



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto De Ciências Biomédicas
Programa De Pós-Graduação Em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Papel do Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) na infecção por *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} durante a gestação em camundongos C57BL/6

Andrea Tatiana Durán Rodriguez

Uberlândia
Fevereiro-2022



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto De Ciências Biomédicas
Programa De Pós-Graduação Em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Papel do Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) na infecção por *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} durante a gestação em camundongos C57BL/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

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

Andrea Tatiana Durán Rodriguez

Uberlândia
Fevereiro-2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

D948p Durán Rodriguez, Andrea Tatiana, 1994-
2022 Papel do Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) na infecção por *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} durante a gestação em camundongos C57BL/6 [recurso eletrônico] / Andrea Tatiana Durán Rodriguez. - 2022.

Orientadora: Neide Maria da Silva.

Coorientadora: Yusmaris Josefina Cariaco Sifontes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5307>

Inclui bibliografia.

I. Citologia. I. Silva, Neide Maria da, 1961-, (Orient.). II. Sifontes, Yusmaris Josefina Cariaco, 1989- III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

Glória Aparecida
Bibliotecária - CRB-6/2047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas

Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 03/2022, do PPGBC				
Data:	25/02/2022	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:50
Matrícula do Discente:	11922BCE001				
Nome do Discente:	Andrea Tatiana Duran Rodriguez				
Título do Trabalho:	Papel do Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF) na infecção por <i>Plasmodium berghei</i> NK65GFP durante a gestação em camundongos C57BL/6				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia Celular de Doenças Infecciosas e Degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Papel do ferro e da Heme-oxigenase-1 na infecção por Toxoplasma e toxoplasmose e malária congênitas				

Reuniu-se, de forma Virtual, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, da Universidade Federal de Uberlândia, assim composta: Doutores: **Ester Cristina Borges Araújo – Laboratório de Geografia Médica/UFU; Profa. Dra. Angélica de Oliveira Gomes – UFTM; e Profa. Dra. Neide Maria da Silva**, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, **Profa. Dra. Neide Maria da Silva**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do 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 Mestre.

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 25/02/2022, às 17:57, 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 **Ester Cristina Borges Araujo, Técnico(a) de Laboratório**, em 25/02/2022, às 17:57, 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 **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 17:57, 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 **3397259** e o código CRC **ADDAA0DF**.

*¡A mi familia motor de mi vida y mi razón de ser!
Esto es por y para ustedes.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar ao fim deste projeto. Por me dar forças para continuar nos dias mais difíceis.

Aos meus pais, Mary e Humberto, por serem tão incondicionais, amorosos e por me incentivarem a realizar meus sonhos.

A Cami pela paciência durante esses anos por ser meu noivo, namorado e amigo. Obrigado por seu amor e por construir sua vida ao meu lado.

A meus irmãos Luisa e Juan por seu apoio e carinho durante toda minha vida.

À luz de nossa família Juli e Lucy obrigado por me fazer sorrir quando eu mais precisava.

À Profa. Neide Maria Silva Obrigado por me receber no seu laboratório mesmo sem me conhecer, pelo aprendizado, pela paciência, orientação e por me permitir realizar este projeto.

Obrigado Yusmaris por seu apoio incondicional na realização deste projeto, sem sua ajuda nada teria sido possível. Pela paciência e vontade de me ensinar. Por sua amizade e conselhos durante esses anos. ¡eu te admiro imensamente!

Aos meus colegas de laboratório Marcos, Laura, Flavia e Ester. Obrigado por sua colaboração nos experimentos e pela convivência diária, isto também é graças a vocês.

Aos meus Roomies David, Nelly y Laura, por serem minha família no Brasil pelas risadas, pelas noites de jantar, pelos milhares de bons momentos compartilhados e por serem minha mão amiga durante o mestrado.

Ao grupo de estrangeiros Aryani, Kelvin, Uriel, Angelis, Danny, Jesus, Sandro, Daniela, Victor, Carlos e Ángela, pelos momentos compartilhados, aniversários, jantares e passeios que fizeram desta época uma experiência inesquecível.

A Samuel pelo auxílio no uso do citometro de fluxo e pelas boas conversas.

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

Aos professores do programa de Biologia Celular e estrutural obrigado pelas excelentes aulas e aprendizados que levarei de volta ao meu país. A Renata pela paciência e ajuda.

A todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto, como os técnicos da Relam e a equipe do biotério. Assim como a todos os meus colegas do programa, obrigado pelo apoio e pela agradável despedida.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À OEA e a GCUB pela oportunidade de vir estudar no Brasil.

A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada
Marie Curie

RESUMO

A malária na gestação pode levar à morte materna, aborto espontâneo e baixo peso ao nascer. O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pluripotente que tem um papel importante na gestação e parto, cujos níveis têm sido demonstrados aumentarem na placenta de mulheres gestantes com malária. Para avaliar o papel do MIF na malária gestacional experimental, camundongos C57BL/6 e geneticamente deficientes em MIF (MIF^{-/-} com fundo genético de C57BL/6) foram inoculados ou não com *Plasmodium berghei* (*Pb*) NK65^{GFP} em três estágios gestacionais. Foram avaliados parâmetros maternos e embrionários/fetais e foi feita uma avaliação comparativa com os resultados gestacionais, bem como os números de mastócitos, células natural killer uterinas (uNK), células CD11b⁺ e células MCP1⁺. Além disso, foi avaliada a expressão no útero/placenta de moléculas importantes para a manutenção da gestação ou envolvidas na resposta imune e sinalização de MIF, tais como MIF, DdT, iNOS, ARG1, VEGF e Tim3. No início da gestação, camundongos fêmeas que expressam MIF apresentaram resultados gestacionais mais adversos como consequência da infecção, tais como diminuição da área da decídua e menor relação entre peso do corno uterino e número de locais de implantação por animal. Além disso, foi demonstrado que camundongos C57BL/6 infectados apresentaram diminuição de células uNK e aumento de células CD11b⁺ na decídua. Em contraste, camundongos MIF^{-/-} não infectados apresentaram menores números destas células, que não foram alteradas em resposta à infecção por *Pb*. As células MCP1⁺ também foram aumentadas em animais C57BL/6 infectados em relação aos animais MIF^{-/-} infectados, assim como aos camundongos C57BL/6 não infectados. Animais C57BL/6 com 8 dias de gestação (DG) infectados apresentaram menores níveis de expressão de ARG1 e VEGF em relação aos animais MIF^{-/-} infectados. No terço médio da gestação, foi observado um inadequado remodelamento das artérias espiraladas e diminuição do espaço vascular placentário em animais C57BL/6 infectados, mas não em camundongos MIF^{-/-} infectados, nos quais observou-se uma diminuição das células uNK, no entanto, um aumento de VEGF. Além disso, nos sítios de implantação de animais MIF^{-/-} se observaram maiores números de células CD11b⁺, acompanhados por uma maior expressão de mRNA ARG1 e menor de iNOS, indicando que os melhores resultados da gestação apresentados na ausência de MIF poderiam estar associados com um predomínio de macrófagos de perfil anti-inflamatório na interface materno-fetal durante a infecção neste período gestacional. No final da gestação, a deficiência de MIF levou a níveis mais elevados de parasitemia, bem como

aumento dos depósitos de hemozoína no baço e labirinto placentário. Os fetos dos animais infectados apresentaram baixo peso, independentemente da presença ou ausência de MIF, embora esse efeito foi mais pronunciado em fetos de mães MIF^{-/-} infectadas. O MIF parece contribuir para os efeitos deletérios da malária gestacional no terço inicial e médio da gestação e participar do controle da parasitemia materna e deposição de hemozoína tecidual no final da gestação refletindo na restrição do peso fetal.

Palavras chave: Malária. Gestação. MIF.

ABSTRACT

Malaria in pregnancy can lead to maternal death, miscarriage and low birth weight. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pluripotent cytokine that has an important role in normal pregnancy and delivery, and its level have been shown to increase in the placenta of pregnant women with malaria. To evaluate the role of MIF in experimental gestational malaria, C57BL/6 and MIF^{-/-} mice were inoculated or not with *Plasmodium berghei* (Pb) NK65^{GFP} at three gestational stages. Maternal and embryonic/fetal parameters associated with adverse pregnancy outcomes were evaluated, as well as the numbers of mast cells, uterine natural killer cells (uNK), CD11b⁺ cells and MCP1⁺ cells. In addition, the expression in the uterus/placenta of molecules important for the maintenance of pregnancy or involved in the immune response and MIF signaling, such as MIF, DdT, iNOS, ARG1, VEGF and Tim3, were evaluated. In early pregnancy, mice expressing MIF had more adverse pregnancy outcomes as a consequence of infection, such as decreased decidua area and lower ratio between uterine horn weight and number of implantation sites per animal. Additionally, it was demonstrated that infected C57BL/6 mice showed a decrease in uNK cells and an increase in CD11b⁺ cells in the decidua. In contrast, uninfected MIF^{-/-} mice had lower counts of these cells, which were not altered in response to Pb infection. MCP1⁺ cells were also increased in C57BL/6 infected animals in comparison with MIF^{-/-} infected group and the uninfected C57BL/6 group. C57BL/6 animals with 8 days of gestation (DG) infected showed lower levels of expression of ARG and VEGF, compared to the MIF^{-/-} group after infection. In mid-gestational period, inadequate remodeling of spiral arteries and decreased placental vascular space were observed in C57BL/6 infected animals, but not in MIF^{-/-} infected mice, in which uNK cells decreased but increased VEGF mRNA expression. Furthermore, in the implantation sites of MIF^{-/-} animals, higher numbers of CD11b⁺ cells were observed, accompanied by a higher expression of ARG1 and lower expression of iNOS, indicating that the better pregnancy outcomes presented in the absence of MIF could be associated with a predominance of macrophages with an anti-inflammatory profile at the maternal-fetal interface during infection in this gestational period. Late in pregnancy, MIF deficiency led to higher levels of parasitemia as well as increased hemozoin deposits in the spleen and placental labyrinth. Fetuses from infected animals were underweight regardless of the presence or absence of MIF, although this effect was more pronounced in fetuses from MIF^{-/-} infected mothers. MIF seems to contribute to the deleterious effects of gestational malaria in the initial

and middle thirds of pregnancy and to participate in the control of maternal parasitemia and tissue hemozoin deposition at the end of pregnancy, reflecting fetal weight restriction.

Keywords: Malaria. Gestation. MIF.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de primers.	44
Tabela 2. Resultado da gestação em camundongos C57BL/6 e MIF ^{-/-} não infectados e infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	46
Tabela 3. Taxa de parto prematuro em camundongos fêmeas C57BL/6 e MIF ^{-/-} infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP} durante o último terço da gestação.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do parasito.....	26
Figura 2. Desenho experimental primeiro terço gestacional.....	38
Figura 3. Desenho experimental segundo terço gestacional.....	39
Figura 4. Desenho experimental terceiro terço gestacional.....	39
Figura 5. Avaliação da parasitemia, depósitos de hemozoína no baço e hemoglobina no primeiro terço gestacional.....	47
Figura 6. Análise das alterações induzidas durante o primeiro terço da gestação.....	49
Figura 7. Análise da parasitemia, depósitos de hemozoína no baço e hemoglobina no segundo terço gestacional.....	49
Figura 8. Avaliação das alterações induzidas pela infecção por <i>Pb</i> NK65 ^{GFP} durante o segundo terço da gestação.....	50
Figura 9. Avaliação do remodelamento das artérias espiraladas e alterações do espaço vascular na placenta durante a infecção por <i>Pb</i> NK65 ^{GFP} no terço médio da gestação.....	52
Figura 10. Análise da parasitemia, depósitos de hemozoína no baço, nas áreas do labirinto placentário e hemoglobina no último terço gestacional de animais infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	53
Figura 11. Avaliação das alterações induzidas pela infecção por <i>Pb</i> NK65 ^{GFP} durante o último terço da gestação.....	54
Figura 12. Análise do espaço vascular no labirinto no último terço de gestação de animais infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	56
Figura 13. Detecção de células uNK, nos sítios de implantação no primeiro e segundo terço da gestação.....	57
Figura 14. Avaliação da expressão de mRNA de VEGF e Tim3 em útero/placenta de animais C57BL/6 e MIF ^{-/-} infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP} nos terços inicial e médio da gestação.....	58
Figura 15. Detecção de mastócitos nos sítios de implantação no primeiro e segundo terço da gestação.....	59
Figura 16. Detecção de células CD11b ⁺ nos sítios de implantação no primeiro e segundo terço da gestação em infecção por <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	60
Figura 17. Detecção de células MCP1 ⁺ nos sítios de implantação no primeiro e segundo terço da gestação de animais infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	61

- Figura 18.** Avaliação da expressão de mRNA de iNOS e ARG em útero/placenta de animais C57BL/6 e MIF^{-/-} infectados com *Pb* NK65^{GFP} nos terços inicial e médio da gestação.62
- Figura 19.** Avaliação da expressão de mRNA de MIF e DdT em útero/placenta de animais C57BL/6 e MIF^{-/-} infectados com *Pb* NK65^{GFP} nos terços inicial e médio da gestação.63
- Figura 20.** Avaliação da expressão de mRNA de MIF e DdT em útero/placenta de animais C57BL/6 e MIF^{-/-} infectados com *Pb* NK65^{GFP} nos terços inicial e médio da gestação.634

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC:** Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase
- BPN:** Baixo Peso ao Nascer
- C5a:** Produto ativado pelo Complemento 5a
- CCL4:** Ligante 4 da Quimiocina CC
- CD:** Células Dendríticas
- COX2:** Prostaglandina-endoperóxido sintase 2
- CXCL1:** Ligante 1 de Quimiocina CXC
- DAB:** Diaminobenzidina
- DG:** Dias de Gestação
- EIs:** Eritrócitos Infectados
- GLUT-1:** Transportador de Glicose
- GM-CSF:** Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
- H&E:** Hematoxilina e Eosina
- HA:** Ácido Hialurônico
- H_z:** Hemozoina
- I.V:** Via Intravenosa
- IL:** Interleucina
- INF:** Interferon
- IP10:** Proteína 10 induzida por Interferon Gamma
- LPS:** Lipopolissacarídeos
- MCP1:** Proteína Químioatraente de Monócitos-1
- MIF:** Fator Inibidor da Migração de Macrófagos
- MIP1 α e β :** Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 α e β
- MP:** Malária Placentária
- NF- κ B:** Fator Nuclear kappa B

PfEMP-1: “Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1”

PGE2: Prostaglandina E2

PRR: Receptor de Reconhecimento de Padrões

RCIU: Restrição do Crescimento Intrauterino

SCA: Sulfato de Condroitina A

sEng: Endoglina Solúvel

sFlt-1: Tirosina Quinasa 1 Soluble tipo fms

TA: Temperatura Ambiente

TLR: Receptores Toll

TNF: fator de necrose tumoral

uNK: Células Natural Killer Uterinas

VAR2CSA: “*Variant Surface antigen 2-CSA*”

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Generalidades do desenvolvimento placentário.....	21
2.2 Aspectos epidemiológicos da malária.....	23
2.3 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i>	24
2.4 Patogênese da malária gestacional.....	26
2.5 Resposta imune durante a gestação.....	28
2.6 Resposta imunológica na infecção por <i>Plasmodium</i> durante a gestação.....	30
2.7 O Fator Inibidor da Migração de Macrófagos.....	31
2.8 MIF e malária.....	32
2.9 Modelo animal	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Animais experimentais.....	37
4.2 Acasalamento dos animais	37
4.3 Cepa do parasito e inóculo	37
4.4 Desenho experimental.....	37
4.5 Anestesia, eutanásia, coleta de amostras e órgãos	39
4.6 Registro de sítios de implantação anormais, peso placentário e fetal	40
4.7 Parasitemia dos animais infectados com <i>Plasmodium</i>	40
4.8 Dosagem de hemoglobina.....	40
4.9 Análises histológicas.....	41
4.10 Detecção de células uNK por histoquímica nos sítios de implantação	42
4.11 Quantificação de mastócitos nos sítios de implantação	42
4.12 Detecção de células CD11b ⁺ por imunohistoquímica nos sítios de implantação	42
4.13 Detecção de células MCP1 ⁺ por imunohistoquímica nos sítios de implantação.....	43
4.14 Análise da expressão de mRNA de MIF, DdT, iNOS, ARG1, VEGF e Tim 3 em amostras de placenta/útero.....	44
4.15 Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS	46
5.1 Taxa de gestação em camundongo C57BL/6 e MIF ^{-/-}	46

5.2	Efeitos da infecção por <i>P. berghei</i> NK65 ^{GFP} no terço inicial da gestação.....	46
5.3	Efeitos da infecção por <i>Pb</i> NK65 ^{GFP} no terço médio da gestação	49
5.4	Efeitos da infecção por <i>Pb</i> NK65 ^{GFP} no último terço da gestação.....	52
5.5	Detecção de células uNK em útero/placenta de animais de 8DG e 11DG infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	56
5.6	Detecção de mRNA dos genes VEGF e Tim3 em útero/placenta de animais infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	57
5.7	Detecção de mastócitos em útero/placenta de animais de 8DG e 11DG infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	59
5.8	Detecção de células CD11b ⁺ e MCP1 ⁺ em útero/placenta de animais aos 8DG e 11DG infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	59
5.9	Detecção de mRNA dos genes iNOS e ARG1 em útero/placenta de animais infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	61
5.10	Detecção de mRNA dos genes MIF e DdT em útero/placenta de animais infectados com <i>Pb</i> NK65 ^{GFP}	62
6.	DISCUSSÃO	65
7.	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO USO ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	91

1. INTRODUÇÃO

A malária na gestação é um grave problema de saúde pública, (NDIP TAKEM, 2013). As mulheres gestantes apresentam risco três vezes maior de infecção grave por *Plasmodium* em relação à população geral (SCHANTZ-DUNN; NOUR, 2009). Esta susceptibilidade é comumente atribuída ao aumento de parasitos sequestrados na placenta e às alterações imunológicas e hormonais que acontecem durante a gestação (ROGERSON et al., 2007).

A infecção por malária tem consequências graves para a gestante, feto e recém-nascido (YARTEY, 2006). Nas mulheres gestantes, a infecção pode causar anemia grave, malária grave e inclusive a morte. Além disso, a infecção placentária pode afetar o crescimento fetal e induzir baixo peso ao nascer, levando ao retardo do crescimento infantil e afetando o desenvolvimento cognitivo, sendo essas alterações um importante fator de risco para mortalidade perinatal, neonatal e infantil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

A infecção placentária é um determinante crítico dos resultados adversos, já que este órgão sofre alterações em decorrência da infecção (PANDYA; PENHA-GONÇALVES, 2019). A placenta é um órgão transicional responsável pela trocas materno-fetais (LEISER; KAUFMANN, 1994). No entanto, no contexto da malária, fornece um nicho para o sequestro de eritrócitos infectados (EIs) (MILLER et al., 2002; MILNER, 2018). Isto leva a um grande acúmulo de parasitos e, por sua vez, causa inflamação local devido à infiltração de monócitos e outros leucócitos na placenta, o que pode induzir ruptura sincicial e danos teciduais (BARATEIRO et al., 2019; HOO; NAKIMULI; VENTO-TORMO, 2020).

O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pluripotente, que pode ser encontrada no endométrio humano, nas vilosidades placentárias, sinciciotrofoblastos e citotrofoblastos (ARCURI et al., 2001; KIECKBUSCH; GAYNOR; COLUCCI, 2015). O MIF pode contribuir significativamente para o estabelecimento do ambiente imunológico na interface materno-fetal (IETTA et al., 2018). Portanto, é importante determinar se MIF colabora nas alterações associadas à malária gestacional e avaliar o efeito da deficiência desta citocina durante esta patologia. O presente estudo teve por objetivo estudar o papel de MIF na interface materno-fetal de camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} gestantes infectadas com *Plasmodium berghei* NK65^{GFP}, um modelo que assemelha as manifestações observadas durante a malária gestacional humana.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Generalidades do desenvolvimento placentário

A interface materno-fetal é composta pela decídua derivada da mãe e da placenta derivada do feto. Em roedores e humanos, a placenta se desenvolve a partir do trofocotoderma do blastocisto (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019). A arquitetura placentária de humanos e roedores apresentam certas diferenças, mas suas estruturas gerais e os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento placentário são semelhantes (WATSON; CROSS, 2005). Uma das suas semelhanças é que ambas espécies possuem uma barreira placentária hemocorial na qual o trofoblasto está em contato direto com o sangue materno (KIRBY; BRADBURY, 1965; PIJNENBORG et al., 1981; SIMMONS, 2014). Por outro lado, a gestação humana ocorre durante um período de 40 semanas, enquanto em camundongos é de aproximadamente 3 semanas (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019).

Os principais passos para o desenvolvimento da interface materno-fetal em muitos mamíferos, como roedores e humanos, são a implantação de embriões e decidualização do endométrio (FAVARO; ABRAHAMSOHN; ZORN, 2014). Durante a implantação, o trofoblasto invasivo ancora o blastocisto à decídua, o epitélio uterino especializado sobre o qual ocorre a placentação. A placenta é um órgão composto por duas linhagens celulares diferentes que surgem do blastocisto: a linhagem trofoblástica que dá origem a células trofoblásticas placentárias, e o mesoderma extraembrionário que se origina das células da massa celular interna e forma a vasculatura placentária fetal (WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018).

Após a implantação, o útero gestante sofre transformações na sua estrutura. As células estromais uterinas proliferam e se diferenciam, processo chamado decidualização, resultando em uma parede uterina que é cinco vezes mais espessa do que no estado não gestante (ADAMSON et al., 2002). A decidualização é caracterizada pela transdiferenciação de fibroblastos endometriais em células deciduais; remodelação da matriz extracelular do estroma endometrial; produção de uma grande variedade de moléculas que regulam o “cross-talk” materno-fetal, angiogênese, formando uma extensa rede de vasos sanguíneos que serve de suprimento nutricional ao embrião e por um influxo vasto e seletivo de células uterinas natural killer (uNK), que contribuem para a regulação imune na interface materno-fetal e no remodelamento dos vasos sanguíneos endometriais durante a placentação (FAVARO; ABRAHAMSOHN; ZORN, 2014).

Em camundongos, o desenvolvimento placentário começa no blastocisto no dia embrionário 3.5 quando a camada do trofotoderma é separada da massa celular interna. No dia 4.5 da gestação ocorre a implantação e as células que não estão em contato com a massa celular interna do trofotoderma mural se tornam células gigantes trofoblásticas, estas células ajudam ao embrião a penetrar no epitélio uterino e a se implantar no endométrio, essas células seriam análogas às células citotrofoblásticas extravilosas humanas (ROSSANT; CROSS, 2001; WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018). Por outro lado, o ectoderma extraembrionário ou âmnio e o cone ectoplacentário emergem do trofotoderma polar, ou seja, das células que estão adjacentes à massa celular interna. Depois, o ectoderma dará origem às células trofoblásticas da camada do córion e finalmente ao labirinto (ROSSANT; CROSS, 2001).

As células nas margens do cone ectoplacentário diferenciam-se em células gigantes trofoblásticas secundárias. Essas células adquirem características invasivas, penetrando profundamente no estroma endometrial e fazendo contato com as artérias maternas. Esta invasão atinge picos entre os dias 7.5 e 9.5 (WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018). A porção vascular da placenta é o labirinto, sendo este uma estrutura ramificada derivada do mesoderma extraembrionário da alantoide e do córion. Por volta do dia embrionário 8.5, o alantoide derivado do mesoderma se funde com o córion e forma células mesenquimais e vasos sanguíneos fetais do labirinto e o cordão umbilical. O córion é uma estrutura plana de múltiplas camadas que sofre morfogênese ramificada após a junção corioalantóica. As células trofoblásticas do córion diferenciam-se para formar dois tipos de células sinciotrofoblásticas multinucleadas que circundam os capilares sanguíneos fetais, formando a principal barreira para a troca de nutrientes e gases. Ao mesmo tempo que células trofoblásticas gigantes mononucleares revestem os sinusóides do sangue materno no labirinto (RAI; CROSS, 2014). Juntos, o trofoblasto e a vasculatura fetal geram vilosidades extensamente ramificadas do labirinto que são análogas às vilosidades coriônicas humanas (GEORGIADES; FERGYSO-SMITH; BURTON, 2002).

No dia 10.5 a placenta murina apresenta uma estrutura madura, estando composta por três camadas celulares distintas: decídua materna através da qual o sangue materno chega ao sítio de implantação por meio das artérias espiraladas; a zona juncional (formada por uma camada de células trofoblásticas gigantes e uma camada de células de glicogênio e espongiotrofoblastos subjacente) e o labirinto que é a grande área de superfície altamente ramificada para troca de nutrientes e gases (RAI; CROSS, 2014) (ADAMSON et al., 2002). O espongiotrofoblasto é uma camada derivada do cone ectoplacentário e sua função é sustentar o

labirinto. Durante a gestação tardia, as células trofoblásticas de glicogênio começam a se diferenciar dentro da camada de espongiotrofoblastos e, posteriormente, invadem difusamente a parede uterina (RAI; CROSS, 2014; ROSSANT; CROSS, 2001). As células de glicogênio têm um papel endócrino já que elas têm a capacidade de produzir glicogênio e hormônios no interstício da decidua. E é provável que este material seja utilizado para fornecimento de energia e para regulação hormonal na gestação (BOUILLOT et al., 2006).

2.2 Aspectos epidemiológicos da malária

No ano 2020, aproximadamente 241 milhões de casos de malária a nível mundial foram registrados em 85 países endêmicos. A maioria dos casos se concentram na Região da África, com uma estimativa de 228 milhões de casos em 2020, representando cerca de 95% dos casos. A incidência de casos de malária aumentou para 59 casos a cada 1000 pessoas em risco durante o ano 2020, isto se associou à interrupção dos serviços de saúde durante a pandemia de COVID-19. A nível mundial, em 2020, as mortes por malária aumentaram 12% em comparação com 2019 com uma estimativa de 627000, acredita-se que as mortes adicionais são devido às interrupções de serviço de saúde pela pandemia mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Após uma tendência sustentada de redução de casos de malária entre os anos 2005 e 2014, a Região das Américas registrou nos últimos anos um aumento do número total de casos, devido ao acréscimo de casos desde 2015 na República Bolivariana da Venezuela e ao aumento da transmissão em áreas endêmicas em países como Brasil, Colômbia, Guiana, Nicarágua e Panamá. No Brasil, apesar da redução do número total de casos, houve aumento de casos nos estados de Mato Grosso, Rondônia e Roraima, afetando principalmente as populações mineiras e indígenas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

De acordo com o Relatório Mundial da Malária de 2020, em 33 países com transmissão moderada e alta da África, havia 33.8 milhões de mulheres gestantes, das quais 11.6 milhões foram expostas à infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Neste grupo de alto risco, infecções assintomáticas são comuns, enquanto a malária clínica é rara. Em contrapartida, em áreas de baixa e instável transmissão da malária, principalmente na região Ásia-Pacífico e América do Sul, as mulheres gestantes têm uma imunidade adquirida mais baixa e as infecções por malária têm maior probabilidade de evoluir para doença clínica (NDIP TAKEM, 2013). Por outro lado, em áreas de transmissão estável, a malária durante a gestação tem uma

epidemiologia caracterizada pela suscetibilidade dependente do número de partos: as mulheres primigestas são infectadas com mais frequência e com densidades parasitárias placentárias mais altas do que as mulheres multigrávidas (FRIED; DUFFY, 2017).

Atualmente, tem sido descritas cinco espécies que podem causar malária em humanos: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. No entanto, *Plasmodium falciparum* é a espécie que causa as complicações mais graves e a principal causadora de mortes pela doença (MARTINEY et al., 2000). A malária na gestação resulta em infecção placentária, denominada malária placentária (MP) e que predispõe a lesão e insuficiência placentária. A insuficiência placentária refere-se à função placentária deficiente que é comumente observada durante a MP. Por sua vez a MP tem sido descrita como uma importante causa de baixo peso ao nascer (BPN) que ocorre como consequência do parto prematuro ou a que os fetos nascem pequenos para a idade gestacional, esse fenômeno também é chamado de restrição de crescimento intrauterino, (CHUA et al., 2021). A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) é uma condição patológica definida como a falha de um feto em atingir seu potencial de crescimento genético completo. A RCIU é uma das principais causas de prematuridade, paralisia cerebral e mortalidade perinatal (WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018).

Os mecanismos precisos por trás da MP associada ao parto prematuro e ao baixo peso para a idade gestacional ainda não são bem elucidados (CHUA et al., 2021). Atualmente, sabe-se que a infecção por *Plasmodium* pode causar inflamação e potencialmente perturbar o equilíbrio imunológico necessário para a manutenção da gestação, sendo previamente sugerido que a inflamação sistêmica induzida pela malária está associada aos piores resultados da gestação (MCDONALD et al., 2019).

2.3 Ciclo biológico de *Plasmodium*

A malária é uma doença causada por protozoários intracelulares do gênero *Plasmodium* (MARTINEY et al., 2000). Várias espécies de *Plasmodium* infectam humanos e outros animais, incluindo aves, répteis e roedores (PIMENTA et al., 2015). Entre as espécies de *Plasmodium* que são específicas de camundongos encontramos: *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium chaubaudi* (PETERS; ROBINSON, 1999).

A transmissão de *Plasmodium* ocorre através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*, que atuam como vetores. Quando o mosquito infectado realiza o repasto sanguíneo, os esporozoítos contidos nas glândulas salivares são injetados na pele do indivíduo

(MARTINEY et al., 2000). Depois, os parasitos atingem a circulação e chegam ao fígado no qual iniciam o chamado estagio extraeritrocitário invadindo hepatócitos, onde se desenvolvem e se replicam sem causar sintomas. Logo, saem dos hepatócitos em forma de merozoítos que uma vez na corrente sanguínea invadem rapidamente os eritrócitos. Dentro dos eritrócitos, o parasito se replica de forma assexuada (esquizogonia), desenvolvendo estágios intraeritrocitários como anéis, trofozoítos e esquizontes, que após a ruptura das hemácias infectadas são liberados na forma de merozoítos, cada um capaz de invadir um novo eritrócito (TRAN et al., 2021). Durante esse processo, forma-se a hemozoína, corpo residual que se acumula de forma significativa nos tecidos e que também recebe o nome de pigmento malárico (MARTINEY et al., 2000). Uma esquizogonia secundária ou latente pode ocorrer durante a infecção por *P. vivax* e *P. ovale*, e permanecer quiescentes no fígado até um momento posterior. Esses estágios de repouso foram denominados hipnozoítos. Este estágio de esquizogonia tardia aparentemente não ocorre em infecções por *P. falciparum*, *P. malariae* ou *P. knowlesi* (GARCIA, 2010).

Uma vez estabelecida a infecção no sangue, o curso típico da infecção em um indivíduo não tratado é que a parasitemia aumente para um nível alto, produzindo sintomas clínicos graves, e depois diminua com os sintomas desaparecendo ou tornando-se mais leves. Logo, em algum momento, a parasitemia aumenta novamente e os sintomas clínicos se repetem. Esse padrão de parasitemia oscilante, ou recrudescência de parasitos, é uma característica de todos os parasitos da malária em seus hospedeiros vertebrados naturais (KYES; HORROCKS; NEWBOLD, 2001).

Alguns dos parasitos intraeritrocitários podem evoluir para estágios de reprodução sexual, embora ainda não está bem elucidado o mecanismo fisiológico pelo qual o parasito realiza esta transformação, é possível que não exista um mecanismo único e que múltiplos fatores possam contribuir para a decisão de formar gametócitos (BAKER, 2010).

O ciclo sexuado começa após a ingestão de sangue pelo vetor, os gametócitos de *Plasmodium* são ativados dentro do trato digestivo do mosquito *Anopheles*, resultando no surgimento de gametas masculinos e femininos (ciclo esporogônico). Após a fertilização, o zigoto resultante se diferencia em um oocineto móvel. O oocineto deve então penetrar e invadir o epitélio do intestino médio. Os oocinetos se aderem à superfície basal do epitélio e se diferenciam em oocistos sésseis que crescem e produzem milhares de esporozoítos. Após a maturação, os esporozoítos são liberados na hemolinfa de onde invadem as glândulas salivares e o ciclo se completa quando o mosquito se alimenta de um novo hospedeiro (BATON;

2018). Por outro lado, estudos prévios têm demonstrado que apesar de que os EIs se ligam aos sincitiotrofoblastos, a maior parte dos parasitos sequestrados é encontrada no espaço intervilosos (MUTHUSAMY et al., 2004).

Os genes *var* sofrem extensas alterações transcricionais que permitem a variação antigênica e um meio de evasão imune, facilitando a infecção crônica e a transmissão. Os produtos da família de genes *var* são, portanto, críticos para a patogênese da malária e para a indução da imunidade protetora (GARDNER et al., 2002). Consequentemente a variação antigênica de PfEMP-1, na superfície dos EIs constitui um importante fator de virulência do parasito (KYES; HORROCKS; NEWBOLD, 2001).

A maior suscetibilidade por parte das mães primíparas se deve ao fato de que a placenta apresenta um novo receptor para a adesão das EIs (as hemácias infectadas se aderem ao SCA e não ao CD36 quem suporta a ligação em indivíduos não gestantes), portanto as subpopulações de parasitos são desconhecidas para as mulheres antes da primeira gestação. No entanto, com gestações sucessivas, as mulheres desenvolvem anticorpos específicos IgG contra a ligação de SCA e EIs placentários que lhes permitem controlar melhor a infecção (FRIED; DUFFY, 1996, 2017; LAGERBERG, 2008).

Dependendo de quando a infecção ocorre durante a gestação, a placenta pode apresentar pigmento malárico associado a fibrina (sinal de infecção antiga) ou parasitos e células mononucleares durante a infecção ativa (MILNER, 2018). Esses infiltrados de células mononucleares estão presentes em grandes quantidades na placenta. Em um estudo prévio foi observado que estas células apresentavam características típicas de células ativadas, com um citoplasma com numerosos vacúolos, inclusões e restos de eritrócitos, além de se localizar em torno dos detritos celulares e depósitos de fibrina (WALTER; GARIN; BLOT, 1983).

A maioria dos estudos sobre malária durante a gestação humana, têm sido realizados usando placentas a termo, após o parto. Portanto, pouco se sabe sobre o impacto da malária no início da gestação porque a placenta não é acessível para avaliação direta (SARR et al., 2015). Na placenta, outras anomalias em sua arquitetura, como desorganização da área do labirinto, distensão e desordem do espaço perivascular e intervilosite crônica devido à migração de monócitos/macrófagos, dentre outras podem ser observadas (BARBOZA et al., 2014; NEBULONI et al., 2001; NERES et al., 2008).

O tecido placentário infectado por *Plasmodium* apresenta alterações funcionais importantes, incluindo redução na atividade do sistema A um grupo de transportadores de aminoácidos dependentes de sódio que captam ativamente pequenos aminoácidos na camada trofoblástica (BOEUF et al., 2013). Também, tem sido descrito que a intervilosite durante a

infecção pode reduzir a atividade do transportador de glicose (GLUT-1), e portanto pode tornar menos eficiente a transferência de glicose para o feto e contribuir para a restrição do crescimento fetal (CHANDRASIRI et al., 2014a). A malária também pode alterar a expressão da megalina no sinciciotrofoblasto, sendo este um transportador importante para uma vasta gama de proteínas (LYBBERT et al., 2016). Além disso, as placentas de mulheres com malária apresentam perfusão placentária reduzida, invasão trofoblástica prejudicada e alterações em vários fatores angiogênicos, tais como a tirosina quinase 1 soluble tipo fms (sFlt-1), endoglin solúvel (sEng) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (CONROY et al., 2013; SILVER et al., 2011) (PANDYA; PENHA-GONÇALVES, 2019). Então, direta ou indiretamente, a troca materno-fetal prejudicada de nutrientes e gases, associada a uma alta demanda metabólica dos leucócitos infiltrados, contribui para a insuficiência placentária e para os efeitos adversos na gestação (SARR et al., 2015) como o BPN, que é o maior fator preditivo de morbidade e mortalidade infantil (CHUA et al., 2021).

A infecção pode causar anemia, hipoglicemia e inclusive a morte em mulheres gestantes (PRIETO et al., 2005). O sequestro esplênico de eritrócitos infectados com malária causa deficiência de ácido fólico e anemia microcítica em adultos. Em mulheres gestantes, ocorre sequestro adicional de EIs na placenta. Portanto, as mulheres gestantes infectadas por *Plasmodium* sofrem desproporcionalmente de anemia grave e portanto estão em maior risco de morbidades, como insuficiência cardíaca congestiva, morte fetal e mortalidade associada à hemorragia no momento do parto (SCHANTZ-DUNN; NOUR, 2009).

A hipoglicemia representa uma complicação frequente durante a malária, sendo 7 vezes mais frequente nas gestantes com malária do que nas pacientes não gestantes. As mulheres gestantes já estão propensas à hipoglicemia devido à hiperinsulinemia fisiológica secundária ao aumento da função das células beta pancreáticas. Durante a infecção por *Plasmodium*, essa situação é agravada por uma diminuição da gliconeogênese hepática e um aumento no consumo de glicose pelo parasita e pelo hospedeiro (PRIETO et al., 2005).

2.5 Resposta imune durante a gestação

A implantação, placentação e primeira parte da gestação requer uma forte resposta inflamatória. Durante esta fase o blastocisto tem que romper o revestimento epitelial do útero para se implantar, etapa seguida da substituição trofoblástica do endotélio e do musculo liso dos vasos maternos. Um ambiente inflamatório é necessário para garantir o reparo adequado do epitélio uterino e a remoção de restos celulares (MOR et al., 2011). Dentre os componentes

celulares importantes nesta etapa, destacam-se as funções imunorreguladoras e pró-angiogênicas das células uNK e células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas (CD) (MARTÍNEZ-VAREA et al., 2014). No local de implantação, a inflamação é caracterizada pela presença de interleucina (IL) -6, IL-8, IL-15, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), ligante 1 de quimiocina CXC (CXCL1), ligante 4 da quimiocina CC (CCL4), osteopontina e fator de necrose tumoral (TNF), que são derivados de células do estroma endometrial e células imunes infiltrantes, (MOR; ALDO; ALVERO, 2017). Outras citocinas importantes para iniciar o processo de angiogênese necessário para implantação são TGF- β e IL-1 que juntamente com IL-6 induzem a células do perfil de resposta imune Th17 a produzir IL-17 (SAITO et al., 2010). As células desse perfil imunológico estão intimamente envolvidas com a infiltração de neutrófilos e induzem imunidade protetora contra micróbios extracelulares no útero (WANG et al., 2020)

Rapidamente após a implantação placentária, a imunidade Th1 inflamatória precoce muda para respostas imunes Th2 anti-inflamatórias. A imunidade Th2, que agora predomina sob a imunidade Th1 no local de implantação placentária, protege o feto equilibrando a imunidade Th1 e acomodando o desenvolvimento fetal e placentário (WANG et al., 2020). Os macrófagos, células NK decíduais e células T reguladoras contribuem para o estabelecimento de um microambiente anti-inflamatório nesta fase da gestação. Durante uma gestação normal, os macrófagos decíduais apresentam um fenótipo predominantemente tipo M2 que está associado à renovação tecidual e secretam predominantemente citocinas anti-inflamatórias (MOR; ALDO; ALVERO, 2017; YAO; XU; JIN, 2019). Sinais pró-inflamatórias que acontecem durante este estágio podem levar ao aborto espontâneo e a parto prematuro (ROMERO et al., 2007) (MOR; ALDO; ALVERO, 2017).

Durante a última fase o feto já completou seu desenvolvimento, porém ainda é necessária a indução de inflamação, caracterizada por um influxo de células imunes no miométrio, para que aconteça o parto. Esse ambiente pro-inflamatório favorece a contração do útero e a expulsão do feto (MOR et al., 2011). Neste sentido, o fator nuclear kappa B (NF- κ B) que pertence a uma família de fatores de transcrição classicamente associados à inflamação tem sido associado com a fisiologia do trabalho de parto (LINDSTRÖM; BENNETT, 2005).

Por outro lado, a placenta formada também tem uma série de mecanismos imunitários inatos incluindo a expressão de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR) como os receptores toll (TLR), a expressão constitutiva de interferons e a liberação de peptídeos antimicrobianos (ANDER; DIAMOND; COYNE, 2019).

Assim, a gestação é um processo que envolve pelo menos três fases que apresentam diferentes perfis inflamatórios e o sucesso da gestação vai depender em grande parte da capacidade do sistema imunológico de manter o status em cada estágio específico (MOR; ALDO; ALVERO, 2017).

2.6 Resposta imunológica na infecção por *Plasmodium* durante a gestação

Durante a malária gestacional, o sequestro dos EIs na placenta leva ao recrutamento e ativação de diferentes células imunes que acionam uma cascata de eventos inflamatórios associados a complicações durante a gestação. A instauração de um ambiente pró-inflamatório tem sido relacionado com expressão desregulada de hormônios de crescimento, fatores vasculares e angiopoietinas que leva ao desenvolvimento anormal da placenta, (CHUA et al., 2021). Por outro lado, uma alteração local ou sistêmica da resposta imune materna para um viés Th2 pode deixar a mãe mais susceptível a infecções dependentes das respostas Th1 como a malária. Durante a infecção placentária são observadas alterações no equilíbrio das citocinas para um perfil Th1 (FIEVET et al., 2001), levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias e à migração de células imunes (SEITZ et al., 2019). A intensidade do infiltrado imune inflamatório varia entre as mulheres e está inversamente relacionada à imunidade adquirida (FRIED; DUFFY, 2017).

O sequestro de eritrócitos infectados na placenta estimula as células mononucleares maternas a secretar β -quimiocinas que são quimiotáticas para monócitos e macrófagos, incluindo proteína inflamatória de macrófagos 1 α e β (MIP1 α e β), proteína 10 induzida por interferon gamma (IP10), a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP1) e I309 (ROGERSON et al., 2007). Algumas das citocinas inflamatórias associadas à malária gestacional incluem fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 (CHANDRASIRI et al., 2014b; DIOUF et al., 2007; FRIED et al., 1998; MOORMANN et al., 1999; OKAMGBA et al., 2018; ROGERSON et al., 2003). IFN- γ parece desempenhar um papel fundamental na proteção contra a parasitemia placentária, assim como IL-10 na prevenção da patologia (MOORE et al., 1999). Por sua parte, aumentos nos níveis placentários de TNF- α estão associados com malária placentária e BPN (ROGERSON et al., 2003). A infecção por *P. falciparum* estimula os monócitos a produzirem IL-12, esta citocina desempenha um papel importante na regulação e diferenciação Th1 e tem ações promovendo a imunidade mediada por células. Ao parecer as respostas IL-12 e INF- γ

permitem sinergicamente respostas imunes protetoras na malária placentária (DIOUF et al., 2007).

A ativação do complemento é outro mecanismo imunológico que pode ser induzido pela malária, resultando na clivagem do produto ativado pelo complemento 5a (C5a), uma potente anafilatoxina, que contribui para o aumento da inflamação (MCDONALD; TRAN; KAIN, 2015). Corney e colaboradores demonstraram um papel crítico do C5a, na patogênese de MP e o BPN, observando níveis aumentados desta proteína no sangue periférico e placentário de mulheres com MP, além de associação entre C5a, desregulação angiogênica e restrição do crescimento fetal (CONROY et al., 2013).

2.7 O Fator Inibidor da Migração de Macrófagos

No ano 1966 foi descoberto o Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) como um fator proteico produzido por linfócitos sensibilizados, sendo associado a hipersensibilidade do tipo tardio. (BERNHAGEN; CALANDRA; BUCALA, 1998; BLOOM; BENNETT, 1966; DAVID, 1966). O MIF foi considerado por muito tempo um produto do linfócito T ativado, tendo como alvo de ação o monócito/macrófago. No entanto, no ano 1994 foi descoberta a produção de MIF por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) indicando que esta citocina pode desempenhar um papel importante nas respostas inflamatórias agudas. Uma vez liberado o MIF, devido a um estímulo pró-inflamatório, este pode atuar em conjunto com TNF- α e outras citocinas para coordenar as defesas do hospedeiro contra uma infecção ou invasão tecidual (CALANDRA et al., 1994). O MIF é o protótipo de uma família pleiotrópica de citocinas que também inclui o homólogo D-dopacromo tautomerase (DDT), ou MIF2. MIF e DDT exercem várias propriedades biológicas, principalmente, mas não exclusivamente, de natureza pró-inflamatória (CALTABIANO et al., 2021).

Hoje em dia sabe-se que as principais células alvo de MIF são os macrófagos, concentrando-os no local da inflamação e aumentando sua adesão e fagocitose, contribuindo assim para a imunidade mediada por células (ARCURI et al., 1999). O MIF também tem potentes efeitos autócrinos e parácrinos que promovem o crescimento e a sobrevivência celular (CALANDRA; ROGER, 2003). Ao mesmo tempo, está envolvido na ativação de células T, indução de citocinas, ativação de células T dependente de antígeno e produção de anticorpos por células B (BERNHAGEN; CALANDRA; BUCALA, 1998; METZ; BUCALA, 1997; SWOPE; LOLIS, 1999).

MIF promove direta ou indiretamente a produção ou expressão de um grande painel de moléculas pró-inflamatórias, incluindo citocinas como TNF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e proteína inflamatória de macrófagos 2, óxido nítrico, Prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (COX2) e produtos da via do ácido araquidônico como prostaglandina E2 (PGE2), além de várias metaloproteinases de matriz e seus inibidores (CALANDRA et al., 1994; CALANDRA; ROGER, 2003). Os sinais acionados por MIF são mediados por sua interação com CD74, uma proteína de membrana tipo II de passagem única. MIF liga-se a CD74 mediante uma interação de alta afinidade, e a expressão de CD74 geralmente é necessária para a fosforilação de ERK-1/2, produção de PGE2 e consequente proliferação celular (LENG et al., 2003).

MIF é uma citocina incomum que possui duas atividades catalíticas, uma atividade de tautomerase (ROSENGREN et al., 1997) e uma atividade de oxido redutase (KLEEMANN et al., 1998). Interessantemente, MIF também é mediador contra regulatório fisiológico que neutraliza os efeitos imunossupressores dos glicocorticoides (BERNHAGEN; CALANDRA; BUCALA, 1998).

MIF está presente durante as diferentes fases do desenvolvimento placentário na gestação em camundongos e humanos, sendo particularmente elevada durante os primeiros estágios da gestação (FARIA et al., 2010; IETTA et al., 2018) e pode desempenhar um papel fisiologicamente importante na regulação das respostas imunológicas durante a gestação (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002). Além disso, células cruciais durante a gestação de humanos e camundongos como células uNK, trofoblastos e células decíduais sintetizam e secretam MIF (VIGANÒ et al., 2007).

2.8 MIF e malária

MIF tem sido associado com a patogênese de doenças parasitárias tais como malária, toxoplasmoses, cisticercose e leishmaniose e infecções virais causadas por citomegalovírus e vírus influenza (CALANDRA; ROGER, 2003; GOMES et al., 2018). Além disso, tem sido demonstrado que MIF é um mediador imunológico chave na resposta placentária a estímulos prejudiciais endógenos e exógenos (IETTA et al., 2018) e que esta citocina pode ser secretada por macrófagos em resposta a vários estímulos pró-inflamatórios, incluindo hemozoína e as citocinas TNF- α e IFN- γ (METZ; BUCALA, 1997).

Concentrações elevadas de MIF foram previamente detectadas no espaço intervilo placentário durante a malária e esses níveis foram associados a BPN e morte neonatal (SINGH et al., 2012). Níveis elevados de MIF podem indicar uma resposta excessiva em casos de

inflamação patológica ou infecção, o que pode ser prejudicial para a gestação e para a saúde do feto (TODROS et al., 2021). Os macrófagos desempenham um papel crítico na eliminação de *Plasmodium*, e desta forma MIF pode ter um papel importante na resposta imune à malária gestacional, auxiliando na retenção e ativação dos macrófagos, além de regular os efeitos inibitórios dos glicocorticóides (BERNHAGEN; CALANDRA; BUCALA, 1998; CHAISAVANEYAKORN et al., 2002; ROGERSON et al., 2007). Além disso, MIF pode participar na retenção de células imunes maternas que podem ser recrutadas para o tecido placentário por meio da atividade de quimiocinas como MIP-1 α /CCL3 e RANTES/CCL5, levando ao aumento do número de monócitos para a interface materno-fetal durante a PM (LUCCHI; PETERSON; MOORE, 2008).

2.9 Modelo animal

Os modelos animais no contexto da malária contribuíram na compreensão da biologia de *Plasmodium*, sua patogênese e imunologia e tem sido muito importantes no descobrimento de vacinas e fármacos contra a doença (MINKAH; SCHAFER; KAPPE, 2018). Então, estes modelos oferecem uma oportunidade de elucidar os mecanismos imunológicos que podem estar envolvidos na malária, uma vez que existem semelhanças nas respostas imunes e características patológicas da infecção em humanos e camundongos. Infecções experimentais controladas em camundongos de laboratório, em particular camundongos geneticamente modificados permitem investigar a imunopatogênese desta doença (LAMB et al., 2006).

O uso de camundongos como modelo para entender a regulação da imunidade à infecção durante a gestação é baseado em um grau de similaridade nos principais eventos da gestação: implantação, placentação e parto. Além disso, existe semelhança na natureza das células imunes que estão presentes na interface feto-placentária e nas redes reguladoras que protegem o feto. Assim, modelos murinos de MP ajudam a entender melhor os mecanismos da imunidade à malária placentária e sua correlação com a saúde fetal (KRISHNAN; NGUYEN; MCCOMB, 2013). A infecção por *Plasmodium berghei* NK65 em fêmeas C57BL/6 gestantes reproduz alterações típicas observadas na malária humana associada à gestação, como diminuição do peso e viabilidade fetal, morte neonatal, anemia materna e morte materna, bem como distúrbios placentários típicos, como diminuição do espaço sanguíneo sinusoidal, acumulação de fibrina e necrose (BARBOZA et al., 2014, 2017, 2019; RODRIGUES-DUARTE et al., 2012, 2018), o que por sua vez leva a comprometimento da saúde materna e fetal. Além disso, o modelo de

infecção de camundongos com *P. berghei* reproduz certas características da malária placentária produzida por *P. falciparum* (HVIID et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na interface materno-fetal de camundongos fêmeas gestantes infectadas com *Plasmodium berghei* NK65^{GFP}, por meio de parâmetros parasitológicos, histológicos e imunológicos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o curso da gestação de camundongos MIF^{-/-} e C57BL/6 nos terços inicial, médio e final da gestação após serem infectados com *Plasmodium berghei* NK65^{GFP};
- Mensurar a parasitemia dos animais MIF^{-/-} e C57BL/6 em diferentes pontos de tempo após a infecção e em diferentes estágios da gestação;
- Analisar a proporção de sítios de implantação anormais em diferentes estágios da gestação, assim como peso placentário e peso fetal em camundongos MIF^{-/-} gestantes infectadas ou não comparando com camundongos controles C57BL/6;
- Analisar as alterações histológicas no útero/placenta de fêmeas C57BL/6 e MIF^{-/-} infectadas ou não em diferentes estágios da gestação;
- Detectar e quantificar células natural killer uterinas (uNK) no útero/placenta de animais MIF^{-/-} e dos animais controles de 8DG e 11DG infectados ou não com *Pb* NK65^{GFP};
- Quantificar mastócitos no útero/placenta de fêmeas C57BL/6 e MIF^{-/-} de 8DG e 11DG infectados ou não com *Pb* NK65^{GFP};
- Detectar e quantificar células de fenótipo CD11b⁺ e MCP1⁺ no útero/placenta de C57BL/6 e MIF^{-/-} de 8DG e 11DG infectados ou não com *Pb* NK65^{GFP};
- Analisar a expressão de mRNA de MIF, por reação de q-PCR em placenta/útero de animais C57BL/6 de 8DG, 11DG e 19DG infectados ou não com *Pb* NK65^{GFP};
- Avaliar a expressão de DdT, por reação de q-PCR em placenta/útero de animais C57BL/6 e MIF^{-/-} de 8DG, 11DG ou 19DG infectados ou não com *Pb* NK65^{GFP};

-Avaliar a expressão de iNOS, ARG1, VEGF e Tim3 por reação de q-PCR em placenta/útero de animais de 8DG e 11DG, infectados ou não com *Pb* NK65^{GFP};

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 e camundongos geneticamente deficientes em MIF (MIF^{-/-} com background genético de C57BL/6) fêmeas e machos de 8-12 semanas de idade, provenientes da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Este trabalho experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo nº 060/19. Os animais foram mantidos sob condições livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água.

4.2 Acasalamento dos animais

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram acasalados com camundongos C57BL/6 machos da mesma idade, respeitando a proporção de 2 fêmeas por macho numa gaiola. As fêmeas MIF^{-/-} foram acasaladas com machos MIF^{-/-} nas mesmas condições. Todos os dias pela manhã as fêmeas foram observadas para verificar se havia presença de rolha vaginal (mistura de sêmen e secreção vaginal). O dia de detecção de rolha foi considerado o dia gestacional 1 (1 DG).

4.3 Cepa do parasito e inóculo

A cepa *Plasmodium berghei* NK65^{GFP} (*Pb* NK65^{GFP}) que expressa a proteína verde fluorescente (GFP), foi usada para infectar os animais neste estudo. A cepa foi mantida em nitrogênio líquido e foi descongelada para infectar camundongos C57BL/6 fêmeas inoculadas por via intravenosa (i.v.) no plexo retro orbital com hemácias infectadas com a finalidade de preparar inóculos com carga parasitaria conhecida e padronizada. Foram coletadas amostras de sangue da cauda destes animais para avaliar a porcentagem de parasitemia e quando as fêmeas atingiram uma porcentagem de parasitemia de 1-2 %, foi coletado o sangue para fazer o stock de vials de parasitos com inóculos de 1×10^5 hemácias infectadas a cada 100 μ L resuspendidos em 10% de glicerina diluída em PBS o qual foi utilizado para infectar todos grupos experimentais. Estes vials foram armazenados a -80 °C. Sendo assim, após descongelamento do inóculo as fêmeas gestantes foram infectadas com 100 μ L de inóculo preparado por via i.v.

4.4 Desenho experimental

Para a avaliação do papel de MIF na malária durante a gestação em camundongos, os animais MIF^{-/-} foram infectados ou não com a cepa *Plasmodium berghei* NK65 no terço inicial, médio e final da gestação. O efeito da infecção foi comparado com os camundongos controles C57BL/6 sob as mesmas condições experimentais. Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais para cada linhagem (C57BL/6 e MIF^{-/-}) da seguinte maneira:

Camundongos fêmeas não gestantes e sem infecção (NG/NI), foram utilizados para comparação quando considerado necessário.

- Grupo 1: camundongos fêmeas com 8 dias de gestação não infectados (8DG/NI).
- Grupo 2: camundongos fêmeas com 8 dias de gestação e 6 dias de infecção (8DG/6DI).
- Grupo 3: camundongos fêmeas com 11 dias de gestação não infectados (11 DG/NI).
- Grupo 4: camundongos fêmeas com 11 dias de gestação e 6 dias de infecção (11DG/6DI).
- Grupo 5: camundongos fêmeas com 19 dias de gestação não infectados (19 DG/NI).
- Grupo 6: camundongos fêmeas com 19 dias de gestação e 6 dias de infecção (19DG/6DI).

Para analisar o papel de MIF no terço inicial da gestação os camundongos foram infectados no dia seguinte da rolha vaginal (2º dia gestacional). Os animais foram inoculados por via i.v. com 1×10^5 hemácias infectadas por *Pb* NK65^{GFP} provenientes dos inóculos previamente preparados. No oitavo dia de gestação os animais foram eutanasiados (Fig. 2).

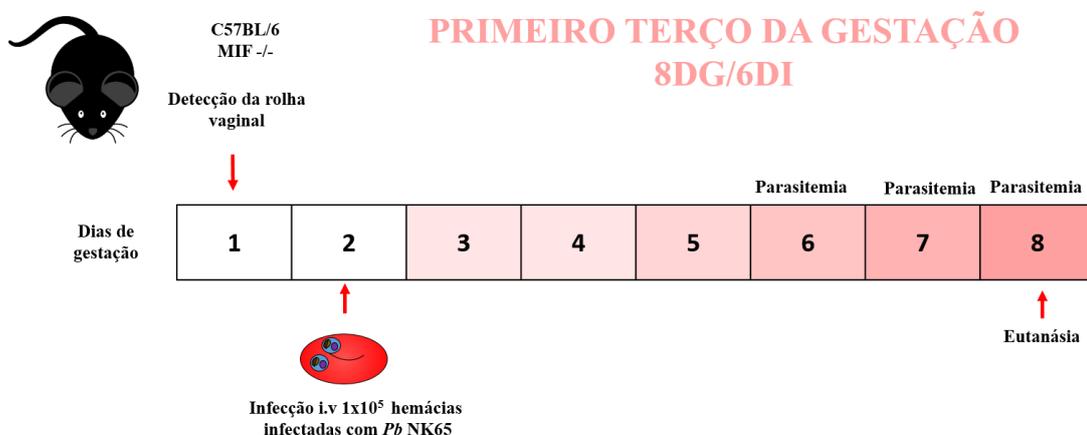


Figura 2. Desenho experimental primeiro terço gestacional.

Para estimar o papel de MIF no terço médio, os camundongos gestantes foram infectados no 5º dia gestacional e eutanasiados no dia 11 de gestação (Fig. 3).

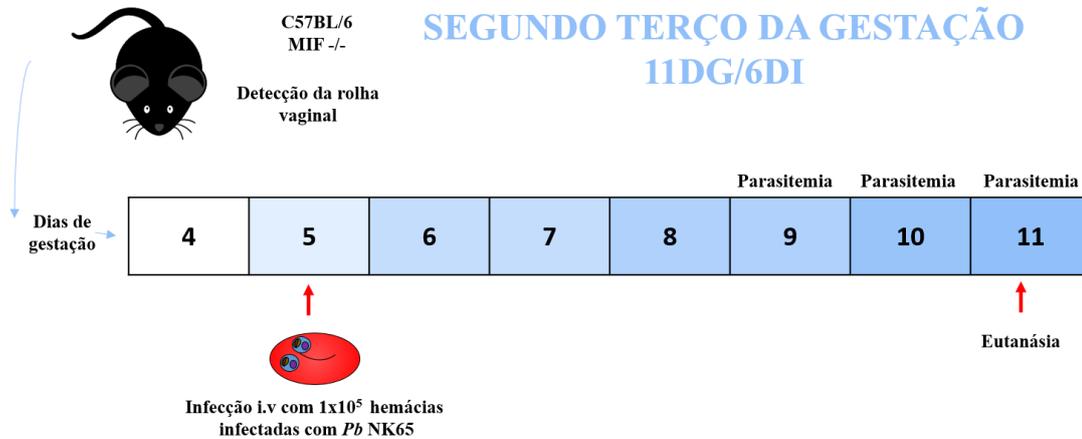


Figura 3. Desenho experimental segundo terço gestacional.

Para avaliar o papel de MIF no terço final da gestação, os camundongos foram infectados no 13º dia da gestação e foram eutanasiados no 19º dia de gestação (Fig. 4).



Figura 4. Desenho experimental terceiro terço gestacional.

4.5 Anestesia, eutanásia, coleta de amostras e órgãos

Os animais foram anestesiados com Xilazina 2%/Cetamina 10%- 10 mg/Kg /100 mg/Kg, por via intraperitoneal. O sangue dos animais foi coletado através do plexo retro-orbital e após centrifugação o soro foi separado e congelado a -80 °C até o momento do uso. Após anestesia e coleta de sangue os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Também, fragmentos teciduais de útero/placenta e baço foram coletados, fixados em formol

tamponado a 10% e posteriormente incluídos em parafina. Fragmentos teciduais de útero/placenta foram envolvidos em meio de congelamento (Tissue-Tek® O.C.T.™, Sakura Finetek, USA) e armazenados a -80°C. Além disso, fragmentos de tecido foram coletados para análises de biologia molecular e dosagem de citocinas, sendo anteriormente lavados em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) e acondicionados em tubos *eppendorfs*, imediatamente foram congelados em nitrogênio líquido, e armazenados à -80 °C até o momento do uso.

4.6 Registro de sítios de implantação anormais, peso placentário e fetal

O aspecto dos sítios de implantação foi avaliado identificando sítios de implantação anormais por sua aparência necrótica e hemorrágica, bem como por seu tamanho reduzido. Além disso, os fetos que apresentavam palidez ou aspecto hemorrágico também foram considerados anormais (NERES et al., 2008). A proporção de sítios de implantação normais e anormais foi calculada conforme descrito anteriormente (JOACHIM et al., 2001) e expressa em porcentagem. Os pesos dos cornos uterinos, placentas e fetos foram registrados. E a razão entre o peso do corno uterino e o número de locais de implantação por animal bem como a razão do peso fetal/peso placentário foram calculadas.

4.7 Parasitemia dos animais infectados com *Plasmodium*

A parasitemia dos animais foi avaliada 4, 5 e 6 dias após a infecção, através de citometria de fluxo. Para tal fim, foram coletadas aproximadamente duas gotas do sangue procedente da cauda dos camundongos, e ressuspensas em 500 µL de PBS estéril para depois serem centrifugadas a 3500 r.p.m durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de hemácias foi ressuspendido em 500 µL de formol 4% em PBS. A amostra assim processada foi avaliada no citômetro Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) estabelecendo uma janela (*gate*) para separação das hemácias segundo tamanho e a granulidade; além da separação pela fluorescência que os parasitos produzem. Foram avaliados um total de 50.000 eventos e os resultados foram analisados no software FlowJo V10.

4.8 Dosagem de hemoglobina

Os níveis de hemoglobina foram determinados nas amostras de sangue dos camundongos usando um kit comercial seguindo as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica S.A. - Belo Horizonte, MG). A absorvância para a dosagem de hemoglobina foi lida num comprimento de onda de 540 nm num leitor de microplacas (Versa Max *ELISA*

Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, United States) e os resultados foram expressos em g / dL.

4.9 Análises histológicas

Amostras de tecido de útero/placenta foram incluídas em parafina e cortes de 4 µm de espessura foram obtidos no micrótomo LEICA RM2125 RTS (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Os cortes foram posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e/ou Azul de Toluidina e/ou Tricrômico de Gomori. As lâminas foram digitalizadas no Aperio AT Turbo Scanner (Leica Biosystems Imaging) para a análise histológica.

A deposição de hemozoína (Hz) foi mensurada nos baços das fêmeas dos grupos experimentais infectados e na camada do labirinto de placentas de fêmeas com 19 DG. Cinco imagens microscópicas por baço ou por placenta foram capturadas no microscópio de luz polarizada Nikon Eclipse Ti-5 (Nikon Corporation, Konan, Minato-ku, Tokyo) usando objetiva de 20X. Imagens de 3-5 placentas foram analisadas por fêmea. Nas imagens obtidas foi detectada a birrefringência produzida pela hemozoína. O software ImageJ foi utilizado para analisar a porcentagem da área de hemozoína em relação à área total da imagem, conforme descrito previamente (CARIACO et al., 2018).

A área da decídua foi mensurada em seções de tecido de útero/placenta de 8DG. Foi estimada manualmente usando o software QuPath (BANKHEAD et al., 2017). Um total de 2-5 sítios de implantação por fêmea foram analisados.

Foi feita a avaliação estereológica do remodelamento das artérias espiraladas na decídua dos sítios de implantação de 11 DG em cortes histológicos digitalizados corados com H&E. A parede e o lúmen das artérias espiraladas foram delimitados usando o software ImageScope (Leica Biosystems Imaging), e a razão entre o tamanho total do vaso e o lúmen foi calculada (KIECKBUSCH; GAYNOR; COLUCCI, 2015).

O espaço vascular na camada do labirinto placentário (19DG) e o espaço vascular na região do trofoblasto (11DG) foi mensurado nas placentas dos camundongos nos tecidos corados com H&E. Imagens de 5 campos microscópicos de cada placenta, de pelo menos 3 placentas por animal, foram capturadas usando um microscópio de luz (Leica DM5000; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) equipado com câmera Leica ICC50 (Leica Micro-systems) usando a objetiva de 40X. As imagens foram analisadas usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MA, EUA), conforme descrito anteriormente (NERES et al., 2008). A ferramenta de

“threshold” de cor foi empregada para cobrir a área correspondente ao lúmen do espaço vascular. A área do espaço vascular foi determinada como a razão entre o número de pixels cobertos pela área definida pelo limiar e o número total de pixels na imagem. Os resultados foram expressos como a porcentagem média da área ocupada pelo espaço vascular de cada fêmea (NERES et al., 2008).

4.10 Detecção de células uNK por histoquímica nos sítios de implantação

Cortes teciduais de útero/placenta dos animais experimentais foram desparafinizados com xilóis e reidratadas em álcoois de concentrações decrescentes. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena usando H₂O₂ 3% em PBS 1X durante 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente (TA). A seguir, foram feitas duas lavagens de 5 minutos cada uma em PBS 1X. Depois, foi feita a incubação com a lectina de *Dolichos biflorus* aglutinina biotinizada (DBA Lectin - Sigma L6533; 1:300) diluída em PBS 1X; as lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e depois foram incubadas com o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) (kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA; 1: 100) em PBS 1X por 30 minutos, a 37°C. A reação foi revelada usando o 3,3' tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em conjunto com peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Foi realizada a contra-coloração do tecido com Hematoxilina de Harris durante 4 segundos. Após a lavagem, desidratação e diafanização dos cortes foi colocada a lamínula usando goma de Damar como meio de montagem. As lâminas foram digitalizadas com o equipamento Aperio AT Turbo Scanner (Leica Biosystems Imaging). Nas áreas das regiões da decídua mesometrial dos sítios de implantação foram quantificadas o número de células positivas. Os resultados foram expressos como número de células uNK por mm² de tecido.

4.11 Quantificação de mastócitos nos sítios de implantação

O número de mastócitos totais nos sítios de implantação das fêmeas em 8 e 11 DG foram quantificados nos cortes de tecido corados com azul de toluidina. Um total de 50 campos microscópicos das regiões do miométrio e endométrio, nas quais estas células se encontram, foram avaliados usando o microscópio Nikon i50 (Nikon Corporation, Konan, Minato-ku, Tokyo) em uma objetiva de 40X, os resultados foram expressos como a média do número de mastócitos em 50 campos (GOMES et al., 2018).

4.12 Detecção de células CD11b⁺ por imunohistoquímica nos sítios de implantação

Para a detecção de células CD11b⁺, secções congeladas de tecido do útero/placenta dos animais experimentais foram obtidas com o criostato CM1850 (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) e fixadas com acetona a -20 °C. Imediatamente, a peroxidase endógena foi bloqueada com 0,3% de H₂O₂ em PBS 1X por 30 minutos em câmara úmida a TA. Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo anti-CD11b biotinilado (RM2815, Invitrogen; 1:50) diluído em PBS 1X por duas horas. Posteriormente, os cortes foram incubados com ABC (kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA; 1: 100) por 30 minutos a 37°C e a reação foi revelada usando DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em conjunto com água oxigenada. Por fim, o tecido foi contra corado com hematoxilina de Harris por 4 e após a lavagem, desidratação e diafanização dos cortes foi colocada a lamínula usando goma de Damar como meio de montagem. As lâminas foram digitalizadas com o equipamento Aperio AT Turbo Scanner (Leica Biosystems Imaging). As áreas totais das secções de tecido foram mensuradas e o número de células positivas foi quantificado. Os resultados da análise foram expressos como o número de células positivas por mm² de tecido.

4.13 Detecção de células MCP1+ por imunohistoquímica nos sítios de implantação

Secções teciduais de útero/placenta congeladas em Tissue-Tek dos animais experimentais foram obtidas no criostato CM1850 (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) y foram fixadas com acetona -20 °C. Logo foi feito o bloqueio da peroxidase endógena usando H₂O₂ 0,3% em PBS 1X durante 30 minutos em câmara úmida a TA. A seguir, foi realizada a incubação por duas horas com o anticorpo primário anti-MCP1 (ab8101, Abcam, Inc) diluído 1:100 em PBS 1X e 0,01% de saponina. Para a detecção de MCP1 foi utilizado o anticorpo secundário anti-rat (Jackson laboratories, 1: 300) diluído em PBS 1X por 1 hora. Posteriormente, foi feita a incubação com o ABC (kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:100, durante 30 minutos a 37 °C. A reação foi revelada usando DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em conjunto com água oxigenada. Finalmente foi realizada a contra-coloração do tecido com Hematoxilina de Harris por 4 segundos. Após a lavagem, desidratação e diafanização dos cortes foi colocada a lamínula usando goma de Damar como meio de montagem. As lâminas foram digitalizadas com o equipamento Aperio AT Turbo Scanner (Leica Biosystems Imaging). As áreas totais das secções de tecido foram medidas e o número de células positivas foi contado. Os resultados da análise foram expressos como o número de células positivas por mm².

4.14 Análise da expressão de mRNA de MIF, DdT, iNOS, ARG1, VEGF e Tim 3 em amostras de placenta/útero

Amostras de tecido de útero/placenta foram pulverizadas utilizando nitrogênio líquido, depois elas foram homogeneizadas em 1000 µL TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, USA) com auxílio de um homogeneizador (IKA Works GmbH & Co. KG-Staufen– Alemanha). A extração do RNA total foi realizada conforme instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram mensuradas no equipamento NanoDrop (1000, Thermo). Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por transcrição reversa ImProm-II™ (Promega, Madison, WI, EUA) realizada no termociclador (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA). A reação de PCR quantitativa (qPCR) foi realizada no equipamento de PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, Life Technologies) utilizando o Kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA). Foram utilizadas sequências de primers específicas para cada gene alvo (Tabela 1). Os dados da expressão gênica foram analisados em relação ao gene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), e os resultados foram normalizados em relação ao grupo NG/NI usando o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1. Sequências de primers.

Nome do gene	Sequência do primer
<i>MIF</i>	Forward 5'-3' TGCCCAGAACCGCAACTACAGTAA Reverse 5'-3' TCGCTACCGGTGGATAAACACAGA
<i>DdT</i>	Forward 5'-3' CTCTTCTCCCCTAACATGC Reverse 5'-3' TCATGCCAGGTCGTATCGTA
<i>iNOS</i>	Forward 5'-3' CAGCTGGGCTGTACAAACCTT Reverse 5'-3' CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
<i>ARG1</i>	Forward 5'-3' AAAGCTGGTCTGCTGGAAAA Reverse 5'-3' ACAGACCGTGGGTTCTTCAC
<i>VEGF</i>	Forward 5'-3' CCCACGACAGAAGGAGAGCAGAAGT Reverse 5'-3' CATCAGCGGCACACAGGACGG
<i>Tim3</i>	Forward 5'-3' GACCCTCCATAATAACAA Reverse 5'-3' TAATAAGGCTCAAACCTCG

4.15 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados de taxa de gestação e taxa de parto prematuro foram analisados pelo teste de Fisher. Os resultados foram expressos como média ± SEM dos resultados obtidos e analisados pelo teste t de Student, One-Way ou Two-Way ANOVA seguido

do pós-teste de Bonferroni, quando os dados forem paramétricos. Valores de $p < 0.05$ indicaram diferenças estatisticamente significativas. Quando os dados foram não paramétricos foram analisados pelos testes Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Valores de $p < 0.05$ indicaram diferenças estatisticamente significativas.

5. RESULTADOS

5.1 Taxa de gestação em camundongo C57BL/6 e MIF^{-/-}

Uma vez que nem sempre que foi detectada rolha nas fêmeas, observou-se gestação no dia da eutanásia, foi avaliado a taxa de gestação em cada condição experimental. As fêmeas MIF de 8DG não infectadas e infectadas apresentaram taxas de gestação de 58.3 % e 50 % respectivamente, por outro lado os camundongos C57BL/6 deste terço gestacional apresentaram taxas de gestação maiores (83.3 % e 78.5%). Os resultados mostram que a ausência de MIF afeta a taxa da gestação principalmente no primeiro terço gestacional (Tabela 2). Este evento dificultou o alcance de um número maior de fêmeas gestantes neste grupo experimental, porém, com os camundongos que se tornaram gestantes foram realizadas as análises que levaram às conclusões do trabalho. Por outro lado, no terço médio a ausência do MIF não mostrou uma afetação evidente da taxa de gestação, essa mudança no neste parâmetro entre os grupos não infectados sem MIF de 11DG pode ser devido a diferentes lotes de camundongos usados para completar os grupos experimentais.

Tabela 2. Resultado da gestação em camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} não infectados e infectados com *Pb* NK65^{GFP}

Linhagem		Grupos Experimentais			
		8DG		11DG	
		NI	6DI	NI	6DI
C57BL/6	Número de fêmeas com sítios de implantação/ número de fêmeas com detecção de rolha vaginal ^a	10/12 (83.3 %) ^a	11/14 (78.5 %) ^a	10/11 (90 %) ^a	10/11 (90.9 %) ^a
	Número de fêmeas com sítios de implantação/ número de fêmeas com detecção de rolha vaginal ^a	7/12 (58.3 %) ^a	7/14 (50 %) ^a	8/10 (80 %) ^a	8/9 (88.8 %) ^a

^aTaxa de gestação; entre parênteses é mostrada a porcentagem de sucesso do resultado da gestação. Os dados foram analisados pelo teste de Fisher.

5.2 Efeitos da infecção por *P. berghei* NK65^{GFP} no terço inicial da gestação

Para avaliar o papel do MIF na malária durante o início da gestação, camundongos fêmeas com 2 dias de gestação (2DG) foram infectados com *Pb* NK65^{GFP} e eutanasiados 6 dias depois com 8DG/6DI, camundongos 8DG/NI foram utilizados como grupo controle. Os

resultados mostraram que os animais MIF^{-/-} gestantes infectadas apresentaram níveis de parasitemia semelhantes a camundongos C57BL/6 nas mesmas condições experimentais (Fig. 5A, B). No entanto, foram observadas maiores porcentagens de hemozoína no baço dos camundongos C57BL/6 gestantes infectados quando comparados com o grupo MIF^{-/-} (Fig. 5C, D). Aos 6 dias de inoculação do parasito, a infecção não induziu anemia em nenhum dos dois grupos de animais infectados, sendo que os níveis de hemoglobina foram semelhantes nos diferentes grupos experimentais (Fig. 5E).

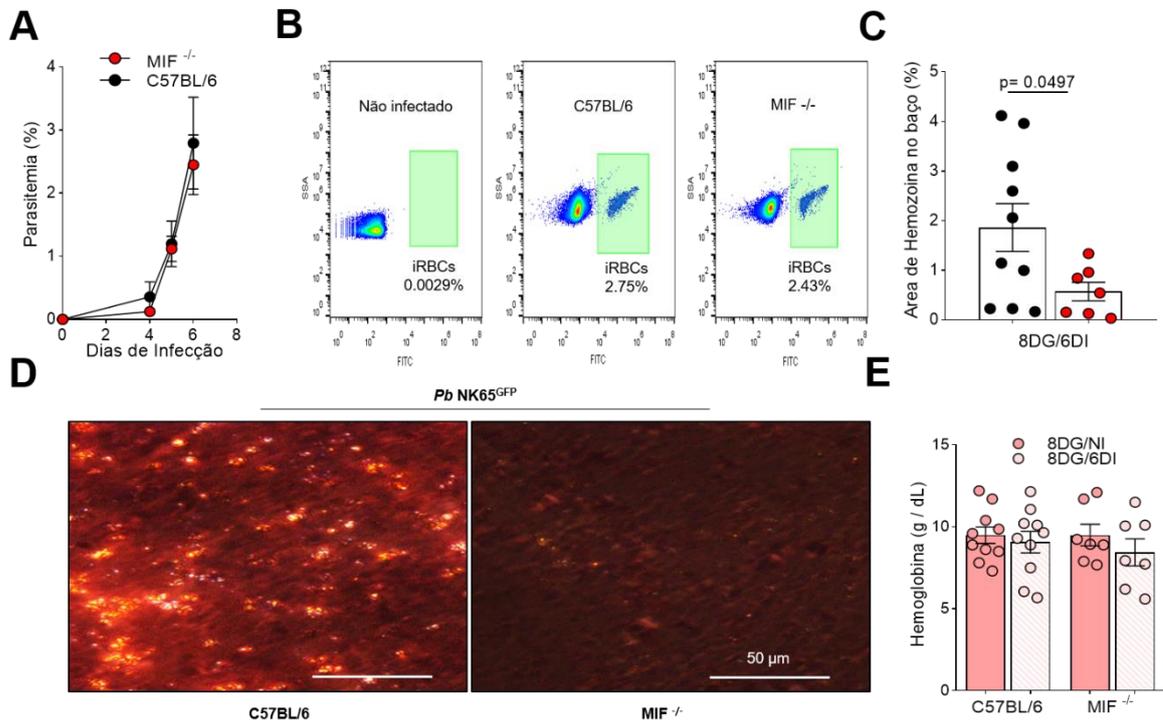


Figura 5. Avaliação da parasitemia, depósitos de hemozoína no baço e hemoglobina no primeiro terço gestacional. Curso da parasitemia durante o experimento em camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} inoculados por via intravenosa com 1×10^5 hemácias infectadas com a cepa *Pb* NK65^{GFP} no segundo dia de gestação (2DG), as porcentagens de parasitemia foram estimadas por citometria de fluxo (A). (B) Figura representativa da parasitemia no dia 6 de infecção em cada grupo experimental (grupo C57BL/6 8DG/6DI, n = 11; grupo MIF^{-/-} 8DG/6DI, n = 7). A porcentagem de área de hemozoína foi quantificada em cortes de baço corados com H&E de fêmeas do grupo 8DG/6DI através de microscopia de luz polarizada (C, D), escala da barra 50 μ m, (grupo C57BL/6 8DG/6DI, n = 10; grupo MIF^{-/-} 8DG/6DI, n = 7). Os níveis de hemoglobina (E) também foram mensurados nas gestantes. As porcentagens de parasitemia foram analisadas por Two Way ANOVA e pós-teste de Sidak e as porcentagens de área de hemozoína e a hemoglobina foram comparadas pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

Nem a infecção nem a deficiência de MIF afetaram o número de sítios de implantação nos animais experimentais (Fig.6A). As fêmeas C57BL/6 não infectadas apresentaram uma baixa proporção de sítios de implantação anormais neste período gestacional, enquanto as fêmeas MIF^{-/-} não exibiram sítios de implantação anormais. Em contraste, foram observados 21 % de sítios anormais nos camundongos C57BL/6 infectados com *Pb* NK65^{GFP}, sendo esta taxa

de reabsorção significativamente maior quando comparada com camundongos MIF^{-/-} infectados (Fig. 6B, C). Foi observada hemorragia intrauterina entre os sítios de implantação das fêmeas C57BL/6 infectadas (Fig. 6C).

Foi demonstrada uma diminuição significativa no peso dos sítios de implantação evidenciada pela redução na razão do peso do útero e o número de sítios de implantação por animal nos camundongos C57BL/6 infectados (8DG/6DI) em comparação com o controle não infectado (8DG/NI) da mesma linhagem e com camundongos durante este período gestacional. Entretanto, este parâmetro não foi alterado em animais MIF^{-/-} em resposta à infecção. Além disso, foi observado que camundongos MIF^{-/-} infectados apresentaram maior peso dos sítios de implantação quando comparado com C57BL/6 infectados (Fig. 6D). Em concordância, as fêmeas C57BL/6 gestantes infectadas apresentaram uma área da decídua diminuída em comparação com os animais controles não infectados e em comparação com o grupo de animais MIF^{-/-} infectados (Fig. 6E-F). Na análise histológica foi observado que enquanto as fêmeas MIF^{-/-} infectadas apresentaram desenvolvimento embrionário normal para a idade gestacional, as fêmeas C57BL/6 infectadas apresentaram necrose na decídua (Fig. 6E). Esses resultados mostram que MIF pode contribuir para piores resultados gestacionais e pode afetar o processo de decidualização neste período gestacional, durante a infecção por *Plasmodium*.

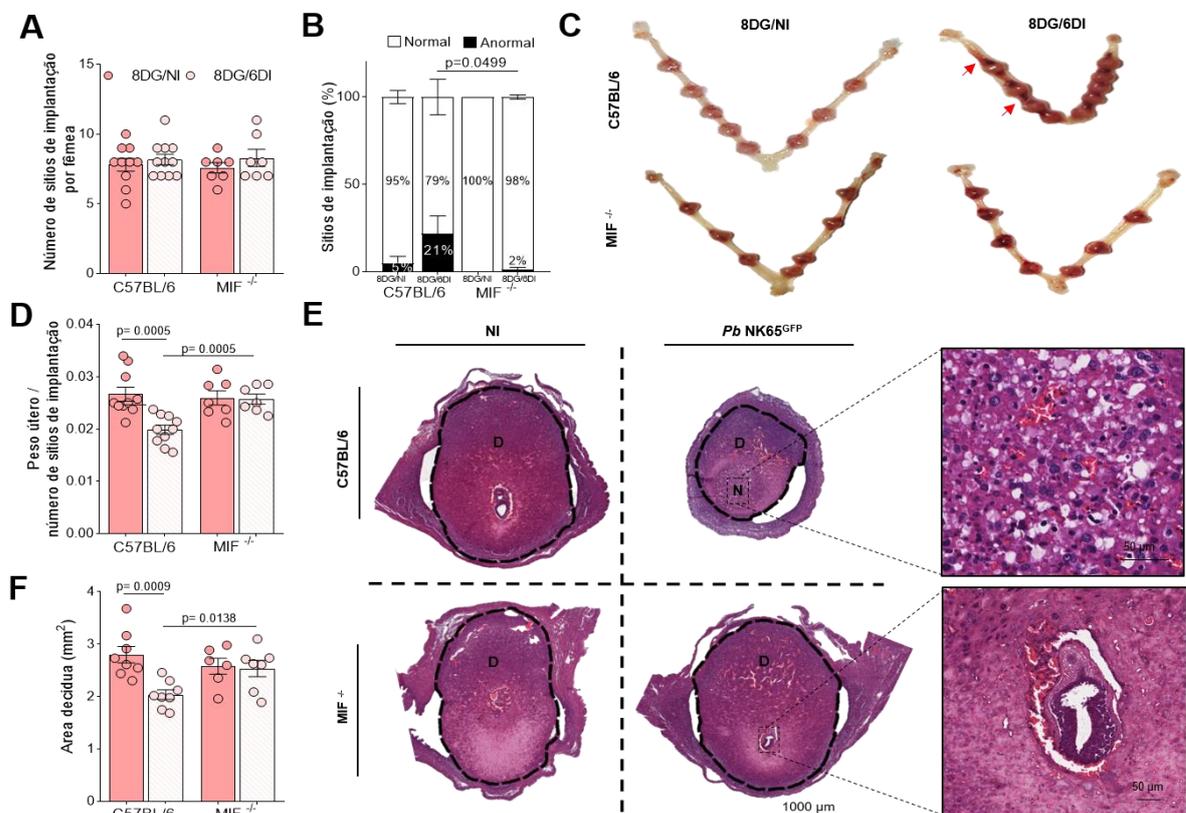


Figura 6. Análise das alterações induzidas durante o primeiro terço da gestação. Camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} foram infectados com *Pb* NK65^{GFP} no segundo dia de gestação e eutanasiados 6 dias depois. Fêmeas gestantes não infectadas de cada linhagem foram usadas como controles. No 8º dia de gestação, os números de sítios de implantação por fêmea foram quantificados (A) e classificados pela aparência como anormais ou normais (B, C). As setas vermelhas indicam hemorragia intrauterina entre os sítios de implantação. A razão entre o peso do corno uterino e o número de locais de implantação por animal foi estimada (D) (grupo C57BL/6 8DG/NI e grupo 8DG/6DI, n = 10; grupo MIF^{-/-} 8DG/NI e 8DG/6DI grupo, n = 7). Os tecidos uterinos foram processados histologicamente e as áreas decíduais dos sítios de implantação foram mensuradas (F) em cortes teciduais corados por H&E (E). Escala da barra: 1000 µm e 50 µm. As porcentagens de sítios de implantação anormais foram comparadas pelo teste Mann-Whitney. As demais comparações foram realizadas pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado, D: região da decídua. N: necrose.

5.3 Efeitos da infecção por *Pb* NK65^{GFP} no terço médio da gestação

Com o objetivo de avaliar o papel do MIF na malária gestacional durante o terço médio, camundongos fêmeas C57BL/6 e MIF^{-/-} foram infectados com *Pb* NK65^{GFP} no quinto dia gestacional e eutanasiados no dia 11 DG, sendo que em todos os grupos experimentais foram avaliados os mesmos 6 dias de infecção em diferentes fases da gestação. Os resultados revelaram que não houve diferenças estatísticas na parasitemia de camundongos MIF^{-/-} e C57BL/6 infectados nos dias avaliados (Fig. 7A, B). Contudo, fêmeas infectadas C57BL/6 apresentaram maiores quantidades de hemozoína no baço em comparação com as fêmeas MIF^{-/-} infectadas (Fig. 7C, D). Também, foi observado que neste terço gestacional a infecção por *Plasmodium* induziu anemia em ambas linhagens, C57BL/6 e MIF^{-/-} (Fig. 7E).

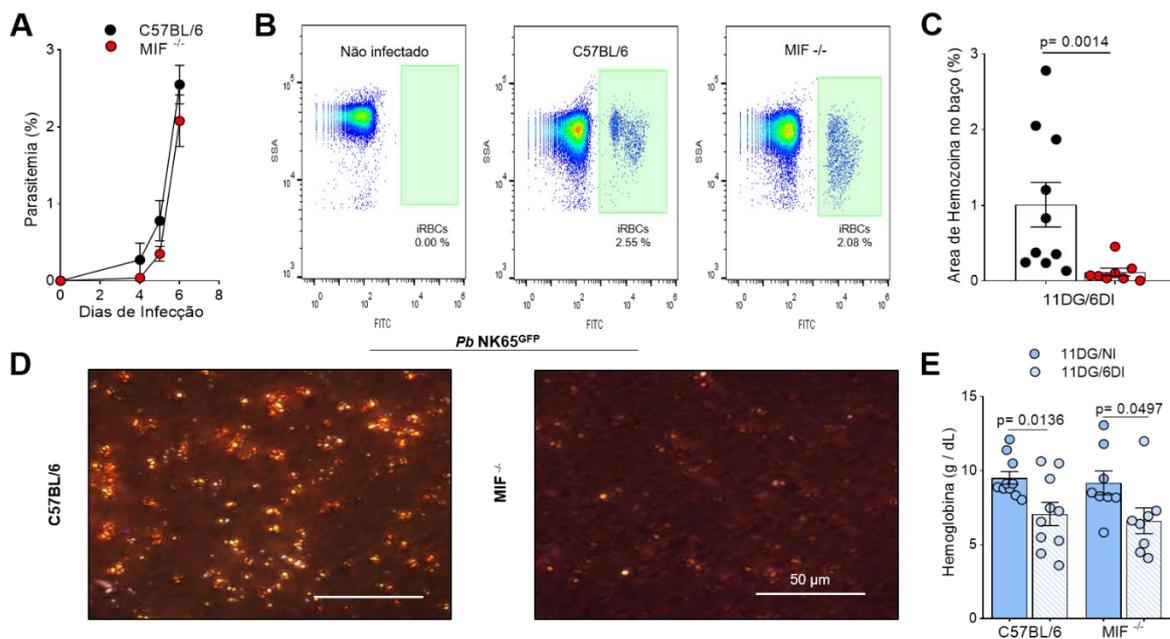


Figura 7. Análise da parasitemia, depósitos de hemozoína no baço e hemoglobina no segundo terço gestacional. Curso da parasitemia durante o experimento em camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} inoculados por via intravenosa com 1×10^5 hemácias infectadas com a cepa *Pb* NK65^{GFP} aos 5DG. As porcentagens de parasitemia foram estimadas em amostras de sangue por citometria de fluxo (A). (B) Figura representativa da parasitemia no dia 6 de infecção em cada grupo experimental. A porcentagem de área de hemozoína foi quantificada em cortes histológicos de baço corados com H&E através de microscopia de luz polarizada (C, D), escala da barra 50 µm,

(Grupo C57BL/6 8DG/6DI, n = 10; grupo MIF^{-/-} 8DG/6DI, n = 8). Além disso, os níveis de hemoglobina (E) foram mensurados. As porcentagens de parasitemia foram analisadas por Two Way ANOVA e pós-teste de Sidak e as porcentagens de área de hemozoína foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney e as concentrações de hemoglobina foram comparadas pelo teste t Student. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

Observou-se que nem a deficiência de MIF nem a infecção induziram alterações no número de sítios de implantação (Fig. 8A). Todos os grupos experimentais durante este período gestacional exibiram porcentagens de sítios de implantação anormais semelhantes (Fig. 8B, 4C). Do mesmo modo, a razão entre o peso do útero e o número de sítios de implantação por animal não mostrou mudanças devido à infecção nem à deficiência de MIF (Fig. 8D).

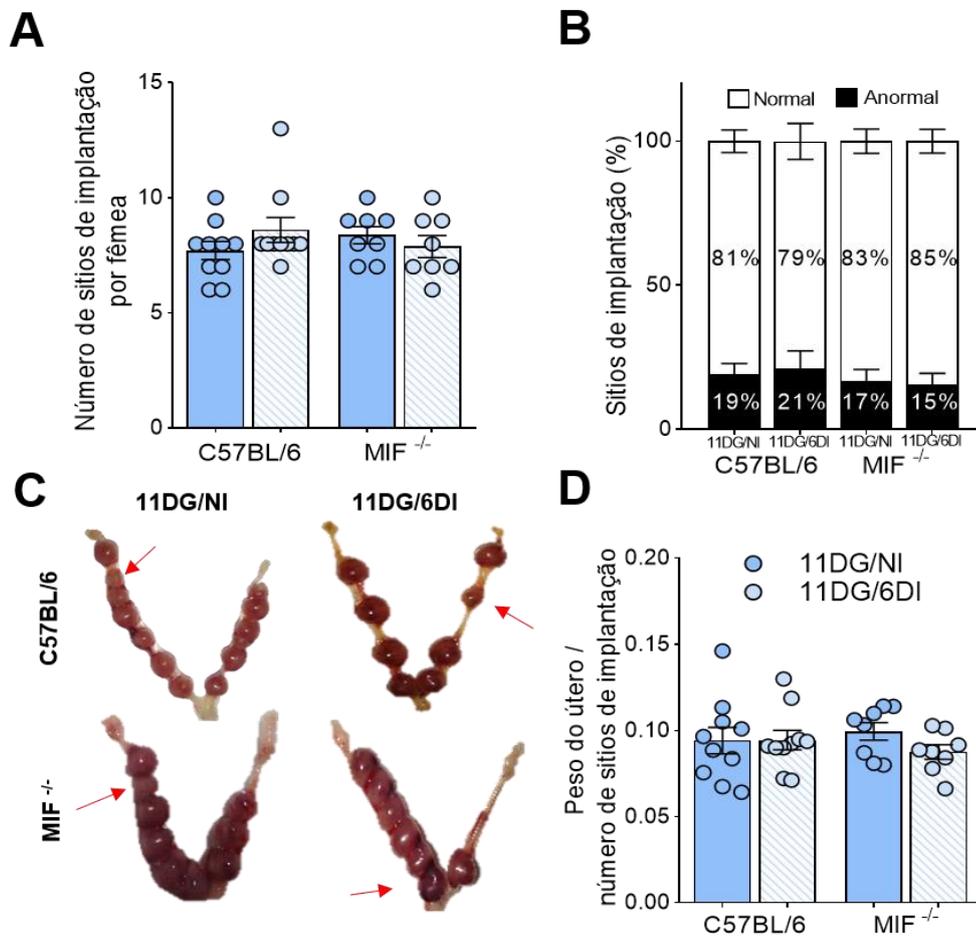


Figura 8. Avaliação das alterações induzidas pela infecção por *Pb* NK65^{GFP} durante o segundo terço da gestação. Camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} foram infectados com *Pb* NK65^{GFP} e avaliados no terço médio da gestação. Camundongos gestantes não infectados de cada linhagem foram usados como controle. Aos 11 dias de gestação, os números de sítios de implantação por fêmea foram registrados (B) e classificados de acordo a sua aparência como anormais ou normais (C, D). A razão entre o peso do corno uterino e o número de sítios de implantação por animal foi estimada (E) (grupo C57BL/6 11DG/NI e 11DG/6DI, n= 10; grupo MIF^{-/-}11DG/NI e 11DG/6DI n = 8). Os números de sítios de implantação por animal foram analisados usando o teste de Mann-Whitney. As demais comparações foram realizadas pelo teste t de Student. As setas vermelhas indicam sítios de implantação com aparência anormal. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

À medida que a decídua se desenvolve, as artérias espiraladas sofrem extensa remodelação, passando de ser vasos de alta resistência e baixo fluxo de sangue para grandes vasos dilatados com aumento do fluxo sanguíneo a uma pressão muito reduzida (BURTON et al., 2009), permitindo assim maior troca de nutrientes e oxigênio entre mãe e o feto (BADRAN et al., 2019). O remodelamento das artérias espiraladas atinge seu pico aos 10.5 dias da gestação murina (BALTAYEVA et al., 2020). Neste trabalho, os resultados mostraram que a infecção provocou uma diminuição significativa no lúmen das artérias espiraladas em animais C57BL/6 em relação aos animais da mesma linhagem não infectados (Fig. 9A). Além disso, foi observado que o tamanho do lúmen arterial em camundongos MIF^{-/-} infectados foi maior quando comparado com camundongos C57BL/6 na mesma condição experimental (Fig. 9A). De fato, não houve alterações no tamanho do lúmen arterial de camundongos MIF^{-/-} infectados quando comparados com camundongos não infectados da mesma linhagem (Fig. 9A, C). Além disso, a razão entre a área luminal e a área total do vaso (relação L/V), demonstrou que as artérias espiraladas dos animais C57BL/6 infectados têm lúmens menores e paredes mais espessas, sugerindo remodelação inadequada após a infecção, enquanto que os camundongos MIF^{-/-} infectados apresentaram uma remodelação adequada das artérias espiraladas evidenciada por uma área maior do lúmen do vaso, e uma relação L/V menor semelhante àquela de camundongos MIF^{-/-} e C57BL/6 não infectados (Fig. 9A, B, C). Com a finalidade de confirmar estes resultados, os sítios de implantação foram corados com tricrômico de Gomori, técnica que permitiu detectar uma maior quantidade de células musculares nas artérias espiraladas de camundongos C57BL/6 infectados em relação aos demais grupos experimentais, o qual representa outra evidencia do inadequado remodelamento destes vasos em resposta à infecção na presença de MIF (Fig. 9C). Assim, o MIF pode influenciar negativamente no remodelamento das artérias espiraladas durante a infecção por *Plasmodium*.

Em seguida, para avaliar a influência do MIF no desenvolvimento do espaço vascular na placenta, foi quantificada a área dos sinusóides na camada do labirinto. Foi demonstrado que camundongos C57BL/6 gestantes infectados apresentaram diminuição da área do espaço vascular no dia 11DG. Este é um achado patológico característico durante a infecção com a cepa do parasito utilizada (RODRIGUES-DUARTE et al., 2012). Em contrapartida, camundongos MIF^{-/-} infectados não mostraram uma diminuição significativa do espaço vascular placentário quando comparados com camundongos não infectados (Fig. 9D, E). Estes resultados sugerem que o MIF poderia prejudicar a organização do espaço vascular placentário durante a infecção por *Plasmodium* o que poderia afetar o posterior desenvolvimento fetal.

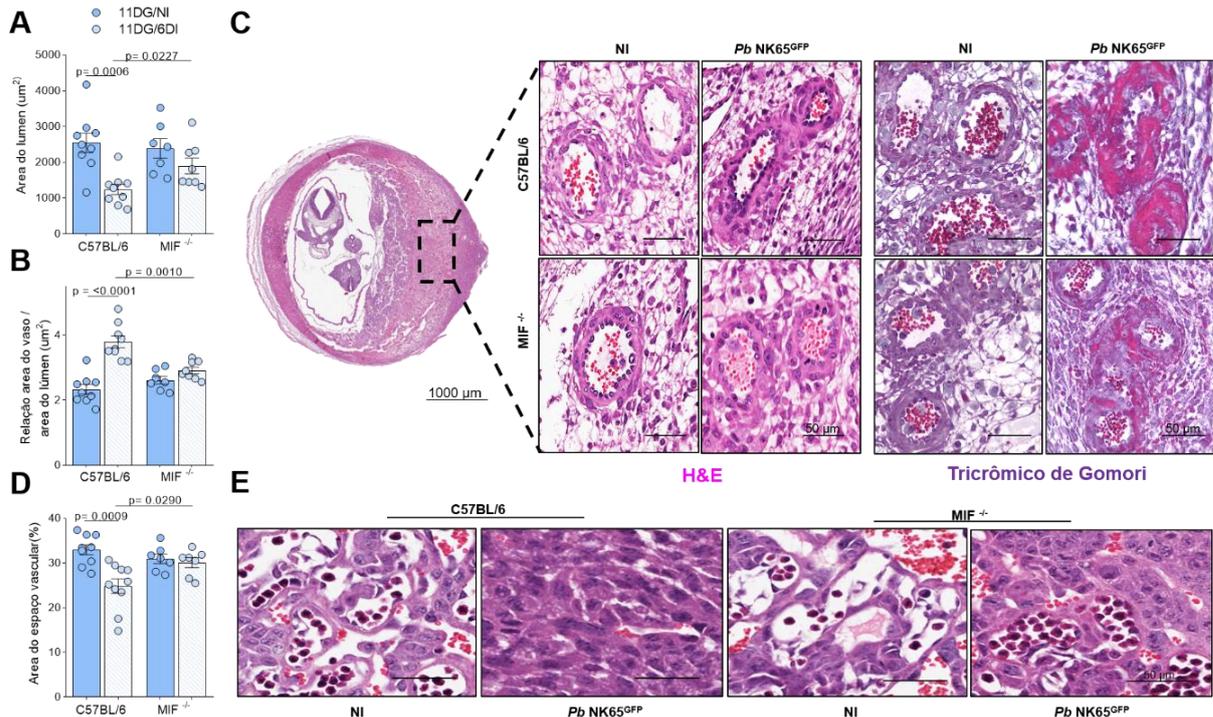


Figura 9. Avaliação do remodelamento das artérias espiraladas e alterações do espaço vascular na placenta durante a infecção por *Pb NK65^{GFP}* no terço médio da gestação. Sítios de implantação de animais C57BL/6 (grupo 11DG/NI e grupo 11DG/6DI, n = 9) e MIF^{-/-} (grupo 11DG/NI, n = 7 e grupo 11DG/6DI, n = 8) com 11 dias de gestação foram processados histologicamente e corados com H&E e coloração de Tricrômico de Gomori, a área da seção transversal das artérias espiraladas foi quantificada (A, C) e a razão entre a área do vaso e a área do lúmen foi calculada (B). O espaço vascular na camada do labirinto também foi mensurado nos cortes de tecido corados com H&E (D, E). Escala de barras: 50 µm. Cada ponto representa a média obtida por animal de no mínimo três sítios de implantação. Fêmeas gestantes não infectadas de cada linhagem foram usadas como controles. Todas as comparações foram realizadas pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

5.4 Efeitos da infecção por *Pb NK65^{GFP}* no último terço da gestação

No presente trabalho, foi investigado o papel do MIF durante o terço final da gestação. Para este fim, foram avaliadas fêmeas de 19 DG infectadas ou não com *Pb NK65^{GFP}* no dia 13 de gestação. A análise da parasitemia mostrou que camundongos MIF^{-/-} gestantes apresentaram níveis de parasitemia significativamente maiores aos 6 dias após a infecção em comparação com camundongos C57BL/6 nas mesmas condições experimentais (Fig. 10A, B). Da mesma maneira, foi evidenciada uma maior percentagem de hemozoína no baço das fêmeas MIF^{-/-} infectadas em comparação com as do grupo C57BL/6 (Fig. 10C, D) e em concordância também foi observada maior quantidade de hemozoína na camada do labirinto das placentas de animais MIF^{-/-} infectados em relação aos animais C57BL/6 infectados (Fig. 10E, F). Por outro lado, a infecção por *Pb NK65^{GFP}* durante o período final da gestação induziu anemia nas fêmeas C57BL/6 e MIF^{-/-} (Fig. 10G). Estes resultados sugerem que MIF é importante para o controle da infecção por *Plasmodium* no final da gestação.

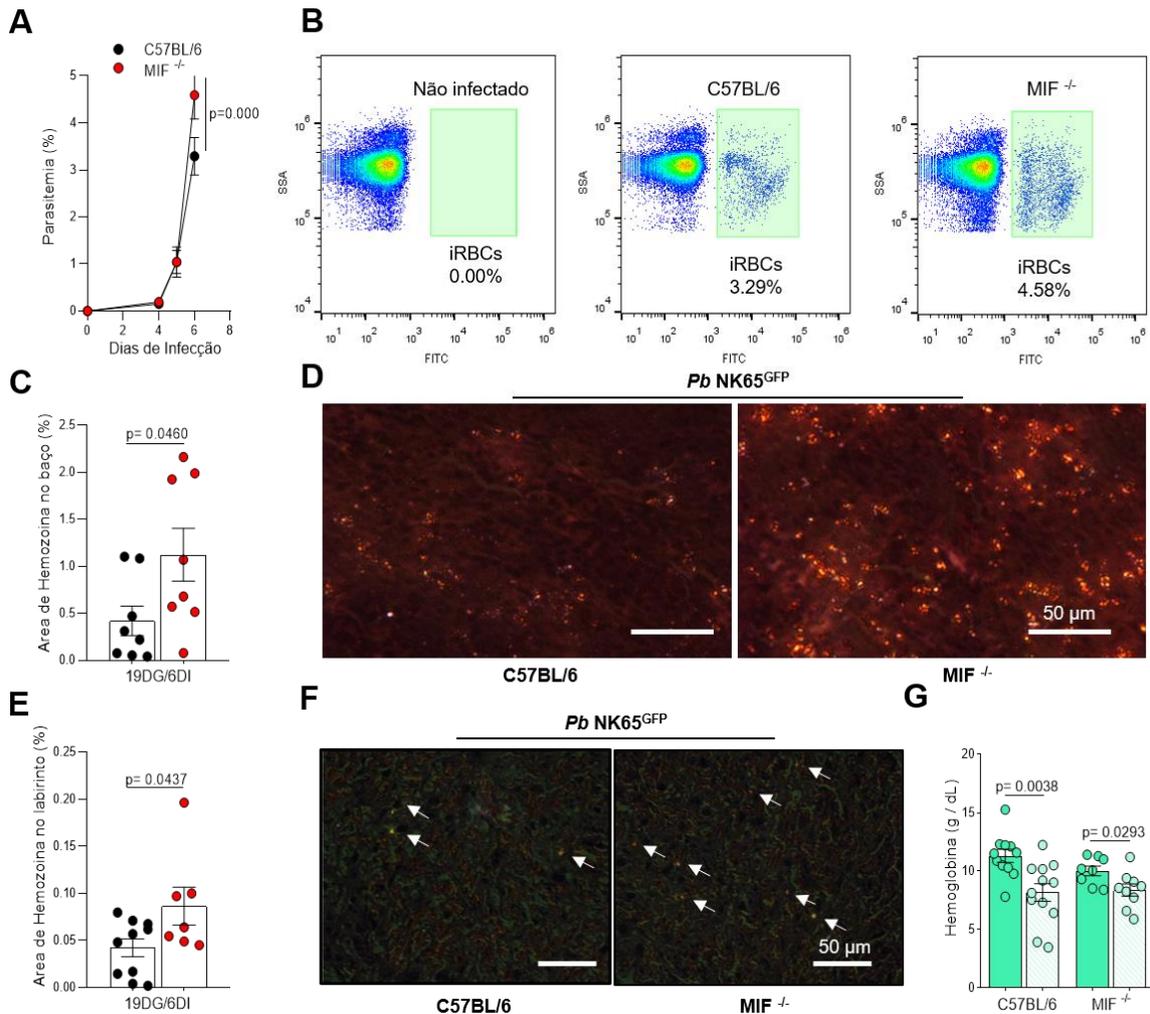


Figura 10. Análise da parasitemia, depósitos de hemozoína no baço, nas áreas do labirinto placentário e hemoglobina no último terço gestacional de animais infectados com *Pb NK65^{GFP}*. Curso da parasitemia durante o experimento em camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} inoculados por via intravenosa com 1×10^5 hemácias infectadas com a cepa *Pb NK65^{GFP}* aos 13DG, as porcentagens de parasitemia foram estimadas em amostras de sangue por citometria de fluxo (A, B) (grupo C57BL/6 19DG/6DI, n = 12; grupo MIF^{-/-} 19DG/6DI, n = 10). A porcentagem de área de hemozoína foi quantificada após 6 dias de infecção em cortes de baço de fêmeas gestantes (grupo C57BL/6 19DG/6DI, n = 8; grupo MIF^{-/-} 19DG/6DI, n = 8) e em cortes de placentas (grupo C57BL/6 19DG/6DI, n = 10; grupo MIF^{-/-} 19DG/6DI, n = 7) corados com H&E através de microscopia de luz polarizada, (C-F), escala de barras 50 µm. No sangue das fêmeas gestantes foram mensurados os níveis de hemoglobina (G). As porcentagens de parasitemia foram analisadas por Two Way ANOVA e pós-teste de Sidak e as porcentagens de área de hemozoína e concentrações de hemoglobina foram comparadas pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. As setas brancas apontam depósitos de hemozoína na área do labirinto placentário. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

Não foram observadas diferenças no número de sítios de implantação ou na porcentagem de sítios de implantação anormais, como consequência da infecção ou da deficiência de MIF (Fig. 11A-C). Por outro lado, nossos resultados demonstraram que os camundongos C57BL/6 infectados apresentaram placentas mais pesadas e fetos mais leves quando comparados com camundongos não infectados, e conseqüentemente, uma relação peso feto/placenta (F/P) diminuída (Fig. 11D-G), o que indica que durante a infecção por *Plasmodium* há ineficiência placentária que pode levar à transferência inadequada de nutrientes

(XU et al., 2020). Além disso, camundongos $MIF^{-/-}$ não infectados exibiram uma razão de peso F/P baixa em relação aos camundongos C57BL/6 não infectados. De maneira interessante, quando os animais “knockouts” foram infectados esta razão diminuiu em relação aos $MIF^{-/-}$ não infectados e aos camundongos C57BL/6 infectados (Fig. 11E-F). Deste modo, a infecção por *Plasmodium* causa ineficiência placentária que foi mais acentuada em camundongos com deficiência de MIF o qual poderia estar relacionado com os maiores níveis de parasitemia observados nesses animais.

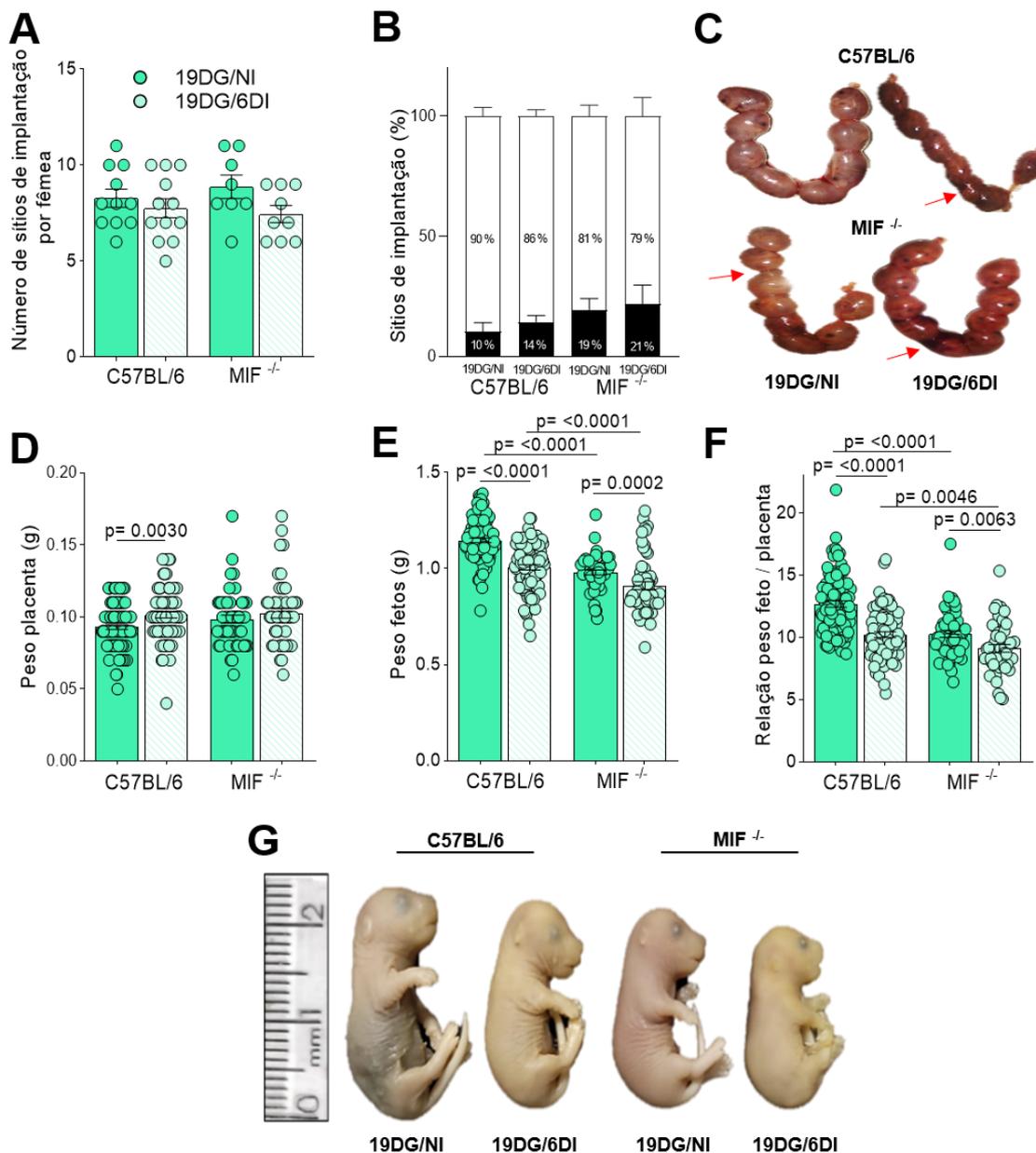


Figura 11. Avaliação das alterações induzidas pela infecção por *Pb NK65^{GFP}* durante o último terço da gestação. Camundongos C57BL/6 e $MIF^{-/-}$ foram infectados com *Pb NK65^{GFP}* no dia 13 de gestação e foram avaliados no final da gestação (19DG). Os números de sítios de implantação por fêmea foram quantificados (A) e classificados pela aparência como anormais e normais (B, C). As placentas (D) e os respectivos fetos (E, G) foram pesados e a relação peso fetal/placentário foi calculada (F) (fêmeas grupo C57BL/6 19DG/NI, n = 11 e grupo 19DG/6DI, n = 12; fêmeas $MIF^{-/-}$ grupo 19DG/NI, n = 8, grupo 19DG/6DI, n = 9). No gráfico A cada ponto

representa a medida individual de cada animal. Nos gráficos D, E, F cada ponto representa a medida individual de cada placenta ou feto. Camundongos fêmeas gestantes não infectadas de cada linhagem foram utilizadas como controles. As setas vermelhas indicam sítios de implantação com aparência anormal. O peso dos fetos e das placentas foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. As demais comparações foram realizadas pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

Uma das complicações da malária gestacional é o parto prematuro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), portanto, no presente estudo foi avaliada a taxa de parto prematuro em camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} infectados e não infectados durante o último terço gestacional, para isso, foram registradas as fêmeas que deram à luz antes do dia do sacrifício. Não foram encontradas alterações significativas nas proporções deste indicador nas diferentes condições experimentais, porém destacamos que os camundongos deficientes em MIF aparentemente apresentam maior proporção de parto prematuro mesmo sem infecção (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de parto pretermo em camundongos fêmeas C57BL/6 e MIF^{-/-} infectados com *Pb* NK65^{GFP} durante o último terço da gestação.

Linhagem		Grupo Experimental	
		19DG	6DI
C57BL/6	Número de fêmeas com parto pretermo/	0/11 (0 %) ^a	2/12 (16.6 %) ^a
	Total de fêmeas		
MIF ^{-/-}	Número de fêmeas com parto pretermo/	2/10 (20 %) ^a	2/10 (20 %) ^a
	Total de fêmeas		

^aTaxa de parto pretermo entre parênteses é mostrada a porcentagem. Os dados foram analisados pelo teste de Fisher.

Em relação à área do espaço vascular, foi observada diminuição da área do espaço vascular tanto nos animais C57BL/6 (19DG/6DI) quanto nos animais MIF^{-/-} (19DG/6DI) quando comparados aos não infectados. Porém, foi notado que os animais MIF^{-/-} não infectados apresentam espaços vasculares maiores em comparação com os camundongos C57BL/6 não infectados (Fig. 12A-B). Esses resultados sugerem que as alterações no espaço vascular pela infecção acontecem independente da expressão do MIF, por tanto o MIF pode não estar envolvido na alteração do espaço vascular no final da gestação.

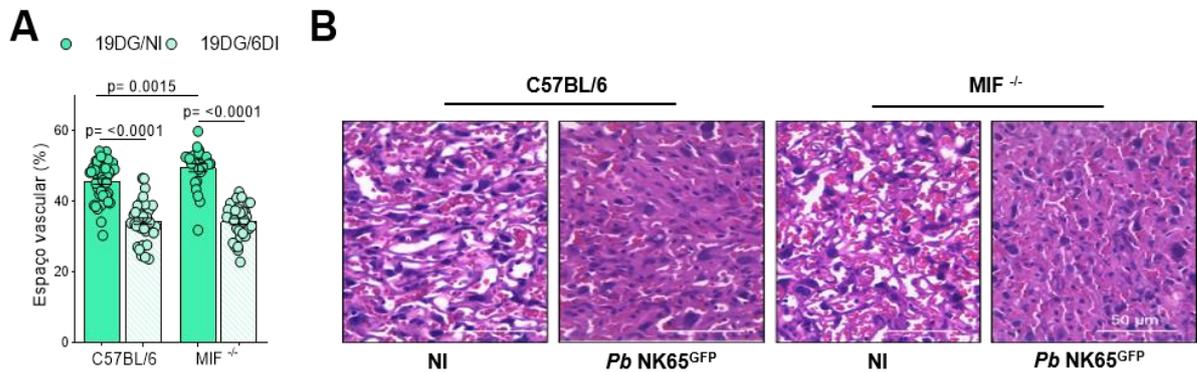


Figura 12. Análise do espaço vascular no labirinto no último terço de gestação de animais infectados com *Pb NK65^{GFP}*. As placentas foram processadas histologicamente e coradas por H&E. O espaço vascular na camada do labirinto foi mensurado. Escala das barras: 50 μm. (A, B) (fêmeas grupo C57BL/6 19DG/Ni, n = 9, grupo 19DG/6DI, n = 9; fêmeas grupo MIF^{-/-}19DG/Ni, n = 5, grupo 19DG/6DI, n = 7). Camundongos gestantes não infectados de cada linhagem foram usados como controles. Cada ponto representa a medida de uma placenta. As porcentagens do espaço vascular foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

5.5 Quantificação de células uNK em útero/placenta de animais de 8DG e 11DG infectados com *Pb NK65^{GFP}*

Uma vez que a presença de MIF esteve relacionada com aumento de sítios de implantação anormais no início da gestação e prejudicou o remodelamento das artérias espiraladas e a área do espaço vascular no terço médio da gestação como consequência da infecção por *Plasmodium*, foram avaliadas células envolvidas na manutenção da gestação como as células uNK, mastócitos e células CD11b⁺ e MCP1⁺, (GONG et al., 2017; YOCKEY; IWASAKI, 2018) nestes terços gestacionais. As células uNK foram detectadas na decídua mesometrial dos sítios de implantação e foi identificado que diminuíram em camundongos fêmeas C57BL/6 infectadas no terço inicial da gestação, em comparação com as fêmeas não infectadas (Fig. 13A, B). Além disso, foi observado que camundongos fêmeas MIF^{-/-} não infectadas (8DG/Ni) apresentaram um menor número de células uNK em comparação com camundongos C57BL/6 não infectados (Fig. 13A, B). Por outro lado, não foram observadas alterações no número de células uNK após a infecção com *Pb NK65^{GFP}* em camundongos MIF^{-/-} (8DG/6DI) (Fig. 13A, B). No terço médio da gestação, não foram observadas diferenças estatísticas no número de células uNK em resposta à infecção em camundongos C57BL/6 ou MIF^{-/-}. Também, foi observado que os camundongos MIF^{-/-} aumentaram o número de células uNK no decorrer da gestação sendo que animais de 11 DG apresentaram uma maior quantidade de estas células em comparação com os camundongos de 8DG. Contudo, uma diminuição no número de células uNK foi encontrada em animais MIF^{-/-} infectados (11DG/6DI) quando comparados com camundongos C57BL/6 infectados (Fig. 13A, C).

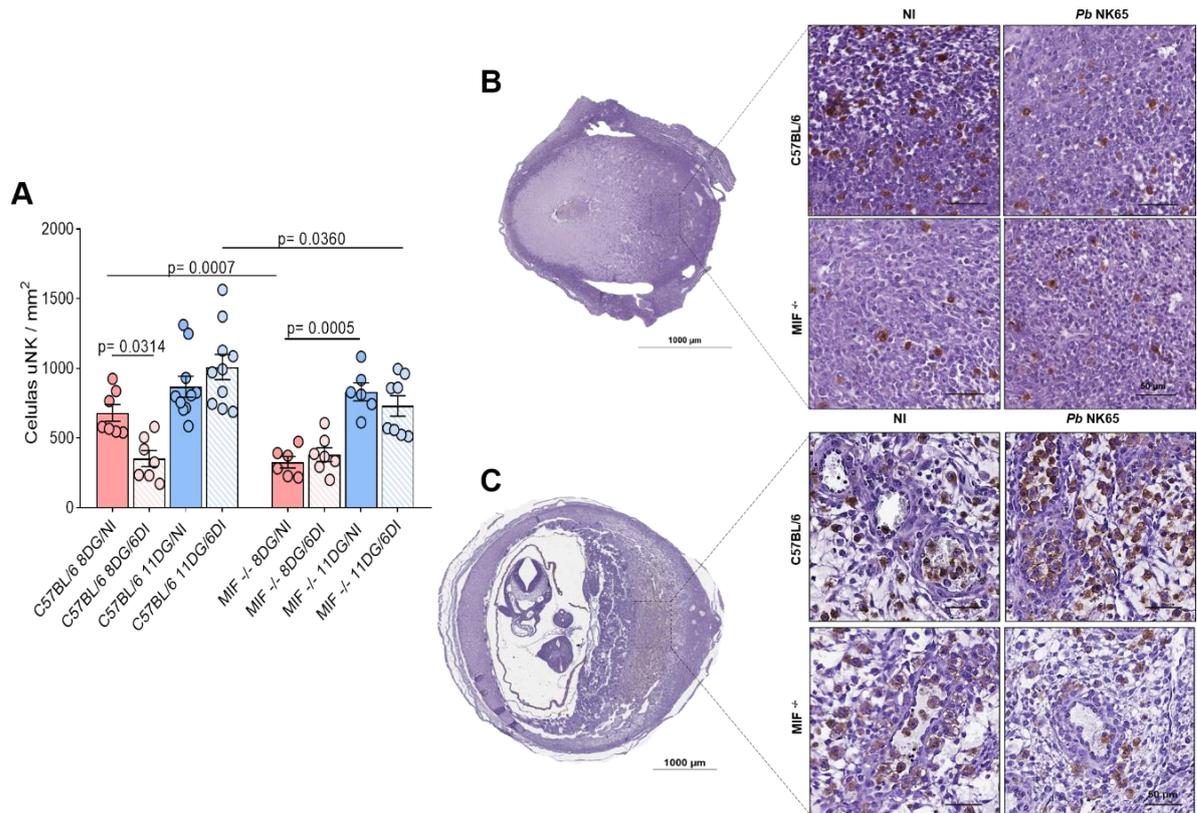


Figura 13. Detecção de células uNK, nos sítios de implantação no primeiro e segundo terço da gestação. O tecido uterino foi processado histologicamente e os cortes de tecido de camundongos gestantes C57BL/6 e MIF^{-/-} com 8 e 11 dias de gestação foram utilizados para detecção e quantificação de células uNK (A, B, F) (C57BL/6 grupo 8DG/NI e 8DG/6DI, n = 7; grupo 11DG/NI e 11DG/6DI, n = 10) (MIF^{-/-} grupo 8DG/NI, n = 6 e 8DG/6DI, n = 7; grupo 11DG/NI, n = 6 e 11DG/6DI, n = 8). Fêmeas gravidas não infectadas de cada linhagem foram usadas como controles. Escala da barra: 50 μ m. Os dados foram analisados pelo teste One Way ANOVA com pós-teste de Sidak. As comparações entre grupos experimentais iguais e linhagens diferentes foram feitas pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

5.6 Detecção de mRNA dos genes VEGF e Tim3 em útero/placenta de animais infectados com *Pb NK65*^{GFP}

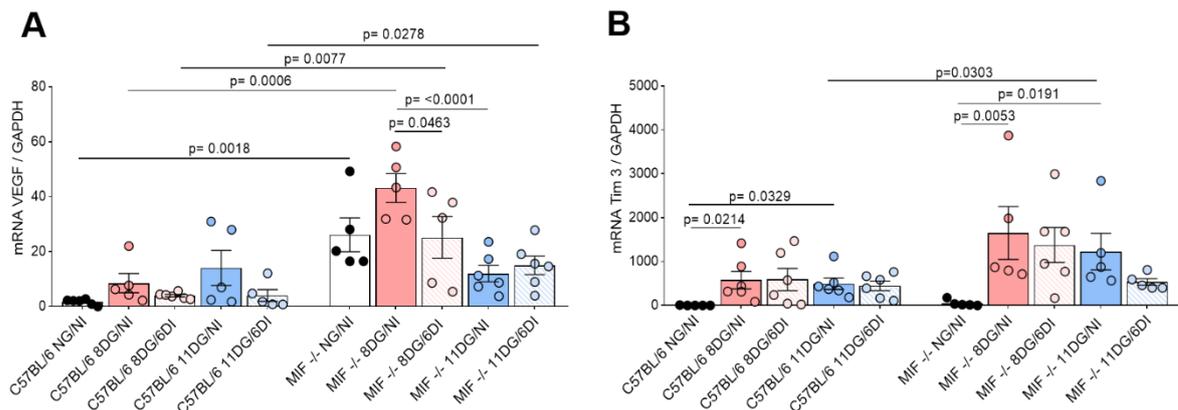
Com a finalidade de investigar o estado funcional das células uNK, foram avaliados os níveis de expressão de mRNA de VEGF fator produzido pelas células uNK envolvido nos estágios iniciais da remodelação vascular e na resposta angiogênica durante a decidualização (LASH, 2006; LI et al., 2008). Da mesma maneira, foi estudada a expressão de mRNA de “T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3” (Tim-3), locus 3 contendo domínio mucina e imunoglobulina de célula T, um marcador que participa na plasticidade funcional das células NK na decídua e em processos fisiológicos e patológicos durante a gestação (LI; LI; DU, 2017).

Os animais MIF^{-/-} infectados (8DG/6DI) apresentaram níveis de mRNA de VEGF significativamente reduzidos em relação aos animais MIF^{-/-} não infectados (8DG/NI), embora a expressão de VEGF foi maior em camundongos MIF^{-/-} infectados quando comparados com

os animais C57BL/6 infectados no mesmo período gestacional. Os resultados da expressão de VEGF no terço médio mostraram maior expressão deste fator durante a infecção em camundongos MIF^{-/-} em relação aos C57BL/6 (11DG/6DI) (Fig. 14A). Por outro lado, os camundongos MIF^{-/-} não infectados apresentaram diminuição de VEGF no decorrer da gestação (Fig. 13A). Em relação ao Tim 3, foi demonstrado que a expressão de mRNA aumenta aos 8 e 11 dias de gestação em sítios de implantação de camundongos C57BL/6 e MIF^{-/-} quando comparado com útero de camundongos NG/NI (Fig. 14B). A infecção não alterou significativamente os níveis de expressão de Tim3 em animais C57BL/6 ou MIF^{-/-} quando infectados com *Pb* ou entre as 2 linhagens de camundongos.

Os resultados indicam que possivelmente os níveis reduzidos de VEGF em camundongos C57BL/6 durante a infecção, juntamente com a menor quantidade de células uNK aos 8 dias de infecção pode ter comprometido o sucesso gestacional no terço inicial de gestação. Ao mesmo tempo que provavelmente os animais MIF conseguem aplacar o efeito da infecção por apresentarem melhores níveis desse fator do que os animais C57BL/6. Além disso, a infecção não interfere no número de células uNK nos animais MIF^{-/-}.

Em relação ao terço médio (11DG) os resultados mostraram que embora os animais MIF^{-/-} apresentaram menor número de células uNK quando infectados em comparação aos animais C57BL/6, eles apresentaram níveis mais elevados de VEGF em relação aos animais C57BL/6, o que pode estar relacionado ao melhor remodelamento das artérias espiraladas observado nos animais MIF^{-/-} durante este período gestacional.



Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

5.7 Detecção de mastócitos em útero/placenta de animais de 8DG e 11DG infectados com *Pb NK65*^{GFP}

Em relação aos mastócitos uterinos, durante o terço inicial e médio da gestação, não houve diferença significativa nas quantidades dessas células em resposta à infecção em camundongos C57BL/6 ou MIF^{-/-} (Fig. 15A, B, C). No entanto, foi observado que os mastócitos diminuem no terço médio de gestação nas duas linhagens de camundongos (Fig. 15A, B, C).

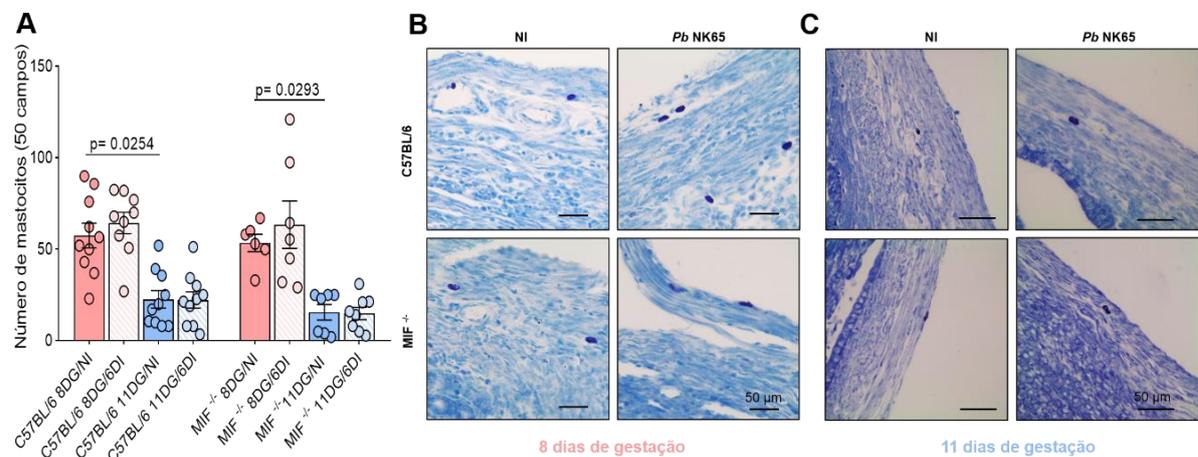


Figura 15. Detecção de mastócitos nos sítios de implantação no primeiro e segundo terço da gestação. O tecido uterino foi processado histologicamente e os cortes de tecido de camundongos gestantes C57BL/6 e MIF^{-/-} com 8 e 11 dias de gestação foram utilizados para detecção e quantificação de mastócitos (A, B, C) (C57BL/6 grupo 8DG/NI, n = 10 e 8DG/6DI, n = 9; grupo 11DG/NI e 11DG/6DI, n = 10) (MIF^{-/-} grupo 8DG/NI, n = 6 e 8DG/6DI, n = 7; grupo 11DG/NI, n = 7 e 11DG/6DI, n = 8). Fêmeas gestantes não infectadas de cada linhagem foram usadas como controles. Escala das barras: 50 μ m. Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis com e pós-teste de Dunns. As comparações entre grupos experimentais iguais e linhagens diferentes foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

5.8 Detecção de células CD11b⁺ e MCP1⁺ em útero/placenta de animais aos 8DG e 11DG infectados com *Pb NK65*^{GFP}

As células CD11b⁺ aumentaram significativamente nos sítios de implantação dos animais C57BL/6 infectados (8DG/6DI) em relação aos camundongos C57BL/6 do grupo 8DG/NI, enquanto que o número dessas células não foi alterado em resposta à infecção em camundongos MIF^{-/-}. De maneira interessante, camundongos MIF^{-/-} gestantes e não infectados apresentaram maiores quantidades de células CD11b⁺ do que camundongos C57BL/6 não infectados, indicando que a deficiência de MIF leva a um aumento deste tipo celular nos sítios

de implantação (Fig. 16A, B). No terço médio da gestação, o número de células CD11b⁺ diminuem em relação aos 8DG nas duas linhagens de camundongos em presença ou não de infecção. Também, neste terço foi detectado que a infecção levou a uma diminuição no número de células CD11b⁺ em camundongos C57BL/6. Em contraste, a infecção causou um aumento nas quantidades destas células em camundongos MIF^{-/-} (Fig. 16A, C). Ao mesmo tempo, camundongos MIF^{-/-} infectados apresentaram maior número de células CD11b⁺ em sítios de implantação no terço médio da gestação em relação aos camundongos C57BL/6 infectados (11DG/6DI) (Fig. 16A, C).

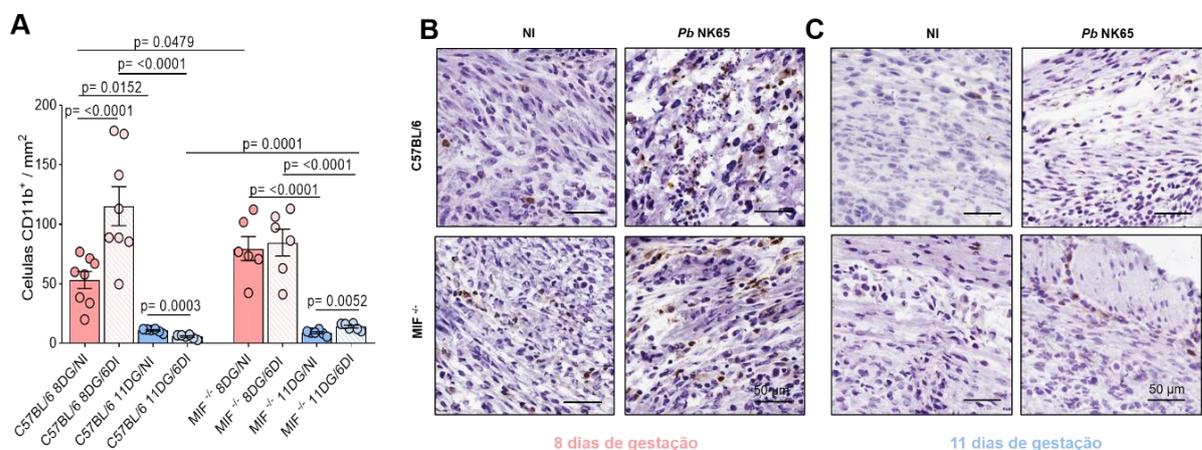


Figura 16. Detecção de células CD11b⁺ nos sítios de implantação no primeiro e segundo terço da gestação em infecção por *Pb NK65*^{GFP}. O tecido uterino foi processado histologicamente e os cortes de tecido de camundongos gestantes C57BL/6 e MIF^{-/-} com 8 ou 11 dias de gestação foram utilizados para detecção e quantificação de células CD11b⁺ por imunohistoquímica (A, B, C) (C57BL/6 grupo 8DG/NI e 8DG/6DI, n = 8; grupo 11DG/NI e 11DG/6DI, n = 6) (MIF^{-/-} grupo 8DG/NI e 8DG/6DI, n = 6; grupo 11DG/NI e 11DG/6DI, n = 6). Fêmeas gestantes não infectadas de cada linhagem foram usadas como controles. Escala da barra: 50 µm. Os dados foram analisados pelo teste One Way ANOVA com pós-teste de Sidak. As comparações entre grupos experimentais iguais e linhagens diferentes foram feitas pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

Em relação às células com fenótipo MCP1⁺ foi observado que no terço inicial aumentaram significativamente em decorrência da infecção nos animais C57BL/6 (8DG/6DI). Contrariamente não foi evidenciado este aumento nas fêmeas MIF^{-/-} infectadas. Interessantemente os resultados mostraram que os animais MIF^{-/-} infectados apresentaram menores quantidades deste fenótipo de células em comparação com as fêmeas C57BL/6 infectadas neste terço gestacional (Fig. 17, A, B). Por outro lado, durante a infecção no terço médio foi evidenciada uma tendência a diminuir deste fenótipo de células nos animais C57BL/6 infectados quando comparados com os animais da mesma linhagem não infectados e observou-se uma diminuição significativa dessas células aos 11DG/6DI em relação aos 8DG/6DI. Contrariamente nos animais MIF^{-/-} foi encontrado que estas células tendem a aumentar em

decorrência da infecção em relação com os animais MIF^{-/-} não infectados (Fig. 17, A, B). Os camundongos MIF^{-/-} aos 11DG6DI apresentaram maiores números de células MCP1⁺ em relação aos animais C57BL/6 nas mesmas condições experimentais infectados (Fig. 17, A, B).

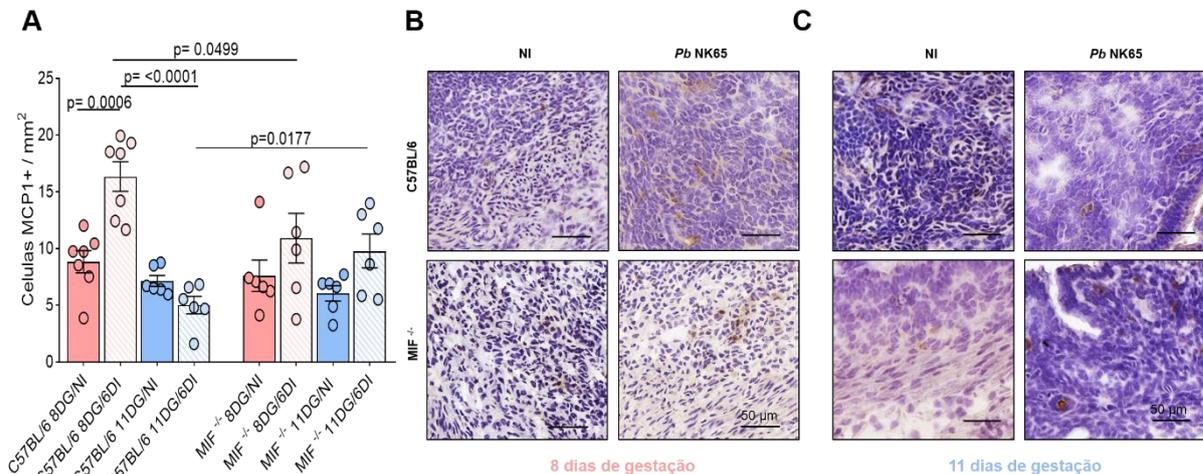


Figura 17. Detecção de células MCP1⁺ nos sítios de implantação no primeiro e segundo terço da gestação de animais infectados com *Pb NK65*^{GFP}. O tecido uterino foi processado histologicamente e os cortes de tecido de camundongos gestantes C57BL/6 e MIF^{-/-} com 8 e 11 dias de gestação foram utilizados para detecção e quantificação de células MCP1⁺ por imuno-histoquímica (A, B, C) (C57BL/6 grupo 8DG/NI e 8DG/6DI, n = 7; grupo 11DG/NI e 11DG/6DI, n = 6) (MIF^{-/-} grupo 8DG/NI e 8DG/6DI, n = 6; grupo 11DG/NI e 11DG/6DI, n = 6). Fêmeas gestantes não infectadas de cada linhagem foram usadas como controles. Escala das barras: 50 μ m. Os dados foram analisados pelo teste One Way ANOVA com pós-teste de Sidak. As comparações entre grupos experimentais iguais e linhagens diferentes foram feitas pelo teste t de Student. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

5.9 Detecção de mRNA dos genes iNOS e ARG1 em útero/placenta de animais infectados com *Pb NK65*^{GFP}

Devido às diferenças observadas no número de células CD11b⁺ e MCP1⁺ no primeiro e segundo terço de gestação, foi avaliada a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e Arginase 1 (ARG1), enzimas fundamentais do perfil funcional dos macrófagos (MILLS et al., 2000). Foram encontradas diferenças significativas em 11 DG, onde camundongos MIF^{-/-} infectados apresentam menores níveis de expressão de iNOS em relação aos camundongos MIF^{-/-} não infectados (11DG/NI) e C57BL/6 infectados (11DG/6DI) (Fig. 18A). Foi encontrado que animais MIF^{-/-} infectados aos 8DG, apresentam níveis maiores de expressão de ARG1 que o grupo C57BL/6 infectado. Ao mesmo tempo que animais da linhagem MIF^{-/-} NI e 8DG/NI apresentaram maiores níveis quando comparados com os camundongos C57BL/6. Do mesmo modo, os animais MIF^{-/-} infectados apresentam maiores níveis de ARG1 em relação aos C57BL/6 infectados (11DG/6DI) (Fig. 18B). Estes resultados sugerem que nos animais com ausência de MIF aos 8DG tem um perfil mais anti-inflamatório devido a maior expressão de

ARG1, nesta linhagem com ou sem infecção fenômeno que possivelmente diminui as alterações em relação às observadas nos animais C57BL/5 infectados. Por outro lado, as alterações induzidas pela infecção na metade da gestação poderiam estar relacionadas a uma polarização de macrófagos para um perfil pro-inflamatório evidenciado pelos altos níveis de expressão de iNOS, enquanto que a prevenção destas alterações em camundongos com deficiência de MIF poderia se dever a um predomínio de macrófagos com perfil anti-inflamatório evidenciado pelos baixos níveis de expressão de iNOS em associação com a maior expressão de ARG1.

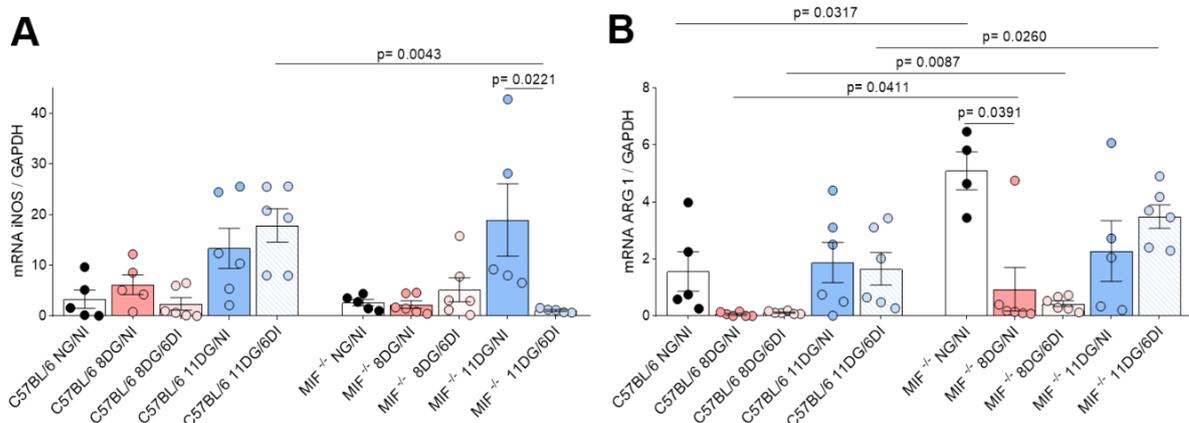


Figura 18. Avaliação da expressão de mRNA de iNOS e ARG em útero/placenta de animais C57BL/6 e MIF^{-/-} infectados com *Pb* NK65^{GFP} nos terços inicial e médio da gestação. (A) Expressão relativa do gene iNOS no útero de fêmeas NG/NI e em útero/placenta de animais C57BL/6 nos dias 8 e 11 DG inoculados ou não com 1×10^5 hemácias infectadas com a cepa *Pb* NK65^{GFP} (C57BL/6 grupo NG/NI, n= 5, 8DG/NI, n= 5 e 8DG/6DI, n= 6; 11DG/NI e 11DG/6DI, n= 6; MIF NG/NI, n= 5, 8DG/NI e 8DG/6DI, n= 6; 11DG/NI e 11DG/6DI, n= 5). (B) Expressão relativa do gene ARG no útero de fêmeas NG/NI e em útero/placenta de animais C57BL/6 e MIF nos dias 8 e 11 DG inoculados ou não com 1×10^5 hemácias infectadas com a cepa *Pb* NK65^{GFP} (C57BL/6 grupo NG/NI, n= 5, 8DG/NI, 8DG/6DI, 11DG/NI e 11DG/6DI, n= 6; MIF NG/NI, n= 4, 8DG/NI e 8DG/6DI, n= 6; 11DG/NI, n= 5 e 11DG/6DI, n= 6). Os dados foram analisados pelo teste Krustal-Wallis com e pós-teste de Dunns. As comparações entre grupos experimentais iguais e linhagens diferentes foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

5.10 Detecção de mRNA dos genes MIF e DdT em útero/placenta de animais infectados com *Pb* NK65^{GFP}

Foi realizada uma análise de expressão de mRNA por qPCR com a finalidade de avaliar os níveis de expressão gênica dos alvos de interesse MIF nos animais C57BL/6 e de seu homólogo funcional DdT nos animais C57BL/6 e MIF^{-/-}. Os resultados mostraram que úteros de fêmeas C57BL/6 não gestantes apresentaram maior expressão do MIF que sítios de implantação de fêmeas aos 8DG. Em concordância com os resultados de Faria et al. (2010), foi observado que o pico de expressão de MIF ocorreu aos 11DG, sendo que sítios de implantação de fêmeas C57BL/6 desse período gestacional apresentaram maior expressão de MIF que

camundongos não infectados da mesma linhagem aos 8DG. Da mesma maneira, os níveis de expressão de MIF são menores em placentas de camundongos C57BL/6 não infectados aos 19DG (Fig. 19A). Não foram demonstradas diferenças da expressão do MIF nos diferentes terços gestacionais como consequência da infecção por *Plasmodium*. Em relação à expressão do mRNA de DdT, não foram identificadas alterações na sua expressão no decorrer da gestação nas linhagens de camundongos utilizadas, embora foi evidenciado um aumento da sua expressão nos grupos de animais infectados MIF^{-/-} aos 8DG, 11DG e 19DG em comparação com os C57BL/6 infectados no mesmo período gestacional. Além disso, foi observado um aumento de mRNA de DdT nos animais MIF^{-/-} de 19DG não infectados em comparação com o grupo de animais C57BL/6 do mesmo período gestacional não infectados (Fig. 19B). Esses resultados mostram que provavelmente a maior expressão de DdT em animais MIF^{-/-} infectados pode se dever a um mecanismo compensatório devido à ausência desta citosina em todos os terços gestacionais avaliados.

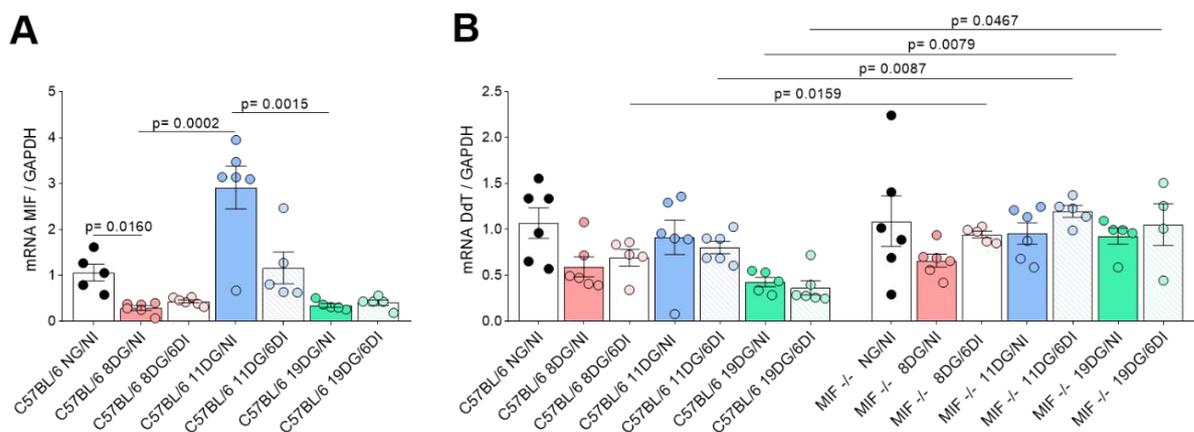


Figura 19. Avaliação da expressão de mRNA de MIF e DdT em útero/placenta de animais C57BL/6 e MIF^{-/-} infectados com *Pb NK65^{GFP}* nos terços inicial e médio da gestação. (A) Expressão relativa de MIF no útero de fêmeas NG/Ni e no útero/placenta de animais C57BL/6 aos 8, 11 e 19 DG inoculados ou não com 1×10^5 hemácias infectadas com a cepa *Pb NK65^{GFP}* (C57BL/6 grupo NG/Ni, n= 5, 8DG/Ni e 8DG/6DI, n= 6; 11DG/Ni, n= 6 e 11DG/6DI, n= 5, 19DG/Ni e 19DG/6DI, n= 5). (B) Expressão relativa do gene DdT no útero de fêmeas NG/Ni e no útero/placenta de animais C57BL/6 e MIF nos dias 8, 11 e 19 DG inoculados ou não com 1×10^5 hemácias infectadas com a cepa *Pb NK65^{GFP}* (C57BL/6 grupo NG/Ni, n= 6, 8DG/Ni, n= 6 e 8DG/6DI, n= 5; 11DG/Ni e 11DG/6DI, n= 6, 19DG/Ni, n= 6 e 19DG/6DI, n= 5) (MIF NG/Ni, n= 6, 8DG/Ni, n= 6 e 8DG/6DI, n= 5; 11DG/Ni, n= 6 e 11DG/6DI, n= 5, 19DG/Ni, n= 5 e 19DG/6DI, n= 4). Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As comparações entre grupos experimentais iguais e linhagens diferentes foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. DG: dias de gestação, DI: dias de infecção, NI: não infectado.

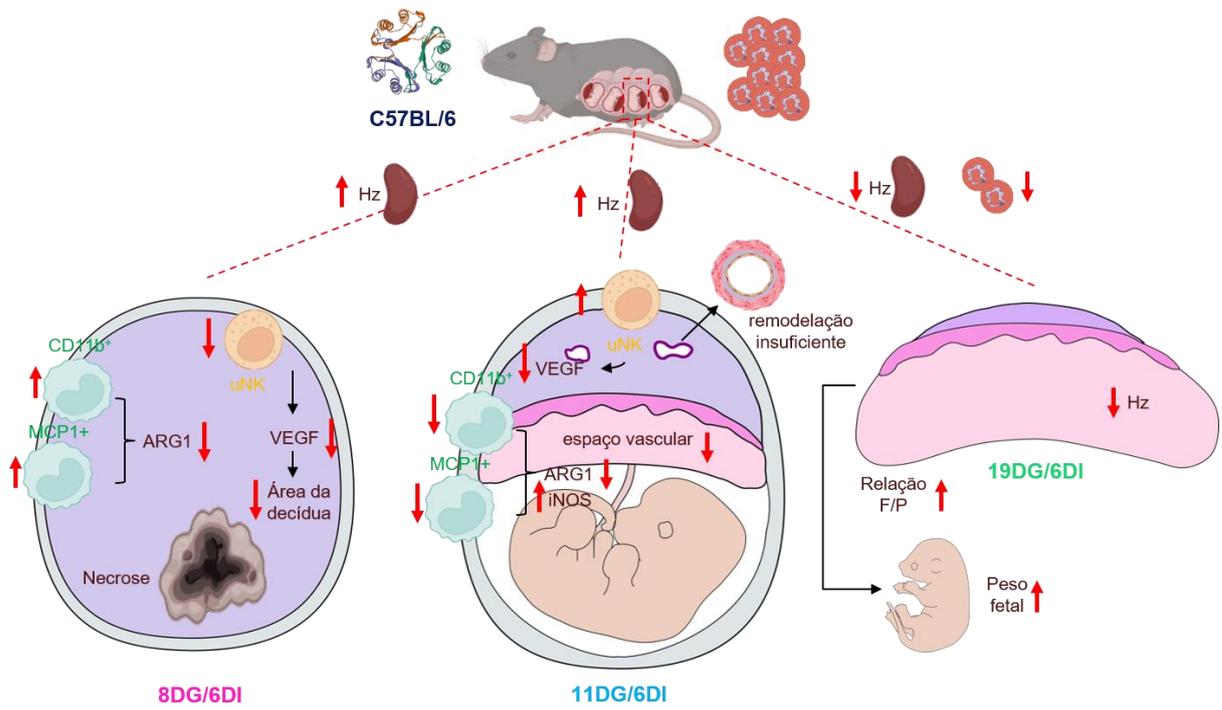


Figura 20. Principais consequências da presença de MIF durante a infecção *Pb* NK65^{GFP} em camundongos C57BL/6 por terço gestacional.

6. DISCUSSÃO

MIF é uma citocina pró-inflamatória pluripotente presente no endométrio humano, nas vilosidades placentárias, sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto (ARCURI et al., 1999, 2001), sendo um fator associado a eventos reprodutivos como ovulação, gestação e parto (IETTA et al., 2002). No presente estudo, foi demonstrado que MIF pode estar envolvido na taxa de gestação e no parto prematuro, pois animais que não expressam esta citocina diminuíram sua taxa gestacional quando observados aos 8 dias de gestação e também apresentaram uma maior taxa de parto prematuro aos 19DG.

MIF não foi determinante quanto a susceptibilidade materna à infecção por *Pb* NK65^{GFP}, em camundongos C57BL/6 no primeiro e segundo terço gestacional, uma vez que não foram observadas diferenças nas cargas parasitárias tampouco nos níveis de hemoglobina das gestantes, entre animais controles e MIF^{-/-}. Por outro lado, quando a infecção ocorre no fim da gestação a ausência de MIF leva ao aumento no parasitismo e prejuízos para a gestação incluindo o parto prematuro.

Deposição de hemozoína no baço de camundongos ICR infectados com *Pb* NK65 foram reportados previamente, os quais foram associados a carga parasitária acumulada e com a duração da infecção (SULLIVAN; ITTARAT; MESHNICK, 1996). Em fêmeas C57BL/6 infectadas aos 8 e 11 DG foram observados maiores depósitos de hemozoína esplênica em relação aos animais MIF^{-/-}, cuja origem pode ser resultante de maiores cargas parasitárias neste grupo de animais controle que, apesar de não apresentarem diferenças significativas nos níveis de parasitemia, apresentaram maior acúmulo de hemozoína (SULLIVAN; ITTARAT; MESHNICK, 1996).

Abortos e alterações gestacionais na infecção precoce por *Plasmodium* tem sido relatados no início da gestação (DAVISON et al., 1998; HVIID et al., 2010; SCHMIEGELOW et al., 2017). Neste estudo, a presença de MIF foi relacionada com maiores porcentagens de sítios de implantação anormais e redução na razão do peso do útero e o número de sítios de implantação durante o primeiro terço gestacional na infecção por *Pb* NK65^{GFP}. Também foi encontrada diminuição na área da decídua e alteração do desenvolvimento embrionário normal evidenciado pela presença de sítios de implantação em processo de necrose. A resposta inflamatória mediada por MIF foi previamente associada a danos teciduais durante a infecção por *Toxoplasma* (CAVALCANTI et al., 2011; DE OLIVEIRA GOMES et al., 2011; GOMES et al., 2018; MARCON et al., 2020) e a dano tecidual em outros órgãos como rim e fígado

(SONG et al., 2022). Além disso, MIF tem sido implicado na etiopatogenia da pré-eclâmpsia (ROLFO et al., 2013).

Considerando que MIF promove a migração direcionada e o recrutamento de leucócitos para locais infecciosos e inflamatórios (GRIEB et al., 2010), MIF pode contribuir para resultados gestacionais adversos durante a infecção por *Plasmodium* no primeiro terço gestacional promovendo uma resposta imune do perfil pró-inflamatório associado ao aumento de células de fenótipo CD11b⁺ e MCP1⁺. Os fenótipos CD11b/CD18 e CD11c/CD18 são antígenos restritos normalmente expressos em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células NK (MAZZONE; RICEVUTI, 1995), e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1/CCL2) é um potente fator quimiotático para monócitos/macrófagos (DESHMANE et al., 2009) que, ao mesmo tempo, são a principal fonte desta quimioquina (YOSHIMURA et al., 1989). Nesse sentido, os macrófagos podem desempenhar um papel fundamental, já que estão presentes no compartimento decidual e, embora tenham funções pró-angiogênicas durante a implantação, podem reconhecer antígenos e mediar a defesa contra agentes infecciosos (KRISHNAN; NGUYEN; MCCOMB, 2013). MIF participa na ativação de macrófagos para eliminar os parasitos da malária na placenta (BULMER et al., 1993), uma vez que o aprisionamento de eritrócitos infectados pelo parasito ou pigmento da malária (hemozoína) induz a liberação desta citocina (MARTINEY et al., 2000; PATHAK; GHOSH, 2016). Em concordância com nossos resultados, anteriormente foi encontrado um aumento no número total de macrófagos no tecido decidual humano acompanhado por uma diminuição na subpopulação de macrófagos de perfil M2, o que foi relacionado a uma diminuição no crescimento uterino/fetal consistente com defeitos no desenvolvimento placentário (BEZEMER et al., 2020). Camundongos MIF^{-/-} não apresentaram alterações no número de células CD11b⁺ ou MCP1⁺ durante a infecção e, devido a isso, é plausível supor que existe um mecanismo compensatório pela ausência de MIF que se mostra benéfico para o sucesso da gestação durante a malária gestacional. Nossos resultados sugerem que MIF favorece a um perfil pro-inflamatório devido a níveis reduzidos de expressão de ARG1 em animais infectados, o que poderia contribuir para os efeitos deletérios desencadeados por MIF, durante a infecção neste terço gestacional.

Uma decidualização alterada poderia ter levado à redução na área decidual durante a infecção de camundongos C57BL/6 aos 8 dias de gestação, que poderia estar relacionada à diminuição das células uNK neste terço gestacional. Tais células são muito importantes nos estágios iniciais da gestação, pois constituem 65-70% das células imunes locais (MOR et al., 2011). As células uNK têm papéis importantes no estabelecimento e manutenção do início da gravidez, como a promoção da angiogênese na decídua, remodelação das artérias espiraladas e

invasão do trofoblasto (MURATA; TANAKA; OKADA, 2021). Conseqüentemente, o desenvolvimento placentário é afetado negativamente em roedores que apresentam deficiência de células uNK (MEYER; ZENCLUSSEN, 2020). Animais MIF^{-/-} apresentaram menores números de células uNK aos 8 dias de gestação em relação aos animais MIF suficientes, podendo este resultado ser justificado pelo fato de que essas células sintetizam e liberam MIF ao mesmo tempo em que MIF exerce uma ação moduladora sobre sua atividade, uma vez que foi demonstrado anteriormente que um anticorpo neutralizante anti-MIF pode aumentar significativamente a atividade citolítica das células uNK (ARCURI et al., 2006). Poderia haver um mecanismo alternativo de regulação de células uNK na ausência de MIF, uma vez que não foram observadas diferenças no número dessas células na presença de infecção nesse grupo de animais. Além disso, o menor número de células uNK não teve impacto no sucesso da gestação neste período gestacional. Outros mecanismos podem estar envolvidos, já que foi descrito que as interações receptor-ligante nessas células podem proteger contra eventos adversos na gestação (HANNA et al., 2006). Portanto, essas células podem estar diminuídas, mas ainda sim podem atuar de maneira eficiente, fornecendo quantidades suficientes de quimiocinas e fatores de crescimento como VEGF, um importante elemento implicado na angiogênese uterina e na implantação embrionária (LOFTI-MIRI RABBANI; ROGERS, 2001). As células uNK têm sido demonstrado serem fonte deste fator (KALKUNTE et al., 2009) e nossos resultados demonstraram menores níveis de VEGF durante a infecção nos camundongos que expressam MIF, sugerindo a existência de uma associação entre a presença de MIF, níveis diminuídos de células uNK e menor expressão de VEGF durante a infecção por *Plasmodium* que poderia ter tido um impacto negativo no desenvolvimento embrionário, levando às alterações observadas durante o primeiro terço da gestação.

Em relação à expressão de mRNA de MIF em útero/placenta de camundongos C57BL/6, não foram verificadas alterações significativas em seus níveis devido à infecção por *Pb NK65^{GFP}*, em nenhum dos terços gestacionais analisados, apesar de ter sido verificada uma tendência a diminuição aos 11 dias de gestação e infecção. Outros pesquisadores não evidenciaram alterações na expressão de mRNA desta citocina em tecido adiposo após dieta hiperlipídica em camundongos, mas encontraram diferenças significativas utilizando outros métodos de quantificação proteica, como ensaios imunoenzimáticos *ELISA* no soro e *Western Blotting* no tecido alvo (LI et al., 2020). De acordo com trabalhos anteriores (FARIA et al., 2010), a expressão de MIF é diferente no decorrer da gestação, tendo sua máxima expressão no aos 11 dias, portanto, decidimos investigar se este tempo gestacional poderia ser chave para avaliar seu papel na infecção por *Plasmodium*.

No segundo terço gestacional de camundongos C57BL/6, a presença de MIF durante a infecção por *Pb* NK65^{GFP} foi correlacionada com falhas na remodelação das artérias espiraladas e diminuição do espaço vascular placentário, o que foi associado com menores níveis de expressão de VEGF, apesar de apresentarem maiores quantidades de células uNK em relação aos animais MIF^{-/-} infectados. Eventos estes correlacionados com um ambiente mais pró-inflamatório observado nos animais MIF suficientes devido aos níveis mais elevados de iNOS.

A remodelação insuficiente das artérias espiraladas leva a sérios distúrbios gestacionais (MEYER; ZENCLUSSEN, 2020). No presente trabalho foi observado que animais C57BL/6 aos 11DG infectados com *Plasmodium* apresentaram um remodelamento inadequado das artérias espiraladas. No entanto, houve aumento no número de células uNK em relação aos animais MIF^{-/-} infectados que apresentaram artérias espiraladas com melhor remodelamento. Neste sentido, o número de células não necessariamente reflete sua funcionalidade, mas sim a expressão de VEGF que é determinante no papel das células uNK durante o remodelamento vascular (PAWLAK et al., 2019). Assim, a maior expressão de VEGF na interface materno-fetal dos animais MIF^{-/-} poderia explicar o melhor remodelamento das artérias espiraladas observado neste grupo, mesmo na presença de infecção. Além disso, durante este terço gestacional, os camundongos C57BL/6, apresentaram menores números de células com fenótipo CD11b⁺ e MCP1⁺ frente a infecção em comparação com os animais MIF^{-/-} e em paralelo uma maior expressão de iNOS e menor de ARG1, o que poderia sugerir uma diminuição da população de macrófagos M2. Os macrófagos do perfil M2 são a subpopulação mais prevalente durante o remodelamento das artérias espiraladas, participando da ruptura da matriz extracelular e da fagocitose das células musculares lisas (SOCHA et al., 2021). O que também poderia auxiliar a explicar o melhor remodelamento nas artérias observado nos animais “knockouts” infectados onde foram observados menores níveis de expressão de mRNA de iNOS e maiores de ARG1. Nossos resultados sugerem que MIF pode estar contribuindo para um remodelamento inadequado das artérias espiraladas na infecção por *Plasmodium* no terço médio da gestação, induzindo um perfil imunológico pró-inflamatório ao qual tem sido associado previamente (CALANDRA; ROGER, 2003), e podendo levar a piores resultados gestacionais. Nossos resultados também mostraram redução do espaço vascular dos sinusóides sanguíneos nas fêmeas C57BL/6 infectadas, e essa alteração patológica foi previamente relatada na infecção por *Pb* NK65 durante a malária gestacional em camundongos (RODRIGUES-DUARTE et al., 2012). Provavelmente esta alteração também esteja relacionada com a resposta pró-inflamatória favorecida pela presença de MIF durante a infecção neste grupo experimental, já que desregula o equilíbrio dos fatores antigênicos e leva à

vascularização aberrante e disfunção placentária (WECKMAN et al., 2019). A redução do suprimento sanguíneo e falhas nas trocas materno-fetais podem ocorrer quando a invasão trofoblástica das artérias espiraladas não é suficiente, ou se a vasculatura materna não responde adequadamente através de uma combinação de vasodilatação e remodelação expansiva, comprometendo assim o fluxo sanguíneo (FOURNIER; D'ERRICO; STAPLETON, 2021). Portanto, as alterações aqui apresentadas provavelmente podem ter comprometido o fluxo sanguíneo para o feto em desenvolvimento, principalmente nos animais C57BL/6.

Embora a principal fonte de MIF no sistema imunológico sejam as células T, outras células, como os mastócitos, têm demonstrado expressar essa citocina (CALANDRA; ROGER, 2003). Foi descrito anteriormente que MIF é necessário para a indução da produção de IL-4 em mastócitos e basófilos na malária precoce em camundongos (*P. chabaudi*), dessa forma diminuindo a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ associada a maior parasitemia (MALU et al., 2011). No presente trabalho, ao menos em termos numéricos, a ausência ou presença de MIF não influenciou o número de mastócitos no útero/placenta no primeiro ou segundo terço gestacional, em animais infectados ou não por *Plasmodium*.

Foi observado maior expressão do homólogo funcional de MIF conhecido como DdT, em camundongos MIF^{-/-} durante a infecção por *Pb* NK65^{GFP} em comparação com camundongos C57BL/6 nas mesmas condições experimentais. Previamente foi descrito que MIF e DdT podem ser expressos de forma coordenada em resposta a estímulos semelhantes (MERK et al., 2011). Foi demonstrado que D-DT recombinante se liga com alta afinidade ao receptor CD74 (receptor de MIF), ativa as quinases ERK1/2 MAP e realiza muitas funções inflamatórias de MIF, tais como modulação da migração de macrófagos e imunossupressão (MERCK et al., 2011). Portanto, a maior expressão de DdT no útero/placenta em animais MIF^{-/-} infectados em relação aos animais controles infectados, poderia se dever a um evento compensatório durante a ausência de MIF durante a infecção.

Finalmente, durante no último terço gestacional, MIF demonstrou ser determinante na susceptibilidade materna à infecção por *Plasmodium*, sendo que fêmeas C57BL/6 apresentaram porcentagens menores de parasitemia, acompanhadas de menores depósitos de hemozoína no baco e na placenta, além de melhor peso fetal, em comparação com os animais MIF^{-/-}. No presente modelo experimental, a infecção induziu anemia materna no terço médio e final da gestação, e esta condição é esperada na malária devido à hemólise causada pela replicação do parasito durante seu ciclo de vida no hospedeiro (BARATEIRO et al., 2019). Embora MIF tenha um papel intrínseco no desenvolvimento de complicações da anemia associada à infecção por malária (MARTINEY et al., 2000; PATHAK; GHOSH, 2016), não foi observada diferença

nas concentrações de hemoglobina entre os animais infectados de cada linhagem. Por outro lado, fêmeas gestantes MIF^{-/-} apresentaram maior parasitemia no 6º dia de infecção e 19 de gestação, neste sentido resultados semelhantes foram mostrados no contexto da infecção por *Taenia crassiceps* (RODRÍGUEZ-SOSA et al., 2003), no qual camundongos geneticamente deficientes para esta citocina desenvolveram cargas parasitárias maiores em relação ao grupo controle. Também foi descrito previamente que MIF desempenha um papel importante no controle de infecções causadas por protozoários como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *T. gondii* e *P. falciparum* através da estimulação de células da imunidade inata e adaptativa (BOZZA et al., 2012). Consequentemente, a maior carga parasitária nos animais MIF^{-/-} levou a maiores depósitos de hemozoína neste grupo em relação aos animais C57BL/6 aos 19DG, tanto no baço quanto na região de labirinto placentário. Isto pode ser explicado pelo fato de que a placenta oferece um nicho para o acúmulo de EIs (FRIED; DUFFY, 1996).

Nossos resultados mostraram diminuição do peso fetal em animais C57BL/6 infectados, achado previamente relatado usando o mesmo modelo experimental (BARBOZA et al., 2014), além de alterações comumente descritas, como reabsorção embrionária, aumento do peso placentário e consequente ineficiência placentária (BARBOZA et al., 2017; RODRIGUES-DUARTE et al., 2012), bem como espessamento do tecido vascular placentário que poderia comprometer o espaço vascular sanguíneo disponível para realizar as trocas de gases e nutrientes entre mãe e feto (NERES et al., 2008) nos grupos infectados. Estes resultados indicam que a placenta apresenta sua funcionalidade comprometida e que não está atendendo às necessidades nutricionais do feto (HAYWARD et al., 2016; XU et al., 2020). O peso fetal normal nos animais C57BL/6 não infectados pode estar relacionado com a presença de MIF, uma vez que foi demonstrado que animais MIF^{-/-} sem infecção apresentam diminuição do peso fetal, confirmando sua importante participação no estabelecimento e manutenção de uma gestação normal (JOVANOVIĆ KRIVOKUĆA et al., 2021; YAMADA et al., 2003).

Nos animais MIF^{-/-} infectados, os resultados mostraram maiores acúmulos de hemozoína na placenta. Foram previamente descritos níveis aumentados de MIF no sangue intervilo placentário humano durante a infecção por *P. falciparum* (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002). Portanto, indiretamente a expressão de MIF parece ser importante para evitar resultados gestacionais mais adversos associados à infecção durante o final da gestação.

O presente trabalho demonstra a participação de MIF na resposta imune contra a infecção por *Plasmodium*, sendo que esta citocina aparentemente contribui para os efeitos deletérios da infecção no primeiro e segundo terço gestacional e participa do controle da

parasitemia materna quando a infecção ocorre no final da gestação. Além disso, MIF mostrou ser crucial ao contribuir para o sucesso gestacional, para o desenvolvimento fetal normal e para a prevenção da restrição do crescimento uterino durante a gestação.

7. CONCLUSÕES

- A ausência de MIF afeta o sucesso da gestação no primeiro terço gestacional.
- MIF contribui para piores resultados gestacionais e afeta o processo de decidualização durante a infecção por *Plasmodium* no primeiro terço gestacional, promovendo uma resposta imune de perfil pró-inflamatório associado ao aumento de células do fenótipo CD11b⁺ e MCP1⁺ nos sítios de implantação, além de estar relacionado com a redução das células uNK e de VEGF importantes para o sucesso gestacional.
- No terço médio da gestação o MIF pode influenciar negativamente o remodelamento das artérias espiraladas durante a infecção por *Plasmodium* e prejudicar a organização do espaço vascular placentário o que poderia afetar o posterior desenvolvimento fetal. A presença de MIF durante a infecção esteve associada com menores níveis de expressão de VEGF e com o favorecimento de um ambiente pró-inflamatório devido aos níveis mais elevados de iNOS e à diminuição da expressão de ARG1.
- No final da gestação foi o MIF é determinante para o desenvolvimento fetal normal e a prevenção da restrição do crescimento uterino. Além disso, MIF está envolvido no controle da parasitemia durante a infecção por *Plasmodium* no final da gestação e sua presença pode ser importante para evitar resultados gestacionais, mas adversos associados a infecção durante o final da gestação.

REFERÊNCIAS

ADAMSON, S. L. et al. Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. **Developmental Biology**, v. 250, n. 2, p. 358–373, 2002. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0773>

ANDER, S. E.; DIAMOND, M. S.; COYNE, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. **Science Immunology**, v. 4, n. 31, 2019. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114>

ARCURI, F. et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblasts. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1299–1303, 1999.

ARCURI, F. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Human Endometrium: Expression and Localization During the Menstrual Cycle and Early Pregnancy. **Biology of reproduction**, 64(4), 1200–1205, 2001. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.4.1200>

ARCURI, F. et al. Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 175–182, 2006. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00857>

BADRAN, M. et al. Intermittent hypoxia impairs uterine artery function in pregnant mice. **Journal of Physiology**, v. 597, n. 10, p. 2639–2650, 2019. <https://doi.org/10.1113/JP277775>

BAKER, D. A. Malaria gametocytogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 172, n. 2, p. 57–65, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019>

BALTAYEVA, J. et al. Obesogenic diet exposure alters uterine natural killer cell biology and impairs vasculature remodeling in mice. **Biology of Reproduction**, v. 102, n. 1, p. 63–75, 2020. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz163>

BANKHEAD, P. et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 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. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01369>

BARBOZA, R. et al. MyD88 signaling is directly involved in the development of murine placental malaria. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 830–838, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01288-13>

BARBOZA, R. et al. TLR4-Mediated Placental Pathology and Pregnancy Outcome in Experimental Malaria. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08299-x>

BARBOZA, R. et al. Fetal-derived MyD88 signaling contributes to poor pregnancy outcomes during gestational malaria. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–8, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00068>

BARUCH, D. I. et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. **Cell**, v. 82, n. 1, p. 77–87, 1995. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90054-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90054-3)

BATON, L. A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Spreading the seeds of million-murdering death: Metamorphoses of malaria in the mosquito. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 573–580, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.012>

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; BUCALA, R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: Biological and structural features. **Journal of Molecular Medicine**, v. 76, n. 3–4, p. 151–161, 1998. <https://doi.org/10.1007/s001090050204>

BEZEMER, R. E. et al. Altered Levels of Decidual Immune Cell Subsets in Fetal Growth Restriction, Stillbirth, and Placental Pathology. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01898>

BLOOM, B. R.; BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. **Science**, v. 153, n. 3731, 1966. <https://doi.org/10.1126/science.153.3731.80>

BOEUF, P. et al. Plasmodium falciparum Malaria Elicits Inflammatory Responses that Dysregulate Placental Amino Acid Transport. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 1–12, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003153>

BOUILLOT, S. et al. Tracing the Glycogen Cells with Protocadherin 12 During Mouse Placenta Development. **Placenta**, v. 27, n. 8, p. 882–888, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.09.009>

BOZZA, M. T. et al. Macrophage migration inhibitory factor in protozoan infections. **Journal of Parasitology Research**, 413052, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/413052>

BULMER, J. N. et al. Placental malaria. I. Pathological classification. **Histopathology**, v. 22, n. 3, p. 211–218, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1993.tb00110.x>

BURTON, G. J. et al. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. **Placenta**, v. 30, n. 6, p. 473–482, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.02.009>

CALANDRA, T. et al. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 6, p. 1895–1902, 1 jun. 1994. <https://doi.org/10.1084/jem.179.6.1895>

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 10, p. 791–800, 2003. <https://doi.org/10.1038/nri1200>

CALTABIANO, R. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) and Its Homologue d-Dopachrome Tautomerase (DDT) Inversely Correlate with Inflammation in Discoid Lupus Erythematosus. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 1, 1 jan. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26010184>

CARIACO, Y. et al. Ethanolic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases inflammation and ameliorates experimental cerebral malaria in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19840-x>

CAVALCANTI, M. G. et al. MIF Participates in *Toxoplasma gondii*-Induced Pathology Following Oral Infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e25259, 22 set. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025259>

CHAISAVANEYAKORN, S. et al. Immunity to placental malaria. IV. Placental malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1371–1375, 2002.

CHANDRASIRI, U. P. et al. Insight into the pathogenesis of fetal growth restriction in placental malaria: Decreased placental glucose transporter isoform 1 expression. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 10, p. 1663–1667, 2014a. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit803>

CHANDRASIRI, U. P. et al. Low antibody levels to pregnancy-specific malaria antigens and heightened cytokine responses associated with severe malaria in pregnancy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 9, p. 1408–1417, 2014b. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit646>

CHUA, C. L. L. et al. Poor Birth Outcomes in Malaria in Pregnancy: Recent Insights Into Mechanisms and Prevention Approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.621382>

CONROY, A. L. et al. Complement activation and the resulting placental vascular insufficiency drives fetal growth restriction associated with placental malaria. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 2, p. 215–226, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.010>

DAVID, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, n. 1, 1966. <https://doi.org/10.1073/pnas.56.1.72>

DAVISON, B. B. et al. *Plasmodium coatneyi* in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as a model of malaria in pregnancy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 2, 1998. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.189>

DE OLIVEIRA GOMES, A. et al. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with toxoplasma gondii depends on gestational age. **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 6, p. 2792–2801, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.005>

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, 2009. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>

DIOUF, I. et al. IL-12 producing monocytes and IFN- γ and TNF- α producing T-lymphocytes are increased in placentas infected by Plasmodium falciparum. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 74, n. 1–2, p. 152–162, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2006.10.001>

DORITCHAMOU, J., Teo, A., Fried, M., & Duffy, P. E. Malaria in pregnancy: the relevance of animal models for vaccine development. **Lab animal**, 46(10), 388–398, 2017. <https://doi.org/10.1038/labani.1349>

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>

FARIA, M. R. et al. Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 1–9, 2010. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-95>

FAVARO, R.; ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, M. T. Decidualization and Endometrial Extracellular Matrix Remodeling. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**, p. 125–142, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00011-4>

FIEVET, N. et al. Plasmodium falciparum induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 10, p. 1530–1534, 2001. <https://doi.org/10.1086/320201>

FOURNIER, S. B.; D'ERRICO, J. N.; STAPLETON, P. A. Uterine Vascular Control

Preconception and During Pregnancy. In: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2021. p. 1871–1893. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190015>

FRANÇA, T. C. C.; DOS SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271–1278, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500060>

FRIED, M. et al. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 5, p. 2523–30, 1998.

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

FRIED, M.; DUFFY, P. E. Malaria during pregnancy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 6, p. 1–24, 2017. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025551>

GARCIA, L. S. Malaria. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 93–129, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.001>

GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 498–511, out. 2002.

GEORGIADES, P.; FERGYSOON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. **Placenta**, v. 23, n. 1, p. 3–19, 2002. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0738>

GOMES, A. O. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents maternal death, but contributes to poor fetal outcome during congenital toxoplasmosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–18, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00906>

GONG, H. et al. The regulation of ovary and conceptus on the uterine natural killer cells during early pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s12958-017-0290-1>

GRIEB, G. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A promising biomarker. **Drug News & Perspectives**, v. 23, n. 4, p. 257, 2010. <https://doi.org/10.1358/dnp.2010.23.4.1453629>

HANNA, J. et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nature Medicine**, v. 12, n. 9, p. 1065–1074, 2006. <https://doi.org/10.1038/nm1452>

HAYWARD, C. E. et al. Placental adaptation: What can we learn from Birthweight:placental weight ratio? **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1–13, 2016. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00028>

HOO, R.; NAKIMULI, A.; VENTO-TORMO, R. Innate Immune Mechanisms to Protect Against Infection at the Human Decidual-Placental Interface. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, p. 1–15, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02070>

HVIID, L. et al. Of mice and women: Rodent models of placental malaria. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 8, p. 412–419, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.010>

IETTA, F. et al. Macrophage migration inhibitory factor in human pregnancy and labor. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 48, n. 6, p. 404–409, 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.01152.x>

IETTA, F. et al. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the survival of first trimester human placenta under induced stress conditions. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6–15, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29797-6>

JOACHIM, R. A. et al. Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNF- α decidual cells via substance P. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 45, n. 5, p. 303–309, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.8755-8920.2001.450506.x>

JOVANOVIĆ KRIVOKUĆA, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor in human early pregnancy events and association with placental pathologies. **Placenta**, n. October 2020, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.02.007>

KALKUNTE, S. S. et al. Vascular Endothelial Growth Factor C Facilitates Immune Tolerance and Endovascular Activity of Human Uterine NK Cells at the Maternal-Fetal Interface. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 7, p. 4085–4092, 1 abr. 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803769>

KIECKBUSCH, J.; GAYNOR, L. M.; COLUCCI, F. Assessment of maternal vascular remodeling during pregnancy in the mouse uterus. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 106, p. 1–7, 2015. <https://doi.org/10.3791/53534>

KIRBY, D. R. S.; BRADBURY, S. The hemo-chorial mouse placenta. **The Anatomical Record**, v. 152, n. 3, p. 279–281, 1965. <https://doi.org/10.1002/ar.1091520307>

KLEEMANN, R. et al. Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: Potential role in cellular redox processes. **FEBS Letters**, v. 430, n. 3, p. 191–196, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00654-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00654-1)

KRISHNAN, L.; NGUYEN, T.; MCCOMB, S. From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 97, n. 1, p. 62–73, mar. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.015>

KYES, S.; HORROCKS, P.; NEWBOLD, C. Antigenic Variation at the Infected Red Cell Surface in Malaria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 673–707, 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.673>

LAGERBERG, R. E. Malaria in Pregnancy: A Literature Review. **Journal of Midwifery and Women's Health**, v. 53, n. 3, p. 209–215, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2008.02.012>

LAMB, T. J. et al. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p. 1–22, 2006. <https://doi.org/10.1017/S1462399406010581>

LASH, G. E. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 3, p. 572–580, 2006. <https://doi.org/10.1189/jlb.0406250>

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: In a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 102, n. 3, p. 122–134, 1994. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211275>

LENG, L. et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 11, p. 1467-1476, 2003. <https://doi.org/10.1084/jem.20030286>

LI, G. H. et al. Role of uterine natural killer cells in angiogenesis of human decidua of the first-trimester pregnancy. **Science in China, Series C: Life Sciences**, v. 51, n. 2, p. 111-119, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0027-7>

LI, Y. H. et al. Tautomerase Activity-Lacking of the Macrophage Migration Inhibitory Factor Alleviates the Inflammation and Insulin Tolerance in High Fat Diet-Induced Obese Mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00134>

LI, Y.; LI, D.; DU, M. TIM-3: a crucial regulator of NK cells in pregnancy. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, n. 11, p. 948-950, 2017. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.85>

LINDSTRÖM, T. M.; BENNETT, P. R. The role of nuclear factor kappa B in human labour. **Reproduction**, v. 130, n. 5, p. 569-581, 2005. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00197>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LOFTI-MIRI RABBANI, M.; ROGERS, P. A. W. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 85-90, 2001. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220085>

LUCCHI, N. W.; PETERSON, D. S.; MOORE, J. M. Immunologic activation of human syncytiotrophoblast by *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 7, p. 1-8, 2008. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-42>

LYBBERT, J. et al. Abundance of megalin and Dab2 is reduced in syncytiotrophoblast during placental malaria, which may contribute to low birth weight. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24508, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep24508>

MALU, D. T. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Downregulator of Early T Cell-Dependent IFN- γ Responses in *Plasmodium chabaudi adami* (556 KA)-Infected Mice . **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6271-6279, 2011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003355>

MARCON, C. F. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and pregnancy may impact the balance of intestinal cytokines and the development of intestinal pathology caused by *Toxoplasma gondii* infection. **Cytokine: X**, v. 2, n. 3, p. 100034, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cyttox.2020.100034>

MARTINEY, J. A. et al. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: Possible role in the pathogenesis of malarial anemia. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2259-2267, 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2259-2267.2000>

MARTÍNEZ-VAREA, A. et al. Relationship between Maternal Immunological Response during Pregnancy and Onset of Preeclampsia. **Journal of Immunology Research**, p. 1-15, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/210241>

MAZZONE, A.; RICEVUTI, G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: Biological and clinical relevance, **Haematologica**, 1995.

MCDEVITT, M. A. et al. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 5, p. 1185-1196, 2006. <https://doi.org/10.1084/jem.20052398>

MCDONALD, C. R. et al. Systemic inflammation is associated with malaria and preterm birth in women living with HIV on antiretrovirals and co-trimoxazole. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43191-w>

MCDONALD, C. R.; TRAN, V.; KAIN, K. C. Complement activation in placental malaria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-9, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01460>

MERK, M. et al. The D-dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 34, p. 577-585, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102941108>

METZ, C. N.; BUCALA, R. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. **Advances in Immunology**, v. 66, p. 197-223, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60598-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60598-2)

MEYER, N.; ZENCLUSSEN, A. C. Immune Cells in the Uterine Remodeling: Are They the Target of Endocrine Disrupting Chemicals?. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1-15, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00246>

MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673-679, 2002. <https://doi.org/10.1038/415673a>

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>

MILNER, D. A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>

MINKAH, N. K.; SCHAFFER, C.; KAPPE, S. H. I. Humanized mouse models for the study of human malaria parasite biology, pathogenesis, and immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00807>

MOORE, J. M. et al. Immunity to Placental Malaria. I. Elevated Production of Interferon- γ by Placental Blood Mononuclear Cells Is Associated with Protection in an Area with High Transmission of Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 5, p. 1218-1225, 1999. <https://doi.org/10.1086/314737>

MOORMANN, A. M. et al. Malaria and pregnancy: Placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 1987-1993, 1999. <https://doi.org/10.1086/315135>

MOR, G. et al. Inflammation and pregnancy: The role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, n. 1, 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. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 8, p. 469-482, 2017. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.64>

MURATA, H.; TANAKA, S.; OKADA, H. Immune Tolerance of the Human Decidua. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 2, p. 351, 2021. <https://doi.org/10.3390/jcm10020351>

Muthusamy, A., Achur, R. N., Bhavanandan, V. P., Fouda, G. G., Taylor, D. W., & Gowda, D. C. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes adhere both in the intervillous space and on the villous surface of human placenta by binding to the low-sulfated chondroitin sulfate proteoglycan receptor. **The American journal of pathology**, 164(6), 2013–2025, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63761-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63761-3)

NDIP TAKEM, E. Malaria in Pregnancy. Open Journal System. **Mediterranean Journal Of Hematology And Infectious Diseases** Citation: *Mediterr J Hematol Infect Dis*, v. 5, n. 5, p. 2013010, 2013. <https://doi.org/10.4084/mjhid.2013.010>

NEBULONI, M. et al. Malaria placental infection with massive chronic intervillitis in a gravida 4 woman. **Human Pathology**, v. 32, n. 9, p. 1022-1023, 2001. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.27603>

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, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001608>

OKAMGBA, O. C. et al. Variations in the leukocyte and cytokine profiles between placental and maternal circulation in pregnancy-associated malaria. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 9, p. 1-8, jan. 2018. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S137829>

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological Update: Malaria in the context of Covid-19. PAHO/WHO, p. 1-10, 2020.

PANDYA, Y.; PENHA-GONÇALVES, C. Maternal-fetal conflict during infection: Lessons from a mouse model of placental malaria. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01126>

PATHAK, V. A.; GHOSH, K. Erythropoiesis in malaria infections and factors modifying the erythropoietic response. **Anemia**, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9310905>

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

PETERS, W.; ROBINSON, B. L. Malaria. In: [s.l.] **Academic Press**, 1999. <https://doi.org/10.1016/B978-012775390-4/50231-1>

PIJNENBORG, R. et al. Review article: Trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. **Placenta**, v. 2, n. 1, p. 71-91, 1981. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(81\)80042-2](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(81)80042-2)

PIMENTA, P. F. et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 23-47, fev. 2015. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140266>

PRIETO, L. et al. Malaria y embarazo. **Progresos de Obstetricia y Ginecología**, v. 48, n. 1, p.

23-34, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0304-5013\(05\)72351-7](https://doi.org/10.1016/S0304-5013(05)72351-7)

RAI, A.; CROSS, J. C. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. **Developmental Biology**, v. 387, n. 2, p. 131-141, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.015>

RODRIGUES-DUARTE, L. et al. Distinct placental malaria pathology caused by different *Plasmodium berghei* lines that fail to induce cerebral malaria in the C57BL/6 mouse. **Malaria Journal**, v. 11, p. 1-9, 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-231>

RODRIGUES-DUARTE, L. et al. Fetal and maternal innate immunity receptors have opposing effects on the severity of experimental malaria in pregnancy: Beneficial roles for fetus-derived Toll-like receptor 4 and type I interferon receptor 1. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 5, 2018. <https://doi.org/10.1128/IAI.00708-17>

RODRÍGUEZ-SOSA, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1247-1254, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1247-1254.2003>

ROGERSON, S. J. et al. Placental Tumor Necrosis Factor Alpha but Not Gamma Interferon Is Associated with Placental Malaria and Low Birth Weight in Malawian Women. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 267-270, jan. 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.267-270.2003>

ROGERSON, S. J. et al. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 105-117, 2007. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70022-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70022-1)

ROGERSON, S. J. et al. Burden, pathology, and costs of malaria in pregnancy: new developments for an old problem. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. e107-e118, 2018. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30066-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30066-5)

ROLFO, A. et al. Pro-Inflammatory Profile of Preeclamptic Placental Mesenchymal Stromal Cells: New Insights into the Etiopathogenesis of Preeclampsia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59403, 19 mar. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059403>

ROMERO, R. et al. The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 1, p. 021-039, 2007. <https://doi.org/10.1055/s-2006-956773>

ROSENGREN, E. et al. The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. **FEBS Letters**, v. 417, n. 1, p. 85-88, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01261-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01261-1)

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

SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601-610, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.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, jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.04.007>

SCHANTZ-DUNN, J.; NOUR, N. M. Malaria and pregnancy: a global health perspective. **Reviews in obstetrics & gynecology**, v. 2, n. 3, p. 186-92, 2009.

SCHMIEGELOW, C. et al. Plasmodium falciparum Infection Early in Pregnancy has Profound Consequences for Fetal Growth. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 12, p. 1601-1610, 2017. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix530>

SEITZ, J. et al. Molecular principles of intrauterine growth restriction in Plasmodium falciparum infection. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 1-17, 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00098>

SILVER, K. L. et al. Circulating Soluble Endoglin Levels in Pregnant Women in Cameroon and Malawi-Associations with Placental Malaria and Fetal Growth Restriction. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24985, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024985>

SIMMONS, D. G. Postimplantation Development of the Chorioallantoic Placenta. **The Guide**

to **Investigation of Mouse Pregnancy**, p. 143-161, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00012-6>

SINGH, P. P. et al. Intervillous Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Associated with Adverse Birth Outcomes in a Study Population in Central India. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 3-8, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051678>

SMITH, R. C.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; JACOBS-LORENA, M. The Plasmodium bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 644-661, 2014. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130597>

SOCHA, M. W. et al. The role of nf- κ b in uterine spiral arteries remodeling, insight into the cornerstone of preeclampsia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22020704>

SONG, S., XIAO, Z., DEKKER, F.J. et al. Macrophage migration inhibitory factor family proteins are multitasking cytokines in tissue injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Life Sci. 79, 105, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04038-8>

SULLIVAN, A. D.; ITTARAT, I.; MESHNICK, S. R. Patterns of haemozoin accumulation in tissue. **Parasitology**, v. 112, n. 3, p. 285-294, 1996. <https://doi.org/10.1017/S003118200006580X>

SWOPE, M. D.; LOLIS, E. Macrophage migration inhibitory factor: cytokine, hormone, or enzyme?, **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 139, p. 1-32, 1999. <https://doi.org/10.1007/BFb0033647>

TODROS, T. et al. Role of the macrophage migration inhibitory factor in the pathophysiology of pre-eclampsia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1-19, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22041823>

TRAN, T. M. et al. Decoding the complexities of human malaria through systems immunology. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 144-162, 2021. <https://doi.org/10.1111/imr.12817>

TUIKUE NDAM, N. G. et al. High level of var2csa transcription by Plasmodium falciparum isolated from the placenta. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 2, p. 331-335, 2005.

<https://doi.org/10.1086/430933>

VIGANÒ, P. et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface. **Seminars in Immunopathology**, v. 29, n. 2, p. 135-150, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0074-3>

WALTER, P. R.; GARIN, Y.; BLOT, P. Placental Pathologic Changes in Malaria. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 38, n. 8, p. 469-471, 1983. <https://doi.org/10.1097/00006254-198308000-00008>

WANG, W. et al. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-14, 2020.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02025>

WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology*, v. 20, n. 3, p. 180-193, 2005. <https://doi.org/10.1152/physiol.00001.2005>

WECKMAN, A. M. et al. The impact of infection in pregnancy on placental vascular development and adverse birth outcomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-11, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01924>

WOODS, L.; PEREZ-GARCIA, V.; HEMBERGER, M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth-New Insights From Mouse Models. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 1-18, 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00570>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report: 20 years of global progress and challenges. WHO/HTM/GM

XU, J. et al. Downregulation of placental amino acid transporter expression and mTORC1 signaling activity contributes to fetal growth retardation in diabetic rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21051849>

YAMADA, H. et al. Decreased serum levels of macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. **Human Reproduction**, v. 18, n. 3, p. 616-620, 2003. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg147>

YAO, Y.; XU, X. H.; JIN, L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>

YARTEY, J. E. Regional And National Perspectives. Malaria in pregnancy: Access to effective interventions in Africa. **Gynaecology and Obstetrics**, v. 94, n. 3, p. 364-373, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2006.04.026>

YOCKEY, L. J.; IWASAKI, A. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. **Immunity**, v. 49, n. 3, p. 397-412, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.017>

YOSHIMURA, T. et al. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. **FEBS Letters**, v. 244, n. 2, p. 487-493, 1989. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80590-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80590-3).

ANEXO A: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO USO ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Papel do MIF na infecção por malária durante a gestação em camundongos C57BL/6”, protocolo nº 060/19, sob a responsabilidade de **Neide Maria da 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 **06 de Dezembro de 2019**.

(We certify that the project entitled “Papel do MIF na infecção por malária durante a gestação em camundongos C57BL/6.”, protocol 060/19, under the responsibility of **Neide Maria da 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 December 06th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 10/12/2019 Término: 10/12/2023
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Mus musculus</i> - camundongo
Número de animais	640
Peso / Idade	22 g / 8-12 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU
Local onde serão mantidos os animais	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU

Uberlândia, 09 de Dezembro de 2019.


Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU
Coordenador da CEUA
Portaria Nº 1234 DE 01 DE OUTUBRO DE 2019