.
21. Coban, C; Igari, Y; Yagi, M; Reimer, T; Koyama, S; Aoshi, T; Ohata, K; Tsukui, T; Takeshita, F; Sakurai, K; Ikegami, T; Nakagawa, A; Horii, T; Nunez, G; Ishii, KJ and Akira, S. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. **Cell Host.Microbe.** 7, 50-61, Jan./2010.
22. Coban, C; Ishii, KJ; Kawai, T; Hemmi, H; Sato, S; Uematsu, S; Yamamoto, M; Takeuchi, O; Itagaki, S; Kumar, N; Horii, T and Akira, S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **J.Exp.Med.** 201, 19-25, Jan./2005.
23. Cookson, BT and Brennan, MA. Pro-inflammatory programmed cell death. **Trends Microbiol.** 9, 113-114, Mar./2001.

24. Coutinho-Silva, R and Ojcius, DM. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. **Microbes.Infect.** 14, 1271-1277, Nov./2012.
25. de Pina-Costa, A; Brasil, P; Di Santi, SM; de Araujo, MP; Suarez-Mutis, MC; Santelli, AC; Oliveira-Ferreira, J; Lourenco-de-Oliveira, R and Daniel-Ribeiro, CT. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz.** 109, 618-633, Aug./2014.
26. Eder, C. Mechanisms of interleukin-1beta release. **Immunobiology.** 214, 543-553, 2009.
27. Eldridge, MJ and Shenoy, AR. Antimicrobial inflammasomes: unified signalling against diverse bacterial pathogens. **Curr.Opin.Microbiol.** 23C, 32-41, Nov./2014.
28. Esposito, F; Lombardi, S; Modiano, D; Zavala, F; Reeme, J; Lamizana, L; Coluzzi, M and Nussenzweig, RS. Immunity to Plasmodium sporozoites: recent advances and applications to field research. **Parassitologia.** 28, 101-105, Aug./1986.
29. Fantuzzi, G and Dinarello, CA. The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. **J.Leukoc.Biol.** 59, 489-493, Apr./1996.
30. Fenton, MJ; Clark, BD; Collins, KL; Webb, AC; Rich, A and Auron, PE. Transcriptional regulation of the human prointerleukin 1 beta gene. **J.Immunol.** 138, 3972-3979, June/1987.
31. Fenton, MJ; Vermeulen, MW; Clark, BD; Webb, AC and Auron, PE. Human pro-IL-1 beta gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. **J.Immunol.** 140, 2267-2273, Apr./1988.
32. Ferrari, D; Pizzirani, C; Adinolfi, E; Lemoli, RM; Curti, A; Idzko, M; Panther, E and Di, VF. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **J.Immunol.** 176, 3877-3883, Apr./2006.
33. Fink, SL and Cookson, BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cell Microbiol.** 8, 1812-1825, Nov./2006.
34. Fowkes, FJ; Richards, JS; Simpson, JA and Beeson, JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of Plasmodium falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis. **PLoS.Med.** 7, e1000218-Jan./2010.
35. Franklin, BS; Ishizaka, ST; Lamphier, M; Gusovsky, F; Hansen, H; Rose, J; Zheng, W; Ataide, MA; de Oliveira, RB; Golenbock, DT and Gazzinelli, RT. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 108, 3689-3694, Mar./2011.
36. Frevert, U; Engelmann, S; Zougbede, S; Stange, J; Ng, B; Matuschewski, K; Liebes, L and Yee, H. Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. **PLoS.Biol.** 3, e192-June/2005.

37. Frischknecht, F; Baldacci, P; Martin, B; Zimmer, C; Thiberge, S; Olivo-Marin, JC; Shorte, SL and Menard, R. Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. **Cell Microbiol.** 6, 687-694, July/2004.
38. Garcia, LS. Malaria. **Clin.Lab Med.** 30, 93-129, Mar./2010.
39. Gazzinelli, RT; Kalantari, P; Fitzgerald, KA and Golenbock, DT. Innate sensing of malaria parasites. **Nat.Rev.Immunol.** 14, 744-757, Nov./2014.
40. Gething, PW; Elyazar, IR; Moyes, CL; Smith, DL; Battle, KE; Guerra, CA; Patil, AP; Tatem, AJ; Howes, RE; Myers, MF; George, DB; Horby, P; Wertheim, HF; Price, RN; Mueller, I; Baird, JK and Hay, SI. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. **PLoS.Negl.Trop.Dis.** 6, e1814-2012.
41. Gilson, PR and Crabb, BS. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. **Int.J.Parasitol.** 39, 91-96, Jan./2009.
42. Goldie, P; Roth, EF, Jr.; Oppenheim, J and Vanderberg, JP. Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hemozoin. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** 43, 584-596, Dec./1990.
43. Good, MF; Miller, LH; Kumar, S; Quakyi, IA; Keister, D; Adams, JH; Moss, B; Berzofsky, JA and Carter, R. Limited immunological recognition of critical malaria vaccine candidate antigens. **Science.** 242, 574-577, Oct./1988.
44. Grobusch, MP and Kremsner, PG. Uncomplicated malaria. **Curr.Top.Microbiol.Immunol.** 295, 83-104, 2005.
45. Gupta, S; Snow, RW; Donnelly, CA; Marsh, K and Newbold, C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. **Nat.Med.** 5, 340-343, Mar./1999.
46. Hagar, JA and Miao, EA. Detection of cytosolic bacteria by inflammatory caspases. **Curr.Opin.Microbiol.** 17, 61-66, Feb./2014.
47. Halban, PA and Irminger, JC. Sorting and processing of secretory proteins. **Biochem.J.** 299 (Pt 1), 1-18, Apr./1994.
48. Hay, SI; Gething, PW and Snow, RW. India's invisible malaria burden. **Lancet.** 376, 1716-1717, Nov./2010.
49. Jaroszewski, L; Rychlewski, L; Reed, JC and Godzik, A. ATP-activated oligomerization as a mechanism for apoptosis regulation: fold and mechanism prediction for CED-4. **Proteins.** 39, 197-203, May/2000.
50. Jones, IW; Thomsen, LL; Knowles, R; Gutteridge, WE; Butcher, GA and Sinden, RE. Nitric oxide synthase activity in malaria-infected mice. **Parasite Immunol.** 18, 535-538, Oct./1996.
51. Kalantari, P; DeOliveira, RB; Chan, J; Corbett, Y; Rathinam, V; Stutz, A; Latz, E; Gazzinelli, RT; Golenbock, DT and Fitzgerald, KA. Dual engagement of the NLRP3 and

AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. **Cell Rep.** 6, 196-210, Jan./2014.

52. Kang, SJ; Wang, S; Kuida, K and Yuan, J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. **Cell Death.Differ.** 9, 1115-1125, Oct./2002.

53. Kayagaki, N; Warming, S; Lamkanfi, M; Vande, WL; Louie, S; Dong, J; Newton, K; Qu, Y; Liu, J; Heldens, S; Zhang, J; Lee, WP; Roose-Girma, M and Dixit, VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature.** 479, 117-121, Nov./2011.

54. Kayagaki, N; Wong, MT; Stowe, IB; Ramani, SR; Gonzalez, LC; Akashi-Takamura, S; Miyake, K; Zhang, J; Lee, WP; Muszynski, A; Forsberg, LS; Carlson, RW and Dixit, VM. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. **Science.** 341, 1246-1249, Sept./2013.

55. Kochar, DK; Das, A; Kochar, A; Middha, S; Acharya, J; Tanwar, GS; Gupta, A; Pakalapati, D; Garg, S; Saxena, V; Subudhi, AK; Boopathi, PA; Sirohi, P and Kochar, SK. Thrombocytopenia in Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). **Platelets.** 21, 623-627, 2010.

56. Kohler, S; Delwiche, CF; Denny, PW; Tilney, LG; Webster, P; Wilson, RJ; Palmer, JD and Roos, DS. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. **Science.** 275, 1485-1489, Mar./1997.

57. Koonin, EV and Aravind, L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. **Trends Biochem.Sci.** 25, 223-224, May/2000.

58. Krishnegowda, G; Hajjar, AM; Zhu, J; Douglass, EJ; Uematsu, S; Akira, S; Woods, AS and Gowda, DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **J.Biol.Chem.** 280, 8606-8616, Mar./2005.

59. Kuida, K; Lippke, JA; Ku, G; Harding, MW; Livingston, DJ; Su, MS and Flavell, RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. **Science.** 267, 2000-2003, Mar./1995.

60. Lamkanfi, M and Dixit, VM. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. **J.Immunol.** 187, 597-602, July/2011.

61. Langhorne, J; Buffet, P; Galinski, M; Good, M; Harty, J; Leroy, D; Mota, MM; Pasini, E; Renia, L; Riley, E; Stins, M and Duffy, P. The relevance of non-human primate and rodent malaria models for humans. **Malar.J.** 10, 23-2011.

62. Li, J; Briher, WM; Scimone, ML; Kang, SJ; Zhu, H; Yin, H; von Andrian, UH; Mitchison, T and Yuan, J. Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization. **Nat.Cell Biol.** 9, 276-286, Mar./2007.

63. Liehl, P; Zuzarte-Luis, V; Chan, J; Zillinger, T; Baptista, F; Carapau, D; Konert, M; Hanson, KK; Carret, C; Lassnig, C; Muller, M; Kalinke, U; Saeed, M; Chora, AF; Golenbock, DT; Strobl, B; Prudencio, M; Coelho, LP; Kappe, SH; Superti-Furga, G; Pichlmair, A; Vigario, AM; Rice, CM; Fitzgerald, KA; Barchet, W and Mota, MM. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. **Nat.Med.** 20, 47-53, Jan./2014.
64. Lundie, RJ; de Koning-Ward, TF; Davey, GM; Nie, CQ; Hansen, DS; Lau, LS; Mintern, JD; Belz, GT; Schofield, L; Carbone, FR; Villadangos, JA; Crabb, BS and Heath, WR. Blood-stage Plasmodium infection induces CD8+ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8alpha+ dendritic cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 105, 14509-14514, Sept./2008.
65. Lundqvist, J; Larsson, C; Nelson, M; Andersson, M; Bergstrom, S and Persson, C. Concomitant infection decreases the malaria burden but escalates relapsing fever borreliosis. **Infect.Immun.** 78, 1924-1930, May/2010.
66. Mac-Daniel, L; Buckwalter, MR; Berthet, M; Virk, Y; Yui, K; Albert, ML; Gueirard, P and Menard, R. Local immune response to injection of Plasmodium sporozoites into the skin. **J.Immunol.** 193, 1246-1257, Aug./2014.
67. Martinon, F; Burns, K and Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol.Cell.** 10, 417-426, Aug./2002.
68. Martinon, F; Hofmann, K and Tschopp, J. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. **Curr.Biol.** 11, R118-R120, Feb./2001.
69. Mastroeni, P; Vazquez-Torres, A; Fang, FC; Xu, Y; Khan, S; Hormaeche, CE and Dougan, G. 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, July/2000.
70. Matuschewski, K. Getting infectious: formation and maturation of Plasmodium sporozoites in the Anopheles vector. **Cell Microbiol.** 8, 1547-1556, Oct./2006.
71. McCallum, FJ; Persson, KE; Mugenyi, CK; Fowkes, FJ; Simpson, JA; Richards, JS; Williams, TN; Marsh, K and Beeson, JG. Acquisition of growth-inhibitory antibodies against blood-stage Plasmodium falciparum. **PLoS.One.** 3, e3571-2008.
72. Menard, R; Tavares, J; Cockburn, I; Markus, M; Zavala, F and Amino, R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nat.Rev.Microbiol.** 11, 701-712, Oct./2013.
73. Meunier, E; Dick, MS; Dreier, RF; Schurmann, N; Kenzelmann, BD; Warming, S; Roose-Girma, M; Bumann, D; Kayagaki, N; Takeda, K; Yamamoto, M and Broz, P. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. **Nature.** 509, 366-370, May/2014.

74. Miller, JL; Sack, BK; Baldwin, M; Vaughan, AM and Kappe, SH. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. **Cell Rep.** 7, 436-447, Apr./2014.
75. Miller, LH; Ackerman, HC; Su, XZ and Wellems, TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nat.Med.** 19, 156-167, Feb./2013.
76. Ministério da Saúde. Malária: Doenças Infecciosas e Parasitárias.210-2006.
77. Mohan, K; Moulin, P and Stevenson, MM. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **J.Immunol.** 159, 4990-4998, Nov./1997.
78. Mueller, I; Zimmerman, PA and Reeder, JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*--the "bashful" malaria parasites. **Trends Parasitol.** 23, 278-283, June/2007.
79. Nadjm, B; Amos, B; Mtove, G; Ostermann, J; Chonya, S; Wangai, H; Kimera, J; Msuya, W; Mtei, F; Dekker, D; Malahiyo, R; Olomi, R; Crump, JA; Whitty, CJ and Reyburn, H. WHO guidelines for antimicrobial treatment in children admitted to hospital in an area of intense *Plasmodium falciparum* transmission: prospective study. **BMJ.** 340, c1350-2010.
80. Oficjalska, K; Raverdeau, M; Aviello, G; Wade, SC; Hickey, A; Sheehan, KM; Corr, SC; Kay, EW; O'Neill, LA; Mills, KH and Creagh, EM. Protective Role for Caspase-11 during Acute Experimental Murine Colitis. **J.Immunol.**Dec./2014.
81. Parroche, P; Lauw, FN; Goutagny, N; Latz, E; Monks, BG; Visintin, A; Halmen, KA; Lamphier, M; Olivier, M; Bartholomeu, DC; Gazzinelli, RT and Golenbock, DT. 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, Feb./2007.
82. Poespoprodjo, JR; Fobia, W; Kenangalem, E; Lampah, DA; Sugiarto, P; Tjitra, E; Anstey, NM and Price, RN. Dihydroartemisinin-piperaquine treatment of multidrug resistant *falciparum* and *vivax* malaria in pregnancy. **PLoS.One.** 9, e84976-2014.
83. Poh, CM; Howland, SW; Grotenbreg, GM and Renia, L. Damage to the blood-brain barrier during experimental cerebral malaria results from synergistic effects of CD8+ T cells with different specificities. **Infect.Immun.** 82, 4854-4864, Nov./2014.
84. Pollitt, LC; Colegrave, N; Khan, SM; Sajid, M and Reece, SE. Investigating the evolution of apoptosis in malaria parasites: the importance of ecology. **Parasit.Vectors.** 3, 105-2010.
85. Py, BF; Jin, M; Desai, BN; Penumaka, A; Zhu, H; Kober, M; Dietrich, A; Lipinski, MM; Henry, T; Clapham, DE and Yuan, J. Caspase-11 controls interleukin-1beta release through degradation of TRPC1. **Cell Rep.** 6, 1122-1128, Mar./2014.
86. Rahimi, BA; Thakkinstian, A; White, NJ; Sirivichayakul, C; Dondorp, AM and Chokejindachai, W. Severe *vivax* malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malar.J.** 13, 481-Dec./2014.

87. Rathinam, VA; Vanaja, SK; Waggoner, L; Sokolovska, A; Becker, C; Stuart, LM; Leong, JM and Fitzgerald, KA. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. **Cell**. 150, 606-619, Aug./2012.
88. Richards, JS and Beeson, JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunol.Cell Biol**. 87, 377-390, July/2009.
89. Rubartelli, A; Cozzolino, F; Talio, M and Sitia, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. **EMBO J**. 9, 1503-1510, May/1990.
90. Sabbatani, S; Fiorino, S and Manfredi, R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern? **Braz.J.Infect.Dis**. 14, 299-309, May/2010.
91. Schauvliege, R; Vanrobaeys, J; Schotte, P and Beyaert, R. Caspase-11 gene expression in response to lipopolysaccharide and interferon-gamma requires nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1. **J.Biol.Chem**. 277, 41624-41630, Nov./2002.
92. Schofield, L and Hackett, F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. **J.Exp.Med**. 177, 145-153, Jan./1993.
93. Schroder, K and Tschopp, J. The inflammasomes. **Cell**. 140, 821-832, Mar./2010.
94. Shi, J; Zhao, Y; Wang, Y; Gao, W; Ding, J; Li, P; Hu, L and Shao, F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**. 514, 187-192, Oct./2014.
95. Shi, YP; Udhayakumar, V; Oloo, AJ; Nahlen, BL and Lal, AA. Differential effect and interaction of monocytes, hyperimmune sera, and immunoglobulin G on the growth of asexual stage *Plasmodium falciparum* parasites. **Am.J.Trop.Med.Hyg**. 60, 135-141, Jan./1999.
96. Shio, MT; Eisenbarth, SC; Savaria, M; Vinet, AF; Bellemare, MJ; Harder, KW; Sutterwala, FS; Bohle, DS; Descoteaux, A; Flavell, RA and Olivier, M. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. **PLoS.Pathog**. 5, e1000559-Aug./2009.
97. Skorokhod, OA; Schwarzer, E; Ceretto, M and Arese, P. Malarial pigment haemozoin, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta and LPS do not stimulate expression of inducible nitric oxide synthase and production of nitric oxide in immuno-purified human monocytes. **Malar.J**. 6, 73-2007.
98. Snow, RW; Guerra, CA; Noor, AM; Myint, HY and Hay, SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**. 434, 214-217, Mar./2005.
99. Snow, RW; Omumbo, JA; Lowe, B; Molyneux, CS; Obiero, JO; Palmer, A; Weber, MW; Pinder, M; Nahlen, B; Obonyo, C; Newbold, C; Gupta, S and Marsh, K. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. **Lancet**. 349, 1650-1654, June/1997.
100. So, A; De, ST; Revaz, S and Tschopp, J. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. **Arthritis Res.Ther**. 9, R28-2007.

101. Stevenson, MM; Tam, MF; Wolf, SF and Sher, A. IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. **J.Immunol.** 155, 2545-2556, Sept./1995.
102. Sturm, A; Graewe, S; Franke-Fayard, B; Retzlaff, S; Bolte, S; Roppenser, B; Aepfelbacher, M; Janse, C and Heussler, V. Alteration of the parasite plasma membrane and the parasitophorous vacuole membrane during exo-erythrocytic development of malaria parasites. **Protist.** 160, 51-63, Feb./2009.
103. Takeuchi, O and Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell.** 140, 805-820, Mar./2010.
104. Tan, SO; McGready, R; Zwang, J; Pimanpanarak, M; Sriprawat, K; Thwai, KL; Moo, Y; Ashley, EA; Edwards, B; Singhasivanon, P; White, NJ and Nosten, F. Thrombocytopenia in pregnant women with malaria on the Thai-Burmese border. **Malar.J.** 7, 209-2008.
105. Tavares, AH; Magalhaes, KG; Almeida, RD; Correa, R; Burgel, PH and Bocca, AL. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS.Negl.Trop.Dis.** 7, e2595-2013.
106. Taylor-Robinson, AW; Phillips, RS; Severn, A; Moncada, S and Liew, FY. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. **Science.** 260, 1931-1934, June/1993.
107. Thornberry, NA and Molineaux, SM. Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. **Protein Sci.** 4, 3-12, Jan./1995.
108. Trape, JF; Zoulani, A and Quinet, MC. Assessment of the incidence and prevalence of clinical malaria in semi-immune children exposed to intense and perennial transmission. **Am.J.Epidemiol.** 126, 193-201, Aug./1987.
109. Wang, S; Miura, M; Jung, Y; Zhu, H; Gagliardini, V; Shi, L; Greenberg, AH and Yuan, J. Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1beta converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. **J.Biol.Chem.** 271, 20580-20587, Aug./1996.
110. Weiss, WR; Sedegah, M; Beaudoin, RL; Miller, LH and Good, MF. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 85, 573-576, Jan./1988.
111. White, NJ; Pukrittayakamee, S; Hien, TT; Faiz, MA; Mokuolu, OA and Dondorp, AM. Malaria. **Lancet.** 383, 723-735, Feb./2014.
112. Wilson, KP; Black, JA; Thomson, JA; Kim, EE; Griffith, JP; Navia, MA; Murcko, MA; Chambers, SP; Aldape, RA; Raybuck, SA and . Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. **Nature.** 370, 270-275, July/1994.
113. World Health Organization. World Malaria Report.2012.

114. Wu, X; Gowda, NM; Kumar, S and Gowda, DC. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. **J.Immunol.** 184, 4338-4348, Apr./2010.
115. Yamashita, T; Kawashima, S; Ohashi, Y; Ozaki, M; Ueyama, T; Ishida, T; Inoue, N; Hirata, K; Akita, H and Yokoyama, M. Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. **Circulation.** 101, 931-937, Feb./2000.
116. Yang, Q; Stevenson, HL; Scott, MJ and Ismail, N. Type I Interferon Contributes to Noncanonical Inflammasome Activation, Mediates Immunopathology, and Impairs Protective Immunity during Fatal Infection with Lipopolysaccharide-Negative Ehrlichiae. **Am.J.Pathol.** Dec./2014.
117. Zavala, F; Tam, JP; Hollingdale, MR; Cochrane, AH; Quakyi, I; Nussenzweig, RS and Nussenzweig, V. Rationale for development of a synthetic vaccine against Plasmodium falciparum malaria. **Science.** 228, 1436-1440, June/1985.
118. Zevering, Y; Khamboonruang, C; Rungruengthanakit, K; Tungviboonchai, L; Ruengpipattanapan, J; Bathurst, I; Barr, P and Good, MF. Life-spans of human T-cell responses to determinants from the circumsporozoite proteins of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** 91, 6118-6122, June/1994.
119. Zhou, R; Yazdi, AS; Menu, P and Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature.** 469, 221-225, Jan./2011.
120. Zuzarte-Luis, V; Mota, MM and Vigario, AM. Malaria infections: what and how can mice teach us. **J.Immunol.Methods.** 410, 113-122, Aug./2014.