

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

ENSAIO DE INVASÃO DE ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGOS POR  
MEROZOÍTOS DE *PLASMODIUM CHABAUDI* E IMPORTÂNCIA DA  
FOSFATIDILSERINA

**MILENA DE FARIAS AZEREDO**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MAIO, 2024



ENSAIO DE INVASÃO DE ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGOS POR  
MEROZOÍTOS DE *PLASMODIUM CHABAUDI* E IMPORTÂNCIA DA  
FOSFATIDILSERINA

**MILENA DE FARIAS AZEREDO**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia sob a orientação do Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta.


Orientador: Renato Augusto DaMatta

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MAIO, 2024

# ENSAIO DE INVASÃO DE ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGOS POR MEROZOÍTOS DE *PLASMODIUM CHABAUDI* E IMPORTÂNCIA DA FOSFATIDILSERINA


Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia e Biotecnologia  
sob a orientação do Prof. Dr. Renato Augusto  
DaMatta.

Aprovada em 24 de maio de 2024:

Documento assinado digitalmente  
 **FABIO DA SILVA DE AZEVEDO FORTES**  
Data: 07/08/2024 18:08:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dr. Fábio da Silva Azevedo Fortes

Documento assinado digitalmente  
 **JOAO LUIZ MENDES WANDERLEY**  
Data: 25/07/2024 15:01:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dr. João Luiz Mendes Wanderley

Documento assinado digitalmente  
 **SERGIO HENRIQUE SEABRA**  
Data: 14/08/2024 16:17:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra

Documento assinado digitalmente  
 **RENATO AUGUSTO DA MATTA**  
Data: 15/08/2024 10:47:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta  
(Orientador)

“A ciência progride quando as observações nos forçam a mudar as nossas ideias preconcebidas.” — Vera Rubin

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, o qual me sustentou até aqui, e me deu forças para continuar. Agradeço a minha família, em especial ao meu pai Moisés, minha mãe Cláudia e meus irmãos Davi e Gabriela, pessoas que mais amo na vida. A admiração deles é o meu combustível.

Agradeço ao professor Sérgio Seabra por me ajudar em todo processo, seja com cálculos, discussões, construção de dados, embasamento teórico com seus trabalhos publicados na área, e por disponibilizar insumos para a pesquisa. Ao professor Milton Kanashiro, por permitir o uso do equipamento citômetro de fluxo prontamente, a técnica Juliana Alves por sempre ser uma querida e nos ajudar a manuseá-lo e levantar pontos importantes para as análises, e em especial ao professor João Luis Mendes Wanderley por disponibilizar os anticorpos anti-PS na porção Inteira, Isotipo, e Fab, em diferentes concentrações, e ter disponibilizado seu tempo para fazer a leitura de alguns dos nossos experimentos em seu laboratório na UFRJ.

Agradeço ao meu orientador Renato DaMatta, que me aceitou como aluna desde a iniciação científica, e mesmo com muitos empecilhos se manteve disposto a me orientar. Aprendi muito com você!

Agradeço ao meu coorientador Pedro Rodrigues, o qual me instruiu e ajudou em toda jornada, meu mentor como pesquisadora. Sem ele eu não conseguiria concluir este trabalho. Minha admiração e gratidão, Pedro!

Agradeço aos amigos do LBCT, a coordenação e professores do PGBB e a UENF por todo ensinamento.

Agradeço as agências de fomento Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código 001, que contribuíram financeiramente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A malária causa a morte de mais de 400 mil pessoas por ano. Todavia, existem enormes dificuldades em se estudar a malária humana e devido a isso, diversos modelos experimentais são utilizados, sendo um deles, a infecção de camundongos por *Plasmodium chabaudi*. A invasão eritrocitária pelo parasito envolve vários ligantes/receptores, mas esse conhecimento é ainda incipiente, apesar de essencial no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. A exposição de um fosfolípido de membrana (fosfatidilserina - PS) por protozoários parece ser essencial para o sucesso da infecção. Estima-se que essa exposição pode estar envolvida na ligação inicial entre merozoítos, forma infectiva de *Plasmodium* spp. e eritrócitos. Para esse estudo, eritrócitos foram retirados do sangue da cauda de camundongos Balb/c saudáveis, e ressuspensos em RPMI com 0.2% de glicose (RPMI-Glu). *P. chabaudi* foi mantido em camundongos da mesma linhagem, em um regime de 12h de luz e 12 h de escuridão, e merozoítos obtidos por punção cardíaca três horas antes da exposição a luz. Depois de etapas de filtração, merozoítos foram ressuspensos em RPMI-Glu, e interações foram realizadas em diferentes tempos. Em seguida, lâminas foram preparadas pelo método de citospin, coradas com panótico rápido e visualizadas por microscopia de campo claro. Em torno de 1 a 2% da população de eritrócitos foram infectados por merozoítos *in vitro* com valores significativos nos primeiros 10 minutos. Todavia, ensaio de infecção analisado por citometria de fluxo mostrou uma infecção de 15 a 20% com 10 minutos de interação. PS de merozoítos foi bloqueada com anticorpo anti-PS (porção inteira e porção Fab) nas concentrações de 10 e 5µg/mL. A entrada em eritrócitos dos merozoítos com PS bloqueada foi 50% menor que sem bloqueio de PS. Esse achado indica que a PS é uma molécula importante para o sucesso da infecção do parasito e fornecem insights valiosos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra a malária, destacando a PS como um potencial alvo terapêutico promissor.

## ABSTRACT

Malaria causes the death of over 400,000 people annually. However, there are significant challenges in studying human malaria, leading to the use of various experimental models, including infecting mice with *Plasmodium chabaudi*. The parasite's invasion of red blood cells involves multiple ligands/receptors, yet our understanding remains limited, despite its critical role in therapeutic development. The exposure of a membrane phospholipid (phosphatidylserine - PS) by protozoa appears crucial for successful infection, potentially facilitating the initial binding between merozoites, the infective form of *Plasmodium* spp., and erythrocytes. For this study, erythrocytes were obtained from the tail blood of healthy Balb/c mice, suspended in RPMI with 0.2% glucose (RPMI-Glu). *P. chabaudi* was maintained in mice of the same lineage, under a 12-hour light-dark cycle, with merozoites obtained via cardiac puncture three hours before exposure to light. After filtration steps, merozoites were suspended in RPMI-Glu, and interactions were observed at different time points. Slides were prepared using the cytopsin method, stained with rapid panoptic stain, and visualized via bright-field microscopy. Approximately 1-1.5% of the erythrocyte population were infected by merozoites in vitro, with significant values within the first 10 minutes. However, flow cytometry infection assay showed 15 to 20% infection within 10 minutes of interaction. Merozoite PS was blocked with anti-PS antibody (whole and Fab portions) at concentrations of 10 and 5 $\mu$ g/mL. The entry of merozoites into erythrocytes with blocked PS was 50% lower than without PS blockade. This finding suggests that PS is a crucial molecule for parasite infection success and provides valuable insights for developing new therapeutic approaches against malaria, highlighting PS as a promising therapeutic target.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global de casos de malária a partir dos anos 2000 .....	1
Figura 2: Casos confirmados de malária nas américas .....	2
Figura 3: Casos e mortes confirmadas por malária no período de 2010 a 2022 na região das américas.....	2
Figura 4: Classificação da incidência parasitária anual da malária .....	3
Figura 5: Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> spp.....	6
Figura 6: Estrutura subcelular de um merozoíto de <i>Plasmodium</i> spp. ....	7
Figura 7: Invasão de merozoítos em eritrócitos .....	9
Figura 8: Esquema representando estrutura de uma membrana plasmática e suas principais moléculas constituintes. ....	12
Figura 9: Representação da assimetria de membrana de eritrócitos .....	13
Figura 10: Mimetismo apoptótico clássico e não clássico .....	15
Figura 11: Imagens por microscopia de campo claro em um aumento de 100x, da interação de merozoítos de <i>Plasmodium chabaudi</i> com eritrócitos de camundongos.....	20
Figura 12: Porcentagem de eritrócitos infectados por merozoítos de <i>P. chabaudi</i> .....	21
Figura 13: Porcentagem de eritrócitos infectados por merozoítos de <i>P. chabaudi</i> .....	21
Figura 14: Análises por citometria de fluxo das interações de merozoítos de <i>P. chabaudi</i> em diferentes intervalos de tempo. ....	22
Figura 15: Porcentagem de eritrócitos infectados por merozoítos de <i>P. chabaudi</i> .....	23
Figura 16: Análises da exposição de fosfatidilserina de merozoítos de <i>P. chabaudi</i> por citometria de fluxo. ....	24
Figura 17: Análises da interação entre merozoítos de <i>P. chabaudi</i> e eritrócitos de camundongos através de citometria de fluxo. ....	25
Figura 18: Análise da porcentagem de eritrócitos infectados por <i>P. chabaudi</i> .....	26

## LISTA DE ABREVIACES

-  cido desoxirribonucleico – (**DNA**)
- Brometo de etídio - (**EtBr**)
- Citocalasina D – (**CytD**)
- Etilenoglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil  ter) -N, N, N', N'-tetraacético - (**EGTA**)
- Fosfatidilinositol - (**PI**)
- Fosfatidilserina - (**PS**)
- Iodeto de propídio - (**PI**)
- Eritrócitos (**RBC**)
- Eritrócitos Infectados (**iRBC**)
- Proteínas constituintes da superfície dos merozoítos - (**MSPs**)
- Proteínas homólogas de liga o a reticulócitos - (**PfRh**)
- RPMI suplementado com 0.2% de glicose - (**RPMI-Glu**)
- Solu o salina tamponada com fosfato - (**PBS**)
- Soro Fetal Bovino - (**SFB**)

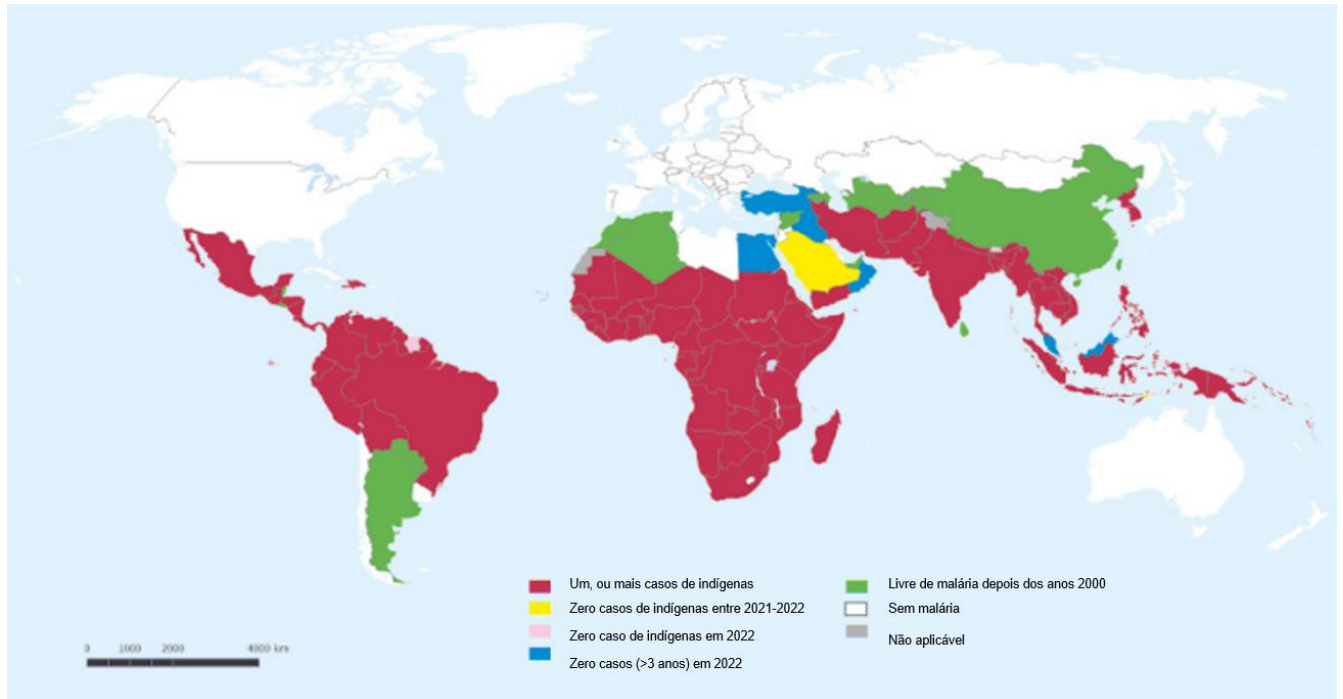
## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Malária .....	1
1.2 Agente etiológico e transmissão .....	3
1.3 Sintomas .....	4
1.4 Ciclo de vida .....	5
1.5 Invasão Merozoíto/Eritrócito .....	7
1.6 Citocalasina D .....	11
1.7 Fosfatidilserina e Mimetismo Apoptótico .....	11
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 Geral .....	16
2.2 Específicos .....	16
3. METODOLOGIA .....	16
3.1. Obtenção de merozoítos de <i>Plasmodium chabaudi</i> .....	16
3.2. Obtenção de eritrócitos .....	17
3.3. Procedimentos éticos .....	17
3.4. Análise da exposição de PS de merozoítos de <i>P. chabaudi</i> por citometria de fluxo .....	17
3.5. Interação de eritrócitos com parasitos .....	18
3.6. Quantificação da infecção .....	18
3.6.1. Por microscopia ótica .....	18
3.6.2. Por citometria de fluxo .....	19
3.7. Análise estatística .....	19
4 RESULTADOS .....	20
5 DISCUSSÃO .....	27
6 CONCLUSÃO .....	29
7 REFERÊNCIAS .....	31

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Malária

A malária é uma doença endêmica, potencialmente fatal que acomete principalmente áreas subtropicais e tropicais, causando a morte de em torno de 500 mil pessoas por ano (Brasil *et al*, 2017). Os países mais acometidos são aqueles cujo passam por crise humanitária, principalmente os da região africana (WHO, 2023).



**Figura 1: Distribuição global de casos de malária a partir dos anos 2000.** Mapa retrata mais específico no período de 2021 a 2022. Fonte: Adaptado, WHO, 2023.

Em 2022 foram registrados 249 milhões de casos de malária em todo o mundo, um aumento de 5 milhões em relação a 2021. Desses casos, 3,2 milhões ocorreram em países africanos: Uganda (0,6 milhões), Nigéria (1,3 milhões) e Etiópia (1,3 milhões). Os demais foram registrados na Papua-Nova Guiné (0,4 milhões) e no Paquistão (2,1 milhões). A incidência da doença e as taxas de mortalidade aumentaram globalmente devido as negligências nos serviços de combate à malária durante a pandemia causada pela doença COVID-19. Em 2019, antes do ocorrido, o número global de casos foi de 233 milhões, 16 milhões a menos do que em 2022 (WHO, 2023).

A região africana continua sendo a maior em casos de malária, sendo responsável por 94% da totalidade mundial (233 milhões) e 95% de todas as mortes (580 mil óbitos). Aproximadamente 78% das mortes por malária nessa região ocorreram em crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2023).

Nas Américas foram registrados 481.788 casos de malária (Figura 2) e aproximadamente 92 mortes em 2022 (Figura 3), (OPAS, 2022).

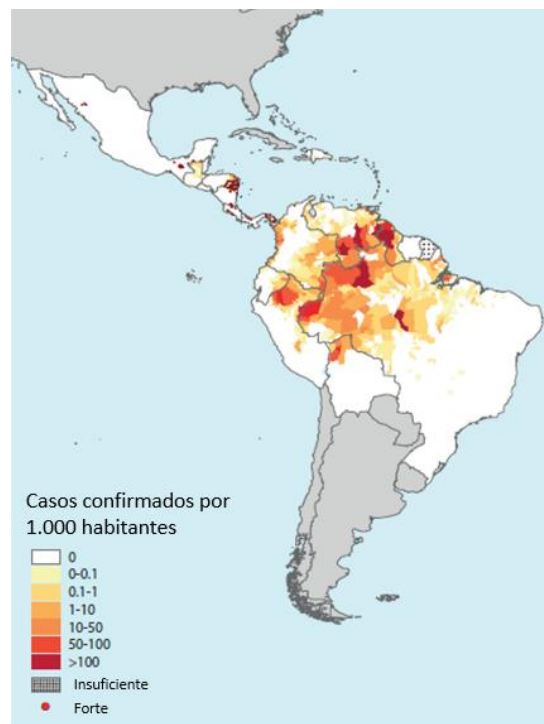


Figura 2: Casos confirmados de malária nas américas. Fonte: Adaptado, WHO, 2023.

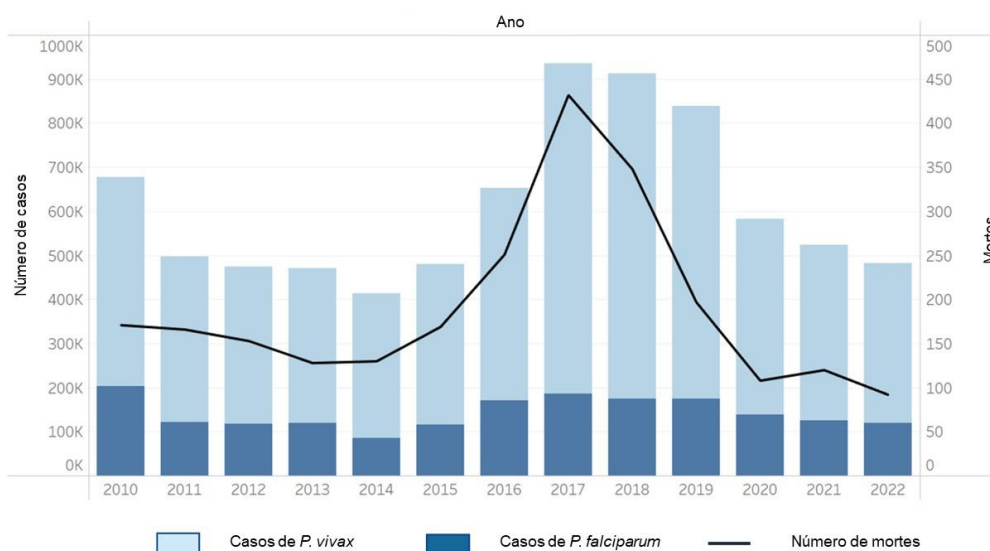
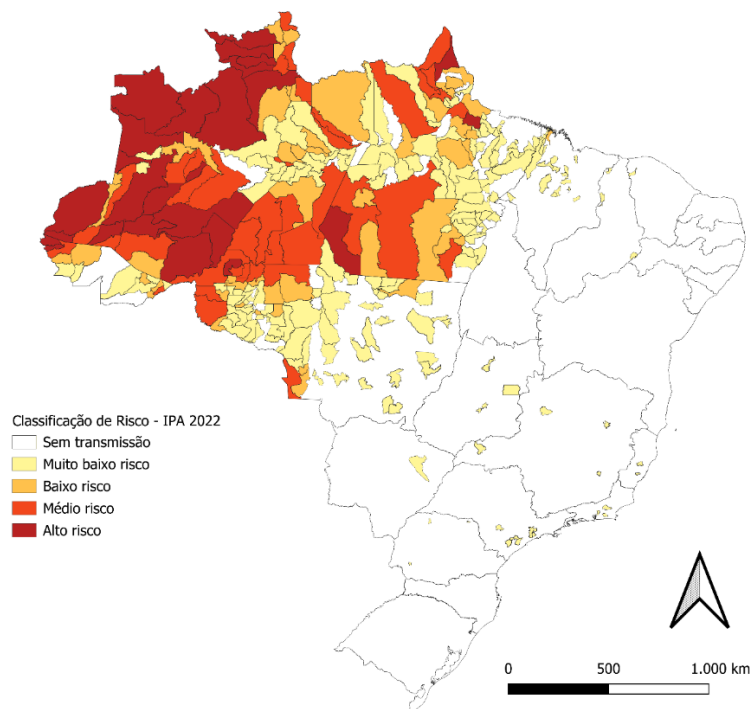


Figura 3: Casos e mortes confirmadas por malária no período de 2010 a 2022 na região das américas. Fonte: Adaptado, WHO, 2023.

No Brasil, a região amazônica é considerada endêmica para a malária, respondendo por 99% dos casos autóctones (Figura 4). Esta região inclui os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. Nas áreas fora da região amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados dos estados endêmicos e de outros países do continente africano. No entanto, há transmissão residual de malária em estados da região extra-amazônica, principalmente em áreas de Mata Atlântica, como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Brasil, 2024).



**Figura 4: Classificação da incidência parasitária anual da malária.** Esquema enfatiza o ano de 2022. Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVSA/MS e E-SUS-VS, 2023.

## 1.2 Agente etiológico e transmissão

Causada por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Plasmodium* spp. Atualmente seis espécies são capazes de infectar humanos, sendo elas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. simium* (WHO, 2023). Sua transmissão é apenas por mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo mais intensa em regiões onde eles sobrevivem por períodos mais longos, permitindo que o parasito complete seu ciclo de desenvolvimento. Devido seu longo ciclo de vida, e forte preferência das espécies de vetores africanos por humanos, são as principais razões pelas quais quase 90% dos casos de malária no mundo ocorrem na África

(OPAS, 2022). É influenciada pelas condições climáticas que podem afetar o número e a sobrevivência dos mosquitos, como padrões de precipitação, temperatura e umidade. Em muitas regiões é sazonal, atingindo seu pico durante e após a estação chuvosa (OPAS, 2022).

Epidemias de malária podem ocorrer quando o clima e outras condições subitamente favorecem a transmissão em áreas onde as pessoas têm pouca ou nenhuma imunidade à doença. Surtos também podem ocorrer quando pessoas com baixa imunidade se deslocam para áreas com alta transmissão, como trabalhadores migrantes, refugiados, ou até mesmo a passeio (OPAS, 2022). A imunidade humana é outro fator importante, especialmente entre adultos em áreas de transmissão moderada ou intensa. A imunidade parcial se desenvolve após anos de exposição e, embora nunca proporcione proteção completa, reduz o risco da infecção por malária evoluir para formas graves. Por isso, a maioria das mortes por malária na África ocorre entre crianças pequenas, enquanto em áreas de menor transmissão e baixa imunidade (OPAS, 2022).

### **1.3 Sintomas**

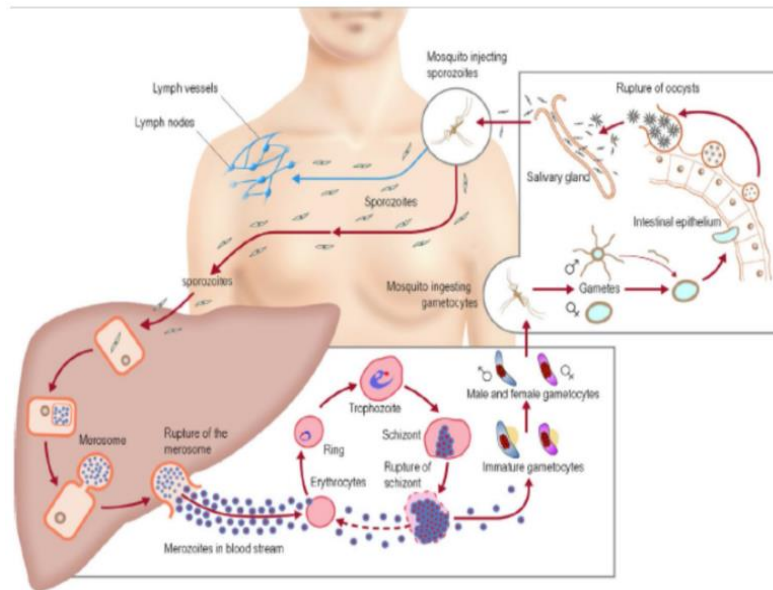
A malária manifesta um quadro febril agudo. Em indivíduos não imunes, os sintomas geralmente aparecem entre 10 e 15 dias após a picada de um mosquito infectado. A febre pode ter diferentes aspectos, dependendo da espécie. O *P. malariae*, responsável pela febre quartã que se manifesta em ciclos de 72 horas; o *P. vivax* provoca a terçã benigna, com ataques febris de 48 horas, e o *P. falciparum*, causador da febre terçã maligna, com ataques febris de 36 a 48 horas (Gomes *et al*, 2011). Esses ataques febris estão relacionados ao rompimento dos eritrócitos (figura 5). Os sintomas típicos incluem, calafrios, dor de cabeça, vômito, diarreia e tosse (Stephens *et al*, 2012). As características clínicas da malária grave são causadas por *P. falciparum*, e variam com idade e estado de gravidade. Se não for tratada nas primeiras 24 horas, frequentemente resultam em morte (OPAS, 2024). Sinais da malária grave em crianças em áreas endêmicas incluem prostração, redução da consciência, dificuldade respiratória, anemia grave, hipoglicemia, choque e icterícia. Síndrome do desconforto respiratório agudo (geralmente iniciando após tratamento), e icterícia são mais comuns em adultos do que em crianças, enquanto anemia grave e convulsões são geralmente menos comuns (OPAS, 2024). Grávidas são particularmente suscetíveis à hipoglicemia, anemia grave e icterícia. Desconforto

respiratório está associado a anemia grave e alterações metabólicas como acidose. Anormal e prolongada convulsões repetidas, geralmente acompanham o coma e pode causar sequelas neurológicas a longo prazo (Stephens *et al*, 2012).

#### 1.4 Ciclo de vida

O ciclo de vida da malária (figura 5) inicia-se quando um mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, contendo esporozoítos em sua glândula salivar, realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro saudável. Nesse processo o mosquito inocula os esporozoítos na corrente sanguínea que invadem os hepatócitos (células do fígado). Em seguida, os esporozoítos amadurecem para esquizontes, que por sua vez sofrem reprodução assexuada, diferenciando-se em merozoítos dentro dos hepatócitos, os quais estão contidos em vesículas denominadas merosomas. Essas vesículas permanecem intactas ao deixar a célula, protegendo o parasito da fagocitose pelas células de Kupffer (macrófago especializado do fígado). Os esquizontes se rompem liberando os merozoítos dos merosomas na corrente sanguínea e há o início do ciclo sanguíneo (ou ciclo eritrocítico) da doença com a infecção de eritrócitos (Mota *et al*, 2000). Dentro dos eritrócitos, os merozoítos se desenvolvem em trofozoítos em estágio anel e posteriormente para esquizontes, que darão origem a merozoítos, e serão liberados na corrente sanguínea onde estão aptos a invadir outros eritrócitos. De outro modo, os trofozoítos também podem se diferenciar em gametócitos femininos e masculinos, e uma vez sendo ingerido por um mosquito anofelino saudável, dá-se início a fase sexuada do ciclo (Florens *et al*, 2002). No estômago do mosquito, os microgametas penetram nos macrogametas, produzindo zigotos, que posteriormente se tornarão móveis e alongados, evoluindo para oocinetos. A parede do intestino médio do mosquito é penetrada pelo oocineto, e lá o parasito se desenvolve em oocisto. Finalizando o ciclo esporogônico, esses oocistos amadurecem, rompem-se e liberam esporozoítos. Em seguida, se deslocam para as glândulas salivares do mosquito. Quando há inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano o ciclo de vida de *Plasmodium* spp. é continuado. Durante o processo de infecção, os merozoítos usam múltiplas interações receptor-ligante em uma série de eventos coordenados, mas o conhecimento atual destas interações e mecanismos de invasão é limitado, impedindo desenvolver abordagens para seu bloqueio, sendo importante para fins terapêuticos (Boyle *et al*, 2010).





**Figura 5: Ciclo de vida de *Plasmodium* spp.** A fêmea do mosquito *Anopheles* infectada por *Plasmodium* spp. inocula os esporozoítos no hospedeiro humano, que por sua vez infectam as células do fígado. Esses esporozoítos se diferenciam em esquizontes, os quais se rompem e liberam merozoítos na corrente sanguínea. Os merozoítos invadem eritrócitos, se diferenciam em trofozoítos, passando pelo estágio anel e esquizogônico. O esquizonte se rompe liberando novos merozoítos na corrente sanguínea. Trofozoítos se diferenciam em gametócitos femininos e masculinos. Um mosquito saudável se alimenta do sangue infectado, proporcionando fecundação dos gametas em seu organismo. O parasito se diferencia em oocineto, e no intestino, os oocinetos se desenvolvem em oocistos. Os oocistos amadurecem, se rompem e liberam esporozoítos, os quais se deslocam para as glândulas salivares do mosquito. Fonte: Varo *et al*, 2020.

Diversos modelos experimentais vêm sendo utilizados para estudo da doença pela dificuldade de manipulação das cepas causadoras da malária em humanos; e devido à existência de uma significativa conservação de fatores genéticos e características fenotípicas entre os parasitos da malária em humanos e os seus homólogos de camundongos, os tornam adequados como modelos da malária humana (Stephens *et al*, 2012). Há algumas espécies de *Plasmodium* capazes de infectar camundongos, sendo elas: *P. berghei*, *P. vinckei*, *P. yoelii*, e dentre elas pode-se destacar *P. chabaudi*, pois apresenta grande similaridade e características de seu ciclo com *P. falciparum*, espécie causadora da malária grave em humanos. Além de um vasto conhecimento de “linhagens” clonadas, e sua facilidade de manipulação, diminuindo risco biológico (Stephens *et al*, 2012; Walliker *et al*, 1971).

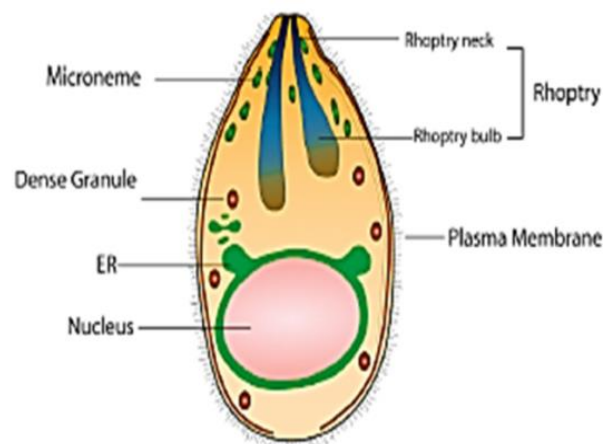
Além do mais, *P. falciparum* não é sincronizado, apresentando diversas formas do ciclo ao mesmo tempo no sangue do hospedeiro. Logo, se faz necessário o uso de diversos fármacos para sincronizar o parasito antes de se realizar a

purificação de merozoítos (Lambros & Vanderberg, 1979). No entanto, *P. chabaudi* é altamente sincronizado pela melatonina do hospedeiro, possibilitando a obtenção de formas específicas do parasito, de acordo com a hora que o sangue é coletado (Wendt *et al*, 2016).

Ao contrário da malária em humanos, onde a esquizogonia resulta em febre, camundongos infectados com *Plasmodium chabaudi* desenvolvem hipotermia (Stephens *et al*, 2012). A anemia em indivíduos com malária ocorre devido a uma combinação de destruição dos eritrócitos infectados, supressão da eritropoiese, depuração de eritrócitos não infectados por fagocitose e desenvolvimento anormal de eritrócitos (Lamikanra *et al*, 2007). Esses mesmos processos têm sido observados em camundongos infectados com *P. chabaudi* (Mohan & Stevenson, 1998; Belyaev *et al*, 2010), tornando-o um modelo eficaz para estudar a malária humana.

### 1.5 Invasão Merozoíto/Eritrócito

Os merozoítos (figura 6) são a forma infectiva de *Plasmodium* spp. em seu ciclo, conseqüentemente, seu objetivo é infectar o maior número de eritrócitos possível. Seu tamanho é pequeno, possuindo cerca de 1 a 2  $\mu\text{m}$  (Cowman *et al*, 2017), sendo uma célula polarizada, com extremidade apical, a qual contém as organelas secretoras micronemas e róptrias, envolvidas no processo de invasão após contato com os eritrócitos. A invasão de merozoítos é dividida em dois processos básicos, conhecidos como mecânico e molecular, os quais ocorrem de forma simultânea.

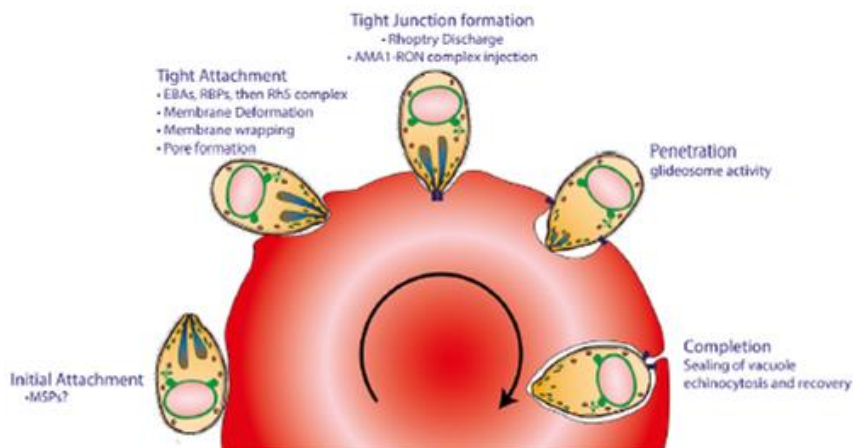


**Figura 6: Estrutura subcelular de um merozoíto de *Plasmodium* spp.** Note micronema e róptrias na extremidade apical, e outros compartimentos como núcleo, retículo endoplasmático, membrana plasmática e grânulo denso. Fonte: Cowman *et al*, 2017.

Na estrutura dos merozoítos (figura 6), encontram-se os micronemas que contêm adesinas, complexos proteicos que reconhecem e se ligam a receptores de mesma natureza, e estão envolvidos na ligação dos eritrócitos, enquanto as rôptrias, por sua vez, são liberadas após o envolvimento inicial da célula hospedeira para facilitar o processo de invasão e formam o vacúolo parasitóforo, onde os merozoítos se replicam formando células filhas (Cowman *et al*, 2017). Além disso, a organela grânulos densos tem subpopulações distintas, havendo um subconjunto chamado de exonemas, que liberam a protease subtilisina 1 (SUB1) no vacúolo parasitóforo, onde processa proteoliticamente várias proteínas para facilitar a saída dos merozoítos (Yeoh *et al*, 2007).

Durante, ou logo após a invasão, os grânulos densos são liberados por fusão com a membrana plasmática do parasito em diferentes fases do ciclo assexuado. A compartimentalização e subconjuntos dessas organelas são provavelmente críticas para permitir a liberação temporal de ligantes específicos para cada etapa de invasão. Enquanto as organelas apicais desempenham um papel essencial na invasão, é a superfície dos merozoítos que primeiro entra em contato com o eritrócito, ativando uma série de etapas mecânicas que terminam em entrada ativa na célula hospedeira. Essas etapas são rápidas e foram visualizadas pela primeira vez usando microscopia eletrônica, observando merozoítos de *P. knowlesi* (Dvorak *et al*, 1975) e posteriormente definido para *P. falciparum* (Gilson & Crabb, 2009) para mostrar que a sequência e cinética deste processo são conservadas ao longo do ciclo de *Plasmodium* spp.

Desta forma, a invasão foi dividida em algumas fases (figura 7), sendo elas a interação inicial e deformação da membrana eritrocitária; a interação apical e invasão celular, a equinocitose (encolhimento rápido do eritrócito com projeções uniformemente espaçadas), finalizando com a recuperação da membrana do hospedeiro (Cowman *et al*, 2017).



**Figura 7: Invasão de merozoítos em eritrócitos.** A invasão de merozoítos envolve uma ligação inicial, que pode envolver MSPs ou diretamente com proteínas PfRh. Reorientação apical promove o envolvimento da membrana de modo que a extremidade apical fique adjacente ao eritrócito, permitindo uma fixação firme, e há formação de um poro entre o merozoíto e o eritrócito. Uma junção apertada é formada envolvendo interações ligante-receptor de alta afinidade entre AMA1 na superfície do merozoíto, a qual se move do polo apical. A camada superficial é desprendida na junção móvel por uma serina protease, que ao atingir o polo posterior, as proteínas adesivas na junção também são removidas proteoliticamente por uma protease residente, rombóide, em um processo que facilita a resselagem da membrana. No processo, o parasito não penetra na membrana, mas invade de uma maneira que cria um vacúolo parasitóforo. Fonte: Cowman *et al*, 2017.

O processo infectivo pode ocorrer independentemente da orientação do merozoíto e mais comumente começa como uma associação 'side on'. Essa baixa afinidade inicial e interação reversível provocam ondas de deformação da membrana eritrocitária (Weiss *et al*, 2015). Diante disso, diversas proteínas constituintes da superfície dos merozoítos (MSPs) podem desempenhar um papel envolvendo a interação inicial do merozoíto com o eritrócito (figura 7), o que forma um grande complexo na superfície do merozoíto com uma série de proteínas periféricas. Todavia, estudos recentes mostraram que merozoítos sem a expressão de MSPs ainda podem invadir eritrócitos, sugerindo que essas proteínas podem não ser extremamente essencial para esse processo (Das *et al*, 2015). Enquanto as proteínas de superfície e periféricas podem não estar envolvidas diretamente no processo de invasão, algumas desempenham um papel na proteção do merozoíto contra o ataque do sistema imunológico do hospedeiro, e também são alvos de imunidade adquirida naturalmente. Rapidamente em seguida, há uma reorientação do merozoíto de tal forma que o complexo apical fica em contato direto com a membrana do hospedeiro. Posteriormente, interações diretas de alta afinidade estabelecidas entre proteínas da superfície da membrana eritrocitária como

receptores, adesinas dos merozoítos como o ligante a eritrócitos, e proteínas homólogas de ligação a reticulócitos (PfRh), facilitam à invasão ativa do parasito que prossegue através de uma depressão na superfície eritrocitária. Adiante há formação de uma junção ocludente, definida por proteínas dos merozoítos providas do complexo AMA1-RON, inserido na membrana eritrocitária. A força de penetração fornecida pelo complexo actina/miosina do parasito o conduz através da membrana do hospedeiro para um compartimento do vacúolo parasitóforo, que acredita ser criado por secreção das róprias na célula hospedeira. A membrana do eritrócito é selada novamente, completando o processo. Toda esta sequência de eventos é completada em aproximadamente 30 segundos (Satchwell, 2016; Cowman *et al*, 2017). *Plasmodium* spp. bem como outros parasitos, desencadeiam adaptações para lidar com o sistema imune do hospedeiro, mantendo sua infecção, reproduzindo-se, e desenvolvendo o estágio clínico da doença. Uma dessas estratégias consiste na quebra da proteína hemoglobina que resulta em aminoácidos livres e a porção heme, que contem núcleo ferroso. Os aminoácidos livres são utilizados para o metabolismo do parasito. O grupo heme induz a produção de radicais livres que são tóxicos para o parasito. No entanto, a heme é transformada pelo parasito em uma forma estável e cristalina, conhecido como hemozoína que não gera radicais livres, permitindo a sobrevivência do parasito (Wendt *et al*, 2016).

Diante disso, alguns trabalhos descrevem a obtenção de merozoítos por meio de separação com coluna magnética (Blackman, 1994; Boyle *et al*, 2012). No entanto, este método apresenta alto custo, o que torna inviável a sua realização de maneira rotineira na maioria dos laboratórios brasileiros. Outro método comumente utilizado é a obtenção de merozoítos por centrifugações diferenciadas e passagem por gradiente de Percoll. Todavia, já foi reportado que merozoítos obtidos por centrifugação diferencial normalmente perdem sua viabilidade (Blackman, 1994; Boyle *et al*, 2012). Portanto, os métodos atuais para a obtenção de merozoítos livres são de difícil realização, merecendo novos avanços.

Sendo assim, nosso grupo desenvolveu um protocolo eficiente, adaptado de Chimanuka *et al* (1997), para obtenção de merozoítos egressos naturalmente de eritrócitos e um ensaio de invasão em eritrócitos (Rodrigues, 2020), que deve ser aprimorado.

Em experimentos do grupo usando esse protocolo, obtivemos merozoítos combinados com diversas células do sangue de camundongo, como eritrócitos e

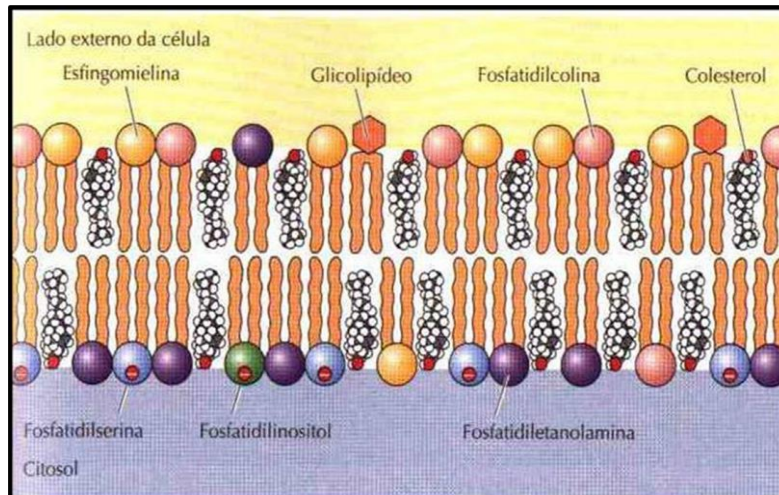
leucócitos, por isso, adicionamos um processo de filtração com membrana de 3  $\mu\text{m}$  (Rodrigues *et al*, 2024). Posteriormente, “beads” de tamanhos conhecidos foram utilizados para calibrar o citômetro de fluxo e permitir a contagem e análise dos merozoítos por esse equipamento; a viabilidade dos parasitos também foi verificada utilizando iodeto de propídio (PI). Observamos que a filtração foi capaz de enriquecer os merozoítos no sobrenadante. Ademais, a citometria de fluxo mostrou alta viabilidade após incubação com PI e aumento do número de eventos correspondentes a merozoítos após a filtração (Rodrigues, 2020).

## **1.6 Citocalasina D**

Sabe-se que o processo final de invasão do merozoíto em eritrócitos é mediado pela força de penetração através de filamentos de actina e miosina, garantindo o sucesso da infecção (Cowen *et al*, 2017). Uma estratégia eficiente para impedir a entrada do parasito na célula é a interrupção desse processo envolvendo filamentos de actina. A Citocalasina D, a qual faz parte de um grupo de metabólitos fúngicos que permeiam as membranas das células, é capaz de se ligar a filamentos de actina, e com isso inibir sua polimerização e despolarização (Cooper, 2004). Diante disso, usamos a Citocalasina D como controle para possivelmente inibir a invasão de merozoítos em eritrócitos nos nossos ensaios.

## **1.7 Fosfatidilserina e Mimetismo Apoptótico**

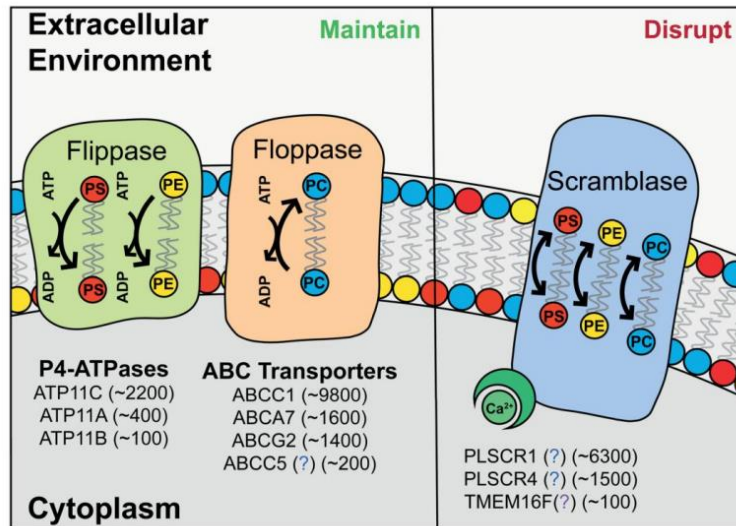
As células eucarióticas em estado saudável mantêm uma distribuição diferencial de lipídios entre os folhetos da membrana plasmática (figura 8), criando o que é conhecido como assimetria de membrana. Em condições normais, os lipídios fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina predominam na camada externa da membrana, com suas cadeias hidrofílicas orientadas para fora, em direção ao ambiente extracelular. Por outro lado, os aminofosfolipídios fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina, juntamente com o fosfatidilinositol (PI) e suas formas fosforiladas, são preferencialmente localizados na camada interna, com suas cadeias hidrofóbicas voltadas para o citoplasma (figura 7) (Fraser *et al*, 2021), todavia durante a morte celular por apoptose a PS é translocada para o exterior da membrana plasmática (Martin *et al*, 1995). Este processo é mediado pela sinalização de TGF- $\beta$  e indução à resposta anti-inflamatória durante a fagocitose de células apoptóticas (FREY & GAJPL, 2011).



**Figura 8: Esquema representando estrutura de uma membrana plasmática e suas principais moléculas constituintes.** Observa-se que a PS está normalmente voltada para o interior da membrana. Fonte: <https://biologados2010.blogspot.com/2010/05/bicamada-lipidica.html>

Essa assimetria confere propriedades biofísicas e bioquímicas distintas a cada folheto. PS e PI carregam uma carga negativa e desempenham funções importantes na interação com proteínas de membrana e as citoplasmáticas, como a proteína C quinase e componentes do citoesqueleto, influenciando assim a atividade enzimática, a sinalização celular e a estabilidade da membrana (Lemon, 2008; Yeung *et al*, 2008).

A assimetria da membrana é regulada por três principais classes de proteínas constituintes da membrana, sendo elas flippases, flopases e scramblases (figura 9). As flippases são responsáveis pela translocação de lipídios da camada externa para a camada interna, enquanto as flopases funcionam na direção oposta. Para neutralizar as ações das flippases e flopases, as scramblases são responsáveis pela ruptura dessa assimetria. Ao contrário das flippases e flopases, a atividade das scramblases é reprimida nas células saudáveis. Conseqüentemente, as scramblases só são ativadas em células velhas ou danificadas, quando a concentração intracelular de  $Ca_2^+$  aumenta. Scramblases também podem ser ativadas por fatores ativadores de plaquetas ou por clivagem mediada por caspases durante a apoptose, independente da hidrólise do ATP, e resulta rapidamente na quebra da assimetria, levando à exposição de PS na superfície celular (Fraser *et al*, 2021).



**Figura 9: Representação da assimetria de membrana de eritrócitos.** É regulada pelas enzimas flipase, flopases e scramblase. Flipases e flopases hidrolisam ATP para mover PS para a camada interna (flipase) e PC para a camada externa (flopase). Scramblase move lipídios indiscriminadamente quando ativado por Ca<sup>2+</sup> citoplasmático. O texto indica a identidade molecular das proteínas nos eritrócitos, com o número de cada proteína por célula com base em dados proteômicos. Ponto de interrogação azul, atribuição funcional incerta; ponto de interrogação roxo, presença incerta em hemácias. PE- fosfatidiletanolamina, PC-fosfatidilcolina. Fonte: Fraser *et al*, 2021.

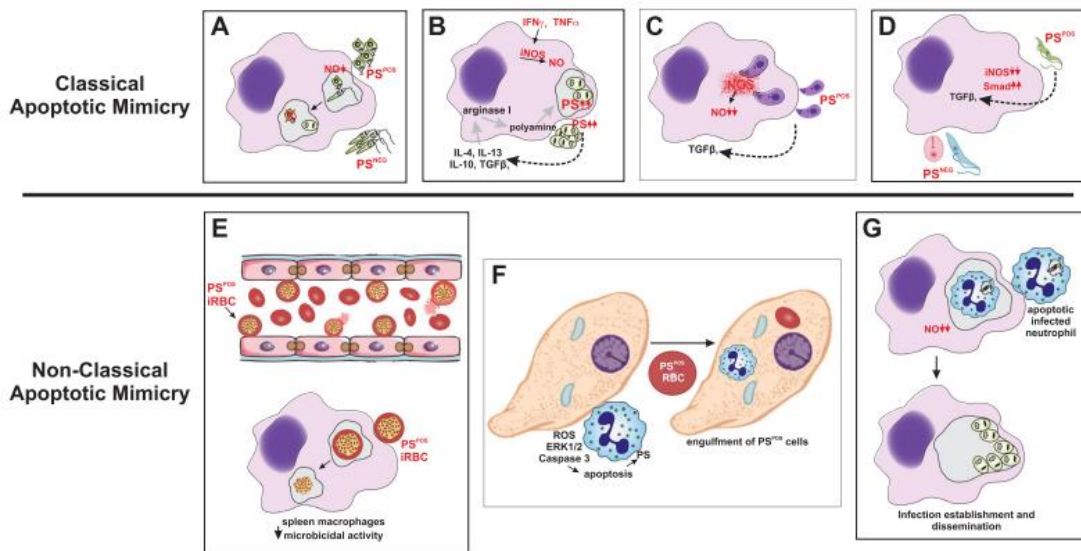
A presença de PS na camada externa da membrana é um marcador distintivo de apoptose celular, e serve como um sinal para o sistema imunológico de que a célula não está mais saudável, desencadeando a fagocitose por macrófagos, monócitos e células vizinhas. Essa forma de morte celular, associada à exposição de PS, geralmente resulta em uma resposta imune não inflamatória, ao contrário da necrose, que provoca inflamação local (Naeini *et al*, 2020).

O papel fundamental da assimetria fosfolipídica na progressão de doenças infecciosas é cada vez mais reconhecido. Alguns patógenos intracelulares parecem expor deliberadamente a PS para facilitar a invasão nas células hospedeiras. Esta estratégia é denominada mimetismo apoptótico, o qual consiste na evasão da resposta imunológica do hospedeiro baseado na exposição de PS (de Freitas Balanco *et al*, 2001; Barcinski *et al*, 2003; Wanderley *et al*, 2020). Os efeitos do reconhecimento de PS na regulação do marcador local, a inflamação sistêmica e a promoção da tolerância imunológica são vantajosas para o estabelecimento e disseminação de alguns parasitos (Wanderley *et al*, 2020).



Excelentes exemplos são elucidados em vários estudos que apontam a exposição de PS em infecções parasitárias causadas por alguns protozoários como, *Leishmania amazonensis* (de Freitas Balanco *et al*, 2001; Wanderley *et al*, 2006; van Zandbergen *et al*, 2006; Wanderley *et al*, 2009), *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al*, 2004) e *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al*, 2007). De fato, a exposição de PS parece ser um mecanismo importante em parasitos intracelulares, e seus efeitos na regulação da inflamação sistêmica são vantajosos para o estabelecimento da infecção.

O avanço em pesquisas para compreensão da exposição de PS por protozoários permitiu delimitar o mimetismo apoptótico em duas vertentes, sendo o mimetismo: clássico e não clássico. No mimetismo apoptótico clássico (figura 10 – A, B, C e D) a PS exposta provém da membrana plasmática do organismo, ou de células que a reconhece, o qual opera em infecções virais envelopadas, ou em desenvolvimento tumoral. Esse mecanismo é o que ocorre nos parasitos intracelulares como *Leishmania amazonensis* (de Freitas Balanco *et al*, 2001; Wanderley *et al*, 2006; van Zandbergen *et al*, 2006; Wanderley *et al*, 2009), *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al*, 2004) e *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al*, 2007). Da mesma forma, diversos vírus são capazes de invadir e desativar células do hospedeiro, através da exposição de PS na superfície do seu envelope. Além disso, células tumorais também exibem PS em sua superfície promovendo disseminação tumoral, tolerância imunológica e ativação de células endoteliais. Por outro lado, o mimetismo apoptótico não clássico (figura 10 – E, F e G) ocorre quando patógenos ou células tumorais aproveitam-se da PS exposta pelas células hospedeiras, seja pela indução da morte celular, ou após a morte natural devido à sua ativação, ou inflamação. Este é o caso de alguns vírus não envelopados e alguns parasitos como *Entamoeba histolytica*, *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. (Wanderley *et al*, 2020).



**Figura 10: Mimetismo apoptótico clássico e não clássico. (A)** Promastigotas de *Leishmania spp.* de culturas in vitr, através da exposição de PS têm capacidade para inibir a produção de NO em macrófagos infectados. **(B)** Amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* são capazes de expor PS em sua superfície, mantido pela atividade concomitante da arginase e iNOS. **(C)** Taquizoítos do *Toxoplasma gondii* são capazes de expor PS e a infecção de macrófagos com esses parasitas levou à degradação da iNOS e estabelecimento de parasitos. **(D)** Tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* é a única forma capaz de expor PS e estabelecer infecção devido a uma inibição da expressão de iNOS dependente de TGFβ. **(E)** Eritrócitos infectados com *Plasmodium spp.* são capazes de aderir às células endoteliais, promovendo resistência no sangue periférico. **(F)** Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* induzem apoptose de neutrófilos. **(G)** Neutrófilos infectados são capazes de sofrer apoptose, seja por indução fisiológica ou de infecção. Fonte: Wanderley, *et al*, 2020.

Resultados anteriores do grupo demonstraram que aproximadamente 50% dos merozoítos de *P. chabaudi* expõem PS, mesmo estando viáveis e que essa exposição é capaz de modular a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoniais de camundongos (Rodrigues, 2020). Esses dados indicam uma provável ocorrência do mecanismo de mimetismo apoptótico por merozoítos de *P. chabaudi*. Dessa forma, estudar o papel da PS no processo infectivo se mostra relevante. Nossa hipótese é que a PS exposta seja uma molécula chave no processo infectivo, podendo ser futuramente alvo para diversos processos terapêuticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Estabelecer ensaio de invasão de eritrócitos por merozoítos de *P. chabaudi* e analisar se a PS exposta pelo parasito está envolvida nesta invasão.

### 2.2 Específicos

- Padronizar condições ideais de infecção merozoíto/eritrócito, variando durante a interação o tempo, fixação do parasito e adição de citocalasina D;
- Determinar a importância da PS no processo invasivo de merozoítos em eritrócitos com anticorpo anti-PS.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Obtenção de merozoítos de *Plasmodium chabaudi*

Merozoítos foram obtidos conforme descrito por Rodrigues *et al* (2024). Brevemente, camundongos Balb/C machos adultos, foram mantidos em regime de luz (10:00 – 22:00) e escuridão (22:00 – 10:00), pois *P. chabaudi* tem ciclo de vida sincronizado com a melatonina do hospedeiro, possibilitando obter eritrócitos infectados com determinadas formas do parasito, dependendo da hora da coleta. A cepa AJ de *P. chabaudi* foi mantida por inoculação na cavidade peritoneal a cada 4 dias. O sangue de camundongos infectados foi obtido por punção cardíaca usando seringas contendo solução aquosa de citrato de sódio a 3,8%, 3 horas antes da primeira hora de luz, para obtenção de formas esquizontes em eritrócitos. Posteriormente, 1 ml de sangue foi depositado em um tubo cônico de 15 ml, juntamente com 14 ml de RPMI (Sigma-1640) suplementado com 0.2% de glucose (RPMI-Glu), homogeneizado, e centrifugado (500g) por 10 minutos. O sobrenadante contendo o plasma sanguíneo foi descartado, o sedimento foi ressuspensionado em RPMI-Glu suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), volume final de 30 ml. Posteriormente, a solução contendo eritrócitos infectados foi levada por 30 min em estufa à 37°C, com 5 % de CO<sub>2</sub>. Durante esse tempo o parasito desenvolve seu ciclo, ocorrendo a esquizogonia e posterior liberação de merozoítos dos eritrócitos (Chimanuka *et al*, 1997). Merozoítos livres no meio foram separados através de centrifugação diferencial e filtrados em membrana de 1,2µm para remoção de eritrócitos não lisados, neutrófilos e demais tipos celulares (Boyle *et al*, 2010). Esse

meio foi distribuído em microtubos e submetido à nova centrifugação a 5000g, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo os merozoítos livres, ressuspensionado em 4 ml de RPMI-Glu.

### **3.2. Obtenção de eritrócitos**

O sangue foi retirado da cauda de camundongos machos saudáveis adultos da linhagem Balb/C. Cerca de 40 µl de sangue foi adicionado a 1 ml de meio RPMI-Glu. Essa solução foi centrifugada à 200g, 25 °C, por 10 minutos, e o sedimento coletado com auxílio de pipeta Pasteur. Para interação analisada por microscopia óptica, os eritrócitos coletados foram ressuspensionados em 1 ml de meio RPMI-Glu, e para a interação analisada por citometria de fluxo, os eritrócitos coletados foram ressuspensionados em 4 ml de meio RPMI-Glu, e ambos contados na câmara de Neubauer.

### **3.3. Procedimentos éticos**

Animais foram abrigados em caixas herméticas próprias para uso, sobre maravalha, mantidos com água filtrada e ração suficiente para consumo diário, no infectório do LBCT, sob temperatura controlada através do uso de ar-condicionado, em um regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, conforme hábitos comuns desses animais. Este projeto foi aprovado na CEUA da UENF protocolo 485 de 06/2021.

### **3.4. Análise da exposição de PS de merozoítos de *P. chabaudi* por citometria de fluxo**

Os merozoítos foram incubados por 30 minutos com Anexina V-Alexa Fluor 488 (1 µg / 1 x 10<sup>5</sup> células) em tampão cálcio (25 µM CaCl<sub>2</sub>, 100 µM HEPES, 14 mM NaCl). Cinco minutos antes da leitura, iodeto de propídio (PI) (3 µg/mL) foi adicionado à solução contendo merozoítos. Para controle da marcação de PS, os merozoítos foram incubados por 30 minutos com Anexina V-Alexa Fluor 488 e PI como descrito acima, mas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 5 µM de etilenoglicol-bis (β-aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA). Para controle da coloração de PI, os parasitas foram incubados com Anexina V-Alexa Fluor 488 e PI como acima, em PBS contendo 0,5% de Triton X-100 por 15 minutos. As células foram avaliadas em um citômetro de fluxo FACScalibur. Os dados foram analisados no programa floreada.io.

### **3.5. Interação de eritrócitos com parasitos**

Nas interações realizadas para análise da infectividade dos merozoítos por microscopia óptica, adicionamos em um microtubo,  $1,1 \times 10^7$  merozoítos em eritrócitos na proporção de 1:1, no volume final de 2 ml em RPMI-Glu. Lâminas nos tempos de 10 e 30 minutos, 1 e 3 horas foram citocentrifugadas pelo método de citospin, coradas com panóptico rápido (Laborclin), onde a lâmina é mergulhada 7 vezes em três reagentes na seguinte ordem: 1 – Solução de triarilmetano a 0,1% – 500 ml; 2 – Solução de xantenos a 0,1% – 500 ml; 3 – Solução de tiazinas a 0,1% – 500 ml. Ao final são lavadas com água corrente, e visualizadas por microscopia de campo claro. Para determinar a infecção de eritrócitos por merozoítos em citometria de fluxo, usamos a marcação por brometo de etídio (EtBr) (15 µg/ml) de merozoítos (Boyle *et al*, 2010). A marcação com EtBr é específica em células nucleadas, pois ele se intercala entre as bases do DNA (ácido desoxirribonucleico), se tornando altamente fluorescente (Brun, 1978; Boyle *et al*, 2010). Dessa forma, eritrócitos não infectados não foram marcados por EtBr devido à ausência de núcleo, enquanto eritrócitos infectados foram positivos para EtBr, pois marca o DNA do parasito. Adicionamos nos microtubos  $1,1 \times 10^7$  merozoítos em eritrócitos na proporção de 1:1, no volume final de 500 µl em RPMI-Glu. As interações realizadas foram: **1** - Controle de eritrócitos não-infectados; **2** - Controle de eritrócitos não-infectados com EtBr; **3** – Controle de merozoítos; **4** – Controle de Merozoítos com EtBr; **5** - Eritrócitos e merozoítos com EtBr (interação por 10, 30 e 60 minutos); **6** - Eritrócitos com merozoítos mortos por congelamento com EtBr; **7** - Eritrócitos com merozoítos incubados por 30 minutos com anticorpo anti-PS (inteiro) (10 e 5µg/mL) com EtBr; **8** - Eritrócitos com merozoítos incubados com anticorpo anti-PS (porção Fab) (10 e 5µg/mL) com EtBr; **9** - Eritrócitos com merozoítos incubados com anticorpo isotipo (10 e 5 µg/mL). Anticorpos anti-PS (Peregrine Pharmaceuticals) independentes de beta-2-glicoproteína I, são IgG<sub>2</sub> monoclonais humanizados dos tipos inteiro (11:31), porção Fab (11:31) e isotipo controle (IgG2, C44) e foram cedidos pelo professor João Luiz Mendes Wanderley, do Laboratório Integrado de Imunoparasitologia, UFRJ *campus* Macaé.

### **3.6. Quantificação da infecção**

#### **3.6.1. Por microscopia óptica**

Eritrócitos com e sem merozoítos foram contados com a objetiva de 100x em microscopia óptica de campo claro. Foram contadas 300 células por amostra e a porcentagem de eritrócitos infectados calculada.

### **3.6.2. Por citometria de fluxo**

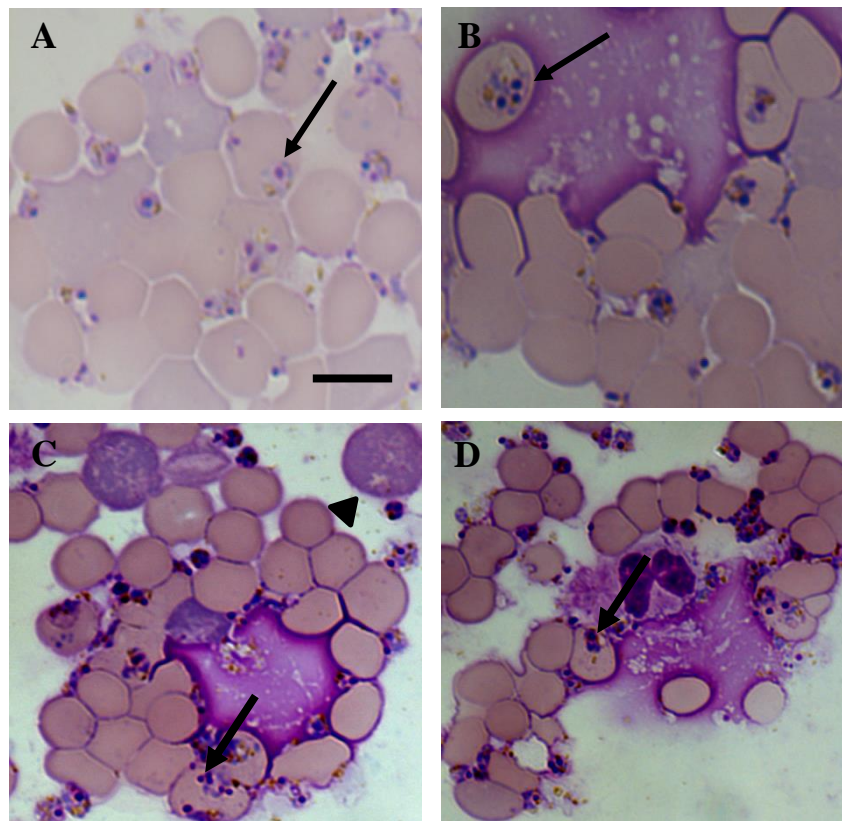
As células foram lidas no equipamento BD FACSCalibur; o laser FL2 foi usado para leitura de EtBr e o tamanho (FSC) foi avaliado. O aumento de fluorescência dos eritrócitos devido a infecção pelos merozoítos definiu um gate de eritrócitos infectados; a porcentagem de infecção dos eritrócitos foi calculada. A quantidade de merozoítos por amostra foi quantificada construindo um gate usando beads de 1  $\mu\text{m}$ , e determinando o número de eventos dentro desse gate em 100  $\mu\text{l}$  de solução. As análises foram realizadas no programa Floreada io.

### **3.7. Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. As variâncias entre três experimentos independentes foram analisadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, ou teste  $t$ , no programa estatístico Graph-Pad Prism 8.0. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4 RESULTADOS

Interações entre merozoítos de *P. chabaudi* e eritrócitos de camundongos foram examinadas por microscopia de campo claro. Foi possível observar que os merozoítos conseguem infectar os eritrócitos *in vitro* (figura 11). Os eritrócitos foram observados formando grumos. Alguns leucócitos foram observados na preparação (figura 11 - C).



**Figura 11: Imagens por microscopia de campo claro em um aumento de 100x, da interação de merozoítos de *Plasmodium chabaudi* com eritrócitos de camundongos.** Após tempos de interação de 1 (A e B) e 3 horas (C e D) foi possível visualizar merozoítos dentro de eritrócitos (setas) e presença de leucócitos (cabeça de setas). Lâminas foram preparadas por método cistospin e coradas com Panótico Rápido. Barra = 10  $\mu$ m.

A quantificação da infecção por merozoítos nas interações de 1 e 3 horas revelou que a população de eritrócitos estava infectada em torno de 6 a 12%, todavia sem diferença significativa entre os tempos de interação (figura 12). Dessa forma, investigamos o processo de invasão em tempos inferiores há 1 hora, mostrando que 1% da população de eritrócitos estava infectada, sem diferença significativa entre os tempos de 10, 30 e 60 minutos (figura 13).

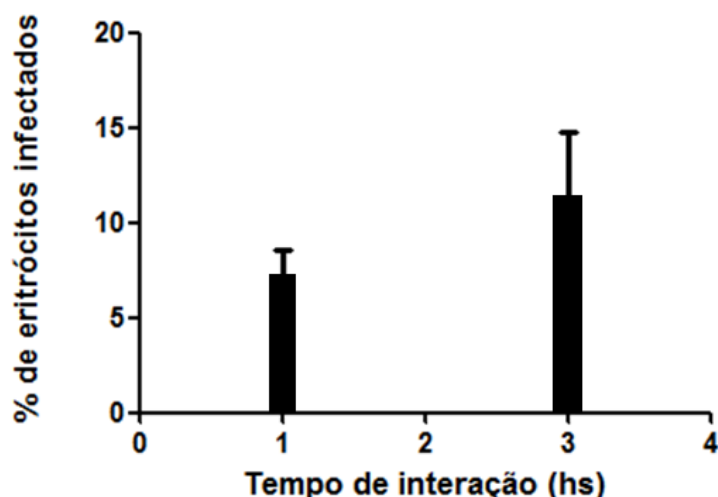


Figura 12: Porcentagem de eritrócitos infectados por merozoítos de *P. chabaudi*. Interação realizada por 1 e 3 horas. Não houve diferença estatística na infecção entre os dois tempos.

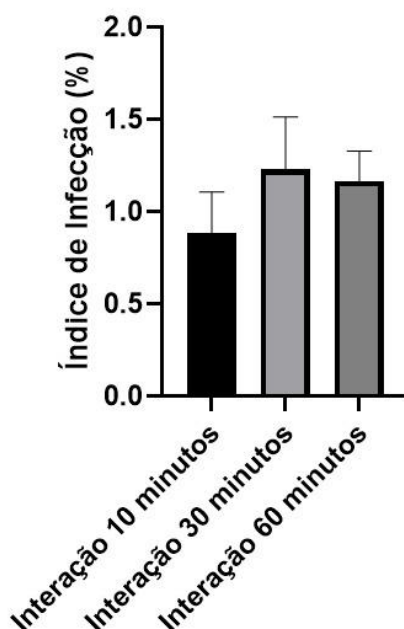
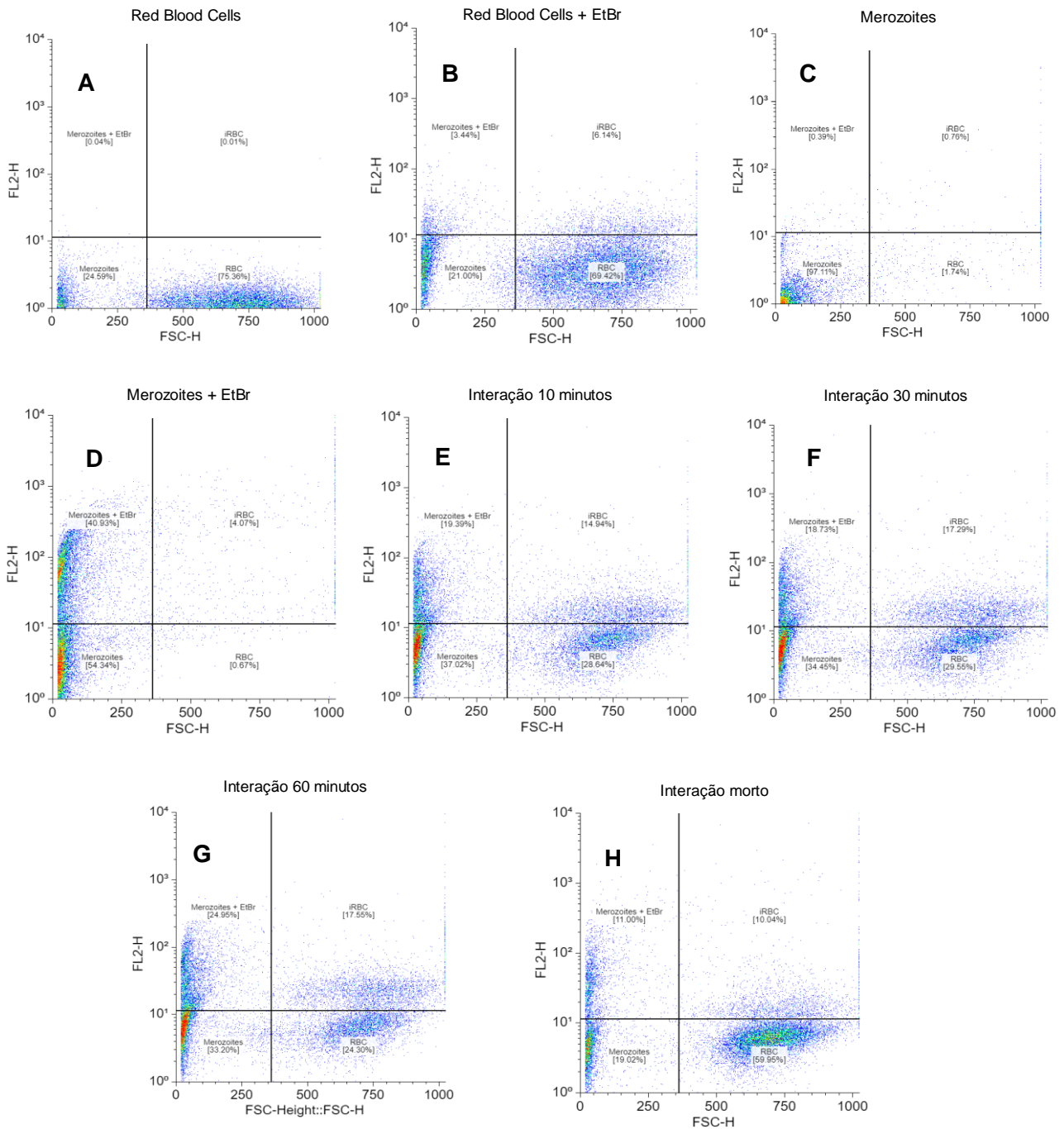


Figura 13: Porcentagem de eritrócitos infectados por merozoítos de *P. chabaudi*. Interação realizada por 10, 30 e 60 minutos. Não houve diferença significativa na infecção entre os tempos.

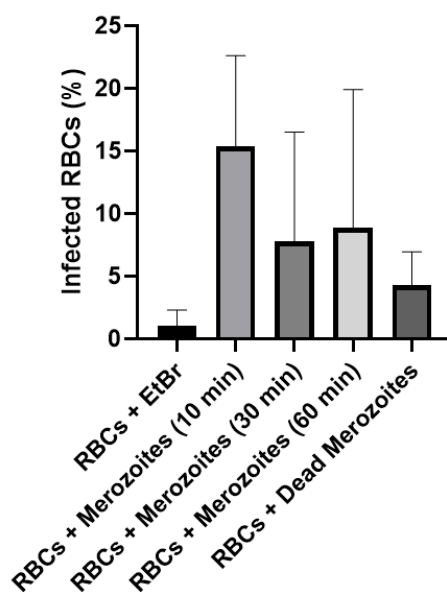
Devido à alta variação das porcentagens de eritrócitos infectados aferidas por microscopia ótica, fizemos análises por citometria de fluxo. Controles foram realizados utilizando eritrócitos isolado com e sem EtBr (figura 14 – A e B); eritrócitos incubados com EtBr apresentaram maior fluorescência. Controle também foi realizado utilizando merozoítos isolados e incubados com EtBr (figura 14 – C e D), indicando que a marcação com EtBr foi funcional. Foi possível determinar que merozoítos invadem eritrócitos em tempos de 10, 30 e 60 minutos, em torno de 10 a 15% (figura 14 – E, F e G), quando comparados a uma interação realizada com



merozoítos mortos (figura 14 – H). Não houve diferença significativa na porcentagem de eritrócitos infectados nos tempos de 10, 30 e 60 minutos, todavia quando comparado 10 minutos de interação e com o controle morto, a porcentagem de infecção reduziu para cerca de 5 % (figura 15).

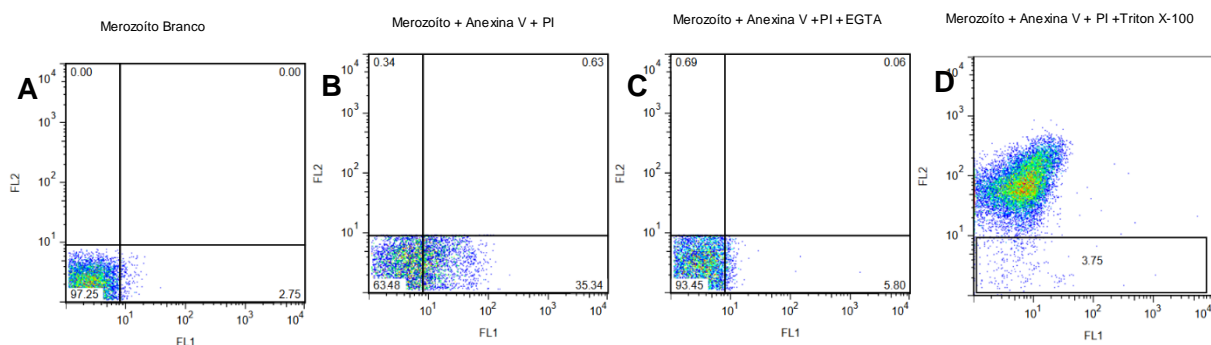


**Figura 14: Análises por citometria de fluxo das interações de merozoítos de *P. chabaudi* em diferentes intervalos de tempo. Eritrócitos (A); Eritrócitos incubados com EtBr (B); Merozoítos (C); Merozoítos incubados com EtBr (D); Interação de eritrócitos com merozoítos por 10 min (E); por 30 min (F); por 60 min (G); Interação com merozoíto morto (controle) (H).**



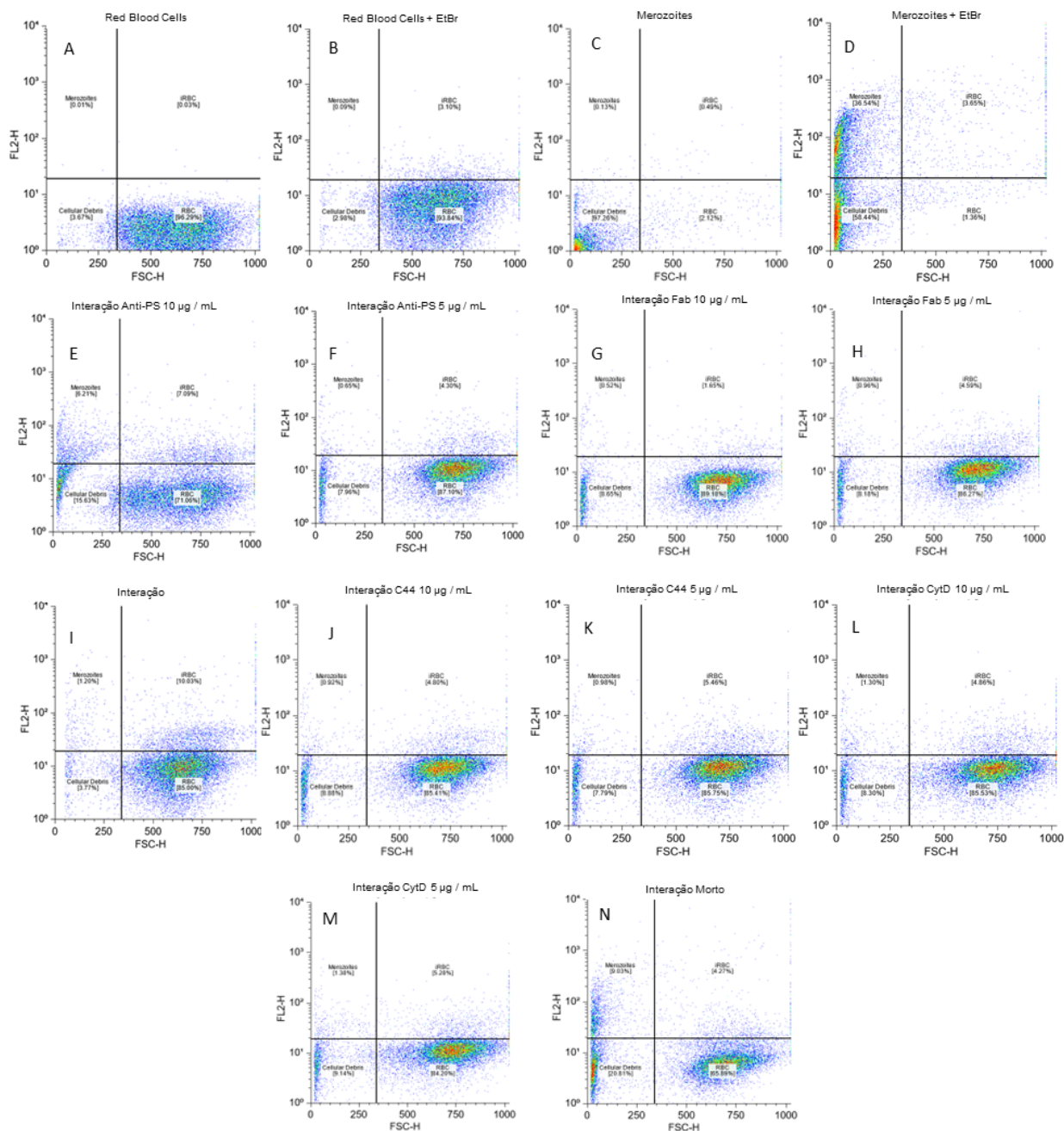
**Figura 15: Porcentagem de eritrócitos infectados por merozoítos de *P. chabaudi*.** RBCs + EtBr: eritrócitos incubados com brometo de etídio (EtBr); RBCs + Merozoites (10 min): interação de eritrócitos com merozoítos por 10 min corados por EtBr; RBCs + Merozoites (30 min): interação de eritrócitos com merozoítos por 30 min corados por EtBr; RBCs + Merozoites (60 min): interação de eritrócitos com merozoítos por 60 min corados por EtBr; RBCs + Dead Merozoites: interação com merozoíto morto corados por EtBr.

Avaliamos a exposição de PS de merozoítos de *P. chabaudi* por citometria de fluxo (Figura 16). Realizamos um controle de merozoítos sem marcador (figura 16 - A). Cerca de 40 % da população de merozoítos de *P. chabaudi* expõem PS com excelente viabilidade (figura 16 – B). Controle utilizando quelante de cálcio apresentou baixa fluorescência nos 2 canais (figura 16 – C). Merozoítos incubados com triton X-100 apresentaram alto sinal de PI e parcial de anexina-V (figura 16 - D).



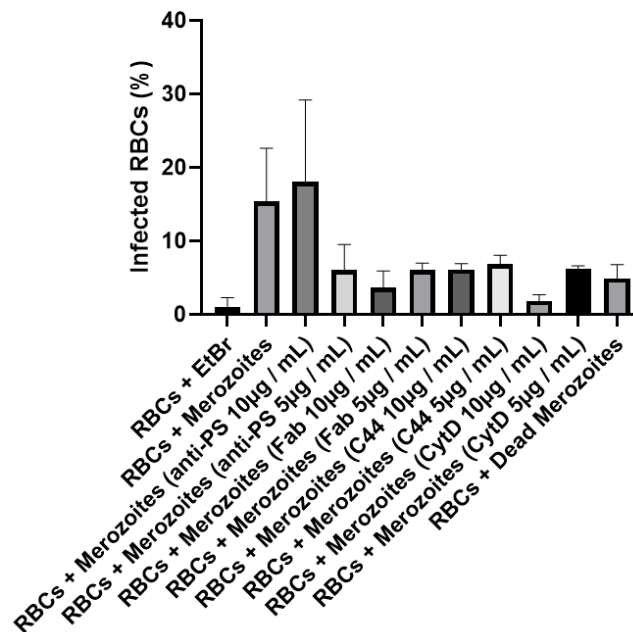
**Figura 16: Análises da exposição de fosfatidilserina de merozoítos de *P. chabaudi* por citometria de fluxo.** Análise da população de merozoítos de *P. chabaudi* na ausência e na presença de anexina V e PI (A e B). Controle utilizando o quelante de cálcio (C) e Triton X100 (D).

Para determinar o papel da exposição da PS no possível processo de infecção de merozoítos de *P. chabaudi*, interações foram realizadas utilizando merozoítos que tiveram a PS bloqueada com anticorpo anti-PS inteiro, constituído pela região FC (fragmento cristalizável) e Fab (do inglês Fragment Antigen Binding), e com anticorpo anti-PS apenas na porção Fab, a qual é responsável pela ligação específica ao antígeno (Abbas *et al*, 2012). Eritrócitos (figura 17 - A e B) e merozoítos (figura 17 - C e D) foram analisados separadamente na presença e ausência de EtBr para definir os parâmetros utilizados para avaliar a porcentagem de infecção de eritrócitos por merozoítos. Merozoítos com a PS bloqueada utilizando anticorpo anti-PS inteiro (figura 17 - E e F) e anticorpo anti-PS porção Fab (figura 17 - G e H) tiveram uma redução de aproximadamente 40 % da sua capacidade infectiva, em comparação com merozoítos que não tiveram sua PS bloqueada (figura 17 - I). Controles utilizando anticorpo isotipo foram realizados (figura 17 - J e K), assim como merozoítos incubados com citocalasina D (figura 17 - L e M), e ambos demonstraram uma redução de células infectadas. Do mesmo modo, foram realizadas interações utilizando merozoítos mortos (figura 17 - N).



**Figura 17: Análises da interação entre merozoítos de *P. chabaudi* e eritrócitos de camundongos através de citometria de fluxo.** Eritrócitos saudios (A); Eritrócitos saudios incubados com EtBr (B); Merozoítos (C); Merozoítos incubados com EtBr (D); Interação entre merozoítos e eritrócitos (E); Interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo anti-PS na concentração de 10 µg/mL (F); Interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo anti-PS na concentração de 5 µg/mL (G); Interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo na porção Fab na concentração de 10 µg/mL (H); Interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo na porção Fab na concentração de 5 µg/mL (I); Interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo isotipo na concentração de 10 µg/mL (J); Interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo isotipo na concentração de 5 µg/mL (K); Interação de eritrócitos com merozoítos que foram incubados com citocalasina D na concentração de 10 µg/mL (L); Interação de eritrócitos com merozoítos que foram incubados com citocalasina D na concentração de 5 µg/mL (M); Interação de eritrócitos com merozoítos mortos (N).

Quantificação da porcentagem de eritrócitos infectados foi realizada, e observou-se que a inibição da infecção pelo anti-PS, tanto na porção inteira, quanto na porção Fab na concentração de 5 µg/mL, foi em torno de 50%, e similar ao controle usando merozoítos mortos ou incubados com citocalasina D a 5 µg/mL (figura 18). Foi possível observar que a inibição da infecção utilizando anticorpo anti-PS na porção inteira, concentração de 10 µg/mL, obteve um valor maior de infecção de eritrócitos em relação as demais variáveis (figura 18). O controle com citocalasina D também se mostrou eficaz para impedir a infecção dos eritrócitos (figura 18).



**Figura 18: Análise da porcentagem de eritrócitos infectados por *P. chabaudi*.** Merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpos anti-PS (tanto a porção inteira quanto a porção Fab) invadiram menos eritrócitos em comparação a merozoítos que não tiveram a PS bloqueada. **RBC + EtBr:** eritrócitos; **RBC + Merozoites:** eritrócitos + interação com merozoítos; **RBC + Merozoites + anti-PS 10 µg/mL:** interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo anti-PS na concentração de 10 µg/mL; **RBC + Merozoites + anti-PS 5 µg/mL:** interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo anti-PS na concentração de 5 µg/mL; **RBC + Merozoites + Fab 10 µg/mL:** interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo porção Fab na concentração de 10 µg/mL; **RBC + Merozoites + Fab 5 µg/mL:** interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo porção Fab na concentração de 5 µg/mL; **RBC + Merozoites + C44 10 µg/mL:** interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo isotipo na concentração de 10 µg/mL; **RBC + Merozoites + C44 5 µg/mL:** interação de eritrócitos com merozoítos que tiveram sua PS bloqueada com anticorpo isotipo na concentração de 5 µg/mL; **RBC + Merozoites + CytD 10 µg/mL:** interação de eritrócitos com merozoítos que foram incubados com citocalasina D na concentração de 10 µg/mL; **RBC + Merozoites + CytD 5 µg/mL:** interação de eritrócitos com merozoítos que foram incubados com citocalasina D na concentração de 5 µg/mL; **RBC + Dead Merozoites:** interação de eritrócitos com merozoítos mortos.

## 5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que merozoítos de *P. chabaudi* são capazes de invadir eritrócitos de camundongos *in vitro*, através de análise por microscopia de campo claro. Tais achados corroboram os encontrados por Boyle *et al.* (2010) em estudo utilizando merozoítos de *P. falciparum*, os quais foram capazes de invadir eritrócitos humanos em uma interação *in vitro*. Nossas análises por microscopia de campo claro demonstraram uma taxa de infecção em torno de 6 a 12% nos tempos de 1 e 3 horas, todavia sem diferença significativa. No mesmo estudo publicado por Boyle e colaboradores (2010), demonstrou-se que essa invasão ocorre de forma acentuada nos primeiros momentos da infecção. Dessa forma, analisamos essa taxa de invasão em tempos de até 60 minutos, e essa característica também parece se aplicar ao modelo animal utilizando merozoítos de *P. chabaudi*, na qual a porcentagem de infecção foi em torno de 1%. Esses resultados também confirmam os encontrados por Boyle *et al.* (2010), onde foi relatado que merozoítos de *P. falciparum* invadem eritrócitos humanos nos primeiros momentos da infecção. No mesmo estudo, foi demonstrado uma taxa de infecção que varia de 1 a 3 %. Esse resultado pode ser explicado, devido a parasitemia em casos de malária humana causada por *P. falciparum*, normalmente ser baixa (Boyle *et al.*, 2010). Resumindo, as taxas de infecção de eritrócitos em ambos os modelos parecem ser similares.

A microscopia óptica é excelente para uma análise qualitativa, entretanto para uma análise quantitativa têm suas limitações. Na quantificação da infecção através da citometria de fluxo foram analisados 20.000 eventos independentes. Apesar de não ter demonstrado uma diferença significativa quando comparamos os tempos de 10, 30 e 60 minutos, mostrou uma porcentagem de eritrócitos infectados variando de 15 a 20 %. Esse resultado mostra uma clara diferença entre uma infecção de malária humana causada por *P. falciparum* e da malária murina causada por *P. chabaudi*. Apesar dessa diferença entre as porcentagens de eritrócitos infectados, em ambas as análises foi possível verificar que tanto na malária humana quanto na malária em camundongos a infecção de eritrócitos por merozoítos parecem ocorrer nos primeiros minutos de interação. Essa divergência pode ser explicada devido as diferenças genéticas e clínicas entre a malária murina e a malária humana, onde tipicamente parasitemias baixas são observadas.

Estudos demonstram que a exposição de PS é um mecanismo essencial para o sucesso infectivo de diversos parasitos intracelulares (de Freitas Balanco, 2001;

Seabra *et al*, 2004; DaMatta *et al*, 2007). Dessa forma, criamos a hipótese de que a PS tem um papel importante na infecção de eritrócitos por merozoítos de *Plasmodium* spp. Foi analisada a exposição de PS por merozoítos e, surpreendentemente, observamos que a proporção dessa exposição na população é semelhante àquela encontrada em formas infecciosas de *Leishmania* spp. (de Freitas Balanco, 2001), *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al*, 2007) e *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al*, 2007), demonstrando em diversos trabalhos a importância da exposição de PS para o sucesso da infecção.

Para avaliar o papel da PS exposta na superfície de merozoítos de *P. chabaudi*, realizamos ensaios de interação entre eritrócitos e merozoítos que tiveram a sua PS bloqueada. Os merozoítos com a PS bloqueada com o anticorpo inteiro, ou com a porção Fab foram menos eficientes em invadir eritrócitos quando incubados na concentração de 5 µg/mL. O efeito de anti-PS na inibição da invasão foi dose dependente, pois merozoítos tiveram menor taxa de infecção quando incubados com anticorpos em menores concentrações, e melhor na porção Fab, provavelmente por ser a região específica do sítio de ligação anticorpo/antígeno. Da mesma forma, um controle com citocalasina D foi utilizado. Merozoítos incubados com essa substância tiveram menor eficácia em invadir eritrócitos na concentração de 10 µg/mL, quando comparado com a concentração de 5 µg/mL. O efeito dose dependente também foi observado nesse ensaio, todavia com maiores concentrações. Um controle com merozoítos mortos demonstrou uma redução de em torno de 10% da taxa de infecção, quando comparado com a interação de merozoíto com eritrócitos. Esse resultado se assemelha aos achados nos ensaios incubados com anticorpo anti-PS na porção Fab e citocalasina D; todavia, merozoítos bloqueados com anticorpo anti-PS na porção inteira, concentração de 10 µg/mL resultou em alta porcentagem de eritrócitos infectados. Esse resultado pode ser devido a uma contaminação de outras células, como neutrófilos e aglutinação de população de merozoítos. Outro controle utilizando um anticorpo isotipo ao anti-PS foi realizado e mostrou efeito na inibição. Não conseguimos explicar esse resultado, e futuros experimentos serão necessários para determinar o papel específico da PS na infecção.

O papel da PS no processo infectivo também se mostrou importante em um estudo realizado com *Toxoplasma gondii* (Santos *et al*, 2011). Em tal estudo, demonstrou-se que apenas a subpopulação que expunha PS era capaz de invadir ativamente as células hospedeiras e inibir a produção de NO em macrófagos

ativados. No entanto, a infecção de camundongos revelou que ambas as subpopulações são necessárias para o equilíbrio da resposta imune. Infecção apenas com a subpopulação que expõe PS resulta em uma carga parasitária significativa, enquanto uma infecção apenas com a subpopulação que não expõe PS causa um processo inflamatório exacerbado, comprometendo a viabilidade do animal (Santos *et al*, 2011). Nossos achados sugerem que a exposição de PS por merozoítos podem desempenha papel crucial no equilíbrio da resposta imune do hospedeiro como no caso de *T. gondii*.

Análise dos experimentos *in vitro* sugere que o bloqueio da PS pode representar uma alternativa terapêutica promissora. Esta intervenção parece ser eficaz no mecanismo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos potencialmente inibindo ou reduzindo a infecção por malária. Contudo, ressalta-se que a validação dessa estratégia terapêutica em modelos animais e, posteriormente, em ensaios clínicos com pacientes, são etapas cruciais para a sua eficácia e segurança. Portanto, estas descobertas sugerem que a intervenção direcionada à exposição de PS pelos merozoítos pode representar uma promissora área de pesquisa para o desenvolvimento de novas terapias antimaláricas, assim como a utilização da substância citocalasina D, visando interromper o ciclo de vida do parasito no hospedeiro humano.

## **6 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi possível validar a infectividade de merozoítos obtidos através de uma metodologia simples descrita por Rodrigues *et al* (2024). Através de experimentos *in vitro* utilizando camundongos observou-se que a invasão entre merozoítos e eritrócitos ocorreu de forma significativa nos primeiros 10 minutos de exposição, indicando rápida capacidade de invasão do parasito. É possível concluir que a exposição da PS pelos merozoítos de *P. chabaudi* desempenha um papel significativo no processo de invasão eritrocitária. Além disso, a utilização de anticorpos anti-PS na porção inteira e Fab, bem como a citocalasina D, demonstrou uma diminuição na taxa de invasão dos merozoítos nos eritrócitos, quando comparados com os grupos controle. Esses resultados sugerem que o bloqueio da PS pode representar uma estratégia terapêutica potencialmente eficaz para inibir o processo de invasão de eritrócitos por *P. chabaudi*.



Em suma, os resultados deste estudo fornecem uma base sólida para futuras pesquisas na busca por novas estratégias terapêuticas contra a malária. A identificação da PS como um potencial alvo terapêutico ressalta a importância de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na relação parasito-hospedeiro. Espera-se que este trabalho contribua para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e direcionadas, que possam melhorar significativamente o manejo e o controle da malária, uma doença que continua a representar um desafio significativo para a saúde pública global.

## 7 REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- Alberts, B. Andrade, A.E.B, Bizarro, C.V, Renard, G. *Biologia molecular da célula* [recurso eletrônico]. – 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. ISBN 978-85-8271-423-2.
- Barcinski, M.A., Moreira, M.E., Balanco, J.M., Wanderley, J.L., Bonomo, A.C. (2003). The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? *Kinetoplastid Biol Dis*, 2, 6. doi: 10.1186/1475-9292-2-6
- Blackman MJ. Purification of *Plasmodium falciparum* merozoites for analysis of the processing of merozoite surface protein-1. *Methods Cell Biol*. 1994;45:213-20. doi: 10.1016/s0091-679x(08)61853-1. PMID: 7707987
- Boulet C, Doerig CD, Carvalho TG. Manipulating Eryptosis of human red blood cells: a novel antimalarial strategy? *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:419.
- Boyle MJ, Wilson DW, Beeson JG. New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. *Int J Parasitol*. 2013 Jan;43(1):1-10. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.11.002. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23220090.
- Boyle, M. Wilson D., Richards J., Riglar D., Tetteh K., Conway D., Ralph S., Baum J., Beeson G. (2010) Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *PNAS*, 107, 32, 14378-14383.
- Brasil, P., Zalis, M.G., de Pina-Costa, A., Siqueira, A.M., Junior, C.B., Silva, S., *et al.* (2017). Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*, 5, e1038-e1046. doi: 10.1016/s2214-109x(17)30333-9.
- Chimanuka, B., François G., Timperman G., Vanden driesche T., Plaizier-Vercammen J (1997). Chronobiology of *Plasmodium chabaudi chabaudi*: analysis of hourly recorded total and differential parasitaemia during a schizogonic cycle. *Parasite*, 4: 319-323.
- Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 1987 Oct;105(4):1473-8. doi: 10.1083/jcb.105.4.1473. PMID: 3312229; PMCID: PMC2114638.

- Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W.-H., Duraisingh, M. T. (2017). The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host & Microbe*. 232–245.
- DaMatta, R.A., Seabra S.H., Deolindo, P., Arnholdt A.C.V., Manhães, L., Goldenberg, S., de Souza, W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *fems microbiol. lett.*, v. 266, n. 1, p. 29–33, 2007.
- Das, S. et al. Processing of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein MSP1 activates spectrin-binding function enabling parasite egress from RBCs. *Cell Host Microbe* 18, 433–444 (2015).
- de Freitas Balanco, J.M., Moreira, M.E., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C.(2001). Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol*, 11, 1870-1873.
- dos Santos TAT, Portes JdA, Damasceno-Sá JC, Caldas LA, de Souza W, DaMatta RA, et al. (2011) Phosphatidylserine Exposure by *Toxoplasma gondii* Is Fundamental to Balance the Immune Response Granting Survival of the Parasite and of the Host. *PLoS ONE*, 6(11): e27867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027867>
- Dvorak, J.A., Miller, L.H., Whitehouse, W.C., and Shiroishi, T. (1975). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*, 187, 748–750.
- Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001;276:1071–7.
- Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, Moch JK, Muster N, Sacci JB, Tabb DL, Witney AA, Wolters D, Wu Y, Gardner MJ, Holder AA, Sinden RE, Yates JR, Carucci DJ. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):520-6. doi: 10.1038/nature01107. PMID: 12368866.
- Fraser, M; Matuschewsk, K; Maie, A. Of membranes and malaria: phospholipid asymmetry in Plasmodium falciparum-infected red blood cells. Of membranes and malaria: phospholipid asymmetry in Plasmodium falciparum-infected red blood cells, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021. DOI <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03799-6>. Disponível em: <file:///C:/Users/Milena%20Farias/Downloads/2021%20membranes%20and%20mal>

- aria%20phospholipid%20asymmetry%20in%20Plasmodium.pdf. Acesso em: 29 jul. 2024.
- Gilson PR, Crabb BS. Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Int J Parasitol*. 2009 Jan;39(1):91-6. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.09.007. Epub 2008 Oct 11. PMID: 18952091.
- Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev*. 2011 Mar;240(1):297-316. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00988.x. PMID: 21349101.
- Lamikanra, A.A., Brown, D., Potocnik, A., Casals-Pascual, C., Langhorne, J., Roberts, D.J. Malarial anemia: of mice and men. *Blood*, v. 110, n. 1, p. 18–28, 2007.
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979 Jun;65(3):418-20. PMID: 383936.
- Lemmon, MA. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2):99–111
- Moore, S.A., Surgey, E.G. & Cadwgan, A.M. (2002). Malaria vaccines: where are we and where are we going? *Lancet Infect Dis*, 2, 737-743.
- Naeini MB, Bianconi V, Pirro M, Sahebkar A (2020) The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions. *Cell Mol Bio Lett* 25:23
- Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol*. 2011 Oct;27(10):442-9. doi: 10.1016/j.pt.2011.06.004. Epub 2011 Jul 26. PMID: 21795115.
- Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) Malária. *In: Malaria*. 2024. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/malaria#:~:text=A%20mal%C3%A1ria%20%C3%A9%20uma%20doen%C3%A7a,mortes%20foram%20registrados%20em%202022>. Acesso em: 29 jul. 2024.
- Richards JS, Beeson JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol*. 2009 Jul;87(5):377-90. doi: 10.1038/icb.2009.27. Epub 2009 May 5. PMID: 19417768.
- Rodrigues P., Azeredo M., Almeida N., Almeida G., Wanderley J., Seabra S., DaMatta R. Infective *Plasmodium chabaudi* merozoites do not survive in activated macrophages *in vitro*. 2024.

- Rodrigues, P. Merozoítos de *Plasmodium chabaudi* obtidos por método melhorado não sobrevivem em 21 macrófagos ativados: correlação com exposição de fosfatidilserina. 2020. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, [S. l.], 2020
- Santos TA, Portes Jde A, Damasceno-Sa JC, Caldas LA, Souza W, DaMatta RA, Seabra SH: Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. PLoS One 2011, 6:e27867.
- Satchwell TJ. Erythrocyte invasion receptors for *Plasmodium falciparum*: new and old. Transfus Med. 2016 Apr;26(2):77-88. doi: 10.1111/tme.12280. Epub 2016 Feb 9. PMID: 26862042.
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. Biochem Biophys Res Commun. 2004;324:744–52.
- Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F, Nagata S. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. Science. 2014; 344:1164–8.
- Stephens, R., Culleton, R.L., Lamb, T.J. (2012).The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria.Trends Parasitol, 28, 73-82. doi: 10.1016/j.pt.2011.10.006
- van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Muller A, Holscher C, Herrmann M, Sacks D, et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:13837–42.
- Varo, R., Chaccour, C., Bassat, Q. (2020). Update on malaria. Medicina Clínica. Elsevier España, S.L.U. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.05.010>
- Walliker, D., Carter, R., Morgan, S. (1971). Genetic recombination in malaria parasites.Nature, 232, 561-562.
- Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, de Souza AP, Barral A, Balanco JM, do Nascimento MT, et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of *Leishmaniasis*. PLoS One. 2009; 4:e 5733.
- Wanderley, J. L. M.; Moreira, M. E. C.; Benjamin, A.; Bonomo, A. C.; Barcinski, M. A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the

- establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts.. The Journal of Immunology (1950), Estados Unidos, v. 176, n.3, p. 1834-1839, 2006. Citações:109|109
- Wanderley, J. L. M., DaMatta, R. A., Barcinski, M. A. (2020). Apoptotic mimicry as a strategy for the establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived phosphatidylserine as key molecule. Cell Communication and Signaling, 18(1). doi:10.1186/s12964-019-0482-8
- Weiss M, Byrne AJ, Blazek K, Saliba DG, Pease JE, et al. 2015. IRF5 controls both acute and chronic inflammation. PNAS 112:11001–6
- Wendt C., Rachid R., de Souza W., Miranda K. Electron tomography characterization of hemoglobin uptake in *Plasmodium chabaudi* reveals a stage-dependent mechanism for food vacuole morphogenesis. J. Struct. Biol. 2016;194:171–179. doi: 10.1016/j.jsb.2016.02.014.
- White NJ. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. Malar J. 2008 Dec 11;7 Suppl 1(Suppl 1):S8. doi: 10.1186/1475-2875-7-S1-S8. PMID: 19091042; PMCID: PMC2604872.
- World Malaria Report 2021, World Health Organization 2021. ISBN 978-92-4-004049-6 (electronic version)
- World malaria report 2023, World Health Organization 2023. ISBN 978-92-4-008617-3 (electronic version)
- Yeoh, S., O'Donnell, R.A., Koussis, K., Dluzewski, A.R., Ansell, K.H., Osborne, S.A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G.H., Bannister, L.H., et al. (2007). Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. Cell, 131, 1072–1083.
- Yeung T, Gilbert GE, Shi J, Silvius J, Kapus A, Grinstein S (2008) Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. Science 319(5860):210–213.