

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Papel da heme oxigenase 1 na malária gestacional: estudo em três tempos gestacionais usando um modelo murino

Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes

Uberlândia
Agosto de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Papel da heme oxigenase 1 na malária gestacional: estudo em três tempos
gestacionais usando um modelo murino

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial a obtenção do
título de Doutor

Discente: Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes
Orientadora: Profa. Neide Maria da Silva

Uberlândia
Agosto de 2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S573
2021

Sifontes, Yusmaris Josefina Cariaco, 1989-
Papel da heme oxigenase 1 na malária gestacional:
estudo em três tempos gestacionais usando um modelo
murino [recurso eletrônico] / Yusmaris Josefina Cariaco
Sifontes. - 2021.

Orientadora: Neide Maria da Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.374>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Silva, Neide Maria da, 1961-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III.
Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico nº 141 do PPIPA				
Data:	Vinte e sete de agosto de dois mil e vinte e um	Hora de início:	14 h	Hora de encerramento:	18 h e 20 min
Matrícula do Discente:	11713IPA004				
Nome do Discente:	Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes				
Título do Trabalho:	Papel da heme oxigenase 1 na malária gestacional: estudo em três tempos gestacionais usando um modelo murino				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunopatologia e Alergia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Alterações imunopatológicas em infecções por protozoários, com ênfase em toxoplasma <i>gondii</i> , bactérias e <i>helminths</i>				

Reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em 27/08/2021, assim composta pelos titulares: Claudio Romero Farias Marinho - USP/SP; Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua - USP/SP; Diego Luís Costa - USP/FMRP; Marcelo José Barbosa Silva, ICBIM/UFU e Neide Maria da Silva, ICBIM/UFU (Presidente) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Profa. Neide Maria da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a).

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Neide Maria da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/08/2021, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Luís Costa, Usuário Externo**, em 01/09/2021, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua, Usuário Externo**, em 02/09/2021, às 08:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CLAUDIO ROMERO FARIAS MARINHO, Usuário Externo**, em 02/09/2021, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo José Barbosa Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/09/2021, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3011234** e o código CRC **006C56F8**.

AGRADECIMENTOS

À professora Neide por me aceitar no seu laboratório e por confiar em mim para a realização deste trabalho que realizei com o maior empenho e dedicação, por estar sempre disponível para trocar ideias e solucionar problemas, por ser exemplo de competência, dedicação, ética em tudo o que faz.

Aos meus colegas de laboratório Ester, Marcos Paulo, Marisol e Tatiana pelo auxílio técnico e suporte emocional requerido para a finalização deste trabalho. Da mesma maneira, gostaria de agradecer ao Romulo e Loyane por me deixar acompanhá-los em experimentos de gestação durante meu treinamento inicial, bem como a todos os estudantes que tem passado pelo laboratório da professora Neide e que com certeza contribuíram com meu crescimento pessoal e profissional.

À REBIR pela manutenção e cuidados dos camundongos utilizados na presente investigação.

Ao departamento de Biologia Celular, Histologia e Embriologia por fornecer ferramentas indispensáveis para o processamento das amostras histológicas.

À Camila Linhares por me apresentar o escâner de lâminas que seria meu grande aliado para realizar análises de imagens histológicas.

Às técnicas do RELAM Mariani, Ana Cláudia e Juliana pelo auxílio para a digitalização de lâminas histológicas e processamento de amostras no citômetro. Da mesma maneira, gostaria de agradecer à Profa. Bellisa Freitas Barbosa e à Esther Campos Fernández pelo auxílio técnico ao usar equipamentos do Laboratório de Imunoparasitologia e Laboratório de Nanobiotecnologia, respectivamente.

Aos professores do PPIPA pela disposição, ensinamentos e trocas de ideias ao longo do meu tempo na universidade. Também agradeço às secretárias do programa Lucélia, Lucileide e Cláudia pelo atendimento sempre que necessário.

Ao professor Jair Pereira da Cunha Junior pela disponibilidade e valiosos conselhos que me ajudaram na solução de problemas durante meus experimentos.

Ao pessoal Laboratório de Neurociências pelo auxílio no uso do microscópio de luz polarizada.

Ao professor Foued Salmen Espindola e seu aluno Rodrigo Rodrigues Franco pelo auxílio no teste de peroxidação lipídica.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, sem cujo apoio financeiro este trabalho não teria sido possível.

A todos os amigos que Uberlândia me deu e que chegaram a me conhecer e querer.

Ao meu namorado Jesus por seu amor, compreensão e companhia ao longo desta aventura longe de casa.

LISTA DE ABREVIÇÕES

PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
HO	Heme oxigenase
CoPPIX	Cobalto protoporfirina IX
ZnPPIX	Zinco protoporfirina IX
uNK	Células <i>natural killer</i> uterinas
uMCs	Mastócitos uterinos
CD	Grupamento de diferenciação ou cluster de diferenciação
PBS	Tampão fosfato-salino
Mcpt5	α -quimase protease de mastócitos 5
CMA1	α -quimase de mastócitos 1
VAR2CSA	Antígeno de superfície variante 2 - condroitina sulfato A
AIM2	Ausente no melanoma 2
NLRP3	Proteína 3 do receptor semelhante a NOD
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ECM	Malária cerebral experimental
Bcl-XL	Linfoma de células B extragrandes
Bcl-2	Proteína de linfoma de células B 2
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
BCA	Ácido Bicinconínico
DNase	Desoxirribonuclease
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
TMB	Tetrametilbencidina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fw	<i>Forward</i>
Rv	<i>Reverse</i>

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Comparação temporal dos principais eventos que ocorrem na gestação em humanos e camundongos	18
Figura 2. Estrutura da placenta e esquema da rede vascular na placenta murina definitiva	20
Figura 3. Imagens representativas de sítios de implantação anormais no início, metade e final da gestação	38
Figura 4. Esquema para delimitação de camadas uteroplacentárias	41
Figura 5. Alterações induzidas pela malária no início da gestação	49
Figura 6. Alterações induzidas pela malária na metade da gestação	52
Figura 7. Alterações induzidas pela malária no período final gestacional	55
Figura 8. Expressão de mRNA de HO-1 e deposição de ferro em tecidos da interface materno-fetal	57
Figura 9. Avaliação do efeito dos tratamentos com inibidor e indutor da HO-1 em animais gestantes não infectados	60
Figura 10. Avaliação da indução e inibição de HO-1 na malária durante o início da gestação.....	63
Figura 11. Avaliação da indução e inibição de HO-1 na malária durante a metade da gestação.....	66
Figura 12. Avaliação da indução e inibição de HO-1 na malária no final da gestação	69
Figura 13. Impacto da modulação de HO-1 durante a malária gestacional no perfil de citocinas em amostras de homogenatos de útero/placenta	73
Figura 14. Perfil de citocinas durante a malária em três períodos da gestação	74
Figura 15. Níveis de heme, ferro e peroxidação lipídica na modulação de HO-1 durante a malária gestacional experimental	77
Figura 16. Coeficientes de correlação entre as concentrações de ferro e citocinas em sítios de implantação de 8 dias de gestação.....	79
Figura 17. Esquema representativo do papel da HO-1 na malária gestacional experimental.....	80

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Desenvolvimento embrionário e fetal	16
1.2. Estrutura da placenta murina definitiva: tipos de trofoblasto que a compõem 19	19
1.3. Imunidade e tolerância durante a gestação	21
1.4. Células NK uterinas (uNK): generalidades e funções	23
1.5. Malária na gestação: aspectos epidemiológicos	25
1.6. Mecanismos de patogênese durante a malária na gestação	28
1.7. Heme oxigenase 1	31
1.8. Papel da HO-1 em doenças infecciosas e durante a gestação	32
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Animais experimentais	36
4.2. Cepa do parasito	36
4.3. Acasalamento e infecção	36
4.4. Tratamentos e avaliação da parasitemia.....	37
4.5. Eutanásia e coleta de órgãos.....	37
4.6. Colorações histológicas	38
4.7. Avaliação das artérias espiraladas.....	39
4.8. Mensuração de camadas uteroplacentárias.....	40
4.9. Avaliação dos espaços vasculares na camada de labirinto	41
4.10. Histoquímica para marcação de células NK uterinas.....	41
4.11. Imunohistoquímica para detecção de alfa actina de musculo liso (α - SMA) 42	42
4.12. Mensuração da área de hemozoína em tecidos uteroplacentários	42
4.13. Análise dos níveis de citocinas por <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	43
4.14. Avaliação dos níveis de TGF- β por ELISA.....	44
4.15. Quantificação de ferro em tecidos uteroplacentários	44
4.16. Mensuração dos níveis de heme	44
4.17. Teste de peroxidação lipídica	45

4.18.	Dosagem de hemoglobina e glicose	45
4.19.	Análise da expressão de mRNA	45
4.20.	Análise estatística	46
5.	RESULTADOS	47
5.1.	Efeitos da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA no início da gestação	47
5.2.	Efeitos da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA na metade da gestação	50
5.3.	Efeitos da infecção por <i>P. berghei</i> ANKA no período final da gestação.....	53
5.4.	Análise de expressão de mRNA da HO-1 e deposição de ferro na interface materno-fetal em resposta à infecção	56
5.5.	Efeitos dos tratamentos com o inibidor ou indutor da HO-1 em camundongos gestantes e não infectados	58
5.6.	Avaliação do efeito da indução e inibição de HO-1 no início da gestação ...	61
5.7.	Avaliação do efeito da indução e inibição de HO-1 na metade da gestação	64
5.8.	Avaliação da indução e inibição de HO-1 na malária durante o final da gestação	67
5.9.	Níveis de citocinas em útero/placenta.....	70
5.10.	Avaliação dos níveis de heme, ferro e peroxidação lipídica.....	75
5.11.	Análise de correlação entre as concentrações teciduais de ferro e os níveis de citocinas.....	78
6.	DISCUSSÃO.....	81
7.	CONCLUSÕES.....	94
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
9.	ANEXOS.....	109
9.1.	Anexo 1. Certificado de aprovação do projeto pelo comitê de ética.....	109

RESUMO

A malária na gestação é um grave problema de saúde pública. Cada ano se registram milhares de casos de neonatos com baixo peso ao nascer devido à infecção materna por espécies de *Plasmodium*. Além disso, a infecção é capaz de induzir outras complicações como anemia, morte materna, aborto e parto prematuro. A heme oxigenase 1 (HO-1) é uma enzima que catalisa a degradação do heme em biliverdina, ferro e monóxido de carbono e cuja atividade tem mostrado ser protetora em diversos contextos, incluindo a gestação, embora sua indução também tem sido relacionada com efeitos prejudiciais. Porém, o efeito da modulação da HO-1 na malária gestacional não tinha sido descrito previamente. Por este motivo, na presente pesquisa foi avaliado o papel da HO-1 na infecção por *Plasmodium berghei* ANKA no início, metade e final da gestação em camundongos BALB/c. Para tal fim, foram avaliados os níveis de expressão de mRNA da enzima na interface materno-fetal após a infecção e o efeito do tratamento com um indutor (CoPPiX) ou um inibidor (ZnPPiX) da atividade da enzima em camundongos gestantes infectados. Os resultados mostraram que a infecção induz anemia, hipoglicemia, elevação nos níveis de heme, perda embrionária e diminuição do peso fetal. A expressão de mRNA de HO-1 em útero/placenta se elevou no início e no final da gestação, em relação aos controles não infectados desses períodos gestacionais. Também foi observado um aumento na deposição de ferro em sítios de implantação de 8 dias de gestação após a infecção. A inibição da HO-1 levou a uma melhora nos resultados adversos provocados pela infecção durante a gestação, principalmente no início da gestação, no qual houve uma redução no parasitismo, deposição de ferro, estresse oxidativo e níveis locais de TNF, assim como um aumento no número de células NK uterinas e nos níveis de hemoglobina e glicose no sangue materno. Apesar de não haver indução de HO-1 na metade da gestação em resposta à infecção, o tratamento com ZnPPiX diminuiu a taxa de sítios de implantação anormais e os níveis de parasitemia, assim como também aumentou os níveis de hemoglobina em relação a fêmeas infectadas tratadas com veículo. No final da gestação, os efeitos benéficos da inibição da HO-1 estiveram restritos a maior peso fetal, enquanto que a indução de HO-1 levou a diminuição nos níveis placentários de IFN- γ . Os efeitos protetores do tratamento com o inibidor da HO-1 se reduziram à medida que a gestação avançou. Em conclusão, a expressão de HO-1 parece contribuir com os resultados adversos provocados pela infecção durante

a gestação e sua modulação parece ser necessária para garantir o sucesso gestacional especialmente no início da gestação.

Palavras-chave: Heme oxigenase 1, malária na gestação, células NK uterinas, ferro, citocinas, CoPPIX, ZnPPIX.

ABSTRACT

Malaria in pregnancy is a serious public health problem. Thousands of cases of newborns with low birth weight due to maternal infection by *Plasmodium* species are registered each year. Furthermore, the infection is capable of inducing other complications such as anemia, maternal death, abortion and premature birth. Heme oxygenase 1 (HO-1) is an enzyme that catalyzes the degradation of heme into biliverdin, iron and carbon monoxide and whose activity has been shown to be protective in several contexts, including pregnancy, although its induction has also been related to be harmful. However, the effect of HO-1 modulation on gestational malaria had not been previously described. For this reason, the role of HO-1 in *Plasmodium berghei* ANKA infection in early, mid and late gestation in BALB/c mice was evaluated in the present study. For this purpose, the mRNA expression levels of the enzyme at the maternal-fetal interface after infection and the effect of treatment of infected pregnant mice with an inducer (CoPPiX) or an inhibitor (ZnPPiX) of the enzyme's activity were evaluated. The results showed that the infection induces anemia, hypoglycemia, elevated heme levels, embryonic loss and decreased fetal weight. The expression of HO-1 mRNA in uterus/placenta increased in early and late gestation compared to uninfected controls in these gestational periods. An increase in iron deposition at implantation sites of the females on day 8 of gestation and 7 of infection was also observed. Inhibition of HO-1 led to an improvement in adverse pregnancy outcomes caused by the infection, especially in early pregnancy, in which there was a reduction in parasitism, iron deposition, oxidative stress and local levels of TNF, as well as an increase in the number of uterine NK cells, maternal hemoglobin and blood glucose levels. Although there is no induction of HO-1 in mid-pregnancy in response to infection, treatment with ZnPPiX decreases the rate of abnormal implantation sites and parasitemia levels, as well as increasing hemoglobin levels compared to infected females treated with vehicle. In late gestation, the beneficial effects of HO-1 inhibition were restricted to higher fetal weight, whereas HO-1 induction led to a decrease in placental IFN- γ levels. The protective effects of HO-1 inhibitor treatment diminished as pregnancy progressed. In conclusion, the expression of HO-1 seems to contribute to the adverse outcomes caused by infection during pregnancy and its modulation seems to be necessary to guarantee gestational success, especially in early pregnancy.

Keywords: Heme oxygenase 1, malaria in pregnancy, uterine NK cells, iron, cytokines, CoPPIX, ZnPPIX.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desenvolvimento embrionário e fetal

O útero dos camundongos pode ser dividido desde o ponto de vista anatômico em duas regiões opostas entre si: mesometrial e antimesometrial. O mesométrio é o ligamento que prende os cornos uterinos à parede da cavidade abdominal, fornecendo ao mesmo tempo um canal pelo qual vasos sanguíneos e nervos alcançam o útero, marcando assim a região mesometrial (FAVARO; ABRAHAMSOHN; ZORN, 2014).

A implantação embrionária é o processo através do qual o conceito entra em contato com o epitélio luminal do endométrio, sendo internalizado no estroma do tecido conjuntivo endometrial e estabelecendo contato com a circulação materna (BEGLEY; FIRTH; HOULT, 1980). Enquanto a implantação embrionária no humano ocorre por volta do 6º dia após a fertilização, a implantação embrionária em camundongos ocorre entre o 4º e o 5º dia após a fertilização. Os embriões murinos se implantam no útero, onde induzem a decidualização (BARATEIRO *et al.*, 2019). Ainda na gestação murina a implantação é necessária para o início da decidualização, em humanos este processo acontece em cada ciclo menstrual independentemente de ocorrer a implantação embrionária (MOFFETT-KING, 2002).

A decidualização envolve a proliferação e diferenciação do tecido estromal uterino ao redor do blastocisto para formar a decídua, a qual representará o componente materno da placenta madura. Este processo compreende a modificação do padrão morfológico, metabólico, secretório e molecular do sítio de implantação. Desta maneira, as células deciduais são capazes de produzir citocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos específicos da gestação. Ao mesmo tempo, uma variedade de células imunes se instala na decídua e promovem a manutenção da gestação (ADAMSON *et al.*, 2002; BEVILACQUA; LORENZON; BANDEIRA, 2014).

Em camundongos, a decidualização se inicia com a geração da zona decidual primária (PDZ, *primary decidual zone*). Isso é seguido pela diferenciação da zona decidual secundária (SDZ, *secondary decidual zone*) ao redor da PDZ, começando de maneira antimesometrial e se estendendo lateralmente e depois em sentido mesometrial, dando origem à decídua basal. Desde o 5º ao 8º dia de gestação, a maioria do tecido no sítio de implantação do camundongo é formado pela decídua. A decídua antimesometrial começa a regredir por volta do 9º dia de gestação e eventualmente se torna uma camada fina conhecida como decídua capsularis,

enquanto que a decídua localizada no lado mesometrial ou decídua basal, persiste até o final da gestação (PANG *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2017). A decídua antimesometrial auxilia o desenvolvimento do concepto no primeiro estágio da gestação por meio da placenta coriovitelina, enquanto que a decídua mesometrial contribui com a posterior formação da placenta corioalantóidea. A placenta coriovitelina, ou placenta primitiva, está composta por uma rede de células trofoblásticas gigantes, o saco vitelino, células da decídua antimesometrial e vasos sanguíneos da decídua mesometrial, sendo a principal fonte de nutrição para o embrião até a formação da placenta corioalantóidea ou definitiva que será descrita mais adiante (FAVARO; ABRAHAMSOHN; ZORN, 2014).

Simultaneamente com a decidualização, outras mudanças estruturais ocorrem no miométrio e na mucosa uterina dos murinos. A mais perceptível delas é o desenvolvimento do agregado linfóide mesometrial da gestação (MLAp, *mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy*) e o aumento da proeminência dos vasos sanguíneos. O MLAp é uma estrutura localizada no lado mesometrial do miométrio a partir do 9º dia de gestação. Esta área, que era previamente conhecida como “glândula metrial”, é reconhecida histologicamente por se desenvolver em cada sítio de implantação no ponto de contato entre a cápsula decidual e a parede uterina e por conter um grande número de células imunes, principalmente células NK uterinas (uNK) (PANG *et al.*, 2014).

No dia 6,5 da gestação murina ocorre o processo de gastrulação, no qual o concepto se diferencia nos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. Ao mesmo tempo, âmnio, córion e alantóides são formados. A placentação se inicia depois de que o alantóide fetal (o tecido progenitor do cordão umbilical) se funde com o córion no 8,5 dia de gestação (HEMBERGER; HANNA; DEAN, 2020). O córion é de dupla camada e consiste nos tecidos mesoderma e ectoderma extraembrionário. Esta última camada surge do trofoectoderma do blastocisto e dá origem às células trofoblásticas da placenta. Após a fusão, prolongações do alantóide que contêm novos vasos sanguíneos embrionários crescem dentro do primórdio da placenta, conhecido como cone ectoplacentário. A circulação placentária começa entre o 9º e 10º e é seguida por um aumento no peso e volume da placenta, que se estima que continue até o 17º dia de gestação, enquanto que o crescimento exponencial do feto ocorre entre a metade e o final da gestação, sendo que o parto em camundongos ocorre ao redor do 20º dia de gestação (Fig. 1).

Sendo assim, a razão entre o peso fetal e o peso da placenta se torna cada vez maior nos estágios mais avançados da gestação em camundongos (PANG *et al.*, 2014).

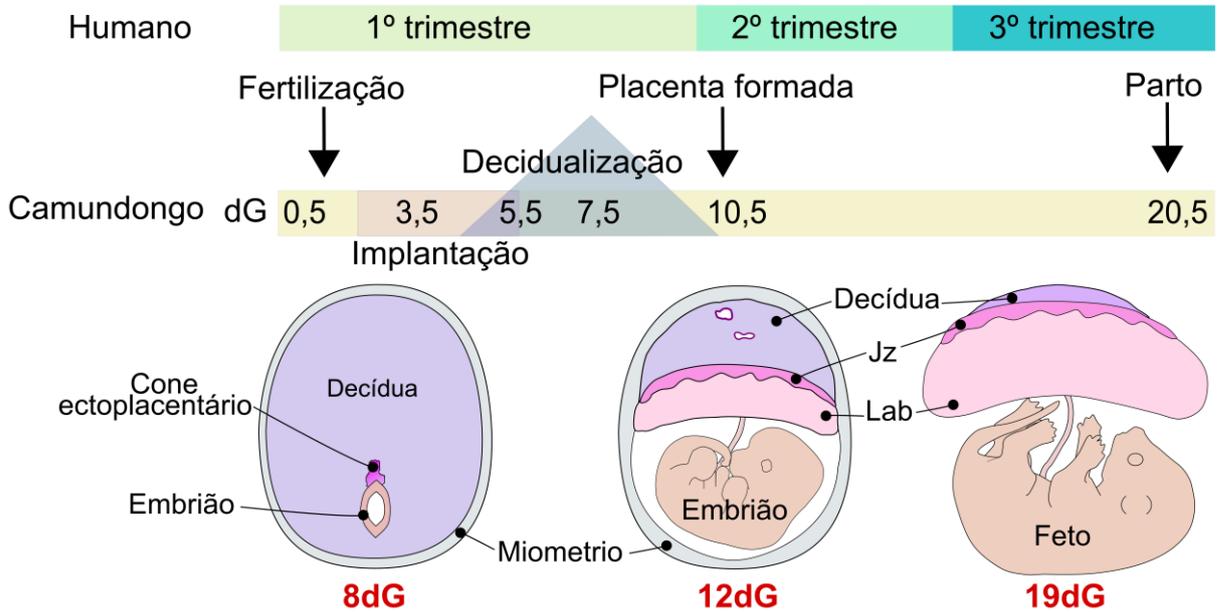


Figura 1. Comparação temporal dos principais eventos que ocorrem na gestação em humanos e camundongos. A gestação humana dura 9 meses enquanto que a gestação em camundongos requer por volta de 20 dias. Após a fertilização, uma série de eventos, dentre eles a implantação embrionária e a decidualização, medeiam a transformação da placenta coriovitelina para a placenta corioalantóideia definitiva ao redor do 11º dia de gestação. Enquanto a placentação em camundongos finaliza na metade do tempo gestacional, em humanos este processo finaliza no final do primeiro trimestre. Na presente investigação foram escolhidos o 8º, 12º e 19º dia de gestação como pontos de tempo para avaliar o início, metade e final da gestação, respectivamente. dG: dias de gestação, Jz: zona juncional, Lab: labirinto. Figura adaptada a partir do esquema de Sones e Davisson (2016).

A placenta dos camundongos apresenta uma estrutura de labirinto perfundida com sangue materno e atinge uma estrutura definitiva na metade da gestação, por volta do dia gestacional 10,5. Esta estrutura consiste de três camadas principais: a decídua basal, que além de conter as células deciduais abriga células imunes maternas, trofoblasto invasivo e artérias espiraladas, que são parcialmente invadidas por citotrofoblasto; uma camada chamada zona juncional formada por uma camada de células trofoblásticas gigantes em direto contato com a decídua materna e uma região celular densa subjacente que compreende as células do espongiotrofoblasto e as células trofoblásticas de glicogênio; e uma camada de labirinto, onde ocorre a transferência de nutrientes e gases entre os espaços sanguíneos materno e fetal (ADAMSON *et al.*, 2002; MALASSINÉ; FRENDO; EVAIN-BRION, 2003).

1.2. Estrutura da placenta murina definitiva: tipos de trofoblasto que a compõem

A placenta é um órgão vital que age como interface entre os microambientes materno e fetal, sendo necessária para a troca de gases, nutrientes e resíduos entre a mãe e o feto. As células trofoblásticas constituem a linhagem celular mais importante na placenta, uma vez que essas fornecem os principais componentes funcionais e estruturais necessários para manter o contato próximo entre o sangue materno e fetal (ROSSANT; CROSS, 2001).

As placentas de humano e camundongo são semelhantes por apresentar forma de disco e estrutura hemocorial. Porém, ao passo que a placenta humana é classificada como hemomonocorial, pois as células endoteliais fetais são separadas do sangue materno por apenas uma camada contínua de trofoblasto, a placenta murina é classificada como hemotricorial, considerando o número de camadas de trofoblasto que separam a circulação materna e fetal na região do labirinto (SIMMONS, 2014; BARATEIRO *et al.*, 2019). Ambas, a placenta humana e a murina, apresentam duas superfícies: a placa basal, contígua ao endométrio materno; e a placa coriônica, voltada para o feto, coberta pelas membranas fetais âmnio e córion e na qual se encontra ligado o cordão umbilical (FURUYA *et al.*, 2008; BURTON; FOWDEN, 2015). Enquanto a estrutura da placenta humana está baseada em vilosidades coriônicas fetais em contato direto com o sangue materno nos espaços intervilosos (BURTON; FOWDEN, 2015), nas placentas murinas os espaços sanguíneos maternos estão separados dos capilares fetais por uma barreira celular, conhecida como membrana interhemal. Esta barreira é formada por uma camada perfurada de citotrofoblasto constituído por células trofoblásticas gigantes sinusoidais (s-TGCs) que se encontram em contato com o sangue materno, duas camadas de sinciotrofoblasto (SynT-I e SynT-II) e por células endoteliais em contato com o sangue fetal. Além disso, ao longo do labirinto se encontram pericitos associados às células endoteliais fetais (MALASSINÉ; FRENDO; EVAIN-BRION, 2003; SIMMONS, 2014). A estrutura da placenta murina, os diferentes tipos de trofoblasto que a constituem bem como a circulação materno-fetal são esquematizados na figura 2.

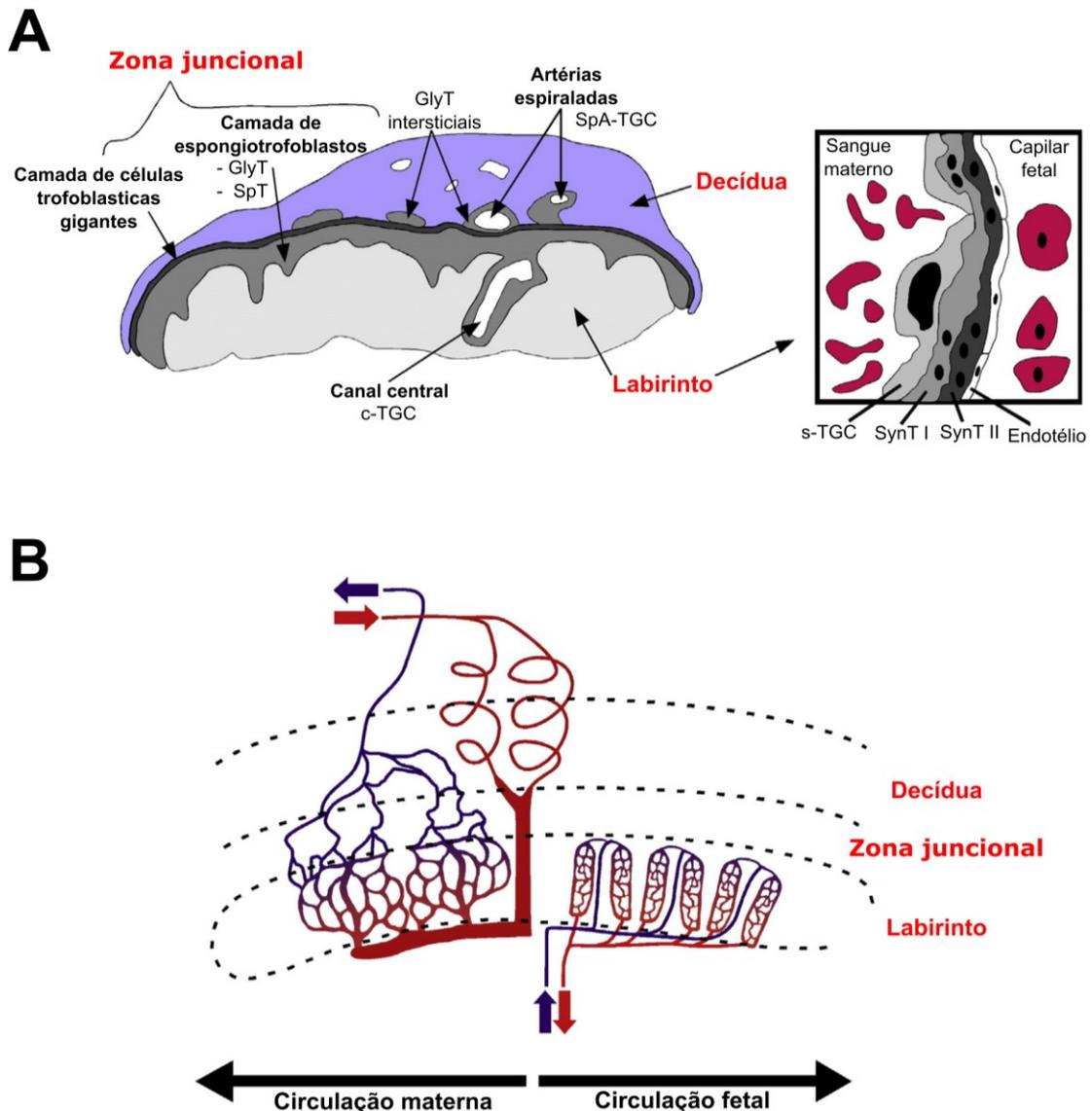


Figura 2. Estrutura da placenta e esquema da rede vascular na placenta murina definitiva. (A) Disposição das camadas placentárias (decídua, zona juncional e labirinto) bem como as populações de trofoblasto que as compõem. Uma amplificação da membrana interhemal é apresentada mostrando as células que formam a barreira placentária na camada de labirinto. GlyT: células de glicogênio; SpT: espongiotrofoblastos; SpA-TGC: células trofoblásticas gigantes associadas a artérias espiraladas; c-TGC: células trofoblásticas gigantes associadas ao canal central; s-TGC: células trofoblásticas gigantes sinusoidais; SynT I: sinciciotrofoblastos 1; SynT II: sinciciotrofoblastos 2. (B) Circulação materno-fetal na placenta murina. O sangue oxigenado materno ingressa na placenta através das artérias espiraladas que convergem no canal central para levar a sangue para a placa coriônica e depois se dividir em redes de sinusóides maternos que extraem o sangue desoxigenado através de veias que se dirigem ao mesométrio. O sangue fetal desoxigenado entra na placenta pela artéria umbilical que se insere na placa coriônica, entrando numa rede capilar restrita à camada de labirinto e que leva o sangue oxigenado para o feto através das veias umbilicais. Esquema de (SIMMONS, 2014), com algumas modificações.

Outros tipos de trofoblasto que formam parte da placenta são aqueles que formam a zona juncional, cuja principal função parece ser a produção de hormônios necessários para a manutenção da gestação, bem como fornecer suporte físico à região de labirinto subjacente (AKISON *et al.*, 2017). Esta região é composta por duas camadas: uma de espongiotrofoblasto e outra de células trofoblásticas gigantes parietais (p-TGCs). A camada do espongiotrofoblasto contém dois tipos celulares, espongiotrofoblasto (SpT) e células de glicogênio (GlyT). Ademais, outro tipo de células trofoblásticas gigantes (c-TGCs) cercam os canais vasculares centrais que passam através da placenta em direção à placa coriônica (MALASSINÉ; FRENDON; EVAÏN-BRION, 2003; SIMMONS, 2014).

Dependendo do tempo de gestação, após a placentação também é possível encontrar alguns tipos de trofoblasto que apresentam propriedades invasivas e atingem a decídua, como as células trofoblásticas gigantes associadas às artérias espiraladas (equivalentes ao trofoblasto extraviloso humano) e as células de glicogênio intersticiais (SIMMONS, 2014). Na decídua, as células de glicogênio liberam seu conteúdo intracelular, que inclui glicogênio e hormônios, que parece ser usado como fonte de energia e regulação hormonal no final da gestação e/ou o parto (BOUILLOT *et al.*, 2006; AKISON *et al.*, 2017). Em vista das importantes funções de cada camada placentária, tais como remodelamento arterial e defesa imunológica na decídua, suporte hormonal na zona juncional e troca de nutrientes no labirinto, tem sido sugerido que inadequadas proporções das camadas placentárias e escassa migração trofoblástica podem levar à restrição do crescimento intrauterino ou inclusive à perda embrionária (WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018).

1.3. Imunidade e tolerância durante a gestação

A gestação requer uma estrita regulação do perfil de resposta imune materno que promova os eventos necessários para a implantação e manutenção da gestação, e que permita a tolerância dos antígenos paternos presentes no conceito. Cada uma das etapas chave na gestação tais como implantação, placentação, crescimento fetal e o parto requerem um microambiente único e representam desafios imunológicos diferentes (MOR; ALDO; ALVERO, 2017).

Como foi revisado e sugerido por Mor *et al.* (2011, 2017) a implantação embrionária e o início da placentação se assemelham a processos de dano tecidual e posterior reparo, sendo requerido um ambiente pró-inflamatório nestas etapas

caracterizado pela produção de citocinas tais como interleucina (IL)-6, IL-8, IL-15, fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF) pelas células estromais endometriais e por células imunes infiltrantes. Na segunda fase da gestação a característica imunológica predominante é a indução de um estado anti-inflamatório o qual permite o rápido crescimento do feto e, na última fase imunológica, quando o feto tem completado seu desenvolvimento, é necessária a indução de um estado pró-inflamatório para realizar o parto. Então, a resposta imune predominante na mãe irá depender do período da gestação e do balanço de sinais originados pelos sistemas imunes materno e fetal, influenciando a susceptibilidade à infecções durante a gestação (MOR *et al.*, 2011; MOR; ALDO; ALVERO, 2017).

A tolerância imunológica aos antígenos fetais é mediada pela restrição e modulação dos leucócitos que chegam à interface materno-fetal. A comunicação entre estes leucócitos, as células estromais e as células trofoblásticas pode alterar o perfil das células imunes e promover mecanismos reguladores (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). Células imunes tais como macrófagos M2, células dendríticas tolerogênicas e células T reguladoras (Treg) medeiam os mecanismos de tolerância imunológica e inibem a imunidade contra os antígenos fetais através do seu potencial para suprimir inflamação. Em particular, as células Treg podem suprimir a inflamação e inibir a geração de populações de células T efectoras, capazes de prejudicar o feto (ROBERTSON; PETROFF; HUNT, 2015), sendo capazes de gerar um microambiente de tolerância na interface materno-fetal através da produção do fator transformador de crescimento beta1 (TGF- β) (ZENCLUSSEN *et al.*, 2006).

Ao mesmo tempo que mecanismos de tolerância imunológica são necessários para a manutenção da gestação, também é importante que a unidade materno-fetal esteja protegida contra o ataque de patógenos. Neste sentido, as camadas de trofoblasto que separam os compartimentos vasculares materno e fetal na placenta constituem uma barreira para certos microrganismos, sobretudo em camundongos, que apresentam uma barreira hemotricorial (BARATEIRO *et al.*, 2019). Além disso, a ausência de junções celulares na camada de sincíotrofoblasto, uma camada celular multinucleada, se apresenta como uma vantagem na proteção contra infecções (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). A placenta também possui outros mecanismos de defesa para a proteção do feto contra infecções, tais como produção de citocinas, reconhecimento de patógenos por receptores da resposta imune inata e transferência de anticorpos IgG (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019).

1.4. Células NK uterinas (uNK): generalidades e funções

As células *natural killer* (NK) constituem a primeira e a melhor descrita das células linfoides inatas (ILC, *Innate Lymphoid Cells*), sendo um subtipo das ILC de tipo 1, apresentam um papel importante na resposta imune inata contra vírus e bactérias intracelulares. São chamadas de *natural killer* devido a que sua principal função é eliminar células tumorais e células infectadas, de maneira semelhante às células T citotóxicas da imunidade adaptativa, no entanto estando classicamente encaixadas como um elemento do sistema imune inato. Ainda, as células NK se encontram principalmente no sangue e no baço, constituindo por volta de 5 e 15% das células mononucleares nesses respectivos órgãos, essas podem ser encontradas raramente em outros órgãos linfoides e abundantemente no fígado e no útero gravídico (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Durante a gestação as células NK uterinas (uNK) compõem aproximadamente 70% dos leucócitos infiltrados na decídua, que também pode conter macrófagos (20-25%) e um pequeno número de células T (3-10%) e células dendríticas (1,7%), sendo as células B praticamente ausentes (MOFFETT-KING, 2002; MOR; ALDO; ALVERO, 2017). A diferenciação das células uNK no útero em decidualização é induzida principalmente pela citocina IL-15 (BARBER; POLLARD, 2003) assim como por IL-2 (ALLEN; NILSEN-HAMILTON, 1998), sendo que ambas citocinas compartilham a cadeia β do receptor de IL-2 (IL-2R β) ou CD122 (CARSON *et al.*, 1994). Em camundongos, as células uNK começam a se acumular de maneira significativa na decídua ao redor do dia gestacional 6,5, atingindo seu pico de proliferação na metade da gestação, por volta do dia gestacional 11,5, após o qual diminuem progressivamente até estarem praticamente ausentes no dia gestacional 19,5, apesar de que algumas células NK são observadas poucos dias após o parto (SOJKA *et al.*, 2018). Dentro dos sítios de implantação, as células uNK apresentam proeminentes grânulos citoplasmáticos, expressam constitutivamente interferon (IFN)- γ , bem como expressão elevada de marcadores de superfície tais como CD11c, o qual complica a discriminação entre as células uNK e as células dendríticas (ERLEBACHER, 2014).

As células uNK humanas são reconhecidas como células CD56^{bright} CD16⁻ CD3⁻. Quanto a sua detecção em camundongos, as células uNK são CD122⁺ CD3⁻, das quais aproximadamente 30% expressam marcadores de células NK periféricas como NK1.1 e CD49b, enquanto que as células CD122⁺ CD3⁻ NK1.1⁻ CD49b⁻ correspondem

a aproximadamente 70% das células NK no útero de camundongos com 9,5 dias de gestação. Na presente investigação as células uNK foram detectadas utilizando-se a marcação com a lectina de aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA), a qual reconhece resíduos de N-acetilgalactosamina presentes nos grânulos e membrana plasmática das células uNK (PAFFARO *et al.*, 2003; CROY *et al.*, 2010). Este método é eficiente na detecção das células NK diferenciadas no útero, pois células CD122⁺ CD3⁻ NK1.1⁺ CD49b⁺ são DBA⁻ e podem ser detectadas em outros órgãos como o baço, enquanto que células CD122⁺ CD3⁻ NK1.1⁻ CD49b⁻ são DBA⁺ e são detectadas no útero, estando ausentes no baço (CROY *et al.*, 2010). Além disso, no momento da escolha dos marcadores para detectar estas células, deve ser considerado que algumas linhagens de camundongos como BALB/c, AKR, CBA, C3H, DBA e 129 não expressam NK1.1 (CARLYLE *et al.*, 2006).

Apesar de que o papel de muitas células que residem no útero durante a gestação ainda não está bem elucidado, no caso das células uNK suas funções são melhor compreendidas atualmente, pois recentemente crescentes esforços têm sido feitos para tentar entender sua biologia e funções, bem como o porquê essas células não exercem sua função citolítica no microambiente uterino durante a gestação apesar de serem capazes de produzir perforina e granzimas. As funções atribuídas às células uNK durante a gestação são diversas e abrangem desde a promoção do remodelamento da vasculatura uterina, especificamente das artérias espiraladas que se inserem na decídua, a produção de citocinas e fatores de crescimento na interface materno-fetal e a manutenção da tolerância imunológica, entre outras (HANNA; MANDELBOIM, 2007; ERLEBACHER, 2014). Uma vez que o útero e a placenta diferem entre mulheres na sua primeira gestação e em gestações posteriores; tem-se descrito uma nova função para as células uNK, que é a geração de memória para auxiliar no remodelamento vascular em gestações subsequentes. Estas células seriam chamadas de células NK decíduais treinadas na gestação e, além de possuírem uma assinatura epigenética e transcriptômica única, quando estimuladas são capazes de produzir mais IFN- γ e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)- α , ambas moléculas necessárias para as modificações vasculares próprias da gestação (GAMLIEL *et al.*, 2018). Além disso, num estudo recente usando cultura primária de células humanas de endométrio em processo de decidualização, células NK uterinas humanas e meio condicionado de embriões, foi demonstrado que as células uNK têm um papel na detecção de embriões de baixa qualidade bem como na

eliminação de células decíduais senescentes que levam à perda da gestação (KONG *et al.*, 2021)

Muitas das propriedades que tornam únicas as células uNK dependem das interações dos seus receptores com as células trofoblásticas. Recentemente, foi descrito que o receptor NKG2A atua educando as células NK maternas para orquestrar as mudanças vasculares que levam ao desenvolvimento cerebral normal dos fetos e a baixo risco de complicações durante a gestação (SHREEVE *et al.*, 2021).

Os mastócitos uterinos (uMCs) são outro tipo celular que se encontra no útero e que têm demonstrado ser de grande importância para a manutenção da gestação, devido à secreção das quimases Mcpt5 e CMA1 que medeiam a apoptose do músculo liso arterial em camundongos e estimulam a invasividade de células trofoblásticas humanas, respectivamente, sendo ambos eventos importantes para o remodelamento das artérias espiraladas e, por conseguinte, para a manutenção do crescimento fetal (MEYER *et al.*, 2017a). De maneira interessante, as células uNK são também produtoras de Mcpt5 e em modelo de indução de aborto as células uNK e os uMCs podem contrabalançar seus efeitos na interface materno-fetal e em conjunto promover o remodelamento arterial e a placentação (MEYER *et al.*, 2017b).

1.5. Malária na gestação: aspectos epidemiológicos

A malária é a doença causada pela infecção por parasitos protozoários do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao filo Apicomplexa. Atualmente sabe-se que 5 espécies de *Plasmodium* podem infectar o ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (WHO, 2015). A principal via de transmissão destes parasitos é vetorial, através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*; porém, a transmissão da doença também tem sido reportada mediante transfusões, transplante de órgãos ou por via transplacentária (ALVES *et al.*, 1995; MUNGAI *et al.*, 2001; MEJIA *et al.*, 2006).

A infecção congênita por *Plasmodium* tem sido relatada em bebês com menos de dois meses de idade (DE PONTUAL *et al.*, 2006; DEL PUNTA *et al.*, 2010; BHATIA; MOHAN; MAITHANI, 2010; RAJWANIYA; AGRAWAL, 2016). Embora seja uma complicação rara em áreas endêmicas, a malária congênita pode ser detectada dois ou três meses após o parto quando os anticorpos maternos se tornam escassos (SCHANTZ-DUNN; NOUR, 2009). Mulheres gestantes, principalmente aquelas que residem em áreas de baixa transmissão, constituem um dos principais grupos de risco

de desenvolver formas graves da doença devido a que essas apresentam uma imunidade reduzida contra antígenos parasitários expressos na placenta durante a infecção (ROGERSON; MWAPASA; MESHNICK, 2007). Em áreas de alta transmissão de malária, as mulheres gestantes geralmente são assintomáticas e apresentam imunidade contra a infecção derivada das repetidas picadas de mosquitos infectados e, por conseguinte, devido à constante exposição aos antígenos parasitários (DESAI *et al.*, 2007; WHO, 2019). A malária na gestação é capaz de colocar em risco a saúde da mãe, do feto e do recém-nascido se tornando um grave problema de saúde pública. As complicações provocadas pela malária na gestação na mãe incluem anemia, hipoglicemia, malária grave e inclusive a morte, enquanto que as complicações que atingem o feto variam de acordo com o período gestacional no qual ocorre a infecção, podendo ocorrer aborto, parto prematuro, restrição do peso intrauterino e baixo peso ao nascer, sendo este último o maior fator de risco para a mortalidade perinatal, neonatal e infantil assim como alterações no crescimento e desenvolvimento cognitivo (DESAI *et al.*, 2007; SCHANTZ-DUNN; NOUR, 2009; WHO, 2019).

No ano 2019 registraram-se aproximadamente 229 milhões de casos e 409 mil mortes devido à malária no mundo, sendo que a grande maioria dessas ocorreram na África subsaariana, região na qual existe uma predominância em casos de infecção por *P. falciparum*. Nesse mesmo ano, em áreas endêmicas da África subsaariana foram registrados mais de 11 milhões de casos de mulheres que apresentaram malária durante a gestação (35% das mulheres gestantes na região) assim como 822 mil casos de neonatos com baixo peso ao nascer, devido a exposição ao *Plasmodium* durante a gestação. Na América Latina, as maiores áreas endêmicas estão concentradas na região da Amazônia, sendo Venezuela, Brasil e Colômbia os países com maior quantidade de casos registrados (WHO, 2020). Em relação à malária na gestação na América Latina, na revisão realizada por Yanow *et al.* (2016) é mencionado que complicações relacionadas à malária na gestação tais como parto prematuro, baixo peso ao nascer e perda fetal, têm sido reportadas no Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia e Honduras.

Recentemente, foi descrito que em uma região de baixa transmissão da Amazônia brasileira (Cruzeiro do Sul - Acre) houve uma prevalência de malária durante a gestação equivalente ao 8,9% entre os anos 2006 e 2014, a maioria desses casos provocados por *P. vivax*. A infecção por *P. vivax* em mulheres gestantes dessa

região foi associada com um menor peso ao nascer, enquanto que os casos de infecção por *P. falciparum* se relacionaram com um aumento nos casos de parto prematuro (DOMBROWSKI *et al.*, 2018). Um estudo posterior realizado em Cruzeiro do Sul e outras quatro municipalidades, no qual foram estudadas as consequências da malária quando as mães foram infectadas por *P. vivax* no primeiro, segundo ou terceiro trimestre da gestação, revelou que a infecção durante o primeiro trimestre se associou significativamente com a apresentação de parto prematuro, baixo peso ao nascer e redução da circunferência craniana e estatura do recém-nascido (DOMBROWSKI *et al.*, 2021).

Existem poucos estudos sobre o impacto da malária no início da gestação, permanecendo os mecanismos que regem a infecção neste período escassamente elucidados (ACCROMBESSI *et al.*, 2018). Estudos clínicos usando pacientes com malária no primeiro trimestre são escassos, em razão de que em áreas endêmicas muitas vezes a primeira consulta pré-natal ocorre no segundo trimestre da gestação, afetando o recrutamento de gestantes no primeiro trimestre. De fato, isto resulta ser de crucial importância porque nessas áreas uma grande proporção de mulheres apresenta infecção malárica no momento da primeira visita pré-natal (KALILANI-PHIRI *et al.*, 2013). Exemplificando, um estudo realizado no Malawi, um país endêmico para malária, usando uma coorte de 6413 mulheres gestantes determinou que apenas 23% das mesmas se apresentaram à primeira consulta pré-natal no primeiro trimestre de gestação, sendo que 69% se apresentaram no segundo trimestre e 8% no último trimestre (NKOKA; CHUANG; CHEN, 2018). Usando um desenho experimental original Accrombessi *et al.* (2018), examinaram 387 mulheres mensalmente desde antes da concepção até o parto para determinar o impacto da malária no início da gestação, encontrando que a prevalência da infecção no primeiro trimestre foi de 20,8%, sendo 7,3% dessas infecções assintomáticas. Discriminando os resultados por mês, notaram que a maioria dos casos se registrava durante o primeiro mês da gestação (16,7%), sendo encontrados 9,2% dos casos no segundo mês e 11,2% no terceiro mês.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o tratamento de mulheres gestantes infectadas por *Plasmodium* com terapias baseadas em combinações de artemisininas (ACTs) no segundo e terceiro trimestre da gestação e de quininas no primeiro trimestre, devido à preocupação em quanto à toxicidade das ACTs para o embrião no começo da gestação (WHO, 2015). No entanto, existe também

preocupação sobre o uso de quininas no primeiro trimestre da gestação, considerando que as ACTs também deveriam ser a opção terapêutica para tratar a malária não complicada durante esse período gestacional (MCGREADY *et al.*, 2020). Além disso, para prevenir as consequências da malária na gestação em áreas de moderada e alta transmissão da doença na África subsaariana a OMS recomenda, em combinação com controle vetorial, diagnóstico imediato e tratamento eficaz, a aplicação do tratamento preventivo intermitente na gestação (IPTp), com o qual mulheres gestantes recebem pelo menos três doses de sulfadoxina-pirimetamina a partir do segundo trimestre (WHO, 2015).

Mulheres gestantes de maneira geral também costumam receber suplementação de ferro. Porém, estudos realizados em mulheres gestantes com malária que realizaram sua primeira visita pré-natal no segundo trimestre de gestação, indicam que estas apresentam um elevado armazenamento corporal de ferro, baseados numa relação entre os níveis de ferritina e do receptor de transferrina séricos, quando comparado com gestantes não infectadas, embora para os autores a interação malária-armazenamento de ferro ainda precisa ser elucidado. Não está claro se altas cargas de ferro favorecem a infecção por malária ou se a malária causa altos níveis armazenamento férrico, mas é salientado que a suplementação com ferro neste cenário poderia ser prejudicial (BAHIZIRE *et al.*, 2018; DIALLO *et al.*, 2020).

1.6. Mecanismos de patogênese durante a malária na gestação

A infecção por parasitos do gênero *Plasmodium* ocorre quando um mosquito infectado inocula os parasitos na forma de esporozoítos na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Então, os parasitos entram na circulação e atingem o fígado invadindo os hepatócitos e proliferando nestes durante o chamado ciclo extra-eritrocítico ou hepático, para depois serem liberados na corrente sanguínea em forma de merozoítos que invadem e proliferam em hemácias durante o ciclo eritrocítico, se desenvolvendo em formas de anel, trofozoíto e esquizonte. Após isso, ocorre a ruptura das hemácias infectadas liberando merozoítos na circulação iniciando novos ciclos de invasão eritrocitária (NILSSON *et al.*, 2015). A contínua hemólise leva à liberação de heme livre que pode ser tóxico para o parasito, motivo pelo qual este converte os monômeros de heme num cristal inerte chamado pigmento malárico ou hemozoína, que se armazena no vacúolo digestivo do parasito (CORONADO; NADOVICH; SPADAFORA, 2014). Na medida que o parasito prolifera e amadurece, pode

expressar e exportar proteínas aderentes à superfície da hemácia, como a proteína 1 da membrana eritrocitária *P. falciparum* (PfEMP1), que permite que estas se liguem a receptores presentes nas células endoteliais tais como ICAM1, VCAM1, E-selectina, CD36, sulfato de condroitina A (CSA) e ácido hialurônico (HA), mediando o sequestro de hemácias infectadas em órgãos alvo como cérebro, pulmão e placenta evitando sua eliminação no baço (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

As hemácias infectadas por *P. falciparum* são capazes de se ligar de maneira específica ao CSA, um glicosaminoglicano presente na superfície do sincitiotrofoblasto nos espaços intervilosos da placenta através da expressão do antígeno de superfície variante 2 - condroitina sulfato A (VAR2CSA), um membro da família da PfEMP1 (FRIED; DUFFY, 1996; SALANTI *et al.*, 2003). De fato, hemácias de camundongo infectadas com *P. berghei* também têm a capacidade de se ligar a CSA e HA (NERES *et al.*, 2008). Esta interação entre a hemácia infectada e as células trofoblásticas leva à acumulação de parasitos na placenta induzindo o recrutamento de células inflamatórias, assim como o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio na interface materno-fetal, contribuindo com a patologia na placenta e com as complicações clínicas associadas (SHARMA; SHUKLA, 2017).

VAR2CSA constitui o principal alvo para o desenvolvimento de vacinas que contribuam para a prevenção das complicações associadas à malária na gestação. De fato, o candidato vacinal PAMVAC está baseado num fragmento recombinante de VAR2CSA e foi testado em voluntários adultos saudáveis, demonstrando ser bem tolerado e imunogênico, produzindo anticorpos capazes de inibir a ligação de hemácias infectadas por *P. falciparum* expressando VAR2CSA. Espera-se que em breve este candidato vacinal seja testado em mulheres antes da primeira gestação em áreas endêmicas (MORDMÜLLER *et al.*, 2019). Isto é um grande avanço no estudo de medidas de controle das complicações associadas à doença durante a gestação uma vez que geração de anticorpos imunoglobulinas G (IgG) específicos contra VAR2CSA tem sido associada a menor risco de sofrer infecção placentária e maior peso nos neonatos (TORNIGAH *et al.*, 2021).

Como foi revisado previamente, aumentos nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-2 têm sido detectados em placentas em resposta à infecção por *Plasmodium*, sendo relacionados à eliminação dos parasitos através da estimulação da proliferação de células T, da atividade fagocítica de macrófagos e

geração de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Contudo, a produção destas citocinas na interface materno fetal também pode afetar o sucesso gestacional. Neste sentido, a elevação dos níveis de TNF- α tem sido claramente associada com a ocorrência de baixo peso ao nascer e parto prematuro. Do mesmo modo, a detecção de citocinas tais como IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5, IL-13 e IL-10 em sangue de cordão umbilical de neonatos expostos a antígenos maláricos *in utero* sugere que a resposta imune desenvolvida pode ser de tipo T helper 1 (Th1), Th2 e/ou Treg (ROGERSON *et al.*, 2007; ODORIZZI; FEENEY, 2016). Além disso, a expressão dos receptores da imunidade inata TLR4 e TLR9 na placenta, assim como de sua molécula adaptadora MyD88 têm sido associados com a produção sistêmica e local de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-1 β , levando a resultados adversos em camundongos infectados. Da mesma maneira, a infecção induz a ativação de inflamassomas AIM2 e NLRP3 e que culminam na produção da citocina IL-1 β nas placentas infectadas. A sinalização por IL-1 β sustenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e possivelmente desregula a expressão de moléculas transportadoras de nutrientes na placenta, promovendo a morte e a restrição do crescimento fetal (REIS *et al.*, 2020). Tanto as alterações na expressão de moléculas transportadoras de nutrientes na placenta (FONTES *et al.*, 2019), quanto a redução dos espaços vasculares na camada de labirinto, devido à inflamação e desorganização do tecido placentário e conseguinte diminuição da área de trocas gasosas e de nutrientes entre mãe e feto, também parecem levar a parto prematuro e restrição do peso fetal (NERES *et al.*, 2008; BARBOZA *et al.*, 2014; BARBOZA *et al.*, 2017).

Em relação à passagem transplacentária do parasito, Crocker *et al.* (2004) observaram que além da citoaderência de hemácias infectadas na placenta, durante a infecção ocorre a destruição direta do sinciciotrofoblasto, alterando a integridade placentária, e sugerem que isso poderia facilitar a passagem de hemácias parasitadas para a circulação fetal. Por outro lado, também tem sido proposto que a acumulação de heme após a internalização de hemácias infectadas pelas células trofoblásticas leva a uma sobrecarga de ferro na placenta que contribui com a morte fetal (PENHA-GONÇALVES; GOZZELINO; MORAES, 2014).

Em uma revisão recente, foi sugerido que o acúmulo de heme liberado após a ruptura das hemácias infectadas, surge como uma de três vias reguladoras do impacto da malária no sucesso gestacional, além da via de desregulação da biogênese de L-arginina-óxido nítrico e a ativação excessiva do complemento. De maneira coletiva,

estas vias criam um ambiente pró-inflamatório e antiangiogênico na interface materno-fetal que interfere com suas funções e desenvolvimento. Acredita-se que a intervenção terapêutica nessas vias poderia reduzir os efeitos nocivos que provocam os resultados adversos na malária gestacional (NGAI *et al.*, 2019).

1.7. Heme oxigenase 1

As enzimas heme oxigenases catalisam a degradação de heme em quantidade equimolares de biliverdina, ferro iônico e monóxido de carbono (CO). A biliverdina é posteriormente transformada em bilirrubina pela ação de uma enzima biliverdina redutase. Têm sido identificadas duas isoformas de heme oxigenase (HO) funcionais e geneticamente distintas: HO-2, que se expressa constitutivamente em células de certos tecidos e a HO-1, cuja expressão é induzida em estados de inflamação e estresse oxidativo (RYTER; ALAM; CHOI, 2006; CAMPBELL; FITZGERALD; DUNNE, 2021). Também foi descrita a expressão de HO-3, que ainda difere estruturalmente de HO-1 apresenta uma alta homologia na sua sequência de aminoácidos (~90%) com HO-2. Inclusive, HO-2 e HO-3 contêm domínios funcionais ausentes em HO-1, fornecendo sítios de ligação adicionais para o heme, diferentes do domínio catalítico para essa molécula. A função específica destes domínios era desconhecida, até que Fleischhacker *et al.* (2020) mostrarem que estes domínios adicionais aprisionam o heme e que interações moleculares entre a cauda e o núcleo da enzima medeiam a sua transferência para o núcleo catalítico de HO-2, facilitando a rotatividade de heme nessa enzima. Uma vez que HO-2 não é induzida sob estímulos do microambiente e que HO-3 apresenta escassa atividade enzimática, HO-1 é induzida em defesa contra estresse oxidativo causado pelo heme, hipóxia, exposição a metais pesados, inflamação e radiação ultravioleta; sendo pouco expressa sob condições fisiológicas (MCCOUBREY; HUANG; MAINES, 1997; RYTER; ALAM; CHOI, 2006; DUVIGNEAU; ESTERBAUER; KOZLOV, 2019).

HO-1, também conhecida como HSP32, é uma proteína de 32 kDa que tem sido caracterizada como uma proteína associada ao retículo endoplasmático, contendo um domínio C-terminal hidrofóbico que sugere a sua compartimentalização de membrana (RYTER; ALAM; CHOI, 2006). Porém, a enzima também pode se translocar para o núcleo, sendo necessária uma clivagem da região C-terminal, gerando uma molécula de ~28 kDa que tem atividade enzimática reduzida, mas ainda participa na defesa anti-oxidante através da sua interação direta com o fator nuclear

eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), evitando a degradação proteossomal desse fator de transcrição e assim estimulando a expressão de proteínas anti-oxidantes como glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1) (BISWAS *et al.*, 2014). De fato, o Nrf2 controla diretamente a expressão de *HMOX1*, o gene que codifica a expressão de HO-1 (SAHA *et al.*, 2020)

HO-1 é bem conhecida por exercer efeitos antioxidantes e citoprotetores através da remoção do heme, o qual catalisa a geração de espécies reativas de oxigênio; e pela geração dos produtos da catálise: bilirrubina que funciona como antioxidante, e o CO que possui propriedades vasodilatadoras, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas. Contudo, apesar dos aspectos benéficos frequentemente citados a formação excessiva de produtos de degradação devido a uma exacerbada expressão também pode produzir efeitos adversos. Os efeitos prejudiciais da elevada expressão da HO-1 são comumente atribuídos à acumulação de ferro nos tecidos devido à sua natureza pró-oxidante em conjunto com alterações nas proteínas transportadoras de ferro. Além disso, a elevada atividade da enzima consome grandes quantidades de NADPH que é necessário para diversos processos celulares o qual sugere que a expressão desta enzima requer uma delicada modulação para preservar seus efeitos benéficos (DUVIGNEAU; ESTERBAUER; KOZLOV, 2019).

1.8. Papel da HO-1 em doenças infecciosas e durante a gestação

No campo das doenças infecciosas, a indução de HO-1 tem mostrado ter efeitos vantajosos e deletérios para o hospedeiro dependendo do microrganismo (COSTA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020). Estudos prévios têm mostrado que a indução farmacológica de HO-1 e a exposição a um dos derivados da sua atividade diminuíram a incidência de morte por malária cerebral experimental (ECM) em camundongos C57BL/6. Tanto camundongos com inibição farmacológica da HO-1, quanto camundongos knockout para HO-1 infectados com *P. berghei* ANKA são susceptíveis a morte por ECM e apresentam aumento da citoaderência no endotélio vascular cerebral (PAMPLONA *et al.*, 2007). Da mesma maneira, a indução de HO-1 levou a proteção contra danos agudos no pulmão de camundongos DBA/2 infectados com *P. berghei* ANKA (PEREIRA *et al.*, 2016). Em contraste, HO-1 demonstrou ter um papel prejudicial durante o estágio hepático da infecção (EPIPHANIO *et al.*, 2008). Portanto o papel de HO-1 durante a malária parece ser diferente dependendo do modelo de infecção estudado.

Um estudo realizado no nosso laboratório no contexto da infecção por outro parasito Apicomplexa, *Toxoplasma gondii*, demonstrou que a indução da expressão de HO-1 controla a infecção por *T. gondii* em pulmão e intestino delgado de camundongos (ARAUJO *et al.*, 2013). No contexto da toxoplasmose congênita, foi observada uma diminuição na expressão da enzima em células trofoblásticas humanas, que quando tratadas com um indutor da enzima ou bilirrubina apresentaram uma diminuição nas taxas de proliferação do parasito (ALMEIDA *et al.*, 2021). Este papel da HO-1 no combate de infecções causadoras de aborto é corroborado pelas investigações de Tachibana *et al.* que num estudo em 2008 demonstraram que a expressão da enzima diminui durante a infecção por *Brucella abortus*, enquanto que quando a expressão de HO-1 foi induzida o aborto devido à infecção foi prevenido. Posteriormente, Tachibana *et al.* (2011) comprovaram o papel protetor da HO-1 durante a infecção por outra bactéria causadora de aborto: *Listeria monocytogenes*, sendo que nesse modelo de infecção a expressão de HO-1 e da proteína anti-apoptótica Bcl-XL é inibida.

HO-1 e seus derivados modulam a função de uma variedade de populações celulares na placenta (SCHUMACHER; ZENCLUSSEN, 2015). A expressão de HO-1 é importante para a presença e proliferação das células uNK (LINZKE *et al.*, 2014); e para a preservação de células dendríticas uterinas no estado imaturo, atenuando assim a resposta de células T contra o feto e promovendo a expansão de células Treg que favorecem a gestação (SCHUMACHER *et al.*, 2012). Além disso, a expressão de HO-1 nos mastócitos suprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias nessas células (YASUI *et al.*, 2007) e a indução de HO-1 em células T e macrófagos leva a produção de citocinas anti-inflamatórias (SCHUMACHER; ZENCLUSSEN, 2015).

Tendo em consideração as evidências científicas que apontam para os efeitos benéficos da expressão de HO-1 na interface materno fetal e no combate a patógenos causadores de aborto, bem como os estudos dos distintos papéis que a enzima pode assumir durante a malária, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar o papel dessa enzima durante a infecção por *P. berghei* ANKA em camundongos BALB/c durante três diferentes períodos gestacionais.

2. JUSTIFICATIVA

Mulheres gestantes e crianças menores de 5 anos constituem os grupos mais vulneráveis à infecção por *Plasmodium*. A infecção por malária durante a gestação constitui um grave problema de saúde pública, sendo que essa pode levar a morte materna, aborto ou baixo peso ao nascer, entre outras complicações. A HO-1 é uma enzima que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, citoprotetoras e anti-apoptóticas e que tem demonstrado ter um papel protetor durante infecções que acarretam aborto. Devido às limitações éticas e logísticas que representa o estudo da malária gestacional em humanos o modelo de camundongos representa uma excelente ferramenta para o estudo da doença, sendo que o modelo experimental usando camundongos BALB/c gestantes infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, reproduz manifestações observadas durante a malária gestacional humana. Este trabalho contribui para a melhor compreensão do papel da HO-1 na tolerância materno fetal durante a malária na gestação. A elucidação deste papel poderia permitir um melhor entendimento dos mecanismos patológicos envolvidos nos efeitos adversos provocados por *Plasmodium* ao longo da gestação, permitindo o desenvolvimento de estratégias farmacológicas que contribuam com as opções terapêuticas atuais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar o papel da heme oxigenase 1 (HO-1) na interface materno-fetal de camundongos durante a malária em três períodos gestacionais.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a parasitemia e quantificar hemozoína na interface materno-fetal de camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA.
- Analisar a expressão de HO-1 em placenta/útero de camundongos infectados ou não quando avaliados no início, metade e final da gestação.
- Confirmar a segurança de tratamentos com inibidor e indutor da HO-1 nos períodos gestacionais estudados.
- Determinar o efeito da inibição e indução da HO-1 no curso da gestação quando camundongos BALB/c são infectados com *P. berghei* ANKA.
- Estudar marcadores de gravidade da doença no sangue de camundongos gestantes infectados.
- Mensurar os níveis de heme circulantes e na interface materno fetal de camundongos infectados ou não quando avaliados no início, metade e final da gestação.
- Quantificar a deposição de ferro e o estresse oxidativo em placenta/útero de camundongos infectados ou não quando avaliados no início, metade e final da gestação.
- Detectar e quantificar células NK e mastócitos uterinos em sítios de implantação de 8 e 12 dias de gestação.
- Avaliar o remodelamento de artérias espiraladas usando análises morfométricas e detecção de α -actina de músculo liso (α -SMA) em sítios de implantação de 12 dias de gestação.
- Quantificar as citocinas IL-6, IL-2, IL-4, TNF, IFN- γ , IL-17, IL-10 e TGF- β em amostras de homogenatos de útero/placenta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados animais machos e fêmeas da linhagem BALB/c. Os camundongos foram mantidos nas instalações da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) em condições livres de patógenos específicos em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob o número de protocolo 066/17 (Anexo 1) e os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas institucionais de ética em experimentação com animais.

4.2. Cepa do parasito

Os animais do presente estudo foram infectados com a parasitos da cepa *P. berghei* ANKA (PbA), os quais expressam a proteína verde fluorescente (GFP), que foram gentilmente cedidos pelo Dr Ricardo Tostes Gazzinelli. Os parasitos foram mantidos em nitrogênio líquido e descongelados para realizar passagens por via intraperitoneal em camundongos machos da linhagem BALB/c. Após isso, foi coletado sangue da cauda do camundongo infectado. Essas hemácias foram utilizadas para infectar os animais dos grupos de estudo.

4.3. Acasalamento e infecção

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idade entre 8-12 semanas, foram acasalados com machos da mesma linhagem em uma proporção de duas fêmeas por cada macho em cada gaiola. As fêmeas foram examinadas a cada dia de manhã para detecção do tampão vaginal, indicativo de cruzamento entre os animais. O dia da detecção do tampão vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação.

Para caracterizar a malária gestacional experimental em diferentes períodos da gestação, as fêmeas foram inoculadas por via intraperitoneal (i.p.) com 5×10^4 hemácias infectadas com PbA no 1º, 5º ou 12º dia de gestação e eutanasiadas no 8º, 12º ou 19º dia de gestação, respectivamente. O dia seguinte à inoculação foi considerado o primeiro dia da infecção. Logo, todos os animais inoculados com PbA no presente estudo contaram com 7 dias de infecção (dl) no momento da eutanásia. Em paralelo, grupos de animais não infectados foram eutanasiados com 8, 12 ou 19

dias de gestação (dG) e usados como controle. Fêmeas não gestantes e não infectadas (NG/NI) e não gestantes infectadas (NG/7dl) foram também utilizadas como controle quando considerado apropriado.

4.4. Tratamentos e avaliação da parasitemia

No presente estudo os animais foram tratados com um indutor da atividade da HO-1, protoporfirina de cobalto IX (CoPPIX), um inibidor da atividade da HO-1, protoporfirina de zinco IX (ZnPPIX) ou veículo. Estas drogas foram dissolvidas em NaOH 0,1 M, diluídas em PBS e o pH neutralizado usando HCl 1 M.

Animais gestantes infectados ou não com PbA foram tratados por via subcutânea com CoPPIX (5 mg/Kg), ZnPPIX (10 mg/Kg) ou veículo no 4º, 5º e 6º dia de infecção. Esquemas representativos dos desenhos experimentais para cada experimento são descritos na seção de resultados.

Amostras de sangue da cauda dos camundongos foram coletadas no 3º, 5º e 7º dia de infecção. A coleta foi executada colocando uma gota de sangue em 500 µL de PBS, seguida de centrifugação a 0,9×g durante 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspenso em 500 µL de formaldeído 4% em PBS e armazenado a 4°C até o processamento em citômetro FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). As hemácias foram separadas segundo seu tamanho e a granulocidade, e a porcentagem de hemácias infectadas foi estimada segundo a fluorescência das mesmas, uma vez que durante este estudo utilizou-se uma cepa do parasito que expressa GFP. Avaliaram-se um total de 50000 células e os dados foram analisados no *software* FlowJo V10. Além disso, foram feitos e avaliados esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido (Instant Prov- NewProv - Paraná - Brasil) como controle qualitativo.

4.5. Eutanásia e coleta de órgãos

Independentemente do estágio da gestação, todas as fêmeas foram eutanasiadas no 7º dia de infecção. Os animais foram anestesiados com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil)/Xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) injetados por via i.p. Uma vez confirmada a ausência de reflexos digitais, o sangue foi coletado através do plexo retro-orbital. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 1000 ×g durante 10 minutos e o soro foi coletado e congelado a -80 °C até o momento do uso. Após a coleta do sangue os animais foram eutanasiados

por deslocamento cervical. Os cornos uterinos foram extraídos e examinados para quantificação e classificação dos sítios de implantação totais, normais e anormais (hemorrágicos, necróticos, pálidos ou de menor tamanho), como ilustrado na figura 3.

Quando os animais foram eutanasiados com 19dG, as placentas e fetos foram extraídos e pesados. Fragmentos de útero ou placenta, segundo o tempo gestacional avaliado, foram coletados e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior maceração de acordo com o objetivo experimental. Da mesma maneira, úteros, placentas e fetos foram fixados em formol tamponado a 10% e incluídos em parafina para a realização de cortes histológicos.

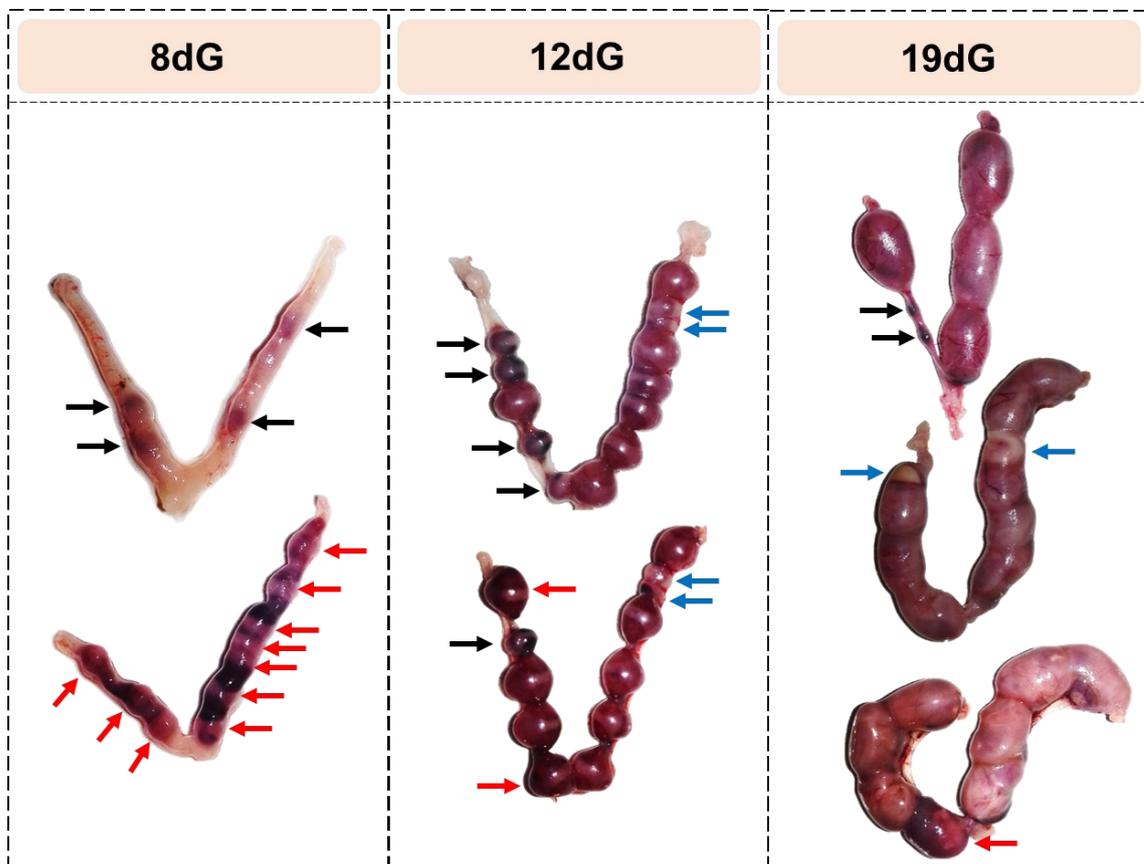


Figura 3. Imagens representativas de sítios de implantação anormais no início, metade e final da gestação. Os sítios de implantação foram considerados anormais quando apresentaram aspecto necrótico (setas pretas), hemorrágico (setas vermelhas), palidez e/ou menor tamanho (setas azuis). dG: dias de gestação.

4.6. Colorações histológicas

Foram realizados cortes histológicos de $4\text{ }\mu\text{m}$ de espessura, sendo estes corados com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação morfológica dos tecidos,

assim como detecção de áreas de necrose. A coloração de Perl (Prussian blue) foi utilizada para evidenciar a presença de ferro nos tecidos, enquanto que a coloração por Azul de Toluidina foi realizada para a quantificação de mastócitos uterinos (uMCs), que foram quantificados a cada 35 campos microscópicos em aumento original de 40X. Os campos microscópicos quantificados correspondiam a áreas de miométrio e endométrio, locais nos quais os uMCs se encontravam.

Para realizar estas colorações os cortes histológicos foram desparafinados em xilol durante 45 minutos, hidratados em álcoois de concentrações decrescentes, lavados em água corrente e água destilada. A seguir seguiu-se o protocolo específico para cada corante:

- Hematoxilina e eosina

As lâminas contendo os cortes histológicos foram imersas em hematoxilina de Harris durante 1 minuto e 30 segundos, lavadas em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos, sendo logo após imersas em Eosina-floxina durante 1 minuto e 30 segundos e lavadas em água corrente rapidamente.

- Azul de Toluidina

As lâminas foram imersas em tampão fosfato citrato pH 3,0 durante 5 minutos. Após isso, as lâminas foram coradas em Azul de Toluidina 0,5% em tampão fosfato citrato pH 3,0 durante 3 minutos, depois do qual foram lavadas rapidamente no tampão fosfato citrato.

- Coloração de Pearl

As lâminas foram incubadas numa mistura de ferrocianeto de potássio 0,5%, ácido clorídrico 1% e triton X-100 1% durante 30 minutos. Depois as lâminas foram lavadas rapidamente em 5 trocas de água destilada e contracoradas com rápido vermelho nuclear por 3 minutos. Finalmente as lâminas foram lavadas rapidamente em 3 trocas de água destilada.

Para montagem das lâminas, estas foram desidratadas em álcoois de concentrações crescentes, durante um minuto cada e depois mergulhadas em xilol por 30 minutos. As lâminas foram montadas usando lamínula e goma de Damar.

As imagens representativas foram capturadas usando um microscópio de luz Leica DM500 conectado a uma câmera digital Leica ICC50; ou com escâner de lâminas Aperio AT Turbo scanner (Leica Biosystems Imaging).

4.7. Avaliação das artérias espiraladas

Lâminas contendo cortes histológicos de sítios de implantação 12dG corados com H&E foram digitalizadas em escâner Aperio ScanScope AT Turbo. As artérias espiraladas foram identificadas na decídua basal e as áreas correspondentes à área da parede e do lúmen arterial foram delimitadas e mensuradas usando o *software* Aperio ImageScope versão 12.3.3. Foi calculada a razão entre a área da parede e o lúmen das artérias e foi feita a média das medições nos sítios de implantação de cada fêmea. Uma razão parede/lúmen aumentada significaria que as artérias apresentam parede mais espessa e/ou lúmen reduzido e, portanto, remodelamento arterial comprometido.

4.8. Mensuração de camadas uteroplacentárias

Lâminas contendo cortes histológicos de sítios de implantação de 8 e 12dG e placentas de 19dG (corados com H&E) foram digitalizadas usando um escâner Aperio ScanScope AT Turbo (Leica Biosystems). Depois, com auxílio da ferramenta “*brush tool*” do *software* QuPath (BANKHEAD *et al.*, 2017), foram delimitadas: a decídua em sítios de implantação de 8dG e as camadas uteroplacentárias MLAp, decídua e trofoblasto em sítios de implantação de 12dG para determinação da área das mesmas, como é mostrado no esquema da figura 4. Devido a que neste período gestacional a zona juncional apresenta uma área muito pequena, por motivos práticos a zona juncional e de labirinto foram mensuradas em conjunto e nomeadas como camada de trofoblasto. Em placentas de 19dG as camadas da decídua, zona juncional e labirinto foram delimitadas e mensuradas como indicado na figura 4.

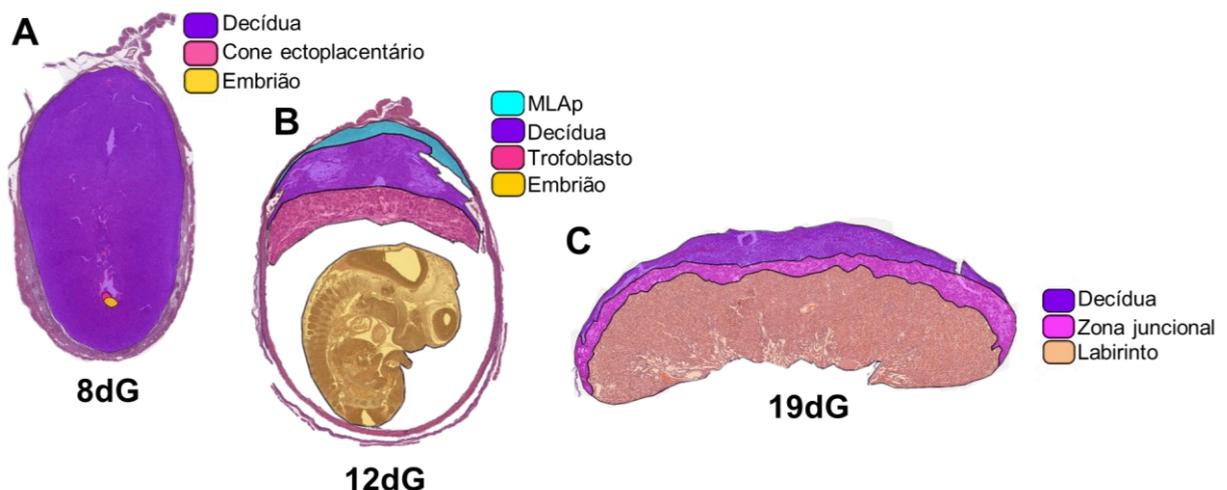


Figura 4. Esquema para delimitação de camadas uteroplacentárias. (A) Sítio de implantação de 8 dias de gestação mostrando a área ocupada pela decídua na qual se encontra implantado o embrião e o cone ectoplacentário que dará origem à placenta. (B) Sítio de implantação de 12 dias de gestação mostrando a delimitação das camadas uteroplacentárias e o embrião em desenvolvimento. (C) Placenta de 19 dias de gestação mostrando a delimitação das camadas decídua, zona juncional e labirinto.

4.9. Avaliação dos espaços vasculares na camada de labirinto

Cortes de placentas de 19dG coradas com H&E foram utilizados para a estimativa da área dos espaços vasculares na camada de labirinto como descrito previamente (NERES *et al.*, 2008). Para isso, 3 campos microscópicos de cada placenta foram capturados aleatoriamente das regiões laterais e media da camada de labirinto. Posteriormente, as imagens foram analisadas com o *software* Image J (NIH, Bethesda, MA, USA), no qual um procedimento de análise de luz automatizado onde a remoção de ruído foi aplicada, para assim garantir a padronização de cor e qualidade de imagem em todos os cortes. Então, foi usado um *threshold* de cor para cobrir a área correspondente ao lúmen dos vasos sanguíneos. A cobertura da área do espaço sanguíneo foi determinada como a razão entre o número de pixels cobertos pela área definida pelo *threshold* e, o número total de pixels na imagem. Os resultados foram expressos como a média da percentagem da área do espaço sanguíneo nas imagens em cada placenta.

4.10. Histoquímica para marcação de células NK uterinas

Cortes de tecidos uterinos de fêmeas com 8dG e 12dG foram desparafinizados, hidratados e lavados em água corrente e água destilada. Depois, a peroxidase endógena foi bloqueada incubando-se os cortes com peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente; após uma lavagem em PBS os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados usando BSA 1% em PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Feito isso, os cortes foram lavados em PBS e incubados a 4 °C *overnight* com a lectina da aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) biotinilada (1:150; L6533, Sigma Aldrich) diluída em PBS. No dia seguinte, após duas lavagens em PBS, os cortes foram incubados com complexo avidina-biotina (kit ABC, Vector Laboratories) diluído 1:100 em PBS durante 30 minutos em câmara úmida a 37 °C. As lâminas foram lavadas duas vezes em PBS, a reação foi revelada adicionando uma solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich, D5637)

contendo peróxido de hidrogênio. Posteriormente, foi feita a contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 4 segundos e a montagem das lâminas. Finalmente, as lâminas foram digitalizadas e, usando o *software* Aperio ImageScope (Leica Biosystems), regiões da decídua mesometrial foram delimitadas para estimação da área de análise. As células foram quantificadas usando a ferramenta “*counter tool*” do *software*. Os resultados são expressados como a média do número de células por mm².

4.11. Imunohistoquímica para detecção de alfa actina de musculo liso (α -SMA)

Cortes histológicos de sítios de implantação a 12dG foram desparafinizados, hidratados e submetidos à recuperação antigênica incubando os cortes em tampão citrato (pH 6,0) em forno micro-ondas por 7 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3% por 30 min. As seções foram lavadas em PBS e os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados usando BSA 1% em PBS por 30 min, seguido de incubação *overnight* a 4 °C com anticorpo anti- α -SMA produzido em camundongo (Santa Cruz, sc-32251) diluído 1:500 em PBS. Posteriormente, as seções de tecido foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-camundongo produzido em cabra (Sigma Aldrich, B7151) a 37 °C por 1 h para posteriormente serem incubadas com complexo avidina-biotina-peroxidase (1:100; kit ABC, Vector Laboratories) a 37 °C durante 30 minutos. A reação foi revelada com DAB (Sigma Aldrich, D5637) diluída em PBS contendo peróxido de hidrogênio. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e montadas com resina Dammar.

Imagens digitalizadas da decídua foram extraídas usando o *software* QuPath e analisadas com o *software* Image J Fiji. Após aplicar a ferramenta “*Color deconvolution*” (opção do vetor “H DAB”), a área de α -SMA detectada foi quantificada na janela “*Color 2*” (transformando a imagem em escala de cinzas e depois ajustando o *threshold*) e normalizada pela área da decídua analisada.

4.12. Mensuração da área de hemozoína em tecidos uteroplacentários

A hemozoína é um pigmento parasitário que se deposita em forma de cristais no vacúolo digestivo do parasito e que tem a propriedade de desviar a luz polarizada,

sendo evidenciada como acúmulos birrefringentes quando observados com microscopia de polarização (BURNETT; CARNS; RICHARDS-KORTUM, 2015).

No presente trabalho, a hemozoína foi detectada em cortes teciduais corados com H&E, usando um microscópio Nikon Eclipse Ti-5 com filtro de luz polarizada. Para isso, 3 campos microscópicos da decídua (8dG e 12dG) ou da camada de labirinto (19dG) por sitio de implantação foram capturados aleatoriamente usando objetivo de 20X de aumento. Estas camadas foram escolhidas para realizar a análise devido a que foram as que apresentavam uma maior área para avaliação nos períodos gestacionais indicados.

A área ocupada pela hemozoína nas imagens foi quantificada usando o *software* Image J Fiji, transformando as imagens em escalas de cinzas e depois ajustando o *threshold*. Os resultados foram expressados como percentagem da área média ocupada pela hemozoína em relação à área total das imagens.

4.13. Análise dos níveis de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA)

Para obtenção dos homogenatos de tecidos, amostras de sítios de implantação de 8dG inteiros, sítios de implantação de 12dG (sem o embrião) e amostras de placenta de 19dG foram utilizados. Os tecidos foram homogeneizados em 5 mM de EDTA diluído em PBS, contendo coquetel inibidor de proteases cOmplete™, Mini, EDTA-free (Roche, 11836170001), usando um homogeneizador Turrax T10 (IKA Works GmbH & Co. KG-Staufen) numa proporção de 200 mg de tecido a cada mL de tampão. As amostras foram depois centrifugadas a 3000 ×g por 30 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram coletados, aliquotados para a realização de distintas análises e armazenados a -80 °C até o uso.

Os níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF e IFN- γ foram mensurados usando um kit de CBA (Mouse Th1/Th2/Th17 CBA kit, BD Biosciences, 560485) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram processadas em citômetro FACSCanto II Flow Cytometer (BD, Biosciences) e os dados analisados usando o *software* FACSDiva (BD Biosciences). Os limites de detecção teóricos (pg/mL) para as citocinas dosadas com este método são: IL-2 0,1; IL-4 0,03; IL-6 1,4; IL-10 16,8; IL-17A 0,8; TNF 0,9; IFN- γ 0,5.

A concentração proteica total foi determinada pelo ensaio BCA (Thermo Fisher Scientific, 23225) foi empregada para a normalização dos resultados obtidos a partir dos homogenatos de tecidos.

4.14. Avaliação dos níveis de TGF- β por ELISA

As concentrações de TGF- β foram quantificadas em amostras de soro e homogenatos de tecidos usando um kit de ELISA sanduiche seguindo as instruções do fabricante (DY1679; R&D Systems). O limite de detecção para este ensaio foi de 15,6 pg/mL.

4.15. Quantificação de ferro em tecidos uteroplacentários

O ferro foi quantificado em tecidos por meio de dois métodos. Primeiro, foi mensurada a área ocupada pelo ferro em toda a extensão dos cortes histológicos corados com Prussian blue e posteriormente digitalizados. Para isso, as imagens dos cortes foram capturadas usando o *software* QuPath e analisadas com o *software* Image J Fiji, quantificando a coloração azul mediante o uso do *threshold* de cor. Os resultados foram normalizados pela área total do corte histológico.

O segundo método utilizado foi a mensuração dos níveis de ferro em sobrenadantes de homogenatos de tecido, gerados como descrito acima, usando um kit comercial para dosagem de ferro (Labtest Diagnóstica S.A. Belo Horizonte, MG, Brazil) seguindo as instruções do fabricante e normalizando o resultado com a concentração proteica dos sobrenadantes.

4.16. Mensuração dos níveis de heme

A quantificação dos níveis de heme em soro e tecidos uteroplacentários foi realizada de acordo ao método descrito previamente (HUY *et al.*, 2005), usando 1-Step™ Turbo TMB (Thermo Fisher Scientific, 34022), uma mistura de TMB e peróxido de hidrogênio estabilizado que permite a detecção do heme devido a sua atividade pseudoperoxidase. Para extrapolar as concentrações do heme nas amostras, foi construída uma curva padrão usando hemina (Sigma Aldrich) com concentrações entre 2,5 e 0,039 μ M.

As amostras (1:50) e pontos da curva foram diluídos na proporção de 1:50 em 1% BSA / Hepes 20 mM em PBS 20 mM. Depois, em microplacas de 96 poços foram adicionados 10 μ L de amostra ou padrão, seguidos de 40 μ L do reagente Turbo TMB que foram incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando 50 μ L de ácido sulfúrico 2M, para finalmente realizar a leitura a 450 nm em leitora de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular

Devices). Os resultados de heme no tecido foram normalizados com a dosagem de proteínas totais nos homogenatos.

4.17. Teste de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica em amostras de útero/placenta foi medida de acordo com o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Amostras de homogenatos de tecido foram incubadas com uma mistura de ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 0,67% por 2 horas a 40 °C, em seguida foi adicionado *n*-butanol e misturado em vortex. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 ×g por 15 min, a fase superior foi coletada e a fluorescência foi mensurada a 515 nm (excitação) e 553 (emissão) em leitora de microplacas (Molecular Devices). A percentagem de peroxidação lipídica foi calculada conforme descrito anteriormente (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2021).

4.18. Dosagem de hemoglobina e glicose

Os níveis de glicose no soro e os níveis de hemoglobina no sangue materno (sangue coletado da cauda no momento da eutanásia) foram mensurados usando kits comerciais seguindo as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica S.A).

4.19. Análise da expressão de mRNA

A extração de RNA foi realizada utilizando amostras de tecido congeladas de útero ou placenta. Estas amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido para depois serem homogeneizadas em 1000 µL de Trizol e incubadas 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 300 µl de clorofórmio e as amostras foram agitadas durante 15 segundos, incubadas durante 3 minutos e centrifugadas a 12,000 ×g por 15 minutos a 4 °C. Após isso, a fase aquosa (superior) foi transferida para um tubo novo, no qual 500 µL de isopropanol foram adicionados. Esta mistura foi incubada durante 10 minutos para depois ser centrifugada a 12000 ×g por 10 minutos a 4 °C. Seguidamente, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 1000 µl de etanol 75% diluído em água Milli-Q. Após agitação manual por 10 segundos as amostras foram centrifugadas 10,000 ×g por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o pellet de RNA foi ressuspendido em 60 µL de água DPEC. A concentração de RNA foi determinada mensurando-se a absorbância a 260 nm em um espectrofotômetro GeneQuant (GE, USA). As amostras

foram tratadas com DNase (DNase I, 18068015, Invitrogen – USA) e transcritas em cDNA, utilizando 1 µg de RNA e transcriptase reversa (SuperScript™ II) para a síntese da cadeia de cDNA. Todas as amostras foram submetidas a reações para detecção de mRNA para GAPDH, o qual foi utilizado como controle positivo da amplificação. A reação de PCR quantitativa (qPCR) foi realizada na máquina de PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) usando o corante fluorescente SYBR *green* (Invitrogen – USA) seguindo as instruções do fabricante. Os primers foram desenhados usando o *software* Prime Express. Os dados da expressão gênica foram analisados em relação ao gene GAPDH usando o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As sequências de primers usados para a amplificação dos genes foram as seguintes: HO-1 Fw 5'-GCTGGTGATGGCTTCCTTGT-3', Rv 5'-GTGGGGCATAGACTGGGTTCT-3'; IL-15 Fw 5'- TGCTGTGTTTGGGAAGGCTG-3', Rv 5'- TAGGCTGGTTATCTGCTGAC-3'; GAPDH Fw 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG-3', Rv 5'-CAGTGTAGCCCAAGATGCCC-3'.

4.20. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 7.0. Os dados de parasitemia foram analisados aplicando o teste Two-way ANOVA para dados com pós-teste de comparação múltipla Bonferroni. Diferenças entre 3 ou mais grupos foram analisadas usando o teste One-way para dados paramétricos ou Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn, respectivamente. Da mesma maneira, diferenças entre dois grupos foram evidenciadas aplicando teste *t* para dados paramétricos ou teste Mann-Whitney para dados não paramétricos. Além disso, foram realizadas análises de correlação Pearson para dados paramétricos e Spearman para dados não paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Além disso, foram elaborados gráficos de radar mostrando o perfil de produção de citocinas nos tecidos, utilizando o *software* Microsoft Excel.

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos da infecção por *P. berghei* ANKA no início da gestação

Com o objetivo de caracterizar as alterações produzidas no período inicial da gestação, quando camundongos BALB/c são infectados com PbA, foi utilizado o desenho experimental descrito previamente neste documento e que é resumido na figura 5A. As fêmeas foram infectadas no dia da detecção do tampão vaginal e eutanasiados com 8dG/7dl, tendo grupos de animais 8dG/NI e NG/NI como controle.

Em primeiro lugar, foi verificado que camundongos do grupo 8dG/7dl apresentam níveis de parasitemia semelhantes a camundongos NG/7dl aos 3, 5 e 7 dias de infecção (Fig. 5B). Além disso, foi encontrado que a infecção induziu uma redução significativa nos níveis de hemoglobina (Fig. 5C) e glicose (Fig. 5D) maternos em animais 8dG/7dl em relação a animais 8dG/NI ($p=0,0068$ e $p=0,0101$; respectivamente) e também em relação a NG/NI ($p=0,0015$ e $p=0,0060$; respectivamente), mostrando assim que a infecção é capaz de induzir anemia e hipoglicemia. Da mesma maneira, a análise dos níveis de TGF- β no soro dos animais mostrou que os camundongos 8dG/7dl apresentam menores níveis dessa citocina em comparação com camundongos 8dG/NI ($p=0,0011$) e camundongos NG/NI ($p=0,0005$) (Fig. 5E).

Ao examinar os sítios de implantação embrionária de animais com 8dG, não se observaram diferenças em relação ao número total de sítios de implantação em cada fêmea (Fig. 5F), seja a mesma infectada ou não. Porém, quando os sítios de implantação foram classificados em normais e anormais se constatou que os animais 8dG/7dl apresentaram um aumento significativo na proporção de sítios anormais (hemorrágicos ou necróticos) em relação ao grupo 8dG/NI ($p=0,0161$), sendo muito frequente encontrar sangramento vaginal no momento da eutanásia de camundongos 8dG/7dl (Fig. 5G,H). A análise de cortes histológicos dos sítios de implantação corados com H&E revelou que sítios de implantação de fêmeas infectadas apresentam decíduas de tamanho reduzido ($p < 0,0001$) (Fig. 5I) e que enquanto os animais 8dG/NI apresentaram embriões saudáveis e tecido decidual normal, cujas células são grandes, com núcleo oval, cromatina de aspecto pontilhado e citoplasma eosinofílico, os animais 8dG/7dl exibiram hemorragia intrauterina e necrose decidual, com células vacuolizadas, núcleos picnóticos e hemácias infectadas infiltradas no tecido (Fig. 5J). Estes resultados apontam que embora o período de implantação

embrionária (~5dG) coincide com a ascensão nos níveis de parasitemia neste estudo (Fig. 5B), a infecção parece não ter induzido falhas consideráveis na quantidade de embriões implantados e sim na necrose decidual.

Levando-se em consideração estudos prévios que mostram a importância dos uMCs e das células uNK para a manutenção da gestação (MEYER *et al.*, 2017a; MEYER *et al.*, 2017b) e que a atividade da HO-1 parece estar diretamente associada com a presença das células uNK (LINZKE *et al.*, 2014), foi quantificada a quantidade destas células em cortes histológicos submetidos à coloração com azul de toluidina e histoquímica usando lectina DBA. Embora não foram encontradas diferenças no que se refere ao número de uMCs ($p=0,8548$) (Fig. 5K,L), observou-se uma diminuição significativa no número de células uNK nos animais 8dG/7dl quando comparados com animais 8dG/NI ($p=0,0031$) (Fig. 5M,N). Sendo que IL-15 é uma citocina essencial para a diferenciação das células uNK (ASHKAR *et al.*, 2003; MEYER *et al.*, 2017b), foi analisada a expressão de mRNA para essa citocina em tecido uterino por qPCR. Os resultados revelaram que a expressão de IL-15 é induzida durante gestação ($p=0,0489$), pois animais 8dG/NI expressaram em média 4 vezes mais IL-15 quando comparados com animais NG/NI. Os animais 8dG/7dl expressaram 1,7 vezes menos IL-15 do que os animais 8dG/NI, embora sem diferença estatística (Fig. 5O).

Estes resultados indicam que no modelo utilizado no presente estudo, a infecção de camundongos gestantes BALB/c com PbA no início da gestação, leva a alterações perceptíveis em parâmetros maternos e ao comprometimento do sucesso gestacional.

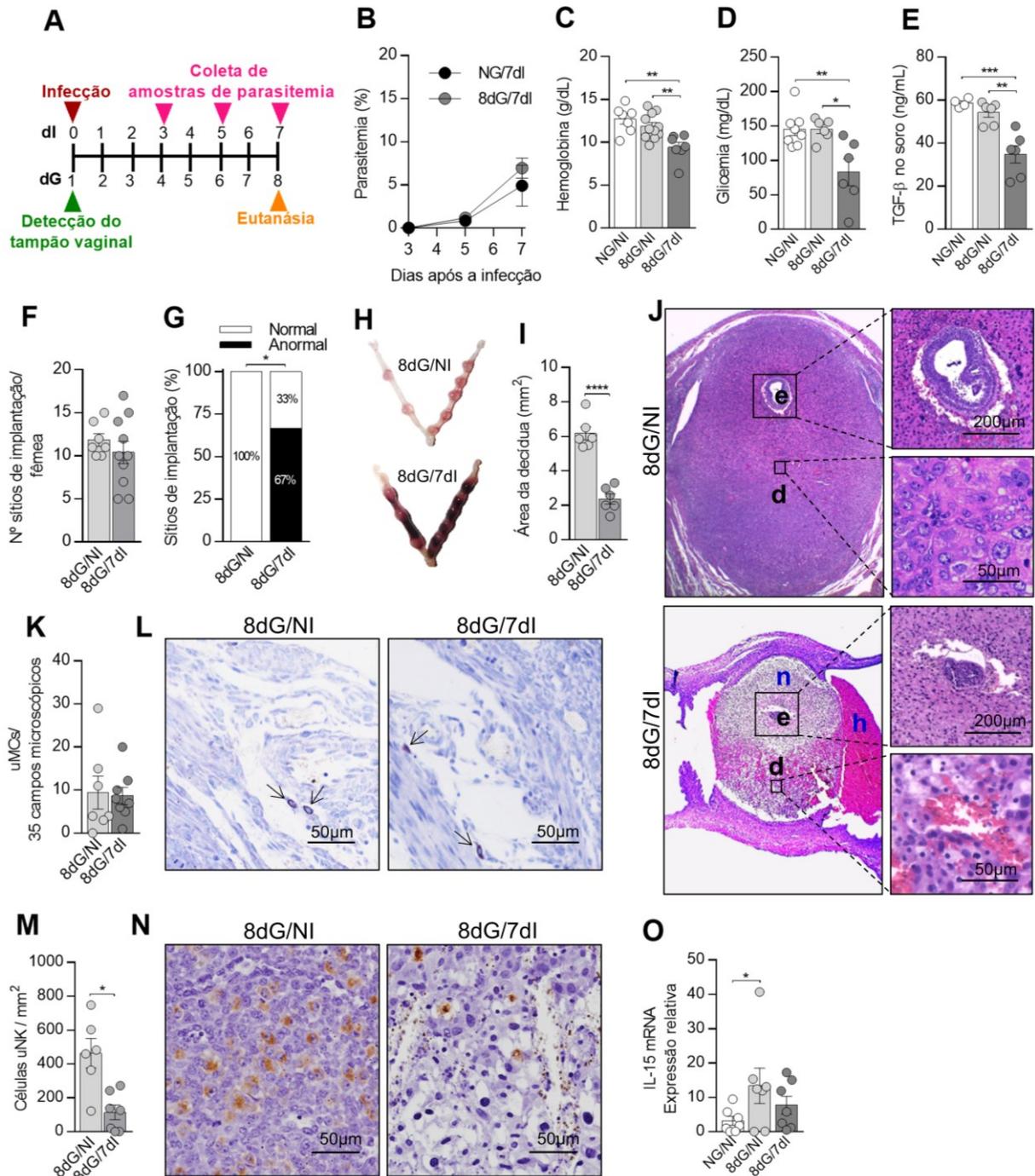


Figura 5. Alterações induzidas pela malária no início da gestação. (A) Desenho experimental: camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA por via i.p. no dia da detecção do tampão vaginal. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para quantificação da parasitemia aos 3, 5 e 7 dias após a infecção. As fêmeas foram eutanasiadas aos 8 dias de gestação para coleta de amostras de soro e tecido que foram utilizadas para o restante das análises. (B) Parasitemia quantificada por citometria de fluxo. (C) Níveis de hemoglobina maternos. (D) Níveis séricos de glicose maternos. (E) Níveis de TGF-β no soro mensurados por ELISA. (F) Número de sítios de implantação por fêmea. (G) Percentagem de sítios de implantação normais e anormais. (H) Imagem macroscópica representativa dos cornos uterinos. (I) Área ocupada pela decídua nos sítios de

implantação. (J) Fotomicrografias representativas de cortes de sítios de implantação corados com H&E, nas quais d: decídua, e: embrião, n: necrose, h: hemorragia. (K) Quantificação de mastócitos uterinos (uMCs). (L) Fotomicrografias representativas de cortes de sítios de implantação corados com azul de toluidina, mostrando uMCs (setas). (M) Número de células NK uterinas (uNK) por área. (N) Fotomicrografias representativas de cortes de sítios de implantação submetidos a histoquímica usando lectina DBA, mostrando a distribuição de células uNK na decídua mesometrial. (O) Análise de expressão de mRNA para IL-15 no útero. Animais com 8dG/NI e NG/NI foram utilizados como controle quando foi considerado apropriado. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo. Os dados foram analisados pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (B), One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (C,D,E,N,O), teste t (F,I,K,M) ou teste de Mann-Whitney (G). NG: não gestante, NI: não infectado, dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.2. Efeitos da infecção por *P. berghei* ANKA na metade da gestação

O período médio da gestação foi avaliado de acordo com o desenho experimental esquematizado na figura 6A. De acordo com este esquema, fêmeas no 5 dia de gestação foram infectadas e eutanasiadas com 12dG/7dl.

De maneira semelhante ao observado no início da gestação, camundongos do grupo 12dG/7dl apresentam níveis de parasitemia similares a camundongos NG/7dl (Fig. 6B), assim como também menores níveis de hemoglobina ($p=0,0233$) (Fig. 6C) e glicose ($p=0,0004$) (Fig. 6D) quando comparados com os camundongos do grupo 12dG/NI. Do mesmo modo, ao avaliar os níveis de TGF- β no soro materno, se detectaram menores concentrações em camundongos do grupo 12dG/7dl em relação ao grupo 12dG/NI ($p=0,0003$) (Fig. 6E) de maneira semelhante ao início da gestação no qual os níveis séricos da citocina diminuíram em decorrência da infecção.

A discriminação entre sítios de implantação normais e anormais revelou que os camundongos do grupo 12dG/NI apresentavam em média 22% de sítios anormais, sendo que os animais do grupo 12dG/7dl apresentaram uma maior proporção de sítios de implantação anormais, 51% ($p=0,0430$) (Fig. 6F), mostrando que a infecção afetou o sucesso gestacional neste período.

Ao analisar cortes histológicos dos sítios de implantação aos 12dG, foi constatado um desenvolvimento normal em sítios de implantação de animais do grupo 12dG/NI, mas não foram observadas grandes alterações histológicas decorrentes da infecção no grupo 12dG/7dl. Embora ao examinar área de trofoblasto, especificamente a camada de labirinto, foi possível observar uma tendência a ter espessamento da membrana interhemal nos camundongos do grupo 12dG/7dl (Fig.

6G). Para estudar melhor os efeitos da infecção na formação da placenta corioalantóidea, foram mensuradas as áreas ocupadas pelas camadas uteroplacentárias presentes neste período gestacional. No entanto, não foram observadas diferenças relevantes nas áreas da decídua (Fig. 6H), trofoblasto (Fig. 6I) ou MLAp (Fig. 6J) das fêmeas, independentemente de estarem infectadas ou não.

O remodelamento das artérias espiraladas que se inserem na decídua é um processo que ocorre na metade da gestação. Ao ser induzida a morte das células musculares lisas que formam parte da túnica média arterial, estes vasos passam a possuir uma alta capacidade e baixa resistência, conseguindo fornecer um fluxo sanguíneo adequado para a unidade feto-placentária (BROSENS; ROBERTSON; DIXON, 1967; CARTWRIGHT *et al.*, 2010). Com a finalidade de avaliar o remodelamento das artérias espiraladas na infecção por malária na gestação, foi mensurada a área da parede arterial e dividida pela área do lúmen arterial. Desta maneira, artérias pouco remodeladas terão uma parede mais espessa e um lúmen reduzido, portanto terão uma razão parede/lúmen aumentada; enquanto que artérias remodeladas terão paredes finas e lúmen distendido gerando uma razão parede/lúmen reduzida. De fato, os resultados revelaram que existe uma maior razão parede/lúmen nos camundongos 12dG/7dl em relação aos animais do grupo 12dG/NI ($p=0,0378$) (Fig. 6K,L). Para confirmar esta observação foi realizada imunomarcagem para detecção de α -SMA, um marcador de células musculares lisas presentes nas artérias não remodeladas. A quantificação desta marcação mostrou que existe uma maior expressão de α -SMA na decídua de camundongos do grupo 12dG/7dl quando comparados com o grupo 12dG/NI ($p=0,0177$) (Fig. 6M,N), o que estaria indicando que a infecção induz falhas no remodelamento arterial que poderiam afetar o sucesso gestacional.

Como foi descrito previamente neste trabalho, uMCs e células uNK têm sido relacionados com o apropriado remodelamento das artérias espiraladas (MEYER *et al.*, 2017a; MEYER *et al.*, 2017b). Então, estas células foram quantificadas para verificar se um desequilíbrio na proporção das mesmas poderia estar causando a falhas de remodelamento arterial no modelo de malária gestacional utilizado. As quantidades de uMCs (Fig. 6O,P) e de células uNK (Fig. 6Q,R) foram semelhantes nos grupos de animais gestantes independentemente de estarem infectados ou não. Isto poderia indicar que estas células não estão envolvidas na falta de remodelamento

arterial ou que estas células apesar de se encontrarem em números semelhantes estão expressando moléculas de maneira diferente.

Estes resultados sinalizam que a infecção por PbA é capaz de provocar importantes alterações durante no período médio da gestação em camundongos da linhagem BALB/c, sendo que algumas destas alterações também foram observadas no período inicial da gestação. Contudo, existiram certas diferenças em relação ao início da gestação e que poderiam estar relacionadas aos diferentes tipos de resposta imune que caracterizam ambos períodos.

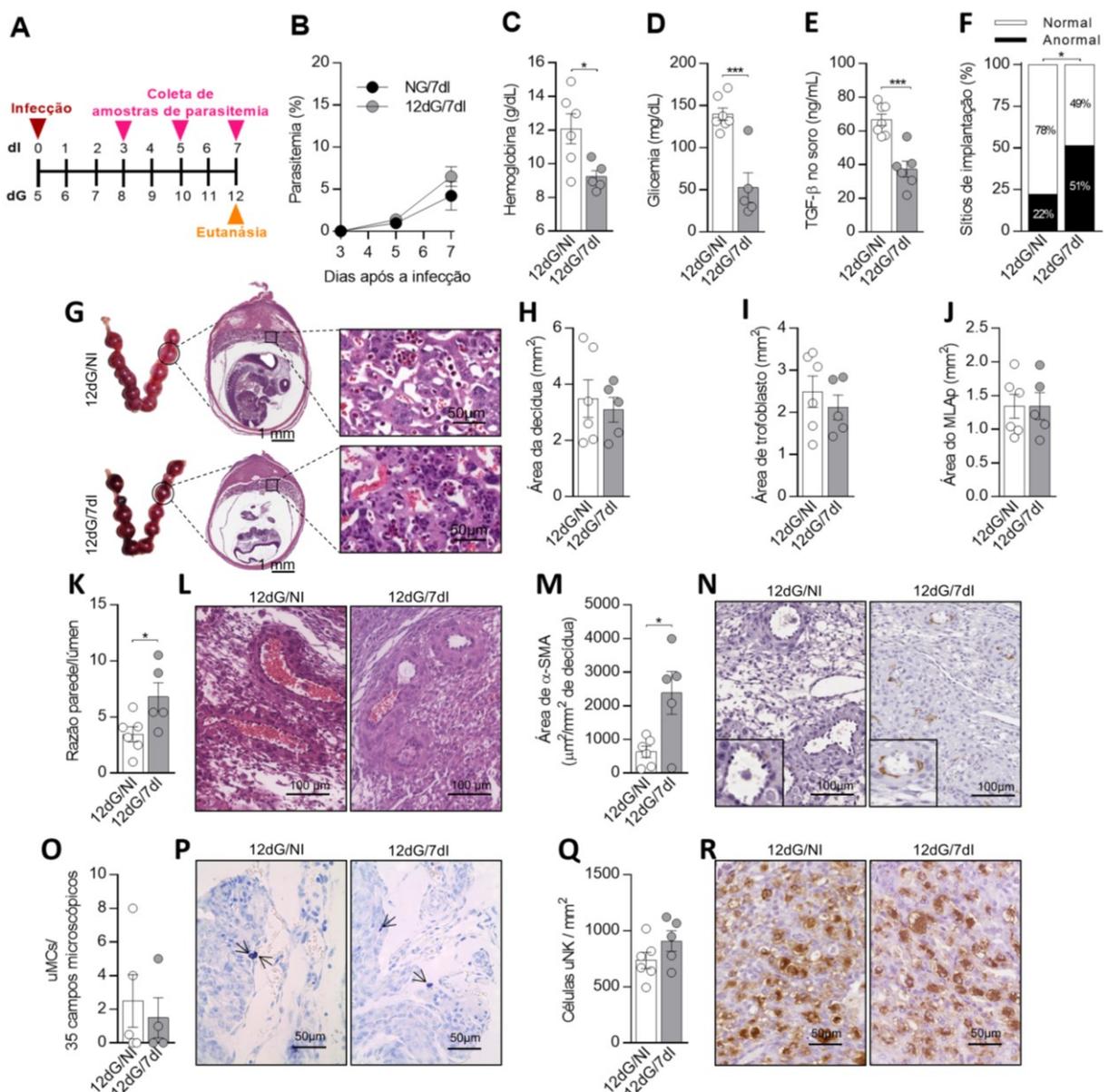


Figura 6. Alterações induzidas pela malária na metade da gestação. (A) Desenho experimental: camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA por via i.p. no 5º dia de gestação. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para quantificação da

parasitemia aos 3, 5 e 7 dias após a infecção. As fêmeas foram eutanasiadas aos 12 dias de gestação para coleta de amostras de soro e tecido que foram utilizadas para o restante das análises. (B) Parasitemia quantificada por citometria de fluxo. (C) Níveis de hemoglobina maternos. (D) Níveis séricos de glicose maternos. (E) Níveis de TGF- β no soro mensurados por ELISA. (F) Percentagem de sítios de implantação normais e anormais. (G) Imagem macroscópica representativa dos cornos uterinos (esquerda) e microscópica representativa de cortes de sítios de implantação de 12dG corados com H&E com maximização de campos correspondentes à camada de labirinto da placenta em formação (direita). (H) Quantificação da área ocupada pela decídua. (I) Quantificação da área ocupada pelo trofoblasto (camada juncional + labirinto). (J) Quantificação da área ocupada pelo MLAp. (K) Análise morfométrica de artérias espiraladas: razão da área da parede / área do lúmen. (L) Imagens representativas das artérias espiraladas em cortes de sítios de implantação corados com H&E. (M) Quantificação da área de α -SMA na decídua. (N) Imagens representativas da imunohistoquímica para detecção de α -SMA. (O) Quantificação de mastócitos uterinos (uMCs). (P) Imagens representativas de cortes de sítios de implantação corados com azul de toluidina, mostrando uMCs (setas). (Q) Número de células NK uterinas (uNK) por área. (R) Imagens representativas de cortes de sítios de implantação submetidos a histoquímica usando lectina DBA, mostrando a distribuição de células uNK na decídua. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo. Os dados foram analisados pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (B), teste t (C,D,E,F,H,I,J,K,M,O,Q). NG: não gestante, NI: não infectado, dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

5.3. Efeitos da infecção por *P. berghei* ANKA no período final da gestação

O impacto da infecção por PbA no final da gestação de camundongos BALB/c foi avaliado seguindo o esquema representado na figura 7A. Os animais foram infectados aos 12dG e eutanasiados 7 dias depois, com 19dG/7dl.

Foi observado que no 7º dia de infecção, camundongos do grupo 19dG/7dl apresentaram níveis médios de parasitemia maiores do que animais NG/7dl, embora sem diferenças estatisticamente significativas (Fig. 7B). Isto sugere que os camundongos parecem ser mais suscetíveis a atingirem maiores parasitemias quando a infecção acontece neste período, o qual é diferente ao que ocorre em períodos gestacionais prévios mostrados no presente estudo.

De maneira semelhante aos resultados do início e metade da gestação, foi constatado que a infecção levou a menores níveis de hemoglobina (Fig. 7C) ($p=0,0490$) e glicose (Fig. 7D) ($p < 0,0001$) nos camundongos 19dG/7dl em relação ao grupo 19dG/NI. Por outro lado, ao verificar os níveis séricos de TGF- β , não se observaram diferenças relevantes entre os grupos 19dG/NI e 19dG/7dl (Fig. 7E).

Ao examine dos cornos uterinos observou-se que camundongos do grupo 19dG/NI apresentaram uma média de 22% de sítios de implantação anormais, a mesma percentagem apresentada pelos animais do grupo 12dG/NI, o qual indica que os sítios anormais observados no final da gestação provavelmente são reabsorções espontâneas que se produziram na metade da gestação. Em contraste camundongos do grupo infectado 19dG/7dl apresentaram uma média de 32% de sítios de implantação anormais. Quando comparadas as percentagens de sítios de implantação anormais destes grupos (19dG/NI e 19dG/7dl) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 7F,G), sugerindo que a infecção por PbA parece não induzir perda fetal significativa no final da gestação, ao menos com o desenho experimental utilizado no presente estudo, provavelmente pelo fato de que a elevação da parasitemia coincide com o 17º dia da gestação no qual os fetos que não sofreram reabsorção espontânea previamente se encontram plenamente formados e em processo de crescimento. Não obstante, a infecção levou a uma pronunciada restrição do peso fetal dos filhotes de mães infectadas em relação aos filhotes extraídos de mães não infectadas aos 19 dias de gestação ($p < 0,0001$) (Fig. 7H,I), sem alteração significativa no peso das placentas (Fig. 7J,K). Para investigar melhor se, apesar de não haver redução no peso das placentas, existia algum desequilíbrio na proporção das camadas placentárias, a área das mesmas foi mensurada e comparada entre os grupos. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no tamanho da decídua (Fig. 7L), zona juncional (Fig. 7M) nem labirinto (Fig. 7N) dos grupos 19dG/NI e 19dG/7dl.

O espessamento da barreira placentária na camada de labirinto e consequente redução dos espaços vasculares disponíveis para realizar as trocas entre a mãe e o feto em desenvolvimento tem sido uma característica previamente descrita em modelos de malária na gestação (BARATEIRO *et al.*, 2019). Com a finalidade de verificar se este fenômeno estaria se reproduzindo no modelo utilizado no presente trabalho, foi realizada a análise dos espaços vasculares em imagens capturadas da região de labirinto na placenta dos animais em estudo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação a este parâmetro (Fig. 7O,P).

Os resultados descritos acima mostram como a infecção por *Plasmodium* é capaz de alterar parâmetros associados à saúde materna, assim como afetar o curso e resultado da gestação dependendo do período gestacional no qual ocorre a gestação.

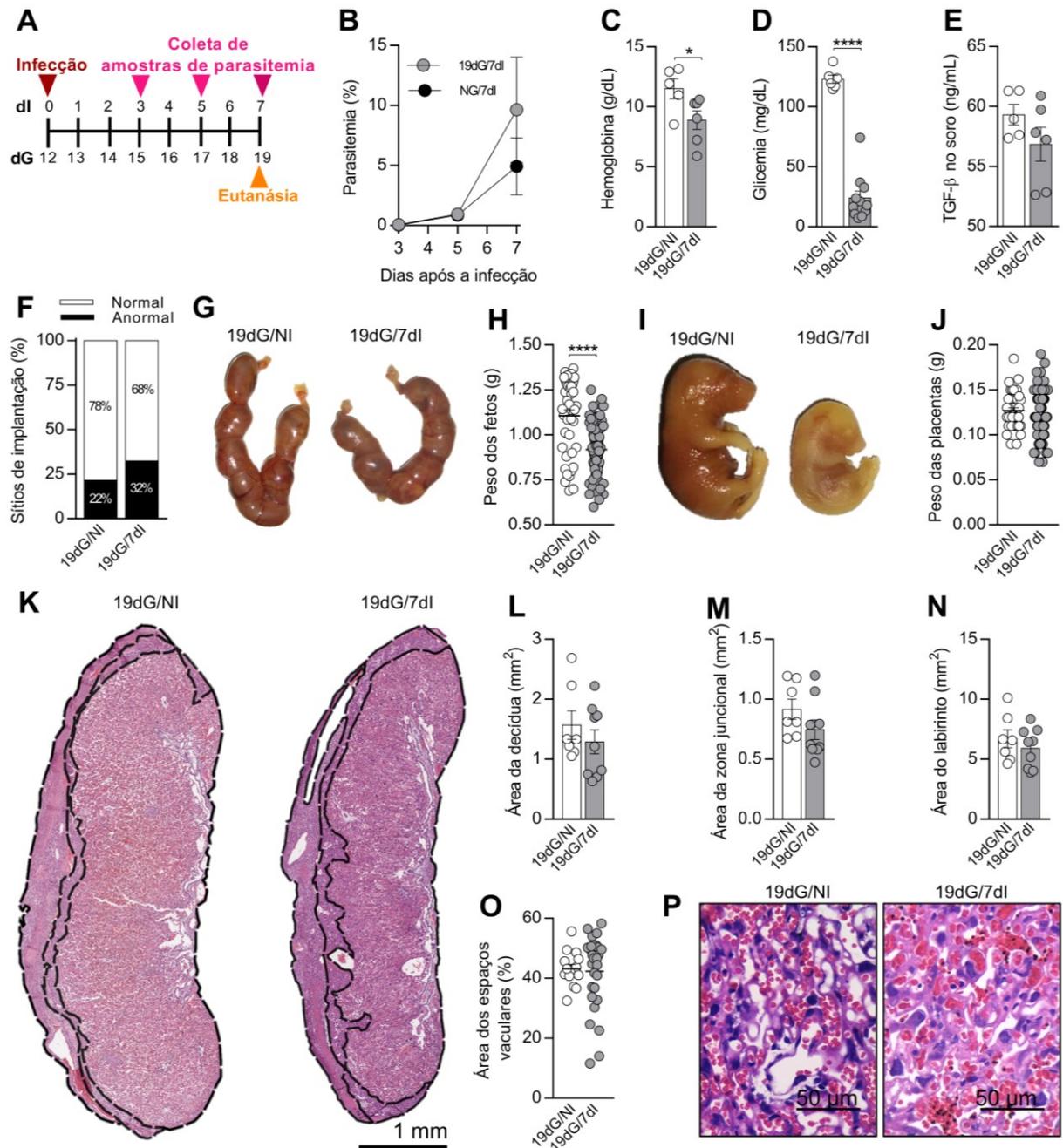


Figura 7. Alterações induzidas pela malária no período final gestacional. (A) Desenho experimental: camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA por via i.p. no 12º dia de gestação. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para quantificação da parasitemia aos 3, 5 e 7 dias após a infecção. As fêmeas foram eutanasiadas aos 19 dias de gestação para coleta de amostras de soro e tecido que foram utilizadas para o restante das análises. (B) Parasitemia quantificada por citometria de fluxo. (C) Níveis de hemoglobina maternos. (D) Níveis séricos de glicose maternos. (E) Níveis de TGF-β no soro mensurados por ELISA. (F) Percentagem de sítios de implantação normais e anormais. (G) Imagem macroscópica representativa dos cornos uterinos. (H) Peso fetal. (I) Imagem macroscópica representativa dos fetos. (J) Peso placentário. (K) Imagens representativas de cortes de placentas de 19dG corados com H&E, as áreas

das camadas placentárias estão delimitadas com linhas tracejadas. (L) Quantificação da área ocupada pela decídua. (M) Quantificação da área ocupada pela zona juncional. (N) Quantificação da área ocupada pelo labirinto. (O) Análise dos espaços vasculares na camada de labirinto. (P) Imagens representativas da camada de labirinto em cortes de placenta corados com H&E. Animais com 19dG/NI foram utilizados como controle. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo, com exceção dos gráficos H,J e O, nos quais cada ponto representa um feto ou uma placenta de maneira individual. Os dados foram analisados pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (B), teste t (C,D,E,F,J,M,N) ou teste de Mann-Whitney (H,L,O). NG: não gestante, NI: não infectado, dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$.

5.4. Análise de expressão de mRNA da HO-1 e deposição de ferro na interface materno-fetal em resposta à infecção

Com a finalidade de determinar qual poderia ser o papel da HO-1 neste período gestacional, os níveis de mRNA para a expressão da enzima em tecido de útero/placenta foram analisados por qPCR. Os dados mostraram que a enzima é induzida na gestação, sendo que camundongos do grupo 8dG/NI apresentou uma maior expressão da enzima em comparação com NG/NI ($p=0,0019$). Também foi observado um aumento significativo nos níveis de expressão da enzima no grupo 8dG/7dl quando comparado com o grupo de animais 8dG/NI ($p=0,0315$) e NG/NI ($p=0,0060$). Ao avaliar os níveis de expressão para HO-1 na metade da gestação, não se observaram diferenças entre os grupos infectado e não infectado neste período gestacional. A análise da expressão de transcritos para HO-1 na placenta aos 19dG mostrou que a infecção levou a uma elevação na expressão de mRNA de HO-1 no grupo 19dG/7dl em relação à sua contraparte não infectada, o grupo 19dG/NI ($p=0,0252$) (Fig. 8A). Os níveis de mRNA de HO-1 foram 3,7 e 1,9 vezes maiores em camundongos infectados quando avaliados no início e no final da gestação, respectivamente, em relação aos controles gestantes não infectados desses tempos gestacionais (Fig. 8A).

A fim de pesquisar qual seria o impacto da expressão de HO-1 nas concentrações de ferro em tecidos uteroplacentários, a marcação para este produto do catabolismo do heme foi mensurada em cortes histológicos corados com o método de Pearl. Os resultados demonstraram que os níveis de ferro foram maiores em animais do grupo 8dG/7dl quando comparados com o grupo 8dG/NI ($p=0,0137$) (Fig. 8B,C). Não se observaram mudanças na deposição de ferro em resposta à infecção nos

períodos médio e final da gestação (Fig. 8B,D,E). Estes dados sugerem que o aumento na deposição de ferro no início da gestação pode estar relacionado ao aumento do mRNA de HO-1 na interface materno fetal.

Então, com a finalidade de investigar se os efeitos adversos da malária na gestação estariam diretamente associados à alta expressão de HO-1 ou se, pelo contrário, estas alterações estariam sendo produzidas devido a que os níveis de HO-1 não estão sendo produzidos em quantidades suficientes para revertê-los, no presente estudo fêmeas gestantes infectadas nos três períodos da gestação (inicial, médio e final) foram tratadas com o indutor (CoPPiX), o inibidor (ZnPPIX) da enzima ou com veículo como controle.

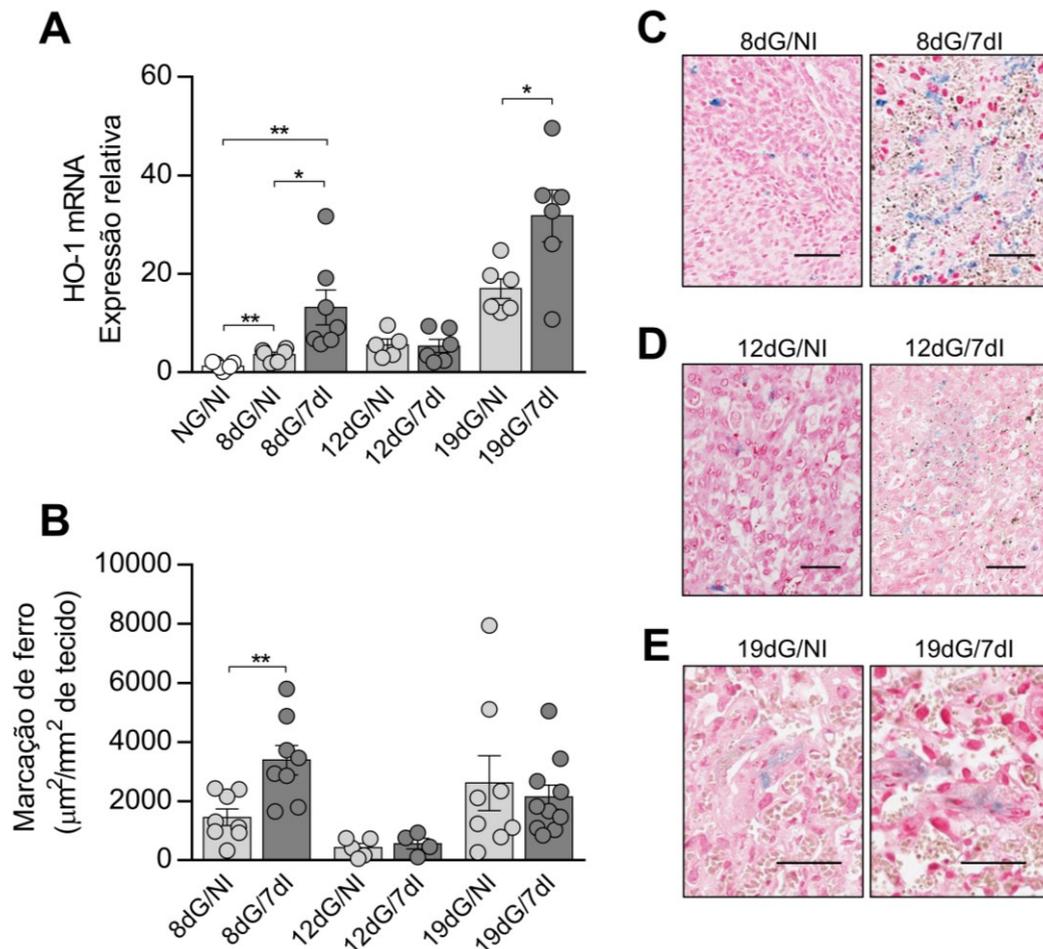


Figura 8. Expressão de mRNA de HO-1 e deposição de ferro em tecidos da interface materno-fetal. Camundongos BALB/c inoculados com 5×10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA por via i.p. em três diferentes períodos da gestação. (A) Análise de expressão de mRNA para HO-1 em útero/placenta por qPCR. (B) Quantificação da marcação para detecção de ferro por área em cortes histológicos de útero/placenta corados com Prussian blue. (C,D,E) Fotomicrografias representativas da

coloração de Prussian blue para detecção de ferro, evidenciada pela cor azul. Barra de escala: 50 μ m. Tecidos de animais dos grupos NG/NI, 8dG/NI, 12dG/NI e 19dG/NI foram utilizados como controle. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo. Os dados foram analisados pelo teste t. NG: não gestante, NI: não infectado, dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

5.5. Efeitos dos tratamentos com o inibidor ou indutor da HO-1 em camundongos gestantes e não infectados

Antes de iniciar os experimentos em camundongos gestantes infectados, foram realizados experimentos em camundongos gestantes não infectados para averiguar se os tratamentos e as doses utilizadas afetariam alguns parâmetros maternos bem como o sucesso gestacional e assim comprovar a segurança das drogas (CoPPIX e ZnPPIX) e do veículo. Para isso, foram aplicados desenhos experimentais esquematizados na figura 9A.

Os níveis de hemoglobina foram mensurados em animais gestantes dos três períodos gestacionais em estudo e foi verificado que não houve diferenças neste parâmetro independentemente se os animais foram tratados com CoPPIX, ZnPPIX ou veículo. Além disso, os níveis de hemoglobina foram similares aos de animais gestantes não infectados (Fig. 9B). Quanto aos níveis de glicose sérico, ao longo da gestação estes foram semelhantes àqueles observados em animais gestantes não tratados e não se observaram diferenças entre os grupos, com exceção de um aumento da glicemia no grupo 8dG/NI/ZnPPIX em relação ao grupo 8dG/NI/CoPPIX ($p=0,0325$) (Fig. 9C).

A proporção de sítios normais e anormais foi avaliada e não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ao longo da gestação independentemente do tratamento recebido pelos animais. Além disso, os resultados dos animais tratados em cada período gestacional foram semelhantes aos seus respectivos controles gestantes não infectados e não tratados (Fig. 9D). Também foi analisado o número de sítios de implantação totais por cada fêmea e foi notado que apesar de uma tendência a haver menos sítios de implantação em camundongos do grupo 8dG/NI/ZnPPIX, não existiram diferenças notáveis entre os grupos tratados com CoPPIX, ZnPPIX ou veículo (Fig. 9E). Do mesmo modo, foram avaliados os pesos fetais (Fig. 9F) e placentários (Fig. 9G) em animais de 19dG/NI sem encontrar diferenças estatísticas

entre os grupos, sendo os mesmos similares aos pesos fetais e placentários de animais gestantes não infectados e não tratados.

Baseado nestes resultados é possível inferir que os tratamentos administrados na dosagem e tempos indicados no presente trabalho são inofensivos para a mãe e não afetam significativamente o resultado da gestação em camundongos BALB/c. Portanto os efeitos induzidos pelos tratamentos em animais gestantes infectados seriam o resultado de interações específicas produzidas durante a infecção.

Como neste trabalho foram apresentadas as alterações induzidas pela infecção por PbA ao longo da gestação, daqui em diante o grupo controle das análises será o grupo gestante infectado e tratado com veículo, na investigação dos efeitos da indução ou inibição da HO-1 no resultado da gestação em animais infectados. A média dos resultados apresentados pelos animais gestantes, não infectados e não tratados (8dG/NI, 12dG/NI ou 19dG/NI) será mostrada como uma linha tracejada nos gráficos.

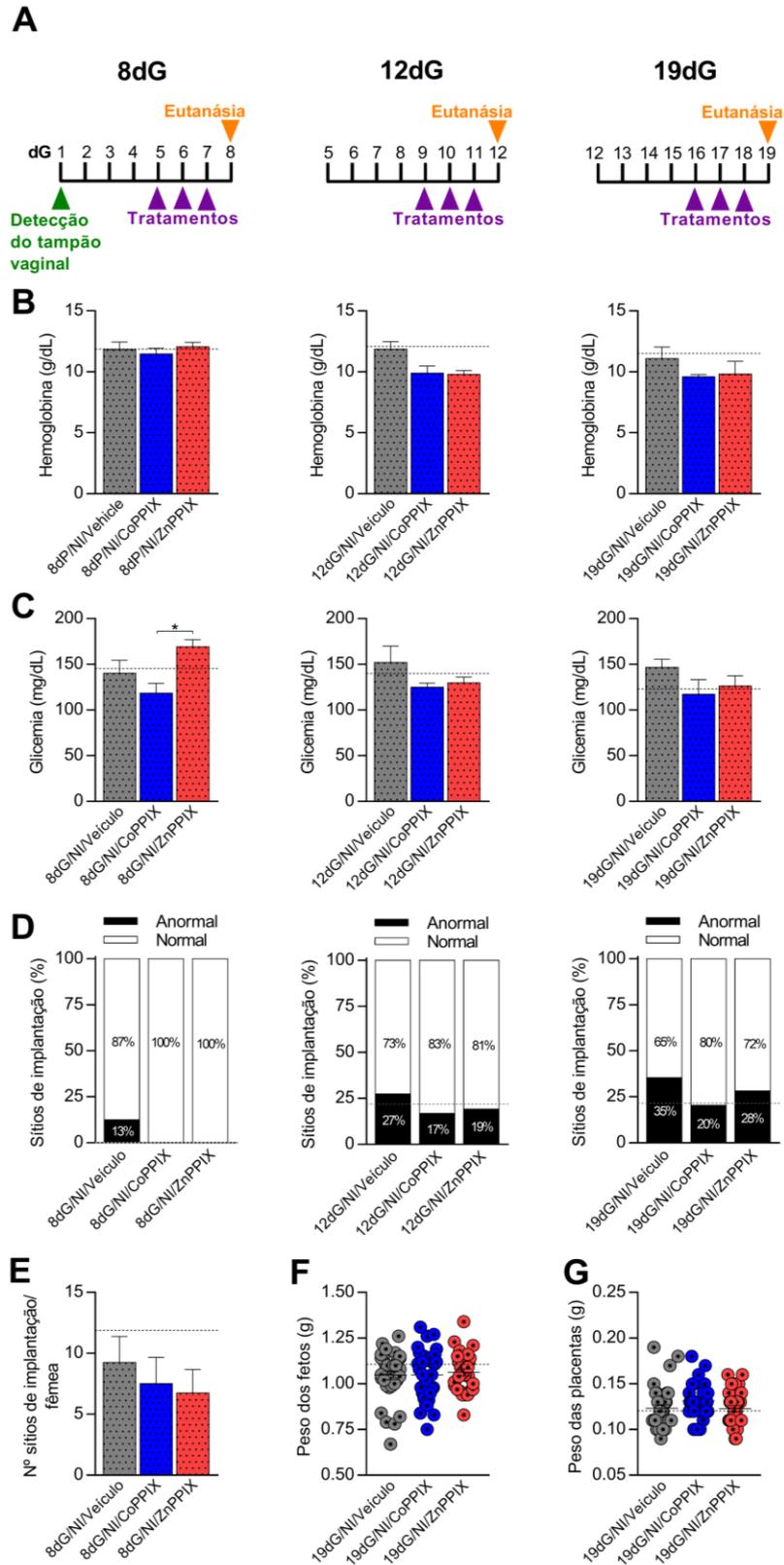


Figura 9. Avaliação do efeito dos tratamentos com inibidor e indutor da HO-1 em animais gestantes não infectados. (A) Desenho experimental: camundongos BALB/c gestantes não infectados foram eutanasiados aos 8, 12 e 19 dias de gestação. Os tratamentos com CoPPiX, ZnPPiX ou veículo foram administrados nos 3 dias prévios a eutanásia. (B) Níveis de hemoglobina maternos. (C) Níveis séricos de glicose maternos. (D) Percentagem de sítios de implantação normais e anormais. (E)

Número de sítios de implantação por fêmea. (G) Peso fetal, cada ponto representa a medida de um feto. (I) Peso placentário, cada ponto representa a medida de uma placenta. As linhas tracejadas indicam a média do grupo gestante não infectado e não tratado em cada período gestacional (8dG/NI, 12dG/NI, 19dG/NI) e para cada parâmetro avaliado. N=4 animais por grupo. Os dados são representados como pela média + erro padrão da média e foram analisados pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (B,C,F,G) ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (D,E). NI: não infectado, dG: dias de gestação. *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$.

5.6. Avaliação do efeito da indução e inibição de HO-1 no início da gestação

Com a finalidade de pesquisar qual é o papel de HO-1 na malária durante o início da gestação, camundongos gestantes infectados foram utilizados seguindo o esquema descrito na figura 10A. Os camundongos foram infectados no primeiro dia da gestação, tratados no 5º, 6º e 7º dia de gestação e eutanasiados no 8º dia de gestação.

A análise da parasitemia revelou que camundongos de ambos os grupos 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0467$) e 8dG/7dl/ZnPPIX ($p=0,0109$) exibiram menores proporções de hemácias infectadas no sangue quando comparados com o controle 8dG/7dl/Veículo (Fig. 10B).

A fim de se estudar quais seriam os efeitos dos tratamentos no parasitismo tecidual na interface materno-fetal neste período gestacional, foi quantificada a área ocupada pela hemozoína em imagens de cortes histológicos capturadas usando microscopia de polarização, devido à propriedade deste pigmento parasitário de desviar a luz polarizada. Como pode ser observado na figura 10C e 10M, apenas o tratamento com inibidor de HO-1 (ZnPPIX) levou a uma diminuição na deposição de hemozoína na decídua dos sítios de implantação em relação ao grupo tratado com veículo ($p=0,0045$). Da mesma forma, os camundongos do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX apresentaram maiores níveis de hemoglobina em relação aos animais 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0122$) (Fig. 10D); bem como maiores concentrações de glicose sérica em comparação com os grupos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0279$) e 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0080$) (Fig. 10E). Por outro lado, os resultados dos níveis séricos de TGF- β que foram menores em relação aos animais gestantes não infectados, sendo que o grupo 8dG/7dl/CoPPIX apresentou níveis menores quando comparado com os grupos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0187$) e 8dG/7dl/ZnPPIX ($p=0,0102$) (Fig. 10F).

Os animais gestantes infectados apresentaram semelhantes números de sítios de implantação por cada fêmea independentemente do tratamento administrado (Fig.

10G). Quando estes sítios de implantação foram classificados em normais e anormais foi encontrado que camundongos dos grupos 8dG/7dl/Veículo e 8dG/7dl/CoPPIX mostraram altas taxas de sítios anormais (86 e 79%, respectivamente). De maneira interessante, camundongos do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX tiveram uma menor proporção de sítios anormais em comparação com os animais 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0334$) (Fig. 10H,M). Em concordância, a avaliação histológica dos sítios de implantação revelou que na maioria dos animais dos grupos 8dG/7dl/Veículo e 8dG/7dl/CoPPIX apresentaram hemorragias intrauterinas, abundantes hemácias infectadas espalhadas no tecido decidual em necrose (Fig. 10M). Ao contrário, na maioria dos animais do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX observaram-se sítios de implantação sem alterações histológicas importantes (Fig. 10M). De fato, camundongos do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX apresentaram maiores áreas deciduais quando comparado com os grupos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0035$) e 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0441$) (Fig. 10I).

Quanto ao número de uMCs, este não foi alterado independentemente do grupo experimental (Fig. 10J,M). No entanto, foi observado que camundongos do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX apresentaram maiores números de células uNK em relação a animais 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0019$) e 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0028$) (Fig. 10K,M). Além disso, camundongos 8dG/7dl/ZnPPIX apresentaram menor deposição de ferro nos sítios de implantação quando comparado com os animais 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0163$) (Fig. 10L,M).

Estes resultados apontam uma importante melhora no curso da gestação, quando camundongos no início da gestação são infectados e tratados com o inibidor de HO-1. Por conseguinte, é possível que a alta expressão de HO-1 causada pela infecção seja prejudicial no início da gestação, sendo que as alterações observadas são parcialmente revertidas pelo tratamento com ZnPPIX. No cenário contrário, o tratamento com indutor da HO-1 durante a infecção no mesmo período da gestação não levou a nenhuma melhoria nos parâmetros verificados no presente trabalho.

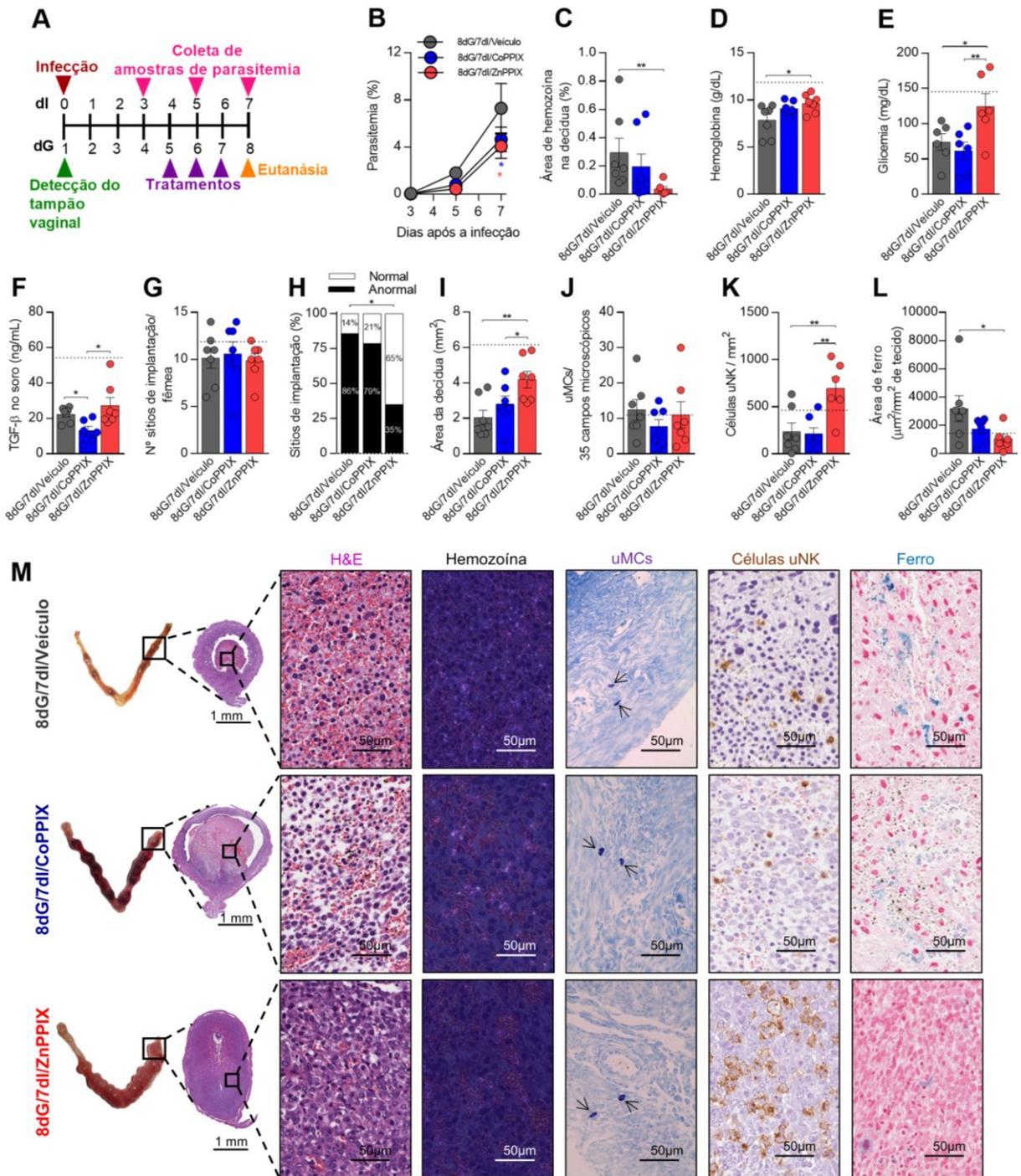


Figura 10. Avaliação da indução e inibição de HO-1 na malária durante o início da gestação. (A) Desenho experimental: camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA por via i.p. no dia da detecção do tampão vaginal. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para quantificação da parasitemia aos 3, 5 e 7 dias após a infecção. Os tratamentos com CoPPIX, ZnPPiX ou veículo foram administrados nos 3 dias prévios a eutanásia. As fêmeas foram eutanasiadas aos 8 dias de gestação para coleta de amostras de soro e tecido que foram utilizadas para o restante das análises. (B) Parasitemia quantificada por citometria de fluxo. (C) Percentagem da área ocupada pela hemozoína na decidua. (D) Níveis de hemoglobina maternos. (E) Níveis séricos de glicose maternos. (F) Níveis de TGF-β no soro mensurados por ELISA. (G) Número de sítios de

implantação por fêmea. (H) Percentagem de sítios de implantação normais e anormais. (I) Área ocupada pela decídua nos sítios de implantação. (J) Quantificação de mastócitos uterinos (uMCs). (K) Número de células NK uterinas (uNK) por área. (L) Quantificação da marcação para detecção de ferro por área. (M) Imagens representativas (de esquerda para direita) dos cornos uterinos, mostrando o aspecto dos sítios de implantação; dos sítios de implantação corados com H&E, mostrando ampliações de campos microscópicos da decídua; da decídua usando microscopia de polarização para evidenciar deposição de hemozoína; do miométrio corado com azul de toluidina para detecção de uMCs, apontados com setas; da decídua submetida a histoquímica para marcação de células uNK; da decídua em cortes corados com Prussian blue para detecção de ferro, evidenciada pela cor azul. As linhas tracejadas indicam a média do grupo gestante não infectado e não tratado para este período gestacional (8dG/NI) em para cada parâmetro avaliado. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo. Os dados foram analisados pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (B), One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (D,E,G,I,J,K) ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (C,F,H,L). dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

5.7. Avaliação do efeito da indução e inibição de HO-1 na metade da gestação

Com o intuito de investigar qual é o papel da HO-1 na malária durante a metade da gestação, camundongos gestantes infectados foram utilizados seguindo o esquema descrito na figura 11A. Os camundongos foram infectados no quinto dia da gestação, tratados no 9º, 10º e 11º dia de gestação e eutanasiados no 12º dia de gestação.

A análise da parasitemia mostrou que camundongos tratados com o indutor da HO-1 (12dG/7dl/CoPPIX) apresentaram uma parasitemia média semelhante àqueles camundongos tratados apenas com veículo. De maneira notável, camundongos tratados com o inibidor da HO-1 (12dG/7dl/ZnPPIX) exibiram menores níveis de parasitemia no 7º dia de infecção quando comparado com o grupo 12dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0416$) (Fig. 11B). Do mesmo modo, ao avaliar a deposição da hemozoína em tecido decidual observaram-se níveis comparáveis de acúmulo desse pigmento parasitário nas decíduas de camundongos dos grupos 12dG/7dl/CoPPIX e 12dG/7dl/Veículo. Embora sem diferença estatisticamente significativa, os animais do grupo 12dG/7dl/ZnPPIX tiveram uma tendência a ter menor deposição decidual de hemozoína quando comparado com 12dG/7dl/CoPPIX e 12dG/7dl/Veículo (Fig. 11C).

Enquanto os níveis de hemoglobina no grupo 12dG/7dl/ZnPPIX foram maiores em relação ao grupo 12dG/7dl/Veículo ($p=0,0339$) (Fig. 11D), as concentrações de glicose (Fig. 11E) e TGF- β no soro materno (Fig. 11F) não foram restaurados

independentemente do tratamento utilizado nos camundongos infectados neste período gestacional. No entanto, a avaliação do aspecto dos sítios de implantação revelou que fêmeas dos grupos 12dG/7dl/Veículo e 12dG/7dl/CoPPIX mostraram uma alta proporção de sítios de implantação anormais, enquanto que o grupo 12dG/7dl/ZnPPIX apresentou uma menor proporção em relação a ambos grupos ($p=0,0496$ e $p=0,0425$, respectivamente) (Fig. 11G,H). Ao analisar a área ocupada pelas camadas uteroplacentárias, foi encontrado que estas foram semelhantes entre os grupos independentemente do tratamento utilizado (Fig. J-L).

Em relação às contagens de uMCs e células uNK, foi observado que o número de uMCs foi reduzido em camundongos do grupo 12dG/7dl/ZnPPIX em relação às fêmeas do grupo 12dG/7dl/Veículo ($p=0,0427$) (Fig. 11M,P), ao mesmo tempo que as células uNK se elevaram em fêmeas do grupo 12dG/7dl/CoPPIX quando comparadas com 12dG/7dl/Veículo ($p=0,0161$) (Fig. 11N,P). Em conclusão, durante a metade da gestação a indução da HO-1 durante a infecção levou a um aumento no número de células uNK enquanto que a inibição durante a infecção levou à diminuição dos uMCs. Contudo, as alterações nestas populações não levaram a um melhor remodelamento das artérias espiraladas, como foi evidenciado pela imunomarcação de α -SMA (Fig. 11P). Por último, ao quantificar a deposição de ferro nos sítios de implantação, não foram encontradas diferenças entre os grupos independentemente do tratamento utilizado (Fig. 11O,P).

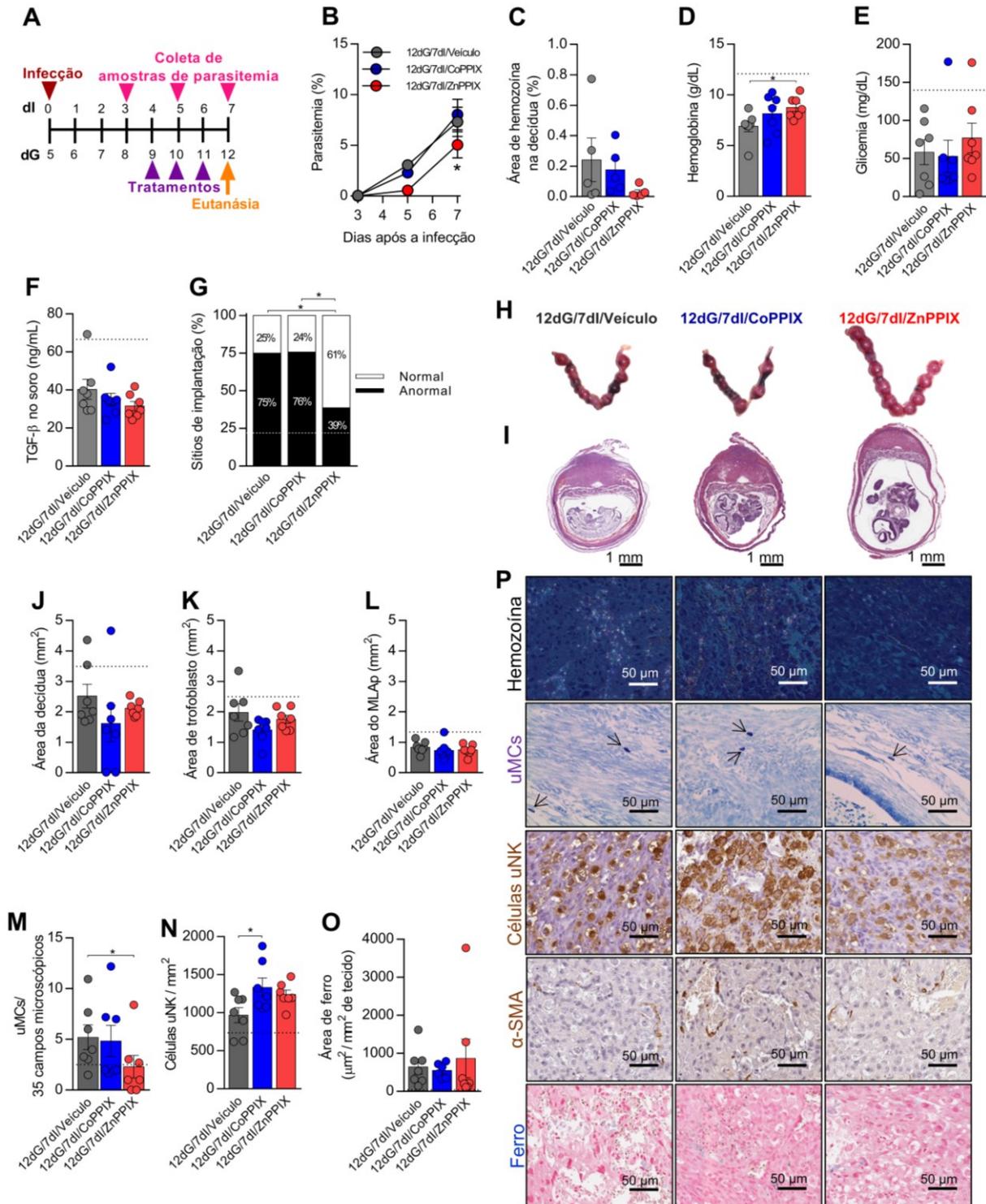


Figura 11. Avaliação da indução e inibição de HO-1 na malária durante a metade da gestação.

(A) Desenho experimental: camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA por via i.p. no quinto dia de gestação. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para quantificação da parasitemia aos 3, 5 e 7 dias após a infecção. Os tratamentos com CoPPIX, ZnPPIX ou veículo foram administrados nos 3 dias prévios a eutanásia. As fêmeas foram eutanasiadas aos 12 dias de gestação para coleta de amostras de soro e tecido que foram utilizadas

para o restante das análises. (B) Parasitemia quantificada por citometria de fluxo. (C) Percentagem da área ocupada pela hemozoína na decídua. (D) Níveis de hemoglobina maternos. (E) Níveis séricos de glicose maternos. (F) Níveis de TGF- β no soro mensurados por ELISA. (G) Percentagem de sítios de implantação normais e anormais. (H) Imagens representativas dos cornos uterinos, mostrando o aspecto dos sítios de implantação. (I) Imagens representativas dos sítios de implantação corados com H&E. (J) Quantificação da área ocupada pela decídua. (K) Quantificação da área ocupada pela zona juncional. (L) Quantificação da área ocupada pelo labirinto. (M) Quantificação de mastócitos uterinos (uMCs). (N) Numero de células NK uterinas (uNK) por área. (O) Quantificação da marcação para detecção de ferro por área. (P) Imagens microscópicas representativas, mostrando (de cima para abaixo) a decídua usando microscopia de polarização para evidenciar deposição de hemozoína; do miométrio corado com azul de toluidina para detecção de uMCs, apontados com setas; da decídua submetida a histoquímica para marcação de células uNK; da decídua em cortes corados com Prussian blue para detecção de ferro, evidenciada pela cor azul. As linhas tracejadas indicam a média do grupo gestante não infectado e não tratado para este período gestacional (12dG/NI) em para cada parâmetro avaliado. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo. Os dados foram analisados pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (B), One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (C,D,E,F,J,K,L,N) ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (G,M,O). dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$.

5.8. Avaliação da indução e inibição de HO-1 na malária durante o final da gestação

Finalmente, para avaliar o papel da HO-1 na malária durante o final da gestação, o esquema representado na figura 12A foi utilizado. As fêmeas no 12º dia de gestação foram infectadas, posteriormente tratadas com CoPPIX, ZnPPIX ou veículo nos 3 dias prévios à eutanásia que foi feita no 19º dia de gestação.

No final da gestação não foi observada nenhuma alteração na parasitemia dos camundongos tratados com o indutor ou o inibidor da HO-1, quando comparados com o veículo (Fig. 12B). Além disso, não foi observada uma alteração significativa na deposição de hemozoína na placenta desses animais (Fig. 12C,D). Da mesma maneira, não se observaram diferenças entre os grupos ao avaliar os níveis de hemoglobina (Fig. 12E) e glicemia maternos (Fig. 12F). Quanto aos níveis de TGF- β no soro materno, estes foram mais elevados no grupo 19dG/7dl/ZnPPIX em relação ao grupo 19dG/7dl/Veículo ($p=0,0440$) (Fig. 12G).

O exame dos cornos uterinos no momento da eutanásia mostrou que os animais apresentaram uma proporção semelhante de sítios de implantação normais e anormais independentemente do tratamento utilizado (Fig. 12H,I). Do mesmo modo, o peso placentário permaneceu imutável entre as condições experimentais (Fig. 12J),

entretanto, o peso fetal foi maior em fetos de mães infectadas que receberam tratamento inibidor da HO-1. O peso destes fetos foi maior em comparação aos fetos de mães infectadas que receberam tratamento com CoPPIX ($p=0,0035$) ou veículo ($p<0,0001$) (Fig. 12K).

Quanto aos espaços vasculares na camada de labirinto, os grupos de estudo apresentaram resultados semelhantes (Fig. 12L,M). O mesmo aconteceu ao avaliar a área das camadas placentárias decídua (Fig. 12N), zona juncional (Fig. 12O) e labirinto (Fig. 12P), bem como a deposição de ferro em tecido placentário (Fig. 12Q,R), os camundongos apresentaram resultados comparáveis nestes parâmetros independentemente do tratamento administrado.

Em suma, estes resultados mostram que, apesar da expressão do mRNA de HO-1 no modelo utilizado neste trabalho para o estudo da malária no final da gestação, a modulação farmacológica da enzima não levou a alterações significativas nos efeitos adversos da infecção no curso final da gestação; principalmente quando se considera a indução da enzima, a qual não levou a melhoras em relação aos animais tratados com veículo. O tratamento com o inibidor da HO-1 levou a leve melhora, restrita à manutenção do peso fetal e aos níveis de TGF- β no soro materno.

Resumindo os achados descritos acima, na medida que a gestação avança, a modulação da HO-1 se torna menos eficiente em contrabalançar os efeitos adversos induzidos pela infecção durante a gestação. Com o objetivo de pesquisar possíveis mecanismos envolvidos nestes resultados, foram mensuradas diferentes moléculas no soro materno e na interface materno-fetal dos camundongos.

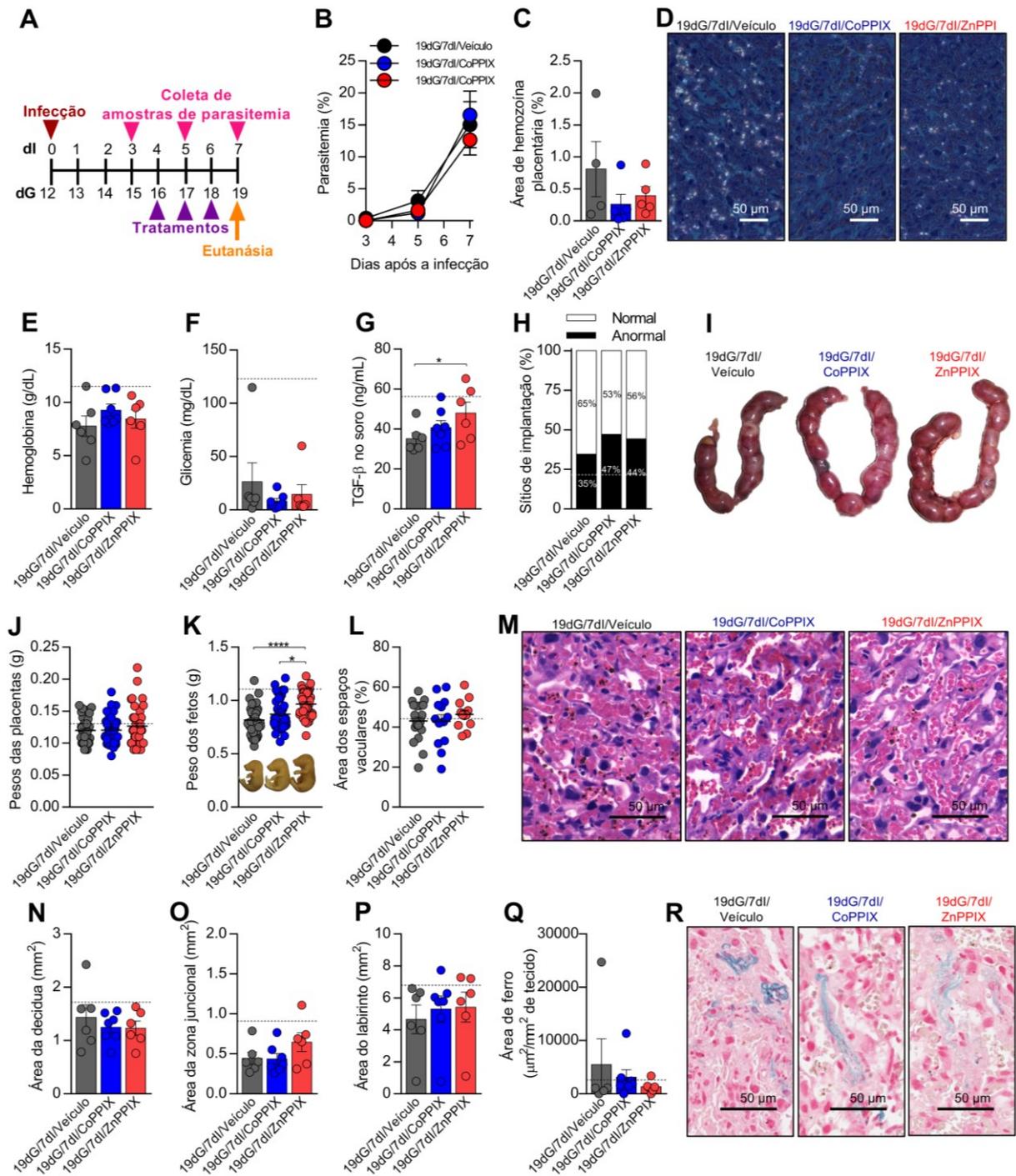


Figura 12. Avaliação da indução e inibição de HO-1 na malária no final da gestação. (A) Desenho experimental: camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 hemácias infectadas com *P. berghei* ANKA por via i.p. no 12º dia de gestação. Amostras de sangue da cauda foram coletadas para quantificação da parasitemia aos 3, 5 e 7 dias após a infecção. Os tratamentos com CoPPIX, ZnPPIX ou veículo foram administrados nos 3 dias prévios a eutanásia. As fêmeas foram eutanasiadas aos 19 dias de gestação para coleta de amostras de soro e tecido que foram utilizadas para o restante das análises. (B) Parasitemia quantificada por citometria de fluxo. (C) Percentagem da área ocupada pela hemozoína na placenta. (D) Imagens representativas usando microscopia de polarização para evidenciar deposição de hemozoína na camada de labirinto. (E) Níveis de hemoglobina maternos. (F)

Níveis séricos de glicemia maternos. (G) Níveis de TGF- β no soro mensurados por ELISA. (H) Percentagem de sítios de implantação normais e anormais. (I) Imagem macroscópica representativa dos cornos uterinos. (J) Peso placentário. (K) Peso fetal e imagens macroscópicas representativa dos fetos. (L) Análise dos espaços vasculares na camada de labirinto. (M) Imagens representativas da camada de labirinto em cortes de placenta corados com H&E. (N) Quantificação da área ocupada pela decídua. (O) Quantificação da área ocupada pela zona juncional. (P) Quantificação da área ocupada pelo labirinto. (Q) Quantificação da marcação para detecção de ferro por área, em cortes de placenta corados com Prussian blue. (R) Imagens representativas da coloração de Prussian blue para detecção de ferro, evidenciada pela cor azul. As linhas tracejadas indicam a média do grupo gestante não infectado e não tratado para este período gestacional (19dG/NI) em para cada parâmetro avaliado. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo, com exceção dos gráficos J,K e L, nos quais cada ponto representa um feto ou uma placenta de maneira individual. Os dados foram analisados pelo teste Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (B), One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (E,G,H,K,L,N,O,P) ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (C,F,J,Q). dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$.

5.9. Níveis de citocinas em útero/placenta

Com a finalidade de se estudar a resposta imune local associada à infecção por *P. berghei* ANKA durante a gestação, bem como o efeito da modulação da HO-1, as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ e TGF- β foram mensurados em sobrenadantes de homogenatos de tecidos de útero/placenta.

Os resultados mostraram que os níveis teciduais de IL-2 se encontraram elevados no grupo 8dG/8dl/ZnPPIX quando comparado com os grupos 8dG/8dl/Veículo ($p=0,0189$) e 8dG/8dl/CoPPIX ($p=0,0129$) (Fig. 13A). Não foram observadas alterações significativas nas concentrações desta citocina em tecidos utero-placentários de camundongos de 12dG ou 19dG, independentemente se estes foram infectados ou do tratamento administrado (Fig. 13A).

Os níveis de IL-4 foram comparáveis entre os grupos de estudo, independente das condições experimentais (Fig. 13B), enquanto que a maioria das amostras apresentaram concentrações de IL-10 inferiores ao limite de detecção do kit (Fig. 13C).

Os níveis de IL-17A mostraram-se estar mais elevados em sítios de implantação de camundongos do grupo 12dG/7dl/CoPPIX, em relação a camundongos do grupo 12dG/7dl/Veículo ($p=0,0216$). Também foi observado um aumento nos níveis desta citocina em placentas de camundongos 19dG/7dl/ZnPPIX

quando comparados com amostras do grupo 19dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0439$), assim como também foi observado que o grupo 8dG/7dl/ZnPPIX teve maiores níveis de IL-17A quando comparado com outras amostras de 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0299$) (Fig. 13D).

IFN- γ apresentou-se elevada em resposta à infecção nos 3 períodos gestacionais estudados. Sítios de implantação de fêmeas de 8dG/7dl e 12dG/7dl exibiram elevados níveis de IFN- γ em relação aos animais no mesmo período gestacional não infectados (8dG/NI e 12dG/NI) independentemente de serem tratados com veículo ($p=0,0025$ e $p=0,0191$; respectivamente), CoPPIX ($p=0,0033$ e $p=0,0162$; respectivamente) ou ZnPPIX ($p=0,0044$ e $p=0,0007$; respectivamente). No final da gestação, placentas de camundongos 19dG/7dl/Veículo ($p=0,0012$) e 19dG/7dl/ZnPPIX ($p=0,0493$) também apresentaram elevação nos níveis de IFN- γ em relação ao grupo 19dG/NI. Os níveis de IFN- γ foram aparentemente mais elevados nos animais do grupo 19dG/7dl/CoPPIX, sendo esses níveis significativamente menores em relação aos do grupo 19dG/7dl/Veículo ($p=0,0107$) (Fig. 13E).

Por outro lado, foi observado que sítios de implantação de camundongos dos grupos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0358$) e 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0182$), mas não 8dG/7dl/ZnPPIX, exibiram maiores níveis de IL-6 em comparação com o grupo 8dG/NI. Os tecidos de camundongos de 12dG e 19dG apresentaram níveis mínimos de IL-6 independentemente das condições experimentais (Fig. 13F).

De maneira interessante, foi observado um aumento significativo nos níveis de TNF em sítios de implantação de camundongos do grupo 8dG/7dl/Veículo em relação aos animais do grupo 8dG/NI ($p=0,0068$). De maneira oposta, enquanto os sítios de implantação deste grupo gestante, infectado e tratado com veículo apresentaram altos níveis de TNF, os sítios de implantação de fêmeas do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX apresentaram níveis reduzidos desta citocina quando comparados com os grupos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0115$) e 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0292$). Os níveis de TNF em amostras de 12dG e 19dG foram baixas e semelhantes entre os grupos de estudo desses tempos gestacionais (Fig. 13G).

Por último, ao analisar os níveis teciduais de TGF- β foi observado que esta citocina se eleva naturalmente durante a gestação em sítios de implantação de 8dG/NI quando comparado com amostras de útero de fêmeas NG/NI ($p=0,0021$). Esta citocina apresenta níveis mais elevados em sítios de implantação de fêmeas 12dG/NI em comparação com fêmeas dos grupos NG/NI e 8dG/NI ($p<0,0001$). No entanto, em

placentas de camundongos não infectados aos 19dG foi observado que esta citocina depois apresenta uma queda em relação ao grupo 12dG/NI ($p=0,0012$). No período inicial da gestação foi detectado que sítios de implantação de camundongos 8dG/7dl/ZnPPIX apresentaram menores níveis de TGF- β em relação aos grupos 8dG/NI ($p=0,0099$), 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0008$) e 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0151$). No período médio da gestação não foram observadas diferenças nos níveis locais desta citocina em resposta à infecção ou à modulação de HO-1. Aos 19dG/7dl, placentas de camundongos tratados com ZnPPIX apresentaram menores níveis de TGF- β em comparação ao grupo 19dG/NI ($p=0,0233$) (Fig. 13H).

A plotagem dos dados em gráficos de radar permitiu observar de maneira geral quais grupos apresentaram diferenças marcantes no seu perfil das citocinas avaliadas na interface materno-fetal. Pode-se notar que no início da gestação camundongos do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX apresentaram menores níveis de TNF e maiores níveis de IL-17 em comparação com camundongos dos grupos 8dG/7dl/Veículo e 8dG/7dl/CoPPIX, os quais apresentaram praticamente o mesmo perfil de citocinas (Fig. 14A). É importante também ressaltar que a resposta pró-inflamatória local causada pela infecção no início da gestação parece ser conduzida pelas citocinas TNF e IL-6, sendo estas as únicas citocinas, dentro das avaliadas no presente estudo, que foram diferencialmente aumentadas durante o início da gestação em decorrência da infecção, e que no caso de TNF esteve reduzida no grupo 8dG/7dl/ZnPPIX.

De modo geral é possível observar em camundongos de 12dG (Fig. 14B) e 19dG (Fig. 14C) que, além dos aumentos significativos nos níveis de IFN- γ como consequência da infecção, os grupos pertencentes a estes períodos gestacionais apresentaram perfis de citocinas comparáveis independentemente da infecção ou a modulação farmacológica da HO-1.

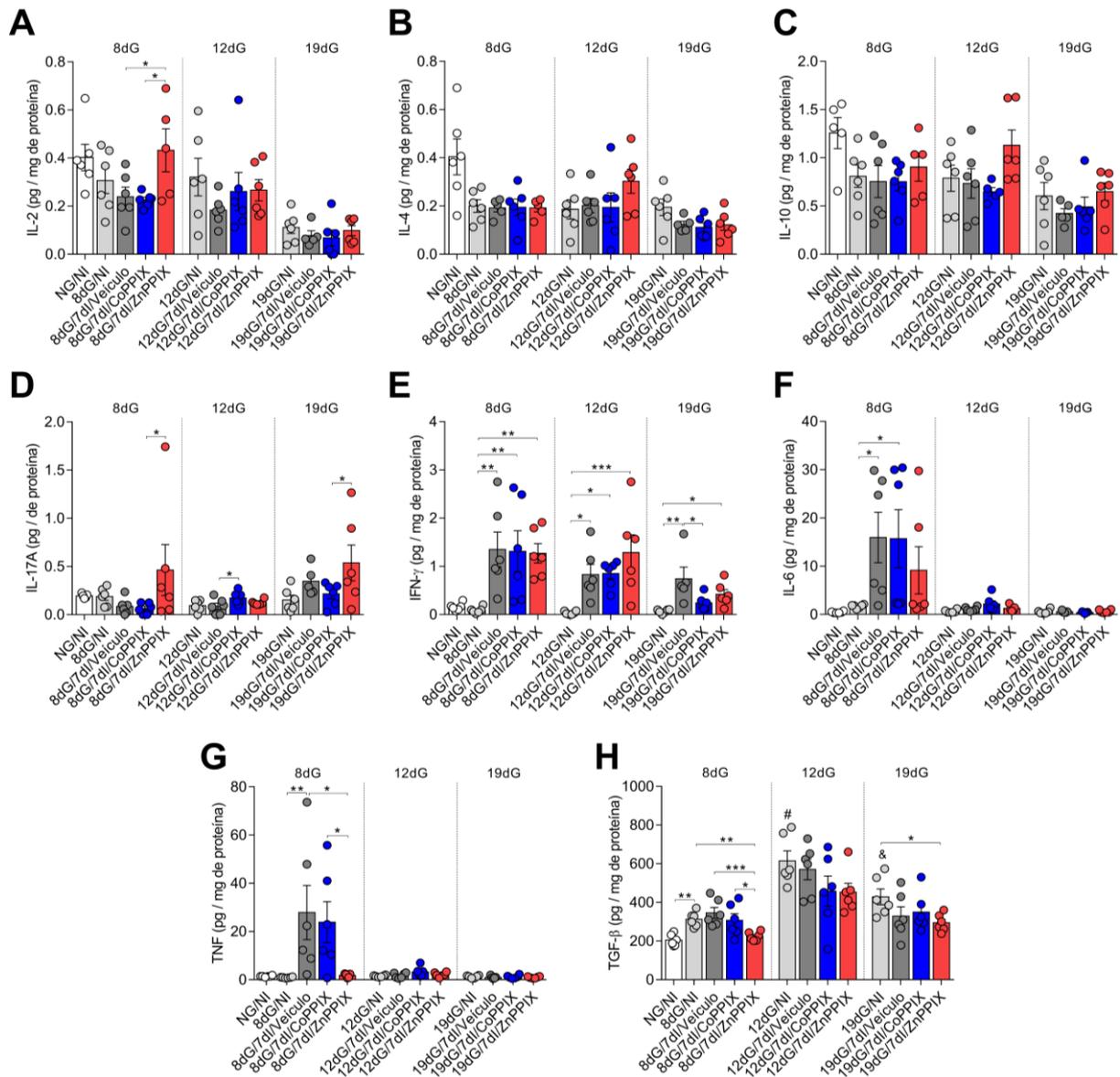


Figura 13. Impacto da modulação de HO-1 durante a malária gestacional no perfil de citocinas em amostras de homogenatos de útero/placenta. Amostras de sítios útero/placenta foram homogeneizadas e o sobrenadante foi utilizado para mensuração das concentrações de IL-2 (A), IL-4 (B), IL-10 (C), IL-17A (D), IFN- γ (E), IL-6 (F), TNF (G) pelo método CBA e TGF- β (H) por ELISA. As dosagens foram normalizadas de acordo à concentração de proteínas presente nas amostras. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (B,E,G,H) ou ambos Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni dependendo da normalidade dos dados no determinado período gestacional (A,D,F). NG: não gestante, NI: não infectado, dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. #: indica diferença estatística entre o grupo 12dG/NI e os grupos NG/NI e 8dG/NI com $p < 0,0001$. &: indica diferença estatística entre o grupo 12dG/NI e o grupo 19dG/NI com $p = 0,0012$.

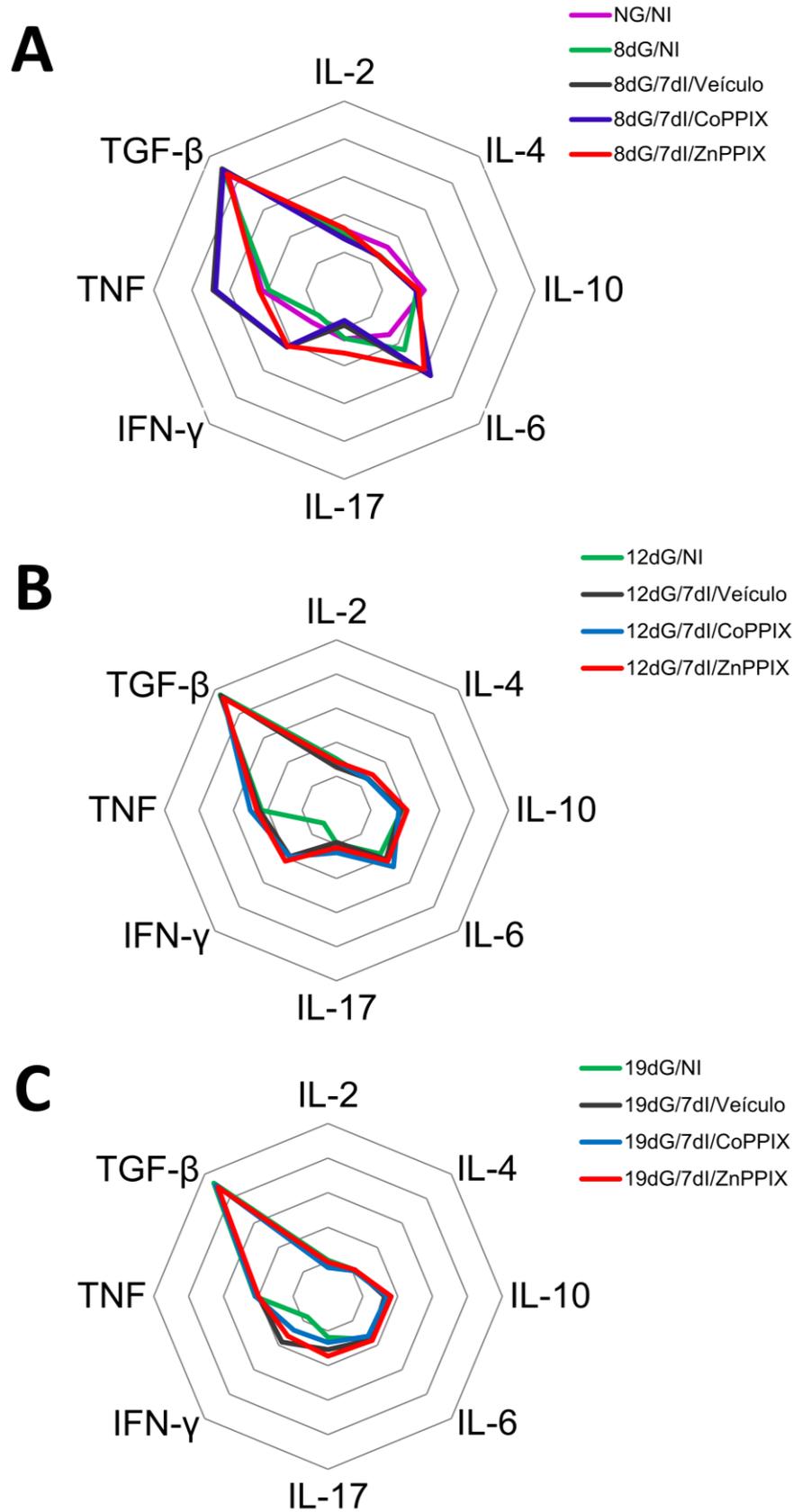


Figura 14. Perfil de citocinas durante a malária em três períodos da gestação. Foram construídos gráficos de radar para visualização do perfil das citocinas apresentadas na figura 8. NG: não gestante, NI: não infectado, dG: dias de gestação, dl: dias de infecção.

5.10. Avaliação dos níveis de heme, ferro e peroxidação lipídica

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que a malária é capaz de induzir efeitos prejudiciais ao longo da gestação e que esses efeitos geralmente estão associados a um aumento na expressão de HO-1. Além disso, os resultados adversos da gestação são reduzidos quando os camundongos são tratados com inibidor da HO-1, principalmente no início da gestação. De maneira interessante, no início da gestação acontece o aumento mais acentuado na expressão de HO-1 nos sítios de implantação de fêmeas infectadas em relação ao controle gestante não infectado, em conjunto com deposição de ferro nos sítios de implantação.

Sendo heme e ferro o substrato e um dos produtos de degradação da HO-1, respectivamente, nos propusemos pesquisar qual seria o status destas moléculas nos grupos de estudo e sua possível influência no estresse oxidativo local, especificamente na peroxidação lipídica.

Primeiramente, foi verificado que existe um aumento nos níveis séricos de heme como consequência da infecção, sendo que camundongos do grupo 8dG/7dl/Veículo apresentaram níveis séricos de heme elevados se comparados com camundongos do grupo 8dG/NI ($p=0,0040$). Ainda este aumento foi também observado no grupo 8dG/7dl/CoPPIX em relação ao grupo 8dG/NI ($p=0,0412$), não sendo observado um aumento significativo no grupo 8dG/7dl/ZnPPIX. Na metade da gestação não foram observadas alterações nas concentrações de heme no soro em resposta à infecção independentemente dos tratamentos, enquanto que no final da gestação foi demonstrada uma elevação no heme sérico em resposta à infecção nos grupos 19dG/7dl/Veículo ($p=0,0005$), 19dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0186$) e 19dG/7dl/ZnPPIX ($p=0,0037$) em relação aos animais 19dG/NI (Fig. 15A).

Ao se avaliar os níveis de heme nos tecidos uteroplacentários, foi encontrado que de maneira similar ao resultado no soro, fêmeas do grupo 8dG/7dl/Veículo apresentaram maiores níveis teciduais de heme em relação a camundongos do grupo 8dG/NI ($p=0,0455$). Também, camundongos dos grupos 12dG/7dl/Veículo ($p=0,0283$) e 12dG/7dl/ZnPPIX ($p=0,0487$) apresentaram níveis aumentados de heme nesses tecidos se comparados com camundongos do grupo 12dG/NI. No final da gestação, os animais do grupo 19dG/7dl/CoPPIX apresentaram altos níveis de heme no tecido quando comparados com os grupos 19dG/NI ($p=0,0289$) e 19dG/7dl/Veículo ($p=0,0304$) (Fig. 15B). Então, apesar dos níveis séricos e teciduais de heme não

serem completamente compatíveis é possível inferir que as concentrações de heme aumentam como consequência da infecção.

Em relação aos níveis teciduais de ferro, foi observado que estes também foram aumentados como consequência da infecção, sendo que camundongos dos grupos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0009$) e 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0492$) apresentaram maiores concentrações de ferro nos sítios de implantação quando comparados com o grupo 8dG/NI. Em contraste, fêmeas do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX apresentaram menores níveis teciduais de ferro em relação a camundongos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0211$). Nos períodos médio e final da gestação não foram observadas alterações nos níveis teciduais de ferro devido à infecção ou à modulação da enzima (Fig. 15C). Estes resultados se correlacionam bem com os dados obtidos nas análises de cortes corados com Prussian blue e que foram descritos previamente neste trabalho.

Tem sido demonstrado que altas concentrações de ferro levam a estresse oxidativo das membranas celulares (LATUNDE-DADA, 2017). Por este motivo, foi verificado se haveria indução de peroxidação lipídica nas amostras de homogenatos de tecidos de útero/placenta dos grupos de estudo. Efetivamente, foi observado que amostras dos grupos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0077$) e 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0117$), mas não do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX, mostraram aumento na taxa de peroxidação lipídica quando seus resultados foram comparados com o grupo 8dG/NI. Ao mesmo tempo, o grupo 8dG/7dl/ZnPPIX apresentou um decréscimo nas taxas de peroxidação lipídica em relação aos grupos 8dG/7dl/Veículo ($p=0,0171$) e 8dG/7dl/CoPPIX ($p=0,0266$). No período médio da gestação, não foram observadas diferenças entre os grupos para este parâmetro, enquanto que no período final da gestação placentas de camundongos de 19dG/7dl/CoPPIX exibiram maiores níveis de peroxidação lipídica em relação aos grupos 19dG/7dl/Veículo ($p=0,0065$) e 19dG/7dl/ZnPPIX ($p=0,0370$) (Fig. 15D).

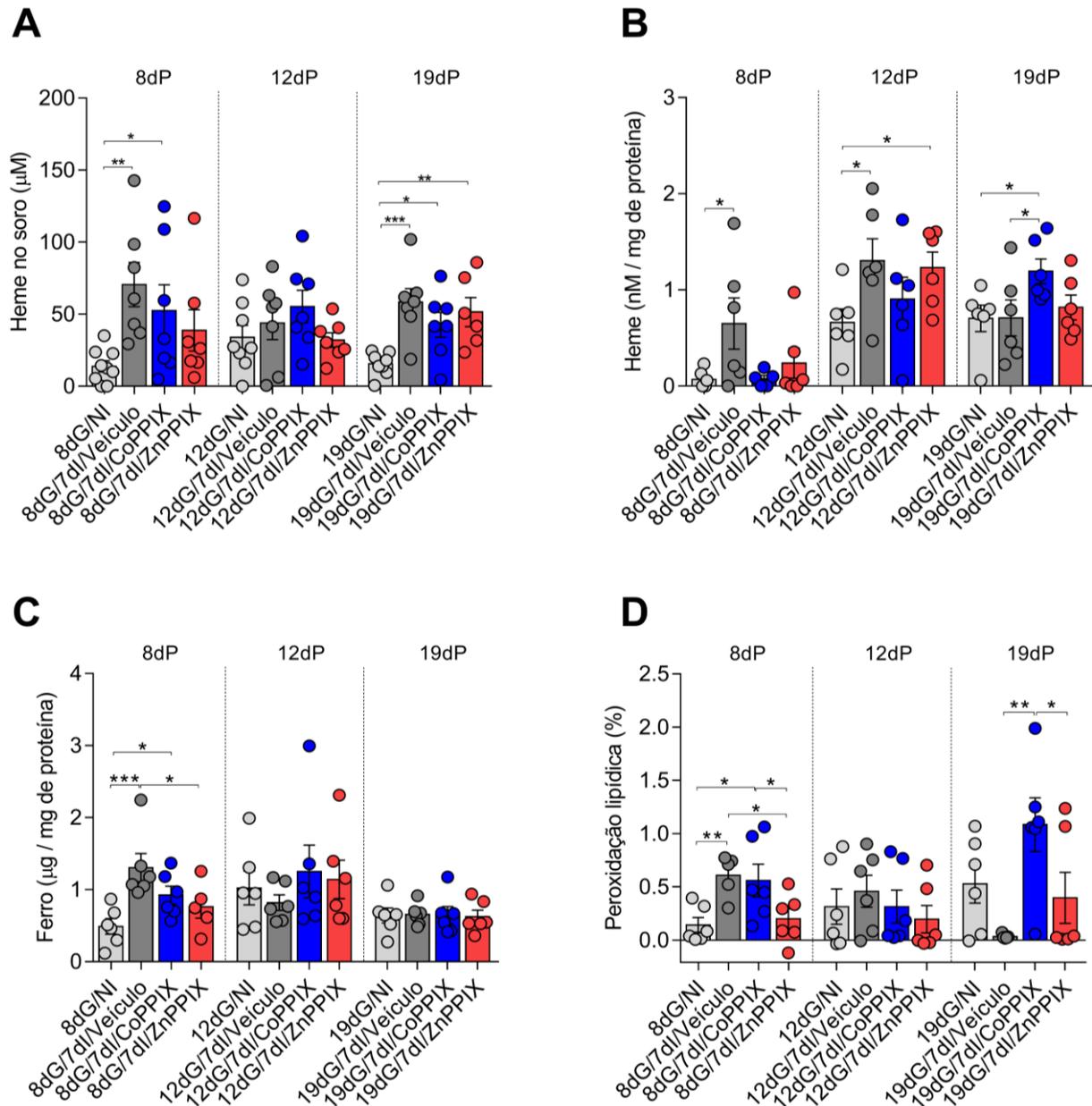


Figura 15. Níveis de heme, ferro e peroxidação lipídica na modulação de HO-1 durante a malária gestacional experimental. As concentrações séricas de heme (A); assim como os níveis de heme (B), ferro (C) e peroxidação lipídica (D) em amostras de útero/placenta foram mensurados em camundongos BALB/c infectados ou não com *P. berghei* ANKA e tratados ou não com tratamento indutor (CoPPiX) ou inibidor de HO-1 (ZnPPiX) em diferentes períodos gestacionais. Os dados são representados como a média \pm erro padrão da média, sendo cada ponto a medida de cada animal dentro do grupo. Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni (A,C) ou ambos Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni dependendo da normalidade dos dados no determinado período gestacional (B,D). NG: não gestante, NI: não infectado, dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

5.11. Análise de correlação entre as concentrações teciduais de ferro e os níveis de citocinas

Uma vez que os efeitos prejudiciais da infecção durante o início da gestação parecem estar associados com uma acumulação de ferro nos sítios de implantação e que a maior modulação da produção das citocinas nesses tecidos ocorreu durante esse período gestacional, realizaram-se análises de correlação entre as concentrações locais de ferro e citocinas com a finalidade de descobrir qual das citocinas estaria associada com a acumulação de ferro no início da gestação.

Das oito citocinas mensuradas no presente estudo, apenas duas mostraram uma correlação diretamente proporcional com os níveis de ferro aos 8dG: TNF ($p=0,0011$) e IL-6 ($p=0,0329$) (Fig. 16). Estes resultados coincidem com o esperado, uma vez que os maiores níveis de ferro foram encontrados em amostras de camundongos dos grupos 8dG/7dI/Veículo e 8dG/7dI/CoPPIX, que também apresentaram aumentos significativos nos níveis teciduais de ferro, peroxidação lipídica, TNF e IL-6. Em contrapartida, camundongos do grupo 8dG/7dI/ZnPPiX apresentaram menores níveis de ferro, peroxidação lipídica, TNF e IL-6, mostrando assim que a inibição de HO-1 é importante para garantir o sucesso da gestação em infecção por PbA, em particular durante o início da mesma.

Em conclusão, a malária na gestação induz alterações que comprometem o sucesso gestacional. Em estágios iniciais e na metade da gestação a infecção por PbA induz perda embrionária enquanto que em estágios finais o peso fetal é significativamente comprometido como consequência da infecção, que também é capaz de induzir hipoglicemia e anemia nas mães ao longo da gestação. A expressão da enzima HO-1 aumenta na interface materno-fetal de fêmeas gestantes infectadas no início e no final da gestação. O início da gestação demonstrou ser um período de alta suscetibilidade aos efeitos da infecção, pois a mesma foi capaz de induzir maiores alterações no perfil local de citocinas, estresse oxidativo e deposição de ferro, a qual foi associada a altos níveis de TNF e IL-6. No entanto, a modulação farmacológica da enzima, especificamente a inibição da mesma demonstrou levar a uma redução no parasitismo sistêmico e tecidual bem como uma melhora no sucesso gestacional, possivelmente devido a seus efeitos na redução na resposta inflamatória, deposição de ferro e estresse oxidativo na interface-materno fetal. Este efeito benéfico da inibição da HO-1 durante a infecção foi contundente no início da gestação e foi se tornando cada vez menos significativo à medida que a gestação avançou (Fig. 17).

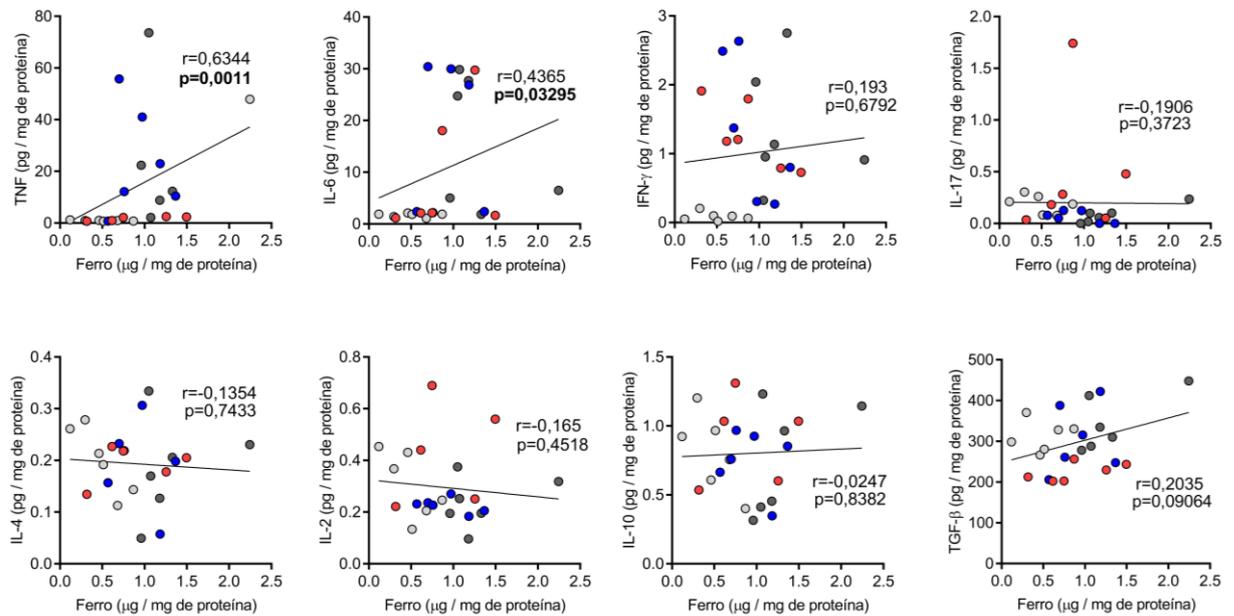


Figura 16. Coeficientes de correlação entre as concentrações de ferro e citocinas em sítios de implantação de 8 dias de gestação. A correlação entre os níveis teciduais de ferro e os níveis teciduais de TNF, IL-6, IL-17 e IL-2 foi estimada usando o coeficiente de correlação de Pearson, enquanto que a correlação entre os níveis teciduais de ferro e os níveis teciduais de IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β foi estimada usando o coeficiente de correlação de Spearman. Os pontos representam a medida de cada camundongo, sendo os grupos representados pelas cores cinza claro (8dG/Nl), cinza escuro (8dG/7dl/Veículo), azul (8dG/7dl/CoPPiX) e vermelho (8dG/7dl/ZnPPiX). NI: não infectado, dG: dias de gestação, dl: dias de infecção. $p < 0,05$ indicam correlações estatisticamente significativas.

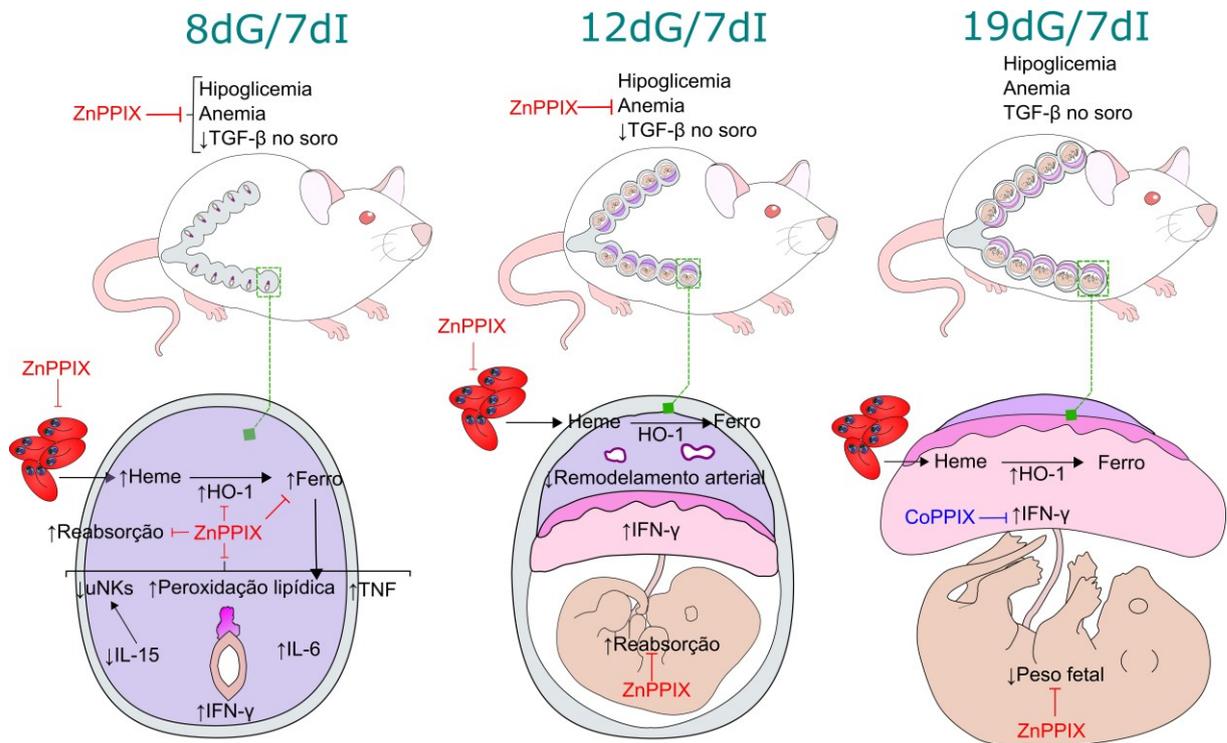


Figura 17. Esquema representativo do papel da HO-1 na malária gestacional experimental. (↑,↓) denota aumento ou diminuição do parâmetro na infecção durante a gestação, (↑,↓) denotam inibição ou diminuição em resposta às drogas ou outros fatores, (→, ←) denotam indução ou aumento em resposta às drogas ou outros fatores.

6. DISCUSSÃO

Os modelos murinos de malária na gestação constituem importantes ferramentas para o estudo da doença, devido às limitações éticas e logísticas que envolve o estudo da malária em humanos (ZUZARTE-LUIS; MOTA; VIGÁRIO, 2014). No presente estudo foi utilizado o modelo de infecção de camundongos BALB/c com PbA, o qual reproduz muitas características da malária gestacional humana (NERES *et al.*, 2008).

No presente trabalho os níveis de hemoglobina, glicemia e TGF- β no soro maternos foram utilizados para monitorar a gravidade da doença nos diferentes desenhos experimentais utilizados. Em relação à hemoglobina, a diminuição dos seus níveis é um sinal de anemia, uma das complicações mais características da malária. Neste trabalho foi observada uma diminuição nos níveis de hemoglobina, após 7 dias de infecção, nos três períodos gestacionais estudados. Sobre este tema, numa revisão realizada por Desai *et al.* (2007), foi evidenciada a alta frequência desta alteração durante a malária na gestação, sendo que em mulheres gestantes da África a proporção de casos de anemia grave atribuível à malária chega a ser de 26%. Além disso, a OMS no seu reporte anual sobre a malária de 2019 (WHO, 2019) mostrou que existe uma correlação positiva entre a anemia materna e a prevalência da exposição à malária durante a gestação. Em modelos murinos de malária gestacional não é diferente (BARATEIRO *et al.*, 2019), sendo que os níveis de hematócrito diminuem na medida que ascendem as taxas de parasitemia (POOVASSERY; MOORE, 2006; AVERY *et al.*, 2012; SARR *et al.*, 2012; WAISBERG *et al.*, 2013; MORFFY SMITH *et al.*, 2019). A hipoglicemia é outra manifestação clínica, ainda menos frequente, observada em mulheres gestantes com malária (BOTELHO-NEVERS *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2011; JIMÉNEZ *et al.*, 2012) e que também aconteceu nos três períodos gestacionais avaliados neste trabalho em decorrência da infecção. Acredita-se que esta alteração ocorra durante a malária em resposta às crescentes demandas nutricionais do parasito (WHITE *et al.*, 1983) e de fato existe evidência de que os picos de proliferação do parasito acontecem durante a os períodos de ingestão alimentícia do hospedeiro (HIRAKO *et al.*, 2018). Por último, neste trabalho os níveis séricos de TGF- β também se encontraram diminuídos no início e na metade da gestação em soro materno de camundongos gestantes infectados. A elevação dos níveis plasmáticos desta citocina estão diretamente associados com a progressão da

gestação (SOTOODEH JAHROMI, SANIE, *et al.*, 2015) e inversamente relacionados com a gravidade da doença em humanos e camundongos (CHAIYAROJ *et al.*, 2004; ABRAMS *et al.*, 2005; RAHMAH *et al.*, 2015). Os animais tratados com ZnPIX apresentaram níveis mais elevados de hemoglobina e glicemia em relação aos animais infectados e tratados com veículo no primeiro terço de gestação, sugerindo que a inibição da HO-1 foi capaz de reduzir a gravidade da malária na gestação nesse período gestacional.

Em relação a parasitemia, foi verificado que a gestação não afetou esse parâmetro significativamente no decorrer da gestação, embora níveis aparentemente maiores foram encontrados no segundo e terceiro terço nos animais gestantes. Boareto *et al.* (2019) detectaram que os níveis de parasitemia são afetados pelo período da gestação em que ocorre a infecção. Eles encontraram que os camundongos infectados no primeiro dia de gestação apresentavam taxas de parasitemia semelhantes a camundongos não gestantes e que quando a infecção ocorre no sexto e décimo segundo dia de gestação os camundongos exibiam níveis de parasitemia maiores que camundongos não gestantes. No presente trabalho, provavelmente a parasitemia similar entre camundongos gestantes e não gestantes pode ter sido devido ao inóculo mais baixo utilizado. Além de quantificar a taxa de hemácias infectadas no sangue, na presente investigação também foi quantificada a hemozoína presente na placenta de camundongos infectados como uma medida do parasitismo tecidual, uma vez que a hemozoína se encontra distribuída uniformemente nos espaços vasculares maternos de placentas infectadas em humanos e camundongos (NERES *et al.*, 2008; AVERY *et al.*, 2012). Nossos resultados apontam que a malária na gestação aumenta a expressão de mRNA de HO-1 na interface materno-fetal de camundongos infectados e que o tratamento com inibidor da HO-1 levou ao aumento dos níveis de hemoglobina, e diminuição da proporção de parasitos circulantes e bem como da quantidade de hemozoína na decídua de camundongos gestantes infectados quando avaliados aos 8dG/7dl e 12dG/7dl. Estes resultados estão de acordo com os dados gerados por Morffy Smith *et al.* (2019), quem mostraram um aumento na expressão de mRNA para HO-1 em conceptos (10dG) de camundongos Swiss infectados com *P. chabaudi chabaudi* AS, sendo os níveis de expressão da enzima diretamente correlacionados com a densidade de hemozoína em tecidos placentários, mostrando que os menores níveis de hemozoína tecidual estão relacionados com uma menor expressão de HO-1.

O efeito antimalárico exercido por ZnPPIX observado neste estudo poderia ser explicado por duas vias; a primeira delas poderia ser a diminuição da disponibilidade do ferro necessário para o crescimento do parasito (GABAY; GINSBURG, 1993), uma vez que ZnPPIX se liga de maneira competitiva à HO-1 evitando a formação dos produtos do catabolismo do heme, dentre eles o ferro (MAINES, 1981); enquanto que a segunda via para explicar o efeito antimalárico do ZnPPIX poderia ser atribuída a sua capacidade para se ligar ao heme e prevenir o processo de formação da hemozoína, de maneira semelhante ao mecanismo de ação de muitas quinolonas, como a cloroquina (IYER *et al.*, 2003). Por fim, é possível que estes mecanismos estejam restritos aos períodos inicial e médio da gestação e não ao período final da gestação devido à maior taxa de parasitemia observada neste último período em relação aos anteriores, extenuando os possíveis mecanismos de ação antiparasitária exercidos pelo ZnPPIX.

No que concerne ao sucesso gestacional, neste trabalho foi encontrado que, como consequência da infecção de camundongos BALB/c com PbA, a perda embrionária ocorreu de maneira significativa nos períodos inicial e médio da gestação. No período final da gestação, o efeito da infecção não se evidenciou na viabilidade dos sítios de implantação e sim na restrição do peso fetal, o qual foi previamente observado em outros estudos usando diferentes modelos de malária gestacional em camundongos (BARATEIRO *et al.*, 2019). Existem poucos estudos a respeito do impacto da malária gestacional experimental na primeira semana da gestação murina; neste sentido, Waisberg *et al.* (2013) também encontraram uma redução no número de embriões viáveis quando fêmeas C57BL/6 foram infectadas com *P. chabaudi chabaudi* AS no dia da detecção do tampão vaginal e eutanasiadas 8 dias após a concepção. Porém, os estudos de malária gestacional no final da gestação oferecem diferentes resultados em relação à viabilidade dos sítios de implantação dependendo do modelo murino utilizado. McDonald *et al.* (2018) notaram uma redução na viabilidade fetal empregando camundongos BALB/c infectados com PbA com 13dG e avaliados aos 19dG. Em contraste com os dados obtidos por McDonald *et al.* (2018), no presente estudo não foram observadas diferenças na viabilidade fetal quando as mães da linhagem BALB/c foram infectadas com PbA, possivelmente devido ao maior inóculo (10^6 hemácias infectadas) e aos critérios usados para definir a perda embrionária (perda de reflexos digitais) utilizados por eles.

O papel das células uNK na malária gestacional não tem sido bem elucidado, pois existe uma ausência na literatura científica sobre estudo destas células em modelos murinos de malária na gestação e devido a que estudos prévios em placentas humanas de mulheres com malária têm sido voltados para a detecção de células NK em sangue periférico, sangue dos espaços intervilosos placentários ou inclusive amostras de tecido placentário, embora sem ênfase na decídua, que é o principal tecido no qual estas células se encontram. Além disso, estes estudos têm sido desenvolvidos usando amostras obtidas no parto, momento no qual a quantidade e funções destas células é reduzido (ORDI *et al.*, 2001; SARTELET *et al.*, 2005; OTHORO *et al.*, 2008). Por outro lado, esses resultados são contraditórios. Por exemplo, Sartelet *et al.* (2005) usando imunohistoquímica observaram um aumento de células CD56⁺ em placentas de mulheres infectadas sugerindo que isto poderia ser um fator que pode comprometer o resultado da gestação. Em contrapartida, Othoro *et al.* (2008) usando citometria de fluxo observaram que células NK CD56⁺ CD3⁻ se encontram em maior quantidade em sangue da placenta do que em sangue periférico. Além disso, encontraram que existe uma redução na quantidade de células NK produtoras de IFN- γ na placenta de mulheres infectadas denotando que estas células poderiam constituir a principal linha de defesa contra a infecção na placenta. Por fim, Ordi *et al.* (2001), utilizando imunohistoquímica para detecção de CD56, reportaram uma completa ausência de células NK no estroma dos vilos e nas áreas intervilosas de placentas de mulheres infectadas, mas presença de pequenos aglomerados de células NK foram observados na decídua de todas as placentas estudadas.

Na presente pesquisa foram detectadas menores quantidades de células uNK na decídua de camundongos infectados no início da gestação o qual poderia estar associado com o processo de decidualização, momento no qual as células uNK começam se acumular (SOJKA *et al.*, 2018). Esta diminuição foi condicente com os reduzidos níveis de expressão de IL-15, sendo essa a principal citocina envolvida na diferenciação e proliferação de células uNK na decídua (ASHKAR *et al.*, 2003; BARBER; POLLARD, 2003). Devido às cruciais funções exercidas por estas células (descritas previamente neste documento), sua ausência parece contribuir com os resultados adversos observados no início da gestação como consequência da infecção e, de fato, camundongos gestantes infectados e tratados com ZnPPiX conseguiram preservar quantidades de células uNK semelhantes a camundongos gestantes não infectados, além de apresentarem menores proporções de sítios de

implantação anormais. Na metade da gestação, não foram observadas diferenças significativas nas quantidades destas células em camundongos gestantes infectados ou não, apesar de que as artérias espiraladas apresentaram um deficiente remodelamento, sendo que o tratamento com o indutor ou inibidor de HO-1 não foi capaz de melhorar esse aspecto. Isto poderia se dever a diferente produção de citocinas e fatores de crescimento por estas células nos diferentes grupos, o qual já tem sido observado em outros contextos biológicos, nos quais apesar do número das células uNK não ser afetado, a deficiência de VEGFC e IFN- γ nessas células foi associado a falhas no remodelamento arterial (KIECKBUSCH *et al.*, 2015; PAWLAK *et al.*, 2019). Sendo assim, seria necessário um estudo mais aprofundado para caracterizar o conteúdo destas células durante a malária neste período gestacional.

Outro achado interessante da presente pesquisa foi que apesar de que as quantidades de uMCs não foram alteradas após a infecção em camundongos com 8dG ou 12dG, nem os números de células uNK em camundongos com 12dG; foi possível observar maiores contagens de células uNK em camundongos do grupo 12dG/7dl/CoPPIX e menor número de uMCs no grupo 12dG/7dl/ZnPPIX, sendo que nenhuma dessas mudanças foi associada com uma melhoria no remodelamento das artérias espiraladas. Sobre a presença destas células, Meyer *et al.* (2017b) mostraram como na ausência de uMCs as funções destas células eram contrabalançadas pelas células uNK e vice-versa. Contudo, apesar de que estas células parecem cumprir com importantes funções que garantem o sucesso gestacional (MEYER *et al.*, 2017a; MEYER *et al.*, 2017b), a partir dos dados obtidos na presente investigação não é possível afirmar que os uMCs tenham um papel relevante na malária na gestação, sendo que estas células não são alteradas em resposta à infecção, mas é provável que a modulação da HO-1 altere a distribuição das células uNK e uMCs no período médio da gestação.

Examinando os possíveis mecanismos envolvidos na patologia induzida pela infecção durante a gestação, encontrou-se que a acumulação de ferro em tecido placentário durante a malária gestacional experimental tinha sido previamente reportada por Penha-Gonçalves *et al.* (2014), que utilizaram o modelo de infecção de camundongos C57BL/6 com *P. berghei* e encontraram que a infecção leva a uma sobrecarga de ferro nas células trofoblásticas o que foi associado com morte fetal. Esta acumulação de ferro foi observada em 43% das placentas de fetos mortos e não em placentas de fetos viáveis aos 19 ou 20dG, estando este fenômeno diretamente

relacionado ao inóculo de parasitos recebida pela mãe. Em concordância, na presente investigação foi observado um aumento na sobrecarga de ferro na interface materno-fetal, mas de maneira distinta ao observado por Penha-Gonçalves *et al.* (2014), essa sobrecarga foi observada no início da gestação e não no final da mesma. Esta diferença pode se dever a diferenças metodológicas em relação a linhagem de camundongos, tempo de infecção e inóculo infectante empregado em ambas pesquisas. Contudo, estes resultados em conjunto ressaltam a importância do estudo do status férrico na interface materno-fetal para prevenir os resultados adversos na gestação.

Ainda no que se refere ao papel do ferro na patologia da malária na gestação, Salifu *et al.* (2016) realizaram um estudo transversal em mulheres gestantes em Gana que foram assintomáticas, mas positivas para malária no momento do parto, realizando interessantes associações entre as concentrações séricas de heme, HO-1 e a suplementação com ferro. Eles constataram que mulheres gestantes infectadas apresentaram níveis séricos aumentados de heme e HO-1 e que seu aumento está relacionado com a suplementação com ferro em mulheres gestantes em geral e naquelas positivas para malária. Do mesmo modo, neste trabalho os níveis de heme no soro e HO-1 na interface materno-fetal estiveram aumentados em camundongos gestantes infectados no início, coincidindo com uma alta deposição de ferro, e final da gestação; e heme no útero/placenta no início e meio da gestação. Nossos dados sugerem que a acumulação de ferro, conseqüente peroxidação lipídica e os resultados adversos provocados pela infecção nesse período da gestação são mediados por HO-1, uma vez que a inibição da mesma levou a melhora do resultado gestacional. Embora não é descartada a teoria de que uma vez que o estresse oxidativo induzido pelo ferro é estabelecido, se produza um *feedback* positivo com HO-1 que acaba perpetuando a acumulação de ferro nos tecidos. Neste sentido, Fisher *et al.* (2021) observaram que camundongos gestantes com sobrecarga de ferro têm expressão aumentada de HO-1 na placenta, especificamente em células endoteliais, elevação que se acentua mais ainda quando existe inflamação induzida por LPS, demonstrando que a sobrecarga de ferro e a inflamação apresentam ação sinérgica para induzir estresse oxidativo e apoptose, resultando em morte fetal e malformações. De fato, o aumento exacerbado na expressão de HO-1 tem demonstrado acelerar a morte celular mediada por ferro enquanto que o tratamento com ZnPPIX é capaz de evitá-lo (KWON

et al., 2015), o qual está em sintonia com nossos dados que mostram uma menor deposição de ferro e reduzida peroxidação lipídica no grupo 8dG/7dl/ZnPPIX.

Em alinhamento com os resultados apresentados aqui, existem outras doenças infecciosas que induzem a expressão de HO-1 e cuja inibição induz efeitos benéficos. Uma delas é a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (ROCKWOOD *et al.*, 2017), contexto no qual a inibição da enzima usando SnPPIX levou à diminuição da carga bacteriana de maneira semelhante à terapia antibacteriana convencional (COSTA *et al.*, 2016). Estudos posteriores revelaram que o mecanismo pelo qual a HO-1 atua durante a tuberculose é através do incremento nos níveis intracelulares de ferro, que inibem o controle bacteriano dependente de IFN- γ e iNOS, mediado por células T. Em contraste, durante a infecção a inibição de HO-1 utilizando SnPPIX reduz os níveis de ferro nas células permitindo a produção de óxido nítrico necessário para o controle bacteriano (COSTA *et al.*, 2021).

O ferro lábil é um dos principais responsáveis por causar a peroxidação lipídica, alterando as propriedades físicas das membranas celulares e causando modificações covalentes em proteínas e ácidos nucleicos (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). Nossos resultados apontam que os efeitos adversos da infecção com PbA no início da gestação estão relacionados com sobrecarga de ferro e peroxidação lipídica nos sítios de implantação. Em concordância, Akanbi *et al.* (2010) demonstraram que mulheres gestantes com malária apresentam maiores índices de peroxidação lipídica no soro quando comparadas com mulheres gestantes não infectadas e mulheres não gestantes infectadas. Do mesmo modo, Sharma *et al.* (2012) observaram aumento da peroxidação lipídica em placentas de camundongos BALB/c após 4 e 6 dias de infecção com PbA, o qual parece levar a ativação da via mitocondrial de morte celular por apoptose, devido a aumento da expressão de Bax e diminuição da expressão de Bcl-2 em conjunto com ativação de caspase 3 e caspase 9. Além disso, é sugerido que este mecanismo leva ao dano placentário, afetando o sistema de trocas da interface materno-fetal e levando à insuficiência placentária que resulta no retardo do crescimento intrauterino observado na infecção.

Em clara concordância com nossos resultados, um estudo recente mostrou a importância de uma rígida e controlada modulação de HO-1 para atingir os efeitos benéficos derivados da sua atividade. O estudo em questão investigou o papel da HO-1 produzida por células da micróglia no contexto da neuroinflamação em camundongos idosos, encontrando que a expressão da enzima nessas células

aumenta com a idade e com estímulos inflamatórios, levando a incrementos nos níveis de marcadores inflamatórios como iNOS, p65, IL-1 β , caspase-1, NLRP3 e TNF- α , acúmulo de ferro e morte celular por ferroptose. De maneira interessante, todas essas alterações foram prevenidas em camundongos com células mieloides deficientes em HO-1 e em camundongos tratados com ZnPPIX (FERNÁNDEZ-MENDÍVIL *et al.*, 2021). De acordo com esses resultados, nossos dados sugerem que enquanto a expressão de HO-1 é benéfica sob condições fisiológicas e de homeostase, em contextos de inflamação o aumento na expressão desta enzima pode se tornar prejudicial.

A hepcidina é uma molécula envolvida na manutenção da homeostase do ferro, inibindo sua absorção intestinal e seu armazenamento nos macrófagos, e cuja deficiência está associada com progressiva sobrecarga de ferro nos tecidos (NICOLAS *et al.*, 2001). A hepcidina regula o ingresso do ferro nas células através da sua ligação à ferroportina, a molécula que exporta o ferro para o plasma, induzindo sua internalização e degradação. Isto significa que a deficiência em hepcidina leva a elevação na taxa de absorção e armazenamento de ferro, apesar de existirem reservas normais ou aumentadas desse elemento. Em contraste, elevados níveis de hepcidina levam a deficiência de ferro devido a incapacidade para absorber ferro (GANZ, 2007). TNF é capaz de suprimir a expressão de hepcidina através de um mecanismo independente de IL-6. Em contraste, IL-6 parece ser o principal mediador do aumento de hepcidina durante a inflamação (NEMETH *et al.*, 2004). Portanto, isto sugere que o aumento de TNF está relacionado com uma elevada deposição de ferro nos tecidos, e que o aumento de IL-6 apresenta o efeito contrário. Porém, em certos contextos patológicos ambos TNF e IL-6 podem também favorecer a sobrecarga de ferro nos tecidos. Um desses é a hemorragia em placas ateroscleróticas, condição na qual a hepcidina atua como um fator pró-inflamatório, sendo que o ferro por si mesmo pode agir como estímulo para a ativação da via IL-6/STAT3 induzindo hepcidina num ciclo de *feedback* positivo ferro-hepcidina que leva ao agravamento da sobrecarga de ferro, demonstrando assim que em certos cenários inclusive o aumento de IL-6 pode estar relacionado ao aumento na deposição de ferro (LI *et al.*, 2019). Estes dados suportam a relação direta entre os níveis locais de TNF e IL-6 com a acumulação de ferro na interface materno-fetal de camundongos infectados com PbA no início da gestação que foi encontrada no presente trabalho. De fato, essa relação foi mais pronunciada entre TNF e o ferro, sendo que os camundongos gestantes infectados e

tratados com inibidor da HO-1 apresentaram níveis locais de TNF significativamente reduzidos, mas apenas uma tendência a apresentarem menores níveis locais de IL-6.

Na presente investigação foi observada uma elevação nas concentrações de IFN- γ em útero/placenta como consequência da infecção nos três períodos gestacionais avaliados, sem alterações nas mesmas em resposta à modulação de HO-1, com exceção de uma diminuição nos níveis placentários quando os camundongos foram tratados com o indutor da HO-1, embora isto não levou a nenhuma melhoria no curso da gestação. Da mesma forma, foi detectado um aumento dos níveis locais de TNF em resposta à infecção, especificamente em sítios de implantação de 8dG, o qual não foi observado em camundongos do mesmo período gestacional, tratados com inibidor de HO-1. Neste sentido, a elevação dos níveis circulantes de TNF têm sido associados com perda fetal no primeiro trimestre da gestação humana (KAISLASUO *et al.*, 2020). De fato, um estudo transversal numa pequena coorte de mulheres gestantes com malária no qual a maioria dos casos se apresentavam em mulheres durante o primeiro trimestre da gestação (aproximadamente 70% dos casos) encontrou que as altas concentrações séricas de TNF e IFN- γ , bem como os polimorfismos genéticos que levam a maiores níveis destas citocinas pró-inflamatórias, estão associadas com a susceptibilidade à doença durante a gestação (NASR *et al.*, 2014). O papel de TNF durante a malária gestacional experimental foi previamente descrito no artigo de Poovassery *et al.* (2009), que observaram que a expressão de TNF é mantida em placentas de camundongos que abortam e sugerem que enquanto IFN- γ contribui com a perda fetal induzida pela infecção, TNF é o fator crítico na patologia placentária e perda fetal na malária. Outros estudos também têm reportado elevações nos níveis de TNF e outras citocinas como IFN- γ , IL-6 e IL-1 β em camundongos, macacos e mulheres gestantes infectadas com *Plasmodium* (FRIED *et al.*, 1998; DAVISON *et al.*, 2006; POOVASSERY; MOORE, 2009; SARR *et al.*, 2012; BARBOZA *et al.*, 2014; SARR *et al.*, 2015; RUIZENDAAL *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2020), sendo que os mecanismos protetores contra a infecção durante o início da gestação parecem estar relacionados com a diminuição nos níveis de TNF nos sítios de implantação.

IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que tem sido pouco estudada na malária gestacional e cujos níveis em tecidos uteroplacentários, apesar de não ter sido alterados pela infecção em si, se encontraram aumentados em camundongos infectados e tratados com ZnPPiX em relação àqueles tratados com CoPPiX no início

e no final da gestação, apesar de serem níveis muito baixos. A interpretação do papel desta citocina neste contexto precisa de estudos adicionais pois, em contraste com nossos resultados, seu aumento tem sido observado em amostras de plasma e placenta de camundongos BALB/c infectados com PbA, sendo este aumento de IL-17 associado com sequestro de hemácias na placenta e redução do peso fetal (FITRI *et al.*, 2015; RAHMAH *et al.*, 2015). De maneira oposta, Megnekou *et al.* (2015) associaram os maiores níveis de hemoglobina maternos e as menores taxas de parasitemia com as concentrações plasmáticas de IL-17A, sugerindo que essa citocina poderia estar envolvida na hematopoiese em mulheres gestantes infectadas.

Em relação aos níveis locais de TGF- β , foi observado que essa citocina foi induzida no útero aos 8dG como consequência da gestação e teve o pico da sua produção no período médio da gestação. Depois, aos 19dG, os níveis dessa citocina se reduzem até níveis semelhantes aos de camundongos com 8dG. Resultados semelhantes tinham sido observados por Shooner *et al.* (2005) em útero de ratos gestantes, com níveis crescentes de TGF- β após a implantação e encontrando o pico da sua produção aos 14dG, coincidindo com o pico de ativação de caspase 3 e a regressão da decídua basal, sugerindo que os níveis locais desta citocina regulam, de maneira fisiológica, os processos de sobrevivência e morte células durante a regressão da decídua basal. Em contraste ao observado no soro, os níveis uterinos de TGF- β aos 8dG não se apresentaram diminuídos devido à infecção e os níveis desta citocina estiveram reduzidos em animais tratados com ZnPPIX quando comparado com todos os grupos gestantes desse período, sendo esse grupo (8dG/7dl/ZnPPIX) o que apresentou a maior melhora aos efeitos deletérios da infecção. Além disso, o grupo 19dG/7dl/ZnPPIX apresentou níveis de TGF- β séricos semelhantes aos animais do grupo 19dG/NI, porém o grupo 19dG/7dl/ZnPPIX também apresentou níveis placentários reduzidos desta citocina em relação ao grupo 19dG/NI. Pode então ser conjecturado que, em camundongos tratados com ZnPPIX, os níveis circulantes de TGF- β são parcialmente produzidos fora da interface materno-fetal para auxiliar no sucesso gestacional.

Os níveis locais de IL-2 em útero/placenta não foram alterados em resposta à infecção na presente investigação. Porém, o aumento da mesma em sítios de implantação de camundongos do grupo 8dG/7dl/ZnPPIX sugere que este mediador poderia ter contribuído com a preservação das células uNK nesse grupo. Embora é bem sabido que IL-15 é a principal citocina envolvida na diferenciação e manutenção

destas células (YE *et al.*, 1996; BARBER; POLLARD, 2003), IL-2 é uma citocina pró-inflamatória que tem demonstrado induzir a proliferação de células NK *in vitro* (STARKEY, 1991) e a sua diferenciação *in vivo* (ALLEN; NILSEN-HAMILTON, 1998). De fato, ambas (IL-2 e IL-15) parecem ter semelhantes efeitos na ativação e expansão das células uNK e compartilham a cadeia β do receptor de IL-2 (IL-2R β) (CARSON *et al.*, 1994; SLIZ *et al.*, 2019).

Em vista dos bem conhecidos efeitos protetores induzidos pela HO-1 em diversos contextos e processos, revisados recentemente por Campbell *et al.* (2021), incluindo melhoria da malária cerebral (PAMPLONA *et al.*, 2007) e de infecções por outros patógenos durante a gestação (TACHIBANA *et al.*, 2008; TACHIBANA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2021), foi surpreendente encontrar que seu aumento e indução poderiam estar relacionados com danos teciduais e que, pelo contrário, sua inibição resultaria mostrou-se protetora. O trabalho de Suttner e Dennery (1999) demonstrou que a enzima tem atividade citoprotetora quando o aumento é inferior a cinco vezes a expressão inicial, enquanto que aumento da atividade da HO-1 de mais de quinze vezes foram citotóxicas e estiveram acompanhadas de aumentos nos níveis de ferro e peroxidação lipídica. Neste cenário, o tratamento com o inibidor da HO-1 estanho mesoporfirina (SnMP), diminuiu a atividade da HO-1 a níveis moderados (quatro a cinco vezes em relação ao controle) o qual diminuiu os níveis de ferro reativo e de dano oxidativo, concluindo que existe um limiar benéfico de expressão de HO-1 relacionado ao acúmulo de ferro reativo liberado na degradação de heme e que esse acúmulo torna improvável que a expressão excessiva de HO-1 ofereça uma resposta protetora. Esta hipótese suporta nossos resultados, uma vez que é possível que o tratamento com ZnPIX tenha levado a níveis de expressão moderados e funcionais na infecção durante o início da gestação, o qual foi caracterizado por um acentuado aumento na expressão da enzima. Por outro lado, a expressão de HO-1 foi inalterada e moderadamente aumentada nos períodos médio e final da gestação, respectivamente, em concordância com a redução dos efeitos protetores do ZnPIX na medida que a gestação avança, o qual poderia significar que outros mecanismos se sobrepõem na patogênese da doença nesses períodos, além dos efeitos de HO-1.

A pré-eclâmpsia constitui uma complicação gestacional cujos mecanismos de patogênese são comparáveis com a malária na gestação, provavelmente porque ambas doenças levam à restrição do crescimento intrauterino e são mais frequentes em primíparas (BRABIN; JOHNSON, 2005; DUFFY, 2007). Tendo isto em mente,

outro estudo que coincide com nossos resultados demonstrou que HO-1 apresenta uma expressão exacerbada em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia, bem como em células trofoblásticas da linhagem JEG-3 sob condições de hipóxia e que, em associação com uma reduzida ativação de STAT3, poderia contribuir para a patogênese da doença (Qu *et al.* 2018). Este mecanismo é de particular interesse para nossa pesquisa, devido a que a expressão e ativação de STAT3 são importantes para o processo de decidualização (TENG *et al.*, 2004), o qual parece ser gravemente afetado como consequência da infecção. Embora estudos adicionais são necessários para esclarecer o papel de STAT3 no contexto da indução de HO-1 na malária durante o início da gestação, o trabalho de Qu *et al.* (2018) ilustra mais um contexto no qual a expressão exacerbada de HO-1 está relacionada a condições patológicas.

Revisões recentes têm evidenciado que durante infecções por patógenos intracelulares, incluindo protozoários, HO-1 pode exercer efeitos benéficos ou prejudiciais dependendo do agente infeccioso e o órgão atingido (COSTA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020). Assim, dependendo da célula hospedeira e do patógeno, HO-1 pode atuar na proteção do hospedeiro contra as infecções ou pode contribuir para a proliferação de patógenos intracelulares (SINGH *et al.*, 2018). Estudos prévios do nosso grupo mostraram que a HO-1 está envolvida no controle do parasitismo pulmonar e intestinal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* (ARAUJO *et al.*, 2013). Seguindo a mesma linha, um recente estudo realizado no nosso laboratório encontrou que a infecção por *T. gondii* diminuiu a expressão da enzima numa linhagem celular de células trofoblásticas e que sua indução leva a redução da proliferação do parasitismo através do aumento na produção de IL-6 (ALMEIDA *et al.*, 2021). No caso da malária, dependendo do contexto ou órgão estudado, HO-1 e os produtos derivados da sua atividade têm demonstrado promover efeitos favoráveis (PAMPLONA *et al.*, 2007; SEIXAS *et al.*, 2009; PENA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2019) e deletérios (SCHLUESENER; KREMSNER; MEYERMANN, 2001; TAKEDA *et al.*, 2005; EPIPHANIO *et al.*, 2008; WALTHER *et al.*, 2012). A expressão da enzima tem mostrado estar aumentada no fígado materno (CRESSMAN *et al.*, 2014; NAJJAR *et al.*, 2019) e em sítios de implantação de camundongos gestantes infectados (SARR *et al.*, 2017; MORFFY SMITH *et al.*, 2019). Em concordância, neste trabalho foi encontrado um aumento na expressão da enzima no útero e placenta de camundongos gestantes infectados no início e no final na gestação.

Em resumo, os dados do presente estudo sugerem que a infecção por PbA causa um aumento na hemólise liberando grandes quantidades de heme que levaria a uma expressão exacerbada de HO-1 na interface materno fetal no início da gestação, isto por sua vez levaria a um aumento na deposição de ferro neste tecido provocando estresse oxidativo via peroxidação lipídica, a qual em conjunto com a resposta pró-inflamatória mediada principalmente por TNF levaria à perda embrionária. O tratamento com o inibidor da enzima ZnPPIX poderia estar modulando a atividade da enzima para que esta possa exercer suas funções benéficas, sendo isto verificado pelo aumento do sucesso gestacional durante a infecção. Nesse sentido, estudos adicionais são necessários para determinar se neste contexto o ferro estaria causando morte celular por apoptose ou ferroptose e como moléculas transportadoras de ferro estariam atuando para induzir ou prevenir o acúmulo de ferro neste cenário.

Os resultados da presente investigação, ressaltam a importância desse estudo na malária gestacional e abre novas perspectivas no manejo terapêutico da HO-1 nesse contexto.

7. CONCLUSÕES

- Os elevados níveis sorológicos de heme podem estar levando a um aumento na expressão de transcritos da HO-1 na interface materno-fetal no de camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA quando avaliados no início e final da gestação.
- A expressão exacerbada de mRNA HO-1 em sítios de implantação embrionária de camundongos com 8 dias de gestação parece ter induzido um aumento na deposição de ferro, estresse oxidativo e inflamação durante a perda embrionária induzida pela infecção.
- A infecção levou à diminuição de células NK uterinas no início da gestação, porém não alterou o número desse fenótipo celular no terço médio da gestação, entretanto, observou-se um menor remodelamento das artérias espiraladas o que poderia estar relacionado ao estado de ativação dessas células.
- O tratamento com inibidor da enzima levou a atenuação dos efeitos adversos da infecção durante a gestação, tanto na mãe quanto no embrião/feto em desenvolvimento. O mecanismo subjacente na proteção durante o início da gestação envolve a modulação da HO-1, presumivelmente até níveis funcionais, o qual leva a menor deposição de ferro na interface materno fetal, menor estresse oxidativo e menores níveis de TNF que, em conjunto com o aumento nos níveis de IL-2 poderia promover a preservação no número de células NK na decídua, levando a um aumento no sucesso gestacional.
- A proteção conferida com a inibição de HO-1 foi diminuindo na medida que a gestação avança, sugerindo que outros mecanismos de patogenicidade induzidos pela infecção poderiam ser mais importantes para a geração de danos em estágios avançados da gestação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 8^o. ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2014.
- ABRAMS, E. T. *et al.* Malaria during pregnancy and foetal haematological status in Blantyre, Malawi. **Malar J**, v. 4, p. 39, 2005. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-39>.
- ACCROMBESSI, M. *et al.* Prevalence and Associated Risk Factors of Malaria in the First Trimester of Pregnancy: A Preconceptional Cohort Study in Benin. **J Infect Dis**, v. 217, n. 8, p. 1309-1317, 2018. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy009>.
- ADAMSON, S. L. *et al.* Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Dev Biol**, v. 250, n. 2, p. 358-373, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)90773-6](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)90773-6).
- AKANBI, O. M.; ODAIBO, A. B.; ADEMOWO, O. G. Effect of antimalarial drugs and malaria infection on oxidative stress in pregnant women. **Afr J Reprod Health**, v. 14, n. 3, p. 209-212, 2010.
- AKISON, L. K. *et al.* Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. **Placenta**, v. 54, p. 52-58, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.114>.
- ALI, A. A. *et al.* Hypoglycaemia and severe *Plasmodium falciparum* malaria among pregnant Sudanese women in an area characterized by unstable malaria transmission. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 88, 2011. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-88>.
- ALLEN, M. P.; NILSEN-HAMILTON, M. Granzymes D, E, F, and G are regulated through pregnancy and by IL-2 and IL-15 in granulated metrial gland cells. **J Immunol.**, v. 161, n. 6, p. 2772-2779, 1998.
- ALMEIDA, M. P. O. *et al.* Heme Oxygenase-1 Induction in Human BeWo Trophoblast Cells Decreases *Toxoplasma gondii* Proliferation in Association With the Upregulation of p38 MAPK Phosphorylation and IL-6 Production. **Front Microbiol**, v. 12, p. 659028, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659028>.
- ALVES, M. J. *et al.* Malária congênita no município de Leme, SP. **J Pediatr (Rio J)**, v. 71, n. 3, p. 163-165, 1995. <https://doi.org/10.2223/jped.747>.
- ANDER, S. E.; DIAMOND, M. S.; COYNE, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. **Sci Immunol**, v. 4, n. 31, p. eaat6114, 2019. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114>.
- ARAUJO, E. C. *et al.* Heme oxygenase-1 activity is involved in the control of *Toxoplasma gondii* infection in the lung of BALB/c and C57BL/6 and in the small intestine of C57BL/6 mice. **Vet Res**, v. 44, n. 1, p. 89, 2013. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-89>.

ASHKAR, A. A. *et al.* Assessment of Requirements for IL-15 and IFN Regulatory Factors in Uterine NK Cell Differentiation and Function During Pregnancy. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 2937-2944, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.2937>.

AVERY, J. W. *et al.* Maternal malaria induces a procoagulant and antifibrinolytic state that is embryotoxic but responsive to anticoagulant therapy. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31090, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031090>.

BAHIZIRE, E. *et al.* Malaria and Iron Load at the First Antenatal Visit in the Rural South Kivu, Democratic Republic of the Congo: Is Iron Supplementation Safe or Could It Be Harmful? **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, n. 2, p. 520-523, 2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0585>.

BANKHEAD, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 16878, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>.

BARATEIRO, A. *et al.* Contribution of Murine Models to the Study of Malaria During Pregnancy. **Front Microbiol**, v. 10, p. 1369, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01369>.

BARBER, E. M.; POLLARD, J. W. The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. **J Immunol**, v. 171, n. 1, p. 37-46, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.37>.

BARBOZA, R. *et al.* MyD88 signaling is directly involved in the development of murine placental malaria. **Infect Immun**, v. 82, n. 2, p. 830-8, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01288-13>.

BARBOZA, R. *et al.* TLR4-Mediated Placental Pathology and Pregnancy Outcome in Experimental Malaria. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 8623, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08299-x>.

BEGLEY, D. J.; FIRTH, J. A.; HOULT, J. R. S. Implantation and Establishment of the Conceptus. In: BEGLEY, D. J.; FIRTH, J. A.; HOULT, J. R. S. **Human reproduction and developmental biology**. 1. ed. London: The MacMillan Press LTD, 1980. Cap. 5, p. 250.

BEVILACQUA, E.; LORENZON, A. R.; BANDEIRA, C. L. Biology of the Ectoplacental Cone. In: CROY, A., *et al.* **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Cambridge, MA: Academic Press - Elsevier, 2014. Cap. 10, p. 113-124.

BHATIA, R.; RAJWANIYA, D.; AGRAWAL, P. Congenital Malaria due to *Plasmodium vivax* Infection in a Neonate. **Case Rep Pediatr**, v. 2016, p. 1929046, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1929046>.

BISWAS, C. *et al.* Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. **J Biol Chem**, v. 289, n. 39, p. 26882-26894, 2014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567685>.

BOARETO, A. C. *et al.* Maternal and fetal outcome of pregnancy in Swiss mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA GFP. **Reprod Toxicol**, v. 89, p. 107-114, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.07.011>.

BOTELHO-NEVERS, E. *et al.* Imported malaria in pregnancy: a retrospective study of 18 cases in Marseilles, France. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 99, n. 7, p. 715-718, 2005. <https://doi.org/10.1179/136485905X65099>.

BOUILLOT, S. *et al.* Tracing the Glycogen Cells with Protocadherin During Mouse Placenta Development. **Placenta**, v. 26, p. 882-888, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.09.009>.

BRABIN, B. J.; JOHNSON, P. M. Placental malaria and pre-eclampsia through the looking glass backwards?. **J Reprod Immunol**, v. 65, n. 1, p. 1-15, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2004.09.006>.

BROSENS, I.; ROBERTSON, W.; DIXON, H. G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. **J Pathol Bacteriol**, v. 93, n. 2, p. 569-579, 1967. <https://doi.org/10.1002/path.1700930218>.

BURNETT, J. L.; CARNS, J. L.; RICHARDS-KORTUM, R. In vivo microscopy of hemozoin: towards a needle free diagnostic for malaria. **Biomed Opt Express**, v. 6, n. 9, p. 3462-3474, 2015. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.003462>.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 370, n. 1663, p. 20140066, 2015. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0066>.

CAMPBELL, N. K.; FITZGERALD, H. K.; DUNNE, A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. **Nat Rev Immunol**, v. 21, n. 7, p. 411-425, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00491-x>.

CARLYLE, J. R. *et al.* Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. **J Immunol**, v. 176, n. 12, p. 7511-7524, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7511>.

CARSON, W. E. *et al.* Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. **J Exp Med**, v. 180, n. 4, p. 1395-1403, 1994. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1395>.

CARTWRIGHT, J. E. *et al.* Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. **Reproduction**, v. 140, n. 6, p. 803-813, 2010. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0294>.

CHAIYAROJ, S. C. *et al.* Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. **Acta Trop**, v. 89, n. 3, p. 319-327, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.010>.

CORONADO, L. M.; NADOVICH, C. T.; SPADAFORA, C. Malarial hemozoin: from target to tool. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 6, p. 2032-2041, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.009>.

COSTA, D. L. *et al.* Pharmacological Inhibition of Host Heme Oxygenase-1 Suppresses *Mycobacterium tuberculosis* Infection In Vivo by a Mechanism Dependent on T Lymphocytes. **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01675-16, 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.01675-16>.

COSTA, D. L. *et al.* Modulation of Inflammation and Immune Responses by Heme Oxygenase-1: Implications for Infection with Intracellular Pathogens. **Antioxidants (Basel)**, v. 9, n. 12, p. 1205, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9121205>.

COSTA, D. L. *et al.* Heme oxygenase-1 inhibition promotes IFN γ - and NOS2-mediated control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Mucosal Immunol**, v. 14, n. 1, p. 253-266, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00342-x>.

CRESSMAN, A. M. *et al.* Malaria infection alters the expression of hepatobiliary and placental drug transporters in pregnant mice. **Drug Metab Dispos**, v. 42, n. 4, p. 603-610, 2014. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.053983>.

CROCKER, I. P. *et al.* Syncytiotrophoblast degradation and the pathophysiology of the malaria-infected placenta. **Placenta**, v. 25, n. 4, p. 273-82, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2003.09.010>.

CROY, B. A. *et al.* Analysis of uterine natural killer cells in mice. In: CAMPBELL, K. S. **Natural Killer Cell Protocols**. 2. ed. Totowa - NJ: Humana Press - Springer, v. 612, 2010. Cap. 31, p. 465-503. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-362-6_31.

DAVISON, B. B. *et al.* The role of soluble tumor necrosis factor receptor types I and II and tumor necrosis factor-alpha in malaria during pregnancy. **J Infect Dis**, v. 194, n. 1, p. 123-132, 2006. <https://doi.org/10.1086/504694>.

DE PONTUAL, L. *et al.* Report of a Case of Congenital Malaria *Plasmodium malariae* in France. **J Trop Pediatr**, v. 52, n. 6, p. 448–450, 2006. <https://doi.org/10.1093/tropej/fml049>.

DEL PUNTA, V. *et al.* Congenital *Plasmodium vivax* malaria mimicking neonatal sepsis: a case report. **Malar J**, v. 9, p. 63, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-63>.

DESAI, M. *et al.* Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 93-104, 2007. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70021-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70021-X).

DIALLO, S. *et al.* Malaria early in the first pregnancy: Potential impact of iron status. **Clin Nutr**, v. 39, n. 1, p. 204-214, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.01.016>.

DOMBROWSKI, J. G. *et al.* Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study. **PLoS One**, v. 13, n. 6, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199415>.

DOMBROWSKI, J. G. *et al.* Adverse pregnancy outcomes are associated with *Plasmodium vivax* malaria in a prospective cohort of women from the Brazilian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 15, n. 4, p. e0009390, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009390>.

DUFFY, P. E. *Plasmodium* in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. **Parasitology**, v. 134, n. 13, p. 1877-1881, 2007. <https://doi.org/10.1017/S0031182007000170>.

DUVIGNEAU, J. C.; ESTERBAUER, H.; KOZLOV, A. V. Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. **Antioxidants (Basel)**, v. 8, n. 10, p. 475, 2019. <https://doi.org/10.3390/antiox8100475>.

EPIPHANIO, S. *et al.* Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine *Plasmodium* liver infection. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 5, p. 331-338, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.04.003>.

ERLEBACHER, A. Leukocyte Population Dynamics and Functions at the Maternal–Fetal Interface. In: CROY, A., *et al.* **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Cambridge, MA: Academic Press - Elsevier, 2014. Cap. 19, p. 227-242.

FAVARO, R.; ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, M. T. Decidualization and Endometrial Extracellular Matrix Remodeling. In: CROY, A., *et al.* **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Cambridge, MA: Academic Press - Elsevier, 2014. Cap. 11, p. 125-142.

FERNÁNDEZ-MENDÍVIL, C. *et al.* Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: Implication of iron metabolism. **Redox Biology**, v. 38, p. 101789, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101789>.

FISHER, A. L. *et al.* Iron-dependent apoptosis causes embryotoxicity in inflamed and obese pregnancy. **Nat Commun**, v. 12, n. 1, p. 4026, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24333-z>.

FITRI, L. E. *et al.* Low Fetal Weight is Directly Caused by Sequestration of Parasites and Indirectly by IL-17 and IL-10 Imbalance in the Placenta of Pregnant Mice with Malaria. **Korean J Parasitol**, v. 53, n. 2, p. 189-196, 2015. <https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.2.189>.

FLEISCHHACKER, A. S. *et al.* The heme-regulatory motifs of heme oxygenase-2 contribute to the transfer of heme to the catalytic site for degradation. **J Biol Chem**, v. 295, n. 16, p. 5177-5191, 2020. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012803>.

FONTES, K. N. *et al.* Dysregulation of placental ABC transporters in a murine model of malaria-induced preterm labor. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 11488, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47865-3>.

FRIED, M. *et al.* Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. **J Immunol**, v. 160, n. 5, p. 2523-2530, 1998.

FRIED, M.; DUFFY, P. E. Adherence of *Plasmodium falciparum* to chondroitin sulfate A in the human placenta. **Science**, v. 272, n. 5267, p. 1502-1504, 1996. <https://doi.org/10.1126/science.272.5267.1502>.

FURUYA, M. *et al.* Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension. **Vasc Health Risk Manag**, v. 4, n. 6, p. 1301-1313, 2008. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s4009>.

GABAY, T.; GINSBURG, H. Hemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysate--a possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites. **Exp Parasitol**, v. 77, n. 3, p. 261-272, 1993. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1084>.

GAMLIEL, M. *et al.* Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies. **Immunity**, v. 48, n. 5, p. 951-962.e5, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.030>.

GANZ, T. Molecular control of iron transport. **J Am Soc Nephrol**, p. 394-400, 2007. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006070802>.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.

HANNA, J.; MANDELBOIM, O. When killers become helpers. **Trends Immunol**, v. 28, n. 5, p. 201-206, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.03.005>.

HEMBERGER, M.; HANNA, C. W.; DEAN, W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. **Nat Rev Genet**, v. 21, n. 1, p. 27-43, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0169-4>.

HIRAKO, I. C. *et al.* Daily Rhythms of TNF α Expression and Food Intake Regulate Synchrony of *Plasmodium* Stages with the Host Circadian Cycle. **Cell Host Microbe**, v. 23, n. 6, p. 796-808.e6, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.016>.

HUY, N. T. *et al.* An improved colorimetric method for quantitation of heme using tetramethylbenzidine as substrate. **Anal Biochem**, v. 344, n. 2, p. 289-291, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.022>.

IYER, J. K. *et al.* Zinc protoporphyrin IX binds heme crystals to inhibit the process of crystallization in *Plasmodium falciparum*. **Mol Med**, v. 9, n. 5-8, p. 175-182, 2003. <https://doi.org/10.2119/2003-00010.sullivan>.

JIMÉNEZ, B. C. *et al.* Imported malaria in pregnancy in Madrid. **Malar J**, v. 11, p. 112, 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-112>.

KAISLASUO, J. *et al.* IL-10 to TNF α ratios throughout early first trimester can discriminate healthy pregnancies from pregnancy losses. **Am J Reprod Immunol**, v. 83, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1111/aji.13195>.

KALILANI-PHIRI, L. *et al.* Timing of malaria infection during pregnancy has characteristic maternal, infant and placental outcomes. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74643, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074643>.

KIECKBUSCH, J. *et al.* Disrupted PI3K p110 δ Signaling Dysregulates Maternal Immune Cells and Increases Fetal Mortality In Mice. **Cell Rep**, v. 13, n. 12, p. 2817-2828, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.050>.

KONG, C. S. *et al.* Embryo biosensing by uterine natural killer cells determines endometrial fate decisions at implantation. **The FASEB Journal**, v. 35, p. e21336, 2021. <https://doi.org/10.1096/fj.202002217R>.

KWON, M. Y. *et al.* Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. **Oncotarget**, v. 6, n. 27, p. 24393-24403, 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget>.

LATUNDE-DADA, G. O. Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. **Biochim Biophys Acta Gen Subj**, v. 1861, n. 8, p. 1893-1900, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.019>.

LI, B. *et al.* Increased hepcidin in hemorrhagic plaques correlates with iron-stimulated IL-6/STAT3 pathway activation in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 515, n. 2, p. 394-400, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.123>.

LIMA JÚNIOR, J. P. D. *et al.* Anacardium humile St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and α -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. **J Ethnopharmacol**, v. 268, p. 113667, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113667>.

LINZKE, N. *et al.* Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. **Hypertension**, v. 63, n. 3, p. 580-588, 2014. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02403>.

MAINES, M. D. Zinc. protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat. **Biochim Biophys Acta**, v. 67, n. 3, p. 339-350, 1981. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90465-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90465-7).

MALASSINÉ, A.; FRENDON, J. L.; EVAIN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. **Hum Reprod Update**, v. 9, n. 6, p. 531-539, 2003. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg043>.

MCCOUBREY, W. K. J.; HUANG, T. J.; MAINES, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur J Biochem**, v. 247, n. 2, p. 725-732, 1997. 10.1111/j.1432-1033.1997.00725.x.

MCDONALD, C. R. *et al.* Malaria in pregnancy alters l-arginine bioavailability and placental vascular development. **Sci Transl Med**, v. 10, n. 431, p. eaan6007, 2018. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan6007>.

MCGREADY, R. *et al.* Why is WHO failing women with falciparum malaria in the first trimester of pregnancy? **Lancet**, v. 395, n. 10226, p. 779, 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30161-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30161-6).

- MEGNEKOU, R. *et al.* Effects of Pregnancy-associated Malaria on T Cell Cytokines in Cameroonian Women. **Scand J Immunol**, v. 81, n. 6, p. 508-514, 2015. <https://doi.org/10.1111/sji.12286>.
- MEJIA, G. A. *et al.* Malaria in a liver transplant recipient: a case report. **Transplant Proc**, v. 38, n. 9, p. 3132-3134, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.08.187>.
- MEYER, N. *et al.* Chymase-producing cells of the innate immune system are required for decidual vascular remodeling and fetal growth. **Sci Rep**, v. 7, p. 45106, 2017a. <https://doi.org/10.1038/srep45106>.
- MEYER, N. *et al.* Safeguarding of Fetal Growth by Mast Cells and Natural Killer Cells: Deficiency of One Is Counterbalanced by the Other. **Front. Immunol.** v. 8, p. 711, 2017b. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00711>.
- MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 9, p. 656-663, 2002. <https://doi.org/10.1038/nri886>.
- MOHAN, K.; MAITHANI, M. M. Congenital Malaria due to Chloroquine-Resistant *Plasmodium vivax*: A Case Report. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 56, n. 6, p. 454–455, 2010. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmq025>.
- MOR, G. *et al.* Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1221, p. 80-87, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x>.
- MOR, G.; ALDO, P.; ALVERO, A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. **Nat Rev Immunol**, v. 17, p. 469–482, 2017. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.64>.
- MORDMÜLLER, B. *et al.* First-in-human, Randomized, Double-blind Clinical Trial of Differentially Adjuvanted PAMVAC, A Vaccine Candidate to Prevent Pregnancy-associated Malaria. **Clin Infect Dis**, v. 69, n. 9, p. 1509-1516, 2019. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1140>.
- MORFFY SMITH, C. D. *et al.* A novel murine model for assessing fetal and birth outcomes following transgestational maternal malaria infection. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 19566, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55588-8>.
- MUNGAI, M. *et al.* Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. **N Engl J Med**, v. 344, n. 26, p. 1973-1978, 2001. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106283442603>.
- NAJJAR, N. *et al.* Dysregulation of solute carrier transporters in malaria-infected pregnant mice. **Parasite Immunol**, v. 41, n. 4, p. e12614, 2019. <https://doi.org/10.1111/pim.12614>.
- NASR, A. *et al.* IFN-gamma and TNF associated with severe falciparum malaria infection in Saudi pregnant women. **Malar J**, v. 13, p. 314, 2014. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-314>.

NEMETH, E. *et al.* IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J Clin Invest**, v. 113, n. 9, p. 1271-1276, 2004. <https://doi.org/10.1172/JCI20945>.

NERES, R. *et al.* Pregnancy outcome and placenta pathology in *Plasmodium berghei* ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1608, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001608>.

NGAI, M. *et al.* Malaria in Pregnancy and Adverse Birth Outcomes: New Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Trends Parasitol**, v. 36, n. 2, p. 127-137, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.005>.

NICOLAS, G. *et al.* Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 15, p. 8780-8785, 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.151179498>.

NILSSON, S. K. *et al.* Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 6, p. e1004871, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004871>.

NKOKA, O.; CHUANG, T. W.; CHEN, Y. H. Association between timing and number of antenatal care visits on uptake of intermittent preventive treatment for malaria during pregnancy among Malawian women. **Malar J**, v. 17, p. 211, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2360-z>.

ODORIZZI, P. M.; FEENEY, M. E. Impact of In Utero Exposure to Malaria on Fetal T Cell Immunity. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 10, p. 877-888, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.08.005>.

ORDI, J. *et al.* Placental malaria is associated with cell-mediated inflammatory responses with selective absence of natural killer cells. **J Infect Dis**, v. 183, n. 7, p. 1100-1107, 2001. <https://doi.org/10.1086/319295>.

OTHORO, C. *et al.* Elevated gamma interferon-producing NK cells, CD45RO memory-like T cells, and CD4 T cells are associated with protection against malaria infection in pregnancy. **Infect Immun**, v. 76, n. 4, p. 1678-1685, 2008. <https://doi.org/10.1128/IAI.01420-07>.

PAFFARO, V. A. J. *et al.* Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**, v. 24, n. 5, p. 479-488, 2003. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0919>.

PAMPLONA, A. *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nat Med**, v. 13, n. 6, p. 703-710, 2007. <https://doi.org/10.1038/nm1586>.

PANG, S. C. *et al.* Implant Site Dissections. In: CROY, A., *et al.* **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Cambridge, MA: Academic Press - Elsevier, 2014. Cap. 2, p. 21-42.

PANG, S. C. *et al.* The Cycling and Pregnant Mouse: Gross Anatomy. In: CROY, A., *et al.* **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Cambridge, MA: Academic Press - Elsevier, 2014. Cap. 1, p. 3-19.

PAWLAK, J. B. *et al.* Lymphatic mimicry in maternal endothelial cells promotes placental spiral artery remodeling. **J Clin Invest**, v. 129, n. 11, p. 4912-4921, 2019. <https://doi.org/10.1172/JCI120446>.

PENA, A. C. *et al.* A novel carbon monoxide-releasing molecule fully protects mice from severe malaria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 3, p. 1281-1290, 2012. <https://doi.org/10.1128/AAC.05571-11>.

PENHA-GONÇALVES, C.; GOZZELINO, R.; DE MORAES, L. V. Iron overload in *Plasmodium berghei*-infected placenta as a pathogenesis mechanism of fetal death. **Front Pharmacol**, v. 5, n. 155, p. 1-13, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00155>.

PEREIRA, M. L. *et al.* Association of Heme Oxygenase 1 with Lung Protection in Malaria-Associated ALI/ARDS. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 4158698, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4158698>.

POOVASSERY, J. S. *et al.* Malaria-induced murine pregnancy failure: distinct roles for IFN-gamma and TNF. **J Immunol**, v. 183, n. 8, p. 5342-5349, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901669>.

POOVASSERY, J.; MOORE, J. M. Murine malaria infection induces fetal loss associated with accumulation of *Plasmodium chabaudi* AS-Infected Erythrocytes in the Placenta. **Infect Immun**, v. 74, n. 5, p. 2839-2848, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.2839-2848.2006>.

POOVASSERY, J.; MOORE, J. M. Association of malaria-induced murine pregnancy failure with robust peripheral and placental cytokine responses. **Infect Immun**, v. 77, n. 11, p. 4998-5006, 2009. <https://doi.org/10.1128/IAI.00617-09>.

QU, H. M. *et al.* Overexpressed HO-1 is associated with reduced STAT3 activation in preeclampsia placenta and inhibits STAT3 phosphorylation in placental JEG-3 cells under hypoxia. **Arch Med Sci**, v. 14, n. 3, p. 597-607, 2018. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63261>.

RAHMAH, Z. *et al.* Parasitemia Induces High Plasma Levels of Interleukin-17 (IL-17) and Low Levels of Interleukin-10 (IL-10) and Transforming Growth Factor- β (TGF- β) in Pregnant Mice Infected with Malaria. **Malays J Med Sci**, v. 22, n. 3, p. 25-32, 2015.

RAMOS, S. *et al.* Renal control of disease tolerance to malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 116, n. 12, p. 5681-5686, 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822024116>.

REIS, A. S. *et al.* Inflammasome activation and IL-1 signaling during placental malaria induce poor pregnancy outcomes. **Sci Adv**, v. 6, n. 10, p. eaax6346, 2020. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax6346>.

ROBERTSON, S. A.; PETROFF, M. G.; HUNT, J. S. Immunology of Pregnancy. In: PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 4. ed. Cambridge - MA: Academic Press - Elsevier, 2015. p. 1835-1874. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00041-7>.

ROCKWOOD, N. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Induction of Heme Oxygenase-1 Expression Is Dependent on Oxidative Stress and Reflects Treatment Outcomes. **Front Immunol**, v. 8, p. 542, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00542>.

ROGERSON, S. J. *et al.* Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 105-17, 2007. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70022-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70022-1).

ROGERSON, S. J.; MWAPASA, V.; MESHNICK, S. R. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 6, p. 14-22, 2007.

ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental development: Lessons from mouse mutants. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 7, p. 538-548, 2001. <https://doi.org/10.1038/35080570>.

RUIZENDAAL, E. *et al.* Interleukin-10 and soluble tumor necrosis factor receptor II are potential biomarkers of *Plasmodium falciparum* infections in pregnant women: a case-control study from Nanoro, Burkina Faso. **Biomark Res**, v. 5, p. 34, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0114-7>.

RYTER, S. W.; ALAM, J.; CHOI, A. M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. **Physiol Rev**, v. 86, n. 2, p. 583-650, 2006. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2005>.

SAHA, S. *et al.* An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5474, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>.

SALANTI, A. *et al.* Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. **Mol Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 179-191, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03570.x>.

SALIFU, H. *et al.* Iron Supplementation Alters Heme and Heme Oxygenase 1 (HO-1) Levels In Pregnant Women in Ghana. **SOJ Microbiol Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 1-22, 2016. <https://doi.org/10.15226/sojmid/4/2/00154>.

SARR, D. *et al.* *Plasmodium chabaudi* AS induces pregnancy loss in association with systemic pro-inflammatory immune responses in A/J and C57BL/6 mice. **Parasite Immunol**, v. 34, p. 224-235, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01355.x>.

SARR, D. *et al.* Differential roles of inflammation and apoptosis in initiation of mid-gestational abortion in malaria-infected C57BL/6 and A/J mice. **Placenta**, v. 36, n. 7, p. 738-749, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.04.007>.

SARR, D. *et al.* Oxidative Stress: A Potential Therapeutic Target in Placental Malaria. **Immunohorizons**, v. 1, n. 4, p. 29-41, 2017.

<https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700002>.

SARTELET, H. *et al.* Less HLA-G expression in *Plasmodium falciparum*-infected third trimester placentas is associated with more natural killer cells. **Placenta**, v. 26, n. 6, p. 505-11, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.08.006>.

SCHANTZ-DUNN, J.; NOUR, N. M. Malaria and pregnancy: a global health perspective. **Rev Obstet Gynecol**, v. 2, n. 3, p. 186-92, 2009.

SCHLUESENER, H. J.; KREMSNER, P. G.; MEYERMANN, R. Heme oxygenase-1 in lesions of human cerebral malaria. **Acta Neuropathol.**, v. 101, n. 1, p. 65–8, 2001. <https://doi.org/10.1007/s004010000250>.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 9, p. 722-735, 2005. <https://doi.org/10.1038/nri1686>.

SCHUMACHER, A. *et al.* Blockage of heme oxygenase-1 abrogates the protective effect of regulatory T cells on murine pregnancy and promotes the maturation of dendritic cells. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42301, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042301>.

SCHUMACHER, A.; ZENCLUSSEN, A. C. Effects of heme oxygenase-1 on innate and adaptive immune responses promoting pregnancy success and allograft tolerance. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 288, 2015.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00288>.

SEIXAS, E. *et al.* Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 37, p. 15837-42, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903419106>.

SHARMA, L.; KAUR, J.; SHUKLA, G. Role of oxidative stress and apoptosis in the placental pathology of *Plasmodium berghei* infected mice. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32694, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.003269>.

SHARMA, L.; SHUKLA, G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. **Front Med (Lausanne)**, v. 4, p. 117, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00117>.

SHOONER, C. *et al.* TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 3, p. 20, 2005.

<https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-20>.

SHREEVE, N. *et al.* The CD94/NKG2A inhibitory receptor educates uterine NK cells to optimize pregnancy outcomes in humans and mice. **Immunity**, v. 54, n. 6, p. 1231-1244.e4, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.021>.

SILVA, R. C. M. C. *et al.* Heme oxygenase-1 in protozoan infections: A tale of resistance and disease tolerance. **PLoS Pathog**, v. 16, n. 7, p. e1008599, 2020.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008599>.

SIMMONS, D. G. Postimplantation Development of the Chorioallantoic Placenta. In: CROY, A., *et al.* **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. Cambridge, MA: Academic Press - Elsevier, 2014. Cap. 12, p. 143-161.

SINGH, N. *et al.* Host heme oxygenase-1: Friend or foe in tackling pathogens? **IUBMB Life**, v. 70, n. 9, p. 869-880, 2018. <https://doi.org/10.1002/iub.1868>.

SLIZ, A. *et al.* Gab3 is required for IL-2- and IL-15-induced NK cell expansion and limits trophoblast invasion during pregnancy. **Sci Immunol**, v. 4, n. 38, p. eaav3866, 2019. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav3866>.

SOJKA, D. K. *et al.* Cutting Edge: Local Proliferation of Uterine Tissue-Resident NK Cells during Decidualization in Mice. **J Immunol**, v. 201, n. 9, p. 2551-2556, 2018. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800651>.

SONES, J. L.; DAVISSON, R. L. Preeclampsia, of mice and women. **Physiol Genomics**, v. 48, n. 8, p. 565-572, 2016. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00125.2015>.

SOTOODEH JAHROMI, A. *et al.* Association of Tumor Growth Factor- β and Interferon- γ Serum Levels With Insulin Resistance in Normal Pregnancy. **Glob J Health Sci**, v. 8, n. 6, p. 25-32, 2015. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n6p25>.

STARKEY, P. M. Expression on cells of early human pregnancy decidua, of the p75, IL-2 and p145, IL-4 receptor proteins. **Immunology**, v. 73, n. 1, p. 64-70, 1991.

SUTTNER, D. M.; DENNERY, P. A. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. **FASEB J**, v. 13, n. 13, p. 1800-1809, 1999. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.13.1800>.

TACHIBANA, M. *et al.* Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. **Microb Pathog**, v. 45, n. 2, p. 105-109, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.04.002>.

TACHIBANA, M. *et al.* Protective role of heme oxygenase-1 in *Listeria monocytogenes*-induced abortion. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25046, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025046>.

TAKEDA, M. *et al.* Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. **Jpn J Infect Dis**, v. 58, n. 5, p. 268-271, 2005.

TENG, C. B. *et al.* Differential expression and activation of Stat3 during mouse embryo implantation and decidualization. **Mol Reprod Dev**, v. 69, n. 1, p. 1-10, 2004. <https://doi.org/10.1002/mrd.20149>.

TORNYIGAH, B. *et al.* *Plasmodium falciparum* VAR2CSA-Specific IgG Subclass Responses Reflect Protection Against Low Birth Weight and Pregnancy-Associated Malaria. **Front Immunol.**, v. 12, p. 610305, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.610305>.

WAISBERG, M. *et al.* The impact of genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus on placental malaria in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62820, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062820>.

WALTHER, M. *et al.* HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002579, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002579>.

WHITE, N. J. *et al.* Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in falciparum malaria. **N Engl J Med**, v. 309, n. 2, p. 61-66, 1983. <https://doi.org/10.1056/NEJM198307143090201>.

WHO. **World malaria report 2015**. Geneva, p. 280. 2015. <https://www.paho.org/en/documents/world-malaria-report-2015>.

WHO. **World malaria report 2019**. Geneva, p. 232. 2019. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721>.

WHO. **World malaria report 2020**. Geneva, p. 300. 2020. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015791>.

WOODS, L.; PEREZ-GARCIA, V.; HEMBERGER, M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth-New Insights From Mouse Models. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 570, 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00570>.

YANOW, S. K. *et al.* Impact of Malaria in Pregnancy as Latin America Approaches Elimination. **Trends Parasitol**, v. 32, n. 5, p. 416-427, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.01.008>.

YASUI, Y. *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits cytokine production by activated mast cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 354, n. 2, p. 485-490, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.228>.

YE, W. *et al.* The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. **J Exp Med**, v. 184, n. 6, p. 2405-2410, 1996. <https://doi.org/10.1084/jem.184.6.2405>.

ZENCLUSSEN, A. C. *et al.* Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 1, p. 82-94, 2006. <https://doi.org/10.1002/eji.200535428>.

ZHOU, C. *et al.* Developmental aspect of decidual patterning. **Reprod Dev Med**, v. 1, p. 100-114, 2017. <https://doi.org/10.4103/2096-2924.216864>.

ZUZARTE-LUIS, V.; MOTA, M. M.; VIGÁRIO, A. M. Malaria infections: what and how can mice teach us. Aug. doi. **J Immunol Methods**, v. 410, p. 113-22, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.05.001>.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1. Certificado de aprovação do projeto pelo comitê de ética



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Papel da hemeoxigenase-1 na malária congênita”, protocolo nº 066/17, sob a responsabilidade de **Neide Maria Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **15 de setembro de 2017**.

(We certify that the project entitled “Papel da hemeoxigenase-1 na malária congênita”, protocol 066/17, under the responsibility of Neide Maria Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 15th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 01/11/2017 Término: 01/03/2021
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongos
Número de animais	416
Peso / Idade	22 g / 8 – 12 semanas
Sexo	Machos e fêmeas
Origem / Local	CBEA – UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 16 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU