

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**O sistema imune inato na patogênese da  
malária**

**por**

**Isabella Cristina Hirako**

Belo Horizonte  
2016

**Isabella Cristina Hirako**

**O sistema imune inato na patogênese da  
malária**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de  
Pesquisas René Rachou, como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em Ciências  
- área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Belo Horizonte  
2016

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

H668s  
2016

Hirako, Isabella Cristina.

O sistema imune inato na patogênese da malária /  
Isabella Cristina Hirako. – Belo Horizonte, 2016.

xvii, 115 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 121 – 127

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título  
de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde do Centro de  
Pesquisas René Rachou. Área de concentração:  
Biologia Celular e Molecular.

1. Malária/imunologia 2. *Plasmodium*/genética 3.  
Imunidade Inata/imunologia I. Título. II. Gazzinelli,  
Ricardo Tostes (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

Isabella Cristina Hirako

## O sistema imune inato na patogênese da malária

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação  
em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas  
René Rachou, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Ciências - área de  
concentração Biologia Celular e Molecular  
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente  
Prof. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ) Titular  
Prof. Dr. Marco Antônio Silva Campos (CPqRR/FIOCRUZ) Titular  
Prof. Dra. Karina Ramalho Bortoluci (UNIFESP) Titular  
Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (UFMG) Titular  
Prof. Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 18/05/2016

Dedico estes trabalhos  
ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar pelos obstáculos, me mantendo firme e fortalecida. Obrigada pelos muitos sinais enviados.

Aos meus pais, a quem devo meu caráter e disciplina ao trabalho, e ao meu irmão por todo amor e momentos de diversão. Muito obrigada por vocês existirem em minha vida.

Ao meu namorado pela presença amorosa. Elaborar uma tese ao lado de um companheiro deste quilate é um presente. Obrigada por tornar a minha vida mais completa e realizada.

Meu profundo agradecimento ao professor orientador Dr. Ricardo Gazzinelli pela confiança e incentivo. Obrigada por me transmitir grandes e valiosos ensinamentos de imunologia e de vida.

Ao professor. Dr. Andrew Luster por ter me recebido gentilmente em seu laboratório. Obrigada pela oportunidade de trabalhar no *Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School)*.

Aos meus colaboradores, colegas de trabalho e técnicos de laboratório pela agradável convivência.

## RESUMO

Por muitas décadas de estudo sobre a patogênese da malária, tem-se estabelecido que as manifestações clínicas são frequentemente uma consequência da inflamação sistêmica provocada pelo parasito.

Os imunocomplexos (ICs) são encontrados na circulação de pacientes com inflamação, seja ela estéril ou causada por infecções. O presente trabalho demonstra que pacientes com malária apresentam elevados níveis de anticorpos circulantes anti-DNA, bem como ICs contendo DNA do parasito. A ativação de monócitos por ICs resultou na formação de *specks* de inflamassomas contendo NLRP3, NLRP12 ou AIM2, ativação de caspase 1 e liberação de IL-1 $\beta$  ativa. As células monocucleares do sangue periférico estimuladas com ICs produzem grandes quantidades de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  e, no entanto, baixos níveis de IL-10. A principal fonte de citocinas pró-inflamatórias em pacientes de fase aguda da malária é a subpopulação de monócitos CD14<sup>+</sup>, que expressa o receptor Fc $\gamma$ RIIIA (CD16). Os monócitos de pacientes em fase de convalescência apresentam um fenótipo anti-inflamatório e, quando estimulados com ICs, produzem elevados níveis de IL-10 e baixos níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Portanto, dependendo do *status* de ativação do monócito, os ICs podem estimular ou modular a produção de citocinas pró-inflamatórias, atuando como um importante imunoregulador durante a malária.

Os monócitos (MOs), macrófagos e células dendríticas (DCs) são populações de células heterogêneas que têm papel crucial na reparação de tecidos, detecção de presença de microrganismos invasivos, iniciando respostas imunitárias protetoras. Estudos recentes definiram novos marcadores que permitem a distinção entre monócitos inflamatórios de células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs), no entanto, a contribuição destas células para neuroinflamação durante a MCE não foi

avaliada. Neste trabalho, observamos que a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*) promove a diferenciação de monócitos inflamatórios esplênicos e DCs convencionais por células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs), que são CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>. Estas células respondem a IFN $\gamma$  sendo a principal fonte de CXCL9 e CXCL10. Além disso, células MO-DCs expressando CXCL9/10 emergem no cérebro via CCR5 dependente, coincidindo com o influxo de células T CD8<sup>+</sup> e o desenvolvimento da síndrome neuropatológica letal. Assim, nossos dados fornecem evidências de que as MO-DCs induzidas pela infecção com *PbA* desempenham um papel central nas respostas imunes, mediando o desenvolvimento de MCE. De acordo com nossos resultados, após a diferenciação, MO-DCs, que expressam CXCL9 e CXCL10, tem um papel importante na ativação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> no baço e também migram para o SNC dependente de CCR5, onde atraem e ativam células T CD8<sup>+</sup>, levando ao desenvolvimento de MCE.

Palavras-chave: Imunologia, Imunidade Inata, Malária



## ABSTRACT

Decades of research on malaria pathogenesis have established that the clinical manifestations are often a consequence of the systemic inflammation elicited by the parasite.

Immunocomplexes (ICs) are found in the circulation of patients undergoing either infectious or sterile systemic inflammation. Here, we report that malaria patients display high levels of circulating anti-DNA antibodies, as well as ICs containing parasite DNA. Monocyte activation with malaria-induced ICs resulted in formation of NLRP3-, NLRP12- or AIM2-inflammasome specks, caspase-1 activation, and release of IL-1 $\beta$ . Upon stimulation with ICs malaria-primed peripheral blood mononuclear cells secrete bulk amounts of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , but low IL-10 levels. The main source of pro-inflammatory cytokines in acutely infected malaria patients is a subset of CD14<sup>+</sup> monocytes that express the Fc $\gamma$ RIIIA receptor (CD16). Intriguingly, in convalescent malaria patients, monocytes shifted back to an anti-inflammatory phenotype, and upon IC stimulation produced high levels of IL-10, but low levels of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Hence, depending on the status of monocyte activation, ICs may promote or dampen the production of pro-inflammatory cytokines, and thus act as important immune-regulators during malaria.

Monocytes (MOs), macrophages and dendritic cells (DCs) are heterogeneous cell populations that have critical role in tissue repair, sensing presence of invasive microorganisms and initiating protective immune responses. Recent studies have defined new markers that allows the distinction of inflammatory monocytes from monocyte derived dendritic cells (MO-DCs), however the contribution of these cells to neuroinflammation during ECM have not been explored. Here we show that infection with *Plasmodium berghei* ANKA (*PbA*) promotes replacement of splenic inflammatory

monocytes and conventional DCs by monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs), which are CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>. These cells are highly responsive to IFN $\gamma$  being a main source of CXCL9 as well as CXCL10. Importantly, the CXCL9/10 MO-DCs emerge in the brain in a CCR5-dependent manner, coinciding with CD8<sup>+</sup> T cell influx and development of the lethal neuropathological syndrome. Thus, we provide evidences that the MO-DCs induced by *PbA* infection play a central role in initiating immune responses and mediating the development of experimental cerebral malaria (ECM). Taken together, we would like to demonstrate that after differentiation, the CXCL9/10 MO-DCs not only have an important role in activating both CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen, but also migrate to the CNS in a CCR5-dependent manner, where they attract/activate CD8<sup>+</sup>T cell leading to the development of ECM.

Key-words: Immunology, Innate Immunity, Malaria

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Personalidades infectadas com <i>Plasmodium</i> ao longo da vida.....	19
<b>Figura 2.</b> Países com transmissão contínua de malária (2013).....	24
<b>Figura 3.</b> Mapa de risco da malária por município, Brasil (2013).....	25
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> infectantes ao homem.....	28
<b>Figura 5.</b> Principais eventos na patogênese da malária.....	29
<b>Figura 6.</b> Aumento de IgM específico para AMA-1 em plasma de pacientes durante a fase aguda da malária por <i>P. vivax</i> .....	71
<b>Figura 7.</b> Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e IL-10 no plasma de pacientes durante a fase aguda da malária.....	72
<b>Figura 8.</b> Soro de pacientes infectados com <i>P. falciparum</i> ou <i>P. vivax</i> apresentam elevados níveis de imunocomplexos (ICs).....	74
<b>Figura 9.</b> Níveis elevados de anticorpos anti-DNA de fita dupla durante a fase aguda de malária por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> .....	75
<b>Figura 10.</b> Elevados níveis de DNA humano e do parasito em plasma e imunocomplexos (ICs) de pacientes com malária por <i>P. vivax</i> .....	77
<b>Figura 11.</b> Assinatura de genes da família NF-κB em monócitos estimulados com o ICs.....	78
<b>Figura 12.</b> E6446, um antagonista de TLR7 e TLR9, bloqueia a atividade estimulatória de ICs em monócitos.....	81
<b>Figura 13.</b> Monócitos são as principais fontes de citocinas em células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) após estímulo com imunocomplexos (ICs) purificados de pacientes com malária.....	82
<b>Figura 14.</b> ICs purificados de pacientes com malária por <i>P. vivax</i> ativam caspase-1 e induzem a produção de elevados níveis da citocina pirogênica IL-1β em monócitos humanos.....	83
<b>Figura 15.</b> Plataformas de inflamassoma contendo NLRP12, NLRP3 e AIM2 são formados após estímulo com ICs em monócitos.....	84
<b>Figura 16.</b> ICs purificados induzem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias por monócitos CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> em pacientes com malária.....	85
<b>Figura 17.</b> Diferenciação de MO-DCs no baço (F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> DCSIGN <sup>+</sup> MHCII <sup>high</sup> CD11c <sup>+</sup> Ly6C <sup>+</sup> ) de animais infectados com <i>PbA</i> .....	88
<b>Figura 18.</b> Expressão de CXCL9 e CXCL10 por MO-DCs de animais infectados com <i>PbA</i> .....	90
<b>Figura 19.</b> Aumento da frequência de MO-DCs no cérebro de animais infectados com <i>PbA</i> .....	92
<b>Figura 20.</b> Expressão de CXCL9 e CXCL10 por MO-DCs de animais infectados com <i>PbA</i> é dependente de IFNγ.....	94

<b>Figura 21.</b> Tratamento com E6446 inibe a expressão de IFN $\gamma$ por linfócitos T bem como de CXCL9 e CXCL10 em MO-DCs.....	97
<b>Figura 22.</b> Expressão de quimiocinas e o surgimento de células hematopoiéticas CD45 <sup>high</sup> para o SNC de animais infectados com <i>PbA</i> é dependente de IFN $\gamma$ .....	99
<b>Figura 23.</b> Aumento da resistência de animais CCR5 <sup>-/-</sup> ao desenvolvimento da MCE.....	102
<b>Figura 24.</b> Migração de células MO-DCs para o SNC de animais infectados com <i>PbA</i> é dependente de CCR5.....	103
<b>Figura 25.</b> Ativação de receptores da imunidade inata por hemozoína (Hz) ou imunocomplexo (ICs).....	109
<b>Figura 26.</b> Células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs) na malária cerebral experimental.....	118

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Sintomas clínicos e parâmetros laboratoriais de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> .....	46
<b>Quadro 2.</b> Sintomas clínicos e parâmetros laboratoriais de pacientes infectados com <i>P. falciparum</i> .....	47
<b>Quadro 3.</b> <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes CCND e <i>Plasmodium</i> espécie específica.....	52
<b>Quadro 4.</b> Especificações dos anticorpos utilizados no ensaio de imunofluorescência com microscopia confocal.....	56
<b>Quadro 5.</b> <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, IFN $\gamma$ , CD8, CCL2, CCL5, $\beta$ 2-microglobulina e GAPDH.....	67
<b>Quadro 6.</b> Genes com a expressão aumentada em monócitos estimulados com ICs.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E MEDIDAS

AIM2	Ausente em melanoma 2 ( <i>Absent in melanoma 2</i> )
AMA-1	Antígeno de membrana apical 1 ( <i>Apical merozoite antigen-1</i> )
APCs	Células apresentadoras de antígeno ( <i>Antigens presenting cells</i> )
BSA	Albumina de soro bovino ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CBA	Citometria com esferas ( <i>Cytometric bead array</i> )
CCND	Cíclico D1 ( <i>Cyclic D1</i> )
cDNA	DNA complementar
cGAS	GMP-AMP cíclico sintase ( <i>Cyclic GMP-AMP synthase</i> )
CMSPs	Células mononucleares de sangue periférico
CpG	Citosina fosfato guanina ( <i>cytosine phosphate guanine</i> )
CSFE	Corante fluorescente carboxifluoresceína succinimidil ester ( <i>Carboxy fluorescein succinimidyl ester</i> )
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos ( <i>Danger associated molecular patterns</i> )
DCs	Células dendríticas ( <i>Dendritic cells</i> )
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
ECL	Substrato quimioluminescente ( <i>Enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
iMOs	Monócitos inflamatórios ( <i>Inflammatory monocytes</i> )
IRF	Fator regulador do interferon ( <i>Interferon regulatory factor</i> )
<i>g</i>	Aceleração da gravidade ( $\approx 9,8\text{m/s}^2$ )
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase ( <i>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase</i> )
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICs	Imunocomplexos
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1 ( <i>Intercellular adhesion molecule1</i> )
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ITAM	Sequência de ativação do imunoreceptor baseado em tirosina ( <i>Immunoreceptor tyrosilne-based activation motif</i> )
ITIM	Sequência de ativação do imunoreceptor baseado em tirosina ( <i>Immunoreceptor tyrosilne-based inhibition motif</i> )
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MAVS	Sinalização mitocondrial antiviral ( <i>Mitochondrial anti-viral signaling protein</i> )
MCE	Malária cerebral experimental
MDA5	Proteína associada à diferenciação do melanoma 5 ( <i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i> )
MOs	Monócitos
MO-DCs	Células dendríticas derivadas de monócitos ( <i>Monocyte-derived dendritic cells</i> )
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Fator 88 de diferenciação mielóide ( <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i> )
NK	Exterminadoras naturais ( <i>Natural killer</i> )
NLR	Receptor do tipo NOD ( <i>NOD-like receptor</i> )
NLRC4	Receptor da família dos NLRs contendo o domínio card ( <i>Card domain-containing protein 4</i> )
NLRP	Receptor da família dos NLRs contendo o domínio pyrin ( <i>NACHT, LRR and PYD domains-conteining protein</i> )
NS	Não significativo

OCT	Meio ótimo de temperatura de corte ( <i>Optimum cutting temperature</i> )
OMS	Organização mundial da saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos ( <i>Pathogen associated molecular patterns</i> )
PBS	Tampão fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PBS-T	Tampão fosfato salino com tween ( <i>Phosphate buffered saline – Tween</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polimerase chain reaction</i> )
PECAM1	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta 1 ( <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i> )
PfEMP1	Proteína de membrana do eritrócito 1 de <i>Plasmodium falciparum</i> ( <i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i> )
pH	Potencial de hidrogênio
PLP	Paraformaldeído lisina periodato
PPRs	Receptores de reconhecimento de padrões ( <i>Pathogen recognition receptor</i> )
RIG-I	Receptores do tipo RLR ( <i>RIG-I-like receptor</i> )
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio em gel de poliácridamida ( <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel</i> )
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>Single nucleotide polymorphism</i> )
STING	Estimulador de genes para IFN ( <i>Stimulator of interferon genes</i> )
TBM	Tetrametilbenzidina
TLR	Receptor do tipo Toll ( <i>Toll-like receptor</i> )
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor- <math>\alpha</math></i> )
VR	Valores de referência
WT	Animal selvagem ( <i>Wild type</i> )

C	Centígrados
$\mu\text{g Eq/mL}$	Equivalentes de gamaglobulina agregada por mililitro
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
cm	Centímetros
<i>g</i>	Aceleração da gravidade ( $\approx 9,8\text{m/s}^2$ )
$\text{g/dL}$	Gramas por decilitro
$\text{g/mL}$	Gramas por microlitro
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mL	Mililitro
$\text{m/m}^3$	Milímetro cúbico
nm	Nanômetro
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
v	Volts

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	18
1.1 A história da pesquisa malária.....	19
1.2 Epidemiologia.....	22
1.3 Agente etiológico e ciclo biológico da malária.....	26
1.4 A patogênese da malária.....	28
1.5 A imunidade inata e a fisiopatologia da malária.....	32
1.5.1 Papel de receptores da imunidade inata na malária.....	32
1.5.2 Modelo murino da malária cerebral.....	35
<b>2 JUSTIFICATIVA GERAL</b> .....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3.1 Malária</b> .....	41
3.1.1 Objetivo geral.....	41
3.1.2 Objetivos específicos.....	41
<b>3.2 Modelo murino da malária cerebral</b> .....	41
3.2.1 Objetivo geral.....	41
3.2.2 Objetivos específicos.....	41
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	43
<b>4.1 Malária</b> .....	44
4.1.1 Paciente.....	44
4.1.1.1 Características e procedência da amostra.....	44
4.1.1.2 Aspectos éticos da pesquisa.....	44
4.1.1.3 Indivíduos da pesquisa.....	44
4.1.1.4 Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes.....	45
4.1.2 Determinação da parasitemia.....	47
4.1.3 Quantificação de imunocomplexos (ICs).....	47
4.1.4 ELISA para anticorpos anti-DNA.....	49
4.1.5 ELISA para antígeno específico.....	50
4.1.6 Purificação de ICs.....	50
4.1.7 Extração de DNA.....	48
4.1.8 PCR em Tempo Real.....	51
4.1.9 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e preparação de monócitos humanos.....	52
4.1.10 Detecção de citocinas.....	53
4.1.11 <i>Western blot</i> para caspase-1.....	55
4.1.12 Imunofluorescência com microscopia confocal.....	55
4.1.13 Detecção de mRNA e análise de expressão gênica por nanostring ( <i>Nanostring Technologies</i> ).....	58
4.1.14 Análise estatística.....	59
<b>4.2 Modelo murino da malária cerebral</b> .....	59
4.2.1 Animais.....	59
4.2.2 Infecção.....	60
4.2.3 Citometria de fluxo.....	60
4.2.4 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo.....	61
4.2.5 Purificação por citometria.....	62
4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	62
4.2.7 Confocal.....	63
4.2.8 Migração de células dendríticas enriquecidas.....	63
4.2.9 Detecção de citocinas.....	64
4.2.10 Extração de RNA.....	64
4.2.11 Síntese do DNA complementar.....	65



4.2.12 PCR em Tempo Real.....	66
4.2.13 Detecção de mRNA e análise de expressão gênica por nanostring (Nanostring Technologies).....	67
4.2.14 Droga e tratamento.....	67
4.2.15 Microscopia intravital.....	68
4.2.16 Análise estatística.....	69
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
<b>5.1 Malária</b> .....	<b>71</b>
5.1.1 Produção de IgG e IgM durante a malária.....	71
5.1.2 Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes no plasma de pacientes com malária.....	72
5.1.3 Aumento dos níveis de ICs durante a málaría.....	73
5.1.4 Aumento de anticorpos anti-DNA durante a málaría.....	74
5.1.5 Presença de DNA de <i>P. vivax</i> em ICs.....	76
5.1.6 Monócitos estimulados com ICs apresentam uma assinatura de genes induzida pelo fator de transcrição NF-κB.....	77
5.1.7 ICs purificados de pacientes com malária induzem a produção de citocinas por monócitos.....	79
5.1.8 A exposição prévia ao IFN $\gamma$ aumenta a produção de citocinas induzidas por ICs.....	81
5.1.9 ICs purificados de pacientes com malária induzem a ativação de caspase-1 em monócitos.....	82
5.1.10 Formação da plataforma de inflamassomas em monócitos estimulados com ICs de pacientes com malária.....	84
5.1.11 ICs induzem a produção de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias por monócitos.....	85
<b>5.2 Modelo murino da malária cerebral</b> .....	<b>86</b>
5.2.1 A infecção por <i>Plasmodium</i> induz a presença de células MO-DCs.....	86
5.2.2 A malária induz a expressão de CCR5 <sup>+</sup> CXCL9 <sup>+</sup> CXCL10 <sup>+</sup> em MO-DCs.....	89
5.2.3 Células MO-DCs CCR5 <sup>+</sup> CXCL9 <sup>+</sup> CXCL10 <sup>+</sup> são encontradas no sistema nervoso central de animais infectados com <i>PbA</i> .....	91
5.2.4 IFN $\gamma$ induz a expressão de CXCL9 e CXCL10 em MO-DCs.....	93
5.2.5 TLRs induzem a expressão de CXCL9 e CXCL10 em MO-DCs.....	95
5.2.6 O recrutamento de MO-DCs para o SNC em animais infectados com <i>PbA</i> é dependente de IFN $\gamma$ .....	98
5.2.7 O recrutamento de MO-DCs para o SNC em animais infectados com <i>PbA</i> é dependente de CCR5.....	100
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>104</b>
6.1 Papel dos ICs na ativação das células do sistema imune inato.....	106
6.2 Papel de monócitos e DCs durante a malária.....	113
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>121</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>128</b>
Anexo 1: “DNA-containing immunocomplexes promote inflammasome assembly and release of pyrogenic cytokines by CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD64 <sup>high</sup> CD32 <sup>low</sup> inflammatory monocytes from malária patients”.....	129
Anexo 2: “Splenic differentiation and emergence of CCR5 <sup>+</sup> CXCL9 <sup>+</sup> CXCL10 <sup>+</sup> monocyte-derived dendritic cells in the brain during cerebral malaria”.....	148
Anexo 3: Carta confirmação “Harvard Medical School”.....	181

# **1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A história da pesquisa na malária

Desde a antiguidade a malária é um dos principais flagelos da humanidade. Originada provavelmente no continente africano, acompanhou o processo migratório do ser humano por diversas regiões ao longo dos tempos<sup>1</sup>.



Figura 1. Personalidades infectadas com *Plasmodium* ao longo da vida.

Os primeiros registros de malária foram encontrados em escritos chineses e egípcios de 3 mil anos a.C.. Textos religiosos e médicos da antiguidade relacionavam febres agudas como punição dos Deuses e a presença de maus espíritos. Hipócrates, na Grécia antiga, foi o primeiro a descartar superstições, descrevendo de forma clara a periodicidade da febre (paroxismo) além de atribuir a esplenomegalia ao diagnóstico clínico da malária<sup>1,2</sup>. Posteriormente, no século II d.C., ocorreram epidemias em diversas áreas da Europa. Os romanos relacionaram a água parada dos pântanos que cercavam o império romano com a presença de

febres agudas durante os meses de verão. Estas febres foram inicialmente chamadas de *mal air* – do italiano, mau ar - pois acreditava-se que a causa da doença estava relacionada com o ar insalubre de determinadas regiões pantanosas<sup>2,3</sup>. Sendo assim, engenheiros romanos projetaram grandes sistemas de drenagem no intuito de eliminar a causa da malária. Após a queda do império romano e a destruição dos sistemas de drenagem de água, os bárbaros se tornaram as principais vítimas da malária. Grande parte do seu exército não resistiu a doença. No século XVI, a malária é disseminada ao novo mundo por meio das grandes navegações, ou seja, viagens de colonizadores espanhóis e portugueses<sup>2</sup>.

Em 1880, Charles Laveran, foi a primeira pessoa a encontrar parasitos no sangue de pacientes infectados com malária. Durante seus trabalhos na Argélia, ele observou formas sanguíneas do parasito que se desenvolviam no interior de glóbulos vermelhos humanos<sup>4</sup>. Por essa grande descoberta, Laveran foi agraciado com o Prêmio Nobel de medicina em 1907<sup>5</sup>. A partir daí, o modo de transmissão e o ciclo do parasita foram esclarecidos até o final do século XIX<sup>4</sup>. Em 1886, Camillo Golgi também elucidou o ciclo do agente da malária, o *Plasmodium*, nos glóbulos vermelhos, e a coincidência temporal entre os calafrios e a febre recorrentes com a ruptura e a liberação de parasitos na corrente sanguínea. Com isso, ele formulou uma hipótese sobre a toxina na patogênese da malária, demonstrando que a febre de forma cíclica segue o ciclo de desenvolvimento do parasito no sangue, sugerindo que era consequente da liberação de uma toxina de origem do parasito, liberada pelo amadurecimento destes nas células vermelhas<sup>3,6</sup>.

Este conhecimento sobre a febre induzida pela malária foi aplicado por um professor de psiquiatria e neurologia em Viena, Julius Wagner-Jauregg, desenvolvendo um método para o tratamento de demência paralítica (estágio

avançado de neurosífilis) por inoculação de parasitos da malária. Ele observou que indivíduos que desenvolviam febres altas poderiam ser curados da sífilis<sup>3,7</sup>. Deste modo, de 1917 a meados dos anos 1940, a malária induzida pelo parasito menos agressivo, *Plasmodium vivax*, foi usada como tratamento para a sífilis terciária uma vez que produzia febres altas e prolongadas (uma forma de piroterapia). Isso foi considerado um risco aceitável porque a malária poderia ser tratada posteriormente com quinino, o qual estava disponível naquele momento<sup>7</sup>. Por este estudo, Jauregg foi agraciado com o prêmio Nobel em medicina em 1927<sup>8</sup>.

Em 1897, Ronald Ross, um oficial britânico no serviço médico indiano, foi o primeiro a demonstrar que os parasitos da malária podem ser transmitidos de pacientes infectados para mosquitos. Ele encontrou formas do parasito da malária no interior de um mosquito que havia se alimentado em um portador da doença. Além disso, ele sugeriu que a transmissão do parasito para humanos ocorria através da picada do mosquito. Assim, a forma de transmissão da malária foi resolvido<sup>3,4</sup>. Por sua descoberta, Ross foi agraciado com o prêmio Nobel de medicina em 1902<sup>9</sup>. Em 1942, Paul Müller, um químico que trabalhava no desenvolvimento de vários produtos químicos para combater insetos agrícolas, desenvolveu o inseticida DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) de grande atividade inseticida, poder residual e baixo custo. O DDT foi também usado para combater mosquitos transmissores da malária em várias partes da Europa tanto durante quanto após a guerra, salvando milhares de vidas<sup>3,4</sup>. Müller também foi agraciado com o prêmio Nobel de medicina em 1948<sup>10</sup>.

No século XVII, os padres jesuítas observaram que os indígenas da América utilizavam cascas de árvores nativas para curar doenças febris. Esta planta foi denominada Cinchona em 1735, e em 1820, o seu princípio ativo foi isolado, o

quinino. Com as dificuldades no fornecimento do quinino durante a I Guerra Mundial, pesquisadores alemães foram estimulados a desenvolver antimaláricos sintéticos, culminando na produção de pamaquina (1924), mepacrina (1930) e cloroquina (1934)<sup>1,3</sup>. Ainda na busca de potenciais fármacos contra a malária devido a resistência de parasitos as drogas, Youyou Tu isolou um composto ativo a partir da *artemisia annua* em 1972, sintetizando o derivado mais potente, dihidroartemisinina, em 1973<sup>11</sup>. Pela descoberta da artemisinina, uma terapia para a malária que salvou milhões de pessoas no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, Youyou Tu recebeu o prêmio Nobel em medicina em 2015<sup>12</sup>.

O aumento de fundos designados ao controle da malária, a estabilidade econômica e a melhoria no sistema público de saúde são fatores importantes que contribuem para uma redução na taxa de incidência da malária. Contudo, o financiamento para o controle da doença não é o único desafio. Em diversas regiões, o sistema público de saúde ainda se encontra em precariedade, sendo incapaz de integrar ao plano de controle global da doença. Além disso, não há ferramentas adequadas disponíveis e suficientes para monitorar o plano de ação global contra a malária<sup>13</sup>.

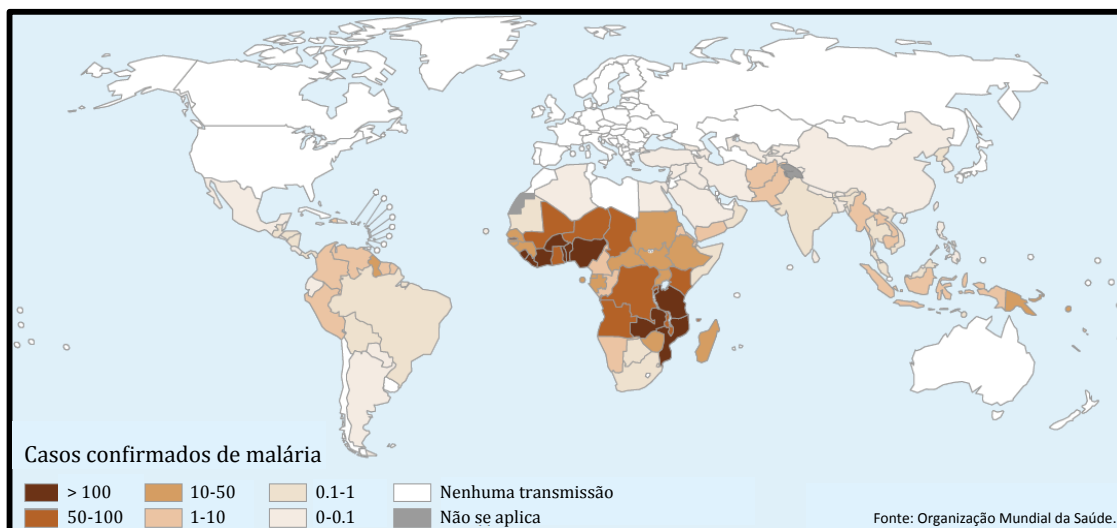
## 1.2 Epidemiologia

A malária é uma doença infecciosa de grande importância no mundo. Está classificada como uma das maiores endemias, sendo um grande obstáculo para o avanço de comunidades e nações menos desenvolvidas<sup>14</sup>. Atualmente, o impacto global referente aos danos sociais e econômicos causados pela malária é extenso e representa um dos maiores problemas de saúde pública nas áreas tropicais e subtropicais do mundo<sup>14,15</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS 2015),

1.2 bilhões de indivíduos habitam áreas de risco e, em média, 214 milhões de novos casos ocorrem anualmente. Além disso, aproximadamente 438 mil mortes são contabilizadas anualmente, principalmente de crianças com menos de cinco anos de idade. Além das crianças, as gestantes também constituem um grupo de alto risco de mortalidade por malária. A cada ano, estima-se que aproximadamente 55 milhões de gestações ocorrem em áreas de risco a transmissão de *Plasmodium falciparum*, na África sub saariana, com aproximadamente 10 mil mortes maternas<sup>14</sup>.

A distribuição de casos de malária depende de vários fatores que influenciam na dinâmica de transmissão. A grande maioria dos casos letais da malária ocorrem na África sub saariana, e são causados pelo *P. falciparum*. Esta espécie do parasito é responsável por 90% dos casos mais graves da malária no mundo, atingindo principalmente a África<sup>14</sup>. No continente africano, a malária é fundamentalmente domiciliar, atingindo principalmente crianças com menos de cinco anos de idade. Portanto, o uso de redes de proteção vem sendo empregado para o controle do vetor e evitar a transmissão do parasito. Baseado em dados de pesquisas domiciliares e relatórios de programa nacional de controle da malária, a proporção da população que dorme utilizando as redes de proteção tem aumentado acentuadamente na África sub saariana. Estima-se que no ano de 2000, menos de 2% da população fazia o uso das redes de proteção. Em 2015, esse número aumentou para 55%. A proporção de crianças menores de cinco anos que faz o uso das redes de proteção aumentou para 68% em 2015<sup>14</sup>.

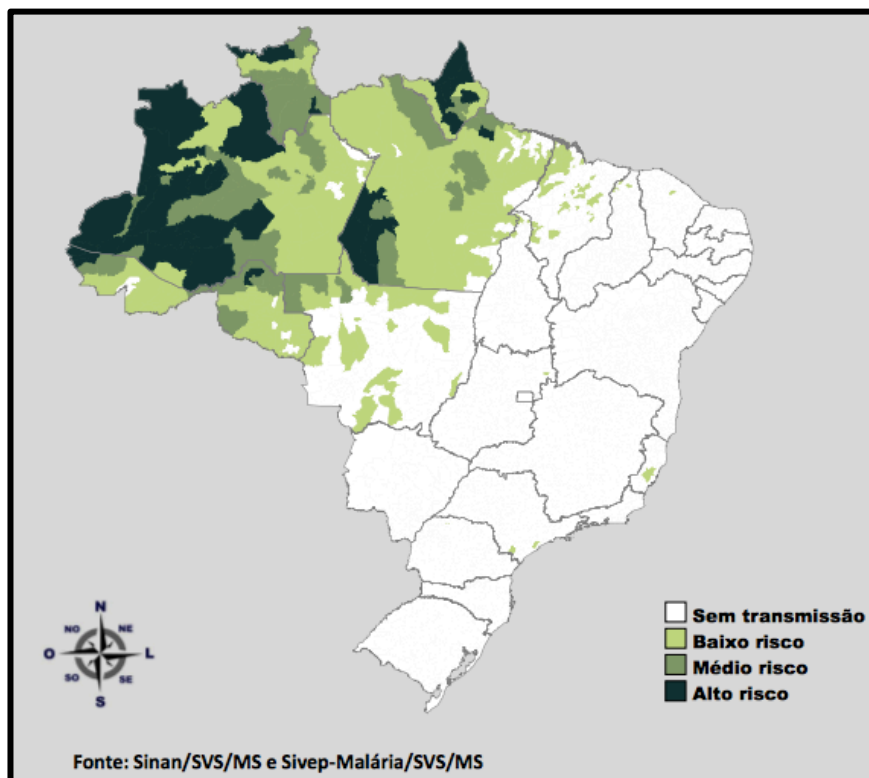
O *P. vivax* é a espécie predominante na Ásia e Américas, onde ocorrem 9% e 1% dos casos de malária, respectivamente. Mesmo considerada uma espécie mais benigna, é responsável por grandes perdas econômicas e problemas sociais<sup>14,15,16</sup>.



**Figura 2. Países com transmissão contínua de malária (2013).**

No Brasil, no ano de 2015 foram relatados 139.354 casos de malária, sendo que mais de 99% dos casos ocorreram na Região Amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, compreendendo 807 municípios<sup>15</sup>. A espécie predominante é o *P. vivax* em 82% dos casos, embora no período de 2011 a 2013, tenha ocorrido um aumento na proporção de malária por *P. falciparum* de 13% para 18%. Este aumento é preocupante, visto que a malária causada por *P. falciparum* é a responsável pela grande maioria das formas graves e óbitos<sup>15,16</sup>. Ademais, a malária no Brasil é considerada uma doença de caráter ocupacional que afeta principalmente adultos que fazem parte de migrações desordenadas e ocupação de áreas rurais<sup>16</sup>. Atividades relacionadas a garimpos de ouro e outros minerais, assentamentos agrícolas, exploração de madeiras e atividades agropecuárias contribuem para a maior ocorrência de casos da doença<sup>17</sup>.





**Figura 3. Mapa de risco da malária por município, Brasil (2013).**

Nas populações amazônicas a associação entre atividades ocupacionais e o risco de malária aponta para uma gênese multifatorial, que envolve mudanças climáticas e movimentos migratórios, ocupação do solo irregular, desmatamentos resultantes de reforma agrária, avanços na agricultura, construção de represas e dificuldade de acesso aos serviços de saúde<sup>17</sup>. Desta forma, faz-se necessário o envolvimento incondicional do segmento governamental e da iniciativa privada em conjunto, pois aproveitar o impulso político e financeiro sem precedentes implica numa melhor coordenação global. Esta atitude reflexiva de ambas as partes deve contribuir para a criatividade nas estratégias da ciência e saúde de um modo geral, resultando na sustentabilidade e inovação em prol do controle e da erradicação da malária<sup>13</sup>.

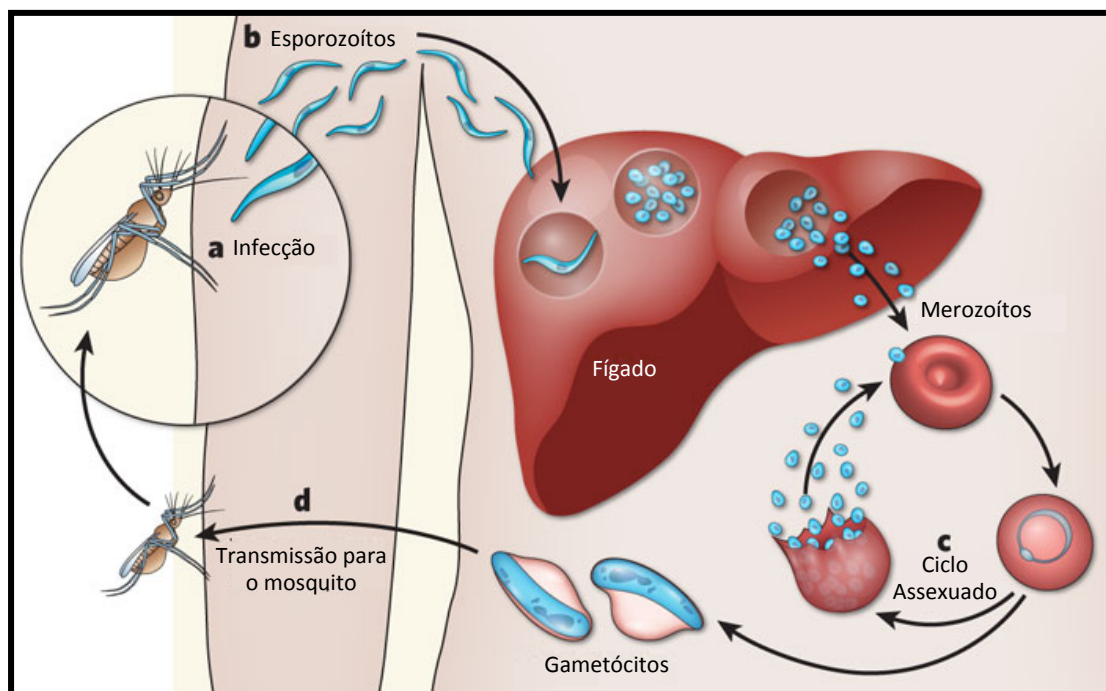
### 1.3 Agente etiológico e ciclo biológico da malária

A malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário, pertencente ao filo Apicomplexa, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. Atualmente, são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, principalmente quatro espécies parasitam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*<sup>18</sup>.

A infecção pelo *P. falciparum* é a mais grave, uma vez que estes parasitos invadem hemácias em qualquer fase evolutiva (eritrócitos e reticulócitos). O tempo de incubação é curto, por volta de seis dias, causando malária maligna com paroxismo de 24 horas, podendo haver crises diárias. O *P. vivax* não causa doença mortal, já que estes só invadem hemácias jovens (reticulócitos). O período de incubação é de cerca de oito dias com crises paroxísticas a cada 48 horas. O *P. malarie* não causa doença aguda fatal infectando somente hemácias envelhecidas. O seu período de incubação é de aproximadamente 15 dias. O paroxismo é de 72 horas e a doença é considerada benigna quartã. O *P. ovale*, não causa doença mortal uma vez que só infecta reticulócitos. O seu período de incubação é de cerca de 15 dias, causando malária benigna terciária, com paroxismo de 48 horas<sup>18</sup>.

O ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado se inicia pela inoculação de esporozoítos, formas infectantes do *Plasmodium*, através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (**Figura 4**). Após ser inoculada na derme humana, formas alongadas e móveis do *Plasmodium*, os esporozoítos, movimentam-se rapidamente acessando a corrente sanguínea. Posteriormente, essas formas invadem os hepatócitos iniciando o ciclo hepático da infecção. Nos hepatócitos, ocorre a esquizogonia, um ciclo assexuado de reprodução, em que os esporozoítos se desenvolvem e originam os esquizontes, os quais amadurecem e liberam por

volta de 40 mil merozoítos na corrente sanguínea. Em algumas espécies de *Plasmodium* (*P. ovale* e *P. vivax*), o esquizonte hepático pode permanecer em estado latente, em forma de hipnozoíto. Essas formas podem ser reativadas, levando a recaídas de episódios agudos da malária. Os merozoítos liberados na circulação, por sua vez, invadem as hemácias e iniciam nova esquizogonia, transformando-se em trofozoítos que amadurecem e se dividem, gerando os esquizontes. Os esquizontes amadurecidos rompem os eritrócitos e liberam aproximadamente dois mil merozoítos que invadem novos eritrócitos, iniciando um novo ciclo replicativo, ou se diferenciando em gametócitos macho e fêmea. Estes gametócitos, quando ingeridos pelo mosquito *Anopheles* no repasto sanguíneo, iniciam um ciclo sexuado no intestino do mosquito, com a fusão dos gametas para formação dos oocinetos que penetram na parede intestinal e geram oocistos. Por sua vez, os oocistos se dividem por esporogonia, originando milhares de esporozoítos que chegam à glândula salivar do mosquito. Quando o mosquito, carregando esporozoítos nas glândulas salivares, se alimentar novamente, irá infectar outros hospedeiros humanos, fechando assim o ciclo do parasito, que é altamente espécie específico<sup>18,19</sup>.



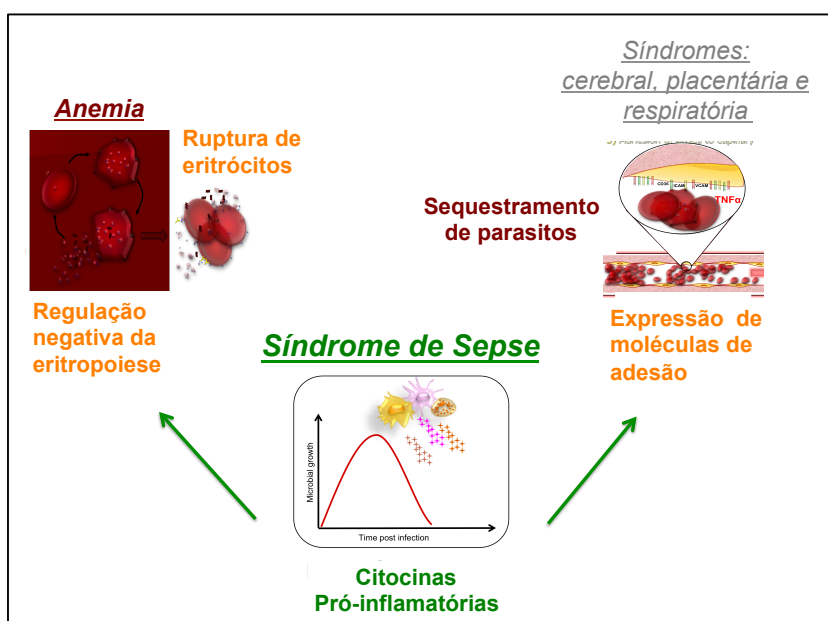
**Figura 4. Ciclo de vida de *Plasmodium* infectantes ao homem.** a, Fêmeas infectadas injetam a forma de esporozoítos do parasito num hospedeiro humano. b, Esporozoítos são transportados na corrente sanguínea para as células do fígado, onde proliferam-se assexuadamente, e, em seguida, como merozoítos, invadem os glóbulos vermelhos. c, Ciclo assexuado dentro das células vermelhas do sangue, fase de manifestação clínica da doença, seguido pela produção de gametócitos macho e fêmea. d, estes são transmitidos de volta para um mosquito durante o repasto sanguíneo, onde se fundem para formar oocistos que dividem para criar esporozoítos. Estes migram para as glândulas salivares, iniciando-se assim novamente o ciclo. (Renaud, F; Michalakis, Y. Nature. 2009; 46: 298-300).

#### 1.4 A patogênese da malária

A patogênese da malária é multifatorial. As manifestações clínicas variam de infecção assintomática em indivíduo imune a complicações graves e dependem de aspectos como a genética do parasito e hospedeiro, exposição prévia a infecção, idade, fatores nutricionais, geográficos e sócio econômicos. Os sinais e sintomas mais comuns da malária, em indivíduos não imunes, como febre (paroxismo), náusea, dor de cabeça, iniciam-se entre sete a 15 dias após a infecção, com a ruptura dos esquizontes eritrocíticos e são característicos de resposta inflamatória sistêmica, com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes<sup>20,21</sup>. A ativação de células do sistema imune e consequentemente a inflamação sistêmica podem

levar a manifestações clínicas graves, como anemia, acidose metabólica, malária cerebral, hipoglicemia, distúrbios respiratórios e insuficiência de múltiplos órgãos. As manifestações clínicas em infecções causadas por *P. falciparum*, se não tratadas, podem evoluir levando a letalidade. Crianças com malária grave apresentam quadros de anemia aguda, icterícia, estresse respiratório devido a acidose metabólica e malária cerebral<sup>20</sup>. O *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos (eritrócitos jovens) contribuindo para cargas parasitárias mais baixas além de uma menor destruição de eritrócitos totais. No caso da infecção por este parasito, a formação de *knobs* (protuberâncias na superfície de eritrócitos) não ocorre, sugerindo sua capacidade limitada de aderência ao endotélio vascular. Assim, não ocorrendo a obstrução de capilares de importantes órgãos, a ocorrência da malária cerebral e placentária é apenas esporádica<sup>22</sup>.

A patogênese da malária resulta de três eventos principais fisiopatológicos: a resposta inflamatória excessiva, destruição de células vermelhas do sangue e adesão de eritrócitos infectados às veias capilares<sup>20,23</sup>.



**Figura 5. Principais eventos na patogênese da malária.** A inflamação sistêmica é um evento central nas síndromes associadas a malária.

Esses eventos estão associados e são responsáveis pelas principais síndromes relacionadas a malária: a inflamação sistêmica, anemia bem como a malária cerebral e placentária<sup>20</sup>. O balanço entre respostas pró e anti-inflamatórias contra o parasito é crítico para se ter proteção clínica, ou seja, pouca ativação imune pode não inibir o crescimento do parasito, enquanto a ativação exacerbada pode levar à imunopatologia<sup>24</sup>.

Uma vez que o crescimento do parasito é sincronizado, pode-se dizer que a liberação de citocinas pirogênicas é cíclica. As citocinas pró-inflamatórias são importantes mediadores inflamatórios durante a malária<sup>20,23</sup>. A “tempestade de citocinas”, também conhecida como hipercitocinemia, é a grande responsável pela febre alta, fadiga extrema e náuseas. A patologia da malária está intrinsecamente ligada a produção descontrolada de mediadores pró-inflamatórios, resultando em um quadro de inflamação sistêmica. A liberação maciça de citocinas vasoativas, hipovolemia e a redução da viscosidade sanguínea contribuem para quadros de sepse durante a malária. No entanto, estes sinais são inespecíficos da malária, podendo ser encontrados em outras infecções. Uma desregulação no equilíbrio da produção de citocinas pró-inflamatórias pode também culminar em quadros de encefalopatia. Além disso, observa-se um efeito inibitório da eritropoese, por meio do aumento no padrão de produção de citocinas pró-inflamatórias, agravando a anemia em estágios avançados da doença<sup>25,26,27</sup>.

Três tipos de mecanismos (não excludentes) explicam o desenvolvimento de uma anemia, de forma não relacionada com o grau de parasitemia, no curso da malária: o aumento da destruição de hemácias pelo parasita, remoção de eritrócitos infectados ou alterados por células fagocíticas e o déficit na reposição de novos eritrócitos. A destruição de células vermelhas do sangue corresponde à uma fase

intra-eritrocítica onde parasitos digerem a hemoglobina, produzindo metabólitos potencialmente tóxicos, refletindo em quadros severos de anemia. Além disto, durante o hiper-esplenismo observado na malária, há remoção por células fagocíticas de eritrócitos parasitados. Além disso, a reduzida capacidade e deformidade mesmo de eritrócitos não parasitados durante a malária, leva a um aumento na ingestão por fagócitos. Além da hemólise de eritrócitos infectados, há a disfunção da medula óssea com diseritropoiese, que persiste por algumas semanas após a infecção aguda, causando uma baixa quantidade de reticulócitos. Os mecanismos do hospedeiro responsáveis pela supressão da eritropoese podem envolver uma resposta imune excessiva ou contínua. Algumas citocinas pró-inflamatórias como  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  e MIF inibem a eritropoese<sup>28,29,30</sup>.

Outro evento chave na fisiopatologia da malária é o seqüestro de hemácias parasitadas em diferentes órgãos, incluindo os pulmões, cérebro, fígado, rins e placenta. Citocinas circulantes, como  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  ou componentes liberados na ruptura de hemácias infectadas, levam a um aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, tais como CD36, ICAM1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*), PECAM1 (do inglês, *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*), receptor do complemento 1, sulfato de heparan e sulfato de condroitina A. Conseqüentemente, PfEMP1 (do inglês, *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) se ligam a essas moléculas de adesão que estão distribuídas entre diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro. Essa interação entre moléculas do parasito (PfEMP1) e moléculas de adesão do hospedeiro é o principal determinante do tropismo do parasito em tecidos e patogenicidade<sup>31,32</sup>. Por exemplo, CD36 e ICAM1 são importante para o sequestro de parasitos no cérebro enquanto o sulfato de heparan e sulfato de condroitina A são os principais receptores para os

eritrócitos infectados na placenta<sup>33</sup>. A ligação de hemácias infectadas a células endoteliais leva a obstrução da microvasculatura, disfunção endotelial, edema e extravasamento de leucócitos para tecidos. O sequestro de parasitas e estes processos de inflamação tecidual são, pelo menos em parte, responsáveis pela síndrome do estresse respiratório, malária cerebral e malária gestacional<sup>30,32,33</sup>.

Em regiões endêmicas de malária, constata-se o desenvolvimento gradativo de imunidade e diminuição das manifestações clínicas em indivíduos com múltiplas infecções progressas. A aquisição deste tipo de proteção natural é dependente principalmente da exposição do indivíduo ao parasito, da exposição a variantes antigênicas múltiplas do *Plasmodium*, bem como da maturação do sistema imunológico<sup>21,31</sup>. Altas parasitemias com sinais e sintomas clínicos da doença são comuns em crianças com menos de cinco anos de idade. Com o avanço da idade e a reincidência de infecções diferentes, mecanismos da imunidade inata e adaptativa participam do controle de altas parasitemias e dos sintomas clínicos. No entanto podem não eliminar completamente a infecção, o que leva à persistência de baixas parasitemias por longos períodos, mantendo alta prevalência de indivíduos assintomáticos e altas taxas de transmissão do parasito<sup>21</sup>.

## **1.5 A imunidade inata e a fisiopatologia da malária**

### **1.5.1 Papel de receptores da imunidade inata na malária**

Estruturas microbianas conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) são detectadas por receptores de reconhecimento de PAMPs (PRR, do inglês, *PAMP recognition receptors*)<sup>34</sup>. Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês, *Toll Like Receptors*) detectam PAMPs na membrana dos endossomas ou na superfície celular<sup>35</sup>, enquanto receptores do tipo RIG-I (RLRs, do inglês, *RIG-I Like*



*Receptors*)<sup>36</sup> e do tipo NOD (NLRs, do inglês, *NOD Like Receptors*) são encontrados no citosol<sup>37</sup>. A ativação de PRRs desencadeia vias de sinalizações diferentes, culminando na eliminação do patógeno. No entanto, a ativação excessiva pode ser deletéria, causando inflamação sistêmica<sup>34</sup>. Além disso, padrões moleculares associados a danos teciduais (DAMPs, do inglês, *Damage Associated Molecular Patterns*) que são componentes endógenos liberados por células em situações de estresse, dano ou morte, também são capazes de ativar PRRs e inflamassomas, independente da infecção. Existem evidências que os DAMPs podem também ter um importante papel na inflamação sistêmica e patogênese da malária<sup>37,38</sup>.

A inflamação sistêmica é um evento central nas diversas síndromes associadas à malária. É causada pela ativação excessiva da imunidade inata e, basicamente induzida por mediadores pró-inflamatórios, principalmente por citocinas pró-inflamatórias<sup>26</sup>. Para isso, compreender os mecanismos pelos quais componentes endógenos (ácido úrico, microvesículas e o grupamento heme)<sup>38,39,40</sup>, assim como do parasito (moléculas GPI, hemozoína e ácidos nucleicos)<sup>36,41,42</sup>, liberados durante a infecção, ativam células da imunidade inata é de grande importância.

As citocinas pró-inflamatórias são produzidas como resultado do reconhecimento direto de elementos do *Plasmodium* por PRRs. Moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI, do inglês, *glycosylphosphatidylinositol*), hemozoína ligada ao DNA e ácidos nucleicos derivados de *Plasmodium* têm sido postuladas como grandes responsáveis pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da malária<sup>41,42</sup>.

Além disso, durante a fase intra-eritrocítica, parasitos digerem a hemoglobina como fonte de aminoácidos, produzindo metabólitos de grande toxicidade. Como

forma de sobrevivência, o *Plasmodium* utiliza enzimas (plasmepsinas) que clivam a hemoglobina em peptídeos menores, aminoácidos, e o heme que é polimerizado, resultando na formação de cristais de hemozoína no vacúolo parasitóforo. Estudos *in vitro* evidenciam que a hemozoína é capaz de ativar monócitos e macrófagos, e estes passam a produzir citocinas pró-inflamatórias tais como  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ . A hemozoína derivada de *P. falciparum* ligada a ácidos nucleicos do parasito é internalizada para o fagolisossomo, onde posteriormente ativa receptores da imunidade inata tanto no endossoma quanto no citoplasma das células. Deste modo, a hemozoína tem sido classificada como um componente chave do parasito na ativação da imunidade inata durante a malária<sup>42</sup>.

Ácidos nucleicos derivados de parasitos inicialmente ligados a hemozoína, também são importantes estimuladores da resposta imune inata. Uma vez que se encontram no fagolisossomo, os motivos estimulatórios CpG do DNA do *Plasmodium* ativam TLR9. A fagocitose de eritrócitos infectados também resulta na ativação de TLR9, como consequência da liberação de DNA por meio da destruição do parasito. Caso o DNA do parasito seja liberado no citosol, após a ruptura do fagolisossomo, causada por cristais de hemozoína, este é capaz de induzir a formação do inflamassoma AIM2 (do inglês, *absent in melanoma 2*), que é responsável pela ativação de caspase-1, clivagem de pró- $\text{IL-1}\beta$  e liberação de  $\text{IL-1}\beta$ . Ademais, o DNA também induz a produção de IFN do tipo I de forma independente de TLRs, através da ativação de cGAS (do inglês, cyclic GMP-AMP synthase)<sup>42,43</sup>.

Por outro lado, o ácido úrico, um produto do metabolismo das purinas, é liberado de células mortas em forma de cristais de urato em grandes quantidades durante a malária. São internalizados por fagolisossomos onde contribuem para a ativação de NLRP3 e a resposta inflamatória durante a malária. Microvesículas com

efeitos modulatórios também se formam durante a infecção com o *Plasmodium* ativando TLR4<sup>38,39</sup>. Ademais, o grupamento heme promove a inflamação ativando células endoteliais induzindo a expressão de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade vascular o que permite o infiltrado de leucócitos<sup>40</sup>.

### 1.5.2 Modelo murino da malária cerebral

Como descrito na sessão anterior, a inflamação sistêmica é um importante componente da patogênese da malária. Para tal, o modelo murino tem sido de grande valia para o melhor entendimento dos estudos mecanísticos sobre o papel da imunidade inata na indução desta inflamação sistêmica e patogênese da malária. Existem três espécies principais que infectam naturalmente roedores e são utilizadas nestes modelos: *P. yoelii*, *P. chabaudi* e *P. berghei*.

A infecção com *P. yoelii* 17XL (cepa letal), *P. yoelii* 17XNL (cepa não-letal) assim como o *P. chabaudi* (cepa não letal) são utilizadas para a avaliação de vacinas experimentais e processos imunológicos que controlam a parasitemia. Já a infecção com o *P. berghei* ANKA (*PbA*) é um bom modelo para se estudar a malária cerebral. Consiste em uma síndrome neurológica, ocorrendo de seis a 12 dias após a infecção, com mortalidade de cerca de 90%. A parasitemia no momento da morte é relativamente baixa. As manifestações neurológicas incluem pêlo arrepiado, postura arqueada, desequilíbrio, paralisia dos membros, convulsões e coma. Os 10% dos animais que sobrevivem a malária cerebral experimental (MCE), morrem nas próximas três a quatro semanas, com anemia grave e parasitemia elevada, sem sinais neurológicos<sup>54</sup>.

Diferente estudos indicam que a ativação de TLRs está envolvida na patogenia da MCE. Animais MyD88<sup>-/-</sup> são mais resistentes a infecção por *P. berghei*

ANKA quando comparado com animais WT. A resistência destes animais foi associada a uma menor produção de IL-12 no soro. Com isso, a injúria hepática, característica da doença, não foi observada devido a uma deficiência na resposta do tipo Th1. Além disso, animais IL-12<sup>-/-</sup> também se mostraram resistentes à MCE na infecção por *PbA*<sup>55,56</sup>.

Os TLRs ensossomais também são de grande importância no desenvolvimento da MCE. Animais infectados com *PbA* e tratados com o composto E6446 (antagonista de TLR7/9), produziram níveis de citocinas pro-inflamatórias significativamente menores que animais tratados com veículo. Os animais tratados com o composto não apresentaram sintomas neurológicos tampouco lesões cerebrais, mostrando-se resistentes<sup>57</sup>. Estudos demonstram que a hemozoína natural é capaz de ativar monócitos e macrófagos murinos, induzindo também a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  via TLR9. A hemozoína sintética associada a oligonucleotídeos contendo motivos CpG não metilados também ativa TLR9 em células dendríticas (DCs, do inglês, *dendritic cells*) e macrófagos de camundongos e induz a formação do inflamassoma NLRP3 e AIM2, resultando na liberação de IL-1 $\beta$  por macrófagos<sup>42,43</sup>.

Consistente com dados em humanos, DNA derivado do parasito no citosol de células do hospedeiro, é capaz de induzir a formação do inflamassoma AIM2, em consequência da ativação de TLRs, e a produção de IFN do tipo I via ativação de cGAS e do adaptador STING (do inglês, *stimulator of interferon genes*). Ainda, o RNA derivado de *PbA* pode ativar receptores das células do hospedeiro. A invasão de hepatócitos por esporozoítos induz a produção de IFN do tipo I via *MDA5* (do inglês, *melanoma differentiation-associated protein 5*) através de *MAVS* (do inglês, *mitochondrial antiviral-signaling protein*) e fatores de transcrição como *IRF3* (do

inglês, *interferon regulatory factor 3*) e *IRF7* (do inglês, *interferon regulatory factor 7*). Esses estudos sugerem que os receptores citosólicos e a produção de IFN do tipo I possuem um papel importante no controle do crescimento da forma hepática do parasito<sup>58,59</sup>.

Durante a malária, a fagocitose de eritrócitos infectados ocorre principalmente na polpa vermelha e na zona marginal do baço. Nestes locais, observa-se populações heterogêneas de células fagocíticas, formada por macrófagos e DCs. Os eritrócitos infectados ou merozoítos são fagocitados de forma precoce logo após a infecção. Este processo auxilia no controle de parasitos no sangue e na indução das respostas imunes que são observadas na fase aguda da infecção. O aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias é um resultado da ativação direta de fagócitos que tem papel central nos processos patológicos<sup>30,60</sup>.

Estas populações tem um papel crítico no controle das infecções, identificando a presença de microrganismos invasores e iniciando respostas imunes protetoras. Contudo, as subpopulações de células têm funções sobrepostas. DCs são eficientes células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês, *antigen presenting cells*) para células T, ao passo que os macrófagos atuam principalmente como fonte de citocinas pró-inflamatórias e células fagocíticas que destroem com eficácia os agentes patogênicos. Monócitos (MOs) são células menos especializadas que contribuem, de um modo geral, para a produção de citocinas inflamatórias, mediadores pró inflamatórios, anti-microbianos e são os principais progenitores para DCs e macrófagos<sup>61,62</sup>.

DCs, monócitos e macrófagos tem um papel de grande importância na resistência do hospedeiro durante a infecção por *Plasmodium*, no modelo murino. Durante a malária, DCs mielóides são ativadas através de TLRs, principalmente

TLR9, servindo como fonte importante de IL-12. Com isso, a IL-12 ativa células NK que produzem  $\text{IFN}\gamma$ , promovendo a diferenciação de linfócitos Th1, responsável pela imunidade protetora, controlando a infecção por *Plasmodium spp*<sup>20,63</sup>.

Em roedores, monócitos inflamatórios ( $\text{CCR2}^+\text{Ly6C}^+\text{F4/80}^+$ ), bem como DCs são importantes fontes de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico que destroem efetivamente células com eritrócitos infectados contendo *Plasmodium* fagocitados. Da mesma forma, DCs também contribuem para a patogênese da malária em roedores. Além disso, DCs também são necessárias para o desenvolvimento de MCE<sup>64,65</sup>.

Um subtipo de células monocíticas  $\text{Ly6C}^+$  tem um papel crítico no recrutamento de células T  $\text{CD8}^+$  para o sistema nervoso central (SNC) resultando no desenvolvimento MCE. Porém, estudos recentes definiram vários marcadores que permitem a distinção de iMOs de DCs derivadas de monócitos (MO-DCs). No entanto, o papel da MO-DCs na neuroinflamação durante MCE não foi explorado. Portanto, na segunda parte desta tese estudamos o papel de MO-DCs no desenvolvimento da inflamação no SNC e MCE.

## 2 JUSTIFICATIVA GERAL

A malária representa um dos principais problemas de saúde pública no mundo em desenvolvimento, tanto em termos de morbidade como de mortalidade. O acúmulo de conhecimento na área leva um consenso de que uma resposta exacerbada do sistema imune inato tem um importante papel na patogênese da malária. Acredita-se que a ativação de células do sistema imune e consequentemente a inflamação sistêmica é a base das manifestações clínicas graves da malária. A inflamação sistêmica e a febre durante a fase aguda da malária

é uma consequência da produção de citocinas por fagócitos ativados através de TLRs, NLRs e receptores citosólicos que reconhecem ácidos nucleicos deste protozoário. Com isso, é importante investigar o mecanismo pelo qual o DNA e o RNA do parasito se tornam acessíveis a receptores presentes nos endossomas e citoplasma e ativam os fagócitos durante a malária. Além disso, tendo em vista a importância de fagócitos durante a infecção pelo *Plasmodium*, torna-se importante caracterizar e identificar o mecanismo pelo qual estas células promovem a inflamação e letalidade durante a malária.

Acreditamos que os estudos realizados durante esta tese, proporcionarão novos conhecimentos acerca dos mecanismos responsáveis pela patogênese e neuroinflamação causada pela infecção com o *Plasmodium*, abrindo portas para novas intervenções terapêuticas na malária.

## **3 OBJETIVOS**



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Malária**

##### **3.1.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade pró-inflamatória de ICs na ativação de receptores da imunidade inata durante a malária.

##### **3.1.2 Objetivos específicos**

Determinar se ICs são fatores imunoestimulatórios via receptores de DNA/RNA, como TLRs, NLRs e outros receptores citosólicos.

Determinar a resposta celular à ICs, bem como as principais fontes celulares de citocinas em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de indivíduos saudáveis ou com malária.

Avaliar a importância de ICs e diferentes receptores Fc $\gamma$  (CD64, CD16, CD32) na ativação de células de indivíduos saudáveis e pacientes com malária.

Avaliar o impacto dos ICs na formação dos inflamassomos em células derivadas CMSPs de pacientes com malária.

#### **3.2 Modelo murino da malária cerebral**

##### **3.2.1 Objetivo geral**

Investigar o papel de MO-DCs no desenvolvimento da MCE.

##### **3.2.2 Objetivos específicos**

Caracterizar células MO-DCs quanto ao fenótipo, propriedades morfológicas e expressão gênica durante a infecção com *PbA*.

Determinar a expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas em células MO-DCs durante a infecção por *PbA*.

Avaliar a migração de células MO-DCs no SNC na infecção por *PbA*.

## **4 METODOLOGIA**

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Malária**

#### **4.1.1 Paciente**

##### **4.1.1.1 Características e procedência da amostra**

Este estudo foi conduzido no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte (MG) e Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), Porto Velho (RO). Foram estudadas amostras de sangue colhidas de indivíduos residentes em Porto Velho (RO), região endêmica de malária.

##### **4.1.1.2 Aspectos éticos da pesquisa**

Os estudos envolvendo pacientes infectados e doadores saudáveis foram aprovados pelo Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) – Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqRR 2004), Comitê de Ética Nacional do Ministério da Saúde (CONEP, número do protocolo 15652), Comitê Ético em Experimentos com Humanos do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEP-CEPEM 095/2009) e também pelo Conselho de Pesquisa Institucional da Universidade de Massachusetts (IRB-UMMS 10268).

##### **4.1.1.3 Indivíduos da pesquisa**

Os critérios de inclusão para pacientes com malária aguda foram: positividade para *P. vivax* ou *P. falciparum* em esfregaços sanguíneos e presença de sintomas clínicos da doença como febre, calafrio, cefaleia, mialgia, náusea e vômito. Foram incluídos indivíduos com idade entre 18 a 60 anos.

Como critério de exclusão, adotou-se: coinfeções, tratamento utilizando anti maláricos dentro de 60 dias, utilização de medicamentos imunossupressores, recusar

o acompanhamento, mulheres grávidas, necessidade de internação e apresentar doenças crônicas ou autoimunes. No tratamento antimalárico para pacientes infectados por *P. vivax* foi utilizado cloroquina (150 mg) associado a primaquina (15 mg) por sete dias. Já o tratamento para pacientes infectados com *P. falciparum* foi utilizado artemether (20 mg) associado a lumefantrina (120 mg) e primaquina (45 mg) por três dias. Pacientes que aceitaram participar do estudo doaram 100 mL de sangue total, que foram coletados em tubos sem anticoagulantes, heparinizados ou EDTA, antes e após 30-45 dias de tratamento quimioterápico. O mesmo procedimento de coleta foi adotado para doadores saudáveis da região endêmica e fora da região endêmica. O sangue foi usado como fonte de células mononucleares de sangue periférico (CMSPs), plasma e soro.

#### **4.1.1.2 Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes**

No presente estudo foram incluídos 80 pacientes infectados com *P. vivax*, 32 pacientes infectados com *P. falciparum* e 30 doadores saudáveis. Os quadros três e quatro apresentam a distribuição do número de indivíduos por sexo, idade, episódios de malária, parasitemia, sintomas clínicos e parâmetros hematológicos de pacientes infectados com *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente.

Quadro 1. Sintomas clínicos e parâmetros laboratoriais de pacientes infectados com *P. vivax*

Paciente	Diagnóstico	Parasitemia	Temperatura (°C)	Episódios de Malária	Sintomas											
					Calafrio	Cefaléia	Mialgia	Náusea	Leucócitos x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> VR: 5000 a 10000		Hemácias x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> VR: 4.4 a 6		Hemoglobina g/dL VR: 13.4 a 17		Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> VR: 150	
									Antes do Tratamento	Após o Tratamento	Antes do Tratamento	Após o Tratamento	Antes do Tratamento	Após o Tratamento	Antes do Tratamento	Após o Tratamento
1	<i>P. vivax</i>	-	Não	4	Sim	Sim	Sim	Não	3,8	4,1	4,1	4,78	12,2	13,9	75	-
2	<i>P. vivax</i>	(+)	37°C	-	Não	Sim	Não	Não	5,8	7,3	4,05	2,83	12	9,7	190	80
3	<i>P. vivax</i>	(+++)	39,5°C	20	Não	Sim	Sim	Não	3,7	5,6	4,09	4,47	11,2	12,9	106	-
4	<i>P. vivax</i>	-	38°C	3	Sim	Sim	Sim	Não	5,4	3,8	4,78	4,73	13,9	14,4	130	-
5	<i>P. vivax</i>	-	37°C	6	Não	Não	Sim	Não	5,9	5,3	4,99	5,17	13,7	14,7	91	-
6	<i>P. vivax</i>	(++)	36,2°C	10 a 12	Sim	Sim	Sim	Sim	4,3	4,7	4,42	4,45	12,7	13,3	63	63
7	<i>P. vivax</i>	(++)	-	2	Sim	Sim	Sim	Sim	4,8	9,8	5,02	4,88	13,8	14,5	40	-
8	<i>P. vivax</i>	(++)	37°C	0	Sim	Sim	Sim	Sim	3,7	6,5	4,67	4,6	11,8	12,9	78	-
9	<i>P. vivax</i>	(++)	37°C	10	Sim	Sim	Sim	Sim	5,5	7,3	3,56	4,51	10,1	12,6	-	237
10	<i>P. vivax</i>	(+)	38°C	8	Não	Sim	Não	Sim	4,1	7,3	4,55	5,07	13,9	15,5	207	277
11	<i>P. vivax</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	6,6	4,81	5,2	13	15,3	-	180
12	<i>P. vivax</i>	(++)	38,5°C	2	Sim	Sim	Sim	Não	3,1	6,6	4,21	5,2	12	15,3	-	180
13	<i>P. vivax</i>	(++)	36°C	6	Sim	Sim	Sim	Não	7,2	8	5,61	5,36	14	13,5	-	211
14	<i>P. vivax</i>	(1/2)	37°C	0	-	Sim	Sim	Não	3,1	5,4	4,93	5,16	13,9	14,6	-	267
15	<i>P. vivax</i>	(+++)	38°C	5	Não	Sim	Sim	Não	6,5	5,7	5,26	4,6	12,6	12,2	104	220
16	<i>P. vivax</i>	(1/2)	37,5°C	30	Sim	Sim	Sim	Não	8,2	-	4,99	-	14,8	-	-	-
17	<i>P. vivax</i>	(++)	37°C	20	Sim	Não	Sim	Não	3,6	5,6	4,86	4,93	13,5	14,9	97	180
18	<i>P. vivax</i>	(++)	37°C	11	Sim	Sim	Sim	Sim	4,6	5,6	5,04	4,98	15	13,9	108	182
19	<i>P. vivax</i>	-	37°C	3	Não	Não	Não	Não	7,1	8,8	5,05	5,56	13,8	15,6	57	321
20	<i>P. vivax</i>	(+)	38,2°C	1	Sim	Sim	Sim	Sim	6,5	8,1	4,43	4,81	12,5	14,3	88	200
21	<i>P. vivax</i>	(+)	38,9°C	8	Sim	Sim	Não	Não	5	5,3	5,61	5,3	13,8	14,1	91	190
22	<i>P. vivax</i>	(+)	36°C	1	Sim	Sim	Sim	Sim	5	5,9	4,5	4,78	14	14,4	129	200
23	<i>P. vivax</i>	(+)	37,6°C	1	Sim	Sim	Sim	Não	4,2	-	4,88	-	15,5	-	89	-
24	<i>P. vivax</i>	(++)	36°C	5	Sim	Sim	Sim	Sim	6,8	6,4	4,88	5,35	13,1	14,2	138	305
25	<i>P. vivax</i>	(+)	37,4°C	mais de 10	Sim	Sim	Sim	Sim	4,6	4	4,66	4,71	14,2	13,7	96	188
26	<i>P. vivax</i>	(++)	37°C	5	Sim	Não	Sim	Sim	6,1	5	4,7	4,82	14,2	14	112	121
27	<i>P. vivax</i>	(+++)	39°C	0	Sim	Sim	Sim	Sim	9,5	6,1	4,4	5,28	12,1	14,8	94	135
28	<i>P. vivax</i>	+	37,4°C	6	Sim	Sim	Sim	Sim	7,7	7	4,45	4,53	13,8	13,3	120	171
29	<i>P. vivax</i>	(+++)	-	4	Sim	Sim	Sim	Sim	6,3	-	5,25	-	13,8	-	74	-
30	<i>P. vivax</i>	(++)	41°C	0	Sim	Sim	Sim	Sim	3,3	-	4,16	-	12,4	-	-	-
31	<i>P. vivax</i>	(++)	37,7°C	5	Sim	Não	Sim	Não	4,7	6,5	4,98	5,54	14,4	15,5	41	-
32	<i>P. vivax</i>	(+)	38,7°C	mais de 10	Não	Sim	Sim	Não	7,6	-	4,38	-	12,8	-	150	-
33	<i>P. vivax</i>	(+)	-	mais de 10	Sim	Sim	Sim	Sim	5,1	8	4,31	4,51	13,1	13,6	151	249
34	<i>P. vivax</i>	(+)	38,5°C	3	Não	Não	Sim	Não	6,9	6,9	5,29	5,29	16,1	16,6	107	107
35	<i>P. vivax</i>	(+)	38°C	0	Sim	Sim	Sim	Não	4,8	-	4,83	-	13,2	-	124	-
36	<i>P. vivax</i>	(++)	37°C	2	Não	Sim	Sim	Não	6,9	5,5	4,82	5,14	14,3	15,8	-	189
37	<i>P. vivax</i>	(++)	38,7°C	0	Sim	Sim	Sim	Sim	4	6,9	5,24	5,82	13,6	15,9	52	238
38	<i>P. vivax</i>	(++)	39,5°C	4	Sim	Sim	Sim	Não	5,1	4,9	4,42	5,35	13,3	17,4	-	195
39	<i>P. vivax</i>	(+)	36,5°C	0	Sim	Sim	Sim	Não	2,5	-	4,84	-	13,6	-	30	-
40	<i>P. vivax</i>	(++)	-	2	Sim	Sim	Sim	Não	5,3	6,5	5,36	5,41	14,8	14,4	148	261
41	<i>P. vivax</i>	(+)	36,5°C	10	Sim	Sim	Sim	Sim	5,5	-	5,09	-	13,2	-	53	-
42	<i>P. vivax</i>	(+)	36,6°C	-	Sim	Sim	Sim	Não	2	3,8	3,6	4,63	11,1	14,7	44	101
43	<i>P. vivax</i>	(++)	39,2°C	4	sim	sim	sim	sim	3,4	-	2,62	-	6,7	-	220	-
44	<i>P. vivax</i>	(++)	36,4°C	2	sim	sim	sim	sim	6,6	-	4,25	-	11,7	-	75	-
45	<i>P. vivax</i>	(+)	36,5°C	3	sim	Não	sim	sim	5,2	-	5,36	-	14,1	-	153	-
46	<i>P. vivax</i>	(+++)	37°C	0	Sim	Sim	Sim	Sim	3,3	-	3,93	-	11,8	-	29	-
47	<i>P. vivax</i>	(+++)	35,2°C	1	não	Não	sim	não	5,5	-	4,35	-	13,2	-	112	-
48	<i>P. vivax</i>	-	38,6°C	5	sim	sim	sim	não	4,1	-	4,89	-	14,2	-	179	-
49	<i>P. vivax</i>	(++)	37,2°C	3	sim	sim	sim	sim	4,1	-	5,03	-	14,6	-	132	-
50	<i>P. vivax</i>	(++)	-	3	sim	Sim	Sim	Sim	4,2	-	6,19	-	17,7	-	61	-
51	<i>P. vivax</i>	(++)	-	4	-	sim	sim	Não	-	-	-	-	-	-	-	-
52	<i>P. vivax</i>	(+)	36,7°C	3	sim	sim	sim	sim	6,8	-	4,86	-	14,6	-	235	-
53	<i>P. vivax</i>	(++)	38,1°C	2	Não	Sim	Não	Não	7,8	-	5,5	-	15,9	-	171	-
54	<i>P. vivax</i>	(+)	38,2°C	1	Sim	Sim	Sim	Sim	2,4	-	3,7	-	10,7	-	50	-
55	<i>P. vivax</i>	(1/2)	38,7°C	15	Sim	Sim	Sim	Não	6,8	-	4,7	-	13,2	-	140	-
56	<i>P. vivax</i>	(++)	37,6°C	21	Não	Não	Não	Não	4,2	-	4,37	-	13,3	-	109	-
57	<i>P. vivax</i>	(+)	37,5°C	37	Sim	Não	Não	Não	9,1	-	4,19	-	10,5	-	144	-
58	<i>P. vivax</i>	(+++)	37,5°C	1	Sim	Sim	Sim	Sim	6,2	-	4,33	-	12	-	150	-
59	<i>P. vivax</i>	(+++)	37,6°C	30	Sim	Sim	Sim	Não	6,6	-	5,2	-	11,7	-	164	-
60	<i>P. vivax</i>	-	-	30	Sim	Não	Sim	Sim	5,5	8,7	4,44	4,52	12,9	13,1	113	193
61	<i>P. vivax</i>	-	39,2°C	0	Sim	Sim	Sim	Sim	3,4	4,6	3,69	3,77	10,7	11,6	42	191
62	<i>P. vivax</i>	-	-	10	Sim	Sim	Sim	Sim	5	7,1	3,61	4,68	10,4	14,1	51	159
63	<i>P. vivax</i>	-	38,5°C	2	Sim	Sim	Sim	Sim	6	6	4,44	4,77	13,4	14,5	66	189
64	<i>P. vivax</i>	-	39,8°C	3	Sim	Não	Sim	Não	5,2	5,2	5,27	5,05	13,8	13,3	86	170
65	<i>P. vivax</i>	-	37,2°C	10	Sim	Sim	Sim	Não	5,8	5	4,85	4,5	14,7	13,8	131	125
66	<i>P. vivax</i>	-	-	5	Não	Sim	Sim	Sim	6,1	4,3	4,88	4,54	13,8	13,1	202	179
67	<i>P. vivax</i>	-	-	15	Não	Sim	Sim	Sim	6,6	7,6	5,45	4,9	15,9	14	180	278
68	<i>P. vivax</i>	-	37,2°C	2	Sim	Sim	Sim	Sim	6,6	6,5	4,32	4	13,5	12	171	229
69	<i>P. vivax</i>	-	39°C	5	Sim	Sim	Sim	Sim	8,2	8	5,36	4,4	15,1	12	93	224
70	<i>P. vivax</i>	-	39,7°C	1	Sim	Sim	Sim	Sim	2,9	6,5	3,80	4,4	11	13	98	262
71	<i>P. vivax</i>	(++)	38,8°C	1	sim	sim	sim	sim	8	6,9	4,73	5,4	13,4	14	111	253
72	<i>P. vivax</i>	(++)	36,9°C	7	sim	sim	sim	não	5	8	5	4,96	14	14,10	90	143
73	<i>P. vivax</i>	(+)	37,5°C	4	sim	sim	sim	sim	4	6,8	5,16	5,18	15,1	14,50	186	353
74	<i>P. vivax</i>	(++)	36,1°C	1	não	sim	sim	sim	3	6,2	5,25	5,16	14,3	14,10	135	254
75	<i>P. vivax</i>	(++)	36°C	8	sim	sim	sim	sim	5	6,4	5,66	5,66	14,5	13,9	85	157
76	<i>P. vivax</i>	(+)	36,1°C	1	sim	sim	sim	sim	4	4,4	4,6	4,6	13,1	13,1	119	119
77	<i>P. vivax</i>	(++)	36,2°C	10	não	sim	sim	não	5	7,6	4,7	4,81	13,2	14,4	189	309
78	<i>P. vivax</i>	(+++)	36,4°C	10	sim	sim	não	não	8	-	5	-	13,3	-	150	-
79	<i>P. vivax</i>	(1/2)	35,5°C	1	sim	sim	sim	sim	2	2,3	5,75	5,75	-	16	-	110
80	<i>P. vivax</i>	(++)	37,5°C	0	sim	sim	sim	sim	4	5,2	5,09	4,36	13,2	11,3	154	284

## Quadro 2. Sintomas clínicos e parâmetros laboratoriais de pacientes infectados com *P. falciparum*

Paciente	Diagnóstico	Parasitemia	Temperatura (°C)	Episódios de Malária	Calafrio	Cefaléia	Mialgia	Náusea	Leucócitos x 10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> VR: 5000 a 10000		Hemácias x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> VR: 4.4 a 6		Hemoglobina g/dL VR: 13.4 a 17		Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> VR: 150	
									Antes do Tratamento	Após o Tratamento	Antes do Tratamento	Após o Tratamento	Antes do Tratamento	Após o Tratamento	Antes do Tratamento	Após o Tratamento
									1	<i>P. falciparum</i>	(1/2)	37°C	0	Sim	Sim	Não
2	<i>P. falciparum</i>	+	36°C	1	Não	Não	Não	Não	5.3	5.8	4.28	4.23	13	13	-	166
3	<i>P. falciparum</i>	++	37°C	5	Sim	Sim	Sim	Não	5.8	7	5.49	4.69	15.4	13.9	-	193
4	<i>P. falciparum</i>	-	-	-	-	-	-	-	4.3	6.6	4.59	3.77	13.6	11.3	91	206
5	<i>P. falciparum</i>	+	37°C	0	Sim	Não	Sim	Não	2.6	5.8	5.04	4.77	15.1	14.1	48	201
6	<i>P. falciparum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>P. falciparum</i>	(++)	40°C	11	Sim	Sim	Sim	Não	8	-	4.79	-	14.7	-	182	-
8	<i>P. falciparum</i>	(+)	36.5°C	Mais de 30	Não	Sim	Sim	Não	5.4	7.7	4.08	4.1	11.6	12.3	155	199
9	<i>P. falciparum</i>	(++)	38.5°C	3	Não	Sim	Sim	Não	4.6	-	3.7	4.75	10.3	-	150	-
10	<i>P. falciparum</i>	(++)	36.4°C	10	Sim	Sim	Sim	Sim	5.5	11.2	4.93	4.75	13.8	13.7	173	286
11	<i>P. falciparum</i>	(++)	39°C	0	Sim	Sim	Sim	Sim	5.5	8.1	4.6	4.99	13.7	15.3	60	167
12	<i>P. falciparum</i>	(++)	36.5°C	2	Sim	Sim	Sim	Não	4.2	-	4.9	-	15.3	16.3	151	-
13	<i>P. falciparum</i>	(+)	36.5°C	13	Sim	Sim	Sim	Sim	-	6.4	-	5	-	16.3	-	201
14	<i>P. falciparum</i>	(++)	36.5°C	0	Sim	Sim	Sim	Sim	3.1	-	4.5	-	12.7	-	60	-
15	<i>P. falciparum</i>	-	36.5°C	Mais de 10	Sim	Sim	Sim	Não	5	6.5	4.74	4.67	13	14.3	80	157
16	<i>P. falciparum</i>	-	36.5°C	Mais de 10	Sim	Sim	Sim	Sim	9.6	8.1	5.28	4.97	15	14.9	95	250
17	<i>P. falciparum</i>	(+)	39°C	-	Sim	Sim	Sim	Sim	6.8	9.4	5.35	5.6	15.2	17.3	86	150
18	<i>P. falciparum</i>	(++)	38.5°C	3	Sim	Sim	Sim	Sim	6.3	7.1	4.89	4.64	14.1	13.3	155	206
19	<i>P. falciparum</i>	-	-	10	-	-	-	-	5	7.8	4.4	4.55	13	13.7	113	243
20	<i>P. falciparum</i>	(++)	-	10	-	-	-	-	-	4.5	-	4.83	-	13.3	-	98
21	<i>P. falciparum</i>	(++)	36.4°C	5	Sim	Sim	Sim	Não	4.2	4.6	4.3	5.19	12	16	192	187
22	<i>P. falciparum</i>	(+)	36°C	8	Sim	Sim	Sim	Sim	5.7	9.3	4.63	4.41	13.7	13.3	113	243
23	<i>P. falciparum</i>	(+)	36.4°C	3	Sim	Sim	Sim	Sim	4.7	7.2	4.89	4.6	14.9	14.7	68	201
24	<i>P. falciparum</i>	(+)	36.7°C	1	Sim	Não	Não	Não	4.2	5.9	4.32	4.81	13.3	13.6	152	226
25	<i>P. falciparum</i>	(+)	37.3°C	20	Sim	Sim	Sim	Não	5.9	-	5.17	-	14.1	-	-	-
26	<i>P. falciparum</i>	-	36.5°C	1	Sim	Sim	Sim	Não	5.3	8	4.09	4.66	12.7	14.7	218	184
27	<i>P. falciparum</i>	(+)	39°C	1	Sim	Não	Sim	Não	6.4	4.7	5.1	5.46	14.1	13.5	224	300
28	<i>P. falciparum</i>	(+)	37.4°C	10	Não	Sim	Sim	Não	6.3	6.8	4.81	4.72	13.4	14.7	191	261
29	<i>P. falciparum</i>	(++)	38°C	3	Sim	Sim	Sim	Não	6	6.6	5.06	4.8	14	15.1	214	243
30	<i>P. falciparum</i>	(+)	37.5°C	20	Sim	Sim	Sim	Sim	5.5	7.3	5.32	4.58	15	14.6	150	297
31	<i>P. falciparum</i>	(+)	38.8°C	0	Sim	Sim	Sim	Não	3.3	5.4	5.13	4.74	15.1	14.1	109	170
32	<i>P. falciparum</i>	(+)	-	2	Sim	Sim	Sim	Sim	3.2	-	4.69	-	14	-	150	-

### 4.1.2 Determinação da parasitemia

A determinação da parasitemia foi realizada por meio de gota espessa de sangue corado com Giemsa e a contagem, de acordo com o número de cruzes preconizado pelo Ministério da Saúde<sup>18</sup>.

### 4.1.3 Quantificação de imunocomplexos (ICs)

Os ICs foram quantificados em soro de pacientes e doadores saudáveis, utilizando o kit imuno enzimático MicroVue CIC-C1q (Quidel, CA), de acordo com as recomendações do fabricante. Este imunoenensaio enzimático baseia-se

no princípio de que os ICs de amostras irão ligar-se a proteína humana purificada C1q aderida a placa. Primeiramente, cada padrão e controle foi reconstituído com 2 mL de reagente hidratante por 15 minutos e as amostras de soro foram diluídas 1:50 com diluente de amostras do complemento. Foram adicionados 300  $\mu$ L de solução de lavagem em cada poço, revestido com C1q, da placa e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, o líquido foi removido e as amostras, padrões e controles foram adicionados em seus respectivos poços, seguido de uma incubação de uma hora (no intuito de que os ICs possam se ligar ao C1q, formando complexos com os poços do microensaio revestidos com C1q) à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem (fornecida pelo kit) e 50  $\mu$ L do conjugado ICs-C1q (anti-IgG humana conjugada a peroxidase HRP) foram adicionados, seguido de uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. O ciclo de lavagem foi repetido e adicionados 100  $\mu$ L de solução de substrato. O anticorpo conjugado a HRP reagiu com o substrato cromogênico formando uma cor verde. A placa foi incubada por 30 minutos e após este período, a reação foi parada com 50  $\mu$ L de solução de paragem. A leitura da densidade ótica foi feita a 405 nm em leitor de ELISA EIA Multi-Well Reader. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Os resultados foram obtidos por meio da curva padrão e expressos como equivalentes de gamaglobulina humana termicamente agregada por mL ( $\mu$ g Eq/mL).



#### 4.1.4 ELISA para anticorpos anti-DNA

Placas de 96 poços Corning Inc. (NY, NY) foram sensibilizadas *overnight* a 37°C com 100 µg/mL de DNA bovino, 25 µL/poço Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), previamente filtrado, utilizando filtros 0,45 µM Milipore (Alemanha) para remover fita simples de DNA. As placas foram bloqueadas com soro bovino fetal 3%, diluído em PBS (50 µl/poço), seguido pela incubação de 25 µl/poço de amostras (diluídas 1:50 para DNA de fita dupla e 1:100 para DNA de fita simples). Anticorpos anti-DNA fita dupla IgG<sup>+</sup> e IgM<sup>+</sup> foram detectados usando fosfatase alcalina e anticorpos marcados com anti-IgG ou anti- IgM humano respectivamente (diluição 1:1000), Southern Biotechnology (Birmingham, AL). As placas foram lavadas com PBS-tween 0,05% entre incubações. Foram adicionados 50 µl/poço de substrato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e a leitura foi feita em 405 nm, usando o leitor de placa Victor (Perkin Elmer, Waltham, MA). Todas as incubações foram feitas a 37°C, por uma hora e 30 minutos. Para a determinação de anticorpos anti-DNA de fita simples, placas foram sensibilizadas com 25 µg/mL de DNA de fita simples.

#### 4.1.5 ELISA para antígeno específico

Os níveis de IgG e IgM antígeno específico foram determinados por ELISA. Placas NUNC<sup>®</sup> Maxisorp foram sensibilizadas *overnight* a 37°C com antígeno específico AMA-1 (do inglês, *Apical Merozoite Antigen-1*) 1 µg/mL em PBS. Após incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem PBS-Tween 0.01% (PBS-T) e bloqueadas com leite desnatado (Molico, lote: 5087046031 0754) a 5% em PBS-T por uma hora a 37°C. Após ciclos de cinco lavagens com PBS-T, as amostras de plasma foram diluídas em leite 3% (1:50 IgG e 1:30 IgM), adicionadas em duplicata aos poços e incubadas por uma hora a 37°C. Um novo ciclo de

lavagens foi realizado, adicionando-se o conjugado biotinilado anti-IgG ou anti-IgM humano diluído em leite desnatado 3%. Após incubação por uma hora a 37°C, as placas foram lavadas e adicionou-se streptavidina diluída 3 mil vezes e, após mais uma incubação de uma hora, 100 µL da solução cromogênica (TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pronta para o uso. A reação enzimática foi interrompida após 20 minutos com a adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a leitura foi realizada em leitor de ELISA EIA Multi-Well Reader a 450 nm.

#### **4.1.6 Purificação de ICs**

ICs foram purificados de plasma de indivíduos por meio do kit de proteína A (Affi-Gel MAPS II). Todos os procedimentos foram feitos na capela de fluxo laminar, em temperatura ambiente. As amostras de plasma foram descongeladas (1 mL), homogeneizadas e diluídas 1:1, usando um tampão filtrado de ligação pH= 9,0 (fornecido pelo kit Affi-Gel MAPS II). Numa coluna (Econo-Column chromatography – 1 x 10 cm) foi inserido 1 mL de proteína A agarose Affi-Gel e equilibrada com cinco volumes de tampão de ligação. A amostra diluída foi aplicada na coluna e lavada duas vezes com 15 volumes de tampão de ligação. IgGs foram eluídas com cinco volumes de tampão de eluição pH= 3,0 (fornecido pelo kit) e rapidamente neutralizadas com 1 M trizma base pH= 9,0. A quantificação da proteína foi feita através de espectrofotometria. A concentração foi determinada levando-se em conta que 1 mg/mL produz absorvância a 280 nm.

#### **4.1.7 Extração de DNA**

O DNA circulante de plasma ou de ICs foi extraído utilizando o kit *QIAmp circulating Nucleic Acid*, como descrito pelo fabricante (QIAGEN, Alemanha). Em

cada tubo falcon (Corning Inc, NY, NY) foram adicionados 800  $\mu$ L de Buffer ACL e 100  $\mu$ L de proteinase K do kit. Após homogeneização por 30 segundos em vortex, as amostras foram incubadas em banho maria a 60°C, durante 30 minutos. Após esse período, adicionaram-se a cada tubo 1,8 mL de Buffer ACB (fornecido pela QIAgen, Holanda), seguido de uma homogeneização e incubação por cinco minutos no gelo. A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna QIAamp DNA e passada por meio de vácuo. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um novo tubo. Foram adicionados 600  $\mu$ L de Buffer ACW ao dispositivo com a coluna, que foram passados a vácuo novamente. O procedimento foi repetido com 750  $\mu$ L de Buffer ACW 2. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de etanol absoluto (Milipore, Alemanha) e o procedimento foi realizado pela última vez. A coluna foi centrifugada a 20.000 g por três minutos para que o excesso de etanol fosse retirado. Posteriormente, a coluna foi colocada no termobloco (Eppendorff, Alemanha) a 56° C por 10 minutos. O DNA extraído da coluna foi eluído pela adição de 80  $\mu$ L de Buffer AE (fornecido pelo fabricante) em uma centrifugação de 20.000 g por um minuto. A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). As leituras a 260 nm e 280 nm, respectivamente, serviram como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do ácido nucléico com proteínas. Os valores considerados satisfatórios foram aqueles entre 1,8 a 2,0. As amostras foram armazenadas a -20°C.

#### **4.1.8 PCR em Tempo Real**

Foram utilizados os oligonucleotídeos para CCND humano de sequências do gene CYCLIND1 e oligonucleotídeos para *P. vivax* e *P. falciparum* espécie

específica de sequência do gene SSUrRNA (18S do rRNA). Os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR estão presentes no **quadro 3**. As reações de PCR foram realizadas em triplicata, incluindo controles negativos, em placas de 96 poços usando o reagente *SYBR-Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA USA), equipamento 7500 *rfl* e analisadas no *software* 7500 v2.0.5. 1  $\mu$ L de DNA foi adicionado à mistura de PCR contendo 0,15  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo (100  $\mu$ M) CCND ou *P. vivax* e 10  $\mu$ L *Sybr green PCR Core Reagents* (Applied Biosystems). O volume foi completado para 20  $\mu$ L com água destilada estéril. Foi realizada uma desnaturação inicial a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos (95° C por 15 segundos, 60° C por 60 segundos) e uma extensão final a 60° C por um minuto. Uma curva padrão foi construída por meio de diluições entre 10<sup>1</sup> to 10<sup>7</sup> em triplicata.

**Quadro 3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes CCND humano e ribossomal do *Plasmodium* espécie específica**

Oligonucleotídeos	Foward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
CCND	GCTCCTGGTGAACAAGCTCAA	TTGGAGAGGAAGTGTTCAATGAAA
<i>P. vivax</i>	ACGATCAGATACCGTCGTCGTAAT	CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA
<i>P. falciparum</i>	TTAAACTGGTTTGAACCAAATATAT T	ACACAATGAACTTATGACTACCCGTC

#### 4.1.9 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) e preparação de monócitos humanos

Cerca de 100 mL de sangue heparinizado de pacientes ou doadores saudáveis foi coletado em tubos de coleta a vácuo e heparinizados. O material foi diluído 1:1 em solução salina (PBS). A seguir, 15 mL de Ficoll-Paque (densidade 1,078 g/mL) (GE-Healthcare) foram depositados no fundo do tubo (Falcon), e o

material diluído com PBS (15 mL) foi lentamente sobreposto acima do Ficoll-Paque. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 800 x g, à temperatura ambiente. A interface de células mononucleares foi obtida, lavada duas vezes com meio RPMI (Gibco, CA) completo, contendo penicilina (100 UI/mL), streptomicina (100 µg/mL) e 10% soro fetal bovino Gibco (Carlsbad, CA) por cinco minutos a 1800rpm, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sedimento obtido foi diluído em 1 mL de meio RPMI, as células foram contadas em câmara de Neubauer e adicionadas na concentração de  $3 \times 10^5$  CMSPs por poço, em placas de 96 poços. As culturas de células foram incubadas em estufa (Thermo, MA) a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. As células foram sensibilizadas ou não com IFN $\gamma$  (200 ng/ml) (BD) *overnight* e posteriormente, estimuladas com ICs (15-120 µg) ou LPS (100 ng/mL) por 24 horas. Em alguns experimentos, as células foram tratadas com o composto E6446, antagonista de TLR7/9 (dois e 20 micro molar) ou E5564, antagonista de TLR4 (3 µg/ml) por três horas antes do estímulo com ICs. Células CD14<sup>+</sup> foram purificadas por meio do kit EasySep, seleção negativa para células humanas, de acordo com o protocolo do fabricante Stemcell (Canada), marcadas com anti-CD14 (APC, clone: 61D3, e-Bioscience) (San Diego, CA) e anti-CD16 (PE, clone: 3G8, BD) (Franklin Lakes, NJ) e a pureza foi verificada por citometria de fluxo Fortessa (BD) e analisadas com o *software* FlowJo versão 10.0.8.

#### **4.1.10 Detecção de citocinas**

Os níveis de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 humano foram avaliados em sobrenadantes de CMSPs, após 24 horas de estímulo com ICs em cultura. Os sobrenadantes foram armazenados a - 20°C até o momento do uso. O kit *cytometric beads array* CBA (BD Becton-Dickinson, cat: 560485) foi usado nesse estudo para a quantificação de

citocinas em uma mesma amostra. Populações de esferas com distintos tamanhos são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina. As esferas foram misturadas para formar o CBA e lidas nos canais FL3 e FL2 do citômetro de fluxo FACScan (BD). As populações de esferas foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as esferas de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "sanduíche". As placas para aquisição foram preparadas com: 25 µL de amostra, 25 µL da mistura de esferas e 14 µL do reagente de detecção PE (*Cytokine PE Detection Reagent /1 vial, 4 mL*). O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. As placas foram homogeneizadas e incubadas por duas horas, em temperatura ambiente, protegido da luz. A seguir, as amostras foram transferidas das placas para tubos de citometria de fluxo. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o *software* FCAP versão 3.0 (BD).

Os níveis de IL-1 $\beta$  também foram determinados por ELISA (R&D System). Placas NUNC<sup>®</sup> Maxisorp foram sensibilizadas *overnight* com anticorpo anti-IL1 $\beta$  (200 ng/mL) diluído em PBS 1% BSA. Após incubação *overnight* em temperatura ambiente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem PBS-Tween 0.01% (PBS-T) e bloqueadas com 200 µL de leite desnatado (Molico, lote: 5087046031 0754) a 5% em PBS-T por duas horas a 37°C. Após um ciclo de quatro lavagens com PBS-T, os sobrenadantes foram adicionados em duplicata aos poços e incubados *overnight* a 4°C. Um novo ciclo de lavagens foi realizado, adicionando-se o conjugado anti-IgG humano diluído à PBS-T. Após incubação por uma hora a 37°C as placas foram lavadas e adicionou-se 100 µL da solução cromogênica

(TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pronta para o uso. A reação enzimática foi interrompida após 15 minutos com a adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a leitura foi realizada em leitor de ELISA EIA Multi-Well Reader a 450 nm.

#### **4.1.11 Western blot para caspase-1**

Para as análises por *Western blot*, foi adicionado 250 µL de inibidor de protease Ripa (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) acrescido do tampão de lise *complete* (Roche, Suíça), conforme o fabricante, ao precipitado contendo  $1 \times 10^6$  de CMSPs estimulados com ICs por 24 horas, a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após 15 minutos no gelo, os lisados foram centrifugados a 13,000 g por 20 minutos a 4°C. Foi adicionado o tampão de amostra (diluído 1:5 em amostra) e aquecidas a 99°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram separados em um gel de acrilamida 15% SDS-PAGE a 100-150v e transferidos para membranas de nitrocelulose a 300 mA por duas horas, com todo o sistema no gelo. Foi adicionado a solução de bloqueio (TBS tween 0,05%) com leite desnatado à 5% e incubado por uma hora em agitação. As membranas foram incubadas com anticorpo primário (anti-caspase-1) diluído em TBS tween 0,05% com leite desnatado à 5% *overnight* a 4°C. Após o período de incubação, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos com PBS tween e o anticorpo secundário diluído em PBS tween 0,05% e leite desnatado à 5% foi adicionado e incubado por uma hora em agitação. Posteriormente a membrana foi reveladas com o anticorpo conjugado com HRP e ECL (Bucks, UK).

#### **4.1.12 Imunofluorescência com microscopia confocal**

Monócitos de doadores saudáveis foram purificados de CMSPs (EasySep kit, seleção negativa) e estimulados com 60 µg de ICs por 24 horas. Como controles

positivos, foram utilizados estímulos com LPS (100 ng/mL) por três horas seguido de hemozoína sintética (150 µg) por quatro horas e meia ou LPS (100 ng/ml) por três horas seguido de nigericina (10 µM) por 30 minutos ou meio como controle negativo. Após o período de estímulo, o sobrenadante foi coletado e as células foram lavadas com PBS. Posteriormente, o paraformaldeído 4% foi adicionado e as células foram fixadas numa incubação de 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com tampão de permeabilização (PBS + 0,3% Triton) por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tampão de incubação (PBS + 3% SBF + 0,1% Triton) foi adicionado e incubado por mais 20 minutos. As células foram lavadas uma vez mais com o tampão de incubação.

As imunofluorescências para os marcadores ASC, NLRP12, NLRP3, NLRC4 e AIM2 foram realizadas em monócitos purificados e preparadas em lâminas. Os anticorpos e suas especificações estão mostrados na **quadro 4**.

**Quadro 4. Especificações dos anticorpos utilizados no ensaio de imunofluorescência com microscopia confocal**

<u>Anticorpos</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Especificações/Isotipo</u>	<u>Diluição</u>
<b>ASC</b> (Santa Cruz Biotechnology – SC-22514-R)	N/C	Anti-camundongo IgG	1:350
<b>NLRP3</b> (Abcam – ab4207)	N/C	Anti-camundongo IgG	1:350
<b>NLRP12</b> (Abcam – ab64928)	N/C	Anti-camundongo IgG	1:350
<b>NLRC4</b> (Abcam – ab99860)	N/C	Anti-coelho IgG	1:300
<b>AIM2</b> (Abcam - ab93015)	N/C	Anti-coelho IgG	1:350
<b>Texas Red</b> (Abcam – ab6800)	A/S	Anti-coelho IgG	1:10.000
<b>Texas Red</b> (Abcam – ab6883)	A/S	Anti-cabra IgG	1:10.000
<b>FITC</b> (Abcam – ab7057)	A/S	Anti-camundongo IgG	1:30.000

N/C: Anticorpo monoclonal não conjugado a fluorocromo. A/S: Anticorpo secundário marcado com fluorocromo



As reações de imunofluorescência foram feitas em monócitos purificados e preparados como descrito previamente. Foram adicionados os anticorpos primários, diluídos em PBS, em volume final de 400  $\mu$ L. As células foram incubadas *overnight* a 4°C e protegidas da luz. Foram realizadas três lavagens de 10 minutos em PBS e o anticorpo secundário foi adicionado. Após uma hora de incubação, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS e secagem das lâminas. As lâminas foram montadas com solução de montagem (90% glicerol + 10% Tris HCL 1M) e armazenadas a 4°C, protegidas da luz por no máximo 48 horas, até que fosse realizada a aquisição das imagens. Em lâminas separadas para cada estímulo, foram realizadas incubações somente com anticorpos secundários, para descartar marcações inespecíficas.

As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Bio-Rad MRC 1024 laser scanning confocal) utilizando o programa Lasersharp 3.0, acoplado a um Microscópio Confocal Zeiss LSM 510, com objetiva de imersão em óleo (63X). A luz emitida foi selecionada utilizando filtros 522/35 para FITC e 568 para Texas Red. Para visualizar as imagens de campo claro, utilizamos os filtros para a visualização do fluorocromo conjugado ao anticorpo utilizado.

O processamento e análise das imagens foram realizados utilizando o programa ImageJ *software*. Foram capturados múltiplos campos para cada lâmina, utilizando-se comprimentos de onda específicos para cada fluorocromo. A análise da expressão de cada marcador baseou-se na identificação de cada fluorescência FITC, Texas Red nos monócitos purificados e estimulados. Para todas as amostras foram obtidas imagens de campo escuro e claro.

#### 4.1.13 Detecção de mRNA e análise de expressão gênica por *Nanostring* (*Nanostring Technologies*)

Para o experimento de expressão gênica, foram utilizados monócitos purificados de doadores saudáveis estimulados com 60 µg/mL de ICs por seis horas. As análises de expressão de mRNA foram realizadas através da metodologia do *Nanostring Technologies* que consiste em uma reação não enzimática utilizando códigos de barras de sondas fluorescentes (GEISS et al., 2008). Conjuntos de códigos foram desenhados para detectar genes relacionados a resposta imune. Um total de  $1 \times 10^4$  células foram lisadas com tampão RLT (Qiagen) suplementado com  $\beta$ -Mercaptoetanol, e em seguida congeladas no freezer  $-80^\circ\text{C}$ . Posteriormente, os lisados celulares, de três animais por grupo, foram hibridizados com sondas repórter e de captura por 16 horas a  $65^\circ\text{C}$  e depois foram colocados em uma plataforma onde ocorre a separação magnética das sondas hibridizadas, lavagem para remover excessos de sondas e imobilização destas nos cartuchos. Por fim, a quantificação foi realizada no analisador digital utilizando 600 campos para detecção das sondas hibridizadas.

A análise dos dados gerados foi realizada utilizando um *software* do programa (nSolver). Estas análises consistem na normalização dos controles positivos para detectar pequenas variações entre diferentes *codesets*, seguido de normalização com sete genes constitutivos, inclusos nos *codesets*, para avaliar diferenças entre as amostras. A normalização foi feita com 14 genes constitutivos (*housekeeping genes*). Resultados normalizados foram representados como níveis relativos de mRNA. O aumento foi definido pela relação do número de cópias de animais infectados por não infectados. Os *heatmaps* foram construídos utilizando o programa

Multi Experiment Viewer v 4.8. Diferenças de expressão gênica foram consideradas estatisticamente significativas com  $p < 0,05$  utilizando o teste  $t$  não pareado.

#### **4.1.14 Análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prism (GraphPad 6). Comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste  $t$  *student* pareado ou não. Mann-Whitney teste foi usado para a análise não paramétrica quando os dados não se encaixavam na distribuição Gaussiana. A comparação entre grupos experimentais foi feita utilizando-se o teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*), seguida por análise de comparações múltiplas, segundo o método de Tukey.

## **4.2 No modelo murino da malária cerebral**

### **4.2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas, com idade entre oito a 12 semanas, pesando de 20 a 28 g. Animais C57BL/6 foram fornecidos pelo biotério da Universidade Federal de Minas Gerais e pelos laboratórios *Jackson*. Animais REX3 e REX3 IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> foram desenvolvidos pelo Dr. Andrew D. Luster no *Massachusetts General Hospital*. Camundongos *Great* (IFN $\gamma$  GFP-reporter), CCR2<sup>-/-</sup>, CCR5<sup>-/-</sup> e IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram comprados dos laboratórios *Jackson* e mantidos no biotério da Fiocruz. Durante todos os procedimentos, os animais foram acondicionados em microisoladores coletivos autoclavados, contendo no máximo cinco animais por microisolador, à temperatura constante de 22°C, com suprimentos de água e alimento, alojados na Fundação Oswaldo Cruz ou *Massachusetts General Hospital*. Todas as práticas utilizadas com animais foram aprovadas pelo *MGH Subcommittee*

on Research and Animal Care and Harvard Committee on Microbiological Safety (IACUC# 2005N000176); e pela Comissão de Ética para Experimentação Animal da Fiocruz (CEUA# LW 15-14).

#### **4.2.2 Infecção**

Os parasitos, conservados em nitrogênio líquido, foram descongelados e mantidos em camundongos C57BL/6 por até 10 passagens. Para infecções experimentais, hemácias infectadas com *PbA* foram coletadas dos animais com tubos heparinizados e  $1 \times 10^5$  hemácias infectadas foram injetadas i.p. em animais *naïve*. Estes animais foram observados diariamente e a parasitemia foi feita por meio de coloração com Giemsa em esfregaços sanguíneos. Sinais e sintomas de malária cerebral foram observados por dois indivíduos usando parâmetros como: arrepio, postura curvada, perda de reflexo, perda de equilíbrio, coma e convulsões. Animais que demonstraram deficiência nos parâmetros ou morreram entre os dias sete e 12 após infecção foram considerados como tendo MCE.

#### **4.2.3 Citometria de Fluxo**

Cérebro de animais foram removidos após perfusão intracardíaca com 30 mL de PBS, macerados e as células passadas por um filtro de 70  $\mu\text{m}$  e centrifugadas em percoll 45% por 30 min a 800 x *g*. O precipitado foi lavado e diluído 1:1 em PBS. Tais células foram contadas em uma câmara de Neubauer e marcadas para a citometria de fluxo. Os baços foram removidos e macerados. As células foram passadas por um filtro de 70  $\mu\text{m}$ , as hemácias foram lisadas com tampão de lise e os esplenócitos foram contados usando a câmara de Neubauer. Para a citometria de fluxo, as células foram marcadas por 20 minutos em temperatura ambiente, com anticorpos

específicos para camundongos: CD11b (PE-Cy7, clone: M1/70, e-Bioscience), F4/80 (PE-Cy5, clone: BM8, e-Bioscience), CD11c (Alexa 700, clone: N418, e-Bioscience), MHC II (PE, clone: AF6-120.1, BD), DC-SIGN (APC e-fluor 660, clone: MMD3, e-Bioscience), Ly6C (e-fluor 450, clone: HK1.4, e-Biosciences), CD8 (APC Cy7, clone: 53-6.7, Biolegend) or (PerCP-Cy 5.5, clone: 53-6.7, e-Bioscience), CD3 (Percep Cy5.5, clone: 145-2C11, e-Bioscience), CD45 (V500, clone: 30-F11, BD), CD62L (PE-Cy7, clone: MEL-14, BD), CD44 (Pacific Blue, clone: IM7, Biolegend) CD4 (APC, clone: RM4-5, Biolegend), CD80 (FITC, clone: 16-10A1, BD), CD86 (FITC, clone: GL1, BD). Em animais REX3, a fluorescência endógena *RFP* (CXCL9) e *BFP* (CXCL10) foram lidas em canais PE e *Pacific Blue* respectivamente. A citometria foi feita por meio do citômetro Fortessa (Becton–Dickinson) e analisada com o *software* FlowJo versão 10.0.8.

**4.2.4 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo.** Sangue (2 mL) de animais controles e infectados com *PbA-GFP* foi coletado em tubos heparinizados. A purificação de hemácias infectadas foi realizada de acordo com o manual do fabricante, utilizando um kit de seleção positiva (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE). Hemácias não infectadas foram utilizadas como controle negativo. A pureza foi determinada pela coloração Giemsa por meio de esfregaços sanguíneos. Esplenócitos totais ( $5 \times 10^5$ ) de animais infectados (sexto dia) e controles foram incubados com hemácias infectadas ( $5 \times 10^5$ ) ou não infectadas ( $5 \times 10^5$ ) por uma hora a 37°C (1:1). As células foram lavadas e marcadas com anticorpos específicos para camundongos CD11b (PE-Cy7, clone: M1/70, e-Bioscience), F4/80 (PE-Cy5, clone: BM8, e-Bioscience), CD11c (Alexa 700, clone: N418, e-Bioscience), MHC II (PE, clone: AF6-120, BD), DC-SIGN (APC e-fluor 660, clone: MMD3, e-Bioscience) e

Ly6C (e-fluor 450, clone: HK1.4, e-Bioscience) por 20 minutos a temperatura ambiente. A citometria de fluxo foi realizada usando o citômetro Fortessa (Becton–Dickinson) e analisada utilizando o *software* FlowJo versão 10.0.8.

#### 4.2.5 Purificação por citometria

Baços de animais infectados C57BL/6 e IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (sete dias após infecção) foram coletados, macerados e os esplenócitos marcados com CD11b (PE-Cy7, clone: M1/70, e-Bioscience), F4/80 (PE-Cy5, clone: BM8, e-Bioscience), CD11c (Alexa 700, clone: N418, e-Bioscience), MHC II (PE, clone: AF6-120.1, BD), DC-SIGN (APC e-fluor 660, clone: N418, e-Bioscience) e submetidos a purificação usando *cell sorting* ARIA (BD). Primeiramente, foi feita uma janela na população FSC-H/FSC-A, a fim de se excluir grumos celulares. Em seguida, uma janela na população duplo positiva para CD11b/F4/80 foi realizada e posteriormente, na população MHCII/DC-SIGN<sup>high</sup>. A separação foi realizada de acordo com as populações selecionadas anteriormente e as células foram coletadas em um novo tubo. As células purificadas foram confirmadas quanto a expressão de CD11c<sup>+</sup> e então congeladas em alíquotas de 10 mil células para análise de expressão gênica usando a tecnologia *Nanostring* ou submetido a citospin para análise morfológica ou preparadas para microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

Após a purificação celular por citometria, MO-DCs foram fixadas em tampão 2.5% glutaldeído, 0.1 M, pH= 7.2, por seis horas, a 8°C. As células foram lavadas com a mesma solução e fixadas numa mistura de 1% tetróxido de ósmio e 1.5% (p/v) ferrocianeto de potássio, desidratadas gradualmente em etanol e embebecidas

em Araldite 502. Os cortes foram corados com 2% acetato de uranila e citrato e a análise foi realizada usando um microscópio eletrônico de varredura. (DSM 960 A).

#### 4.2.7 Confocal

Baços foram coletados em tampão PLP (0.05 M tampão fosfato contendo 0.2 M L-lisina (pH= 7.4), 2 mg/mL NaIO<sub>4</sub> 10 mg/mL paraformaldeído), fixado por cinco a 12 horas e desidratado em 30% sacarose e posteriormente embebido em OCT meio de congelamento (Sakura Finetech). Cortes de 10 µm de tecido congelado foi feito em criostato (CM3050S, Leica). Estes cortes foram secos por duas horas, fixados com acetona por 10 minutos, reidratados, fixados com solução de cálcio-formaldeído e lavados com PBS. Em seguida, os cortes foram bloqueados com PBS contendo *American Hamster* ou Rat gamma globulina (100 µg/mL), marcados com F4/80 (APC, clone: BM8, e-Bioscience) ou CD11c (APC, clone: N418, e-Bioscience) e embebidos em solução fixadora que evita foto degradação. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal LSM510 (Carl Zeiss Microimaging).

#### 4.2.8 Migração de DCs enriquecidas

Esplenócitos CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> de animais controles e infectados (seis dias após infecção) foram purificados usando o kit de seleção positiva de acordo com o protocolo do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE). As células foram marcadas com anti-CD11b (PE-Cy7, clone: M1/70, e-Bioscience) e anti-CD11c (Alexa 700, clone: N418, e-Bioscience), e a pureza avaliada por citometria de fluxo. Células CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> foram resuspendidas 1x10<sup>5</sup> células/mL em meio RPMI completo (10% SBF). Para avaliar a capacidade migratória de MO-DCs, foi utilizado uma placa *transwell* de 12 poços (Corning, Amboise, FR) com membrana contendo

poros de 5  $\mu\text{m}$  que evita a difusão passiva, contudo permite a migração ativa de DCs. Para cada condição testada, câmaras inferiores do *transwell* foram preenchidas com 600  $\mu\text{L}$  ou mais 0.1, 1 ou 10 ng/mL de CCL2 (Biolegend) ou/e CCL5 (e-Bioscience). As DCs ( $1 \times 10^5$  em 100 $\mu\text{L}$ ) foram depositadas na câmara superior do *transwell* e a placa foi incubada por três horas a 37°C. As DCs que migraram foram coletadas da câmara inferior e contadas por meio de uma câmara de Neubauer. A contagem foi realizada duas vezes para avaliar a confiabilidade do método. Não foi encontrada variação acima de 10% entre as duas contagens.

#### **4.2.9 Detecção de citocina**

Os níveis de IFN $\gamma$  foram avaliados em soro de animais controle e infectados, em determinados dias após a infecção. Os soros foram armazenados a -20°C até o momento do uso. O kit *Cytometric Beads Array* (CBA) (BD) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas em uma mesma amostra, como descrito anteriormente. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o *software* FCAP versão 3.0 (BD).

#### **4.2.10 Extração de RNA**

Baço e cérebro de animais controle e infectado foram removidos após perfusão intracardíaca com 50 mL de PBS estéril. Foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (mantido a 4°C) aos tecidos e, com auxílio de um macerador de tecidos, homogeneizou-se durante um min. Logo após, as amostras foram mantidas por cinco minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (1:5 v/v clorofórmio; Trizol), homogeneizou-se por 15 segundos em equipamento tipo vortex



e as amostras foram incubadas por três minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 2 mL (o RNA total encontra-se exclusivamente nessa fase). Para a precipitação do RNA foram adicionados 500 µL de isopropanol (mantido a -20°C) (1:2 v/v, isopropanol e Trizol utilizado no início). Os tubos foram agitados cuidadosamente, por inversão, durante dois minutos e mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e o RNA precipitado, até então invisível, formou um sedimento gelatinoso no fundo do tubo (precipitado). O sobrenadante foi descartado e esse precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (1:1 v/v, etanol 75% e Trizol utilizado no início). As amostras foram centrifugadas a 7.500 g por cinco minutos a 4°C e o sobrenadante foi imediatamente descartado. O precipitado foi seco por cerca de 10 minutos a temperatura ambiente e depois eluído em 25 µL de água estéril. O RNA isolado foi quantificado e, depois, estocado em -80°C.

#### **4.2.11 Síntese do DNA complementar**

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de RNA total. Primeiramente, 1 µg RNA total foi incubado com 2 µL de oligonucleotídeo num volume final de 19,25 µL completado com água livre de DNase e RNase, a 70°C por oito minutos. A proporção de reagentes utilizada para a transcrição reversa foi: 5 µL de tampão RT 10X, 11 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL d’NTP Mix (100 mM), 1,25 µL de transcriptase reversa Multiscribe RT (Applied Biosystems) e 12,5 µL de água livre de DNase e RNase, totalizando um volume final de 30,75 µL. A reação foi feita sob as seguintes condições de ciclagem: incubação dos reagentes por 10 minutos a 25°C,

aquecimento a 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C. A eficiência da reação de transcrição reversa foi considerada igual para todas as amostras. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR em tempo real.

#### 4.2.12 PCR em Tempo Real

Foram utilizados os oligonucleotídeos para CXCL9, CXCL10, IFN $\gamma$ , CD8, CCL2, CCL5,  $\beta$ 2 microglobulina e GAPDH. Os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR estão presentes no **quadro 5**. As reações de PCR foram realizadas em triplicata, incluindo controles negativos, em placas de 96 poços usando o reagente *SYBR-Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA USA), equipamento *Realplex2 mastercycler* (Eppendorf). Dois  $\mu$ L de cDNA foi adicionado à mistura de PCR contendo 1  $\mu$ L da mistura de cada oligonucleotídeo e 13  $\mu$ L *Sybr green PCR Core Reagents* (Applied Biosystems). O volume foi completado para 25  $\mu$ L com água destilada estéril. Foi realizada uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos (95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos) e uma extensão final a 60°C por um minuto. Todas as amostras foram normalizadas usando  $\beta$ 2-microglobulina ou GAPDH.

**Quadro 5. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4, IFN $\gamma$ , CD8, CCL2, CCL5,  $\beta$ 2-microglobulina e GAPDH**

Oligonucleotídeos	Foward (5' $\rightarrow$ 3')	Reverse (5' $\rightarrow$ 3')
CXCL9	AATGCACGATGCTCCTGCA	AGGTCTTTGAGGGATTTGTAGTGG
CXCL10	GCCGTCATTTTCTGCCTCA	CGTCCTTGCGAGAGGGATC
CCL3	CCAAGTCTTCTCAGCGCCAT	TCCGGCTGTAGGAGAAGCAG
CCL4	TCTTGCTCGTGGCTGCCT	GGGAGGGTCAGAGCCCA
IFN $\gamma$	AACGCTACACACTGCATCTTGG	GCCGTGGCAGTAACAGCC
CD8	GACGAAGCTGACTGTGGTTGA	GCAGGCTGAGGGTGGTAAG
CCL2	TGGCTCAGCCAGATGCAGT	TTGGGATCATCTTGCTGGTG
CCL5	CAAGTGCTCCAATCTTGCAATC	TTCTCTGGGTTGGCACACAC
$\beta$ 2-microglobulina	CCGAACATACTGAACTGCTACGTAA	CCCCTTCTCAGCATTGGA
GAPDH	GTGGTGAAGCAGGCATCTGA	GGGAGTCACTGTTGAAGTCGC

#### 4.2.13 Detecção de mRNA e análise de expressão gênica por *Nanostring* (*Nanostring Technologies*)

Para o experimento de expressão gênica, foram utilizados MO-DCs purificados de animais C57BL/6 e IFN $\gamma$ <sup>-</sup> infectados com *PbA*. As análises de expressão de mRNA foram realizadas através da metodologia do *Nanostring Technologies*, como descrito anteriormente. Os *heatmaps* foram construídos utilizando o programa Multi Experiment Viewer versão 4.8. Diferenças de expressão gênica foram consideradas estatisticamente significativas com  $p < 0,05$  utilizando o teste *t Student* não pareado.

#### 4.2.14 Droga e tratamento

O composto E6446 (antagonista de TLR7/9 - *Eisai Pharmaceuticals*) foi dissolvido em água e os animais foram tratados com 120 mg/Kg/dia começando do dia anterior a infecção até o terceiro dia após a infecção, administrando 100  $\mu$ L por meio de gavagem diariamente. Animais tratados como veículo (água) foram

utilizados como controle.

#### **4.2.15 Microscopia intravital**

Células CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> do baço foram purificadas como descrito pelo fabricante (MACS Miltenyi Biotec, CA), incubadas com CFSE (2 uM) durante oito minutos e lavadas. A vasculatura foi corada com anticorpo anti-CD31 (PE) (10 µL de uma solução de estoque (0,2 mg / mL eBioscience, o clone 390). Os animais infectados (cinco dias após a infecção) foram anestesiados via intraperitoneal (100 µL por animal) contendo ketamina (37,5 mg/mL, concentração final) e xilazina (2,5 mg/mL, concentração final). Após anestesiados, as células e o anti-CD31 foram injetados via intravenosa e uma perfuração craniana (2×2 mm) foi feita acima do córtex parietal deixando a dura-máter intacta, permitindo a visualização da microvasculatura cerebral. O animal era imobilizado utilizando um suporte e células CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> juntamente com o endotélio foram observadas utilizando um microscópio confocal (Nikon, o Eclipse 50i, 20x lente objetiva) equipado com uma fonte de luz fluorescente (epi-iluminação a 510-560 nm, usando um filtro de emissão de 590 nm). O número de células que migraram foi determinado durante análise da reprodução do vídeo de 15 minutos de duração. Em cada animal, um campo foi registrado e analisado para determinar o número total de células. Análise de imagem quantitativa foi realizada usando o *software* Volocity versão 6.3. Os dados são representativos de quatro experimentos independentes.

#### 4.2.16 Análise estatística.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Prism (GraphPad 6). Comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste *t Student*. Mann-Whitney teste foi usado para a análise não paramétrica quando os dados não se encaixavam na distribuição Gaussiana. A comparação entre grupos experimentais foi feita utilizando-se o teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*), seguida por análise de comparações múltiplas, segundo o método de Tukey. As curvas de sobrevivência foram analisados pelo teste *log-rank*. O valor  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todos os dados estão representados como média das amostras. Dados do gráfico de barras mostram o desvio padrão (SD).

## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Malária

#### 5.1.1 Produção de IgG e IgM durante a malária

Foram determinados os níveis de anticorpos IgG e IgM específicos para o antígeno AMA-1 em plasma de pacientes com malária ( $n= 18$ ), durante a fase infecção com *P. vivax* e 30-45 dias após o tratamento com anti-maláricos e cura parasitológica. Plasmas de doadores saudáveis foram utilizados como controle (Figura 6). Nenhuma diferença significativa foi observada na produção de anticorpos IgG entre pacientes com malária e após o tratamento. Além disso, amostras de pacientes na fase aguda da doença apresentaram altos níveis de anticorpos IgM contra AMA-1, seguindo de uma redução destes após o tratamento.

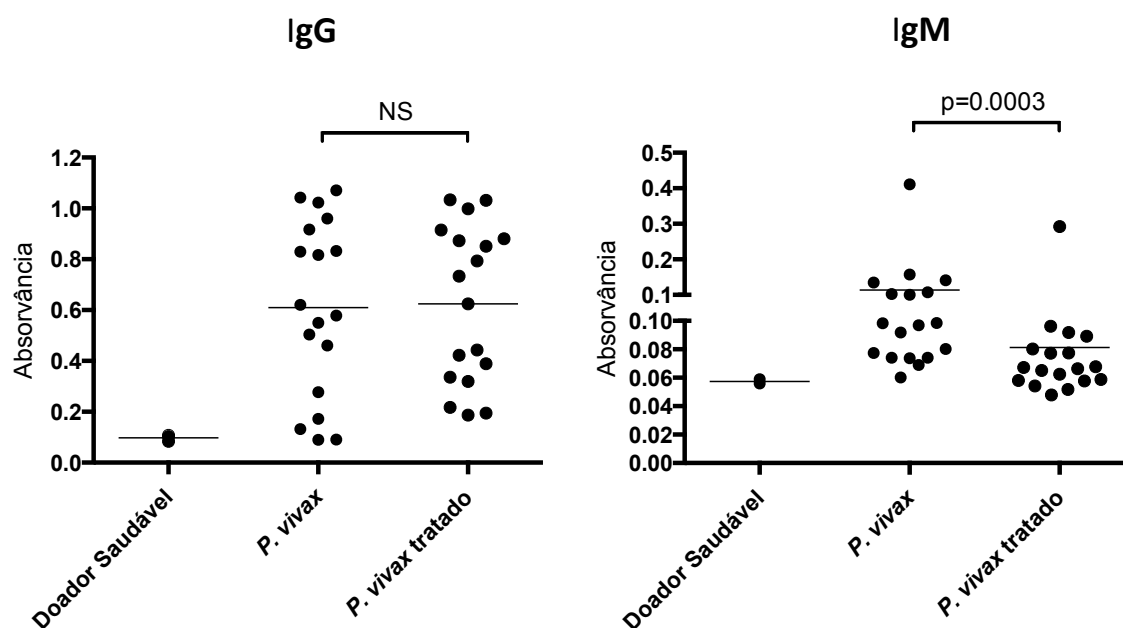
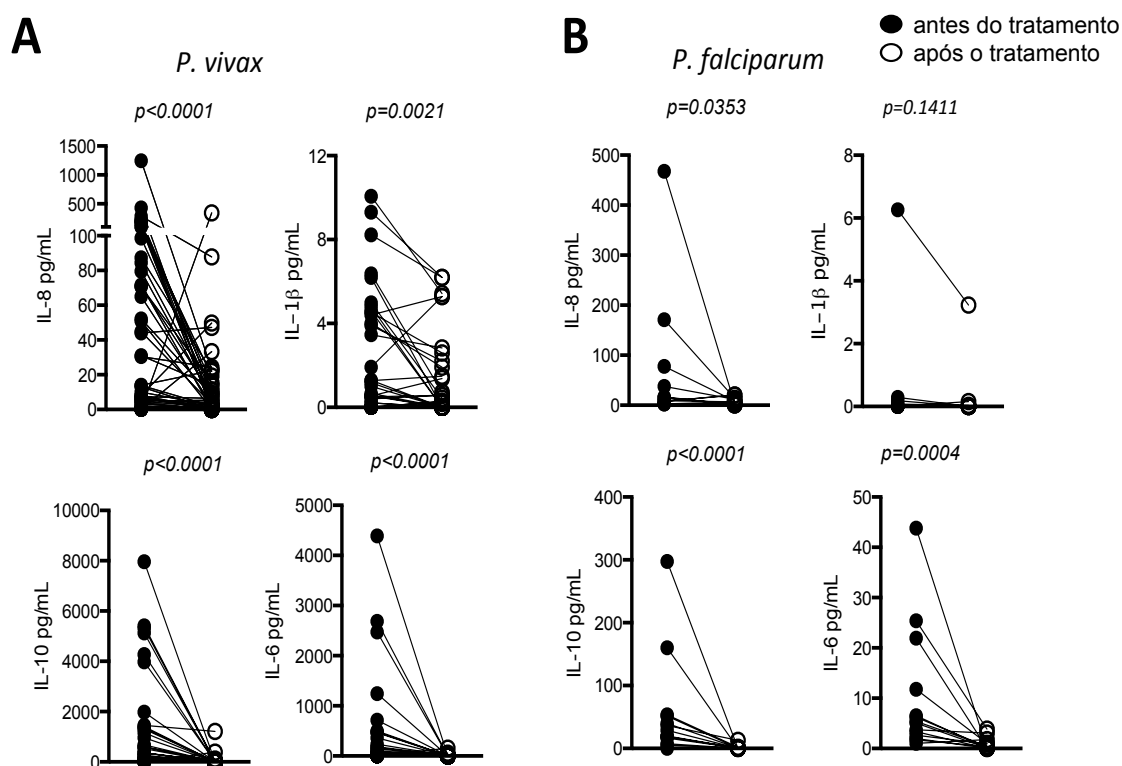


Figura 6. Aumento de IgM específico para AMA-1 em plasma de pacientes durante a fase aguda da malária por *P. vivax*. Os anticorpos IgG e IgM específicos para AMA-1 foram detectados, por ELISA, em plasma de pacientes ( $n= 18$ ) antes e após o tratamento com anti-maláricos, bem como em plasma de doadores saudáveis. Diferenças significativas estão indicadas pelo valor de  $p$  determinado pelo test *t Student*.

### 5.1.2 Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes no plasma de pacientes com malária

A partir de amostras de plasma de pacientes com malária, infectados com *P. vivax* ou *P. falciparum*, foi feita uma análise no perfil e citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a fase aguda e 30-45 dias após o tratamento (Figura 7). Pacientes sintomáticos, durante a fase aguda da infecção seja por *P. vivax* ou *P. falciparum* apresentaram altos níveis de IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-6 circulante. Não obstante, observou-se uma diminuição na produção destas citocinas pró-inflamatórias, assim como IL-10 (anti-inflamatória) em amostras de pacientes após o tratamento com anti-maláricos.



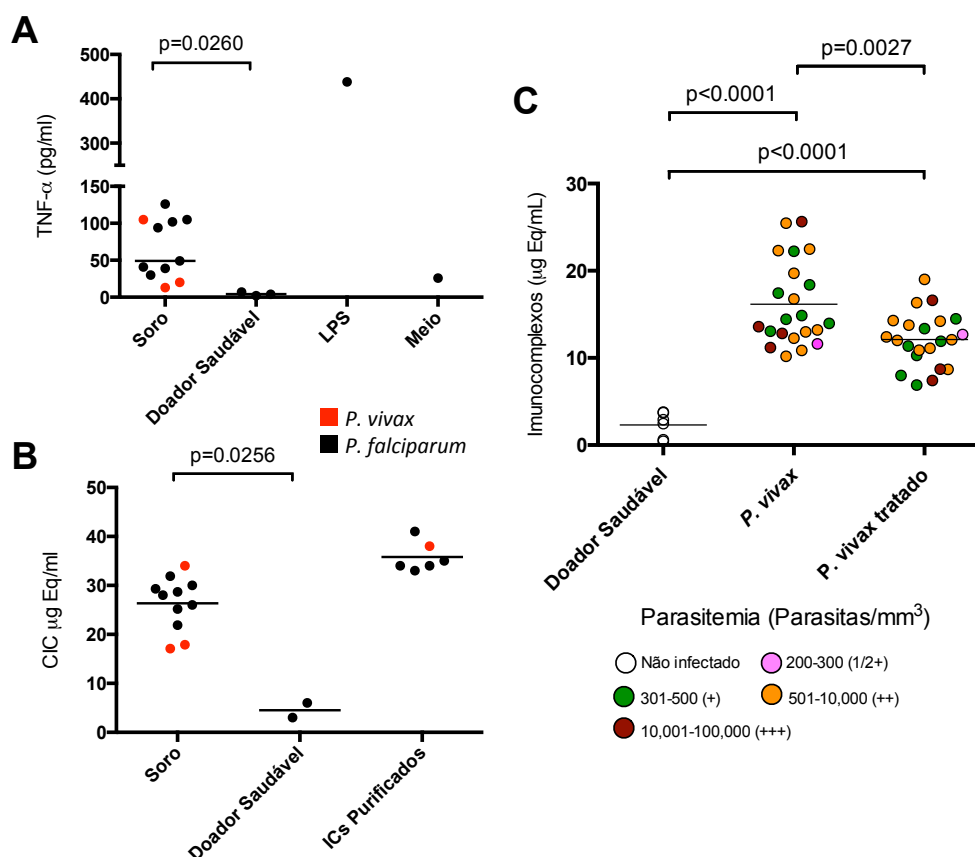
**Figura 7. Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e IL-10 no plasma de pacientes durante a fase aguda da malária.** As citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-6 foram medidas em plasma de pacientes infectados por *P. vivax* ( $n = 56$ ) (A) ou *P. falciparum* ( $n = 14$ ) (B), durante a fase aguda (círculos pretos) e 30-45 após o tratamento (círculos brancos). Níveis de produção das citocinas foram medidos por meio de CBA. Diferenças significativas estão indicadas pelo valor de  $p$  determinando test  $t$  Student pareado.



### 5.1.3 Aumento dos níveis de ICs durante a malária

O soro de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* ou *P. falciparum* foi capaz de induzir a produção de  $\text{TNF}\alpha$  em monócitos humanos (**Figura 8A**). Esta indução não foi observada quando utilizado o soro de doadores saudáveis. Dessa forma, hipotetizamos que ICs circulantes poderiam ser importantes fatores imuno estimulatórios. De fato, detectamos elevados níveis de ICs em soro dos mesmos pacientes com malária aguda (**Figura 8B**).

Os níveis de ICs foram quantificados em soro de pacientes infectados por *P. vivax* (n= 25) antes e 30-45 dias após o tratamento quimioterápico, bem como em doadores saudáveis (n= 6) (**Figura 8C**). Níveis elevados de ICs foram encontrados no soro de pacientes sintomáticos durante a fase aguda da infecção por *P. vivax* (média 16.1  $\mu\text{g mEq/mL}$ ), quando comparados com doadores saudáveis (média = 2.3  $\mu\text{g mEq/mL}$ ). Contudo, não houve correlação entre os níveis de ICs e a parasitemia dos pacientes. Os níveis de ICs no soro de pacientes tratados apresentaram níveis intermediários e também diferiram significativamente quando comparados a pacientes antes do tratamento e doadores saudáveis.

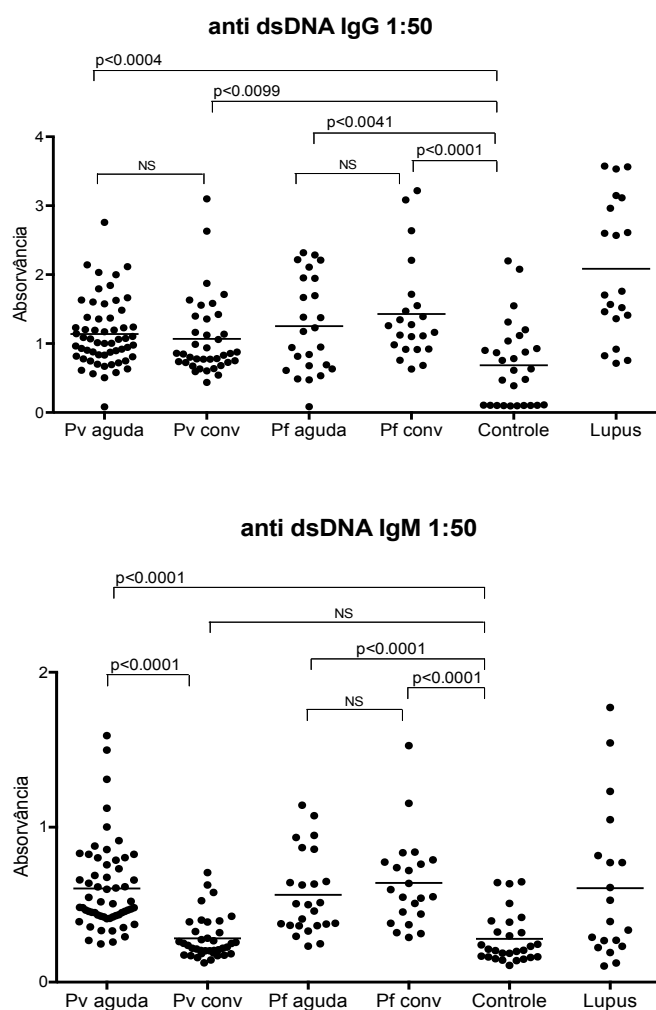


**Figura 8. Soro de pacientes infectados com *P. falciparum* ou *P. vivax* apresentam elevados níveis de imunocomplexos (ICs).** A. Monócitos de doadores saudáveis foram incubados individualmente com soro diluído 1:2 de pacientes infectados com malária, sendo *P. vivax* (n=3) e *P. falciparum* (n=8) ou estimulados com 100ng/mL de LPS e a produção de TNF $\alpha$  foi avaliada após 24 horas por ELISA (gráfico superior a esquerda). B. Níveis de ICs foram quantificados nas mesmas amostras. C. ICs foram quantificados em soro de indivíduos infectados por *P. vivax* (n=25), antes e 30-45 dias após o tratamento e em doadores saudáveis (n=6). Cores diferentes significam parasitemias diferentes. Níveis de ICs foram quantificados utilizando o kit MicroVue CIC-C1q EIA (Quindel). Linhas horizontais indicam a média de cada grupo. Diferenças significantes estão indicadas pelo valor de  $p$  por meio de test *One-way ANOVA*.

#### 5.1.4 Aumento de anticorpos anti-DNA durante a malária

Níveis significativamente elevados de anticorpos anti-DNA fita dupla (ds) também foram encontrados em soro de pacientes infectados por *P. vivax* (n= 52) ou *P. falciparum* (n= 25) (Figura 9). O soro de pacientes portadores de lúpus (n= 19), bem como de doadores saudáveis (n= 28), foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. Os níveis de anticorpos anti-DNA de fita dupla IgG e IgM estão significativamente elevados em soro de pacientes com malária na fase aguda, tanto na infecção por *P. vivax* quanto por *P. falciparum*. Nenhuma diferença

foi observada nos níveis de anticorpos anti-DNA de fita simples. Não obstante, os níveis de anticorpos anti-DNA de fita dupla persistiram por pelo menos 30-40 dias após o tratamento (fase de convalescência) e cura parasitológica dos pacientes.

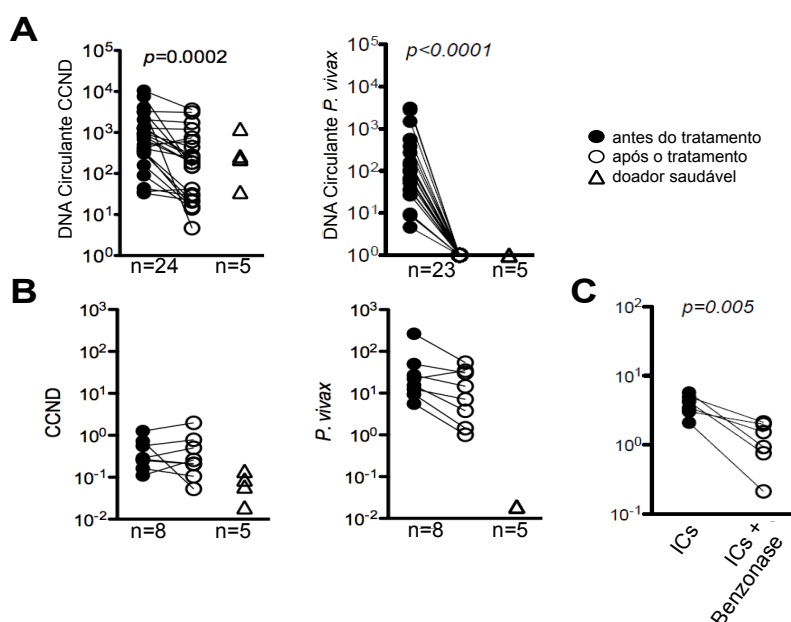


**Figura 9. Níveis elevados de anticorpos anti-DNA de fita dupla durante a fase aguda de malária por *P. vivax* e *P. falciparum*.** Os níveis de anticorpos IgG e IgM anti-DNA de fita dupla IgG e IgM foram medidos por ELISA em soro de 58 pacientes com infecção aguda da malária por *P. vivax* (Pv) e 25 com *P. falciparum* (Pf) e na em fase de convalescência (conv) 30-45 dias após terapia com anti-maláricos. Como controles negativo e positivo, foi utilizado soro de 28 doadores saudáveis e 19 pacientes portadores de Lúpus respectivamente. Diferenças significantes são indicadas por valor de  $p$  usando o teste Mann Whitney.

### 5.1.5 Presença de DNA de *P. vivax* em ICs

Foi detectada a presença de DNA em ICs. Estes níveis de DNA foram quantificados em ICs purificados de plasma de pacientes infectados por *P. vivax* por PCR em tempo real, utilizando oligonucleotídeos de sequência para o gene humano *CYCLIN D1* (CCND) e *P. vivax* SSUrRNA (18S do rRNA). Foi observado um aumento dos níveis de DNA humano e do parasito em plasma de pacientes infectados com *P. vivax* antes do tratamento. O DNA circulante humano persistiu, ainda que em baixos níveis, enquanto o DNA do parasito foi praticamente eliminado da circulação após a terapia com anti-maláricos (**Figura 10A**).

Do mesmo modo, o DNA do parasito foi detectado em ICs de pacientes infectados por *P. vivax*, antes, e em níveis muito baixos, depois do tratamento (**Figura 10B**). Por outro lado, o DNA humano foi detectado em níveis muito baixos em ICs dos mesmos pacientes. Uma vez que a benzonase degrada todas as formas de DNA, este ensaio foi realizado para confirmar a presença de DNA em ICs oriundos de pacientes com malária.

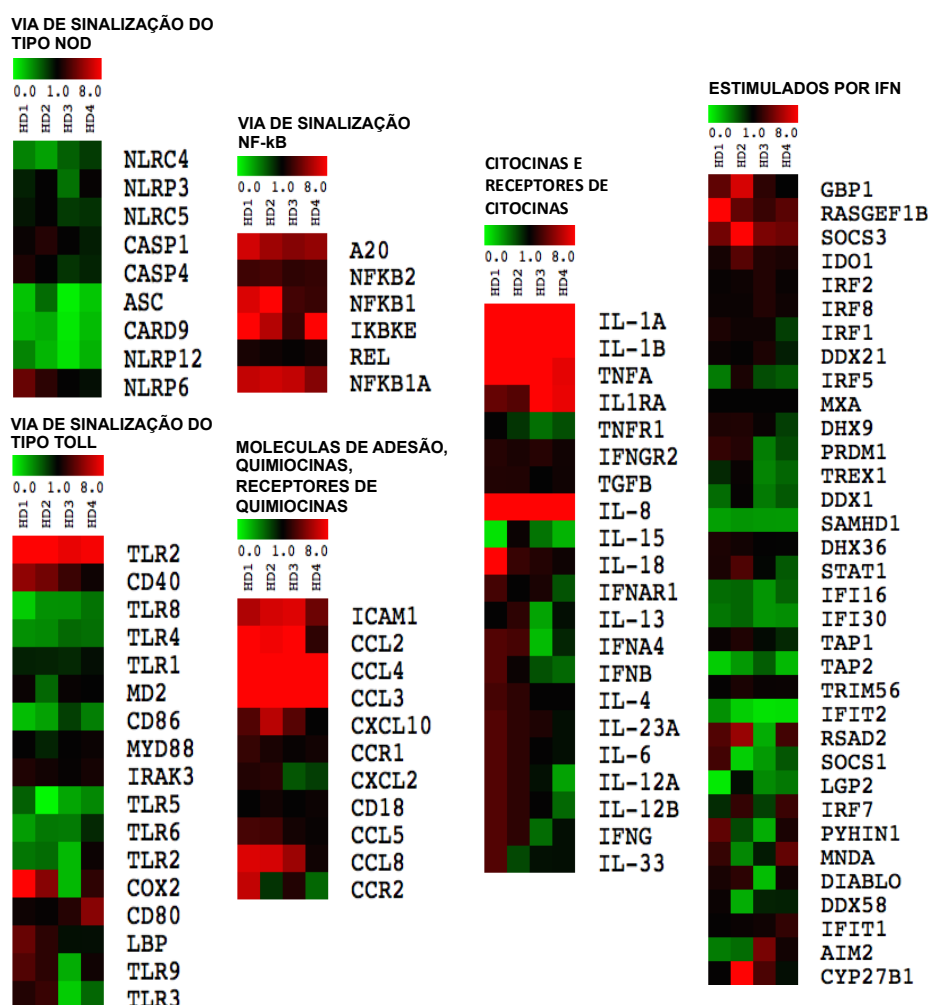


**Figura 10. Elevados níveis de DNA humano e do parasito em plasma e imunocomplexos (ICs) de pacientes com malária causada pelo *P. vivax*.** **A.** Níveis de DNA circulante foram quantificados em plasma de pacientes infectados com *P. vivax* (n=24) antes e 30-45 dias após o tratamento bem como em doadores saudáveis (n=5) através da amplificação dos genes humano *CYCLIN D1* (CCND) e *P. vivax SSUrRNA* (18S do rRNA). **B.** ICs de pacientes infectados por *P. vivax* (n=8) antes e 30-45 dias após o tratamento bem como doadores saudáveis (n=5) foram purificados e utilizados para a amplificação dos genes humano CCND e *P. vivax SSUrRNA*. **C.** Quantificação de DNA total extraído de ICs purificados de pacientes com malária infectados por *P. vivax* (n=6) antes e após o tratamento com benzonase. Diferenças significativas estão indicadas por valores de p utilizando test *t* Student pareado.

### 5.1.6 Monócitos estimulados com ICs apresentam uma assinatura de genes induzida pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B

Foi avaliada a expressão de genes em monócitos de quatro doadores saudáveis, estimulados com 60  $\mu$ g/mL de ICs por seis horas. De um total de 105 genes relacionados a respostas inflamatórias presentes no *codeset* analisado, sete eram constitutivos e 98 eram genes relacionados a resposta imune inata. Os genes foram divididos em seis grupos: via de sinalização de receptores do tipo NOD, via de sinalização de receptores do tipo Toll, família do NF- $\kappa$ B, citocinas e receptores de citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas e genes estimulados por IFN. Os monócitos expressaram um aumento na expressão de 27 genes diferencialmente expressos após estímulo com ICs, com um valor de  $p < 0.05$  e uma indução maior

que 1.8 (**quadro 6**). Os genes mais induzidos após o estímulo com ICs foram genes relacionados a família NF- $\kappa$ B. Dos 27 genes expressos diferencialmente, cinco eram da família NF- $\kappa$ B. Como pode ser observado na **figura 11**, a maioria dos outros genes com expressão aumentada é de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, conhecidas por serem induzidas por NF- $\kappa$ B.



**Figura 11. Assinatura de genes da família NF- $\kappa$ B em monócitos estimulados com o ICs.** Monócitos de quatro doadores saudáveis foram purificados e estimulados com ICs (60 $\mu$ g/mL) por 6 horas. A análise da expressão gênica foi realizada por meio da tecnologia *Nanostring*. Diferentes vias de sinalização estão representadas nos *heatmaps*. Os dados foram normalizados utilizando genes constitutivos e o aumento da expressão do gene foi calculado em comparação com amostras não estimuladas do mesmo doador. Os *heatmaps* mostram genes diferencialmente expressos (linhas) para cada doador saudável (coluna) que diminuíram (verde), foram inalterados (preto) ou tiveram expressão aumentada (vermelho). O quadro 6 fornece o valor de  $p$  dos genes que apresentaram aumento significativo na expressão, determinado pelo teste  $t$  Student.

**Quadro 6 - Genes com a expressão aumentada em monócitos estimulados com ICs.** Asteriscos indicam diferenças significativas, determinadas por teste *t Student*

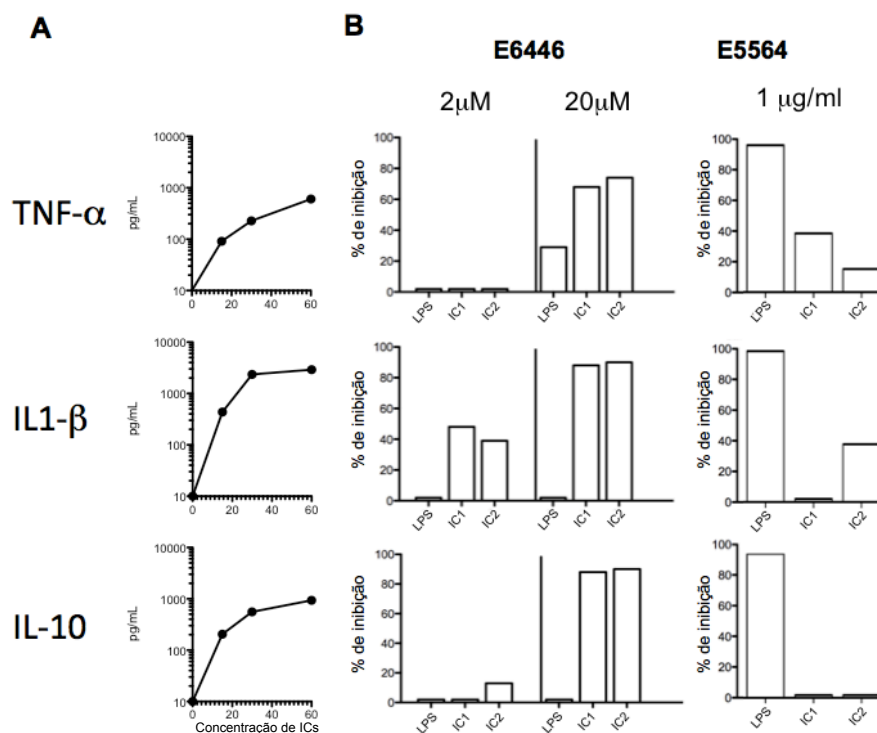
Gene	Nome de Gene	Nível de expressão	Estatística
A20	Fator de necrose tumoral proteína 3 induzida por alfa	5.03	**
CCL3	Quimiocina (motivo C-C) ligando 3	10.14	**
CCL4	Quimiocina (motivo C-C) ligando 4	9.69	***
CCL5	Quimiocina (motivo C-C) ligando 5	2.11	**
CCL8	Quimiocina (motivo C-C) ligando 8	5.14	*
CD80	Complexo de diferenciação 80	2.31	*
CXCL10	Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 10	3.42	*
GBP1	Proteína 1 de ligação ao guanilato	3.44	*
HCK	Cinase de células hematopoiéticas	2.29	**
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1	3.98	****
IFNGR2	Receptor de IFN gama 2	2.71	***
IKBKE	Inibidor do fator nuclear kappa B	22.24	**
IL18	Interleucina 18	3.87	**
IL1A	Interleucina 1 alfa	9.39	**
IL1B	Interleucina 1 beta	16.16	****
IL1RA	Receptor para interleucina 1 alfa	7.41	*
IL6	Interleucina 6	1.83	***
IL8	Interleucina 8	17.09	****
NFKB1	Fator nuclear kappa B 1	2.50	**
NFKB2	Fator nuclear kappa B 2	2.44	**
NFKBIA	Fator nuclear kappa B 1 alfa	4.55	***
PSTPIP2	Interação de prolina-serina-treonina fosfatase a proteína 2	2.08	*
PTGS2	Prostaglandina-endoperoxidase sintetase 2	5.97	**
RASGEF1B	Fator de troca de nucleotídeos guanina associado ao domínio Ras 1 B	3.43	*
SOCS3	Supressor da sinalização de citocina 3	4.01	***
TLR2	Receptor do tipo Toll 2	7.80	**
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa	7.31	*

### 5.1.7 ICs purificados de pacientes com malária induzem a produção de citocinas por monócitos

Foi analisada a capacidade de ICs purificados de plasma de pacientes infectados por *P. vivax* em induzir a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de doadores saudáveis. Utilizou-se diferentes concentrações de ICs purificados e níveis de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-10}$  foram avaliados em sobrenadantes de cultura de CMSPs, 24 horas após o estímulo. Foi definido que 60  $\mu\text{g}$  de ICs purificados é a concentração ideal para induzir a produção de citocinas por CMSPs (**Figura 12A**). Essa concentração foi utilizada em experimentos posteriores. A seguir, avaliamos se o DNA é um componente importante para a atividade imunoestimulatória dos ICs. Para isso, foi utilizado o E6446 (antagonista de TLR7 e TLR9) um composto que se liga ao DNA e RNA no compartimento lisossomal, bloqueando a ativação de TLR7, bem como TLR9

(Figura 12B). Como controle, utilizou-se CMSPs tratados previamente por 3 horas com E5564 (2  $\mu$ g), um antagonista de TLR4, seguido de estimulação com LPS (100 ng/mL). O tratamento de CMSPs com E6446 (2  $\mu$ M) por 3 horas, seguido de estímulo com ICs, resultou na inibição de 30-40% de IL-1 $\beta$ . Uma concentração maior do inibidor de DNA/RNA (20  $\mu$ M) foi necessária para inibir a produção de 70% de TNF $\alpha$  e 90% de IL-1 $\beta$  e IL-10. Experimentos controles utilizando E5564 (antagonista de TLR4) (1  $\mu$ g/mL) resultaram em 100% na inibição de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 após estímulo com LPS. Essa inibição não foi observada quando CMSPs foram previamente tratados com E5564 e estimulados com ICs. Estes dados sugerem que os fragmentos de DNA do parasito presentes nos ICs formados durante a malária estão diretamente envolvidos na ativação celular do sistema imune inato.

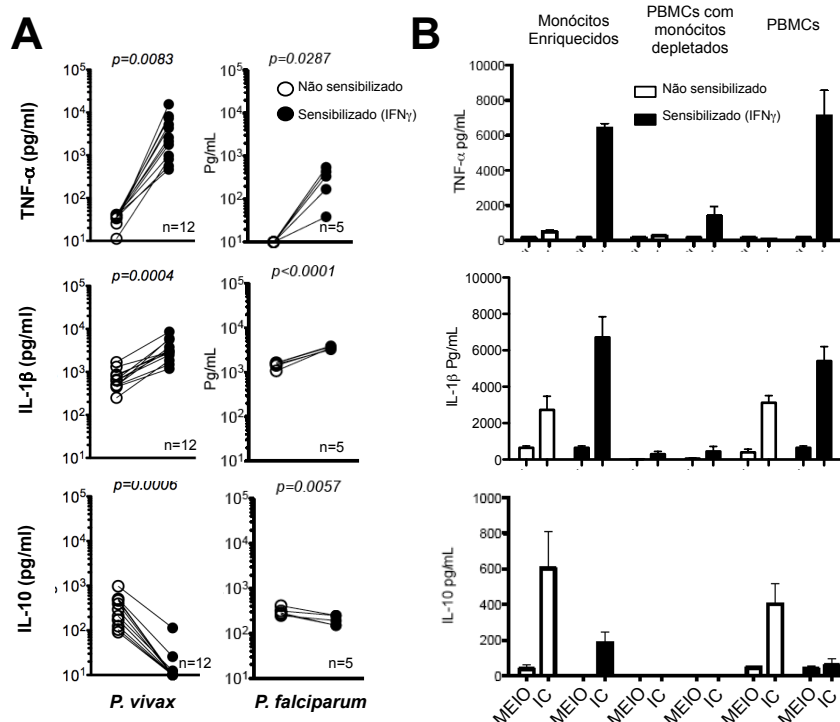




**Figura 12. E6446, um antagonista de TLR7 e TLR9, bloqueia a atividade estimulatória de ICs em monócitos.** **A.** CMSPs foram isolados de doadores saudáveis, estimulados com ICs em diferentes concentrações e os níveis de citocinas foram medidos após 24 horas nos sobrenadantes da cultura celular. **B.** CMSPs foram tratados com E6446, antagonista de TLR7 e TLR9, (2 $\mu$ M ou 20  $\mu$ M) ou E5564, um antagonista de TLR4 (2 $\mu$ g/mL) por 2 horas antes do estímulo com 60  $\mu$ g/ml de ICs por 24 horas. Logo após, níveis de citocinas foram medidos em sobrenadante. Barras representam percentagem de inibição da citocina em sobrenadantes. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 foram medidos por meio de CBA (BD).

### 5.1.8 A exposição prévia ao IFN $\gamma$ aumenta a produção de citocinas induzidas por ICs

Foi avaliado o efeito da sensibilização prévia com IFN $\gamma$  no perfil de citocinas produzidas por CMSPs de doadores saudáveis. A exposição ao IFN $\gamma$ , seguido de estímulo de 24 horas com ICs purificados de plasma de pacientes com malária, infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum*, elevou a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Em contraste, observou-se uma redução na produção de IL-10 quando comparado com os níveis de citocinas produzidas por células não sensibilizadas (**Figura 13A**). O mesmo perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias *versus* anti-inflamatórias foi observado em monócitos purificados (**Figura 13B**).

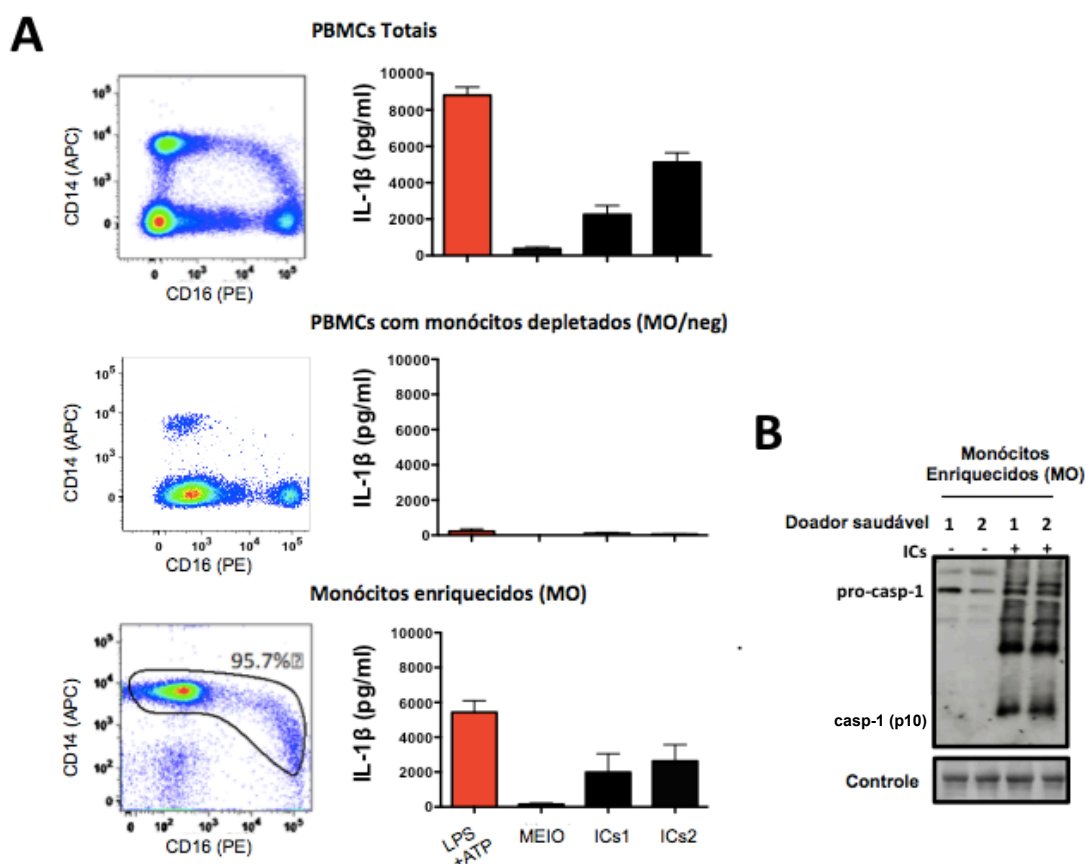


**Figura 13. Monócitos são as principais fontes de citocinas em células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) após estímulo com imunocomplexos (ICs) purificados de pacientes com malária. A.** CMSPs foram isolados de doadores saudáveis, sensibilizadas (círculos escuros) ou não (círculos claros) com 100 ng de IFN $\gamma$  e estimulados com 60 mg/mL de ICs purificados de plasma de pacientes com malária por *P. vivax* (gráficos a esquerda, n=12) ou *P. falciparum* (gráficos a direita, n=5) e os níveis de citocinas medidos em sobrenadante de cultura celular, 24 horas após estímulo. **B.** Monócitos CD14 $^{+}$  foram purificados de CMSPs de três doadores saudáveis por seleção positiva. Monócitos purificados, CMSPs com monócitos depletados e CMSPs totais foram sensibilizados ou não com IFN $\gamma$  (100 ng/mL) e estimulados com 60 mg/mL de ICs purificados de plasma de pacientes com malária. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 foram medidos por CBA 24 horas após estímulo com ICs. Diferenças significativas estão indicadas pelos valores de *p* utilizando teste *t student* pareado.

### 5.1.9 ICs purificados de pacientes com malária induzem a ativação de caspase-1 em monócitos

Uma vez observado que ICs induzem a produção de IL-1 $\beta$ , investigamos se estes eram capazes de promover a ativação de caspase-1. Primeiramente, foi definida a principal fonte de IL-1 $\beta$  em CMSPs, após estímulo com ICs purificados de plasma de pacientes com malária. Para tanto, foi utilizado CMSPs totais, CMSPs com monócitos depletados (células CD14 $^{+}$ ) e monócitos purificados. Os resultados mostram que, na população purificada, aproximadamente 95% das células são CD14 $^{+}$  e CD16 $^{-}$  (**Figura 14A** painel esquerdo). Uma pequena população é CD14 $^{+}$  CD16 $^{lo}$ . Os resultados apresentados também mostram que monócitos purificados

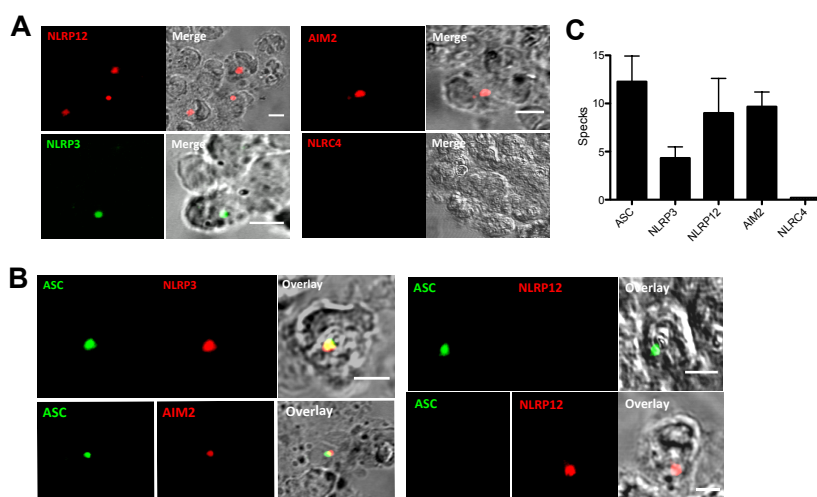
produziram grandes quantidades de IL-1 $\beta$ , enquanto CMSPs com células CD14<sup>+</sup> depletadas não produziram IL-1 $\beta$ , após estímulo com ICs. Além disso, a pró-caspase-1 foi autoclivada em caspase-1 ativa (subunidade p10) após estímulo com ICs em monócitos (**Figura 14B**).



**Figura 14. ICs purificados de pacientes com malária causadas por *P. vivax* ativam caspase-1 e induzem a produção de elevados níveis da citocina pirogênica IL-1 $\beta$  por monócitos humanos. A.** Painéis da esquerda mostram a frequência de células CD14<sup>+</sup> em CMSPs (gráfico superior), CMSPs com monócitos depletados (gráfico do meio) e monócitos purificados (gráfico inferior). Nos painéis da direita, CMSPs, CMSPs com monócitos depletados e monócitos purificados foram estimulados com ICs (60  $\mu$ g/ml) por 24 horas e IL-1 $\beta$  foi medida no sobrenadante de cultura celular por ELISA. **B.** Monócitos purificados foram estimulados com 60  $\mu$ g/mL de ICs por 24 horas e as células foram lisadas por tampão RIPA e usadas para a detecção de pró-caspase-1 e forma ativa de caspase-1 (p10) por *Western blot*. Os presentes resultados são representativos de três diferentes doadores saudáveis.

### 5.1.10 Formação da plataforma de inflamassomas em monócitos estimulados com ICs de pacientes com malária

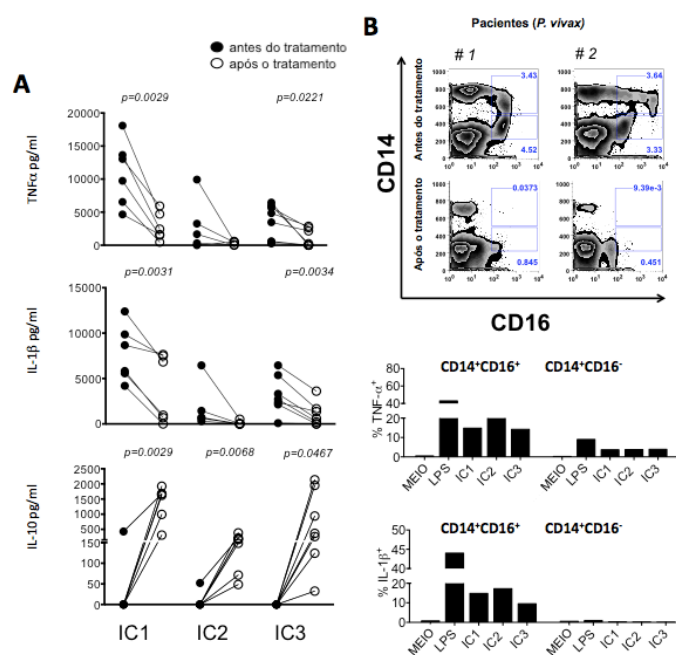
Para saber se ICs promovem a formação de inflamassomas, monócitos de doadores saudáveis foram purificados e estimulados com ICs de pacientes com malária, infectados por *P. vivax*. Foi observada a formação de plataformas contendo NLRP12, AIM2 e NLRP3 (**Figura 15A**). Cerca de 10, 10 e 5% dos monócitos expressam inflamassomas de AIM2, NLRP12 e NLRP3 respectivamente (**Figura 15C**). Contudo, nenhuma evidência de formação de inflamassoma contendo NLRC4 foi encontrada. Além disso, verificou-se a co-localização de molécula adaptadora ASC com o inflamassoma NLRP3 ou AIM2. O inflamassoma NLRP12 não foi associado a ASC, sugerindo que este se auto-oligomeriza (**Figura 15B**). Estes resultados vinculam a formação de inflamassomos à ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 $\beta$ , um aspecto importante na atividade pró-inflamatória dos ICs.



**Figura 15. Plataformas de inflamassoma contendo NLRP12, NLRP3 e AIM2 são formados após estímulo com ICs em monócitos.** **A.** Detecção por análise confocal de inflamassomas contendo NLRP3 (em verde), NLRP12 (vermelho) e AIM2 (vermelho), em monócitos CD14<sup>+</sup> estimulados com 60  $\mu$ g de ICs por 24 horas. Não foi observada reação com anticorpos secundários, na ausência de anticorpos primários. **B.** ASC co-localiza com NLRP3 e AIM2 mas não com NLRP12. Ambos inflamassomas foram encontrados no citoplasma de monócitos. **C.** O gráfico de barra mostra a frequência de inflamassomas em monócitos de doadores saudáveis, 24 horas após estímulo com 60  $\mu$ g de ICs.

### 5.1.11 ICs induzem a produção de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias por monócitos

Foi utilizada a concentração de 60  $\mu\text{g/mL}$  de ICs para estimular CMSPs de pacientes com malária, infectados com *P. vivax* antes e 30-40 dias após o tratamento e cura parasitológica. O estímulo com ICs induziu a produção de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias,  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ , e baixos níveis de  $\text{IL-10}$  (Figura 16A) por monócitos de pacientes infectados. A principal fonte de citocinas pró-inflamatórias eram as células  $\text{CD14}^+ \text{CD16}^+$ . Curiosamente, o perfil de citocinas produzidas por monócitos após o tratamento mudou-se para anti-inflamatório: produção elevada de  $\text{IL-10}$  e produção reduzida de  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{TNF}\alpha$  (Figura 16B)



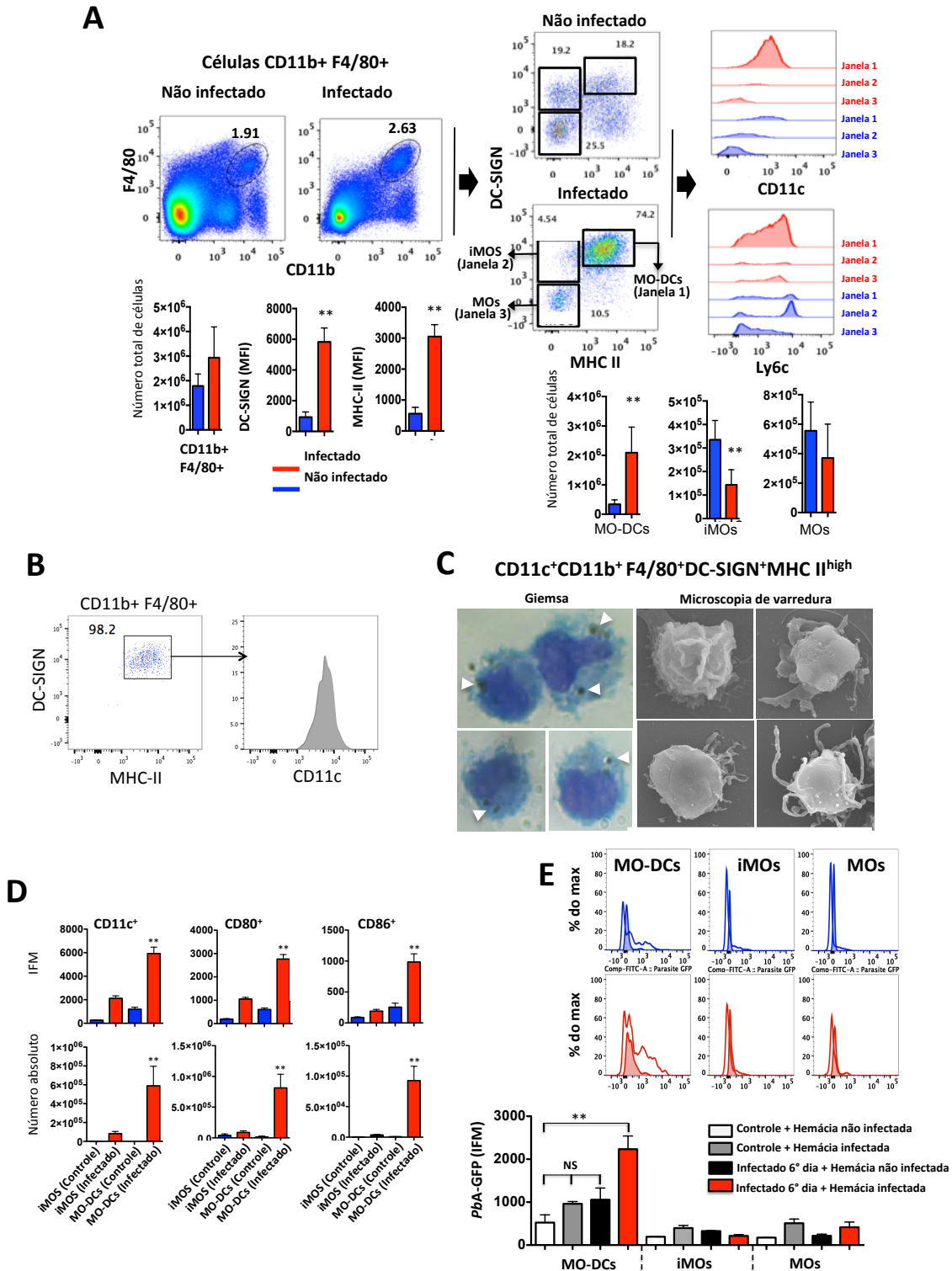
**Figura 16. ICs purificados induzem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias por monócitos  $\text{CD14}^+ \text{CD16}^+$  de pacientes com malária.** **A.** CMSPs de pacientes com malária infectados por *P. vivax* ( $n=7$ ) antes e 30-45 dias após o tratamento foram isolados e estimulados com 60  $\mu\text{g/ml}$  de ICs por 24 horas. As citocinas  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-10}$  foram medidas nos sobrenadantes de cultura celular por CBA. **B.** Análise por citometria mostra um aumento na frequência de células  $\text{CD14}^+ \text{CD16}^+$  em CMSPs de dois pacientes infectados por *P. vivax* antes e 30-45 dias após o tratamento e cura parasitológica. CMSPs de pacientes foram estimulados com meio ou ICs purificados de diferentes pacientes por 24 horas e, posteriormente, realizada uma marcação intracelular para avaliar  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  por citometria de fluxo. Diferenças significantes estão indicadas com valores de  $p$  utilizando teste  $t$  student pareado.

## 5.2 Modelo murino da malária cerebral

### 5.2.1 A infecção por *Plasmodium* induz a presença de células MO-DCs

Estudos recentes demonstraram que os iMOs diferenciam em MO-DCs durante infecções microbianas *in vivo*<sup>86,87</sup>. Sendo assim, avaliamos a presença de MO-DCs durante a infecção murina com *PbA*. Células CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup> foram avaliadas no baço de animais infectados, uma vez que este é o principal órgão onde observa-se a interação de fagócitos e hemácias infectadas. Para isso, foi feita uma seleção na janela de células duplo positivas para CD11b e F4/80 e posteriormente, na população MHCII<sup>high</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>. Os resultados apresentados na **Figura 17A** indicam que a frequência de MO-DCs na população total de CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> do baço aumentou de 18 a 74% quando comparamos os animais controles e infectados com *PbA*. Além disso, a intensidade de fluorescência média (IFM) de DC-SIGN e MHCII em MO-DCs de animais infectados aumentou 3 vezes. Uma parte destas células também expressou níveis diferentes de Ly6C. Entretanto, a porcentagem de células CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>int</sup>MHCII<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>Ly6C<sup>high</sup> (iMOs) reduziu de 10 para 4,4% sugerindo que iMOs estão se convertendo em MO-DCs. Nossas análises indicam que a frequência de CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>high</sup>DC<sup>-</sup>SIGN<sup>-</sup>Ly6c<sup>-</sup>, o que corresponde a células dendríticas convencionais (cDCs), diminuiu de 48% para 20% do total de CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>high</sup> em animais controles e infectados respectivamente. Para melhor caracterizar MO-DCs, foi feita uma purificação desta células em citômetro de fluxo (95-99% de pureza em diferentes experimentos) (**Figura 17B**) seguida de uma coloração por Giemsa, onde observou-se hemozoína no interior das células ou análise por microscopia eletrônica de varredura (**Figura 17C**). Para investigar a capacidade fagocítica de MO-DCs, esplenócitos de animais controles e infectados foram incubados com hemácias

infectadas ou não com *PbA-GFP*. Por meio de citometria de fluxo foi visto que MO-DCs tem uma elevada capacidade fagocítica quando comparamos estas com iMOs e MOs (**Figura 17D**). Além disso, ao contrário de MOs, MO-DCs apresentou um aumento no nível de CD80 e CD86 (**Figura 17E**), sugerindo que MO-DCs são células apresentadoras de antígeno altamente eficientes.

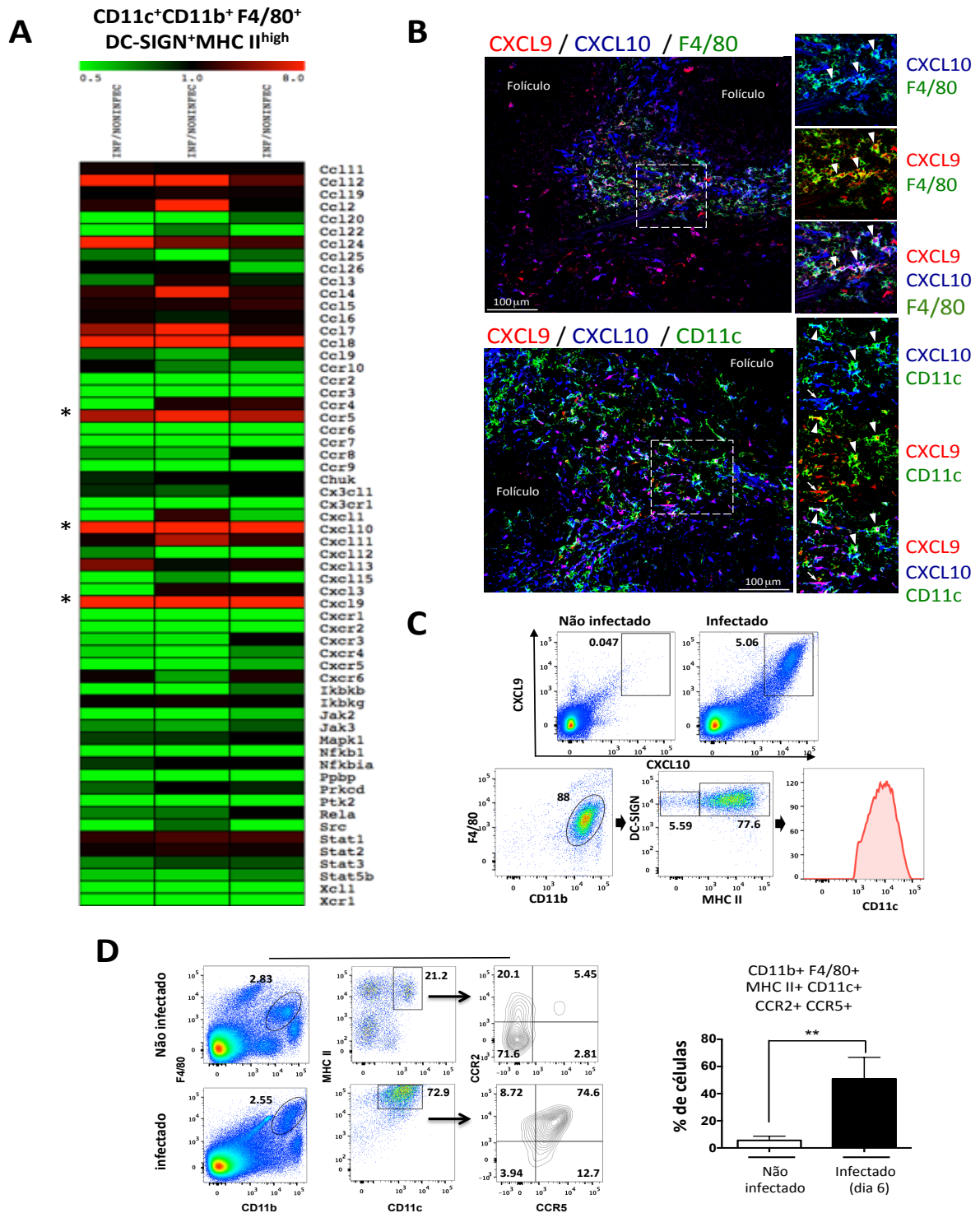


**Figura 17. Diferenciação de MO-DCs no baço ( $F4/80^+CD11b^+DC-SIGN^+MHCII^{high}CD11c^+Ly6c^+$ ) de animais infectados com *PbA*. Baços foram coletados cinco dias após a infecção com *PbA*. Resultados representativos da citometria de fluxo são mostrados a seguir. **A.** Primeira janela feita em esplenócitos  $F4/80^+CD11b^+$  e posteriormente em células  $DC-SIGN^+MHCII^{high}$ . Células  $F4/80^+CD11b^+DC-SIGN^+MHCII^{high}$  também foram avaliadas quanto a expressão de  $CD11c$  e  $Ly6c$ . Gráfico de barras correspondem o número total de células (quatro animais por grupo). Os dados mostrados são representativos de cinco experimentos independentes. **B.** Baços foram coletados no sexto dia após infecção com *PbA*. MO-DCs foram marcados com anticorpos anti- $F4/80^+CD11b^+DC-SIGN^+MHCII^{high}$ , e posteriormente, submetidas a citometria de fluxo. Foi obtido aproximadamente 98.2% de células puras, os quais são também  $CD11c^+$ . **C.** Esplenócitos foram marcados com anticorpos fluorescentes e as MO-DCs foram purificadas por citometria de fluxo e coradas com Giemsa ou analisadas por microscopia de varredura. **D.** Expressão de  $CD11c$  e moléculas co-estimulatórias  $CD80$  e  $CD86$  na superfície de MOs, iMOS e MO-DCs. **E.** Histogramas mostram resultados de IFM de esplenócitos de animais controles (linhas sombreadas) e infectados (linhas abertas) incubados com hemácias não infectadas (azul) ou hemácias infectadas com *PbA-GFP* (vermelho). O gráfico de barras indica a atividade fagocítica de MO-DCs, iMOS e MOs. Os resultados são expressos em média. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes entre infectados e não infectados (\*\*,  $p > 0.01$ ) após *two-way ANOVA*.**



### 5.2.2 A malária induz a expressão de CCR5<sup>+</sup>CXCL9<sup>+</sup>CXCL10<sup>+</sup> em MO-DCs

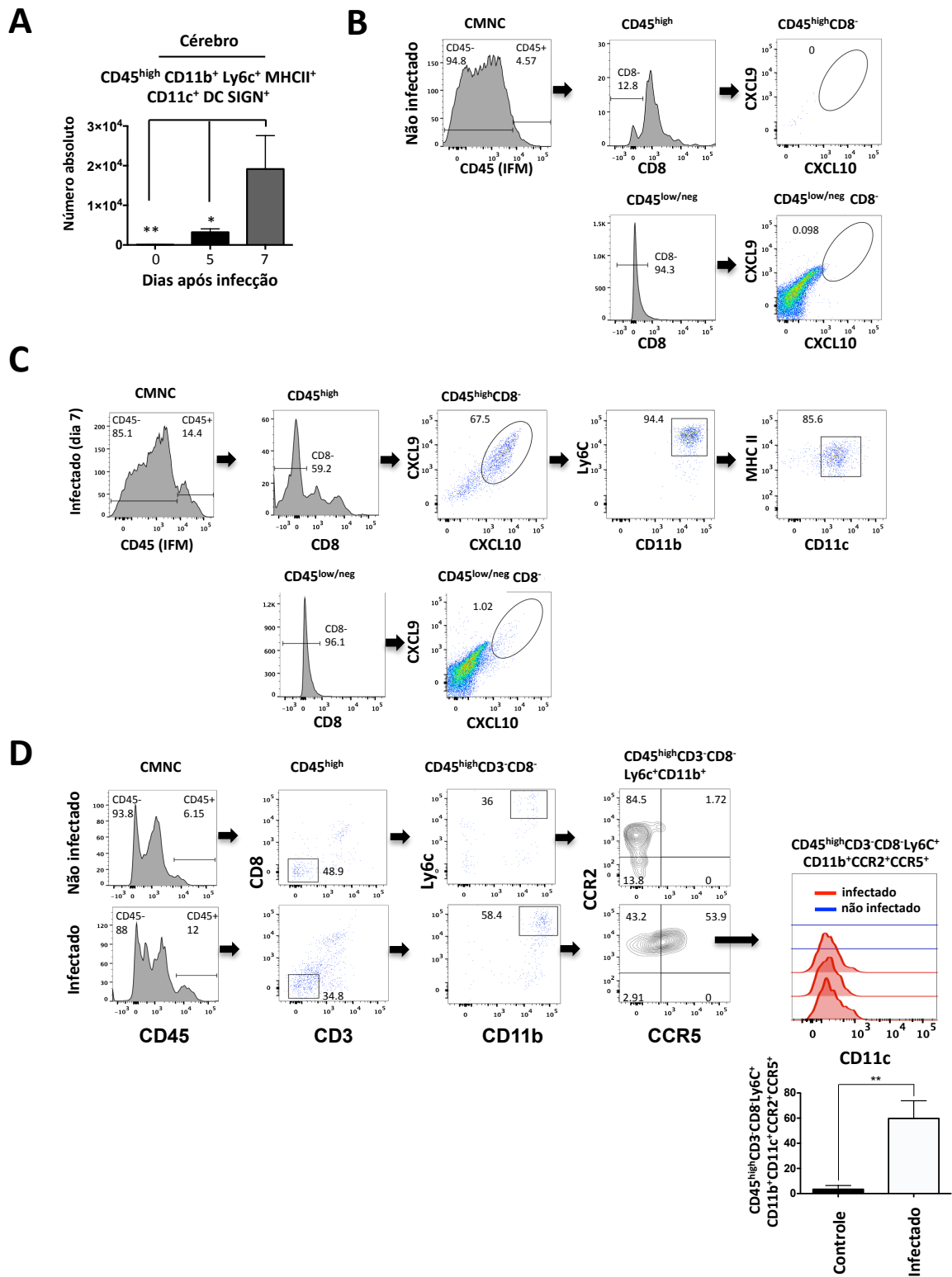
Para a caracterização gênica de MO-DCs, lisados de células purificadas (**Figura 17B**) foram obtidos e os transcritos do gene analisados para 547 genes relacionados ao sistema imune, mais 14 genes constitutivos (*housekeeping genes*) utilizando o kit comercial de sondas *Nanostring*. Observou-se um aumento na expressão de 18% dos genes analisados. Dentre eles, o aumento maior foi observado na expressão de CXCL9 (24 vezes) e CXCL10 (19 vezes). Além disso, da família de receptores de quimiocinas, a expressão de CCR5 foi aumentada seis vezes (**Figura 18A**). Como CXCL9 e CXCL10 tem demonstrado um importante papel na malária cerebral no modelo experimental<sup>75,81</sup>, foi investigada a expressão dessas quimiocinas no baço de animais infectados com *PbA*. Para isso, foi utilizado o animal transgênico REX3 (*reporting the expression of CXCR3 ligants*), que expressa proteína fluorescente vermelha (*red fluorescence protein – RFP*) e proteína fluorescente azul (*blue fluorescence protein – BFP*) como genes *reporter* sob os promotores dos genes CXCL9 e CXCL10 respectivamente. Foram encontradas grandes quantidades de células duplo positivas  $RFP^+BFP^+$  em MO-DCs, enquanto iMOs foram  $RFP^-BFP^-$  (**Figuras 18B e 18C**). Da mesma forma, aproximadamente 80% de MO-DCs são CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>, sendo iMOs CCR2<sup>+</sup>, porém CCR5<sup>-</sup> (**Figura 18D**).



**Figura 18. Expressão de CXCL9 e CXCL10 por MO-DCs de animais infectados com *PbA*.** Esplenócitos foram coletados no sexto dia após a infecção com *PbA*, marcados com anticorpos fluorescentes e CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHCII<sup>high</sup> MO-DCs purificadas por citometria de fluxo (Figura 1B) e analisadas para **A.** expressão de RNA de genes relacionados ao sistema imune utilizando o sistema de análise *nCounter*. Os resultados indicam um aumento na expressão gênica, quando comparado MO-DCs de três animais infectados por três controles. **B.** Microscopia confocal de baço um animal REX3 infectado. Painéis superiores indicam marcações para F4/80<sup>+</sup> (APC convertido em verde), CXCL9-RFP e CXCL10-BFP. Setas indicam células duplo e triplo positivas respectivamente. **C.** Animais REX3 infectados foram sacrificados no sexto dia após infecção e MO-DCs do baço foram avaliadas quanto a expressão de CXCL9 e CXCL10. Janela primeiramente em células do baço duplo positivas para CXCL9 e CXCL10 e em seguida em células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e DC-SIGN<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>. Todas as células CXCL9<sup>+</sup>CXCL10<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> são positivas para CD11c. **D.** Células do baço foram coletadas no sexto dia após a infecção e uma janela de exclusão foi feita para selecionar células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e posteriormente em células CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>. A maioria de MO-DCs de animais controle e animais infectados com *PbA* são CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup> e CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> respectivamente. Os dados são representativos de três experimentos independentes com três animais por grupo que reproduziram resultados similares.

### 5.2.3 Células MO-DCs CCR5<sup>+</sup>CXCL9<sup>+</sup>CXCL10<sup>+</sup> são encontradas no sistema nervoso central de animais infectados com *PbA*.

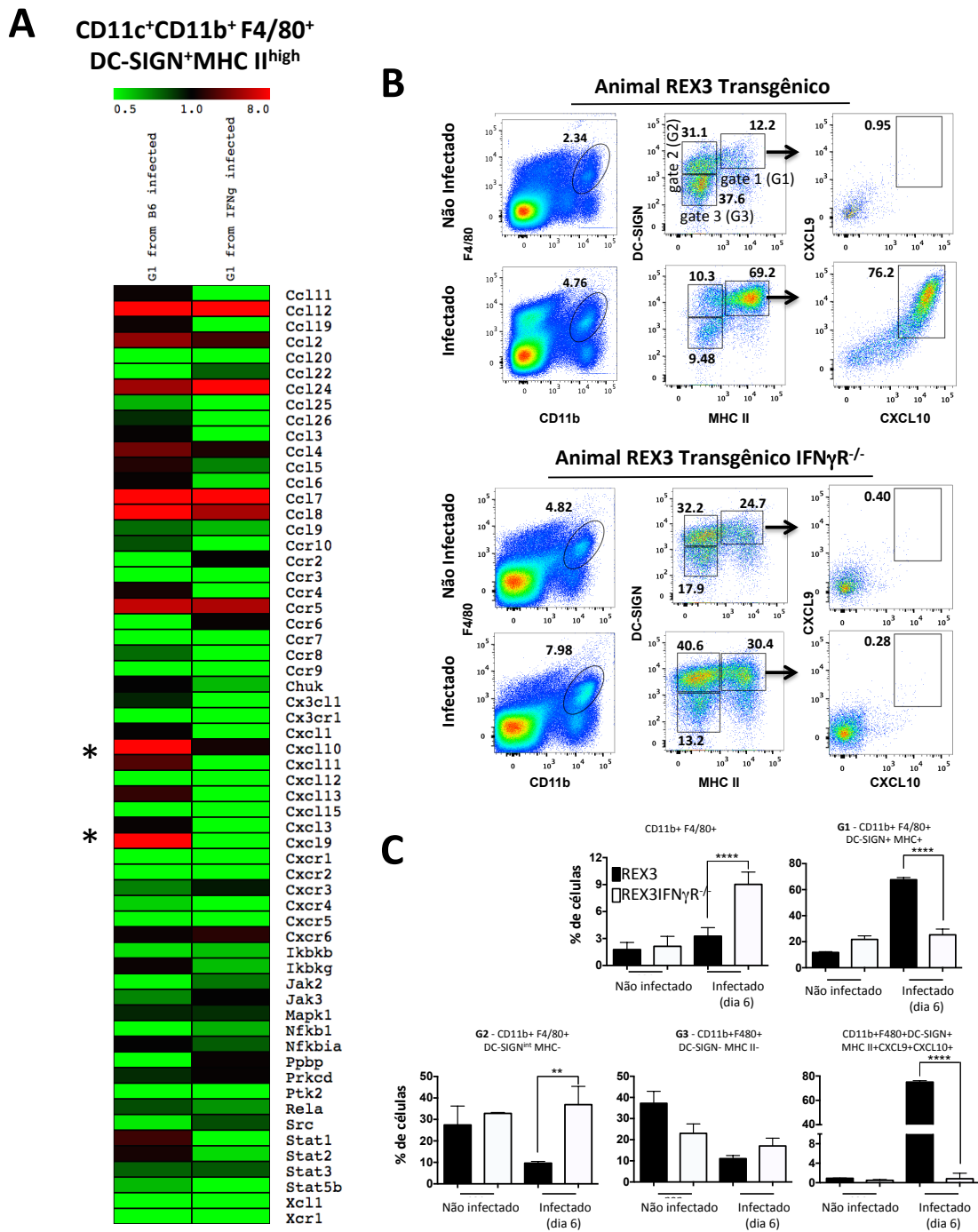
Posteriormente, células MO-DCs foram avaliadas no sistema nervoso central (SNC) de animais com MCE. Para analisar a presença de MO-DCs no SNC de animais infectados com *PbA*, células mononucleares do cérebro (CMNC) foram discriminadas em hematopoiéticas CD45<sup>high</sup> e micróglia (CD45<sup>interm</sup>). Uma vez que o infiltrado celular na MCE é enriquecido por células T CD8<sup>+</sup>, foi feita uma seleção na janela da população celular CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup>. As células MO-DCs surgem no quinto dia após infecção com *PbA* obtendo um pico no dia 7, o que coincide com a expressão de CXCL9 e CXCL10 e outros mediadores inflamatórios no SNC (**Figura 19A**). Além disso, foi analisada a expressão de CXCL9, CXCL10 e CCR5 em células CMNC de animais infectados com *PbA*. Entretanto, não foi observado o aumento da expressão de CXCL9 e CXCL10 em animais REX3 controle (**Figura 19B**). Em animais REX3 infectados, células BFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup> são CD45<sup>high</sup>. As células CD45<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> são BFP<sup>-</sup>RFP<sup>-</sup>, enquanto aproximadamente 60% de células CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup> são BFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup> (**Figura 19C**). Células CD45<sup>interm</sup> como também CD45<sup>-</sup>, provavelmente micróglia, neuronios/células gliais respectivamente, são ambas *BFP* e *RFP* negativas. Por fim, avaliamos a expressão de CCR2 e CCR5 em MO-DCs do SNC de animais infectados. Os resultados mostrados na **figura 19D** indicam que aproximadamente 60% de células MO-DCs do cérebro de animais infectados, mas não de animais controle, são duplo positivas para CCR2 e CCR5.



**Figura 19. Aumento da frequência de MO-DCs no cérebro de animais infectados com *PbA*.** **A.** MO-DCs (CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>F480<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>) foram quantificados por citometria de fluxo em CMNC isoladas nos dias 0, 6 e 8 após infecção com *PbA*. **B.** CMNC de animais REX3 foram analisadas por citometria de fluxo nos dias 0 e 7 após a infecção. Em MO-DCs, foi feita uma janela em células CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup>. Aproximadamente 70% de células CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup> de animais infectados, mas não de controles, são duplo positivas para CXCL9 e CXCL10, *RFP* e *BFP* respectivamente. Oito por cento de células CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup>CXCL9<sup>+</sup>CXCL10<sup>+</sup> são positivas para CD11b, Ly6C, CD11c e MHCII. CMNC, que são negativas ou expressam níveis baixos de CD45, são negativas para CD8, *RFP* e *BFP*. Resultados representativos da seleção de CD45<sup>high</sup> pela citometria de fluxo são mostrados. **C.** CMNC foram coletadas de animais WT nos dias 0 e 7 após infecção com *PbA* e a expressão de CCR2 e CCR5 foi avaliada em MO-DCs (células CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) por citometria de fluxo. Dados representam a média de três ou quatro animais por grupo e os resultados são representativos de três experimentos independentes. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando \*, p<0,05, e \*\*, p<0,01 como indicado pelo teste *t* student.

#### 5.2.4 IFN $\gamma$ induz a expressão de CXCL9 e CXCL10 em MO-DCs

Estudos recentes tem desmonstrado que IFN $\gamma$  é um importante mediador na diferenciação de MO-DCs<sup>87</sup>. Além disso, ambos IFN $\gamma$  e IFN do tipo I (IFN $\alpha/\beta$ ) estão relacionados com a expressão de CXCL9 e CXCL10 em macrófagos. Com isso, utilizamos animais IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>, o REX3IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, infectados com *PbA*. Primeiramente, foi avaliado o perfil da expressão gênica em MO-DCs purificadas de animais C57BL/6 e IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados. De 98 genes que a expressão foi induzida por *PbA*, 58 (60%) são dependentes de IFN $\gamma$  endógeno. A expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10 induzida pela infecção por *PbA* foi totalmente ausente em MO-DCs de animais IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>, enquanto o aumento da expressão de outros genes, como por exemplo CCR5, CCL7 e CCL8 foi independente de IFN $\gamma$  endógeno (**Figura 20A**). Coerentemente, MO-DCs de REX3, mas não animais REX3IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>, expressaram elevados níveis de *RFP* e *BFP* (**Figuras 20B e 20C**). Avaliou-se também se IFN $\gamma$  é necessário para a diferenciação de MO-DCs. Foi observado um acúmulo de iMOs e uma redução da frequência de MO-DCs em REX3/IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> relativo aos animais REX3 e C57BL/6 infectados com *PbA* respectivamente (**Figuras 20B e 20C**). Estes resultados indicam que a diferenciação do precursor iMOs em MO-DCs é afetada em animais quando o gene *IFN $\gamma$ R* não é funcional.



**Figura 20. Expressão de CXCL9 e CXCL10 por MO-DCs de animais infectados com *Pba* é dependente de IFN $\gamma$ .** Animais C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> ou REX3/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram infectados e seus baços coletados no sexto dia após infecção. **A.** A expressão gênica foi analisada pelo sistema de análise *nCounter*, em RNA total extraído de MO-DCs altamente purificadas (aproximadamente 98% de pureza) do baço de animais C57BL/6 e IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados. Dados são representados por média da expressão gênica de três animais por grupo. **B.** Resultados representativos de citometria de fluxo são referentes a MO-DCs de baço de animais REX3 e REX3IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Primeiramente foi feita uma janela incluindo células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (painéis da esquerda) e depois células DC-SIGN<sup>+</sup>MHCII<sup>high</sup> (painel do meio), e CXCL9 e CXCL10 duplo positivos (painel da direita), respectivamente. As porcentagens de MO-DCs (janela 1, F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>), iMOs (janela 2, F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHCII<sup>-</sup>), MOs (janela 3, F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>-</sup>MHCII<sup>-</sup>) e CXCL9<sup>+</sup>CXCL10<sup>+</sup> MO-DCs estão indicadas. **C.** Frequência das subpopulações de CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> no baço de animais REX3 e REX3IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados. A média e desvio padrão são representativos de experimentos distintos com três ou quatro animais por grupo. Diferenças significativas foram consideradas estatisticamente quando \*\*, p<0.01; and \*\*\*\*, p<0.0001 como indicado pela análise *two-way ANOVA*.

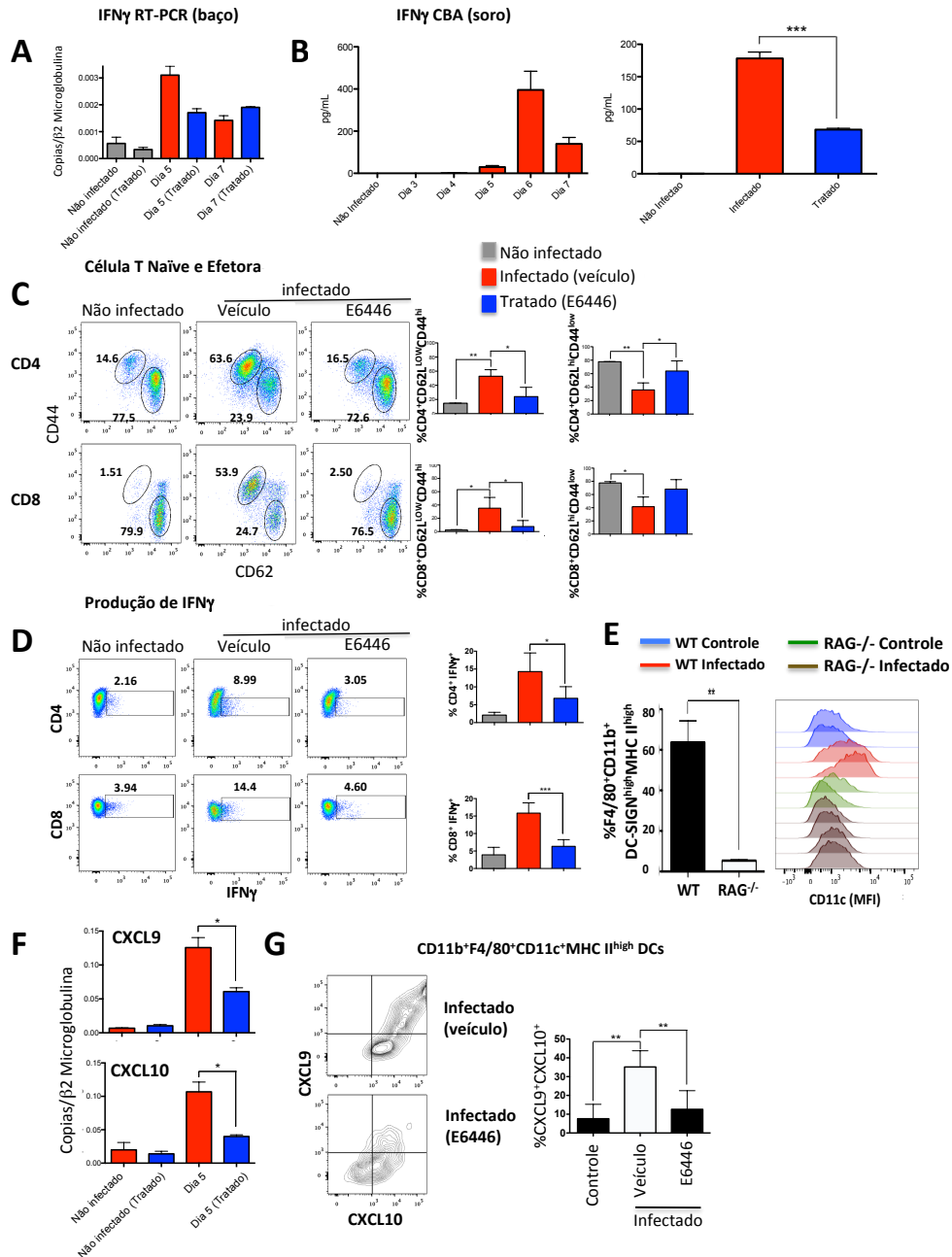
### 5.2.5 TLRs induzem a expressão de CXCL9 e CXCL10 em MO-DCs

Cheong *et al*<sup>86</sup>. demonstrou que o LPS induz a diferenciação de iMOS para MO-DCs. Sabe-se também que a infecção por *Plasmodium* ativa o sistema imune inato primeiramente pela ativação de TLR9 e outros receptores intracelulares que reconhecem ácidos nucleicos<sup>42,57,82,83</sup>. A ativação de TLR9 durante a infecção por *PbA* induz a produção de IL-12 por DCs, culminando na produção de IFN $\gamma$  primeiramente por linfócitos T. Por conseguinte, avaliamos se a infecção por *PbA* induzia a diferenciação de MO-DCs via ativação de TLR. Para tanto, foi utilizado o E6446, um antagonista que previne a ativação de TLR7 e TLR9 por ssRNA e DNA. Os dados mostrados na **Figura 21A** e **21B** mostram que o tratamento com o E6446 inibe a expressão de mRNA de IFN $\gamma$  por esplenócitos e resulta na diminuição de níveis circulantes de IFN $\gamma$  no soro de animais no quinto dia após infecção com *PbA*. Ademais, no quinto dia após infecção, a proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (CD44<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup>) aumentou para 55.5% e 39.9% em animais infectados, quando comparado com 14.7% e 12.2% ou 27.8% e 10.2% em animais controles ou infectados e tratados com E6446, respectivamente (**Figura 21C**).

A porcentagem de células T não ativadas (CD44<sup>low</sup>/CD62L<sup>high</sup>) foi inversalmente proporcional a células ativadas e observou-se uma redução de 32.9% de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e 37.3% de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em animais infectados, quando comparado com 77.7% e 78.1% dos controles e 59.6% e 64% em animais infectados e tratados com E6446, respectivamente. Da mesma forma, o E6446 inibiu a expressão de IFN $\gamma$  tanto por linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto por linfócitos T CD8<sup>+</sup> de animais infectados. Os resultados apresentados na **Figura 21D** foram obtidos usando o camundongo *GREAT* que expressa o gene *YFP* no promotor IFN $\gamma$ . A expressão de YFP por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> aumentou, respectivamente, de 2.16% para

8.99% e 3.94% para 14.4%, quando comparado animais controle com infectados. Nos animais *GREAT* infectados com *PbA* e tratados com E6446 somente 3.05% e 4.60% de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressaram YFP, respectivamente. Para avaliar a contribuição de células NK para a diferenciação de MO-DCs, foi utilizado animais *RAG*<sup>-/-</sup>, o qual é deficiente em linfócitos T. Foi observado em animais *RAG*<sup>-/-</sup> infectados, que iMOS não se diferenciaram em MO-DCs. Estes resultados indicam que IFN $\gamma$  e/ou outros sinais provenientes de células NK não são o suficiente para promover a diferenciação de MO-DCs (**Figura 21E**). Como consequência da inibição da produção de IFN $\gamma$  por linfócitos T, o tratamento com E6446 também inibiu a expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10 (**Figura 21F**) bem como *RFP* (CXCL9) e *BFP* (CXCL10) por MO-DCs de animais REX3 infectados (**Figura 21G**).

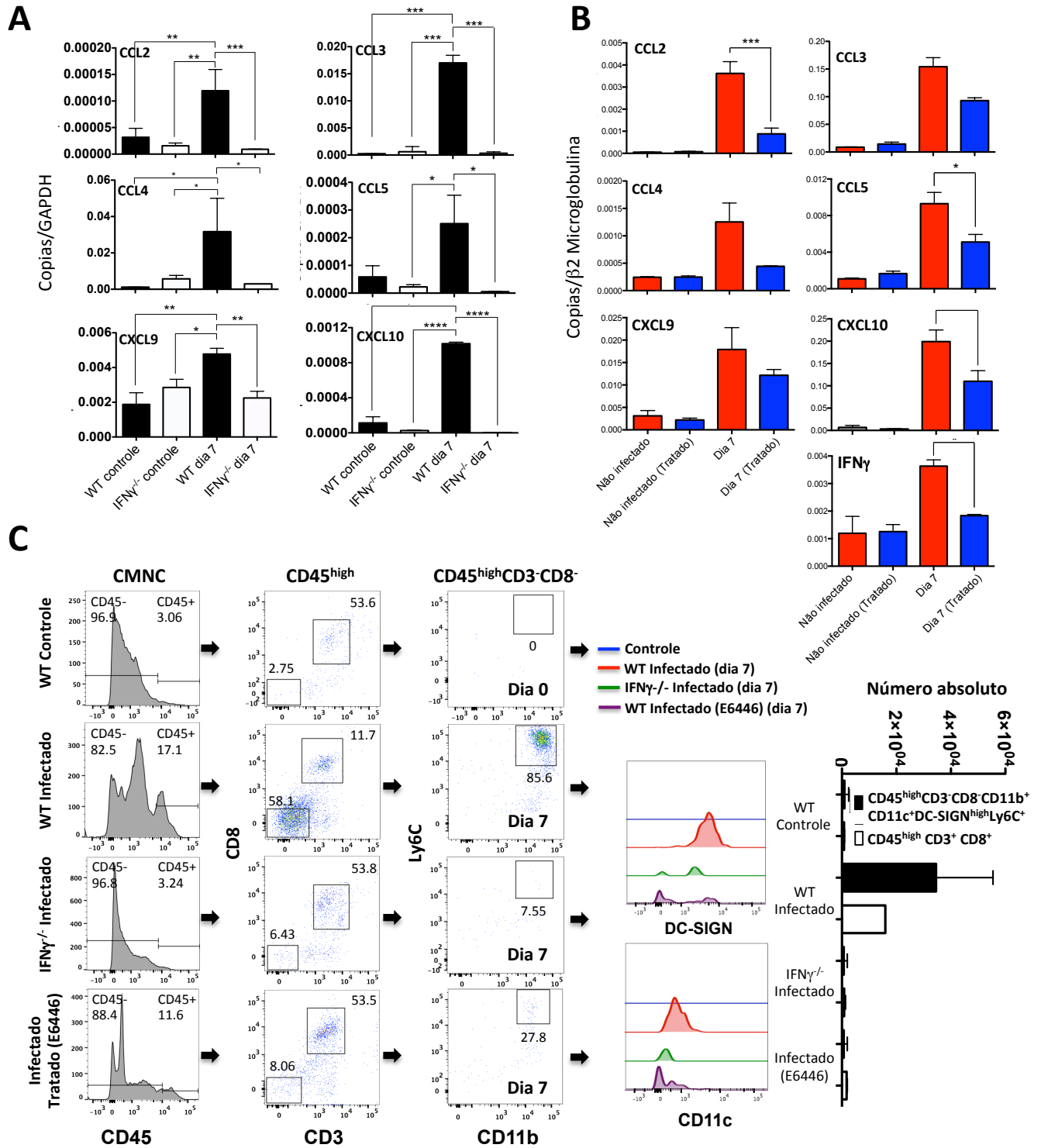




**Figura 21. Tratamento com E6446 inibe a expressão de IFN $\gamma$  por linfócitos T bem como de CXCL9 e CXCL10 em MO-DCs.** Animais C57BL/6, GREAT, e REX3 foram infectados com *PbA* e tratados com E6446 (120 mg/Kg/dia) ou veículo do dia -1 a 3 após infecção. **A.** Baços foram coletados de animais WT nos dias indicados, o RNA total foi extraído e os níveis de expressão de mRNA de IFN $\gamma$  foram analisado por qPCR. Resultados foram normalizados pela expressão de RNA de  $\beta 2$  microglobulina. **B.** Soro de animais C57BL/6 infectados foi coletado em diferentes tempos após infecção e usado para medir IFN $\gamma$  por CBA. O efeito inibitório de E6446 em níveis circulantes de IFN $\gamma$  foi avaliado no sexto dia após infecção (painel da direita). **C.** Animais C57BL/6 foram tratados ou não com E6446 e os baços foram coletados no quinto dia após infecção. Gráfico de barras correspondem a porcentagem de células *naïve* (CD62L<sup>high</sup>CD44<sup>low</sup>) por células efetoras ativadas (CD62L<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>) CD4<sup>+</sup> T (painéis superiores) e CD8<sup>+</sup> T (painéis inferiores). **D.** Esplenócitos de animais GREAT infectados foram estimulados com PMA (50 ng/mL) e ionomicina (500 ng/mL) por quatro horas em cultura contendo brefeldina A e em seguida, submetidos a citometria de fluxo. Células YFP positivas foram consideradas como produtoras de IFN $\gamma$  em células T CD4<sup>+</sup> (painel superior) e células T CD8<sup>+</sup> (painel inferior). **E.** Baços de animais WT e RAG<sup>-/-</sup> infectados com *PbA* ou não foram coletados e a frequência de MO-DCs foi analisada por citometria de fluxo. Painéis da direita e esquerda mostram a frequência de F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> DC-SIGN<sup>high</sup> MHCII<sup>high</sup> e a expressão de CD11c em MO-DCs respectivamente. **F.** qRT-PCR e **G.** análise por citometria de fluxo revelaram que o tratamento com E6446 inibe a expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10 no baço, assim como na expressão de proteínas *RFP* (CXCL9) e *BFP* (CXCL10) em MO-DCs do baço de animais infectados com *PbA* C57BL/6 e REX3 respectivamente. Resultados apresentados nos painéis C,D,E e F são representativos de experimentos distintos com três ou cinco animais por grupo. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 como indicado pelo teste *t student*.

### 5.2.6 O recrutamento de MO-DCs para o SNC em animais infectados com *PbA* é dependente de IFN $\gamma$

Os resultados apresentados nas **figuras 22A e 22B** mostram que a expressão de mRNA relacionado a CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 e IFN $\gamma$  não é observada ou é reduzida no cérebro de animais IFN $\gamma^{-/-}$  infectados com *PbA* ou animais C57BL/6 infectados com *PbA* e tratados com E6446. Uma vez que MO-DCs expressam CCR2 (receptor para CCL2) e CCR5 (receptor para CCL3, CCL4 e CCL5), avaliou-se o surgimento de MO-DCs no cérebro de animais IFN $\gamma^{-/-}$  infectados com *PbA* bem como animais C57BL/6 tratados com E6446. Foi observado que, a migração de MO-DCs para o cérebro de animais IFN $\gamma^{-/-}$  infectados e C57BL/6 tratados com E6446 foi afetada (**Figura 23C**). Consistente com a importância de MO-DCs no recrutamento de linfócitos T CD8 $^{+}$  e o desenvolvimento da MCE, o número de linfócitos T CD8 $^{+}$  foi reduzido, mas não foi ausente no SNC de animais IFN $\gamma^{-/-}$  ou C57BL/6 tratados com E6446, ambos infectados com *PbA*.

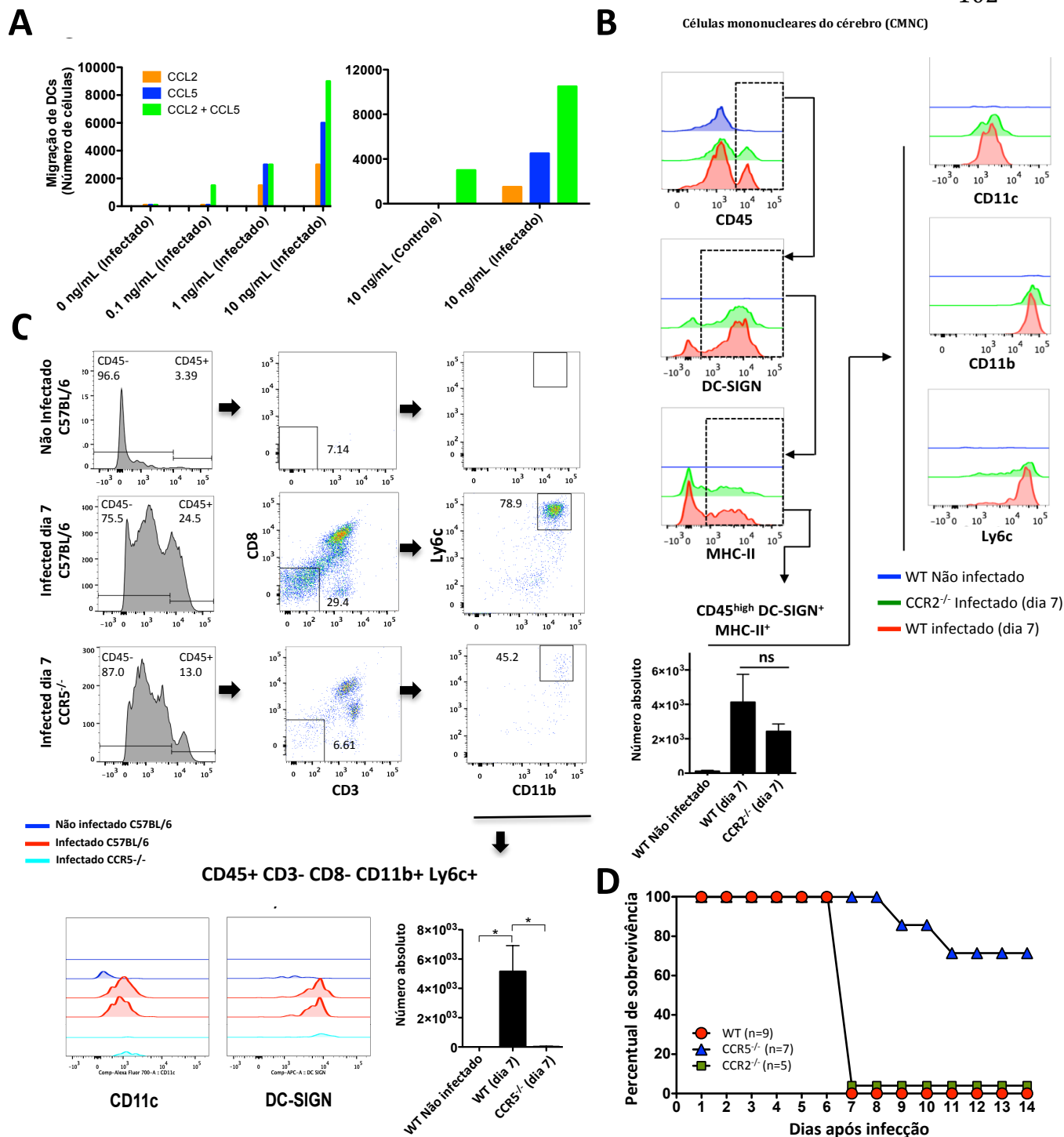


**Figura 22. Expressão de quimiocinas e o surgimento de células hematopoiéticas CD45<sup>high</sup> para o SNC de animais infectados com *Pba* é dependente de IFN $\gamma$ .** A expressão de mRNA de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 e IFN $\gamma$  foi analisada no cérebro de animais controles ou infectados com *Pba* (7 dias após a infecção). **A.** Análise gênica em animais IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> e C57BL/6 controles ou infectados com *Pba* (7 dias após a infecção). **B.** Animais C57BL/6 controles, infectados (7 dias após a infecção), tratados com E6446 (120 mg/kg/dia) ou veículo. O RNA total foi extraído e os níveis de expressão de mRNA foram analisado por qPCR. Resultados foram normalizados pela expressão de RNA de  $\beta 2$  microglobulina. **C.** Análise por citometria de fluxo de MO-DCs do cérebro (CD45<sup>high</sup> CD3<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> DC-SIGN<sup>+</sup>) de animais controles ou infectados com *Pba*, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> ou C57BL/6 tratados ou não com E6446. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 como indicado pela análise *two-way ANOVA*.

### 5.2.7 O recrutamento de MO-DCs para o SNC em animais infectados com *PbA* é dependente de CCR5

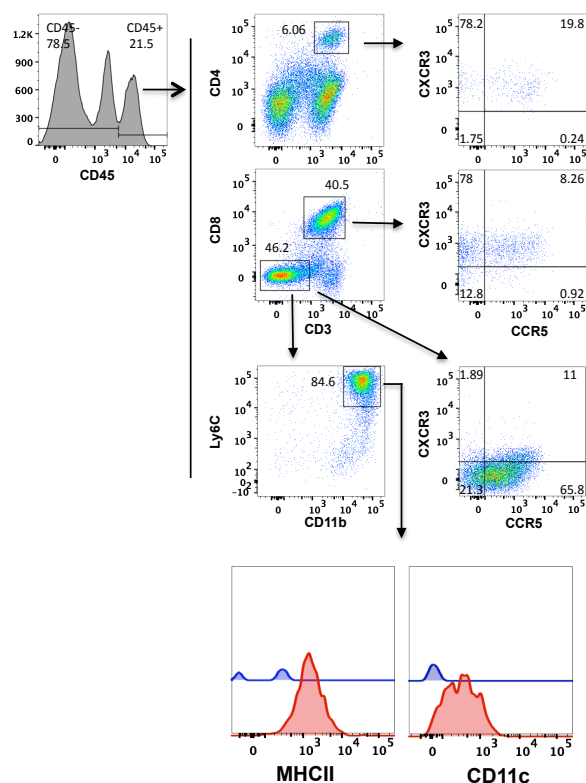
Hipotetizou-se que CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 são responsáveis pelo recrutamento de MO-DCs para o SNC de animais infectados com *PbA*. Nos resultados apresentados na **Figura 23A**, indicam que MO-DCs migram através de ambos gradiente de CCL2 ou CCL5, embora CCL5 mostrou-se mais eficiente. Também foi observado um efeito aditivo das duas quimiocinas. Como CCL2 e CCR2 são importantes no recrutamento de iMOS durante a infecção com *Toxoplasma gondii* and *P. chabaudi*<sup>77,85</sup>, avaliou-se o papel de CCR2 no desenvolvimento da MCE. O número de MO-DCs no SNC de animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados com *PbA*, foi marginalmente reduzido (**Figura 23B**). Além disso, a frequência e o número de MO-DCs no SNC de animais CCR5<sup>-/-</sup> infectados com *PbA* foram drasticamente reduzidos (**Figura 23C**). Consistente com o número de MO-DCs no SNC, animais CCR5<sup>-/-</sup>, mas não CCR2<sup>-/-</sup>, foram mais resistentes ao desenvolvimento da MCE que os animais WT infectados com *PbA* (**Figura 23D**). Mais de 80% de MO-DCs no SNC de animais C57BL/6 infectados expressaram CCR5. Entretanto, menos de 10% de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressaram CCR5, enquanto mais de 90% expressaram CXCR3 (**Figuras 24A e 24B**). Consequentemente, hipotetizou-se que CCR5 é um receptor chave para o recrutamento de MO-DCs para o SNC enquanto CXCR3 e seus ligantes CXCL9 e CXCL10 são responsáveis por atrair linfócitos T. Por fim, foram realizado experimentos *in vivo* para avaliar o papel de CCR5 no recrutamento de MO-DCs para o SNC. Células MO-DCs purificados de baços de animais WT ou CCR5<sup>-/-</sup> infectados com *PbA* foram transferidas para animais WT no quinto dia após a infecção e a migração de MO-DCs marcadas com CFSE foi avaliada por 15 a 60 min após a transferência celular. Foi observado um aumento na frequência de

células MO-DCs de animais WT na microvasculatura e no parênquima do SNC. Células MO-DCs de animais CCR5<sup>-/-</sup> infectados com *PbA* foram menos eficientes na migração para o SNC de animais WT infectados. Nenhuma migração de MO-DCs foi observada para o SNC de animais controles ou não infectados (**Figura 24C**).

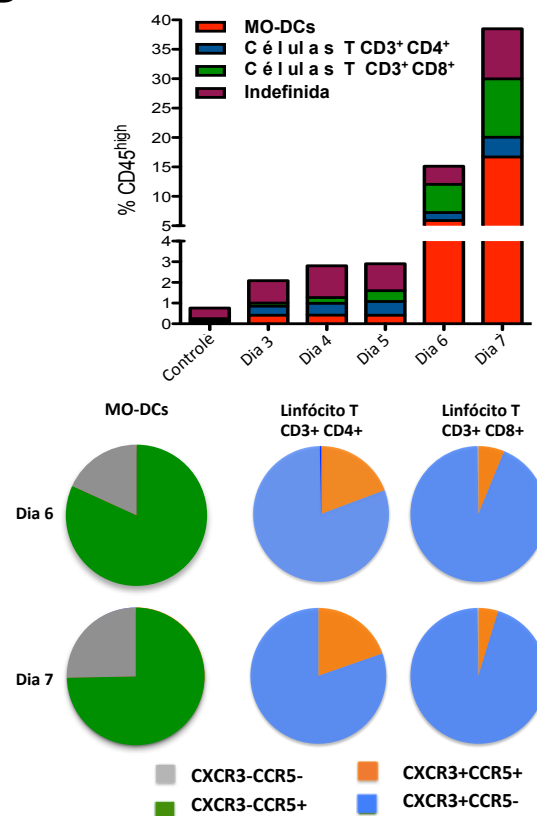


**Figura 23. Aumento da resistência de animais CCR5<sup>-/-</sup> ao desenvolvimento da MCE.** **A.** Migração *in vitro* de células MO-DCs para diferentes concentrações de CCL2, CCL5 ou a combinação de ambos. **B.** Análise por significante na frequência e número absoluto de CD45<sup>high</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>F480<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> no cérebro de animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados com *PbA*. **C.** Análise por citometria de fluxo de MO-DCs no SNC em animais WT e CCR5<sup>-/-</sup> infectados com *PbA*. A frequência de CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> é significativamente menor no cérebro de animais CCR5<sup>-/-</sup> infectados com *PbA*. Resultados representativos da citometria de fluxo são apresentados após a janela em CD45<sup>high</sup> para leucócitos, excluindo células CD46<sup>interm</sup> e CD45<sup>-</sup>. **D.** Curva de sobrevivência de animais C57BL/6, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR5<sup>-/-</sup> infectados com *PbA*. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com três a cinco animais por grupo. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando \*  $p < 0,01$  como indicado pelo teste *t student*. A curva de sobrevivência foi analisada pelo teste *log-rank* e animais CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram-se mais resistente a infecção por *PbA*, quando comparado com animais CCR2<sup>-/-</sup> ou WT ( $p < 0,01$ ).

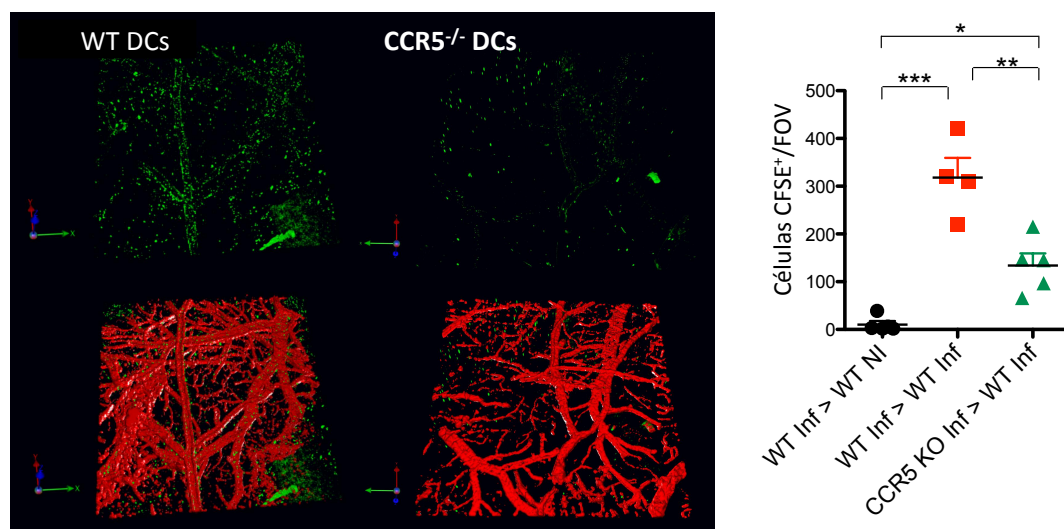
A



B



C



**Figura 24. Migração de células MO-DCs para o SNC de animais infectados com *PbA* é dependente de CCR5.** **A.** Análise por citometria de fluxo de células MO-DCs e linfócitos T expressando CXCR3 bem como CCR5 no SNC de animais infectados com *PbA*. CMNC de animais infectados com *PbA* obtidas na janela inicial CD45<sup>high</sup> e então CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e analisadas quanto a expressão de CXCR3 e CCR5. Células CD45<sup>high</sup> foram selecionadas em CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> e logo após analisadas quanto a expressão de CCR5. **B.** Gráficos superiores mostram a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> bem como MO-DCs no cérebro de animais C57BL/6 em diferentes tempos após infecção com *PbA*. Painéis inferiores mostram a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando CXCR3 e CCR5, e também MO-DCs expressando CCR5. **C.** Imagens *in vivo* de MO-DCs no SNC de animais infectados com *PbA*. Células MO-DCs enriquecidas foram obtidas de animais WT e CCR5<sup>-/-</sup> no quinto dia após infecção, coradas com CFSE e transferidas para animais WT infectados e controles. A presença de células marcadas com CFSE foi detectada na microvasculatura e no parênquima cerebral por microscopia confocal entre 15 a 60 min após o inóculo das células pelo plexo orbital. Os resultados são representativos de quatro experimentos independentes. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando \*  $p < 0,01$  como indicado pelo teste *t student*.

## **6 DISCUSSÃO**



## 6 DISCUSSÃO

A malária é uma das doenças mais importantes do mundo, e afeta aproximadamente 200 milhões de pessoas por ano, causando altas taxas de morbidade e mortalidade em aproximadamente meio milhão de crianças anualmente<sup>66</sup>. O paroxismo, uma das principais respostas fisiopatológicas à infecção por *Plasmodium*, é caracterizado por ciclos agudos de febre alta acompanhada por calafrios, que coincidem com a ruptura sincronizada de glóbulos vermelhos (hemácias) e a liberação de parasitas. Embora a febre possa ajudar na defesa, retardando o crescimento de agentes patogênicos, ela também está associada a diversos processos patológicos, tais como sintomas associados a sepse como cefaleia, mialgia, letargia, assim como insuficiência respiratória e manifestações neurológicas que causam morbidade e mortalidade na malária<sup>20</sup>.

O objetivo geral desta tese foi o de estudar os mecanismos pelos quais a infecção com *Plasmodium* ativa o sistema imune inato, levando a inflamação sistêmica e tecidual, que causam muitos dos sintomas e sinais da malária. Em primeiro lugar, utilizando amostras de pacientes com malária, interrogamos sobre o papel pró-inflamatório de ICs durante malária. Em um segundo capítulo, estudamos a diferenciação e o papel de células MO-DCs na malária cerebral murina. De uma maneira geral nossos estudos indicam que a ativação de monócitos e DCs por IFN $\gamma$  endógeno e ácido nucleicos do parasita tem um importante papel na ativação do sistema imune inato e na patogênese da malária.

### 6.1 Papel dos ICs na ativação das células do sistema imune inato

Os ICs são considerados parte da defesa imunitária contra antígenos solúveis. Sua formação se dá quando anticorpos policlonais se ligam a antígenos polivalentes gerando um amplo complexo antígeno-anticorpo. São consequências inevitáveis de uma resposta imune efetiva, no intuito de eliminar patógenos. Em alguns casos, a formação excessiva de leva a sua deposição em tecidos com sequelas devido a atividade pro-inflamatória dos ICs. A eliminação de ICs é um processo delicado, e sua retenção nos tecidos está associada a uma variedade de doenças de cunho inflamatório, devido a fixação de complemento e ativação de células do sistema imune inato através de receptores  $Fc\gamma$ <sup>49,51</sup>.

LES é considerado uma doença autoimune que apresenta altos níveis de ICs circulantes, principalmente contra antígenos nucleares próprios, tais como histonas e ácidos nucléicos, principalmente DNA de cadeia dupla (dsDNA). Estes ICs são depositados em órgãos, mantendo uma resposta inflamatória, o que leva a sintomatologia da doença<sup>48</sup>.

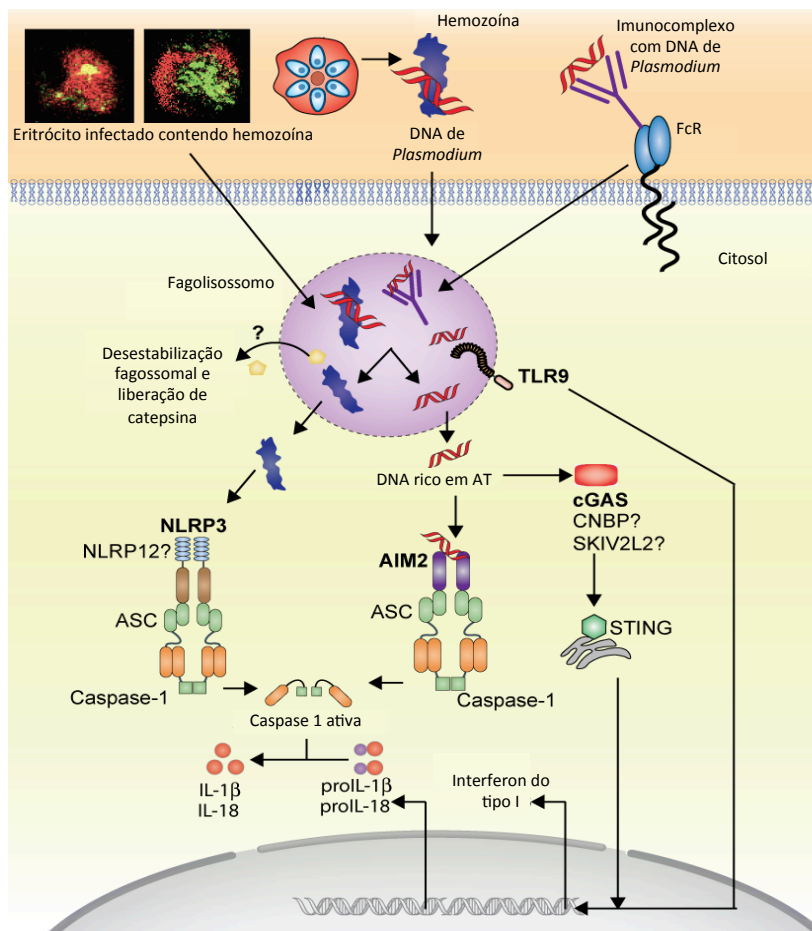
Tendo em vista a importância de ácidos nucléicos na formação de ICs e na ativação de células da imunidade inata, torna-se importante o estudo do papel deste agregado molecular na patogênese da malária. O DNA e o RNA derivado do *Plasmodium* estimulam TLRs e receptores citosólicos que ativam TBK1, STING e via IRF3, além de induzirem a formação de plataformas multiprotéicas, os inflamassomas. Como consequência, eles ativam tanto a via de transcrição NF- $\kappa$ b quanto IFN do tipo I<sup>44,58</sup>. Contudo, como os ácidos nucléicos do parasita se tornam acessíveis a receptores intracelulares da imunidade inata ainda não é bem compreendido.

Estudos recentes demonstram que a hemozoína, um polímero da molécula heme, formada durante a degradação da hemoglobina pelo parasito e liberada na ruptura de glóbulos vermelhos, tem um papel importante no transporte de DNA para o meio intracelular. A hemozoína nativa se liga ao DNA do *Plasmodium* carreando para o fagolisossoma de células fagocíticas, quando é fagocitada por monócitos, macrófagos e células dendríticas. Deste modo, ao atingir o compartimento endossomal o DNA do parasito ativa o TLR9. Além disso, os cristais de hemozoína desestabilizam a membrana do fagolisossomo, liberando o seu conteúdo, que inclui ácidos nucleicos do parasito, para o citosol da célula do hospedeiro, culminando na formação de inflamassomas e ativando outros receptores citosólicos que reconhecem DNA e RNA<sup>42,43</sup>.

Além disto, a fagocitose de glóbulos vermelhos infectados também pode resultar na liberação de hemozoína e ácidos nucleicos do parasito no fagolisossomo e, conseqüentemente, culminando da ativação dos TLRs e receptores da imunidade inata citosólicos. Portanto, a opsonização por IgG, que medeia com eficácia a fagocitose de glóbulos vermelhos infectados bem como componentes do parasito, deve contribuir para a ativação da imunidade inata durante a malária. O papel dos anticorpos como carreadores de componentes do parasito para o interior de células fagocíticas, quer seja através formação de ICs ou opsonização de glóbulos vermelhos infectados parecem ser especialmente relevantes na infecção com *P. vivax*, uma vez que na infecção com esta espécie do *Plasmodium* a parasitemia e o nível de depósitos de hemozoína são bem menores que na infecção com *P. falciparum*<sup>43</sup>.

Os resultados apresentados nesta tese, indicam como previamente descrito para o LES<sup>48,67,68</sup>, que ICs presentes na circulação de pacientes com malária contém

DNA, do parasita, e estimulam monócitos a expressar uma assinatura transcricional induzida pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Além disso, observamos que os ICs isolados do soro de pacientes com malária causada por *P. vivax* ou *P. falciparum* induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos inflamatórios. Neste estudo, também observamos que ICs, purificados de pacientes com malária, induzem a formação de inflamassomas contendo NLRP3 e ASC bem como AIM2 e ASC em monócitos humanos. Sendo assim, hipotetizamos que ICs dos pacientes com malária se ligam a receptores Fc $\gamma$  e são internalizados, liberando DNA do parasito no fagolisossomos e posteriormente no citosol de monócitos, onde eles ativam TLRs endossomais e AIM2, respectivamente. A indução e a formação de inflamassomas e a ativação de caspase-1 requer a ativação da via NF- $\kappa$ B, por exemplo, por agonistas de TLR ou citocinas, que levam a expressão dos componentes do inflamassoma (NLRs, pró-caspase-1 e pró-IL1 $\beta$ )<sup>69</sup>. Acreditamos que, de forma análoga a hemozoína, os ICs circulantes em pacientes com malária transportam DNA do *Plasmodium*, irá ativar os TLRs endossomais, tais como TLR7, TLR8 e TLR9, servindo como primeiro sinal para a indução de inflamassomas. Simultaneamente, os ICs induzem instabilidade na membrana de fagolisossomos e liberam seus componentes no citosol da células, induzindo a formação de inflamassomas como NLRP3 e AIM2 em monócitos humanos.



**Figura 25. Ativação de receptores da imunidade inata por hemozoína (Hz) ou imunocomplexos (ICs).** Internalização de Hz ou ICs resulta na liberação de DNA do parasito no fagolisossomo, onde haverá a ativação de TLR9. Hz e ICs desestabilizam a membrana do fagolisossomo liberando o seu conteúdo. No citosol de células hospedeiras, os cristais de Hz e ICs ativam NLRP3, enquanto o DNA do parasito ativa AIM2 e cGAS. A ativação destes receptores da imunidade inata resulta na expressão de genes que codificam IFN do tipo I e de outras citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-18 e TNF- $\alpha$ ). A ativação destas vias da imunidade inata é a base da inflamação sistêmica, sintomas e sinais da malária.

Os monócitos constituem uma população de células heterogêneas, constituindo a primeira linha de defesa contra microrganismos. Estas células podem ser distinguidas pela expressão de CD14<sup>24</sup>. Diferentes membros da família dos receptores Fc $\gamma$  podem estar com a expressão aumentada ou diminuída durante os processos infecciosos. Por exemplo, a ativação de FC $\gamma$ RIIIA (CD16a) ou FC $\gamma$ RI (CD64) promove uma resposta pro-inflamatória, aumentando a capacidade de endocitose e fagocitose de ICs, enquanto FC $\gamma$ RIIB (CD32) leva a uma resposta anti-

inflamatória. Sendo assim, a sinalização simultânea de ativação e inibição de receptores  $Fc\gamma$  define um limiar para a ativação celular impedindo uma resposta inflamatória excessiva. De acordo com os resultados encontrados, após estímulo com ICs, monócitos  $CD14^+ Fc\gamma RI(CD64)^+ CD16(Fc\gamma RIIIA)^+ CD32(Fc\gamma RIIB)^{low}$  são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com malária<sup>49,51</sup>. Deste modo, o aumento da expressão de  $Fc\gamma RI$  e  $Fc\gamma RIIIA$  associada a uma diminuição da expressão de  $Fc\gamma RIIB^+$  em monócitos de pacientes com malária parece tender a uma produção excessiva de citocinas e a uma resposta inflamatória sistêmica.

Além disso, as citocinas são também de grande importância para determinar a capacidade de ICs de estimular respostas pro-inflamatórias ou anti-inflamatórias<sup>49</sup>. Por exemplo, dependendo da forma clínica da doença, a infecção com *Leishmania* induz uma resposta pró-inflamatória ou anti-inflamatória caracterizadas por produção elevada de  $TNF\alpha/IFN\gamma$  ou IL-10, respectivamente<sup>70</sup>. Observamos que em pacientes com malária na fase aguda, ICs induzem monócitos a produzirem altos níveis de  $TNF\alpha$  e IL-1 $\beta$  e baixos níveis de IL-10. Este padrão na produção de citocinas muda para anti-inflamatório após o tratamento e cura parasitológica do indivíduo. Da mesma forma, monócitos de doadores saudáveis estimulados com ICs produzem elevados níveis de IL-10 e baixos níveis de  $TNF\alpha$  e IL-1 $\beta$ , enquanto após a sensibilização com  $IFN\gamma$ , a produção de citocinas pró-inflamatórias se torna dominante. Como demonstrado em nossos estudos, a citocina  $IFN\gamma$  promove a expressão de CD64, enquanto inibe a expressão de CD32. Além disto, a um aumento na frequência dos monócitos  $CD16^+$  na circulação de pacientes com malária aguda, explicando em parte a mudança funcional destas células durante a malária.

É importante mencionar que em estudos prévios, observou-se que crianças africanas com malária grave, infectadas com *P. falciparum*, apresentaram níveis elevados de ICs circulante, quando comparado com adultos ou crianças com a doença moderada<sup>71</sup>. Além disso, trabalhos mostram que adultos sintomáticos bem como crianças africanas infectadas com *P. falciparum* são hiper responsivos a agonistas de TLR, como por exemplo CpG<sup>23,72</sup>. Por outro lado, indivíduos imunes na África, que estão continuamente expostos ao *P. falciparum*, são mais tolerantes a doença e menos responsivos a agonistas de TLR9<sup>73</sup>, e portanto, devem ser menos responsivos a ICs contendo DNA que estão em altos níveis na circulação de pacientes com malária. Concluindo, muitos sinais e sintomas da malária são resultado da ativação excessiva de células da imunidade inata. Nossos dados fornecem evidências que ICs são de grande importância neste processo.

Apesar das diferentes manifestações clínicas e etiologia, existem similaridades entre a malária e o lúpus eritematoso sistêmico (LES). Em ambas as doenças, DNA e RNA são responsáveis por ativar receptores da imunidade inata e induzir inflamação sistêmica<sup>42,43,44</sup>. A ativação de sensores de ácidos nucleicos via TLRs pode ser patogênica ou conferir proteção, tanto no LES quanto na malária<sup>45</sup>. Da mesma forma, o TNF $\alpha$ , citocina induzida pela ativação de TLRs pode mediar resistência ou patogênese, seja no LES, seja na malária<sup>46,47</sup>. Curiosamente, por muitas décadas, diferentes medicamentos contra a malária têm sido utilizados regularmente no tratamento do LES, como por exemplo a cloroquina. O mecanismo de ação destas drogas caracteriza-se por elevar o pH de lisossomas e, por conseguinte, previne a ativação de TLRs endossomais, isto é TLR7, TLR8 e TLR9<sup>46</sup>. É de grande importância a compreensão de como os ácidos nucleicos têm acesso aos TLRs endossomais para o entendimento da patogênese do LES e da malária.

No LES, imunocomplexos (ICs) contendo anticorpos patogênicos anti-DNA de dupla fita podem ser importantes transportadores de DNA e RNA humano para o compartimento intracelular de células B e fagócitos, onde ativam TLRs endossomais e outros sensores citosólicos de DNA. É importante ressaltar que elevados níveis de ICs, também são encontrados em pacientes com malária<sup>36,45,48</sup>. Contudo, a importância de ICs contendo DNA na ativação de células da imunidade inata e patogênese da malária é desconhecida.

A família de receptores Fc $\gamma$  pode ser classificada de acordo com a homologia estrutural, afinidade e especificidade às subclasses de IgG, expressão nas células e funções biológicas, obtendo um papel importante na internalização de ICs por células do sistema imune inato. Uma vez ligado à porção Fc de IgGs, estes receptores podem ser classificados como receptores de ativação (Fc $\gamma$ RI - CD64, Fc $\gamma$ RIII - CD16) ou de inibição (Fc $\gamma$ RII - CD32). Isso resulta na sua capacidade de estimular ou inibir funções como fagocitose, citotoxicidade, degranulação, apresentação de antígenos e produção de citocinas via ITAM (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) ou ITIM (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*)<sup>49</sup>.

De acordo com as funções biológicas e localização no cromossomo, os receptores Fc $\gamma$  podem estar relacionados à suscetibilidade ao LES. Um grande número de polimorfismos tem sido descrito entre as sequências gênicas que codificam os receptores Fc $\gamma$ RIIa, IIb e IIIb. Além do mais, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) observados nestes genes apresentam funções biológicas diferentes entre os genótipos encontrados<sup>49,50</sup>.

A incidência de LES é, em média, três vezes maior em populações africanas ou asiáticas que em caucasianos. Nestas populações observa-se uma maior



frequência de homozigose associada a Fc $\gamma$ RIIB<sup>T232</sup>. Essa alteração é comumente encontrada em regiões endêmicas de malária. Uma disfunção em Fc $\gamma$ RIIB pode resultar numa vantagem para a sobrevivência contra a doença. Em humanos, a expressão de Fc $\gamma$ RIIB<sup>T232</sup> aumenta a fagocitose de eritrócitos infectados com *P. falciparum* opsonizados por macrófagos *in vitro*. Além disso, a homozigose para Fc $\gamma$ RIIB<sup>T232</sup> está associada a uma proteção considerável contra a malária grave em crianças do Kênia. Portanto, a perda da função do polimorfismo no gene que codifica o Fc $\gamma$ RIIB, protege contra a malária porém, aumenta a suscetibilidade ao LES<sup>51</sup>. Contudo, estudos sugerem que os ICs parecem ter um importante papel na patogênese da malária.

## 6.2 Papel de monócitos e DCs durante a malária

As DCs e iMOS desempenham papéis importantes na resistência ao *Plasmodium* e patogênese da malária. De fato, há uma distribuição dinâmica dos iMOS e subpopulações de DCs no baço de animais com infecção aguda, que varia de acordo com o tempo de infecção, espécie do *Plasmodium* e sua virulência<sup>63</sup>. iMOS e DCs podem internalizar e destruir os glóbulos vermelhos infectados no baço e mediar a resistência à infecção *P. chabaudi* em camundongos. Além disso, as DCs durante a fase eritrocítica na infecção por *P. chabaudi* são capazes de produzir elevados níveis de IL-12 que induzem a produção de IFN $\gamma$  por linfócitos T e células NK. Por sua vez, IFN $\gamma$  ativa os macrófagos, e estes produzem metabólitos potencialmente tóxicos, tais como espécie reativa de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), que mediam a resistência do hospedeiro à infecção por *Plasmodium* em camundongos<sup>74</sup>.

Os iMOS e DCs também desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória deletéria e patogênese da malária em roedores. As DCs promovem o aumento de citocinas no sangue e perda de peso em animais infectados com *P. chabaudi*<sup>55</sup>. Tanto iMOS quanto DCs são necessárias para o recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> e o desenvolvimento da neuroinflamação observada na malária murina<sup>65,75,76</sup>. No modelo da MCE, observamos que a maioria das células CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>high</sup> no baço de animais infectados com *PbA*, também é DC-SIGN<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>, consistente com o fenótipo de MO-DCs. Em estudos prévios utilizando o modelo murino com *P. chabaudi*, observou-se em iMOS, a baixa expressão de CD11c, bem como uma redução na frequência de células CD11c<sup>+</sup> que são CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup><sup>77,78</sup>. Os resultados apresentados nesta tese sugerem que em animais infectados com *PbA*, iMOS e MOs esplênicos são progenitores das MO-DCs. Ao passo que a frequência e o número de MO-DCs estão aumentadas significativamente, os mesmo parâmetros para iMOS e MOs estão diminuídos, entre as células CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> do baço de animais infectados com *PbA*. Ademais, a população de células MO-DCs apresentam variações na expressão de Ly6C. Enquanto iMOS são classicamente Ly6C<sup>high</sup>, propomos que células Ly6C<sup>high</sup> MO-DCs são recentemente diferenciadas, enquanto Ly6C<sup>low</sup> MO-DCs são totalmente diferenciadas. Notavelmente, determinamos que células MO-DCs induzidas pela malária, e não iMOS ou MOs, expressam elevados níveis de CCR5, CXCL9 e CXCL10 que são de grande relevância para o desenvolvimento MCE.

Após estímulo microbiano por meio de TLRs ou citocinas, iMOS podem se diferenciar em macrófagos ou MO-DCs, migrando para órgãos linfóides e não linfóides<sup>67,79</sup>. O IFN $\gamma$  tem um papel fundamental na resistência do hospedeiro à infecção por *Plasmodium*. Além disso, é um importante mediador na patogênese da

malária. O aumento de IFN $\gamma$  circulante durante a infecção por *Plasmodium*, leva a uma sensibilização pró inflamatória que promove a inflamação sistêmica<sup>20</sup>. No caso da MCE, o tratamento com anticorpos neutralizantes anti-IFN $\gamma$  ou a infecção em camundongos IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> com *PbA* impede a neuroinflamação e conseqüentemente a letalidade. Diferentes funções são atribuídas para o IFN $\gamma$  no desenvolvimento de MCE, que inclui o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, bem como o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais da vasculature cerebral<sup>80</sup>. Muito importante para este estudo, animais CXCL9<sup>-/-</sup>, CXCL10<sup>-/-</sup> e CXCR3<sup>-/-</sup> apresentam um infiltrado menos intenso de células T CD8<sup>+</sup> no SNC e são mais resistentes ao desenvolvimento de MCE<sup>81</sup>. De acordo com os nossos resultados, a diferenciação de MO-DCs é prejudicada e a expressão de CXCL9 e CXCL10 é abolida em animais IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> ou IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>. Já a expressão de CCR5 por MO-DCs parece ocorrer independente da produção de IFN $\gamma$ .

Diferentes estudos sugerem que TLR7 e TLR9 são importantes receptores que estão envolvidos na ativação de DCs e na produção de IL-12 e conseqüentemente de IFN $\gamma$ , tanto na malária humana, quanto no modelo murino experimental<sup>42,55,82,83</sup>. No presente estudo observamos que o composto lisossomotrópico (E6446), que se liga ao RNA e DNA e bloqueia a ativação dos receptores TLR7 e TLR9, previne o desenvolvimento da MCE. Quando administrado durante os primeiros três dias de infecção, o tratamento com E6446 inibe a ativação e a produção de IFN $\gamma$  por ambas as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Como consequência, a expressão de CXCL9 e CXCL10 por MO-DC não foi induzida em animais infectados com *PbA* e tratados com E6446. Estes resultados corroboram estudo anterior que mostra que IFN $\gamma$  produzido pelas células T CD4<sup>+</sup> induz a expressão de CXCL9 e

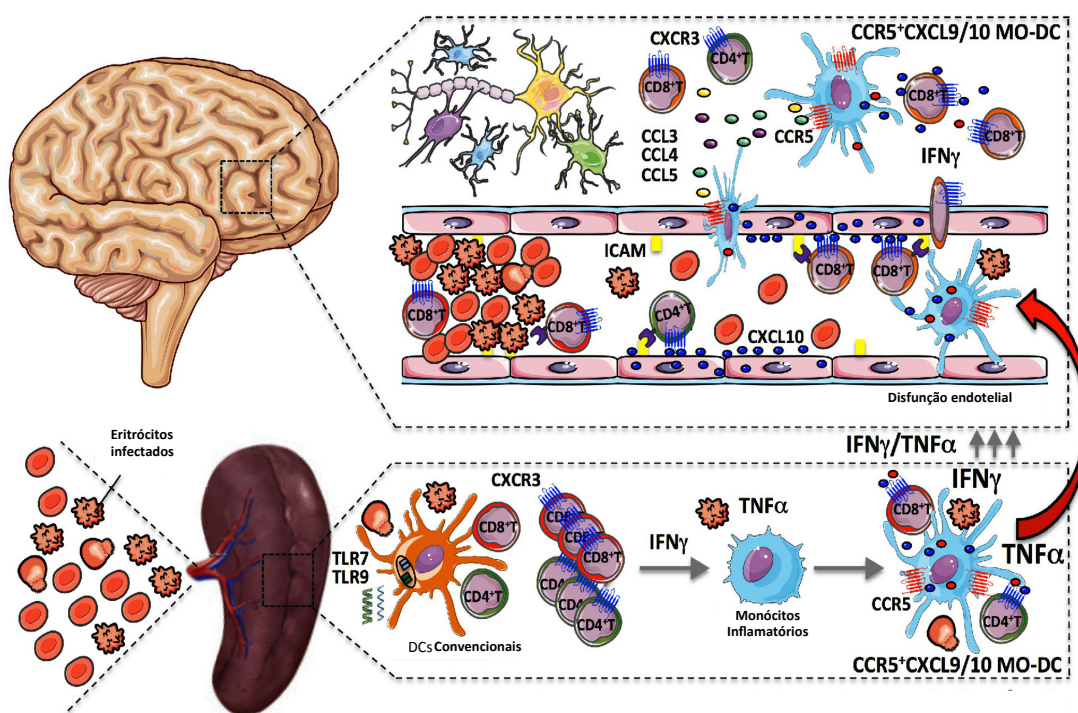
CXCL10 e promove o recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> patogênicas para o cérebro de animais infectados com *PbA*<sup>75</sup>.

No nosso trabalho também observamos o surgimento de MO-DCs CXCL9<sup>+</sup> CXCL10<sup>+</sup> no cérebro de animais infectados com *PbA*. Células hematopoiéticas (CD3<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD45<sup>high</sup>) apresentaram-se em número elevado, sendo que, a maior parte delas, expressa CD11b, F4/80, DC-SIGN, Ly6C, MHC II e CD11c. O aumento da frequência de MO-DCs CCR5<sup>+</sup> CXCL9<sup>+</sup> CXCL10<sup>+</sup> coincidiu com o aumento na expressão de mRNA de CXCL9 e CXCL10 no SNC de animais infectados com *PbA*. Também foi observado que MO-DCs CD45<sup>high</sup> são as principais fontes de CXCL9 e CXCL10 (células RFP<sup>+</sup> BFP<sup>+</sup>) no cérebro de animais REX3 infectados com *PbA*. Sendo assim, MO-DCs CCR5<sup>+</sup> CXCL9<sup>+</sup> CXCL10<sup>+</sup> parecem desempenhar um papel fundamental no recrutamento e ativação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> durante a MCE.

Um questão importante gerada pelos nossos resultados é se MO-DCs diferenciam de iMOS recrutados para o SNC ou se são diretamente recrutados do baço a partir de MO-DCs esplênicos CCR5<sup>+</sup> CXCL9<sup>+</sup> CXCL10<sup>+</sup>. Com base na literatura, salienta-se que tanto iMOS quanto MO-DCs expressam CCR2. Demonstra-se que CCL2 e CCR2 são importantes no egresso de iMOS da medula óssea, baço e na migração para o local da infecção e na resistência do hospedeiro aos protozoários *P. chabaudi* e *Toxoplasma gondii*<sup>84,85</sup>. Contudo, observamos que a frequência de MO-DCs no cérebro de animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados com *PbA* foi marginalmente afetada e a suscetibilidade a MCE não se alterou. É importante ressaltar que, como dito anteriormente, o número total de iMOS no baço foi consideravelmente reduzido em animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados com *PbA*. De acordo com nossos dados, observamos um aumento na população de MOs (CD11c<sup>-</sup> MHCII<sup>-</sup>

DC-SIGN<sup>-</sup>) que se tornaram Ly6C<sup>high</sup> dentro de esplenócitos que são CD11b e F4/80 positivos em animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados com *PbA*. Com isso propomos que em animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados, MOs Ly6C<sup>high</sup> são os principais precursores de MO-DCs.

Em nosso trabalho também observamos que as MO-DCs induzidas pela malária experimental expressam elevados níveis de CCR5. O mesmo não foi observado em iMOS. Animais CCR5<sup>-/-</sup> apresentam mais resistência a infecção por *PbA* porém, o mecanismo pelo qual o CCR5 medeia a MCE não é bem definido. A ausência de CCR5 não teve impacto na diferenciação de MO-DCs no baço, mas afetou claramente o surgimento de MO-DCs no cérebro de animais infectados com *PbA*. Todos os agonistas de CCR5 (CCL2, CCL3 e CCL5) são expressos no cérebro de animais infectados com *PbA* e podem agir em conjunto para recrutar MO-DCs CCR5<sup>+</sup> CXCL9<sup>+</sup> CXCL10<sup>+</sup>. Embora células T CD8<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> não expressem CCR5, sua migração para o cérebro também foi comprometida em animais CCR5<sup>-/-</sup> infectados. Estes resultados são consistentes com a hipótese de um circuito de amplificação entre MO-DCs (fonte importante de ligantes ao CXCR3) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (fonte importante de ligantes CCR5) no recrutamento durante a MCE, como foi recentemente proposto para células monocíticas Ly6C<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup>.



**Figura 26. Células dendríticas derivadas de monócitos (MO-DCs) na malária cerebral experimental.** A infecção com *PbA* leva a ativação de DC convencionais e induz a diferenciação de monócitos inflamatórios (IMOs) por meio de IFN $\gamma$  para MO-DCs do baço que expressam altos níveis de CCR5, CXCL9 e CXCL10 (MO-DCs CCR5+ CXCL9+ CXCL10+). Hipotetizamos que após a diferenciação, MO-DCs CCR5+ CXCL9+ CXCL10+ migram para o sistema nervoso central em resposta aos ligantes de CCR5 (CCL3, CCL4 e CCL5) amplificando o recrutamento de linfócitos T CD8+, iniciado por células endoteliais expressando CXCL10 e promovendo o desenvolvimento de MCE.

Concluindo, como ilustrado na **figura 26** nossos dados são consistentes com o modelo de malária cerebral onde a infecção com *PbA* induz uma diferenciação massiva de MO-DCs no baço, o qual posteriormente emerge no SNC mediando a MCE. A diferenciação e a ativação de MO-DCs no baço é mediada por IFN $\gamma$  e receptores de ácidos nucleicos. Estas células então, migram para o cérebro, de uma forma dependente da expressão de CCR5, levando a um aumento da expressão de CXCL9 e CXCL10 e o recrutamento de linfócitos T patogênicos CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, no SNC de animais infectados com *PbA*.

## **7 CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

Como conclusão, muitos dos sinais e sintomas da malária são resultado da ativação excessiva das células da imunidade inata. O presente trabalho fornece evidências de que ICs são importantes nesse processo. Baseado em nossos resultados, ICs parecem transportar DNA do parasito ao compartimento interior de células do hospedeiro, tornando-os acessíveis aos sensores intracelulares da imunidade inata, incluindo a ativação de inflamasomas e liberação de IL-1 $\beta$ .

Além disso, após se diferenciarem no baço, MO-DCs migram para o cérebro de uma maneira dependente de CCR5 e independente de CCR2, amplificando o influxo de linfócitos T CD8<sup>+</sup> contribuindo para a patogênese da malária, levando a inflamação neurológica letal.



## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

1. Krafts, Hempelmann. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. *Malaria Journal* **12**, 232-245 (2013).
2. Cunha, B.A., Cunha C.B. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J. Vector Borne Dis.* **45**, 194-199 (2008).
3. Centers for disease control and prevention. **The history of malaria, an ancient disease**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/history>. Acesso em: 16 mar 2016.
4. Cox, FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Cox Parasites & Vectors* **3**, 5-14 (2010).
5. Nobel prize. **The nobel prize in physiology or medicine 1907**. Disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1907](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1907). Acesso em: 16 mar 2016.
6. Golgi, C. On the cycle of development of malarial parasites in tertian fever: differential diagnosis between the intracellular parasites of tertian and quartan fever. *Archivio per le Scienze Mediche* **13**, 173-196 (1889).
7. Wagner, J., Bruetsch, W. L. The history of the malaria treatment of general paralysis. *Am. J. Psychiatry* **102**, 577-582 (1946).
8. Nobel prize. **The treatment of dementia paralytica by malaria inoculation**. Disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1927/wagner-jauregg-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1927/wagner-jauregg-lecture.html) Acesso em: 16 mar 2016.
9. Nobel prize. **The nobel prize in physiology or medicine 1902**. Disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1902](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1902). Acesso em: 16 mar 2016.
10. Nobel prize. **Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane and newer insecticides**. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1948/mullerlecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1948/mullerlecture.html). Acesso em: 16 mar 2016.
11. Youyou Tu. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine* **17**, 1217-1220 (2011).
12. Nobel prize. **A novel therapy against malaria**. Disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2015/tu-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/tu-facts.html) Acesso em: 16 mar 2016.
13. Alonso, P. Tanner, M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. *Nature Medicine* **19**, 150-155.
14. World Health Organization: Malaria. WHO, 2015.

15. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, ano de 2015**. Disponível em: <[www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)>. Acesso em 10 fev 2016.
16. Oliveira-Ferreira, J. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal* **9**, 115-130.
17. Silva-Nunes, M. *et al.* Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Tropica* **121**, 281-291 (2012).
18. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília, 2005. 118p.
19. Renaud, F., Michalakis, Y. Evolution in vector control. *Nature* **462**, 298-300 (2009).
20. Gazzinelli, R.T., Kalantari, P., Fitzgerald, K.A. & Golenbock, D.T. Innate sensing of malaria parasites. *Nature rev. Immunol.* **14**, 744-757 (2014).
21. Drakeley, C. *et al.* Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature rev. Microbiol.* **12**, 833-840 (2014).
22. Anstey, N. *et al.* The pathophysiology of vivax malaria. *Trends in Parasitology* **25**, 220-227 (2009).
23. Franklin, B. *et al.* Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 5789-5794 (2009).
24. Antonelli, L.R., *et al.* The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *Plos Pathog.* **10**, e1004393 (2014).
25. Anstey, N. M. *et al.* *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Adv. Parasitol.* **80**, 151-201 (2012).
26. Miller, L. *et al.* Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine* **19**, 156-168 (2013).
27. Clark, I. *et al.* Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal* **5**, 85-117 (2006).
28. Chang, K., Stevenson, M. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int. J. Parasitol* **34**, 1501-1516 (2004).

29. Awandare, G. *et al.* Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. *Am. J. Hematol.* **86**, 155-162 (2011).
30. Buffet, P. *et al.* The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* **117**, 381-394 (2011).
31. Scherf, A., Lopez-Rubio, J. Riviere, L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 445-470 (2008).
32. Idro, R., Jenkins, N. Newton, C. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol.* **4**, 827-840 (2005)
33. Rogerson, S. *et al.* Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 105-117 (2007).
34. Takeuchi, O, Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820 (2010).
35. O'Neil, L., Golenbock, D. Bowie, A. The history of Toll-like receptors – redefining innate immunity. *Nature rev. Immunol.* **13**, 453-460 (2013).
36. Barbalat, R. *et al.* Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 185-214 (2011).
37. Schroder, K. Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell* **140**, 821-832 (2010).
38. Mantel, P. Marti, M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasite. *Cell. Microbiol.* **16**, 344-354 (2014).
39. Orengo, J. *et al.* *Plasmodium*-induced inflammation by uric acid. *Plos Pathog.* **4**, e1000013 (2008).
40. Ferreira, A. *et al.* Sickle hemoglobin confers tolerance to *Plasmodium* infection. *Cell* **145**, 398-409 (2011).
41. Durai, P., Govindaraj, R., Choi, S. Structure and dynamic behavior of toll-like receptor 2 subfamily triggered by malarial glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* **280**, 6196-6212 (2013).
42. Parroche P. *et al.* Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:1919-1924 (2007).
43. Kalantari P., *et al.* Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Reports* **6**, 196-210 (2014).

44. Sharma, S., *et al.* Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity* **35**, 194-207 (2011).
45. Barrat, F.J., Coffman, R.L. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Rev.* **223**, 271-283 (2008).
46. Ronnblom, L., Elkon, K. Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nature rev. Rheumatology* **6**, 339-347 (2010).
47. Grau, G. *et al.* Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* **237**, 1210-1212 (1987).
48. Means T. *et al.* Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* **115**, 407-417 (2005).
49. Nimmerjahn, F., Ravetch, J. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature rev. Immunol.* **8**, 34-47 (2008).
50. Pierre, B. *et al.* Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**, 3716-3725 (2008).
51. Kenneth, G. Smith, K., Clatworthy, M. FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nature rev. Immunol.* **10**, 328-343 (2010).
54. Franke-Fayard, B. *et al.* Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria ? *Plos Pathog* **6**, e1001032 (2010).
55. Franklin, B.S., *et al.* MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* **9**, 881-890 (2007).
56. Adachi, K. *et al.* *Plasmodium berghei* infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J. Immunol.* **167**, 5928-5934 (2001).
57. Franklin, B.S., *et al.* Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3689-3694 (2011).
58. Liehl, P. *et al.* Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. *Nature Medicine* **20**, 47-55 (2014).
59. Miller, J. *et al.* Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Reports* **7**, 436-447 (2014).
60. Geissmann, F., *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656-661 (2010).

61. Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E. & Taylor, P.R. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunol.* **14**, 986-995 (2013).
62. Gordon, S., Pluddemann, A. & Martinez Estrada, F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* **262**, 36-55 (2014).
63. Wykes, M.N. & Good, M.F. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nature rev. Microbiol.* **6**, 864-870 (2008).
64. deWalick, S., *et al.* Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* **178**, 6033-6037 (2007).
65. Pai, S., *et al.* Real-time imaging reveals the dynamics of leukocyte behaviour during experimental cerebral malaria pathogenesis. *Plos Pathog.* **10**, e1004236 (2014).
66. Murray, C. J. *et al.* Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* **379**, 413-431 (2012).
67. Cros, J. *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* **33**, 375-386 (2010).
68. Dean, J. A. *et al.* Control of Toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* **27**, 801-810 (2007).
69. Ataíde, M. A. *et al.* Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *Plos Pathog.* **10**, e1003885 (2014).
70. Elshafie, A. L. *et al.* Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in Sudanese patients with acute visceral *Leishmania donovani* infection undergoing sodium stibogluconate treatment: implications for disease pathogenesis. *J. Immunol.* **178**, 5383-5389 (2007).
71. Thomas, B. *et al.* Circulating immune complex levels are associated with disease severity and seasonality in children with malaria from Mali. *Biomark Insights* **7**, 81-86 (2012).
72. Hartgers, F. C. *et al.* Enhanced Toll-like receptor responsiveness associated with mitogen-activated protein kinase activation in *Plasmodium falciparum*-infected children. *Infect Immun.* **76**, 5149–5157 (2008).
73. Crompton, P. D. *et al.* The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naïve individuals. *J. Immunol.* **182**, 3318–3326 (2009).
74. Ing, R., *et al.* Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J. Immunol.* **176**, 441-450 (2006).
75. Campanella, G.S., *et al.* Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proceedings of*

*the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4814-4819 (2008).

76. deWalick, S., *et al.* Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. *J. Immunol.* **178**, 6033-6037 (2007).

77. Sponaas, A.M., *et al.* Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood* **114**, 5522-5531 (2009).

78. Borges da Silva, H., *et al.* In vivo approaches reveal a key role for DCs in CD4+ T cell activation and parasite clearance during the acute phase of experimental blood-stage malaria. *Plos Pathog.* **11**, e1004598 (2015).

79. Bogunovic, M., *et al.* Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* **31**, 513-525 (2009).

80. Villegas-Mendez, A., *et al.* IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J. Immunol.* **189**, 968-979 (2012).

81. Nie, C.Q., *et al.* IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *Plos Pathog.* **5**, e1000369 (2009).

82. Gowda, N.M., Wu, X. & Gowda, D.C. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J. Immunol.* **188**, 5073-5085 (2012).

83. Guermonprez, P., *et al.* Inflammatory Flt3l is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during *Plasmodium* infection. *Nature Medicine* **19**, 730-738 (2013).

84. Sponaas, A.M., *et al.* Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood* **114**, 5522-5531 (2009).

85. Dunay, I.R., *et al.* Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* **29**, 306-317 (2008).

86. Cheong, C., *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* **143**, 416-429 (2010).

87. Goldszmid, R.S., *et al.* NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* **36**, 1047-1059 (2012).

**ANEXO**



## RESEARCH ARTICLE



## DNA-Containing Immunocomplexes Promote Inflammasome Assembly and Release of Pyrogenic Cytokines by CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD64<sup>high</sup> CD32<sup>low</sup> Inflammatory Monocytes from Malaria Patients

Isabella C. Hirako,<sup>a</sup> Carolina Gallego-Marin,<sup>b,c</sup> Marco A. Ataíde,<sup>a,d</sup> Warrison A. Andrade,<sup>a,b</sup> Humberto Gravina,<sup>d</sup> Bruno C. Rocha,<sup>a,d</sup> Rosane B. de Oliveira,<sup>b</sup> Dhelio B. Pereira,<sup>a</sup> Joseph Vinetz,<sup>f</sup> Betty Diamond,<sup>g</sup> Sanjay Ram,<sup>b</sup> Douglas T. Golenbock,<sup>a,b</sup> Ricardo T. Gazzinelli<sup>a,h,i</sup>

Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>a</sup>; Division of Infectious Diseases and Immunology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA<sup>b</sup>; Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas-CIEIM, Cali, Colombia<sup>c</sup>; Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>d</sup>; Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, Rondônia, Brazil<sup>e</sup>; School of Medicine, University of California San Diego, San Diego, California, USA<sup>f</sup>; Center for Autoimmune and Musculoskeletal Diseases, The Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, New York, USA<sup>g</sup>

ICH and C.G.M. and D.T.G. and R.T.G., equally contributed to this work.

**ABSTRACT** High levels of circulating immunocomplexes (ICs) are found in patients with either infectious or sterile inflammation. We report that patients with either *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* malaria have increased levels of circulating anti-DNA antibodies and ICs containing parasite DNA. Upon stimulation with malaria-induced ICs, monocytes express an NF- $\kappa$ B transcriptional signature. The main source of IC-induced proinflammatory cytokines (i.e., tumor necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ] and interleukin-1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ]) in peripheral blood mononuclear cells from acute malaria patients was found to be a CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD64 (Fc $\gamma$ RIIIA)<sup>+</sup> CD64 (Fc $\gamma$ RI)<sup>high</sup> CD32 (Fc $\gamma$ RIIB)<sup>low</sup> monocyte subset. Monocytes from convalescent patients were predominantly of the classical phenotype (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>) that produces high levels of IL-10 and lower levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in response to ICs. Finally, we report a novel role for the proinflammatory activity of ICs by demonstrating their ability to induce inflammasome assembly and caspase-1 activation in human monocytes. These findings illuminate our understanding of the pathogenic role of ICs and monocyte subsets and may be relevant for future development of immunity-based interventions with broad applications to systemic inflammatory diseases.

**IMPORTANCE** Every year, there are approximately 200 million cases of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria, resulting in nearly 1 million deaths, most of which are children. Decades of research on malaria pathogenesis have established that the clinical manifestations are often a consequence of the systemic inflammation elicited by the parasite. Recent studies indicate that parasite DNA is a main proinflammatory component during infection with different *Plasmodium* species. This finding resembles the mechanism of disease in systemic lupus erythematosus, where host DNA plays a central role in stimulating an inflammatory process and self-damaging reactions. In this study, we disclose the mechanism by which ICs containing *Plasmodium* DNA activate innate immune cells and consequently stimulate systemic inflammation during acute episodes of malaria. Our results further suggest that Toll-like receptors and inflammasomes have a central role in malaria pathogenesis and provide new insights toward developing novel therapeutic interventions for this devastating disease.

Received 26 September 2015 Accepted 16 October 2015 Published 17 November 2015

**Citation** Hirako IC, Gallego-Marin C, Ataíde MA, Andrade WA, Gravina H, Rocha BC, de Oliveira RB, Pereira DB, Vinetz J, Diamond B, Ram S, Golenbock DT, Gazzinelli RT. 2015. DNA-containing immunocomplexes promote inflammasome assembly and release of pyrogenic cytokines by CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD64<sup>high</sup> CD32<sup>low</sup> inflammatory monocytes from malaria patients. *mBio* 6(6):e01605-15. doi:10.1128/mBio.01605-15.

**Editor** Gerald B. Piel, Harvard Medical School

**Copyright** © 2015 Hirako et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

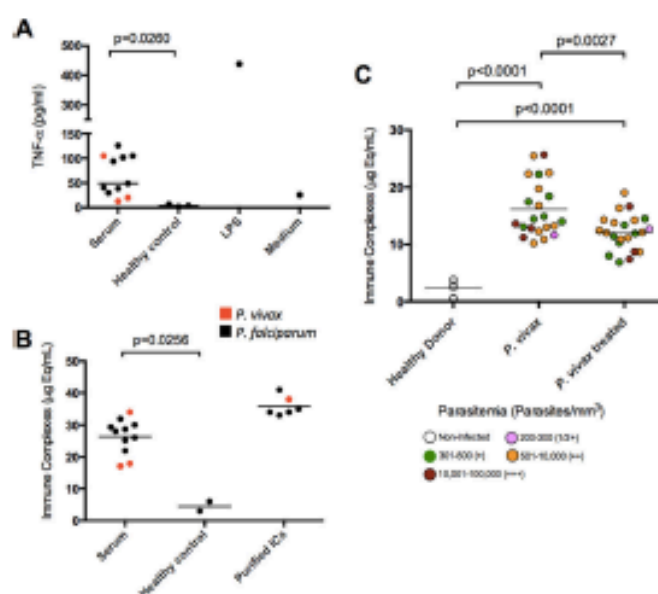
Address correspondence to Ricardo T. Gazzinelli, [ricardo.gazzinelli@ufmg.br](mailto:ricardo.gazzinelli@ufmg.br).

This article is a direct contribution from a Fellow of the American Academy of Microbiology.

Despite different etiologies and clinical manifestations, there are many parallels between malaria and systemic lupus erythematosus (SLE). In both diseases, nucleic acids are thought to be responsible for activating innate immune sensors and promoting systemic inflammation (1–4). Activation of nucleic-acid-sensing Toll-like receptors (NAS-TLRs) may be either pathogenic or protective in both SLE (5–8) and malaria (9–12). Likewise, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), a cytokine induced by TLR activa-

tion, can either mediate resistance or enhance the pathogenesis of either disease (13–16). Intriguingly, for many decades effective antimalarial drugs have been used to treat SLE patients. These drugs accumulate in lysosomes, where they raise the pH, and are thought to mitigate the symptoms of SLE by preventing activation of endosomal TLRs (17).

How nucleic acids gain access to intracellular innate immune receptors is an important question in understanding the patho-



**FIG 1** High levels of ICs in sera from *P. falciparum*- and *P. vivax*-infected patients. (A) Monocytes from healthy donors were incubated with individual sera from *P. vivax* ( $n = 3$ ) and *P. falciparum* ( $n = 8$ ) malaria patients at a 1:5 (20%) dilution in tissue culture medium or stimulated with 100 ng/ml of LPS, and TNF- $\alpha$  production was evaluated 24 h later by ELISA. (B) IC levels in sera from malaria patients and healthy individuals, as well as in purified IC preparations, as positive controls. (C) ICs in the sera of *P. vivax*-infected subjects ( $n = 22$ ) before and 30 to 45 days after treatment as well as in healthy donors ( $n = 4$ ). Different colors indicate different levels of parasitemia. IC levels shown in panels B and C were measured by the MicroVue CIC-C1q enzyme immunoassay kit. Horizontal lines indicate the average for each group. *P* values were determined by Student's *t* test (A and B) and paired *t* test (C).

genesis of SLE and malaria (7). In SLE, immunocomplexes (ICs) containing pathogenic anti-DNA/RNA antibodies are thought to be important carriers of human nucleic acids to the intracellular compartments of B cells and phagocytes, where they can activate the endosomal TLRs and possibly transit to the cytoplasm, where other DNA sensors can be engaged (4, 7, 8, 18, 19). Importantly, high levels of ICs are also found in both human and rodent malaria (20–22). However, the importance of DNA-containing ICs in activation of innate immune cells and pathogenesis of malaria is unknown.

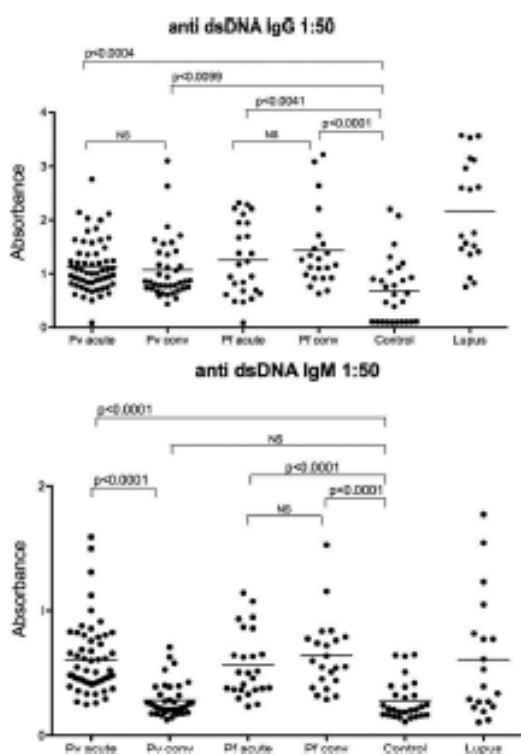
The IgG Fc receptors have an important role in internalization of ICs by innate immune cells. Once bound to the Fc portion of IgG, Fc receptors can inhibit (e.g., Fc $\gamma$ RIIB) or activate (e.g., Fc $\gamma$ RIIIA and Fc $\gamma$ RI) monocyte functions (23). Indeed, a loss-of-function polymorphism in the gene encoding the deactivating Fc $\gamma$ RIIB protects against malaria but enhances susceptibility to SLE (24–28).

In this study, we report that ICs containing *Plasmodium* DNA activate intracellular DNA sensors. Our data indicate a previously undescribed role of the proinflammatory activity of ICs by demonstrating their ability to induce inflammasome assembly, caspase-1 activation, and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) secretion, primarily via CD14<sup>+</sup> CD16 (Fc $\gamma$ RIIIA)<sup>+</sup> CD64 (Fc $\gamma$ RI)<sup>hi</sup> CD32 (Fc $\gamma$ RIIB)<sup>low</sup> monocytes. Our findings have important implications for understanding the role of ICs and monocyte subsets in malaria pathogenesis and, more broadly, for understanding other infectious and autoimmune diseases.

## RESULTS

**Increased levels of cytokines and circulating ICs in sera of malaria patients.** The levels of IL-6, IL-8, and IL-10 in the plasma of malaria patients used in this study (see Fig. S1 in the supplemental material) are consistent with our prior data (29, 30). To evaluate the immunostimulatory properties of sera from malaria patients, we incubated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors with RPMI medium containing 20% sera from either *Plasmodium vivax*- or *Plasmodium falciparum*-infected subjects. We found that only sera from malaria patients, not those from healthy controls, triggered TNF- $\alpha$  production (Fig. 1A). The TNF- $\alpha$  levels were undetectable in similarly diluted (20%) patient sera (data not shown), ensuring that it was released from monocytes and not presented *a priori* in the tissue culture medium.

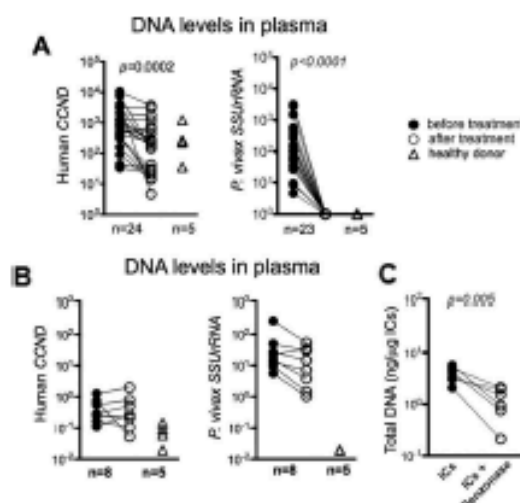
We hypothesized that circulating ICs were responsible for stimulating monocytes. Indeed, we detected high levels of ICs in sera of the same patients with acute untreated malaria (Fig. 1B). The levels of ICs were also measured in sera from *P. vivax*-infected patients before and after chemotherapy and compared with healthy donors as baseline controls. We found high levels of ICs in sera from patients during acute *P. vivax* episodes (mean,  $\sim 16.1$   $\mu$ g-equivalents [ $\mu$ g-eq]/ml) compared to healthy donors (mean,  $\sim 2.3$   $\mu$ g-eq/ml). The IC levels in the sera of treated patients were intermediate (mean,  $\sim 12.1$   $\mu$ g-eq/ml) and differed significantly from patient serum pretreatment and healthy controls (Fig. 1C). We found no correlation between the level of ICs and parasitemia.



**FIG 2** High levels of circulating anti-dsDNA in patients undergoing acute episodes of *P. vivax* and *P. falciparum* malaria. Levels of circulating anti-dsDNA IgG (top) and IgM (bottom) measured by ELISA in sera from patients with acute episodes of *P. vivax* ( $n = 58$ ) and *P. falciparum* ( $n = 25$ ) malaria and convalescent (conv) individuals 30 to 45 days after antimalarial therapy. Sera from uninfected healthy donors (control;  $n = 28$ ) and lupus patients ( $n = 19$ ) were used as negative and positive controls, respectively. Significant differences are indicated with  $P$  values using the Mann-Whitney  $U$  test. NS, nonsignificant.

**Circulating ICs from malaria patients contain *Plasmodium* DNA.** We next measured the levels of IgM and IgG specific for double-stranded DNA (dsDNA) and single-stranded DNA (ssDNA) in the sera of *P. vivax*- and *P. falciparum*-infected patients. As in SLE patients, the levels of anti-dsDNA IgG and IgM were significantly increased in the sera of acutely infected patients over those in sera from healthy donors (Fig. 2). Anti-dsDNA IgG persisted at least 30 to 40 days after treatment and parasitological cure in either *P. vivax*- or *P. falciparum*-infected individuals. In contrast, anti-ssDNA IgG and IgM levels in malaria patients did not differ from the corresponding levels measured in healthy donors (data not shown).

The levels of human and parasite DNA present in ICs and total plasma from malaria patients were determined by quantitative PCR using *CCND1*- and *SSUrRNA*-specific primers. *CCND1* is a single-copy gene optimized to quantify human DNA (<http://www.rtpimerdb.org>, primer ID 3605). *SSUrRNA* is a multicopy gene from *P. vivax*, which allows amplification and quantitation of



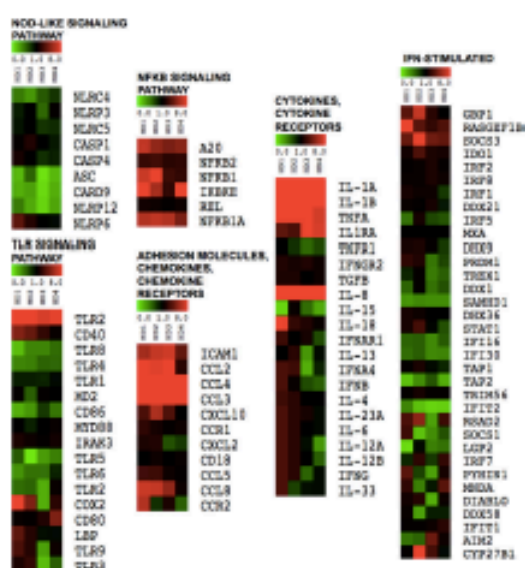
**FIG 3** High levels of human and parasite DNA in plasma and ICs of *P. vivax* malaria patients. (A and B) Quantitative PCR to determine levels of human *CYCLIND1* (*CCND1*) and *P. vivax* *SSUrRNA* (18S from rRNA) genes in plasma from *P. vivax* patients ( $n = 24$ ) before and 30 to 45 days after treatment as well as in healthy donors ( $n = 5$ ) (A) and DNA extracted from purified ICs from *P. vivax* malaria patients ( $n = 8$ ) before and 30 to 45 days after treatment as well as healthy donors ( $n = 5$ ) (B). (C) Quantification of total DNA extracted from purified ICs from *P. vivax* malaria patients ( $n = 6$ ) before and after Benzonase treatment. Significant differences are indicated with  $P$  values using a paired  $t$  test.

DNA in a highly sensitive and *Plasmodium* species-specific manner. We observed increased levels of both human and parasite DNA in the plasma of *P. vivax* malaria patients before treatment. Circulating human DNA persisted, although at lower levels, whereas parasite DNA was not detectable in plasma following antimalarial chemotherapy (Fig. 3A). Similarly, parasite DNA was detected in purified ICs from *P. vivax* malaria patients before and (at much lower levels) after treatment. Human DNA was detected at very low levels in IC preparations from the same patients (Fig. 3B). Benzonase treatment degraded DNA and confirmed the presence of DNA in ICs from malaria patients (Fig. 3C).

**An NF- $\kappa$ B transcriptional signature in monocytes stimulated with ICs.** We next profiled mRNA expression of highly enriched monocytes (over 99% purity) collected from four healthy donors (Fig. 4). A custom code set for NanoString analysis was designed for 98 genes related to inflammatory responses. Genes were divided into six groups: NOD-like receptor signaling pathway; TLR signaling pathway; NF- $\kappa$ B signaling pathway; cytokines and cytokine receptors; adhesion molecules, chemokines, and chemokine receptors; and interferon (IFN)-stimulated genes. Of these, 27 genes had augmented expression upon IC stimulation (fold change,  $>1.8$ ;  $P$  value,  $<0.05$ ) (see Table S1 in the supplemental material). Of the 27 differentially expressed genes, five were from the NF- $\kappa$ B family, and most of the genes with enhanced expression were proinflammatory cytokines and chemokines known to be induced by NF- $\kappa$ B (Fig. 4).

**ICs derived from malaria patients induce cytokine production by human monocytes.** We then examined if ICs from malaria

Hirako et al.



**FIG 4** NF- $\kappa$ B transcriptional signature in monocytes stimulated with ICs. Purified monocytes from four different healthy donors were either unstimulated or stimulated with ICs (60  $\mu$ g/ml) for 6 h and analyzed for gene expression using the NanoString technology. Data were normalized using housekeeping genes, and fold increase in gene expression was calculated in reference to unstimulated samples from the same patient. Different signaling pathways are depicted in the heat maps and show differentially expressed genes (rows) for each healthy donor (columns) that have diminished (green), unaltered (black), and enhanced (red) expression. Table S1 in the supplemental material provides the *P* values of genes which showed significantly enhanced expression as determined by the unpaired *t* test.

patients could induce cytokine production by PBMCs from healthy donors. We incubated PBMCs from healthy donors with different concentrations of purified ICs and measured TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10 levels in culture supernatants 24 h after stimulation. We observed that 60  $\mu$ g/ml of purified ICs induced near-maximal cytokine production by PBMCs (see Fig. S2A in the supplemental material) and chose this concentration for the remaining experiments.

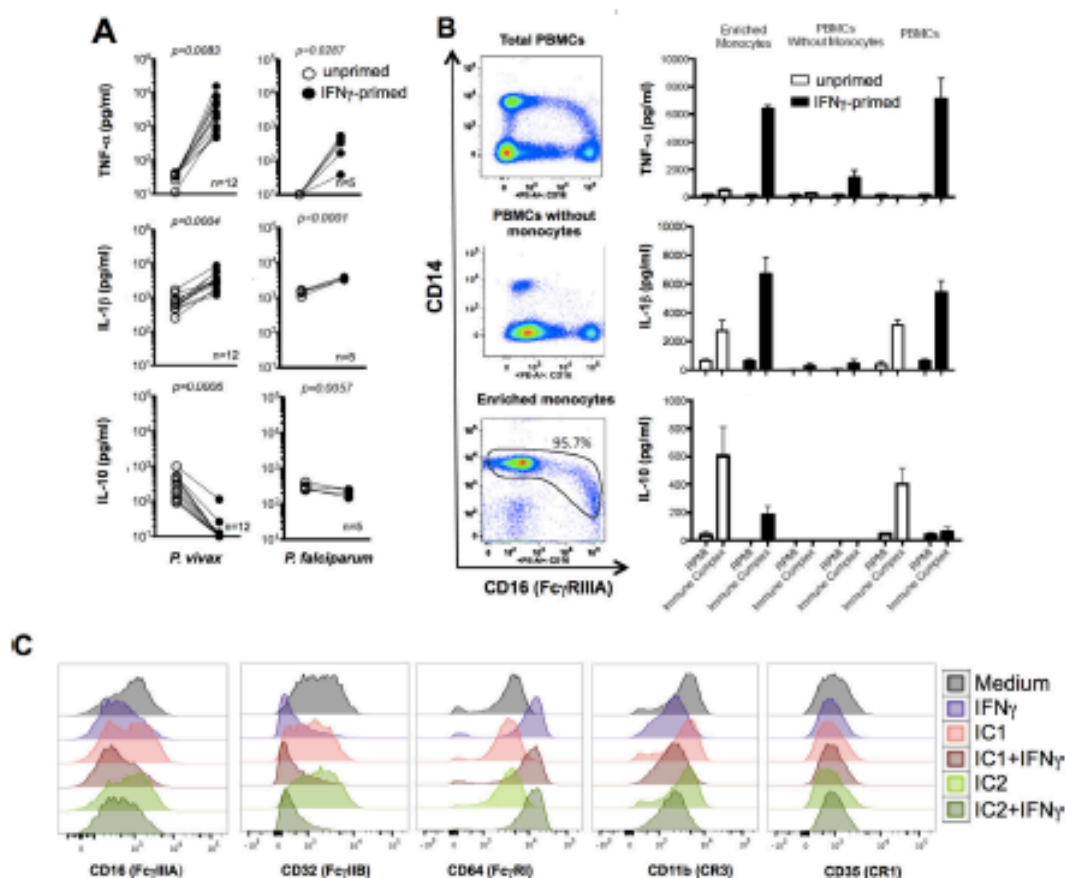
We next evaluated whether DNA is an important component for the immunostimulatory activity of ICs. To address this question, we used E6446, a compound that binds DNA and RNA in the lysosomal compartment and blocks activation of TLR7 as well as TLR9 (10, 31) and potentially other DNA/RNA sensors. PBMCs stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and E5564, a TLR4 antagonist (32), were used as controls. Pretreatment of PBMCs with the DNA/RNA inactivator E6446 (2  $\mu$ M) for 3 h followed by stimulation with ICs for 24 h resulted in 40 to 50% inhibition of IL-1 $\beta$  but no inhibition of TNF- $\alpha$  or IL-10. At a higher concentration, E6446 (20  $\mu$ M) inhibited 70% of TNF- $\alpha$  and 90% of IL-1 $\beta$  as well as IL-10 production (see Fig. S2B in the supplemental material). Control experiments using the TLR4 antagonist E5564 (2  $\mu$ M) resulted in  $\sim$ 100% inhibition of LPS-induced cytokines but had no effect on IC-induced cytokine production by PBMCs. Collectively, these data suggest that parasite DNA fragments formed

during malaria are main components of ICs and are involved in induction of cytokines by human PBMCs.

We previously demonstrated that PBMCs from malaria patients express various gamma interferon (IFN- $\gamma$ )-inducible genes and become hyperresponsive to TLR agonists (30). Relative to unprimed cells, priming with IFN- $\gamma$  enhanced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and decreased IL-10 production by PBMCs from healthy donors stimulated with malaria-induced ICs (Fig. 5A). We also evaluated the main cell source of cytokines in PBMCs stimulated with ICs. For these experiments, we used total PBMCs, PBMCs depleted of monocytes, and a highly enriched monocyte population (CD14<sup>+</sup> cells). Our results show that >95% of the cells in the purified population are CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> (Fig. 5B, bottom left panel). A minor population of monocytes expressed low levels of CD14 and high levels of CD16. Monocytes were the main source of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10 (Fig. 5B). Importantly, IFN- $\gamma$  priming upregulated expression of CD64 and downregulated expression of CD32, while expression of CD16, CD11b, and CD35 was unchanged. As CD32 is a deactivating Fc $\gamma$ R, these results further suggest that IFN- $\gamma$  priming shifts the balance of Fc $\gamma$ R expression toward a proinflammatory one (Fig. 5C; also see Fig. S3 in the supplemental material).

ICs induce high levels of proinflammatory cytokines by CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD32<sup>low</sup> monocytes from *P. vivax* malaria patients. We next looked at the responsiveness of PBMCs from *P. vivax* malaria patients to ICs. As previously reported (30, 33) for various TLR agonists, we found that PBMCs from patients undergoing acute malaria episodes were highly responsive and produced high levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , but not IL-10, upon stimulation with ICs (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, and in Fig. S4 in the supplemental material (and previously reported), the frequency of CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> (Fc $\gamma$ RIIIA)<sup>+</sup> cells is increased in patients with acute *P. vivax* infection and drops to levels seen in healthy individuals 30 to 40 days posttreatment (34, 35). Furthermore, we defined CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> cells as the primary source of cytokines among different monocytes from malaria patients (Fig. 6C). Hence, after treatment the profile of cytokines produced by PBMCs shifted back to an anti-inflammatory one, producing high IL-10 levels and low IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels (Fig. 6A), which coincided with the lower frequency of CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> cells in convalescent patients. Importantly, while expression of the deactivating Fc $\gamma$ RIIB (CD32) was unchanged, CD64 mean fluorescence intensity (MFI) was increased in CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> cells as well as CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> cells from malaria patients (Fig. 6D). Thus, the ratios of CD16/CD32 and CD64/CD32 expression by monocytes were changed to proinflammatory ones during malaria. We also looked at expression of receptors that may interact with complement-coated ICs, i.e., CD35 (CR1) and CD11b (a component of CR3), and found no difference in expression levels when comparing patients before and after treatment and parasitological cure (see Fig. S5 in the supplemental material).

**Inflammasome specks and caspase-1 activation in monocytes stimulated with ICs from malaria patients.** The results presented in Fig. 5B and 6C indicated that monocytes are the main source of IL-1 $\beta$  in PBMCs. Hence, we investigated whether monocyte stimulation with ICs leads to activation of caspase-1. Highly purified monocytes were obtained from PBMCs of healthy donors and stimulated with ICs. Approximately 4% and 8% of stimulated monocytes expressed either the NOD-like receptor

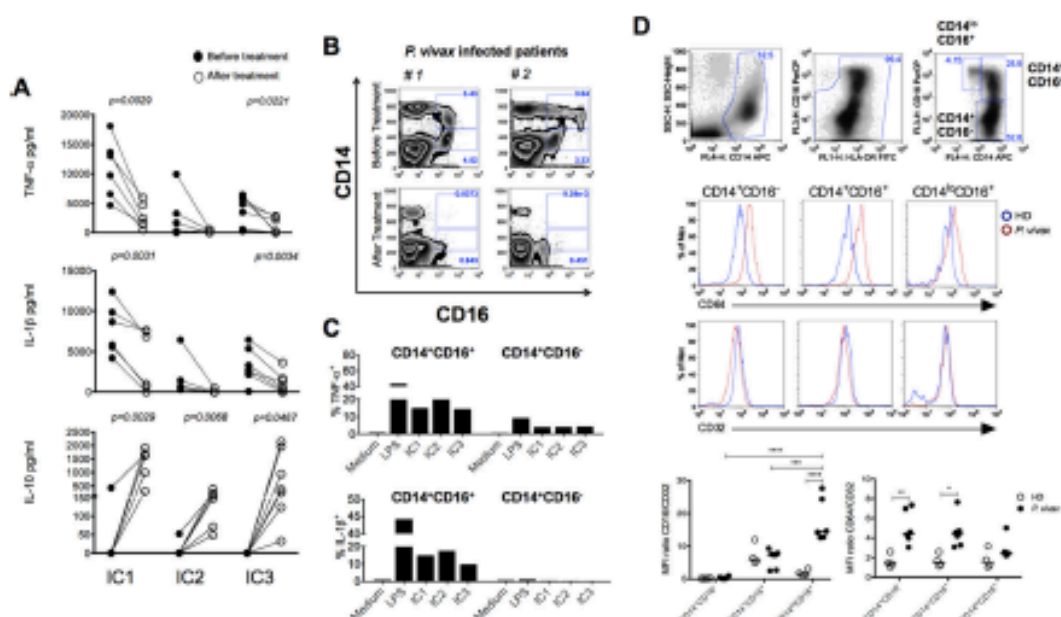


**FIG 5** Monocytes are the main source of cytokines in PBMCs stimulated with ICs derived from malaria patients. (A) PBMCs isolated from healthy donors were either unprimed or primed with 100 ng IFN- $\gamma$  and stimulated with 60  $\mu$ g/ml of ICs from either *P. vivax* or *P. falciparum* malaria patients, and cytokine levels were measured 24 h later. (B) CD14<sup>+</sup> monocytes were positively selected from PBMCs of three healthy donors. Total purified monocytes, monocyte-depleted PBMCs, and total PBMCs were either unprimed or primed with IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) and stimulated with 60  $\mu$ g/ml of ICs from malaria patients. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10 were measured by CBA 24 h after stimulation. Results are representative of one out of three experiments. (C) PBMCs were either unprimed or primed with 100 ng of IFN- $\gamma$  overnight and stimulated with ICs for 24 h. FACS analysis was performed with gating on CD14<sup>+</sup> cells and evaluating the levels of expression (MFI) of CD16, CD32, CD64, CD11b, or CD35. Results shown are representative of one out of three experiments. *P* values shown in panel A were determined by a paired *t* test.

protein 3 (NLRP3) or absent in melanoma 2 (AIM2) inflammasome specks, respectively, while NLRC4 (NLR family, CARD domain-containing 4) specks were not detected (Fig. 7A). In addition, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) colocalized with either NLRP3 or AIM2 inflammasome specks. Our results also show that pro-caspase-1 was autocleaved into mature caspase-1 (p10 subunit) after monocyte stimulation with ICs (Fig. 7B). Importantly, we show that monocytes purified from PBMCs from patients undergoing acute episodes of *P. vivax* malaria express NLRP3<sup>+</sup> ASC<sup>+</sup> or AIM2<sup>+</sup> ASC<sup>+</sup> specks (Fig. 7C) as well as active caspase-1 (34). These findings suggest that ICs stimulate inflammasome assembly, caspase-1 activation, and IL-1 $\beta$  secretion *in vivo* during acute malaria infection.

## DISCUSSION

Malaria is a devastating disease, infecting ~200 million people and killing close to 1 million children every year (36, 37). Paroxysm, a main pathophysiological response to *Plasmodium* infection, is characterized by cycles of sharp peaks of high fever accompanied by chills and rigors, which coincide with synchronized release of parasites from red blood cells (RBCs). While fever may aid in host defense, delaying the growth of pathogens, it is also associated with various pathological processes, such as respiratory distress, anemia, and neurological manifestations that cause morbidity and mortality in malaria. These clinical manifestations are associated with a systemic production of pyrogenic cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . However, many of the basic details of malaria-



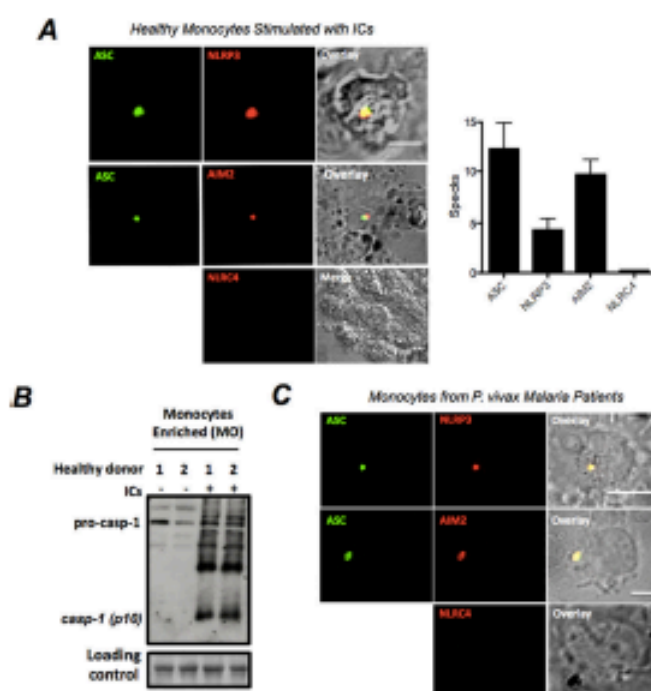
**FIG 6** Purified ICs induce high levels of proinflammatory cytokines by CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes from malaria patients. (A) PBMCs from *P. vivax* malaria patients ( $n = 6$ ) before and 30 to 45 days after treatment were isolated and stimulated with 60  $\mu\text{g/ml}$  of ICs for 24 h. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10 were measured in supernatants by CBA. The  $P$  values were determined by a paired  $t$  test. (B) Flow cytometric analysis shows an increased frequency of CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> cells in PBMCs from two *P. vivax* malaria patients. The frequency of CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> cells decreased to levels similar to those for healthy donors at 30 to 40 days after treatment and parasitological cure. Results of three additional patients and healthy donors are shown in Fig. S4A in the supplemental material. (C) PBMCs from two different *P. vivax* malaria patients were isolated and stimulated with 60  $\mu\text{g/ml}$  of ICs for 10 h in culture containing brefeldin A and submitted to flow cytometric analysis to measure the expression of intracellular TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> as well as CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes. The results are representative of two out of five patients. (D) Top panels show the gating strategy to identify the monocyte subsets: CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>, and CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>. The middle two panels are representative histograms of CD64 and CD32 expression in *P. vivax*-infected patients and healthy donors (HD). Bottom panels show the mean fluorescence intensity (MFI) ratios of CD16/CD32 (left) and CD64/CD32 (right) of the three monocyte subsets from *P. vivax*-infected patients ( $n = 6$ ) and in healthy donors (HD,  $n = 4$ ). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

induced cytokinemia are not fully understood (38, 39). Here, we provide evidence that ICs carrying *Plasmodium* DNA are potent stimulators of cytokine synthesis by human monocytes through activation of innate immune receptors and may contribute to the pathogenesis of malaria.

*Plasmodium*-derived DNA and RNA stimulate nucleic-acid-sensing TLRs (NAS-TLRs) and AIM2 inflammasomes, as well as cytosolic sensors that activate the TBK1/STING/IRF3 pathway (1–3, 40, 41). As a consequence, they elicit both the NF- $\kappa$ B and type I IFN pathways. However, how parasite nucleic acids become accessible to these intracellular innate immune receptors is not completely understood. Recent studies from our group show that hemozoin, a detoxification polymer of heme released from hemoglobin digested by *Plasmodium* merozoites, may have an important role in this process. We have shown that phagocytosis of hemozoin, which is normally bound to *Plasmodium* DNA, makes parasite nucleic acids readily available to endosomal TLRs (1, 3). Furthermore, hemozoin crystals destabilize the phagolysosome membranes, releasing their contents, including parasite nucleic acids, into the host cell cytosol, culminating in activation of inflammasomes and other cytosolic sensors for DNA and RNA (3). Internalization and digestion of infected red blood cells (RBCs)

also release hemozoin and parasite nucleic acids into phagolysosomes and subsequently into the cytosol, resulting in activation of innate immune receptors. Therefore, opsonization by IgGs efficiently mediates phagocytosis of infected RBCs as well as parasite components and may contribute to innate immune activation during malaria. The data presented here indicate that, as previously described for SLE (4, 6, 18, 19), DNA-containing ICs derived from malaria patients trigger monocytes to express an NF- $\kappa$ B transcriptional signature and produce high levels of proinflammatory cytokines. We hypothesize that ICs derived from malaria patients bind to Fc receptors and are internalized, releasing parasitic DNAs into phagolysosomes and subsequently into the monocyte cytosol, where they activate NAS-TLRs and AIM2, respectively.

An important finding of this study is that malaria ICs induced the formation of NLRP3<sup>+</sup> ASC<sup>-</sup> as well as AIM2<sup>+</sup> ASC<sup>-</sup> containing inflammasomes in primary human monocytes. Induction of inflammasome assembly and caspase-1 activation requires activation of the NF- $\kappa$ B pathway, for instance, by TLR agonists or cytokines, and consequent expression of inflammasome components, e.g., different members of the NLR family, pro-caspase-1, and pro-IL-1 $\beta$  (42). We believe that ICs derived from the plasma



**FIG 7** Inflammasome specks containing NLRP3 and AIM2 after stimulation of monocytes with ICs. (A) Confocal analysis detected ASC (green), NLRP3 (red), and AIM2 (red) specks in CD14<sup>+</sup> monocytes stimulated with 60  $\mu$ g of ICs for 24 h. We also used antibodies to detect NLRP4 inflammasomes, but the results were negative. Reaction with secondary antibodies in the absence of primary antibody yielded negative results on confocal analysis. The bar graphs show the frequencies of specks in monocytes derived from healthy donors 24 h after stimulation with 60  $\mu$ g of ICs. (B) Western blot assay showing pro-caspase-1 and active caspase-1 (p10) levels in enriched monocytes from healthy donors stimulated with 60  $\mu$ g/ml of ICs for 24 h. (C) Double-positive NLRP3/ASC and AIM2/ASC inflammasome specks are found in circulating monocytes derived from *P. vivax* malaria patients but not from healthy donors.

of malaria patients carry *Plasmodium* DNA and activate intracellular NAs-TLRs, most likely TLR8 and TLR9, which may serve as the first signal for inflammasome activation. IC-induced instability of phagolysosomes and release of their contents into the cytosol may trigger the formation of NLRP3 inflammasomes. In addition, AIM2, a DNA sensor, is activated by *Plasmodium* DNA in mouse cells and may also provide the second signal for assembly of inflammasome platforms during malaria (3). Hence, the results presented here indicate that circulating ICs from malaria patients trigger the assembly of NLRP3<sup>+</sup>/ASC<sup>+</sup> and AIM2<sup>+</sup>/ASC<sup>+</sup> in human monocytes.

Monocytes are a heterogeneous population, which reflects different developmental stages or activation status with distinct physiological roles, such as migration to lesions or entry to normal tissues, production of proinflammatory or anti-inflammatory cytokines, and antimicrobial effector functions (43). These monocyte subsets can be distinguished based on expression of CD14 and different members of the Fc $\gamma$ R family that may up- or downregulate cell responsiveness to ICs. For example, activation of Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a) or Fc $\gamma$ RI (CD64) promotes a proinflammatory response, whereas Fc $\gamma$ RIIB (CD32) triggers an anti-inflammatory response (23, 44). Interestingly, the frequency of a single

nucleotide polymorphism in the Fc $\gamma$ RIIB (CD32) gene that abrogates the receptor function is augmented in populations from areas of endemicity, suggesting a survival advantage against malaria. This same polymorphism is associated with susceptibility to SLE, further suggesting that CD32 is a negative regulator of the proinflammatory response and protects against this autoimmune disease. Thus, the simultaneous signaling of activating versus inhibitory Fc $\gamma$  receptors sets the threshold for cellular activation and prevents an excessive inflammatory response. Another important finding of our study is that upon IC stimulation, CD14<sup>+</sup> CD16 (Fc $\gamma$ RIIIA)<sup>+</sup> CD32 (Fc $\gamma$ RIIB)<sup>low</sup> monocytes are the main source of proinflammatory cytokines in PBMCs from malaria patients. Hence, the enhanced expression of Fc $\gamma$ RIIIA and/or Fc $\gamma$ RI associated with decreased expression of Fc $\gamma$ RIIB<sup>+</sup> in monocytes from malaria patients seems to skew the balance of cytokine production toward a proinflammatory response. Further research is needed to determine whether activation of Fc $\gamma$ RIIIA or Fc $\gamma$ RI by ICs directly induces cytokine production by monocytes or simply licenses these cells to produce large amounts of proinflammatory cytokines upon activation of intracellular DNA/RNA sensors.

Furthermore, the cytokine milieu is also an important determinant of the capacity of ICs to stimulate either a pro- or anti-

inflammatory response (23, 44). This dichotomy is regulated by cytokines, such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , which favor cellular activation, or IL-10, which modulates activation of professional phagocytes. For instance, depending on the clinical form of the disease, *Leishmania* infection induces a pronounced proinflammatory response (45). In contrast, induction of IL-10 by ICs promotes an anti-inflammatory response leading to establishment of *Leishmania* parasitism and disease (46). We found that in clinically ill patients undergoing acute malaria episodes, ICs trigger monocytes to produce high levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and low levels of IL-10. This pattern of cytokine production changes to an anti-inflammatory one after treatment and parasitological cure of malaria patients. Likewise, monocytes from healthy donors stimulated with ICs produce high IL-10 levels and low TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels, whereas after IFN- $\gamma$  priming the production of the proinflammatory cytokines becomes dominant. These findings are likely to be relevant to the cytokine storm during malaria; a hallmark of this inflammatory response is IFN- $\gamma$ -induced priming of innate immune cells (30, 34).

It is noteworthy that our studies were conducted in Brazil, where malaria is an occupational disease and affects mainly adults. In addition, both *P. vivax* and *P. falciparum* forms of malaria in Brazil are not as severe as those in Africa, where mostly children <5 years of age develop the disease. Hence, significant differences are likely to be found among populations from different geographic regions and different age groups as well as in pregnant women. It is notable that different studies described TLR9 polymorphisms associated with severity of disease in both *P. vivax* and *P. falciparum* malaria patients from Brazil and Africa, respectively (47–49). Furthermore, higher levels of circulating ICs were found in African children with severe malaria than in adults and children with moderate clinical symptoms (50). Moreover, studies have shown that symptomatic adults in Brazil as well as African children infected with *P. falciparum* are hyperresponsive to TLR agonists, including oligonucleotides containing unmethylated CpG motifs (30, 51). Hence, as reported here for adult malaria patients, children infected with *P. falciparum* are likely to be more responsive to IC stimulation. In contrast, immune individuals in Africa, who are continuously exposed to *P. falciparum*, are more tolerant to disease and less responsive to a TLR9 agonist and may be less responsive to malaria-induced ICs (52, 53).

In conclusion, many of the signs and symptoms of malaria are a result of the excessive activation of innate immune cells. This study provides evidence that ICs are important players in this process. ICs from malaria patients appear to carry parasite DNAs to the inner compartment of host cells, making them accessible to the intracellular innate immune sensors, including NALP3-TLRs and AIM2 inflammasomes. Furthermore, our results suggest that the ratio of Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RIIIA (stimulatory) expression to Fc $\gamma$ RIIB (inhibitory) expression influences the magnitude of cytokine response by IC-activated monocytes. Hence, the IgG response during the early stage of malaria has an important role in the activation of the innate immune response and the pathogenesis of malaria.

## MATERIALS AND METHODS

**Ethics statement.** The protocols and consent forms were approved by the Institutional Review Board of the University of Massachusetts Medical School (IRB-UMMS H-10268) and the Ethical Committees on Human Experimentation from Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEP-

CEPEM 095/2009) and Centro de Pesquisas René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqRR 2004), as well as by the National Ethical Committee (CONEP 15652) from the Ministry of Health, Brazil.

**Patients.** Individuals were between 18 and 60 years old. Malaria patients infected with either *P. vivax* (see Table S2 in the supplemental material) or *P. falciparum* (see Table S3) were diagnosed by a thick blood smear and confirmed by PCR. The clinical manifestations of malaria were fever, myalgia, chills, nausea, vomiting, and/or diarrhea, but no patient had complicated malaria requiring hospitalization. Patients infected with *P. falciparum* received a fixed dose of the artemether (20-mg) and lumefantrine (120-mg) combination two times a day (four tablets each dose) for 3 days followed by a single dose of primaquine (45 mg) on the last day of treatment. Patients infected with *P. vivax* were treated with chloroquine (150 mg) every 8 h for 3 days and a single dose per day of primaquine (15 mg) for 2 weeks. The treatment schedule, dose, and drugs described above have been tested and are recommended by the Brazilian Ministry of Health. Healthy donors as well as patients before and after chemotherapy had 50 to 100 ml of total blood collected using EDTA anticoagulant tubes. Parasitemic cure was documented by PCR. Exclusionary criteria included any patient who had a malaria episode in the last 6 months, severe anemia (defined as a hematocrit of <35), severe disease (requiring admission to the hospital), any comorbidity, recent or concurrent treatment with anti-inflammatory or immunosuppressive drugs, or pregnancy.

**IC quantitation.** The MicroVue CIC-C1q enzyme immunoassay (Quidel, San Diego, CA) was used to quantify circulating ICs in human serum according to the manufacturer's instructions. Serum samples were diluted 1:50 and tested in duplicate. Results were obtained in reference to the standard curve and were expressed as microgram-equivalents per milliliter.

**Anti-dsDNA and anti-ssDNA antibody ELISA.** Anti-dsDNA antibody levels in sera of patients and healthy controls were determined as previously described (54). Briefly, Costar 96-well half-area plates (Corning Inc., New York, NY) were dry coated overnight at 37°C with 25  $\mu$ g/ml of sonicated calf thymus DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) that had been filtered using a 0.45- $\mu$ m Millex HA filter (Millipore, Germany) to remove ssDNA. Plates were blocked and then incubated with serum samples (1:50 and 1:100 dilutions, 25  $\mu$ l/well). IgG<sup>+</sup> or IgM<sup>+</sup> anti-dsDNA antibodies were detected using alkaline phosphatase (AP)-labeled anti-human IgG or anti-human IgM antibody (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) and developed with 50  $\mu$ l/well AP substrate (Sigma-Aldrich). The optical density at 405 nm (OD<sub>405</sub>) was measured by using a Victor microplate reader (PerkinElmer, Waltham, MA). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the levels of anti-ssDNA antibodies was performed exactly as described above, except that the plates were coated with 25  $\mu$ g/ml ssDNA (Sigma-Aldrich).

**IC purification.** ICs from plasma were purified using the Affi-Gel protein A MAPS II kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Plasma (1 ml) was thawed, homogenized, and diluted 1:1 using a filtered binding buffer at pH 9.0 (Bio-Rad). An Econo-Column chromatography column (1 by 10 cm) was packed with 1 ml of Affi-Gel protein A agarose and equilibrated with 5 bed volumes of binding buffer. The diluted sample was applied, and the column was washed with 15 bed volumes of binding buffer. IgG was eluted with 5 bed volumes of an elution buffer (pH 3.0), neutralized immediately after elution by the addition of 1 M Tris-HCl (pH 9.0), and quantified in a NanoDrop spectrophotometer.

**Quantitative PCR.** DNA samples were extracted from plasma or ICs using the QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen, Germantown, MD) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription-quantitative PCRs (qRT-PCRs) were performed in a final volume of 20  $\mu$ l, containing ~1  $\mu$ l DNA, 0.15  $\mu$ l primers (10  $\mu$ M initial concentration; 0.075  $\mu$ M final concentration), 10  $\mu$ l SYBR green PCR core reagents (Applied Biosystems), and 8.7  $\mu$ l sterile water. Primer sequences for the human *CYCLIN D1* (*CCND1*) gene were GCTCCTGGTGAACAAGCTCAA (F) and TTGGAGAGGAAGTGTTCATGAAA (R), and those for the *P. vivax* 18S from rRNA (*SSUrRNA*) gene were ACGATCAGATACCGTCG



TCGTAAT (F) and CAATCTAAGAATAAACTCGAAGAGAAA (R). A standard curve was constructed by diluting each gene (from  $10^4$  to  $10^7$ ). Real-time monitoring of PCR amplification was performed using a 7500 Real-Time PCR system, and results were analyzed with 7500 software, v2.0.5. The temperature profile was 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min.

**PBMC and monocyte assays.** Blood from patients or healthy donors was diluted 1:1 in phosphate-buffered saline (PBS), layered onto Pico-Paque gradients with a density of 1.078 g/ml (GE Healthcare, United Kingdom), and centrifuged for 15 min at  $800 \times g$ . The mononuclear cells at the interface were aspirated, washed, and resuspended at  $3 \times 10^6$  cells/well in complete RPMI medium containing 10% fetal calf serum (FCS). CD14<sup>+</sup> cells were purified using the EasySep positive selection kit according to the manufacturer's protocol (StemCell Technologies, Canada). Cells were stained with anti-CD14 (allophycocyanin [APC]) (eBioscience, San Diego, CA) and anti-CD16 (phycoerythrin [PE]) (Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ), and purity was checked by fluorescence-activated cell sorting (FACS).

**NanoString analysis.** After stimulation with 60  $\mu$ g/ml of purified ICs, human monocytes were lysed in RLT buffer (Qiagen) supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol and used to determine mRNA abundance by NanoString technology as previously described (53). In brief, lysates were hybridized with capture and reporter probes overnight at 65°C and loaded onto the nCounter preparation station. Purified target/probe complexes were eluted and immobilized in the cartridge for data collection and quantification by the nCounter digital analyzer. For side-by-side comparisons of nCounter experiments, data were normalized for small variations using internal positive controls and seven housekeeping genes included in the CodeSet. The heat map was constructed using the Tiger Multi Experiment Viewer software, version 4.8.1.

**Cytokine assays.** Levels of human TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-10 were measured in PBMC culture supernatants or plasma by the cytometric bead array (CBA) human inflammatory cytokine kit (Becton, Dickinson) and ELISA for IL-1 $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, MN).

**Flow cytometry.** For intracellular measurement of cytokines, PBMCs were isolated and cultured for 8 h in the presence of ICs (60  $\mu$ g/ml) and brefeldin A (GolgiPlug; Becton, Dickinson). Surface markers were stained with anti-CD11b, -CD32, -CD35, -CD64, and -CD14 (eBioscience, San Diego, CA) or anti-CD16 (Becton, Dickinson), fixed and permeabilized with Cytofix (Becton, Dickinson), and incubated with phycoerythrin-anti-TNF- $\alpha$  or -anti-IL-1 $\beta$  (Becton, Dickinson). Subsequently, cells were washed and analyzed by flow cytometry on a FACScan cytometer (Becton, Dickinson).

**Immunoblotting assays for caspase-1.** Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (250  $\mu$ l) plus protease inhibitor was added to a pellet containing  $1 \times 10^6$  stimulated PBMCs. After 15 min on ice, lysates were centrifuged at  $13,000 \times g$  for 20 min at 4°C. Supernatants were separated on a 15% acrylamide SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with pro-caspase-1- or caspase-1-specific antibodies and visualized with HRP-conjugated antibody and the ECL system (Amersham, Bucks, United Kingdom).

**Confocal analysis.** Monocytes obtained from either healthy donors or malaria patients were analyzed *ex vivo* or after *in vitro* stimulation with ICs for 24 h. Monocytes were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized using Triton X-100, and stained with anti-NLRP3 (fluorescein isothiocyanate [FITC] or Texas Red), anti-NLRP4 (Texas Red), or anti-AIM2 (Texas Red) (all from Abcam [United Kingdom]) and anti-ASC (FITC) (Santa Cruz, Dallas, TX). Images were acquired using an LSM510 microscope (Zeiss, Germany) and analyzed by ImageJ software (National Institutes of Health). Dual-color images were acquired by consecutive scanning with only one laser line active per scan to avoid cross-excitation.

**Statistical analysis.** All data were analyzed using GraphPad InStat 6.0 software. Comparisons were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and Student's *t* test. The paired *t* test was used in experi-

ments where we compared the same patients before and after treatment. Mann-Whitney *U* testing was used for nonparametric analysis when data did not fit a Gaussian distribution.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <http://mbo.asm.org/lookup/suppl/doi:10.1128/mbo.01605-15/-DCSupplemental>.

Figure S1, TIF file, 1.5 MB.  
Figure S2, TIF file, 1.5 MB.  
Figure S3, TIF file, 1.5 MB.  
Figure S4, TIF file, 1.5 MB.  
Figure S5, TIF file, 1.5 MB.  
Table S1, DOCX file, 0.2 MB.  
Table S2, DOCX file, 0.1 MB.  
Table S3, DOCX file, 0.1 MB.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Melanie Trombly for critically reviewing the manuscript.

This work was supported by the U.S. National Institutes of Health (A1079293), the National Institute of Science and Technology for Vaccines (CNPq) and FAPEMIG, and the Rede Mineira de Biomoléculas (Fapemig). R.T.G., D.T.G., M.A.A., and B.C.R. received fellowships from CNPq. I.C.H. received a fellowship from CAPES. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

I.C.H., M.A.A., B.D., S.R., D.T.G., and R.T.G. conceived and designed the experiments. J.V. provided samples. I.C.H., C.G.-M., M.A.A., H.G., W.A.A., B.C.R., R.B.D.O., and D.B.P. performed the experiments. I.C.H., B.D., S.R., J.V., D.T.G., and R.T.G. analyzed the data. I.C.H., D.T.G., and R.T.G. wrote the paper.

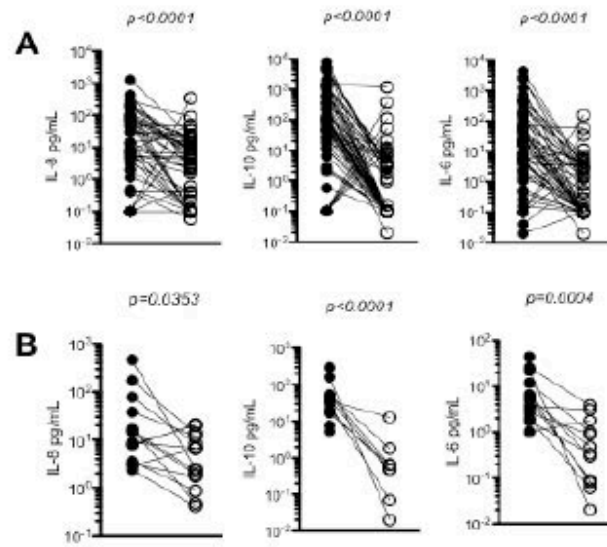
## REFERENCES

- Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Viatrin A, Halmen KA, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Golenbock DT. 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1919–1924. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608745104>.
- Sharma S, DeOliveira R, Kalanari P, Parroche P, Goutagny N, Jiang Z, Chan J, Bartholomeu D, Lauw F, Hall J, Barber G, Gazzinelli R, Fitzgerald K, Golenbock D. 2011. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity* 35:194–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.016>.
- Kalanari P, DeOliveira R, Chan J, Corbett Y, Rathinam V, Stutz A, Latz E, Gazzinelli R, Golenbock D, Fitzgerald K. 2014. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep* 6:196–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.014>.
- Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. 2011. Nucleic acid recognition by the Innate Immune system. *Annu Rev Immunol* 29:185–214. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101340>.
- Ehlers M, Fukuyama H, McCaha TL, Aderem A, Ravetch JV. 2006. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med* 203:553–561. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20052438>.
- Deane JA, Pislakun P, Barrett RS, Felgenbaum L, Town T, Ward J, Flavell RA, Bolland S. 2007. Control of Toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* 27:801–810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.009>.
- Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. 2007. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology (Oxford)* 46:1052–1056. <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kem112>.
- Barrat FJ, Collier RL. 2008. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev* 223:271–283. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00630.x>.
- Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M, Kawal T, Takenchi O, Hiseida H, Horii T, Akira S. 2007. Pathological role of

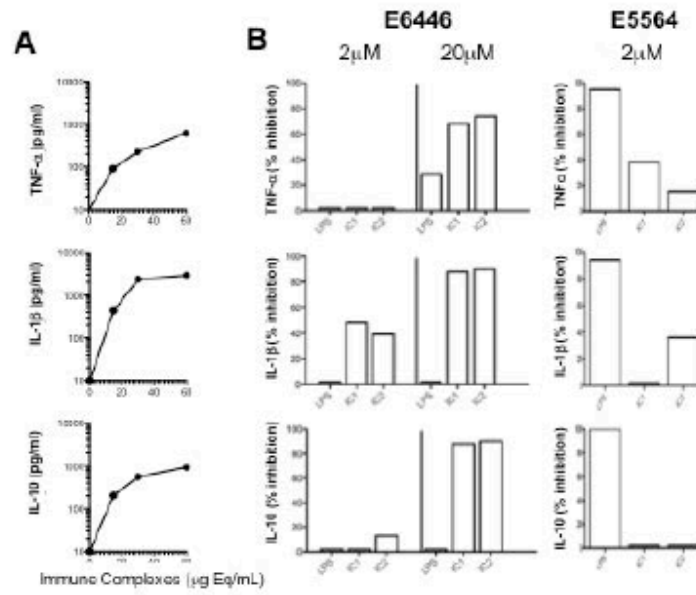
- Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. *Int Immunol* 19:67–79. <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dx1123>.
10. Franklin BS, Ishizaka ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, Rose J, Zheng W, Alalade MA, de Oliveira RB, Goldenberg DT, Gazzinelli RT. 2011. Therapeutic targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3689–3694. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1015406108>.
  11. Baccarella A, Fontana MF, Chen BC, Kim CC. 2013. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infect Immun* 81: 4431–4442. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00923-13>.
  12. Gowda NM, Wu X, Gowda DC. 2012. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J Immunol* 188: 5073–5085. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1102143>.
  13. Rönblom L, Elkon KB. 2010. Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 6:339–347. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.64>.
  14. Cran G, Fajardo L, Pignat B, Allet B, Lambert P, Vassalli P. 1987. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 237:1210–1212. <http://dx.doi.org/10.1126/science.3306918>.
  15. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. 1994. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371:508–510. <http://dx.doi.org/10.1038/371508a0>.
  16. Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A. 1995. 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.
  17. Katz SJ, Russell AS. 2011. Re-evaluation of antimalarials in treating rheumatic diseases: re-appreciation and insights into new mechanisms of action. *Curr Opin Rheumatol* 23:278–281. <http://dx.doi.org/10.1097/BOR.0b013e32834456b6>.
  18. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Goldenberg DT, Luster AD. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 115:407–417. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI23025>.
  19. Cros J, Cagnard N, Woillard K, Patey N, Zhang S, Senechal B, Puel A, Blawas SK, Moshons D, Picard C, Jais J, D’Cruz D, Casanova J, Trouillet C, Gelsmann F. 2010. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33:375–386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>.
  20. Mihel EK, Orago AS, Storte JA. 2005. Immune complex levels in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 72: 593–599.
  21. Fernandez-Arias C, Lopez JP, Hernandez-Perez JN, Bautista-Ojeda MD, Branch O, Rodriguez A. 2013. Malaria inhibits surface expression of complement receptor 1 in monocytes/macrophages, causing decreased immune complex internalization. *J Immunol* 190:3363–3372. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1103812>.
  22. De Oliveira RB, Wang JP, Ram S, Gazzinelli RT, Finberg RW, Goldenberg DT. 2014. Increased survival in B-cell-deficient mice during experimental cerebral malaria suggests a role for circulating immune complexes. *mBio* 5:e00949-14. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00949-14>.
  23. Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2008. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8:34–47. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2206>.
  24. Bolland S, Yin YS, Tus K, Wakeland EK, Ravetch JV. 2002. Genetic modifiers of systemic lupus erythematosus in Fc gammaRIIb(-/-) mice. *J Exp Med* 195:1167–1174. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20020165>.
  25. Mackay M, Stanevsky A, Wang T, Aranow C, Li M, Koenig S, Ravetch JV, Diamond B. 2006. Selective dysregulation of the Fc gammaRIIb receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med* 203:2157–2164. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051503>.
  26. Clatworthy MR, Willcocks L, Urban B, Langhorne J, Williams TN, Peshu N, Watkins NA, Hofo RA, Smith KGC. 2007. Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor Fc gammaRIIb reduce susceptibility to malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7169–7174. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608889104>.
  27. Nlederer HA, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KGC. 2010. Fc gammaRIIb, Fc gammaRIIc, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 1183:69–88. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05132.x>.
  28. Walsberg M, Tarasenko T, Vickers BK, Scott BL, Willcocks LC, Molina-Cruz A, Pierce MA, Huang CY, Torres-Velez FJ, Smith KGC, Barillas-Mury C, Miller LH, Pierce SK, Bolland S. 2011. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus protects against cerebral malaria in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:1122–1127. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1017996108>.
  29. Leonatti FM, Trevellin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PA, Gravina HD, Tada MS, Pereira DB, Goldenberg DT, Antonelli LR, Gazzinelli RT. 2012. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1710. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001710>.
  30. Franklin BS, Parroche P, Alalade MA, Latz E, Roper C, de Oliveira RB, Pereira D, Tada MS, Nogueira P, da Silva LHP, Bjorkbacka H, Goldenberg DT, Gazzinelli RT. 2009. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of Toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5789–5794. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0809742106>.
  31. Lamphier M, Zheng W, Latz E, Spyvee M, Hansen H, Rose J, Genest M, Yang H, Shaffer C, Zhao Y, Shen Y, Liu C, Liu D, Mempel TR, Rowbottom C, Chow J, Twine NC, Yu M, Gusovsky F, Ishizaka ST. 2014. Novel small molecule inhibitors of TLR7 and TLR9: mechanism of action and efficacy in vivo. *Mol Pharmacol* 85:429–440. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.113.089821>.
  32. Millarkey M, Rose JR, Bristol J, Kawata T, Kimura A, Kobayashi S, Przelak M, Chow J, Gusovsky F, Christ WJ, Rossignol DP. 2003. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1093–1102. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.102.044487>.
  33. McCall MBB, Netea MG, Hermans CC, Jansen T, Jacobs L, Goldenberg DT, van der Ven AJAM, Sauerwein RW. 2007. *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *J Immunol* 179:162–171. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.162>.
  34. Alalade MA, Andrade WA, Zamboni DS, Wang D, Souza MDC, Franklin BS, Eilan S, Martins FS, Pereira D, Reed G, Fitzgerald KA, Goldenberg DT, Gazzinelli RT. 2014. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS Pathog* 10:e1003885. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003885>.
  35. Antonelli LR, Leonatti FMS, Costa PAC, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, Pereira DB, Teixeira-Carvalho A, Goldenberg DT, Gonçalves R, Gazzinelli RT. 2014. The CD14+ CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Pathog* 10:e1004393. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004393>.
  36. Murray CJ, Rosenfield LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Pullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 379: 413–431. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60034-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60034-8).
  37. Geithing PW, Blyazar IR, Moyes CI, Smith DL, Baitie KE, Guerra CA, Pull AP, Talem AI, Howes RE, Myers MF, George DB, Horby P, Wertheim HF, Price RN, Mueller I, Baird JK, Hay SI. 2012. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1814. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001814>.
  38. Anstey NM, Douglas NM, Poesoprodjo JR, Price RN. 2012. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Adv Parasitol* 80:151–201. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00003-7>.
  39. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Goldenberg DT. 2014. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 14:744–757. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3742>.
  40. Wu J, Tian L, Yu X, Pattaradilokrat S, Li J, Wang M, Yu W, Qi Y, Zeltner AE, Nair SC, Crompton SP, Orandle MS, Bolland SM, Qi CF, Long CA, Myers TG, Colgan JE, Wang R, Su XZ. 2014. Strain-specific innate immune signaling pathways determine malaria parasitemia dynamics and host mortality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E511–E520. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1316467111>.
  41. Liehl P, Zazzarte-Luts V, Chan J, Zillinger T, Baptista F, Carapan D, Konert M, Hanson KK, Carret C, Lassnig C, Müller M, Kallnie U, Saed M, Chora AF, Goldenberg DT, Strobl B, Pradêncio M, Coelho LP, Kappe SH, Superti-Furga G, Pichlmair A, Vigarito AM, Rice CM, Fitzgerald KA, Barchet W, Mota MM. 2014. Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat Med* 20:47–53. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3424>.
  42. Schroder K, Tschopp J. 2010. The Inflammasomes. *Cell* 140:821–832. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>.

43. Gordon S, Taylor PR. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953–964. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1733>.
44. Smith KGC, Catworthy MR. 2010. FcγRIIb in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* 10:328–343. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2762>.
45. Elshafie AI, Ahlin E, Mathison I, ElGhazali G, Ronnefeldt J. 2007. Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in Sudanese patients with acute visceral Leishmania donovani infection undergoing sodium stibogluconate treatment: implications for disease pathogenesis. *J Immunol* 178:5383–5389. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5383>.
46. Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubel S, Mosser DM. 2010. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis* 10:712–722. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70166-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70166-3).
47. Leoratti F, Farias L, Alves F, Suarez-Mutis M, Coura J, Kall J, Camargo E, Moraes S, Ramasawmy R. 2008. Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. *J Infect Dis* 198:772–780. <http://dx.doi.org/10.1086/590440>.
48. Sam-Agudu NA, Greene JA, Opoka RO, Kazura JW, Bohlin MJ, Zimmerman PA, Riedesel MA, Bergmann TL, Schimmenti LA, John CC. 2010. TLR9 polymorphisms are associated with altered IFNγ levels in children with cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 82:548–555. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0467>.
49. Mockenhaupt F, Hamann I, von Gaertner C, Bedn-Addo G, Kleinsorge C, Schumann R, Blenzle U. 2006. Common polymorphisms of Toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *J Infect Dis* 194:184–188. <http://dx.doi.org/10.1086/505152>.
50. Thomas R, Djalilo D, Noumfi G, Montils JM. 2012. Circulating immune complex levels are associated with disease severity and seasonality in children with malaria from Mali. *Biomark Insights* 7:81–86. <http://dx.doi.org/10.4137/BMI.S9624>.
51. Hartgers FC, Obeng BB, Voskamp A, Larbi IA, Amoah AS, Luty AJF, Boakye D, Yazdanbakhsh M. 2008. Enhanced Toll-like receptor responsiveness associated with mitogen-activated protein kinase activation in *Plasmodium falciparum*-infected children. *Infect Immun* 76:5149–5157. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01579-07>.
52. Crompton PD, Mircetic M, Weiss C, Haghman A, Huang CY, Topham DJ, Treanor JJ, Sanz I, Lee FE, Durbin AP, Mitra K, Narum DL, Ellis RD, Malkin E, Mullen GED, Miller LH, Martin LB, Pierce SK. 2009. The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naïve individuals. *J Immunol* 182:3318–3326. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803596>.
53. Traore B, Koné Y, Doumbo S, Doumtabé D, Traoré A, Crompton PD, Mircetic M, Huang C, Kayentao K, Dicko A, Sagara I, Ellis RD, Mitra K, Galindo A, Miller LH, Doumbo OK, Pierce SK. 2009. The TLR9 agonist CpG fails to enhance the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in semi-immune adults in Mali. *Vaccine* 27:7299–7303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.023>.
54. Ray SK, Putterman C, Diamond B. 1996. Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2019–2024. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.5.2019>.
55. Gelsa GK, Burgamer RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, Fell HP, Ferree S, George RD, Grogan T, James JJ, Maysuria M, Milton JD, Oliveri P, Osborn JL, Peng T, Ratcliffe AL, Webster PJ, Davidson EH, Hood L, Dimitrov K. 2008. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 26:317–325. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1385>.

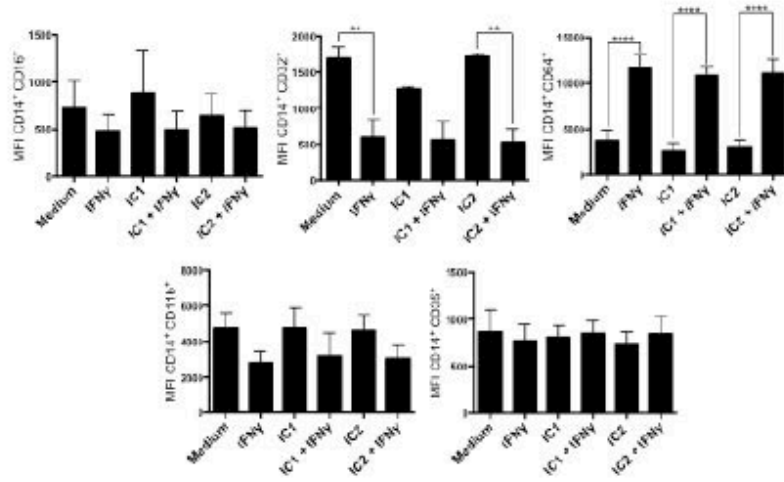
Hirako et al. – Figure S1



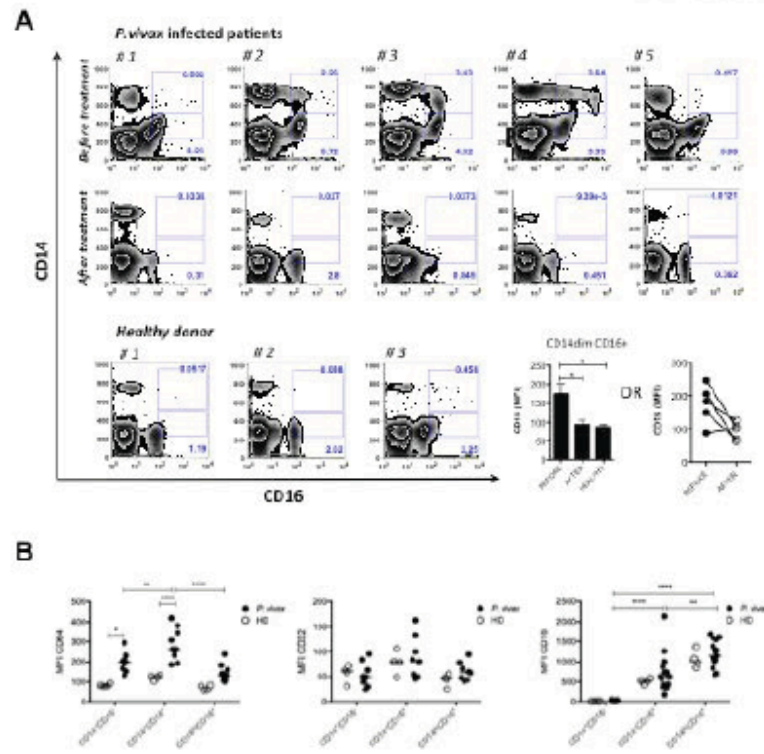
Hirako et al. – Figure S2



Hirako et al. – Figure S3



Hirako et al. – Figure S4



Hirako et al. – Figure S5

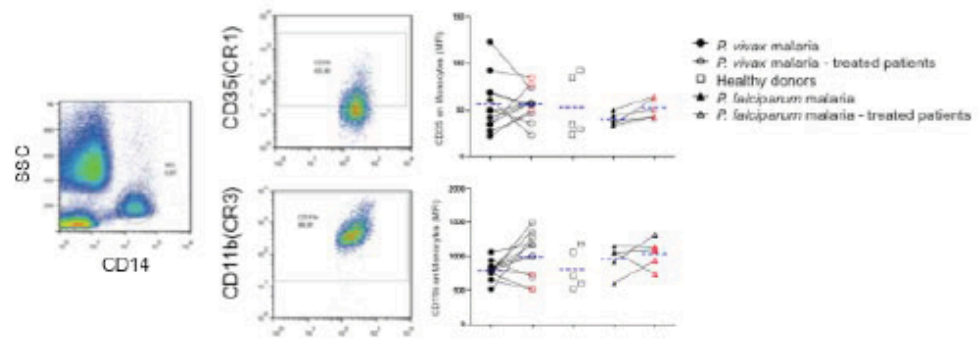




Table S1 – Genes with augmented expression in monocytes stimulated with ICs

Gene Name	Common Gene Name (s)	Fold Change	Statistic
A20	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	5.03	**
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	10.14	**
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	9.89	***
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	2.11	**
CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	5.14	*
CD80	Cluster of Differentiation 80	2.31	*
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	3.42	*
GBP1	Guanylate binding protein 1	3.64	*
HCK	Hematopoietic Cell Kinase	2.29	**
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	3.98	****
IFNGR2	Interferon gamma receptor 2	2.71	***
IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	22.24	**
IL18	Interleukin 18	3.87	**
IL1A	Interleukin 1 alpha	9.39	**
IL1B	Interleukin 1 beta	16.16	****
IL1RA	Interleukin 1 alpha receptor	7.41	*
IL6	Interleukin 6	1.83	***
IL8	Interleukin 8	17.09	****
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	2.50	**
NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	2.44	**
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4.55	***
PSTPIP2	Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	2.08	*
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5.97	**
RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	3.43	*
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	4.01	***
TLR2	Toll-like receptor 2	7.90	**
TNFA	Tumor Necrosis Factor-alpha	7.31	*

Asterisks indicate that differences are significant, as determined by student *t* test: \* $0.01 > p < 0.05$ , \*\* $0.001 > p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ ).

Table S2 – *Plasmodium vivax* malaria patients

Characteristics	Malaria Before Treatment	Malaria After Treatment
Gender, Male/Female	15/65	10/44
Mean Age, Years (range)	34.5 (18-60)	34.5 (18-60)
<b>Malaria Episodes, n (%)<sup>*</sup></b>		
1 <sup>**</sup>	10 (12.5)	-
<5	31 (38.7)	-
≥5	39 (48.7)	-
<b>Parasitemia, parasites/μL of blood, n (%)</b>		
Thick smear positive <sup>**</sup>	17	-
200-300	4 (6.3)	-
301-500	21 (33.3)	-
501-10,000	29 (46)	-
>10,000	9 (14.2)	-
<b>Symptoms, n (%)</b>		
Fever		
≤36	8 (10)	-
36 – 37.9	47 (58.7)	-
>37.9	25 (31.2)	-
Rigor	61 (76.2)	-
Headache	68 (85)	-
Myalgia	72 (90)	-
Nausea	45 (56.2)	-
Vomiting	32 (40)	-
Chills	70 (87.5)	-
Diarrhea	21 (26.2)	-
<b>Hematological Records</b>		
Hemoglobin levels g/dL (Median)	13.45	14
Red Blood Cells x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> (Median)	4.62	4.85
White Blood Cells x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> (Median)	5	5.6
Platelets x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> (Median)	80.5	237

<sup>\*</sup> The number of malaria episodes for each patient was determined according to individual history and detailed anamnesis.

<sup>\*\*</sup> Parasitemia is not available.

Table S3 – *Plasmodium falciparum* malaria patients

Characteristics	Malaria Before Treatment	Malaria After Treatment
Gender, Male/Female	25/6	21/6
Mean Age, Years (range)	34 (18-60)	34 (18-60)
Malaria Episodes, n (%) <sup>*</sup>		
NA	4	-
1 <sup>**</sup>	4 (14.8)	-
<5	16 (59.2)	-
≥5	7 (25.9)	-
Parasitemia, parasites/ $\mu$ L of blood, n (%) Thick smear positive <sup>**</sup>		
200-300	5	-
301-500	1 (3.8)	-
501-10,000	14 (53.8)	-
>10,000	11 (42.3)	-
	0 (0)	-
Symptoms, n (%)		
Fever		
NA	6	-
≤36	2 (8)	-
36 – 37.9	13 (52)	-
>37.9	10 (40)	-
Rigor	27 (87)	-
Headache	27 (87)	-
Myalgia	29 (93.5)	-
Nausea	15 (48.3)	-
Vomiting	9 (28)	-
Chills	24 (75)	-
Diarrhea	11 (34.3)	-
Hematological Records		
Hemoglobin levels g/dL (Median)	14	14.2
Red Blood Cells x 10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> (Median)	4.81	4.74
White Blood Cells x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> (Median)	5	7
Platelets x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> (Median)	150	199

<sup>\*</sup> The number of malaria episodes for each patient was determined according to individual history and detailed anamnesis.

<sup>\*\*</sup>Parasitemia is not available.

**Splenic differentiation and emergence of  
CCR5<sup>+</sup>CXCL9<sup>+</sup>CXCL10<sup>+</sup> monocyte-derived dendritic cells  
in the brain during cerebral malaria**

Isabella C. Hirako<sup>1,2,5</sup>, Marco A. Ataíde<sup>1,3,5</sup>, Lucas Faustino<sup>2</sup>,  
Elizabeth W. Sorensen<sup>2</sup>, Hisashi Ueta<sup>2</sup>, Natalia M. Araújo<sup>1,3</sup>,  
Gustavo B. Menezes<sup>3</sup>, Andrew D. Luster<sup>2,6</sup>,  
and Ricardo T. Gazzinelli<sup>1,3,4,5</sup>

Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte,  
Minas Gerais, Brazil<sup>1</sup>; Center for Immunology and Inflammatory Diseases, Division  
of Rheumatology, Allergy, and Immunology, Massachusetts General Hospital,  
Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA<sup>2</sup>; Department of  
Biochemistry and Immunology and Department of Morphology - Universidade  
Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil<sup>3</sup>; and Division of  
Infectious Diseases and Immunology - University of Massachusetts Medical School,  
Worcester, Massachusetts, USA<sup>4</sup>.

<sup>5,6</sup> These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to R.T.G.

([ricardo.gazzinelli@umassmed.edu](mailto:ricardo.gazzinelli@umassmed.edu)) or A.D.L. ([aluster@mgh.harvard.edu](mailto:aluster@mgh.harvard.edu)).

Dendritic cells play an important role in immune surveillance. After being exposed to microbial components, they migrate to secondary lymphoid organs and activate T lymphocytes. Here we report that during rodent malaria splenic inflammatory monocytes differentiate into monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs), which are CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC I<sup>high</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>Ly6c<sup>+</sup> and express high levels of CCR5, CXCL9 and CXCL10 (CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs). We propose that malaria-induced splenic MO-DCs take a reverse migratory route. After differentiation in the spleen, CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs traffic to the brain in a CCR2-independent, CCR5-dependent manner where they amplify the influx of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, leading to a lethal neuropathological syndrome.

## Introduction

Monocytes (MOs), macrophages and dendritic cells (DCs) are heterogeneous cell populations that have critical roles in tissue repair, sensing the presence of invasive microorganisms and initiating protective immune responses. These cell subsets have overlapping functions. DCs are more specialized in antigen presentation and shaping T cell mediated immunity, whereas macrophages primarily act as a source of pro-inflammatory cytokines and phagocytic cells that effectively destroy pathogens. MOs are less specialized cells that contribute to the overall production of inflammatory cytokines, anti-microbial effector functions, and are the main progenitors for DCs and macrophages<sup>1-3</sup>.

DCs, MOs and macrophages are thought to play an important role in host resistance to both rodent and human malaria<sup>4,5</sup>. During malaria, DCs are activated through Toll-Like Receptors (TLRs), primarily TLR9<sup>6-9</sup>, and serve as important source of IL-12. IL-12 activates NK cells to produce IFN $\gamma$  and promotes differentiation of Th1 lymphocytes that orchestrate the acquired protective immunity against *Plasmodium* infection<sup>10-16</sup>. Importantly, uptake of infected erythrocytes seems to inhibit maturation and function of human DCs<sup>17</sup>, and depletion of circulating DCs is associated with impairment of antigen-specific T cell responses in symptomatic patients infected with either *P. falciparum* or *P. vivax*, suggesting their role in resistance to human disease<sup>18</sup>. In addition, inflammatory monocytes (iMOs) in rodents (CCR2<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> and F4/80<sup>+</sup>) and humans (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>high</sup>) as well as DCs are important sources of inflammatory cytokines and reactive nitrogen and oxygen intermediates that effectively destroy *Plasmodium* parasites within phagocytized infected red blood cells<sup>11,19-21</sup>.

DCs also contribute to the pathogenesis of rodent malaria. Blockade of T cell and DC interaction prevents an overwhelming response associated with wasting syndrome and hypothermia in *P. chabaudi* infected mice<sup>22</sup>. DCs are also required for the development of experimental cerebral malaria (ECM)<sup>23</sup>. In addition, a subset of Ly6c<sup>+</sup> monocytic cells is critical for recruiting CD8<sup>+</sup> T cells to the central nervous system (CNS) and development of ECM<sup>24</sup>. Furthermore, a high proportion of iMOs and DCs express inflammasomes and upon a secondary microbial stimuli release deleterious levels of IL-1 $\beta$ , both in rodent and human malaria<sup>25</sup>.

While at homeostasis the progenitors of most DCs that enter peripheral tissues are not monocytes, different studies have demonstrated that in response to infection or inflammation, monocytes can be induced to differentiate and provide important DC functions<sup>26-36</sup>. The monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) have many of morphological and functional characteristics of conventional DCs, including a powerful capacity for capturing antigens and presenting them to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes as well cross-presenting antigen to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Monocytes are far more abundant than DCs in blood and bone marrow, and the *in vivo* mobilization of this monocyte reservoir to generate potent antigen-presenting DCs is of central importance when the organism is threatened by microbial infections<sup>31-34,36</sup>.

Recent studies have defined various markers that allow the distinction of conventional DCs and iMOs from MO-DCs. However the role of MO-DCs in rodent

malaria as well as in neuroinflammation observed during ECM has not been explored. Here we report that MO-DCs emerge as a main splenic DC population during early stages of *P. berghei* ANKA (PbA) infection in mice. These MO-DCs are unique in that they express high levels of the chemokine receptor CCR5 as well as the interferon-inducible CXCR3 chemokine ligands CXCL9 and CXCL10 (CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs). CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs were the main DC subset found in the CNS of mice undergoing cerebral malaria. Importantly, emergence of MO-DCs in the CNS and development of ECM was dependent on MO-DC CCR5 expression and independent of CCR2 expression. Our results reveal a previously unappreciated role of MO-DCs in PbA induced neuroinflammation as well as the mechanism by which CCR5 mediates the development of ECM.

## Results

### Malaria infection induces MO-DCs

Recent studies have demonstrated that *in vivo* microbial challenge signal iMOs to differentiate into MO-DCs<sup>35,36</sup>. Here, we evaluated whether MO-DCs emerge during rodent malaria by searching for CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>high</sup> cells in the spleen, a main site of phagocytic cell interaction with *Plasmodium* infected red blood cells. For this purpose, we gated double positive CD11b and F4/80 spleen cells for MHC II<sup>high</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup><sup>35</sup>. The results presented in Figure 1A indicate that the frequency of MO-DCs in total CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> splenic cells was increased from 18% in uninfected to 74% in PbA-infected mice. In addition, the level of expression, as indicated by MFI, of DC-SIGN and MHC II in MO-DCs from infected mice increased three-fold. A fraction of these cells also expressed different levels of Ly8c. In contrast, the frequency of CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>int</sup>MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>Ly8c<sup>high</sup> cells (iMOs) decreased from 19% to 4.4%, suggesting that iMOs were converted into MO-DCs. After infection, most MOs (Gate 3, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) became Ly8c<sup>high</sup>, but as a whole the difference in number of cells was not statistically significant when comparing uninfected with infected WT mice. We also performed the initial gating on CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup> cells and then on the DC-SIGN<sup>+</sup>Ly8c<sup>+</sup> population and confirmed that over 80% of these cells in PbA-infected mice were CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (Supplementary Figure 1A). In addition, our analysis indicated that the frequency of CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>Ly8c<sup>+</sup> cells, which correspond to conventional DCs (cDCs), decreased from 48% in uninfected control mice to 20% of total CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup> in infected mice.

To further characterize the MO-DCs, we sorted MO-DCs (95-99% purity) by flow cytometry (Supplementary Figure 2), and analyzed by Giemsa staining and optical and scanning electronic microscopy (SEM) (Figure 1B). The results obtained from SEM show that morphology of MO-DCs is heterogeneous. While a significant proportion of MO-DCs from PbA-infected mice were typical DCs with a smooth surface and dendrites, other cells displayed characteristics of monocytes or transitional morphological phenotypes. Interestingly, we found in the Giemsa staining that a high frequency of MO-DCs purified from infected mice contained hemozoin, which are heme polymers produced by the parasite. To further evaluate the phagocytic capacity of MO-DCs, we incubated spleen cells from uninfected controls and infected mice with erythrocytes infected with a PbA clone that

expresses GFP. By flow cytometry, we demonstrated that MO-DCs were highly efficient phagocytic cells, when compared with iMOs and MOs (Figure 1C). In addition, we observed that unlike iMOs and MOs, MO-DCs express very high levels of CD80 and CD86 (Figure 1D and Supplementary Figure 1B), further suggesting that they are highly efficient antigen presenting cells.

#### Malaria-induced CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs

To further characterize MO-DCs, lysates of highly purified FACS sorted MO-DCs (Supplementary Figure 2) were obtained and gene transcripts analyzed for 547 immune-related genes plus 14 housekeeping genes using a commercially available set of nanostring probes. We observed an increase in the expression of approximately 18% of the analyzed genes in MO-DCs isolated from the spleens of infected mice compared to uninfected mice. Of note, the induction in the expression of *CXCL9* (24-fold increase) and *CXCL10* (19-fold increase) stood out. In addition, the expression of *CCR5* was enhanced 6 fold (Figure 2A). As *CXCL9* and *CXCL10* have been shown to play an important role on ECM<sup>37-39</sup>, we further investigated the expression of these chemokines in spleens of PbA-infected mice. The results presented in Supplementary Figure 3A show that expression of *CXCL9* and *CXCL10* mRNA achieved the highest level from 5 to 7 days post-infection, coinciding with the peak of MO-DCs in the spleen. We also used the Reporting Expression of CXCR3 ligands (REX3) transgenic mice that express the Red Fluorescent Protein (RFP) and Blue Fluorescent Protein (BFP) as reporter genes under the control of the *CXCL9* and *CXCL10* promoters, respectively<sup>40</sup>. We found that a large proportion of the double-positive RFP<sup>+</sup>BFP<sup>+</sup> cells from infected mice were MO-DCs (Figures 2B and 2C). Likewise, over 80% of these cells were CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>, whereas the iMOs and MO-DCs from uninfected mice were CCR2<sup>+</sup>, but CCR5<sup>-</sup> (Figure 2D).

#### Emergence of CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs in the CNS of PbA-infected mice

We next evaluated the presence of MO-DCs in the CNS of mice undergoing ECM. To analyze the presence of MO-DCs in the CNS of PbA-infected mice, we first gated the CD45<sup>high</sup> brain mononuclear cells (BMNC) to discriminate hematopoietic cells from microglia (CD45<sup>interm</sup>). Because the cellular infiltrate in ECM is highly enriched for CD8<sup>+</sup> T cells, we then gated on CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup> cells. MO-DCs emerge at day 5 and peaked at day 7 post-infection with PbA, which coincides with expression of *CXCL9* and *CXCL10* and other inflammatory mediators in the CNS (Figure 3A and Supplementary Figures 3B and 4A). Importantly, most of CD45<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup> cells in the CNS were also CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>, which is consistent with the MO-DC phenotype. We further analyzed BMNCs from PbA-infected mice for *CXCL9*, *CXCL10* and *CCR5* expression. We found no cells expressing *CXCL9* and *CXCL10* in uninfected REX3 mice (Figure 3B and Supplementary Figure 4A). In infected REX3 mice, BFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup> cells were CD45<sup>high</sup>, CD45<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> cells were BFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup>, whereas approximately 60% of CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup> cells were BFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup> (Figure 3C). Furthermore, 80% of CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup>BFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup> cells were CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>high</sup>, consistent with the hypothesis that MO-DCs are also a main hematopoietic source of *CXCL9* and *CXCL10* in the CNS of infected mice (Figure



3C). CD45<sup>interm</sup> as well as CD45<sup>+</sup> cells, most likely microglia and neuron or glial cells, respectively, were both BFP and RFP negative. Finally, we evaluated the expression of CCR2 and CCR5 in MO-DCs derived from CNS of infected mice. The results shown in Figure 3D demonstrate that approximately 80% of brain MO-DCs from infected, but not from uninfected mice, were double positive for CCR2 and CCR5.

#### IFN $\gamma$ -induced expression of CXCL9 and CXCL10 by MO-DCs

A recent study has demonstrated that IFN $\gamma$  is an important mediator of MO-DC differentiation<sup>36</sup>. In addition, both IFN $\gamma$  and Type I IFN (IFN $\alpha/\beta$ ) have been shown to induce expression of CXCL9 and CXCL10 in macrophages. Hence, we used IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, REX3IFN $\gamma$ R<sup>+</sup> as well as REX3IFNAR<sup>+</sup> mice infected with PbA. We first evaluated the profile of gene expression in highly purified splenic MO-DCs (Supplementary Figure 2) isolated from infected C57BL/6 and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> mice. From 98 PbA-induced genes, 58 (60%) were dependent on endogenous IFN $\gamma$ . Expression of CXCL9 and CXCL10 mRNA induced by PbA infection was totally absent in MO-DCs from IFN $\gamma$ <sup>+</sup> mice, whereas enhanced expression of other genes, such as CCR5, CCL7 and CCL8 was independent of endogenous IFN $\gamma$  (Figure 4A). Consistently, MO-DCs from REX3, but not from REX3IFN $\gamma$ R<sup>+</sup> mice, expressed high levels of RFP and BFP (Figures 4B and 4C). Unexpectedly, we found no redundancy of IFN $\gamma$  and IFN $\alpha/\beta$ , and surprisingly, expression of CXCL9 (RFP) and CXCL10 (BFP) were significantly augmented in MO-DCs from PbA-infected REX3IFNAR<sup>+</sup> mice, when compared to infected REX3 mice (data not shown).

We also tested whether IFN $\gamma$  is necessary for differentiation of MO-DCs. We noticed an accumulation of iMOs and decreased frequency of MO-DCs in REX3/IFN $\gamma$ R<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> relative to REX3 and C57BL/6 mice infected with PbA (Figures 4B, 4C and Supplementary Figure 5). Together, these results indicate that differentiation of precursor iMOs into MO-DCs is impaired in mice lacking either functional IFN $\gamma$  or IFN $\gamma$ R genes.

#### TLR-induced expression of CXCL9 and CXCL10 by MO-DCs

Cheong et al.<sup>35</sup> demonstrated that LPS induces differentiation of iMOs into MO-DCs. It is also well established that *Plasmodium* infection activates the innate immune system primarily by activation of TLR9<sup>6,9,41</sup> and other nucleic acid sensors<sup>42,43</sup>. The activation of TLR9 during PbA infection induces the production of IL-12 by DCs, culminating in the production of IFN $\gamma$  primarily T lymphocytes<sup>6,22,41</sup>. Hence we decided to evaluate whether PbA infection was inducing differentiation of MO-DCs via TLR activation. With this in mind, we used E6446, an antagonist that prevents activation of TLR7 and TLR9 by ssRNA and DNA<sup>41,44</sup>. The results presented in Supplementary Figure 6 show that therapy with E6446 prevented lethality when given in the very early days of infection (from day -1 to 3 post-infection).

The data presented in Figures 5A and 5B show that treatment with E6446 inhibits the expression of IFN $\gamma$  mRNA by spleen cells and results in decreased circulating levels of IFN $\gamma$  in sera of mice at 6 days post-infection with PbA. In addition, at five days post-infection, the proportion of activated (CD44<sup>high</sup>/CD62L<sup>low</sup>)

CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was augmented to 55.5% and 39.9%, when compared to 14.7% and 12.2% in uninfected controls or 27.8% and 10.2% in infected mice treated with E8446, respectively (Figure 5C). The percentage of resting T cells (CD44<sup>low</sup>/CD62L<sup>high</sup>) was inversely proportional to activated cells, and decreased to 32.9% of CD4<sup>+</sup> T and 37.3% of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in infected mice, as compared to 77.7% and 78.1% in uninfected controls and 59.6% and 64% in infected mice treated with E8446, respectively. Likewise, E8446 inhibited expression of IFN $\gamma$  by both CD4<sup>+</sup> T as well as CD8<sup>+</sup> T cells from infected mice. The results presented in Figure 5D were obtained by using GREAT mice that express an YFP gene under the IFN $\gamma$  promoter. Expression of YFP by CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells isolated from controls and infected mice increased from 2.16% to 8.99% and 3.94% to 14.40%, respectively. In GREAT mice infected with PbA and treated with E8446, only 3.05% and 4.60% of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells expressed YFP, respectively. These results were confirmed by intracellular staining for IFN $\gamma$  in T lymphocytes from C57BL/6 mice infected with PbA (data not shown). To evaluate the NK cell contribution to MO-DC differentiation we used the RAG<sup>-/-</sup> mice, which lack T cells. To our surprise, we observed that iMOs did not differentiate into MO-DCs in RAG<sup>-/-</sup> mice infected with PbA. These results indicate that IFN $\gamma$  and/or other signals provided by NK cells are not sufficient to promote MO-DC differentiation (Figure 5E).

As a consequence of inhibition of IFN $\gamma$  production by T lymphocytes, treatment with E8446 also inhibited the expression of *CXCL9* and *CXCL10* mRNA by spleen cells (Figure 5F) as well as RFP (*CXCL9*) and BFP (*CXCL10*) by MO-DCs from infected WT and REX3 mice, respectively (Figure 5G). Immunocytochemistry analysis revealed the inhibitory effect of E8446 treatment on *CXCL9* and *CXCL10* expression by spleen cells from PbA-infected REX3 mice (Supplementary Figure 6B).

#### IFN $\gamma$ -dependent recruitment of MO-DCs to the CNS of PbA-infected mice

The results presented in Supplementary Figure 3B show that expression of *IFN $\gamma$*  and chemokine genes (*i.e.*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CCL8*, *CXCL9* and *CXCL10*) is induced and peaks in the brain at 6-7 days post-infection with PbA. Our experiments also demonstrated that expression of these genes is not seen or largely decreased in the brains of PbA-infected IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice or PbA-infected C57BL/6 mice treated with E8446 (Figures 6A and 6B). Since MO-DCs express both CCR2 (receptor for *CCL2*) and CCR5 (receptor for *CCL3*, *CCL4* and *CCL5*), we evaluated the emergence of MO-DCs in the brain of PbA-infected IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice as well as infected C57BL/6 mice treated with E8446. We observed that migration of MO-DCs into the brain of infected IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice or E8446 treated WT mice was also impaired (Figure 6C). Consistent with the importance of MO-DCs in recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells and development of ECM<sup>37-39</sup>, the total number of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was reduced, but not absent, in the CNS of either IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice or PbA-infected C57BL/6 mice treated with E8446. Based on these results and those published elsewhere<sup>445-48</sup>, we propose that IFN $\gamma$  is a key cytokine mediating ECM by promoting the expression of chemokines that recruit MO-DCs into the brain and consequently amplifying recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells to the CNS.

#### CCR5-dependent recruitment of MO-DCs to the CNS of PbA-infected mice

We hypothesized that CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5 are largely responsible for recruiting MO-DCs to the CNS of PbA-infected mice. The data presented in Figure 7A provided evidence that isolated MO-DCs (75-85% purity) migrate towards to both CCL2 and CCL5 *in vitro*, although CCL5 appeared to be a more efficacious chemoattractant for MO-DCs. We also noticed an additive effect of the two chemokines. As CCL2 and CCR2 have been shown to be important for recruitment of iMOs during infection with *Toxoplasma gondii* and *P. chabaudi*<sup>15,49</sup>, we evaluated the role of CCR2 in the development of ECM. As expected, we observed a decreased frequency of MO-DCs in the spleen of both uninfected and PbA-infected CCR2<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Figures 7A and 7B). However, the number of MO-DCs in the CNS of PbA-infected CCR2<sup>-/-</sup> mice was only marginally reduced (Figure 7C). In contrast, we observed no difference in the frequency or number of splenic MO-DCs in infected CCR5<sup>-/-</sup> mice (Supplementary Figures 8A and 8B). Nevertheless, emergence of MO-DCs in the CNS of PbA-infected CCR5<sup>-/-</sup> mice was highly compromised (Figure 7C). Consistent with numbers of MO-DCs in the CNS, CCR5<sup>-/-</sup> mice, but CCR2<sup>-/-</sup> mice, were more resistant to the development of ECM than PbA-infected WT mice (Figure 7D).

Importantly, over 80% of MO-DCs in the CNS of infected C57BL/6 mice expressed CCR5. Less than 10% of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes expressed CCR5, whereas over 90% expressed CXCR3 (Figures 8A and 8B). Hence, we hypothesize that CCR5 is a key receptor for MO-DC recruitment to the CNS, whereas CXCR3 and its ligands, CXCL9 and CXCL10, are responsible for attracting T lymphocytes to the CNS. Finally, we performed *in vivo* imaging experiments to evaluate the role of CCR5 in the recruitment of MO-DCs to the CNS. MO-DCs (75-85% purity) from spleens of PbA-infected WT or CCR5<sup>-/-</sup> mice were transferred into WT mice five days post-infection. Migration of CFSE-labeled MO-DCs was evaluated from 15 to 60 minutes after cell transfer. We found high frequency of WT MO-DCs, primarily, in the microvasculature. MO-DCs from CCR5<sup>-/-</sup> mice were less efficient in migrating to the CNS of infected mice. No migration of MO-DCs to the CNS of uninfected mice was observed (Figure 8C and Supplementary Videos 1 and 2). Consistent with role of CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10 MO-DCs in recruitment of CCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, the number of both cell populations was markedly decreased in the CNS of PbA-infected CCR5<sup>-/-</sup> mice (Figure 8D).

#### Discussion

We provide compelling evidence that acute infection with PbA stimulates differentiation of splenic iMOs into MO-DCs in an IFN $\gamma$ -dependent manner. Different from iMOs, malaria-induced MO-DCs possess a strong phagocytic activity, and express high levels of molecules involved in antigen presentation (*i.e.*, MHC II, CD80 and CD86) as well as the IFN $\gamma$ -inducible CXCR3 ligands CXCL9 and CXCL10 and the chemokine receptor CCR5. Hence, splenic CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs seem to play an important role in activating T lymphocytes and promoting systemic inflammation during acute malaria episodes. We hypothesize that high levels of circulating IFN $\gamma$  produced by splenic T cells induces the expression of

adhesion molecules and chemokines by endothelial cells and initiates recruitment of leukocytes to the CNS. Furthermore, our data suggest that after differentiation, splenic  $CCR5^+CXCL9/10^+$  MO-DCs migrate to the brain in a CCR5-dependent manner and amplify the recruitment and activation of  $CXCR3^+CD8^+$  T cells, promoting neuroinflammation and ECM.

DCs and iMOs play important roles in host resistance to malaria. Indeed, there is a very dynamic distribution of iMOs and DC subpopulations in the spleen of acutely infected mice, which changes with the course of infection, parasite virulence and infective *Plasmodium spp*<sup>5</sup>. For instance, DCs exposed to the erythrocytic stage of *P. chabaudi* produce high levels of IL-12 and promote the production of IFN $\gamma$  by both T lymphocytes and NK cells<sup>14</sup>. This cytokine activates macrophages to produce toxic metabolites, such as reactive nitrogen intermediates (RNI), and promotes Ig switch to the IgG2a/IgG2c, which mediate host resistance to *Plasmodium* infection in mice<sup>11,50</sup>. In addition, both iMOs and DCs can internalize and destroy infected RBCs in the spleens and mediate resistance to *P. chabaudi* infection in mice<sup>19,21</sup>. However, depending on experimental setting, dendritic cells may become refractory or impaired for presenting antigen to CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells<sup>51,52</sup>. For instance, virulent *P. yoelli* strains impair DC functions to prevent the induction of host protective immune responses<sup>15</sup>. iMOs and DCs also play key roles in the deleterious inflammatory response and pathogenesis of rodent malaria. As examples, DCs promotes cytokinemia and wasting syndrome in *P. chabaudi* infected mice<sup>22</sup>; and both conventional DCs and iMOs are required for recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells and development of neuroinflammation in the ECM model<sup>23,24,38</sup>.

Unexpectedly, we found that most CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup> cells in the spleen of PbA-infected mice are DC-SIGN<sup>high</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> consistent with a MO-DC phenotype<sup>35,36</sup>. Because these cells share various markers with iMOs and conventional myeloid as well as plasmacytoid DCs, some of the existing results in the literature may have missed that a significant proportion of DCs in this rodent malaria model are indeed MO-DCs. Previous studies using the *P. chabaudi* model identified iMOs that express low levels of CD11c as well as a low frequency of CD11c<sup>+</sup> cells that were CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup><sup>19,21</sup>. Here we provide evidences that in this model, splenic iMOs and MOs are progenitors of MO-DCs. While the frequency and numbers of MO-DCs cells were markedly increased in the spleen following infection, iMOs and MOs were decreased within the splenic CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> population. Furthermore, we noticed a continuous gradient of MO-DCs expressing Ly8c, from Ly8c<sup>high</sup> to Ly8c<sup>low</sup>. As iMOs are classically Ly8c<sup>high</sup>, we propose that Ly8c<sup>high</sup>MO-DCs are recently differentiated, whereas Ly8c<sup>low</sup> MO-DCs are fully differentiated. Importantly, we determined here that malaria-induced MO-DCs, but not iMOs or MOs, express high levels of CCR5, CXCL9 and CXCL10, which are highly relevant for the development ECM<sup>38,39,53</sup>.

Upon TLR or cytokine stimulation, iMOs may differentiate into macrophages or MO-DCs that migrate to lymphoid organs and non-lymphoid tissues<sup>26-30,35,36</sup>. IFN $\gamma$  not only has an important role in host resistance to *Plasmodium* infection, but is also a key mediator of malaria pathogenesis<sup>4</sup>. The high circulating levels of IFN $\gamma$  elicited during *Plasmodium* infection lead to pro-inflammatory priming<sup>48,54</sup> that promotes systemic inflammation<sup>25,48,55</sup>. In the case of ECM, treatment with

neutralizing anti-IFN $\gamma$  antibodies or genetic deficiency of IFN $\gamma$  prevents PbA-induced neuroinflammation and lethality due ECM<sup>46,47,56</sup>. Different functions are attributed to IFN $\gamma$  in the development of ECM, which includes the enhanced production of pro-inflammatory cytokines and chemokines as well as enhanced expression of adhesion molecules in endothelial cells from brain vasculature<sup>57,58</sup>. Important to this study, CXCL9<sup>-/-</sup>, CXCL10<sup>-/-</sup>, and CXCR3<sup>-/-</sup> mice have a less intense infiltrate of CD8<sup>+</sup> T cells in the CNS and are more resistant to development of ECM<sup>37-39</sup>. Here, we demonstrate that differentiation of MO-DCs is impaired and expression of CXCL9 and CXCL10 abolished in PbA-infected IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> and IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mice.

Different studies suggest that TLR7 and TLR9 are important receptors involved in the activation of DCs and initiation of IL-12 and IFN $\gamma$  production during both human and mouse malaria<sup>6-9,14,22,59,60</sup>. We found that the lysosomotropic compound (E6446), which binds to RNA and DNA and blocks TLR7 and TLR9 activation, prevents development of ECM<sup>41,44</sup>. When given in the first three days of infection, treatment with E6446 inhibited CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell activation and IFN $\gamma$  production. As consequence expression of CXCL9 and CXCL10 by MO-DCs was not induced. These results are consistent with earlier studies showing that IFN $\gamma$  produced by CD4<sup>+</sup> T cells induce CXCL9 and CXCL10 expression and promotes the recruitment of pathogenic CD8<sup>+</sup> T cells to the brain of PbA-infected mice<sup>38,39,46,47,61,62</sup>. *Plasmodium* DNA and RNA were also shown to activate other families of cytosolic innate immune receptors. Since E6446 binds and "inactivates" DNA and RNA that transit through the lysosomes, it may also prevent activation of other DNA/RNA cytosolic sensors that are inducers of Type I IFN<sup>42,43,63</sup>. However, expression of CXCL9 and CXCL10 by MO-DCs was not abolished in infected REX3IFNAR<sup>-/-</sup> mice, demonstrating the Type I IFN is not a physiological inducers of CXCL9 and CXCL10 following PbA infection.

We also observed the emergence of CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs in the brain of PbA-infected mice. Among the CD3<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD45<sup>high</sup> hematopoietic cells, most cells expressed CD11b, F4/80, DC-SIGN, Ly6c, MHC II and CD11c<sup>64,65</sup>. The increased frequency of CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs coincided with increased expression of CXCL9 and CXCL10 mRNA in the CNS of PbA-infected mice. While we have evidence that endothelial cells are also important source of CXCL10 in the brain, we found that among CD45<sup>high</sup> cells, MO-DCs were the major source of both CXCL9 and CXCL10 (RFP<sup>+</sup>BFP<sup>+</sup> cells) in the brain of PbA-infected REX3 mice. Hence, CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs are likely to play an important role in recruiting and activating CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during ECM. Importantly, recent studies have proposed that endothelial cells are able to cross-present malaria antigens<sup>66,67</sup>. However, our data suggest the MO-DCs maybe the key cells presenting malaria antigens to CD8<sup>+</sup> T cells in the brain microvasculature and parenchyma.

A main question raised by these results is whether MO-DCs differentiate in the CNS from recruited iMOs or are being directly recruited from the pool of splenic CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs. As previously described<sup>35</sup>, both iMOs and MO-DCs express CCR2. CCL2 and CCR2 play important roles in controlling iMOs egress from the bone marrow and their migration to the spleen or to sites of infection. CCL2 and CCR2 have also been shown to be important for host resistance to *P. chabaudi* and *Toxoplasma gondii*<sup>19,49</sup>. However, we found that the frequency of MO-

DCs in the brain was only marginally affected in CCR2<sup>-/-</sup> mice and susceptibility to ECM was not altered. Importantly, as previously reported (what ref), the total number of iMOs was markedly decreased in spleen in CCR2<sup>-/-</sup> mice infected with PbA. Interestingly, we found that MOs (CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>) that become Ly8c<sup>high</sup> were increased within the CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> population in PbA-infected CCR2<sup>-/-</sup> mice. Thus, we propose that in infected CCR2<sup>-/-</sup> mice, the splenic Ly8c<sup>high</sup>MOs are the main precursors of MO-DCs.

Interestingly, we found that malaria-induced MO-DCs, but not iMOs, express high levels of CCR5. CCR5<sup>-/-</sup> mice have been reported to be more resistant to PbA infection<sup>53</sup>, but the mechanism by which CCR5 mediates ECM is not known. The deficiency on CCR5 did not impact MO-DCs differentiation in the spleen, but clearly affected their emergence in the brain of PbA-infected mice. All three CCR5 chemokine agonists (i.e., CCL2, CCL3 and CCL5) are expressed in the brain of PbA-infected mice, and may act together to recruit CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs. Although most CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells do not express CCR5, their migration to the CNS is also compromised in infected CCR5<sup>-/-</sup> mice. These results are consistent with the hypothesis of an amplification loop involving MO-DCs (important source of CXCR3 ligands) and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte (important source of CCR5 ligands)<sup>45,68</sup>, resulting in increased CD8<sup>+</sup> T cell and MO-DC recruitment to the brain in ECM, as recently proposed for Ly8c<sup>+</sup> monocytic cells and CD8<sup>+</sup> T cells<sup>24</sup>. Our study provides important novel information regarding the pathogenic mechanism responsible for ECM by demonstrating that the vast majority of Ly8c<sup>+</sup> that emerge in the CNS of PbA infected mice are indeed MO-DCs. We also demonstrate how these cells induce T lymphocyte recruitment to the CNS, as we clearly show that they are an important source of CXCL9 and CXCL10. Finally, we demonstrate that the emergence of these Ly8c<sup>+</sup> MO-DCs in the CNS is dependent on CCR5, and, surprisingly, independent of CCR2, which is classically involved in iMOs recruitment to lymphoid organs and to site of infection.

In conclusion, we propose that immune responses during malaria are initiated by exposure of resident splenic DCs to parasite nucleic acids, which leads to IFN $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and differentiation of iMOs into MO-DCs. The CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs display a potent phagocytic activity and express high levels of MHC II, CD80 and CD86, indicating a great potential not only to recruit, but also to present antigen and activate T lymphocytes. Importantly, CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs become the dominant subset of splenic DCs (CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup>) and likely play a key role in activating parasite-specific T cells and promoting systemic inflammation during acute malaria. Finally, our results suggest that MO-DCs are not following the conventional path from non-lymphoid tissues to secondary lymphoid organs. Instead they are being recruited from a pool of splenic MO-DCs to the CNS of PbA-infected mice. Once they reach the brain, the CCR5<sup>+</sup>CXCL9/10<sup>+</sup> MO-DCs execute their pathogenic role by recruiting and activating CD8<sup>+</sup> T cells, which are the effector cells in ECM.

**Acknowledgements.**

This work was supported by grants from the US National Institutes of Health to A.D.L. R.T.G. laboratory was supported by Rede Mineira de Biomoléculas from Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig, RED-00012-14) and Brazilian National Institute of Science and Technology for Vaccines granted by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Fapemig/Ministério da Saúde (573547/2008-4). R.T.G. was recipient of a Scholar Fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and the David Rockefeller Center for Latin American Studies at Harvard University. I.C.H., M.A.A., and N.M.A are recipient of Science without Borders and Graduate Student fellowships from CNPq and CAPES. R.T.G. and G.B.M. are research fellows from CNPq. We thank Barbara Louzada for her technical assistance in the laboratory.

**Methods**

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/natureimmunology/>.

### Figure Legends

**Figure 1. Differentiation of splenic MO-DCs (F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>MHC II<sup>high</sup> CD11c<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) in PbA-infected mice.** Spleens were harvested five days after PbA infection. Representative primary flow cytometric dot plots are shown. (A) Splenocytes were first gated for F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells and then for DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup> cells. F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>MHC II<sup>high</sup> cells were also checked for CD11c<sup>+</sup> and Ly6C<sup>+</sup> expression. Bar graphs correspond to total number of cells (four mice per group). The data shown are representative of eight independent experiments. (B) Splenocytes were labeled with fluorescent antibodies and CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>MHC II<sup>high</sup> monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) purified by flow cytometry (Supplementary Figure 2) and analyzed by Giemsa staining and optical microscopy as well as scanning electronic microscopy. White arrows indicate hemozoin crystals inside purified MO-DCs. (C) Flow cytometry histograms show the MFI results from spleen cells of uninfected (shaded lines) versus infected (open lines) incubated, at 1:1 ratio, with uninfected red blood cells (RBCs) (blue) or RBCs infected with GFP-expressing PbA (red). The results indicate the phagocytic activity of MO-DCs, iMOs and MOs, as indicated. Bar graphs correspond to the MFI average of three to four mice per group. The data shown are representative of two independent experiments. (D) Expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 on cell surface of MOs, iMOs, and MO-DCs. The data shown are representative of two independent experiments. Results are expressed as mean. Differences considered statistically significant when comparing infected and non-infected mice (\*\*, p>0.01) after two-way ANOVA.

**Figure 2. Expression of CXCL9 and CXCL10 by MO-DCs from PbA-infected mice.** Splenocytes were harvested at 6 days post PbA infection. CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>MHC II<sup>high</sup> monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) were purified by flow cytometry (Supplementary Figure 2) and analyzed for (A) RNA expression of immune related genes using a nCounter Analysis System. The results indicate fold increase of gene expression, when comparing MO-DCs isolated from three infected mice compared to three non-infected mice. (B) Confocal microscopy of spleen from an infected REX3 mouse. Top panels shows F4/80<sup>+</sup> (APC converted in green), CXCL9-RFP and CXCL10-BFP staining. Bottom panels show CD11c<sup>+</sup> (APC converted in green), CXCL9-RFP and CXCL10-BFP staining. Arrows and arrowheads show double and triple positive cells, respectively. (C) PbA-infected REX3 mice were sacrificed at day 6 post-infection and splenic MO-DC cells analyzed for CXCL9 and CXCL10 expression. Spleen cells were first gated on double positive CXCL9/CXCL10, and then on F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> cells. All CXCL9<sup>+</sup>CXCL10<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> cells were CD11c<sup>+</sup>. (D) Spleen cells harvested 6 days post-infection were first gated on F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and then on CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> cells. The majority of MO-DCs from uninfected and PbA-infected mice were CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup> and CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>, respectively. Representative primary flow cytometric dot plots are shown. The data are representative of three experiments with three mice per group that yielded similar results. Results are expressed as mean. Difference considered statistically significant when comparing infected and non-infected mice (\*\*, p>0.01) after student t test.



**Figure 3. High levels of MO-DCs in the brain from PbA-infected mice.** (A) MO-DCs ( $CD45^{high}CD8^{-}CD3^{-}CD11b^{+}Ly6c^{+}MHC\ II^{+}DC-SIGN^{high}CD11c^{+}$ ) were quantified by flow cytometric analysis within brain mononuclear cells (BMNCs) isolated at 0, 5 and 7 days post-infection with PbA. (B) BMNCs from uninfected REX3 mice were analyzed by flow cytometric analysis. All  $CD45^{high}CD8^{-}$  cells were negative for CXCL9 (RFP) and CXCL10 (RFP). (C) Approximately 70% of  $CD45^{high}CD8^{-}$  BMNCs from PbA-infected REX3 mice were double positive for the CXCL9 and CXCL10 reporters. Eighty percent of  $CD45^{high}CD8^{-}CXCL9^{+}CXCL10^{+}$  cells were  $CD11b^{+}Ly6c^{+}CD11c^{+}MHC\ II^{+}$ .  $CD45^{low/negative}CD8^{-}$  BMNCs were all negative for CXCL9-RFP and CXCL10-BFP. Representative primary flow cytometric dot plots are shown after  $CD45^{high}$  gating for leukocytes. (D) BMNCs were harvested from WT mice at 0 and 7 days post-infection and expression of CCR2 and CCR5 analyzed in MO-DCs. Data represent the average of three or four mice per group and results are representative of three independent experiments. Differences were considered statistically significant when \*,  $p < 0.05$ , and \*\*,  $p < 0.01$  as indicated by two-way ANOVA (A) and student *t* test analyses (D).

**Figure 4. IFN $\gamma$ -dependent expression of CXCL9 and CXCL10 by MO-DCs from PbA-infected mice.** C57BL/6, IFN $\gamma^{+}$ , REX3 or REX3/IFN $\gamma R^{-}$  mice were infected with PbA and their spleens harvested at 8 days later. (A) Gene expression was analyzed in total RNA extracted from highly purified (over 98% purity) MO-DCs from infected C57BL/6 and IFN $\gamma^{+}$  mice by nCounter Analysis System. Data represent the average of gene expression of three mice per group. (B) Representative primary flow cytometric dot plots are shown for splenic MO-DCs from REX3 and REX3/IFN $\gamma R^{-}$  mice gated on  $F4/80^{+}CD11b^{+}$  (left panels), then on  $DC-SIGN^{high}MHC\ II^{high}$  cells (middle panels), and CXCL9 and CXCL10 double positive cells (right panels), respectively. The percentage of MO-DC (Gate 1), iMOs (Gate 2), and MOs (Gate 3), and CXCL9 $^{+}$ CXCL10 $^{+}$ MO-DCs are indicated. (C) Frequency of splenic  $CD11b^{+}F4/80^{+}$  cell subsets in infected REX3 and REX3/IFN $\gamma R^{-}$  mice are shown. The average and SD are representative of two independent experiments with three or four mice per group. Differences were considered statistically significant when \*\*,  $p < 0.01$ ; and \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  as indicated by two-way ANOVA analysis.

**Figure 5. Treatment with E6446 inhibits expression of IFN $\gamma$  by T lymphocytes as well as CXCL9 and CXCL10 by MO-DCs.** C57BL/6, GREAT, RAG $^{-}$  as well as REX3 mice were infected with PbA and treated with either E6446 (120 mg/Kg/day) or vehicle from -1 to 3 days post-infection. (A) Spleens were harvested from WT mice at 0, 5 and 7 post-infection, total RNA extracted, and expression levels of IFN $\gamma$  mRNA analyzed by qPCR. The results were normalized to  $\beta 2-MICROBULIN$ . (B) Sera from infected C57BL/6 mice were collected at different times post-infection and used to measure the levels of IFN $\gamma$  by Cytometric Bead Analysis. The inhibitory effect of E6446 on the levels of circulating IFN $\gamma$  was evaluated at 8 days post-infection (right panel). (C) Spleens from untreated and E6446-treated C57BL/6 mice were harvested 5 days-post infection. Bar graphs correspond to the percentage of naïve ( $CD62L^{high}CD44^{low}$ ) versus activated effector ( $CD62L^{low}CD44^{high}$ )  $CD4^{+}T$  (top panels) and  $CD8^{+}T$  (bottom panels) cells. (D) Splenocytes from uninfected and

infected GREAT mice treated with E6446 or left untreated were stimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) for 4h in culture containing brefeldin A, and analyzed by flow cytometry. YFP positive cells were considered as IFN $\gamma$  producers CD4 $^{+}$ T (top panels) and CD8 $^{+}$ T (bottom panels) cells. (E) Spleens were harvested from uninfected and PbA-infected WT and RAG $^{-/-}$  mice and the frequency of MO-DCs analyzed by flow cytometry. Left and right panels show the frequency of F4/80 $^{+}$ CD11b $^{+}$ DC-SIGN $^{high}$ MHC II $^{high}$  and levels of CD11c expression on MO-DCs, respectively. (F) qRT-PCR (left panels) and (G) flow cytometry analysis revealed that treatment with E6446 resulted in inhibition of CXCL9 and CXCL10 mRNA expression in the spleen and RFP and BFP proteins by splenic MO-DCs from PbA-infected C57BL/6 and REX3 mice, respectively. Representative primary flow cytometry dot plots are shown in panels C, D, E and F. Results are representative of two to three independent experiments with three to five mice per group. Differences considered statistically significant when \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , as indicated by two-way ANOVA analysis.

**FIGURE 6. IFN $\gamma$ -dependent chemokine expression and emergence of CD45 $^{high}$  hematopoietic cells to the CNS of PbA-infected mice.** *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CXCL9*, *CXCL10* and *IFN $\gamma$*  mRNA expression was analyzed in brain tissue of uninfected or PbA-infected (A) IFN $\gamma^{+}$  and C57BL/6 mice, as well as (B) C57BL/6 mice treated from day -1 to 3 post-infection with vehicle or E6446 (120 mg/Kg/day), as indicated. The mRNA levels were analyzed by qPCR and results presented after normalization with either *GAPDH* (A) or  *$\beta$ 2-microglobulin* (B) mRNA. (C) Flow cytometric analysis of brain MO-DCs (CD45 $^{high}$ CD3 $^{-}$ CD8 $^{-}$ CD11b $^{+}$ Ly6C $^{+}$ CD11c $^{+}$ DC-SIGN $^{+}$ ) from uninfected and PBA-infected WT, IFN $\gamma^{+}$ , and WT mice treated with E6446 seven days post-infection. The numbers of both CD45 $^{high}$ CD8 $^{+}$ CD3 $^{+}$  and CD45 $^{high}$ CD8 $^{-}$ CD3 $^{-}$ CD11c $^{+}$ CD11b $^{+}$ DC-SIGN $^{high}$ Ly6C $^{+}$  cells are significantly decreased in the brain of infected IFN $\gamma^{+}$  and E6446-treated mice. Differences considered statistically significant when \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; and \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  as indicated by two-way ANOVA analysis.

**FIGURE 7. Enhanced resistance of CCR5 $^{-/-}$  mice to development of ECM.** (A) In vitro migration of enriched MO-DCs towards different concentrations of CCL2, CCL5 or the combination of CCL2 and CCL5. (B) Flow cytometric analysis of MO-DCs in the CNS of WT and CCR2 $^{-/-}$  mice infected with PbA. A lower, but not significant difference in the frequency of CD45 $^{high}$ CD11c $^{+}$ CD11b $^{+}$ DC-SIGN $^{high}$ MHCII $^{high}$ Ly6C $^{+}$  is observed in the brain of PbA-infected CCR2 $^{-/-}$  mice. (C) Flow cytometric analysis of MO-DCs in the CNS of WT and CCR5 $^{-/-}$  mice infected with PbA. The numbers of CD45 $^{high}$ CD8 $^{-}$ CD3 $^{-}$ CD11c $^{+}$ CD11b $^{+}$ DC-SIGN $^{high}$ Ly6C $^{+}$  are significantly decreased in the brain of PbA-infected CCR5 $^{-/-}$  mice. Representative primary flow cytometric dot plots are shown after CD45 $^{high}$  gating for leukocytes. (D) Survival curve of PbA infected C57BL/6, CCR2 $^{-/-}$  and CCR5 $^{-/-}$  mice. The results are representative of two independent experiments with three to five mice per group. Differences were considered statistically significant when \*  $p < 0.01$  as indicated by student t test. The survival curves were analyzed by log-rank test and CCR5 $^{-/-}$  mice were shown more resistant to PbA infection, when compared to CCR2 $^{-/-}$  or WT mice ( $p < 0.01$ ).

**FIGURE 8. CCR5-dependent migration of MO-DCs to the CNS of PbA-infected mice.** (A) Flow cytometric analysis of MO-DCs and T lymphocytes expressing CXCR3 as well as CCR5 in the CNS of PbA-infected mice. Brain mononuclear cells (BMNC) were recovered from PbA-infected mice gated on CD45<sup>high</sup>, then on CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and analyzed for CXCR3 and CCR5 expression. Alternatively, CD45<sup>high</sup> cells were gated on CD3<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly8c<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> and then analyzed for CCR5 expression. (B) Top graph shows the frequency of CD45<sup>high</sup> cells (*i.e.*, MO-DCs, CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells) in total BMNCs isolated from C57BL/6 mice at different time post-infection. Bottom panel shows the frequency of MO-DCs, CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells expressing CXCR3 and CCR5. (C) *In vivo* imaging of MO-DCs in the CNS of PbA-infected mice. MO-DC enriched populations were obtained from WT and CCR5<sup>-/-</sup> mice 5 days post-infection and labeled with CFSE transferred *i.v.* (one million cells/mouse) in the orbital vein into uninfected and PbA-infected WT mice. The presence of CFSE labeled cells were detected in the microvasculature and brain parenchyma by confocal microscopy 15-60 minutes after cell transfer in the orbital vein (Supplementary Videos 1 and 2). (D) Numbers of both CD45<sup>high</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>Ly8c<sup>+</sup> and CD45<sup>high</sup>CCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> are significantly decreased in the brain of PbA-infected CCR5<sup>-/-</sup> mice. These results are representative of four experiments. Differences were statistically significant (\* p<0.01) as indicated by student t test.

## REFERENCES

1. Geissmann, F., *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661 (2010).
2. Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E. & Taylor, P.R. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* 14, 986-995 (2013).
3. Gordon, S., Pluddemann, A. & Martinez Estrada, F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 262, 36-55 (2014).
4. Gazzinelli, R.T., Kalantari, P., Fitzgerald, K.A. & Golenbock, D.T. Innate sensing of malaria parasites. *Nature reviews. Immunology* 14, 744-757 (2014).
5. Wykes, M.N. & Good, M.F. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat Rev Microbiol* 6, 864-870 (2008).
6. Gowda, N.M., Wu, X. & Gowda, D.C. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *Journal of immunology* 188, 5073-5085 (2012).
7. Parroche, P., *et al.* Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1919-1924 (2007).
8. Pichyangkul, S., *et al.* Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *Journal of immunology* 172, 4926-4933 (2004).
9. Guermonprez, P., *et al.* Inflammatory Flt3l is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during Plasmodium infection. *Nature medicine* 19, 730-738 (2013).
10. Sedegah, M., Finkelman, F. & Hoffman, S.L. Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10700-10702 (1994).
11. Stevenson, M.M., Tam, M.F., Wolf, S.F. & Sher, A. IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *Journal of immunology* 155, 2545-2556 (1995).
12. Artavanis-Tsakonas, K. & Riley, E.M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Journal of immunology* 169, 2956-2963 (2002).
13. Jung, S., *et al.* In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220 (2002).
14. Ing, R., Segura, M., Thawani, N., Tam, M. & Stevenson, M.M. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *Journal of immunology* 176, 441-450 (2006).

15. Wykes, M.N., *et al.* Plasmodium strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. *PLoS pathogens* 3, e96 (2007).
16. Haque, A., *et al.* Type I IFN signaling in CD8- DCs impairs Th1-dependent malaria immunity. *The Journal of clinical investigation* 124, 2483-2496 (2014).
17. Urban, B.C., *et al.* Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 400, 73-77 (1999).
18. Pinzon-Charry, A., *et al.* Apoptosis and dysfunction of blood dendritic cells in patients with falciparum and vivax malaria. *The Journal of experimental medicine* 210, 1635-1646 (2013).
19. Sponaas, A.M., *et al.* Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood* 114, 5522-5531 (2009).
20. Antonelli, L.R., *et al.* The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute Plasmodium vivax malaria. *PLoS pathogens* 10, e1004393 (2014).
21. Borges da Silva, H., *et al.* In vivo approaches reveal a key role for DCs in CD4+ T cell activation and parasite clearance during the acute phase of experimental blood-stage malaria. *PLoS pathogens* 11, e1004598 (2015).
22. Franklin, B.S., *et al.* MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9, 881-890 (2007).
23. deWalick, S., *et al.* Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. *Journal of immunology* 178, 8033-8037 (2007).
24. Pai, S., *et al.* Real-time imaging reveals the dynamics of leukocyte behaviour during experimental cerebral malaria pathogenesis. *PLoS pathogens* 10, e1004236 (2014).
25. Ataide, M.A., *et al.* Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLoS pathogens* 10, e1003885 (2014).
26. Romani, N., *et al.* Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *The Journal of experimental medicine* 180, 83-93 (1994).
27. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 179, 1109-1118 (1994).
28. Jakubzick, C., *et al.* Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. *Journal of immunology* 180, 3019-3027 (2008).
29. Bogunovic, M., *et al.* Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525 (2009).
30. Cros, J., *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-386 (2010).

31. Leon, B., Lopez-Bravo, M. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519-531 (2007).
32. Nakano, H., *et al.* Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nature immunology* 10, 394-402 (2009).
33. Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A. & Pamer, E.G. TNF/*i*NOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59-70 (2003).
34. Siddiqui, K.R., Laffont, S. & Powrie, F. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity* 32, 557-567 (2010).
35. Cheong, C., *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143, 416-429 (2010).
36. Goldszmid, R.S., *et al.* NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 36, 1047-1059 (2012).
37. Hansen, D.S., Bernard, N.J., Nie, C.Q. & Schofield, L. NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during *Plasmodium berghei*-mediated cerebral malaria. *Journal of immunology* 178, 5779-5788 (2007).
38. Campanella, G.S., *et al.* Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4814-4819 (2008).
39. Nie, C.Q., *et al.* IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS pathogens* 5, e1000369 (2009).
40. Groom, J.R., *et al.* CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity* 37, 1091-1103 (2012).
41. Franklin, B.S., *et al.* Therapeutic targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 3689-3694 (2011).
42. Kalantari, P., *et al.* Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell reports* 6, 196-210 (2014).
43. Sharma, S., *et al.* Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity* 35, 194-207 (2011).
44. Lamphier, M., *et al.* Novel small molecule inhibitors of TLR7 and TLR9: mechanism of action and efficacy in vivo. *Molecular pharmacology* 85, 429-440 (2014).
45. Griffith, J.W., Sokol, C.L. & Luster, A.D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology* 32, 659-702 (2014).

46. Belnoue, E., *et al.* Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. *Parasite immunology* 30, 544-553 (2008).
47. Villegas-Mendez, A., *et al.* IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *Journal of immunology* 189, 968-979 (2012).
48. Franklin, B.S., *et al.* Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5789-5794 (2009).
49. Dunay, I.R., *et al.* Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306-317 (2008).
50. Su, Z. & Stevenson, M.M. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *Journal of immunology* 168, 1348-1355 (2002).
51. Perry, J.A., Olver, C.S., Burnett, R.C. & Avery, A.C. Cutting edge: the acquisition of TLR tolerance during malaria infection impacts T cell activation. *J Immunol* 174, 5921-5925 (2005).
52. Wilson, N.S., *et al.* Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nature immunology* 7, 165-172 (2006).
53. Belnoue, E., *et al.* CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood* 101, 4253-4259 (2003).
54. McCall, M.B., *et al.* *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *Journal of immunology* 179, 162-171 (2007).
55. da Silva, H.B., *et al.* IFN-gamma-induced priming maintains long-term strain-transcending immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *Journal of immunology* 191, 5160-5169 (2013).
56. Grau, G.E., *et al.* Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5572-5574 (1989).
57. Miu, J., Hunt, N.H. & Ball, H.J. Predominance of interferon-related responses in the brain during murine malaria, as identified by microarray analysis. *Infection and immunity* 76, 1812-1824 (2008).
58. Miu, J., *et al.* Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *Journal of immunology* 180, 1217-1230 (2008).
59. Coban, C., *et al.* Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of experimental medicine* 201, 19-25 (2005).
60. Baccarella, A., Fontana, M.F., Chen, E.C. & Kim, C.C. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infection and immunity* 81, 4431-4442 (2013).

61. Belnoue, E., *et al.* On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *Journal of immunology* 169, 8369-8375 (2002).
62. Poh, C.M., Howland, S.W., Grotenbreg, G.M. & Renia, L. Damage to the blood-brain barrier during experimental cerebral malaria results from synergistic effects of CD8+ T cells with different specificities. *Infection and immunity* 82, 4854-4864 (2014).
63. Wu, J., *et al.* Strain-specific innate immune signaling pathways determine malaria parasitemia dynamics and host mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E511-520 (2014).
64. Fischer, H.G. & Reichmann, G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *Journal of immunology* 166, 2717-2726 (2001).
65. John, B., *et al.* Analysis of behavior and trafficking of dendritic cells within the brain during toxoplasmic encephalitis. *PLoS pathogens* 7, e1002246 (2011).
66. Howland, S.W., *et al.* Brain microvessel cross-presentation is a hallmark of experimental cerebral malaria. *EMBO molecular medicine* 5, 916-931 (2013).
67. Howland, S.W., Poh, C.M. & Renia, L. Activated Brain Endothelial Cells Cross-Present Malaria Antigen. *PLoS pathogens* 11, e1004963 (2015).
68. Cocchi, F., *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, 1811-1815 (1995).



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Mice.** All animals used in this work were 8- to 12-week-old mice. C57BL/6 mice were obtained from either Animal Facility of the UFMG or Jackson Laboratories. The REX3, REX3/*IFN $\alpha$ / $\beta$ R*<sup>-/-</sup> and REX3/*IFN $\gamma$ R*<sup>-/-</sup> were generated by A.D.L. at Massachusetts General Hospital (MGH). The GREAT mice (*IFN $\gamma$  GFP-reporter*), the *CCR2*<sup>-/-</sup>, *CCR5*<sup>-/-</sup>, *RAG*<sup>-/-</sup> and *IFN $\gamma$* <sup>-/-</sup> mice were originally purchased from Jackson Laboratories and housed under specific-pathogen-free conditions at MGH or at Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz). All procedures were approved by the MGH Subcommittee on Research and Animal Care and Harvard Committee on Microbiological Safety (IACUC# 2005N000176); as well as the Institutional Ethical Committee for Animal Experimentation at Fiocruz (CEUA# LW 15-14).

**Infection.** The PbA or GFP transgenic PbA (GFP-PbA) kept in liquid nitrogen were thawed and maintained into C57BL/6 mice for up to 12 passages. For experimental infection, PbA-infected red blood cells (iRBCs) were collected from donors in heparinized tubes and  $1 \times 10^5$  iRBCs injected i.p. into naive mice. These mice were observed daily, and parasitemia was estimated by counting Giemsa-stained thin blood smears. ECM signs were evaluated by two independent observers using different parameters that included ruffled fur, abnormal postural responses, reduced reflexes, reduced grip strength, coma, and convulsions. Mice that demonstrated complete disability in all parameters or died between days 7 and 9 post-infection were considered as having ECM<sup>2</sup>.

**Flow Cytometry.** Brains were removed after intracardial perfusion with 30 ml of PBS; they were minced and the cells were passed through a 70  $\mu$ m cell strainer and centrifuged on a 45% Percoll for 30 min at 800 x g. The cells were washed, diluted 1:1 PBS, counted and stained for flow cytometry<sup>3</sup>. Spleens were removed, passed through a 70  $\mu$ m strainer, RBCs lysed, splenocytes counted by using a hemocytometer. For flow cytometry analysis, cells were stained with antibodies specific for mouse CD11b (PE-Cy7, clone: M1/70, e-Bioscience), F4/80 (PE-Cy5, clone: BM8, e-Bioscience), CD11c (Alexa 700, clone: N418, e-Bioscience), MHC II (PE, clone: AF6-120.1, BD), DC-SIGN (APC e-fluor 660, clone: MMD3, e-Bioscience), Ly6C (e-fluor 450, clone: HK1.4, e-Biosciences), CD80 (FITC, clone: 16-10A1, BD), CD86 (FITC, clone: GL1, BD), CD8 (APC Cy7, clone: 53-6.7, Biolegend) or (PerCP-Cy 5.5, clone: 53-6.7, e-Bioscience), CD3 (Percep Cy5.5, clone: 145-2C11, e-Bioscience), CD31 (PE, clone: 390, eBioscience), CD45 (V500, clone: 30-F11, BD), CD62L (PE-Cy7, clone: MEL-14, BD), CD44 (Pacific Blue, clone: IM7, Biolegend) CD4 (APC, clone: RM4-5, Biolegend) at RT for 20 min. In REX3 mice, endogenous RFP (CXCL9) and BFP (CXCL10) were read in PE and Pacific Blue channels, respectively. Cytofluorometry was performed by using a Fortessa Cytometer (Becton–Dickinson) and analyzed with Flowjo software.

**Phagocytosis assay by flow cytometry.** Blood (2 mL) from GFP-PbA-infected and non-infected mice were collected in heparinized tubes. The enrichment of iRBCs was performed using a positive selection kit according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE). Uninfected RBCs were used as a negative control. The purity was determined by Giemsa-stained thin blood smears. Total splenocytes ( $5 \times 10^5$ ) from infected (8 days) and non-infected mice were incubated with iRBCs ( $5 \times 10^5$ ) or RBCs ( $5 \times 10^5$ ) for 1 hour at 37°C (1:1). Cells were washed and stained with the antibodies specific for mouse CD11b (PE-Cy7), F4/80 (PE-Cy5), CD11c (Alexa 700), MHC II (PE), DC-SIGN (APC e-fluor 660), Ly6C (e-fluor 450) at RT for 20 min. Flow Cytometry was performed by using a Fortessa Cytometer (Becton–Dickinson) and analyzed with Flowjo software.

**Cell sorting.** Spleens from the C57BL/6 and *IFN $\gamma$* <sup>-/-</sup> control uninfected and infected mice, at 7 day post-infection, were harvested and splenocytes stained with CD11b (PE-Cy7), F4/80 (PE-Cy5), CD11c (Alexa 700), MHC II (PE), DC-SIGN (APC e-fluor 660) and then submitted to purification by using a cell sorting ARIA (BD). These cells were first gated on FSC-H/FSC-A in order to avoid doublets. Next we first gated on CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> and then on MHC-II<sup>high</sup>DC-

SIGN<sup>high</sup>. The gated cells were sorted, collected into fresh new tubes, confirmed to be CD11c<sup>+</sup> and then frozen in small aliquots of 10,000 cells for used for gene expression analysis using the nanostring technology. Alternatively, cells were submitted to cytopsin, stained with Giemsa for morphological analysis using corrected optics 40x and 100x (oil) in an optical microscope (Olympus, GXML3200B).

**Scanning Electronic Microscopy (SEM).** After cell sorting aliquots of MO-DCs were fixed in 2.5% buffered glutaraldehyde solution, 0.1 M, Ph 7.2, 6 h, 8°C. Cells were then washed with the same buffer and fixed in a mixture of 1% osmium tetroxide and 1.5% (w/v) potassium ferrocyanide, dehydrated in a graded series of ethanol, infiltrated, and embedded in Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Sections were stained with 2% uranyl acetate and Reynolds lead citrate and then analyzed using SEM (DSM 960 A).

**Confocal.** Spleens were harvested into PLP buffer [0.05 M phosphate buffer containing 0.2M L-lysine (pH 7.4), 2 mg/ml NaIO<sub>4</sub>, 10 mg/ml paraformaldehyde], fixed for 5–12 hr, and dehydrated in 30% sucrose prior to embedding in OCT freezing media (Sakura Finetek). Ten mm frozen sections were cut on a CM3050S cryostat (Leica). Sections were dried for 2h, acetone fixed for 10 min, rehydrated, fixed with formaldehyde-calcium solution and washed with PBS. Sections were blocked in PBS containing American Hamster or Rat gamma globulin (100µg/mL), stained in PBS, F4/80 (APC) or CD11c (APC) and embedded in prolong gold. Images were acquired on a LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss Microimaging).

**Intravital confocal microscopy.** MO-DCs were purified from spleens of PbA-infected from four mice by consecutive positive selection of CD11b<sup>+</sup> (cat: 130-097-142) and then CD11c<sup>+</sup> (cat: 130-052-001) cells using the MicroBeads kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE, CD11b). The cells were then incubated with CFSE (2 µM / 1x10<sup>6</sup> cells in 100 µl) for 8 min and washed. The vasculature was stained using 10 µL of a PE-coupled anti-CD31 antibody stock solution (0.2 mg/ml). Infected mice (5 days post-infection) were anesthetized intraperitoneally (100 µl for each animal) with a mixture of ketamine (37.5 mg/ml, final concentration) and xylazine (2.5 mg/ml, final concentration). After anesthetized, one million of CFSE-stained CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells and anti-CD31 were injected intravenously and a cranial window (2 × 2 mm) was drilled above the parietal cortex leaving the dura mater intact to exposed and visualize the brain vasculature. Mouse was immobilized using the stereotaxis apparatus and CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells and endothelium were observed using a confocal microscope (Nikon, ECLIPSE 50i, 20x objective lens) outfitted with a fluorescent light source (epi-illumination at 510–560 nm, using a 590 nm emission filter). The number of migrating cells was determined offline during the video playback analyses. In each animal, a field was recorded and analyzed to determine the total number of cells. Quantitative image analysis was performed by using the software Volocity (Version 6.3).

**Dendritic cell migration assay.** Splenic CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells from uninfected and 6 days post-infection mice were purified using a positive selection kit, as described in the intravital confocal microscopy section (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE). Cells were stained with anti-CD11b (PE-Cy7, clone: M1/70, e-Bioscience) and anti-CD11c (Alexa 700, clone: N418, e-Bioscience), and purity checked by FACS. CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells were suspended in RPMI medium plus 10% FBS at 1x10<sup>5</sup> cells/ml. To assess the migratory capacities of MO-DCs cells, we used a 12 well-Transwell microplate (Corning, Amboise, FR) with 5-µm membrane pore size that forbade the passive diffusion, but allowed the active migration of MO-DCs. For each condition tested, lower chambers of the transwell were filled with 800 µL in the absence or presence of 0.1, 1 or 10 ng/mL CCL2 (Biolegend) and/or CCL5 (e-bioscience). MO-DCs (1x10<sup>5</sup> in 100 µL) were deposited in the upper chamber of the transwell and were allowed to migrate for 3 hours at 37°C. Migrating DCs were harvested from the lower chamber and were counted using Neubauer camera. Enumerations were performed twice to assess the reliability of the method.

**Cytokine assays.** The levels of IFN $\gamma$  were measured in sera of control and infected mice by using the Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokines Kit (BD Becton-Dickinson, cat: 560485) <sup>4</sup>.

**Quantitative PCR.** Total RNA from spleens and brains from uninfected or PbA infected mice was extracted by using TRIzol and cDNA prepared using Multiscribe RT (Applied Biosystems). qPCR was performed with SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) using a Realplex2 mastercycler (Eppendorf) <sup>1</sup>. Primer sequences for measuring IFN $\gamma$  and chemokine gene expression were: CXCL9, 5'-AATGCACGATGCTCCTGCA-3' and 5'-AGGTCTTTGAGGGATTTGTAGTGG-3'; CXCL10, 5'-GCCGTCATTTTCTGCCTCA-3' and 5'-CGTCCTTGCGAGAGGGATC-3'; IFN $\gamma$ , 5'-AACGCTACACACTGCATCTTGG-3' and 5'-GCCGTGGCAGTAACAGCC -3'; CD8, 5'-GACGAAGCTGACTGTGGTTGA-3' and 5'-GCAGGCTGAGGGTGGTAAG-3'; CCL2, 5'-TGGCTCAGCCAGATGCAGT -3' and 5'-TTGGATCATCTTGTCTGGTG -3'; CCL3, 5'-CCAAGTCTTCTCAGCGCCAT-3' and 5'-TCCGGCTGTAGGAGAAGCAG -3'; CCL4, 5'-TCTTGCTCGTGGCTGCCT-3' and 5'-GGGAGGGTCAGAGCCCA-3'; and CCL5, 5'-CAAGTGCTCCAATCTTGCAGTC-3' and 5'-TTCTCTGGGTTGGCACACAC-3'. All samples were normalized using  $\beta$ 2-MICROGLOBULIN or GAPDH expression employing either 5'-CCGAACATACTGAACTGCTACGTAA-3' and 5'-CCCGTTCTTCAGCATTGGA-3' or 5'-GTGGTGAAGCAGGCATCTGA-3' and 5'-GGGAGTCACTGTTGAAGTCGC-3' primers, respectively.

**Quantification of RNA Expression by Nanostring.** Purified MO-DCs from C57BL/6 and IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> infected with PbA were analyzed by NanoString methodology. Briefly, 10,000 cells were resuspended in 1 ml of Qiagen RLT lysis buffer and hybridized to the target specific code set on 65 °C. The code set contained probes against a panel of 561 genes encoding relevant innate immunity proteins (nCounter® Mouse Immunology). After incubation, samples (three animals per group) were loaded onto the NanoString Prep station for excess reporter removal, binding to cartridge surface, and probe scanning. After scanning and data collection onto a digital analyzer, data normalization was performed against positive and negative control oligonucleotides and fourteen housekeeping genes. Normalized results are represented as the relative mRNA level. The fold change was defined by rate of mRNA's numbers of copies of the infected by non-infected mice. The software Multiple Experiment Viewer (MeV) was used to generate the heat maps. Differences in gene expression were considered significant if  $p < 0.05$  as defined by unpaired t test.

**Drug and Treatment.** TLR7/9 antagonist (E6446, Eisai Pharmaceuticals) was dissolved in water and mice were treated 120 mg/Kg/day from a day before infection to the indicated day post-infection, given in 100  $\mu$ l through oral gavage once daily <sup>2</sup>. Mice treated with vehicle (water) were used as a control.

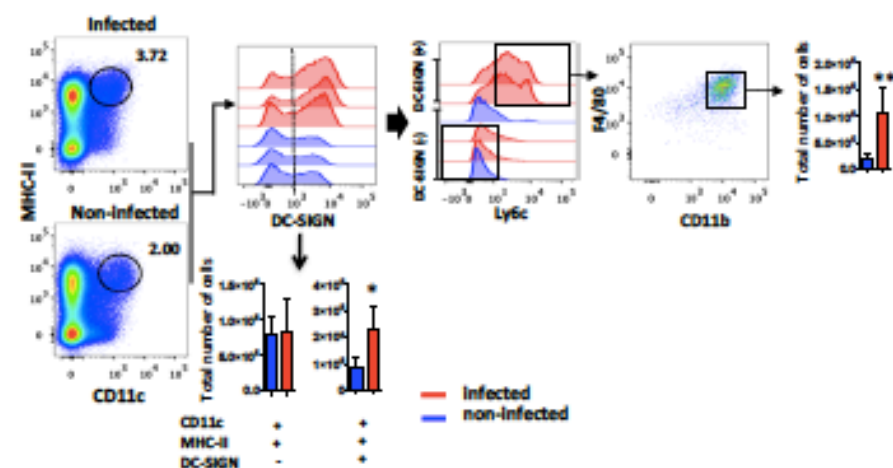
**Statistical Analysis.** All data were analyzed using Graphpad Prism 6.0 Software. Two-tailed Student's *t* tests were used for data analysis and generation of *p* values. Mann-Whitney testing was used for nonparametric analysis when data did not fit a Gaussian distribution. ANOVA via post-tukey test for multiple comparisons was used for comparing more than two samples. A  $p < 0.05$  value was considered statistically significant. All data are represented as mean with individual data points representing individual samples. Bar graph data show standard deviation error (SD) bars.

**REFERENCES**

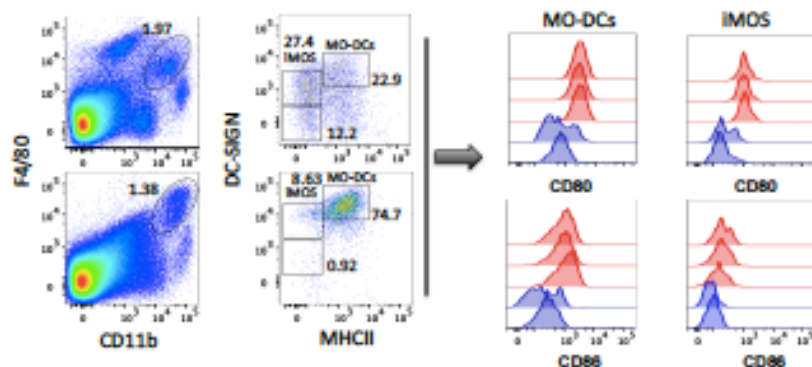
1. Groom, J.R., *et al.* CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity* **37**, 1091-1103 (2012).
2. Franklin, B.S., *et al.* Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3689-3694 (2011).
3. LaFrance-Corey, R.G. & Howe, C.L. Isolation of brain-infiltrating leukocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2011).
4. Franklin, B.S., *et al.* MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **9**, 881-890 (2007).

## SUPPLEMENTARY FIGURES

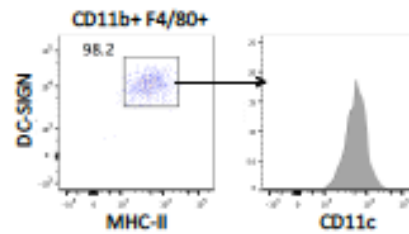
A



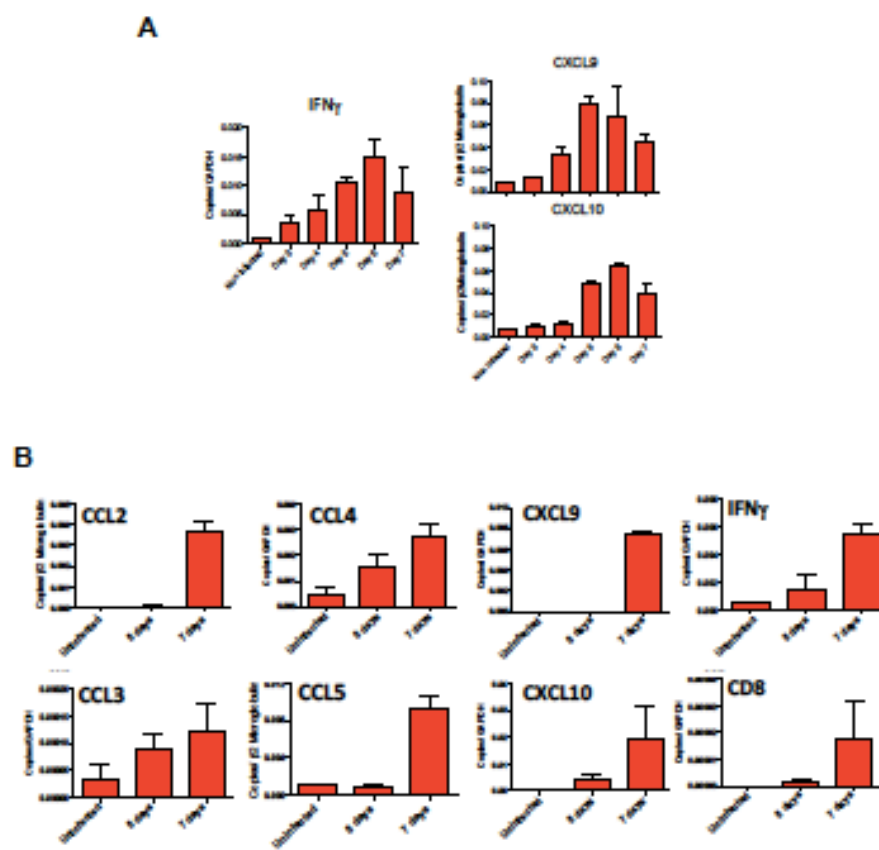
B



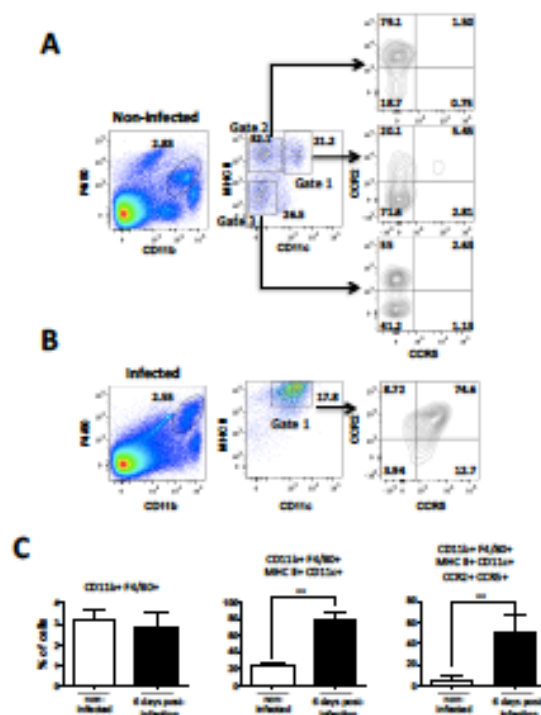
**Supplementary Figure 1. Immunophenotyping of MO-DCs.** Splenocytes were harvested from control and infected mice at five days post-infection. **(A)** Splenocytes were first gated for CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup> cells and then for DC-SIGN<sup>high</sup> and Ly6c<sup>+</sup> cells. Over 90% of CD11c<sup>+</sup>MHC II<sup>high</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>Ly6c<sup>+</sup> cells were CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>. Bar graphs correspond to total number of cells (four mice per group). Results are expressed as mean. Differences considered statistically significant between infected and non-infected, when \*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  after two-way ANOVA. The data shown are representative of five independent experiments. **(B)** Levels of CD80 and CD86 expression in iMOs (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>low</sup>MHCII<sup>-</sup>) and MO-DCs (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>MHCII<sup>high</sup>) from control and infected mice. Representative results of four mice per group of control versus infected mice.



**Supplementary Figure 2. Purity of MO-DCs isolated by cell sorting.** Spleens were harvested at six days after infection with PbA. Mo-DCs were labeled with F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>high</sup>MHC II<sup>high</sup> cells and submitted to sorting by flow cytometry. We obtained over 98.2% purity of cells that were also CD11c<sup>+</sup>. The data shown are representative of MO-DCs purified from at least ten mice and used for analysis by optical and scanning electronic microscopy (Figure 1) as well as gene expression by nanostring (Figures 2 and 4).

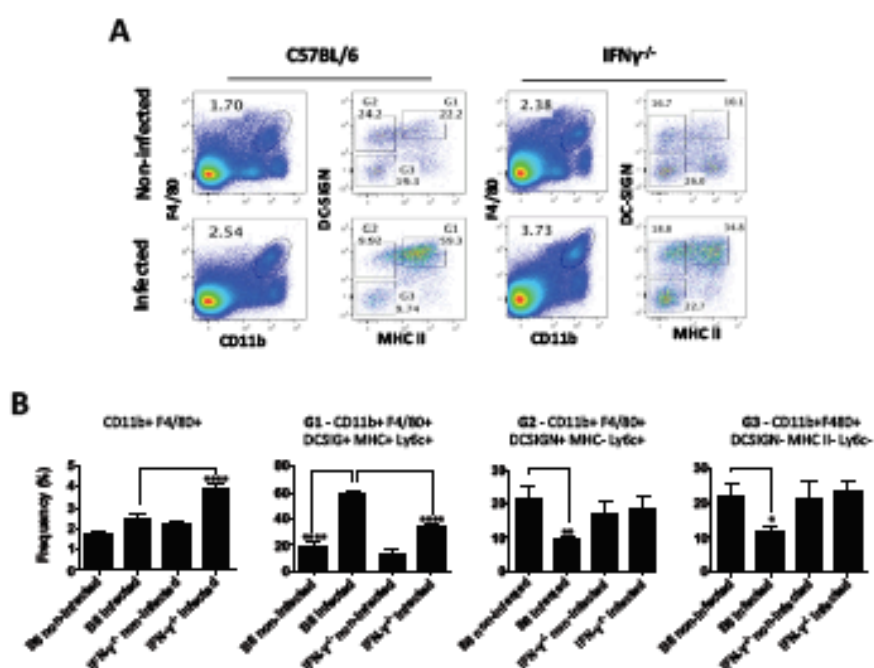


**Supplementary Figure 3. Kinetics of  $IFN\gamma$ ,  $CD8$ , and chemokine mRNA expression in spleens and brains from PbA infected mice. (A)** Spleens were harvested at 0 and 3 to 7 days post-infection. **(B)** Brains were harvested at days 0, 5 and 7 post-infection with PbA. Total RNA was extracted from individual spleens and brains and levels of cytokine/chemokine mRNA analyzed by qPCR and normalized by *GAPDH* or  $\beta$ -*MICROGLOBULIN* expression. The data are representative of two independent experiments with four mice per group.

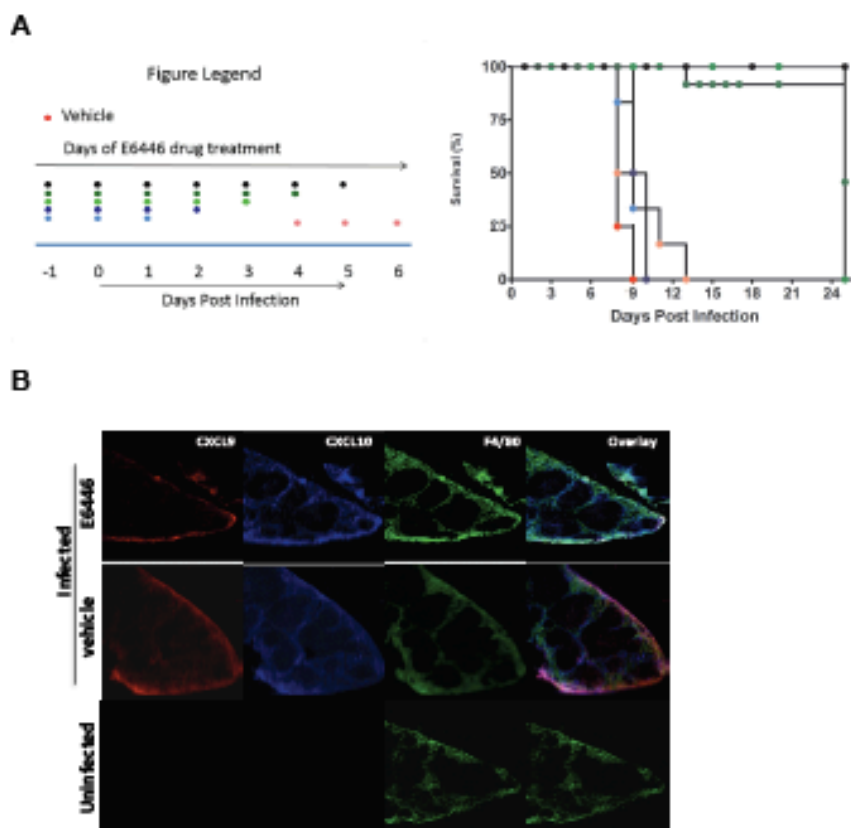


**Supplementary Figure 4. CCR5 expression by splenic MO-DCs from C57BL/6 mice infected with PbA.** (A) Representative primary flow cytometric dot plots of spleens from uninfected control mice are shown. The percentage of MO-DCs (Gate 1, F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>), Gate 2 (F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>), and Gate 3 (F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>) expressing CXCR2 and CXCR5 are indicated. (B) C57BL/6 mice were inoculated with PbA, and spleens harvested 6 days later. Representative primary flow cytometric dot plots of spleens from infected mice are shown. The percentage of MO-DCs (Gate 1, F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>) expressing CXCR2 and CXCR5 are indicated. C. Frequency of splenic MO-DCs and other cell populations in controls and infected C57BL/6 are shown in bar graphs. The average and SD are one representative of three independent experiments with three or four mice per group. \*\* indicates that  $p < 0.01$  as determined by two-way ANOVA analysis.

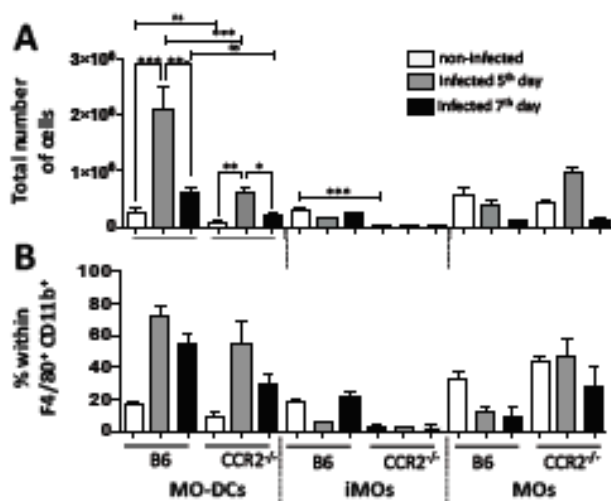




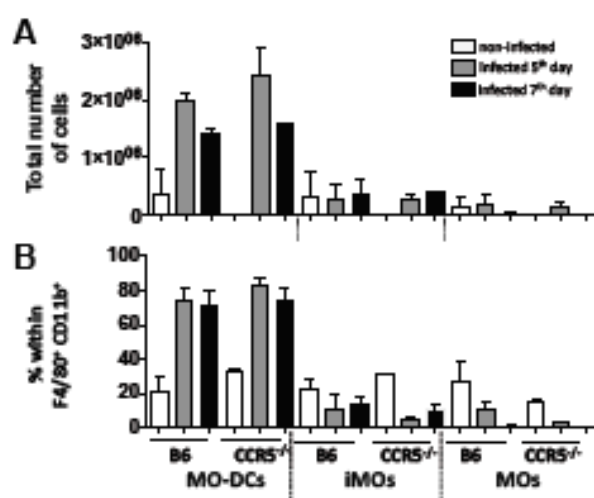
**Supplementary Figure 5. Frequency of splenic MO-DCs is reduced in  $IFN\gamma^{-/-}$  mice infected with PbA.** C57BL/6 and  $IFN\gamma^{-/-}$  mice were inoculated with PbA, and spleens harvested 6 days later. (A) Representative primary flow cytometric dot plots of spleens from infected mice are shown. The percentage of MO-DCs (Gate 1, F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>), Gate 2 (F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>), and Gate 3 (F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>) are indicated. (B) Frequency of splenic MO-DCs and other cell populations in controls and infected C57BL/6 and  $IFN\gamma^{-/-}$  mice are shown in bar graphs. The average and SD are one representative of two independent experiments with three or four mice per group. Differences were considered statistically significant when \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  as indicated by two-way ANOVA analysis.



**Supplementary Figure 6. Treatment with E6446 prevents lethality expression of CXCL9 and CXCL10 by splenocytes in PbA infected mice. (A)** Mice were treated using different schedules (left panel) and followed for survival (right panel). The selected regimen (day -1 to day 3 post-infection) was used in all experiments presented in this study. **(C)** Illustrative confocal analysis of spleens from uninfected and infected REX3 mice treated with E6446. Treatment with E6446 inhibits expression of RFP (CXCL9) and BFP (CXCL10) by spleen cells from PbA-infected REX3 mice.



**Supplementary Figure 7. Frequency and total numbers of MO-DCs in spleens from  $CCR2^{-/-}$  mice infected with PbA.** C57BL/6 and  $CCR2^{-/-}$  mice were infected with PbA and spleens harvested at 0, 5 and 7 days later. Splenocytes were gated on CD11b and F4/80 and then analyzed for DC-SIGN and MHC II expression. Average and standard deviation of (A) total number and (B) frequency of MO-DCs (Gate 1, F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>), Gate 2 (F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>), and Gate 3 (F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>-</sup>MHC II<sup>+</sup>) within CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells are shown. The presented data are representative of one out of two experiments. Differences were considered statistically significant when \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  as indicated by two-way ANOVA analysis.



**Supplementary Figure 8.** Frequency and total number of splenic MO-DCs is not affected in CCR5<sup>-/-</sup> mice infected with PbA. C57BL/8 and CCR5<sup>-/-</sup> mice were inoculated with PbA, and spleens harvested 0, 5 and 7 days later. Splenocytes were gated on CD11b and F4/80 and then analyzed for DC-SIGN and MHC II expression. Average and standard deviation of (A) total number and (B) frequency of MO-DCs (Gate 1, F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>), Gate 2 (F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>+</sup>MHC II<sup>-</sup>), and Gate 3 (F4/80<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>DC-SIGN<sup>-</sup>MHC II<sup>+</sup>) within CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells are shown. The presented data are representative of one out of two experiments. Differences were considered statistically significant when \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  as indicated by two-way ANOVA analysis.

**Supplementary Videos 1A and 1B.** *In vivo* imaging of CCR5<sup>-/-</sup> MO-DCs in the brain of C57BL/6 mice infected with PbA. MO-DC enriched populations were obtained from CCR5<sup>-/-</sup> mice at 5 days post-infection labeled with CFSE and transferred i.v. (one million cells/mouse) to PbA-infected WT mice. The presence of CFSE labeled cells were detected in the microvasculature and brain parenchyma by confocal microscopy 15-30 minutes after cell transfer in the orbital vein.

**Supplementary Videos 2A and 2B.** *In vivo* imaging of WT MO-DCs in the brain of C57BL/6 mice infected with PbA. MO-DC enriched populations were obtained from C57BL/6 mice 5 days post-infection labeled with CFSE and transferred i.v. (one million cells/mouse) to PbA-infected WT mice. The presence of CFSE labeled cells were detected in the microvasculature and brain parenchyma by confocal microscopy 15-30 minutes after cell transfer in the orbital vein.



MASSACHUSETTS  
GENERAL HOSPITAL



HARVARD  
MEDICAL SCHOOL

**Division of Rheumatology, Allergy and Immunology**  
**Center for Immunology and Inflammatory Diseases**  
149 Thirteenth Street, Room 8301  
Charlestown, MA 02129  
Tel: 617.726.5710, Fax: 617.726.5651  
E-mail: [aluster@mg.harvard.edu](mailto:aluster@mg.harvard.edu)

**Andrew D. Luster, MD, PhD**  
*Chief, Division of Rheumatology,  
Allergy and Immunology*  
*Director, Center for Immunology  
and Inflammatory Diseases*  
*Persis, Cyrus and Marlow B.*  
*Harrison Professor of Medicine*  
*Harvard Medical School*

October 29, 2013

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Ministry for Science and Technology of Brazil

To whom it may concern:

This letter is to confirm that Isabella Hirako joined my laboratory on October 21, 2013 with an award from CNPq to evaluate the role of TLR9 in mediating inflammation and development of cerebral malaria in mice

Sincerely,

Andrew D. Luster, M.D., Ph.D.