

1 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

2

3

4

5

6

7

8

PEDRO SOUTO RODRIGUES

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

Merozoítos de *Plasmodium chabaudi* obtidos através de uma nova metodologia não sobrevivem em macrófagos ativados: correlação com exposição de fosfatidilserina

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

42

Março de 2020

1 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

2

3

4

5

6

7

8 Pedro Souto Rodrigues

9

10

11

12

13

14

15

16

17 Merozoítos de *Plasmodium chabaudi* obtidos através de uma nova metodologia não
18 sobrevivem em macrófagos ativados: correlação com exposição de fosfatidilserina

19

20

21

22

23

24

25 Tese apresentada ao Centro de Biociências e
26 Biotecnologia da Universidade Estadual do
27 Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte
28 das exigências para obtenção do título de
29 Doutor em Biociências e Biotecnologia.

30

31

32

32 Coorientador: Renato Augusto DaMatta

33

34

34 Orientador: Sergio Henrique Seabra

35

36

37

38

39

40

41

42

43 Campos dos Goytacazes – RJ

44

44 Março de 2020

45

2

3

4

5 Merozoítos de *Plasmodium chabaudi* obtidos através de uma nova metodologia não
6 sobrevivem em macrófagos ativados: correlação com exposição de fosfatidilserina

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Biociências e Biotecnologia.

18 Aprovada em 23 de março de 2020.

19

20

21

22

23 Banca examinadora:

24

25

26 Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
27 UFES

28

29

30 Prof. Dr. João Carlos de Aquino Almeida
31 UENF

32

33

34 Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro
35 UENF

36

37

38 Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta
39 Coorientador – UENF

40

41

42 Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra
43 Orientador – UEZO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

Dedico esta tese ao meu pai, Pedro Rodrigues da Silva Jr., *in memoriam*, por ter sido, desde o momento de meu nascimento, exemplo para minha vida e principalmente por ter depositado em mim a sua confiança, possibilitando a concretização dos meus sonhos.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

“A good swordsman is more important than a good sword.”
— **Amit Kalantri, Wealth of Words**

1 **Agradecimentos**

2 Primeiramente a Deus, que escrevendo certo por linhas tortas me guiou até aqui.

3 A minha mãe que é meu mundo e meu porto seguro, que sempre me apoiou em tudo e
4 de todo jeito possível.

5 Ao meu Pai, Pedro (*in memorian*), que sempre quis ver seu filho um doutor e apesar de
6 não poder estar comigo nesse momento me apoiou em todos os momentos da minha vida e sem
7 o qual eu não seria nada que sou hoje.

8 Ao meu irmão Daniel, que também é meu melhor amigo, por toda ajuda no inglês dos
9 artigos.

10 A minha namorada Lara, que sempre me apoiou e fez meus dias melhores.

11 A Loyze Lima, minha melhor amiga que sempre me ajudou, inclusive nas discussões
12 desse trabalho.

13 Ao meu casal Dani e Roseira, cuja a relação é minha inspiração.

14 A todos os amigos da UEZO, em especial ao Thiago Alves, Felipe, Yago, Thamires e
15 Nayara.

16 Aos meus amigos da UENF, Thiago Torres e Fred, e em especial Tâmara que se tornou
17 uma verdadeira irmã pra mim.

18 Ao professor João Wanderley que me ajudou em todas as análises por citometria de
19 fluxo.

20 Ao professor Renato DaMatta, que sem o qual a realização desse trabalho não teria sido
21 possível e que sempre me ajudou em todos os aspectos.

22 Ao professor Sergio Seabra, quem me orientou e me ajudou na construção deste trabalho
23 e me iniciou na vida científica desde a graduação.

24

1	Sumário	
2		
3	Lista de abreviaturas.....	viii
4	Lista de figuras e tabelas.....	ix
5	Resumo	11
6	Abstract	12
7	1. Introdução	13
8	2. Revisão de Literatura.....	14
9	2.1. Malária.....	14
10	2.2. Classificação Taxonômica	15
11	2.3. Ciclo Biológico.....	15
12	2.3.1. Esporozoítos.....	16
13	2.3.2. Merozoíto	16
14	2.3.3. Gametócitos.....	18
15	2.3.4. Ciclo no hospedeiro invertebrado.....	18
16	2.4. Meios de Transmissão e Sintomatologia	20
17	2.5. Epidemiologia.....	21
18	2.6. Tratamento para Malária	23
19	2.7. <i>Plasmodium chabaudi</i>	24
20	2.8. <i>Plasmodium</i> e sua interação com fagócitos	27
21	2.9. Óxido nítrico na infecção por <i>P. chabaudi</i>.....	28
22	3. Objetivos.....	30
23	3.1. Objetivos gerais.....	30
24	3.2. Objetivos específicos	30
25	4. Trabalhos.....	31
26	4.1. Trabalho 1	31
27	4.2. Trabalho 2	58
28	5. Discussão	73
29	6. Conclusões	78
30	7. Referências	79
31		
32		

1 **Lista de abreviaturas**

2

3 **Abreviaturas na tese**

4 IFN- γ : interferon-gamma

5 NO: Óxido Nítrico

6 iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

7 nNOS: Óxido Nítrico Sintase Neuronal

8 eNOS: Óxido Nítrico Sintase Endotelial

9 LPS: Lipopolissacarídeo

10 PS: Fosfatidilserina

11 DNA: ácido desoxirribonucleico

12 TRAP: Proteínas Relacionadas à Trombospondina

13 ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

14 IFA: Ensaio de Imunofluorescência Indireta

15 RDT: Testes de Diagnóstico Rápido

16 STAT: Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição

17

18 **Abreviaturas nos trabalhos**

19 BSA: Bovine Serum Albumin

20 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

21 FBS: Fetal Bovine Serum

22 IFN- γ : Interferon γ

23 LPS: Lipopolysaccharide

24 PBS: Phosphate Buffered Saline

25 PI: Propidium Iodide

26 EGTA: Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyl ether) -N, N, N', N'-Tetraacetic Acid

27 DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

28

Lista de figuras e tabelas

Figura 1 - Merozoíto de <i>Plasmodium</i> spp.	8
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .	10
Figura 3 - Distribuição global de casos de Malária.	13
Tabela 1 – Comparação da patogenicidade de <i>Plasmodium chabaudi</i> em camundongos e infecções causadas por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> em humanos.	17
Figure 1 (trabalho 1) - Bright field microscopy of cytospin slides and flow cytometry of obtained <i>Plasmodium chabaudi</i> merozoites.	37
Figure 2 (trabalho 1) - Survival of mice infected with <i>Plasmodium chabaudi</i> .	38
Figure 3 (trabalho 1) - Transmission electronic microscopy images of filtered merozoites of <i>Plasmodium chabaudi</i> .	39
Figure 4 (trabalho 1) - Erythrocyte invasion assay with filtered merozoites of <i>Plasmodium chabaudi</i> .	40
Figure 5 (trabalho 1) - Bright field microscopy of Giemsa stained (A, C, E) and polarized light microscopy (B, D, F) of activated mice peritoneal macrophages infected with <i>Plasmodium chabaudi</i> filtered merozoites for 2 h (A, B), 24 h (C, D) and 48 h (E, F).	41
Figure 6 (trabalho 1) - Immunolocalization of <i>Plasmodium chabaudi</i> filtered merozoites after infection of activated mice peritoneal macrophages.	43
Figure 7 (trabalho 1) - Transmission electronic microscopy of activated macrophages infected for 24 h with <i>Plasmodium chabaudi</i> filtered merozoites.	44
Figure 1 (trabalho 2) - Phosphatidylserine exposure analysis of unfiltered (A, B, C) and filtered (D, E, F) <i>P. chabaudi</i> merozoites.	54
Figure 2 (trabalho 2) - Analysis of phosphatidylserine exposure of unfiltered (A) and filtered (B) <i>P. chabaudi</i> merozoites labeled with polyclonal anti-merozoite antibody.	55
Figure 3 (trabalho 2) - Analysis of nitric oxide (μM) production of activated macrophages after interaction with unfiltered (A) and filtered (B) merozoites for 24 h and 48 h.	56

Figure 4 (trabalho 2) - Immunolocalization of merozoites and iNOS after infection of activated mouse peritoneal macrophages.	57
Figure 5 (trabalho 2) - Analysis of lysosomal fusion to vacuoles containing parasite by labeling lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP-1) and merozoites.	58

1
2

1 **Resumo**

2 A malária é causada por parasitos apicomplexa do gênero *Plasmodium* e é um grande problema
3 mundial. Durante a infecção no estágio sanguíneo da malária, os merozoítos invadem os
4 eritrócitos. No entanto, merozoítos de *Plasmodium* spp. infectam outras células hospedeiras
5 além dos eritrócitos, como macrófagos. É possível que o sucesso da infecção de merozoítos
6 esteja relacionado com o mecanismo evasivo denominado mimetismo apoptótico. O mimetismo
7 apoptótico é a exposição de fosfatidilserina (PS) por células que não se encontram em estado
8 apoptótico e consiste em um mecanismo de evasão do sistema imune presente em pelo menos
9 3 protozoários parasitos. Nenhum método simples está disponível para obter merozoítos viáveis
10 e infectivos, restringindo a experimentação envolvendo células hospedeiras. Relatamos um
11 novo método para a obtenção de merozoítos de *P. chabaudi* egressos naturalmente de eritrócitos
12 infectados com formas esquizontes. Os merozoítos obtidos foram filtrados e sua viabilidade,
13 capacidade infectiva, ultraestrutura e exposição de PS foram analisadas. Os ensaios de interação
14 parasito-célula hospedeira foram realizados com eritrócitos de camundongos, células epiteliais
15 LLC-MK2 e macrófagos peritoneais de camundongos ativados classicamente. Os merozoítos
16 obtidos apresentaram excelente viabilidade, foram capazes de matar camundongos, infectaram
17 eficientemente os eritrócitos e foi observada uma relação inversamente proporcional entre a
18 porcentagem de eritrócitos infectados e a proporção de merozoítos:eritrócitos. Além disso,
19 cerca de 50% da população de merozoítos expõe PS. Merozoítos infectaram macrófagos
20 ativados, inibiram a sua produção de óxido nítrico (NO), um agente microbicida, e ainda assim
21 não persistiram nessas células; somente hemozoína foi detectada após 48 h de infecção. As
22 células LLC-MK2 não foram infectadas. Descrevemos um método simples e melhorado para
23 obter merozoítos viáveis e infectantes. Macrófagos ativados degradaram merozoítos, sugerindo
24 que essas células podem não servir como reservatórios para esses parasitos em uma infecção *in*
25 *vivo*. A exposição de PS por merozoítos é um forte indício que *P. chabaudi* realiza o mimetismo
26 apoptótico e reforça a nossa hipótese que esse mecanismo é comum em diversos protozoários
27 parasitos. Esses achados têm implicações importantes para a compreensão da biologia dos
28 merozoítos de *P. chabaudi* e podem melhorar a compreensão da relação parasito hospedeiro.

29

30 **Palavras chaves:** *Plasmodium chabaudi*, merozoítos, macrófagos, fosfatidilserina.

31

1 **Abstract**

2 Malaria is caused by apicomplexan parasites from *Plasmodium* genus and is a huge issue
3 worldwide. During the infection in the blood stage of malaria, merozoites invade erythrocytes.
4 *Plasmodium* spp. However, merozoites of *Plasmodium* spp. infect other host cells besides
5 erythrocytes, such as macrophages. It is possible that the merozoites infection success is related
6 to the evasive mechanism called apoptotic mimicry. The apoptotic mimicry is the
7 phosphatidylserine (PS) exposure by cells that are not in an apoptotic state and it is an evasive
8 mechanism found in at least 3 parasitic protozoa. No simple method is available to acquire
9 viable and infectious merozoites, restricting the experimentation with host cells. We presented
10 a new method to obtain *P. chabaudi* merozoites which were naturally egressed from
11 erythrocytes infected with schizont forms. The acquired merozoites were filtered and their
12 viability, infectious capacity, ultrastructure and PS exposure were analyzed. Interaction essays
13 were performed with mice erythrocytes, LLC-MK2 cells and classically activated peritoneal
14 macrophages of mice. The obtained merozoites showed excellent viability, were capable of
15 killing mice, infected erythrocytes effectively and an inversely proportional relation between
16 the percentage of infected erythrocytes and the proportion of merozoites:erythrocytes was
17 observed. About 50% of the merozoite population exposed PS. Merozoite infected activated
18 macrophages, modulated their nitric oxide (NO) production), a microbicidal agent, and did not
19 persist in these cells; only hemozoin was detected after 48 h of infection. LLC-MK2 cells were
20 not infected. We described a simple and improved method for obtaining viable and infectious
21 merozoites. Activated macrophages degraded merozoites, suggesting that these cells may not
22 work as reservoirs for these parasites in an *in vivo* infection. PS exposure by merozoites is a
23 strongly suggestion that *P. chabaudi* may realize apoptotic mimicry and reinforces our
24 hypothesis that this mechanism is common in several parasitic protozoa. These findings have
25 important implications for the comprehension of the *P. chabaudi* merozoites biology and can
26 improve the comprehension of the host-parasite relationship.

27

28 **Keywords:** *Plasmodium chabaudi*, merozoites, macrophages, phosphatidylserine.

29

1 1. Introdução

2 A malária é uma infecção parasitária causada por protozoários intracelulares
3 pertencentes ao gênero *Plasmodium*. Existem cerca de 150 espécies de *Plasmodium* causadores
4 da malária em diferentes hospedeiros vertebrados, como répteis, aves, roedores e primatas
5 (Moore *et al.* 2002), porém apenas seis espécies causam a doença em seres humanos:
6 *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*,
7 *Plasmodium knowlesi* (Richards & Beeson 2009; White 2008) e *Plasmodium simium* (Brasil *et*
8 *al.* 2017). Em termos de virulência e mortalidade, a espécie *P. falciparum* é a mais importante
9 (Wiesner *et al.* 2003).

10 Devido aos empecilhos inerentes ao trabalho experimental com a malária humana,
11 diversos modelos animais são utilizados, contribuindo para a compreensão da doença e seu
12 tratamento. A infecção em camundongos por *P. chabaudi* é um dos modelos que mais se
13 aproxima da doença em humanos causada por *P. falciparum* (Cox *et al.* 1987). *Plasmodium*
14 *chabaudi* infecta roedores (Stephens *et al.* 2012), sendo o modelo de malária escolhido nessa
15 tese.

16 Atualmente o tratamento da malária é baseado em fármacos antimaláricos, que podem
17 ser produtos naturais ou compostos sintéticos. São específicos para cada etapa do ciclo de vida
18 do parasita, podem atuar contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos em uma
19 espécie, porém totalmente ineficazes contra outras (Franca *et al.* 2008). A falta de métodos
20 adequados para se obter certas formas de parasito é um grande empecilho que vem dificultando
21 o desenvolvimento de novas terapias ou vacinas (Boyle *et al.* 2010). No ciclo eritrocítico da
22 malária, acreditava-se que o eritrócito era a única célula hospedeira capaz de suportar a
23 replicação e liberação de merozoítos de *Plasmodium* spp. Entretanto, esses parasitos
24 apresentam um ciclo de vida mais complexo na fase sanguínea, envolvendo outras células
25 hospedeiras (Mac-Daniel & Menard 2015). Merozoítos liberados no sangue naturalmente
26 infectam eritrócitos mas invadem e se replicam em outras células nos modelos aviários (Huff
27 1957) e murinos (Wykes *et al.* 2011; Gueirard *et al.* 2010), incluindo macrófagos (Landau *et*
28 *al.* 1999). Landau *et al.* 1999 reportaram a presença de 4 a 32 merozoítos em macrófagos e
29 neutrófilos do baço e fígado em camundongos infectado. Sugeriu-se então que macrófagos
30 poderiam servir como célula reservatório, sendo uma peça chave para a sobrevivência do
31 parasito e reinfeção do hospedeiro (Landau *et al.* 1999).

32 Macrófagos residentes são ativados por citocinas pró-inflamatórias, como interferon-
33 gamma (IFN- γ) produzindo NO, um agente microbicida, que é catalisado pela NO sintase
34 induzível (iNOS) (Gregory & Olivier 2005). Macrófagos peritoneais de camundongo ativados

1 com IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS) expressam altos níveis de iNOS (Stuehr & Marletta
2 1987) e, conseqüentemente, produzem níveis elevados de NO (Vespa *et al.* 1994). Esses
3 macrófagos são denominados de “classicamente ativados” e controlam o crescimento de
4 protozoários patogênicos intracelulares (Mills 2012).

5 Foi demonstrado que macrófagos infectados com os protozoários parasitos *Leishmania*
6 *amazonenses* (de Freitas Balanco *et al.* 2001), *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al.* 2004) e
7 *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al.* 2007) tem a produção de NO inibida. Essa inibição é
8 explicada por um dos mecanismos evasivos destes protozoários que consiste na exposição de
9 fosfatidilserina (PS) (Barcinski *et al.* 2003). A PS é um fosfolípídeo presente em membranas
10 biológicas, e na membrana plasmática de células vivas normalmente está voltada para o meio
11 intracelular (Wanderley *et al.* 2020). No entanto, com a morte celular programada por apoptose
12 ocorre a exposição de PS, que passa a ser o principal ligante envolvido no reconhecimento de
13 células apoptóticas por macrófagos gerando resposta anti-inflamatória (Fadok *et al.* 2001). A
14 exposição da PS por tais protozoários enquanto estão viáveis consiste em um mecanismo de
15 evasão denominado “mimetismo apoptótico” (Barcinski *et al.* 2003; de Freitas Balanco *et al.*
16 2001; Wanderley *et al.* 2020).

17 O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia simples e eficiente para a
18 obtenção de merozoítos de *P. chabaudi*, caracterizá-los e estudar sua interação com eritrócitos
19 e macrófagos. Com os resultados obtidos, conseguimos melhor entender a biologia de
20 merozoíto desse parasito quando infecta células hospedeiras. O conhecimento gerado por esse
21 estudo é importante para ajudar na elucidação do mecanismo pelo qual merozoítos de
22 *Plasmodium* spp. sobrevivem em macrófagos de baço e fígado (Landau *et al.* 1999).
23 Acreditamos que os resultados descritos nessa tese são importantes para a compreensão da
24 biologia dos merozoítos de *P. chabaudi* e podem ajudar a entender a relação do parasito com o
25 hospedeiro.

27 **2. Revisão de Literatura**

28 **2.1. Malária**

29 A malária, também conhecida como paludismo, impaludismo, febre palustre, maleita ou
30 sezão, foi primeiramente citada na era pré-Cristã por Hipócrates. Foi ele quem descreveu suas
31 características, como: sua ocorrência sazonal e a febre com padrão paroxístico e intermitente.
32 Entretanto, somente no início do século XIX que o termo malária teve origem, baseado na
33 expressão “mal aria”, que significa “mau ar”, pois acreditava-se que a doença era causada pelos
34 vapores nocivos que exalavam dos pântanos tiberianos (Krotoski *et al.* 1982). Em 1880,

1 Laveran descreveu o agente etiológico da malária, ao observar organismos em movimento
2 examinando a fresco o sangue de um paciente infectado com malária. Em 1884, Gerhardt
3 confirmou que a malária era causada por uma hemoparasitose, ao conseguir reproduzir a doença
4 a partir de transfusão de sangue infectado. Golgi *et al.* (1885) descreveram o ciclo assexuado
5 do parasito, e em 1892, a morfologia dos parasitos sanguíneos foi demonstrada através do
6 método de esfregaços corados, desenvolvido por Romanowsky. Também em 1892, o estágio
7 final do ciclo e a presença de estágios latentes no fígado foi demonstrado (Krotoski *et al.* 1982).
8 Em 1897, MacCallum descobriu os estágios sexuais do parasito no sangue e Ross descobriu
9 oocistos no estômago de mosquitos que haviam se alimentado de sangue de pacientes infectados
10 com malária. Com base nesses estudos, em 1898 e 1899, foi elucidado o desenvolvimento
11 completo do ciclo de vida de três espécies de *Plasmodium* que infectam humanos em mosquitos
12 anofelinos. A descoberta de que os parasitos da malária se desenvolvem no fígado antes de
13 entrar na corrente sanguínea foi feita por Shortt e Garnham em 1948 (Cox 2010).

14 De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a malária é uma das doenças
15 parasitárias mais prevalentes nos países tropicais, especialmente na África Ocidental, Sudeste
16 Asiático e América Latina (WHO 2000). O padrão global de transmissão da malária sugere uma
17 doença centrada nos trópicos, mas com um alcance em regiões subtropicais em cinco
18 continentes, porém, as taxas de transmissão são notavelmente mais altas na África Subsaariana
19 (WHO 2016). Cerca de 30 espécies de *Plasmodium* são capazes de infectar primatas, excluindo
20 o ser humano (Baird 2009; Sachs & Malaney 2002). Somente seis espécies de *Plasmodium* são
21 capazes de infectar seres humanos (Brasil *et al.* 2017; Richards and Beeson 2009; White 2008).

22

23 **2.2. Classificação Taxonômica**

24 *Plasmodium* é um parasito pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa, ordem
25 Eucoccidiida, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. O inseto vetor da doença, pertence
26 ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae, gênero
27 *Anopheles* (Stephens *et al.* 2012).

28

29 **2.3. Ciclo Biológico**

30 *Plasmodium* é um gênero de parasitos unicelulares, causadores da malária em seus
31 hospedeiros. O parasito sempre tem dois hospedeiros em seu ciclo de vida: um inseto Dipterano
32 e um hospedeiro vertebrado (Vaughan *et al.* 2008).

33 A infecção no vertebrado se inicia com a picada do mosquito anofelino, onde os
34 esporozoítos são introduzidos na pele. Após a deposição intradérmica, alguns esporozoítos são

1 destruídos pelos macrófagos locais, alguns entram nos vasos linfáticos e outros vão para a
2 corrente sanguínea (Silvie *et al.* 2008; Yamauchi *et al.* 2007). Os esporozoítos que entram em
3 um vaso linfático atingem o nódulo linfático drenante, onde alguns dos esporozoítos se
4 desenvolvem parcialmente em estágios exoeritrocíticos (Good & Doolan 2007).

6 **2.3.1. Esporozoítos**

7 Os esporozoítos que encontram um vaso sanguíneo chegam ao fígado em minutos. Os
8 esporozoítos movem-se por uma sequência contínua de motilidade cola-desliza (*stick-slip*),
9 usando uma família de proteínas relacionadas à trombospondina (TRAP) e também um motor
10 de actina-miosina (Baum *et al.* 2006; Munter *et al.* 2009). Os esporozoítos atravessam os
11 sinusóides hepáticos e infectam hepatócitos, se multiplicando dentro de vacúolos parasitóforos.
12 Cada esporozoíto se desenvolve em um esquizonte gerando entre 10.000-30.000 merozoítos,
13 ou mais no caso de infecção por *P. falciparum* (Amino *et al.* 2006; Jones & Good 2006; Kebaier
14 *et al.* 2009). O crescimento e desenvolvimento do parasito em células hepáticas são facilitados
15 por um ambiente favorável proporcionado pela proteína circumsporozoíta do parasito
16 (Prudencio *et al.* 2006; Pukrittayakamee *et al.* 2008). Toda a fase pré-eritrocítica possui duração
17 de cerca de 5 a 16 dias, dependendo da espécie do parasito. A fase pré-eritrocítica é uma fase
18 silenciosa, com pouca patologia e sem sintomas, pois apenas alguns hepatócitos são afetados.
19 Esta fase também é um ciclo único, ao contrário do próximo estágio eritrocítico que ocorre
20 repetidamente (Parham & Michael 2010; Vaughan *et al.* 2008).

21 **2.3.2. Merozoíto**

22 Os merozoítos (figura 1) que se desenvolvem dentro dos hepatócitos estão contidos em
23 vesículas denominadas merosomas que permanecem intactas ao deixar a célula, protegendo
24 essas formas da fagocitose pelas células de Kupffer (macrófagos do fígado). Estes merozoítos
25 são eventualmente liberados dos merosomas na corrente sanguínea e iniciam o estágio
26 sanguíneo da doença com a infecção de eritrócitos (Silvie *et al.* 2008). Em infecções por *P.*
27 *vivax* e *P. ovale*, alguns dos esporozoítos podem permanecer dormentes durante meses no
28 fígado. Chamados de hipnozoítos, essas formas se desenvolvem em esquizontes após um
29 período de latência, geralmente de algumas semanas ou meses (Cogswell 1992; Collins 2007).

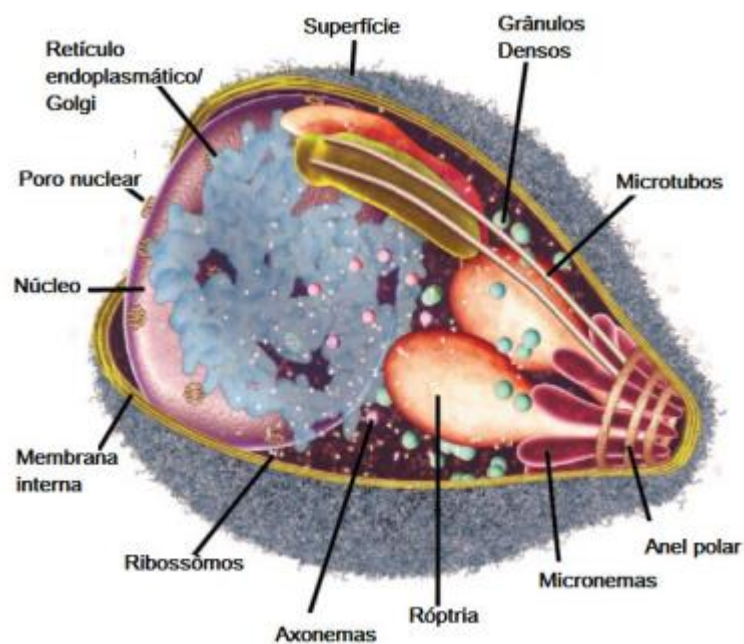


Figura 1 – Merozoíto de *Plasmodium* spp. A principal característica dessa forma é a presença de um complexo apical na região anterior do corpo alongado e tem a função de fixação e invasão de células hospedeiras (Traduzido de Cowman *et al.* 2012).

Dentro dos eritrócitos ocorrem ciclos repetidos de desenvolvimento parasítico com periodicidade precisa e, no final de cada ciclo, liberam-se centenas de merozoítos que invadem mais eritrócitos. Os merozoítos reconhecem, fixam e entram nos eritrócitos por múltiplas interações receptor-ligante em apenas 60 segundos. Este rápido desaparecimento da circulação para dentro dos eritrócitos minimiza a exposição dos antígenos na superfície do parasito, protegendo-os assim da resposta imune humoral do hospedeiro (Cowman & Crabb 2006; Greenwood *et al.* 2008). A invasão dos merozoítos nos eritrócitos é facilitada por interações moleculares entre ligantes distintos dos parasitos e receptores na membrana dos eritrócitos (Mayer *et al.* 2009; Weatherall *et al.* 2002).

Merozoítos de *P. vivax* invadem exclusivamente reticulócitos, enquanto merozoítos de *P. falciparum* invadem eritrócitos e reticulócitos, ainda que apresentem preferência por eritrócitos jovens. Merozoítos de *P. vivax* somente parasitam reticulócitos que expressam o grupo sanguíneo Duffy, que serve como ligante para uma molécula que os merozoítos expressam em sua superfície. Portanto, indivíduos Duffy negativos (frequentemente encontrados na África Ocidental) são imunes à infecção sanguínea por *P. vivax* (Greenwood *et al.* 2008; Mayer *et al.* 2009). *P. falciparum* utiliza diversos receptores de eritrócitos para invadi-los; glicoforina A é o principal, mas eritrócitos que expressam formas variantes ou defeituosas de glicoforina A não são resistentes à infecção. Na superfície do merozoíto, diversas moléculas são capazes de exercer o papel de ligantes de receptores eritrocitários; a molécula parasitária provavelmente

1 mais relevante nessa função é conhecida como EB A-175 (antígeno de ligação a eritrócitos)
2 (Bargieri *et al.* 2012).

3 O processo de ligação, invasão e estabelecimento do merozoíto no eritrócito é
4 possibilitado por organelas especializadas do merozoíto. A interação inicial entre o parasito e
5 os eritrócitos estimula uma deformação em toda a membrana dos eritrócitos, levando à
6 formação de uma junção estável entre as células do parasito e a do hospedeiro. Em seguida, o
7 parasito atravessa a bicamada lipídica do eritrócito com a ajuda do motor de actina-miosina,
8 proteínas relacionadas à TRAP e aldolase mantendo parte da membrana plasmática e criando
9 um vacúolo parasitóforo. Esse vacúolo mantém o parasito no citoplasma da célula hospedeira
10 em um ambiente favorável para o seu desenvolvimento. Nesta fase, o parasito aparece com
11 formato de um anel intracelular (Bosch *et al.* 2007; Cowman & Crabb 2006; Haldar &
12 Mohandas 2007; Matz *et al.* 2020).

13 O ciclo eritrocítico ocorre a cada 24 h nos casos de *P. knowlesi*, 48 h nos casos de *P.*
14 *falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 h no caso de *P. malariae*. Durante cada ciclo, merozoítos
15 se desenvolvem na sequência dos seguintes estágios: trofozoíto jovem (anel), trofozoíto e
16 esquizonte; ao final, de 8 a 32 merozoítos podem ser gerados, dependendo da espécie. No final
17 do ciclo, os eritrócitos infectados se rompem, liberando novos merozoítos que, por sua vez,
18 infectam mais eritrócitos. Com o crescimento desenfreado, o número de parasitos pode subir
19 rapidamente para níveis bastante elevados (Greenwood *et al.* 2008).

20

21 **2.3.3. Gametócitos**

22 Uma pequena porção de parasitos assexuados não sofre esquizogonia, mas se diferencia
23 em gametócitos. Gametócitos masculinos e femininos não são patogênicos, mas são cruciais
24 para o ciclo sexuado no mosquito vetor (Miller *et al.* 2002; Pukrittayakamee *et al.* 2008).

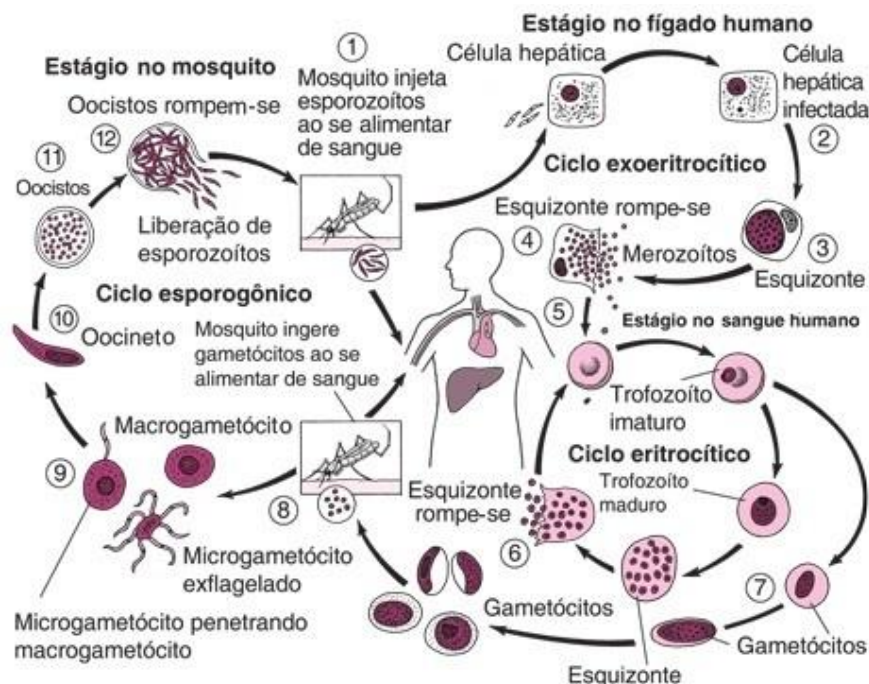
25 Durante o repasto sanguíneo, o anofelino ingere as formas sanguíneas do parasito, mas
26 somente os gametócitos são capazes de evoluir no inseto, originando o ciclo sexuado ou
27 esporogônico. No intestino médio do mosquito, fatores como temperatura e pH estimulam o
28 processo de gametogênese, no qual gametócitos se transformam em gametas extracelulares
29 (Neves 2004).

30

31 **2.3.4. Ciclo no hospedeiro invertebrado**

32 Após a fecundação dos gametas extracelulares é formado um ovo ou zigoto. Este migra
33 para a parede do intestino médio, encistando na camada epitelial do órgão, sendo chamado de
34 oocisto. Inicia-se, então, o processo de divisão esporogônica. Após esse processo, ocorre a

1 ruptura da parede do oocisto, liberando os esporozoítos. Estes são disseminados pelo corpo do
 2 inseto através da hemolinfa até atingir o canal central das glândulas salivares ingressando no
 3 duto salivar para serem injetados no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva (Cowman
 4 *et al.* 2012). O ciclo de vida de *Plasmodium* envolve dois hospedeiros (figura 2). O ciclo
 5 assexuado ocorre no hospedeiro vertebrado, e o ciclo sexuado ocorre no mosquito que é,
 6 portanto, o hospedeiro definitivo (Blackman 2004).



7

8 **Figura 2 - Ciclo de vida do *Plasmodium*.** 1- Mosquito fêmea do gênero *Anopheles* spp. pica o
 9 hospedeiro injetando esporozoítos, existentes em suas glândulas salivares, na corrente
 10 sanguínea. 2- No fígado, infectam hepatócitos e se reproduzem assexuadamente (3).
 11 Hepatócitos infectados se rompem e liberam merozoítos (4) que infectam eritrócitos (5), onde
 12 novamente se reproduzem assexuadamente por esquizogonia. Após este processo, rompem a
 13 membrana celular (6) e infectam outros eritrócitos no chamado "ciclo eritrocítico",
 14 eventualmente se diferenciando em gametócitos (7). Esse ciclo se completa quando um
 15 mosquito não infectado realiza o repasto em um hospedeiro infectado, e ingere os gametas do
 16 protozoário (8) que se reproduzem sexuadamente no tubo digestório do mosquito (9), dando
 17 origem a um oocineto que migra para a parede do estômago do inseto (10). No estômago do
 18 inseto ainda acontece novamente reprodução assexuada dentro de oocistos (11), e os parasitos
 19 resultantes migram para as glândulas salivares do inseto (12) de onde irão infectar novos
 20 hospedeiros picados pelo mosquito. (Reproduzida a partir do site MSD Manuals).

21

22 O mosquito infectado e o parasito se beneficiam mutuamente e, assim, promovem a
 23 transmissão da infecção. Os mosquitos infectados com *Plasmodium* têm uma melhor
 24 sobrevivência e mostram uma taxa aumentada de alimentação de sangue (Ferguson & Read
 25 2004).

26

2.4. Meios de Transmissão e Sintomatologia

A malária é transmitida em 108 países habitados por cerca de 3 bilhões de pessoas. É uma doença protozoária principalmente transmitida através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, embora casos de contaminação por transfusão sanguínea e transplante de órgãos tenham sido relatados (Alkhunaizi *et al.* 2008). Existem cerca de 20 espécies diferentes de mosquitos deste gênero que são localmente importantes ao redor do mundo. A transmissão ocorre de maneira mais intensa em locais onde o tempo de vida do mosquito é mais longo, de modo que o parasito possui mais tempo para completar o seu desenvolvimento dentro do mosquito. Seis espécies do gênero *Plasmodium* causam todas as infecções de malária em seres humanos. A maioria dos casos são causados por *P. falciparum* ou *P. vivax*, mas infecções humanas também podem ser causadas por *P. ovale* e *P. malariae*, e em algumas partes do sudeste da Ásia, por *P. knowlesi*. Ainda não existem estudos suficientes de casos causados por *P. simium*. Quase todas as mortes são causadas pela infecção por *P. falciparum* (White *et al.* 2014). A doença também pode ser adquirida por meio do contato direto com o sangue de uma pessoa infectada, como por exemplo, em transfusões sanguíneas ou transplante de órgãos ou ainda pelo compartilhamento de seringas (Alkhunaizi *et al.* 2008).

Os primeiros sintomas da malária, comuns a todas as diferentes espécies de *Plasmodium*, são inespecíficos e similares aos de infecções virais comuns (Cullen *et al.* 2014). Os sinais e sintomas da malária são variados, mas a maioria dos pacientes apresentam febre. Até dois dias antes do início da febre, sintomas prodrômicos, como mal-estar, anorexia, fadiga e tonturas podem ser experimentados. Outros sintomas comuns incluem dor de cabeça, dor nas costas e articulações, calafrios, sudação aumentada, mialgia, náuseas, vômitos, diarreia, tosse, anemia hemolítica, icterícia, hemoglobinúria e convulsões. A febre geralmente é irregular no início e a temperatura aumenta, apresentando tremores e calafrios moderados. Após alguns dias, a febre tende a tornar-se periódica (Bartoloni & Zammarchi 2012; Beare *et al.* 2006).

O sintoma clássico da malária são ataques paroxísticos, a ocorrência cíclica de uma sensação súbita de frio intenso seguida por calafrios e posteriormente febre e sudação. Estes sintomas ocorrem a cada dois dias em infecções por *P. vivax* e *P. ovale* e a cada três dias em infecções por *P. malariae*. A infecção por *P. falciparum* pode provocar febre recorrente a cada 36-48 h ou febre menos aguda, mas contínua (Post 2010). A malária severa pode apresentar diversas complicações, entre elas, distúrbios respiratórios, edema pulmonar, febre da água negra (hemólise causa insuficiência renal devido a hemoglobina liberada na corrente sanguínea), malária cerebral, hipoglicemia, insuficiência renal aguda, anemia grave, hemorragia, acidose metabólica, esplenomegalia, e em casos de malária em gestantes, morte do

1 feto ou peso inferior a 2,5kg ao nascer (Bartoloni & Zammarchi 2012; Beare *et al.* 2006;
2 Hartman *et al.* 2010).

3 Quase todas as formas graves e mortes por malária são causadas por *P. falciparum*.
4 Raramente, *P. vivax* ou *P. ovale* produzem complicações sérias, recaídas debilitantes ou morte.
5 Qualquer uma das complicações da malária severa podem se desenvolver rapidamente e
6 progredir até a morte dentro de horas ou dias. Em muitos pacientes, várias dessas complicações
7 coexistem ou evoluem em rápida sucessão em poucas horas (Trampuz *et al.* 2003). O
8 diagnóstico de malária deve sempre ser considerado para pessoas que apresentam esses
9 sintomas e que viajaram para uma área de transmissão conhecida da doença. A malária também
10 deve ser considerada no diagnóstico diferencial de pessoas com febre de origem desconhecida,
11 independentemente do histórico de viagem (Cullen *et al.* 2014).

12 A patogênese da infecção por malária em humanos depende de diversos fatores, mas é
13 centrado na ocorrência de três eventos primordiais: anemia malarial grave, induzida pela
14 resposta imune (Lamikanra *et al.* 2007), sequestro de eritrócitos infectados para células
15 endoteliais ativadas (Heddini *et al.* 2001) e acidose metabólica (Mackintosh *et al.* 2004). A
16 malária severa causada por *P. falciparum* tem como característica o acúmulo ou sequestro de
17 glóbulos vermelhos infectados com o parasito. Esses processos podem afetar diversos tecidos,
18 como: cérebro, pulmão ou placenta na infecção durante a gravidez. Os mesmos são dependentes
19 de fatores específicos do hospedeiro e do parasito (Beeson & Brown 2002; Miller *et al.* 2002).

20 A malária pode ser diagnosticada por meio de análises clínicas baseadas na
21 sintomatologia do paciente, neste caso os critérios da Organização Mundial da Saúde para o
22 diagnóstico consideram dois aspectos-chave da patologia da doença: febre e presença de
23 parasitos. Parasito é visualizado por meio de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, ou
24 sorologia por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Ensaio de Imunofluorescência
25 Indireta (IFA) e Testes de Diagnóstico Rápido (RDT). Os casos podem ser classificados como
26 confirmados ou suspeitos e são categorizados adicionalmente pela espécie infectante. Quando
27 mais de uma espécie é detectada, o caso é categorizado como uma infecção mista (Cullen *et al.*
28 2014; Wongsrichanalai *et al.* 2007).

29

30 **2.5. Epidemiologia**

31 A malária é uma das principais causas de doenças infecciosas com distribuição mundial
32 (figura 3). Em 2016, estima-se que 216 milhões de casos de malária ocorreram em todo o
33 mundo. Em comparação com 2015, onde ocorreram 211 milhões de casos. A maior parte dos
34 casos reportados em 2016 ocorreram na Região Africana (90%), seguida da Região do Sudeste

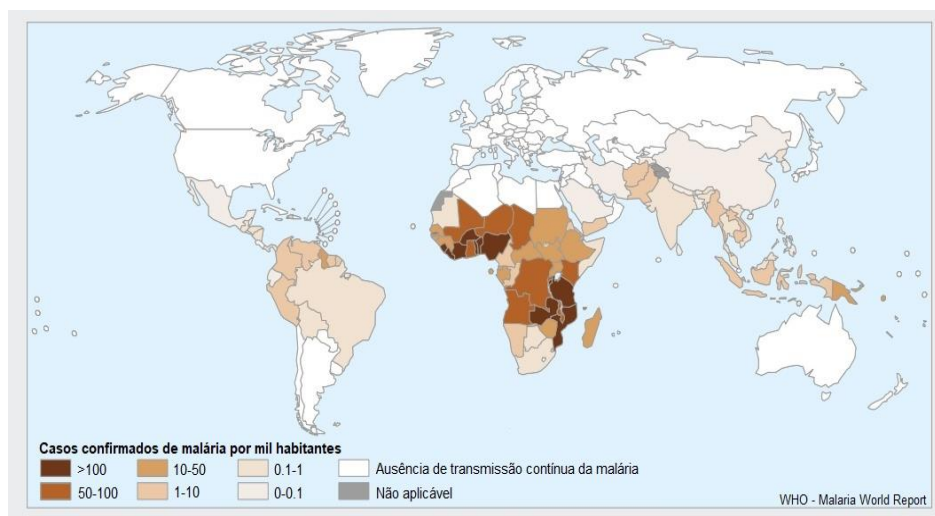
1 Asiático (7%) e da Região do Mediterrâneo Oriental (2%) (WHO 2016). Estima-se que 445.000
2 mortes ocorreram globalmente, das quais aproximadamente 90% foram na Região Africana
3 (Arab *et al.* 2014).

4 Alguns grupos populacionais correm um risco consideravelmente maior de contrair
5 malária e desenvolver a forma severa da doença. Estes incluem bebês, crianças menores de 5
6 anos, mulheres grávidas e portadores de HIV, bem como migrantes não imunes, populações
7 móveis e viajantes. Em áreas com alta transmissão de malária, crianças menores de 5 anos são
8 particularmente suscetíveis a infecção e a morte, cerca de 70% de todas as mortes por malária
9 ocorrem nesta faixa etária (WHO 2000). A malária continua a ser uma das doenças que mais
10 mata crianças menores de 5 anos, onde uma criança morre a cada 2 minutos (WHO 2016).

11 As espécies causadoras de malária no Brasil são: *P. vivax*, responsável por cerca de 85%
12 dos casos registrados, *P. falciparum*, que causa aproximadamente 15% e *P. malariae*,
13 responsável por uma mínima porcentagem dos casos (Costa *et al.* 2010). Não há transmissão
14 autóctone de *P. ovale* e *P. knowlesi* (Oliveira-Ferreira *et al.* 2010). Ainda não existem estudos
15 suficientes sobre *P. simium*.

16 Fatores demográficos e variáveis ambientais como temperatura, umidade, chuva e
17 velocidade do vento afetam a incidência da malária, seja através de mudanças na duração do
18 ciclo de vida do mosquito e do parasito ou influências no comportamento humano, vetor ou
19 parasitário (Kelly-Hope *et al.* 2009; Parham & Michael 2010). Os vetores transmissores da
20 malária estão presentes em 80% do território brasileiro. Portanto, a área receptiva para
21 transmissão da doença é bastante extensa. A Amazônia apresenta condições climáticas,
22 ambientais e ecológicas muito favoráveis à transmissão da malária (Oliveira-Ferreira *et al.*
23 2010).

24



25

1 **Figura 3 - Distribuição global de casos de Malária.** A incidência de casos da malária se
2 concentra na América Latina, Ásia, Oriente Médio e principalmente no continente Africano
3 (Adaptado de WHO - Malaria World Report, 2016).
4

5 Os métodos de prevenção e controle recomendados globalmente para diminuição do
6 número de casos são as quatro principais ferramentas de controle da malária: mosquiteiros
7 tratados com inseticida de longa duração, pulverização residual interna, tratamento presuntivo
8 intermitente de mulheres grávidas e tratamento com medicamentos eficazes, principalmente a
9 terapia combinada à base de artemisinina (Otten *et al.* 2009).
10

11 **2.6. Tratamento para Malária**

12 Fármacos antimaláricos têm sido utilizados desde antes da Era Cristã, onde os chineses
13 já tratavam a malária com uma preparação que consistia na raiz pulverizada da planta *Dichroa*
14 *febrifuga*, cujo princípio ativo é o alcaloide febrifugina. Antes da chegada dos europeus ao
15 continente americano, os índios peruanos usavam a casca da quina (*Cinchona calisaya*) para o
16 tratamento da malária. Em 1820, Pelletier e Caventou, isolaram a substância ativa da casca da
17 quina, o alcaloide quinina (Foley & Tilley 1998).

18 Cinco anos antes da II Guerra Mundial, foi concebida a cloroquina, o primeiro exemplo
19 de 4-aminoquilonina antimalárica. Na década de 40 passou a ser utilizada no tratamento e
20 profilaxia da malária. Porém, na década de 60 detectou-se vários casos de resistência ao fármaco
21 na África, Ásia e América do Sul (Taylor & White 2004).

22 Atualmente os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos
23 sintéticos produzidos a partir da década de 40 (Wiesner *et al.* 2003). Estes são específicos para
24 cada etapa do ciclo de vida de *Plasmodium*. Existem antimaláricos eritrocíticos, que atuam nas
25 formas presentes nos eritrócitos do homem, os antimaláricos gametocíticos que matam as
26 formas sexuadas do parasito (gametócitos) no indivíduo infectado, de forma que quando este é
27 picado por outro mosquito evita-se que ocorra a transmissão da doença para o inseto e assim a
28 disseminação da doença para outras pessoas e, por último, os antimaláricos esporontocidas, que
29 atuam contra os esporozoítos e são capazes de matar os parasitos assim que eles entram na
30 corrente sanguínea, após a picada do mosquito (Taylor & White 2004).

31 Entre os principais antimaláricos está a quinina, que faz parte da família das quinolinas,
32 são compostos ativos contra formas eritrocíticas de *P. falciparum* e *P. vivax*. O mais eficaz
33 entre estes fármacos foi a cloroquina, um dos antimaláricos mais utilizados para a eliminação e
34 profilaxia da malária em diversas regiões endêmicas. Foi o fármaco mais utilizado até o
35 surgimento da resistência pelo parasito (Robert *et al.* 2001). A estratégia de profilaxia com
36 cloroquina induziu a resistência do *Plasmodium* ao fármaco, que ocorre na maioria dos países

1 endêmicos. A cloroquina atua como um agente esquizonticida por inibir o processo de formação
2 de hemozoína e é raro o aparecimento de efeitos colaterais sérios no tratamento profilático da
3 doença (Gregson & Plowe 2005). Hemozoína é um produto resultante da quebra da
4 hemoglobina presente em eritrócitos em um grupo *heme* e aminoácidos livres. Esse grupo *heme*
5 induz a produção de radicais livres e por isso, o parasito transforma em um cristal conhecido
6 como hemozoína (Wendt *et al.* 2016). A formação de hemozoína é um processo essencial para
7 a sobrevivência do parasito e por isso a inibição desse processo é um alvo de muitas drogas
8 anti-malária (Weissbuch & Leiserowitz 2008).

9 Em 1972, foi isolada a artemisinina, que provém da planta *Artemisia annua* (Li & Wu
10 2003). É principalmente um esquizonticida sanguíneo com ação rápida e mais potente que a
11 cloroquina e quinina. Foi utilizada como base para concepção de diversos derivados
12 artemisínicos caracterizados por rápida absorção oral e boa distribuição tecidual. É o agente
13 antimalárico de ação mais rápida, provocando melhoras significativas no estado febril em cerca
14 de 32 h (Robert *et al.* 2001). A artemisinina e seus derivados também são gametocidas, logo,
15 bloqueiam a propagação da doença. Uma alternativa para potencializar a ação dos fármacos
16 artemisínicos, consiste na sua combinação com outros antimaláricos de ação lenta e meia vida
17 longa, visando a redução da duração do tratamento e do desenvolvimento de resistência por
18 parte do parasito (Giao & de Vries 2001; Wiesner *et al.* 2003).

19 Embora existam várias drogas aprovadas para o seu tratamento, a resistência aos
20 antimaláricos tem comprometido a maioria delas, tornando indispensável o desenvolvimento
21 de novos medicamentos para o tratamento e prevenção da malária. O conhecimento do genoma
22 de *P. falciparum* e o crescimento da compreensão da biologia parasitária fomentam a busca de
23 novos alvos para drogas (Phillips & Rathod 2010).

24 A complexidade do ciclo de vida do parasito explica as grandes dificuldades para
25 estabelecer uma terapia antimalárica eficaz e segura. O desenvolvimento de um fármaco
26 antimalárico ideal pressupõe a existência de atividade antiparasitária ótima e o mínimo de
27 efeitos adversos para o paciente (Franca *et al.* 2008). A falta de uma metodologia simples e
28 eficiente para a obtenção de merozoítos de *Plasmodium* spp. tem sido um empecilho no
29 desenvolvimento de novos fármacos e vacinas (Wykes *et al.* 2011).

30 31 **2.7. *Plasmodium chabaudi***

32 Embora várias espécies de *Plasmodium* spp. que infectam roedores difiram em suas
33 características de ciclo de vida, há uma significativa conservação das características genéticas
34 e fenotípicas entre esses parasitos e os que infectam o homem, tornando-os atraentes como

1 modelos para malária humana (Stephens *et al.* 2012; Walliker *et al.* 1971). Um dos atributos
2 mais interessantes de *Plasmodium chabaudi* é a variedade de linhas clonadas bem
3 caracterizadas (Carter 1978). Estas linhas são todas síncronas e exibem um espectro de
4 severidade da doença, diferentes níveis de sequestro e transmissibilidade à mosquitos (Bell *et*
5 *al.* 2006; Gadsby *et al.* 2009; Gilks *et al.* 1990). *P. chabaudi* possui como características: fase
6 de anel com tamanho reduzido, vacúolo central e um núcleo alongado que muitas vezes é
7 dividido em 2 ou até 3 fragmentos, anéis accolé frequentes, trofozoítos podem mostrar
8 pseudópodes finos e, às vezes, assumir uma forma de banda. O núcleo se divide em grandes
9 fragmentos, e o esquizonte maduro, com 4-14 merozoítos, ocupa dois terços do total do
10 eritrócito (Landau 1965).

11 Diferentes espécies de *Plasmodium* invadem eritrócitos em estágios específicos de
12 desenvolvimento, a disponibilidade do tipo preferencial de eritrócitos determina grande parte
13 da dinâmica da infecção. Como *P. falciparum*, *P. chabaudi* invade tanto os normócitos quanto
14 os reticulócitos. Entretanto, diferentemente de outras espécies, os eritrócitos infectados por *P.*
15 *chabaudi* aderem às células endoteliais do hospedeiro no estágio esquizonte e a eritrócitos não
16 infectados (Cox *et al.* 1987; Gilks *et al.* 1990; Mackinnon *et al.* 2002).

17 Camundongos infectados com *P. chabaudi* apresentam uma série de sintomas que tem
18 início na fase aguda da doença (Cross & Langhorne 1998). Em contraposição à malária em
19 humanos, onde a esquizogonia leva à febre, camundongos infectados por *P. chabaudi*
20 desenvolvem hipotermia (Stephens *et al.* 2012). Anemia ocorre em indivíduos infectados com
21 malária devido a uma combinação de morte dos eritrócitos infectados, supressão da
22 eritropoiese, depuração de eritrócitos não infectados via fagocitose por macrófagos do baço e
23 fígado e desenvolvimento anormal de eritrócitos (Lamikanra *et al.* 2007). Esses mesmos
24 processos têm sido mostrados em camundongos infectados por *P. chabaudi* (Belyaev *et al.*
25 2010; Mohan & Stevenson 1998).

26 O modelo de *P. chabaudi* espelha muitos aspectos patológicos e imunológicos das
27 infecções por malária humana (tabela 1), sendo uma excelente ferramenta para aprofundar o
28 conhecimento sobre as infecções por malária humana e para identificar novos alvos para
29 intervenções terapêuticas (Stephens *et al.* 2012). No entanto, existem algumas limitações, como
30 o órgão de sequestro de eritrócitos nos camundongos (o fígado e não o cérebro), nível de
31 parasitemia circulante necessário para observar sintomas patogênicos (mais elevados do que
32 para infecções por malária humana), algumas diferenças em sintomas patogênicos, e o
33 desenvolvimento de hipotermia em vez de febre (Landau & Chabaud 1994).

34

1 Tabela 1 – Comparação da patogenicidade de *Plasmodium chabaudi* em camundongos e infecções causadas
 2 por *P. falciparum* e *P. vivax* em humanos. Traduzido de Stephens *et al.*, 2012.

Patogênese	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. chabaudi</i>
Febre	Picos constantes ou irregulares, muitas vezes seguido por um padrão cíclico de 36-48h.	Ocorre a cada 48h.	Camundongos gradualmente desenvolvem hipotermia.
Anemia e Trombocitopenia	Desenvolvimento de anemia grave com eritrofagocitose, supressão da hematopoese e trombocitopenia.	Desenvolvimento de anemia grave com eritrofagocitose, supressão da hematopoese e trombocitopenia.	Desenvolvimento de anemia grave com eritrofagocitose e supressão da hematopoese. Induz trombocitopenia, com recuperação após pico da parasitemia.
Malária cerebral	Relacionada com edema cerebral, hemorragia, inflamação e bloqueio do fluxo sanguíneo.	Geralmente não associada com malária cerebral, mas possui alguns casos descritos na literatura.	Geralmente não associada com malária cerebral.
Esplenomegalia	Esplenomegalia presente.	Esplenomegalia presente.	Esplenomegalia presente após 5º dia de infecção.
Hipoglicemia	Infecção induz hipoglicemia.	Infecção induz hipoglicemia.	Infecção induz hipoglicemia.
Dificuldade Respiratória e Acidose Metabólica	Indução da acidose metabólica contribui para o surgimento da síndrome do desconforto respiratório agudo, que pode ser letal.	Induz lesão pulmonar e desconforto respiratório. Acidose metabólica leva ao desconforto respiratório.	Cepas mais virulentas causam dificuldades respiratórias e camundongos mais suscetíveis desenvolvem dificuldades respiratórias. O nível de acidose não é conhecido.
Malária Placentária	Causa nascimento com baixo peso e aumenta o risco de morte perinatal.	Causa nascimento com baixo peso.	Causa inflamação placentária e aborto.

3

4 A genética parasitária também é um dos principais determinantes da patogênese da
 5 infecção por malária. *P. falciparum*, como espécie, é constituído por diferentes cepas, algumas
 6 das quais se mostram diferentes em características como a formação de rosetas de eritrócitos na

1 corrente sanguínea, que tem uma correlação com a gravidade da doença (Heddini *et al.* 2001).
2 Embora o clone AS seja normalmente a escolha de pesquisadores que trabalham com *P.*
3 *chabaudi*, clones mais ou menos virulentos como o AJ podem ser usados para se avaliar os
4 mecanismos genéticos e imunológicos por trás do processo infectivo. Outros estudos genéticos
5 de parasitos usando clones mutados com fenótipos resistentes a drogas identificaram genótipos
6 subjacentes de resistência a drogas, e *P. chabaudi* provou ser um modelo ideal para isso porque
7 genes ortólogos demonstraram controlar os mesmos fenótipos de resistência em *P. chabaudi* e
8 *P. falciparum* (Borges *et al.* 2011; Cheng & Saul 1994), destacando a conservação da função
9 genética entre as espécies (Janse *et al.* 2011).

10 A memória imune é importante na infecção por malária, como evidenciado pelo aumento
11 da resistência à patogênese da malária com a idade. Entretanto, a imunidade clínica completa
12 (e específica à cepa) é parcialmente dependente da exposição constante a *Plasmodium* spp.. A
13 reinfecção com o mesmo clone de *P. falciparum* em humanos (Contamin *et al.* 1996; Newbold
14 *et al.* 1992) ou *P. chabaudi* em camundongos resulta em reduções similares na parasitemia
15 (Cheesman *et al.* 2006; Jarra & Brown 1985). Além disso, foram observados níveis intermédios
16 de proteção contra infecções secundárias não homólogas em malária humana e em
17 camundongos (Collins & Jeffery 2002).

18

19 **2.8. *Plasmodium* e sua interação com fagócitos**

20 Algumas infecções por espécies de *Plasmodium* podem persistir por anos e algumas
21 vezes pela vida do hospedeiro e as razões para isso ainda não foram completamente elucidadas
22 (Wykes *et al.* 2011). Acreditava-se que eritrócitos eram as únicas células que serviam como
23 hospedeiras e capazes de suportar a replicação de formas sanguíneas de espécies de
24 *Plasmodium*. Uma hipótese foi proposta afirmando que *Plasmodium* spp. usaria alguma outra
25 célula como hospedeira além de eritrócitos, uma vez que anticorpos específicos contra
26 *Plasmodium* spp. foram transferidos para camundongos imunocomprometidos e esses
27 camundongos apresentaram redução, mas não ausência de parasitemia (Hirunpetcharat *et al.*
28 1999). Estudos relataram que o ciclo de vida do parasito é mais complexo, envolvendo outras
29 células do hospedeiro e já foram encontrados parasitos do estágio sanguíneo dentro de células
30 epiteliais (Gueirard *et al.* 2010; Huff 1957), plaquetas (Fajardo 1973), neutrófilos (Landau *et*
31 *al.* 1999), células dendríticas (Wykes *et al.* 2011) e macrófagos (Landau *et al.* 1999; Mora-
32 Silvera *et al.* 1997).

33 *Plasmodium gallinaceum* também tem dois estágios onde merozoítos invadem outras
34 células, além de eritrócitos. O primeiro é durante o estágio pré-eritrocítico inicial e o segundo

1 é no estágio sanguíneo (Huff 1957). A infecção começa quando esporozoítos da glândula
2 salivar do mosquito invadem células mononucleares da pele, onde ocorre esquizogonia e
3 liberação de merozoítos após a lise. Esses merozoítos invadem células mononucleares por todo
4 o corpo do hospedeiro e após nova esquizogonia, ocorre nova liberação de merozoítos que
5 chegam a corrente sanguínea e invadem eritrócitos. Na segunda fase, merozoítos provenientes
6 de eritrócitos invadem muitos outros endotélios onde o parasito se multiplica (Huff 1957).
7 Wykes *et al.* 2011 relataram que alguns parasitos que invadem células dendríticas conseguem
8 impedir a fusão lisossomal, sobrevivem e são capazes de se replicar dentro dessas células
9 enquanto outros são degradados. Quando células dendríticas de camundongos infectados,
10 independente da parasitemia, foram transferidas para camundongos não-infectados, esses
11 camundongos desenvolveram a doença. Isso demonstrou que células dendríticas servem como
12 células reservatório para parasitos do gênero *Plasmodium*. Mora-Silvera *et al.* 1997 também
13 demonstraram que macrófagos contendo merozoítos aparentemente saudáveis foram
14 observadas no baço e nos linfonodos de camundongos parasitados por *P. yoelii nigeriensis*. Até
15 40 merozoítos de três esquizontes maduros puderam ser vistos no mesmo compartimento.
16 Landau *et al.* 1999 também demonstraram sacos contendo merozoítos dentro de macrófagos do
17 baço e do fígado obtidos de animais infectados. A análise por microscopia das células infectadas
18 não encontrou nenhum indício de atividade lisossomal, indicando que os merozoítos estavam
19 em um estado latente dentro dos macrófagos. Assim como células dendríticas, macrófagos
20 podem ter papel na manutenção da infecção do hospedeiro, servindo como células reservatório
21 e, portanto, sendo capazes de permanecer em um estado latente por gerar uma resposta anti-
22 inflamatória em macrófagos através da exposição de PS.

23

24 **2.9. Óxido nítrico na infecção por *P. chabaudi***

25 Os radicais livres gasosos compõem um grupo de agentes intracelulares que têm sido
26 relacionados a vários processos fisiológicos. Dentre eles está o NO, um gás produzido pela
27 atividade de enzimas denominadas sintases do NO (NOS) que podem ser classificadas em três
28 tipos: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) ou induzível (iNOS) (Rosselli *et al.* 1998).

29 NO é descrito como uma das principais moléculas de sinalização extra e intercelular
30 presentes nos organismos (Ignarro 2000). Tanto o NO quanto as espécies reativas do oxigênio
31 geradas a partir desse radical livre reagem com uma variedade de biomoléculas como o ácido
32 desoxirribonucleico (DNA), fatores de transcrição, enzimas, citocinas e receptores de
33 membrana, exercendo ou mediando uma variedade de funções fisiológicas e patológicas
34 (Rosselli *et al.* 1998). Dentre diversas funções atribuídas ao NO, inclui-se sua participação no

1 sistema imunológico, no qual a alta produção de NO e derivados tem papel importante na
2 destruição de agentes patológicos (Wei *et al.* 1995).

3 A identificação das enzimas ativas produtoras de NO, no ambiente celular significou
4 um avanço extremamente importante para a comprovação dos efeitos biológicos exercidos pelo
5 NO. Macrófagos de camundongo ativados com IFN- γ em combinação com LPS expressam
6 maior atividade da enzima iNOS (Stuehr & Marletta 1987).

7 Os mecanismos do sistema imune que o hospedeiro utiliza para eliminar formas
8 eritrocíticas do parasito da malária ainda necessitam de ser completamente elucidados. Existe
9 a necessidade de mais esclarecimentos sobre o seu funcionamento, mas mecanismos da
10 imunidade, inata e adaptativa, parecerem envolvidos (Fritsche *et al.* 2001; Taylor-Robinson *et*
11 *al.* 1993). Um desses mecanismos regulatórios consiste na ativação de moléculas efetoras como
12 o NO, que tem papel ativo na patogênese da malária, embora seu mecanismo de ação durante a
13 doença ainda seja controverso (Clark & Cowden 2003). Ainda de acordo com Clark & Cowden
14 (2003), apesar da polêmica inicial sobre as múltiplas funções do NO de fagócitos humanos
15 *versus* murinos, foi descrito que os genes e regiões promotoras da iNOS são extremamente
16 semelhantes (Chartrain *et al.* 1994; MacMicking *et al.* 1997). Em 1998, Mohan & Stevenson
17 propuseram que o NO produzido em excesso durante infecção por parasitos do gênero
18 *Plasmodium* tem um efeito direto no controle da parasitemia por meio de danos oxidativos.

19 Não há dúvida de que o NO é produzido durante a infecção por *Plasmodium*, entretanto
20 o papel exato dessa molécula na fase eritrocítica tem sido questionado (Taylor-Robinson &
21 Smith 1999; van der Heyde *et al.* 2000). Ademais, dados que apoiam o papel de NO na
22 eliminação do parasito são frequentemente conflitantes (Mohan & Stevenson 1998) devido a
23 alguns estudos demonstraram que os níveis de NO não tem efeito na eliminação de formas
24 eritrocíticas de *P. chabaudi* (van der Heyde *et al.* 2000; Yap & Stevenson 1994), e outros
25 sugerirem que existe um papel essencial no processo infectivo (Taylor-Robinson & Smith
26 1999).

27

1 **3. Objetivos**

2 **3.1. Objetivos gerais**

3 Desenvolver uma metodologia simples e eficiente para obtenção de merozoítos viáveis
4 e infectivos de *P. chabaudi*, usá-los para infectar eritrócitos e macrófagos e estudar sua
5 sobrevivência e possível relação com o mecanismo de mimetismo apoptótico.

6

7 **3.2. Objetivos específicos**

- 8 • Verificar se merozoítos obtidos através da metodologia desenvolvida são viáveis,
9 mantém sua ultraestrutura e conseguem infectar eritrócitos *in vitro* e
10 camundongos;
- 11 • Avaliar a sobrevivência de merozoítos em macrófagos murinos ativados;
- 12 • Avaliar a exposição de PS pelos merozoítos obtidos;
- 13 • Avaliar a expressão da enzima iNOS e produção de NO após a interação de
14 macrófagos ativados com merozoítos de *P. chabaudi*;
- 15 • Verificar a ocorrência de fusão lisossomal através da marcação com LAMP-1.
16

1 **4. Trabalhos**
2 **4.1. Trabalho 1**
3

Parasitology Research <em@editorialmanager.com>
Responder a: Parasitology Research <karengrace.corpuz@springernature.com>
Para: Renato DaMatta <renato@uenf.br>

20 de fevereiro de 2020 17:17

Dear Dr. DaMatta,

Thank you for submitting your manuscript, "Plasmodium chabaudi merozoites obtained through an improved method do not survive in classically activated macrophages", to Parasitology Research

The submission id is: PARE-D-20-00214
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<https://www.editorialmanager.com/pare/>

Your username is: Renato
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page.

With kind regards,

Journals Editorial Office PARE
Springer

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pare/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

<https://mail.google.com/mail/u/1/?ik=2546d786ef&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1659088167193581902&siml=msg-f%3A1659088...> 1/1

4
5

1 Pedro Souto Rodrigues^{a,b}, Milena de Farias Azeredo^a, Natália de Souza Almeida^a, Gisela G.
2 C. Galaxe de Almeida^a, João Luiz Mendes Wanderley^a, Sergio Henrique Seabra^{a,b*}, Renato
3 Augusto DaMatta^{a*}

4

5 ***Plasmodium chabaudi* merozoites obtained through an improved method do not survive**
6 **in classically activated macrophages**

7

8 ^a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Biologia Celular
9 e Tecidual, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, 28013-602

10 ^b Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e
11 Microscopia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 23070-200

12 ^c Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Imunoparasitologia, Macaé, RJ,
13 Brazil, 27930-560

14

15 * Correspondence: Tel.: +55 22 99201 7917

16 Sergio Henrique Seabra: seabrash@gmail.com,

17 Renato Augusto DaMatta: renato@uenf.br

18 # Present Address: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de
19 Biologia Celular e Tecidual. Av. Alberto Lamego, 2000 CEP: 28013-602, Campos dos
20 Goytacazes, RJ - Brazil

21

22 **Acknowledgements**

23 The authors thank Andrèa Carvalho César and Daniel Souto Rodrigues for suggestions
24 on the manuscript. To Prof. Ricardo Gazzinelli for providing CB57BL/6 mice previously
25 infected with *P. chabaudi* (AS strain). To the *Laboratório de Biologia Celular e Tecidual*
26 (LBCT) staff for technical support.

1 **Declarations**

2 **Funding**

3 Funding was received from the Brazilian research funding agencies CNPq (National Council
4 for Scientific and Technological Development), FAPERJ (Carlos Chagas Filho Foundation
5 for Research Support in Rio de Janeiro) and CAPES (Coordination for the Improvement of
6 Higher Education Personnel – Finance Code 001).

7 **Competing interests**

8 The authors declare that they have no competing interests.

9 **Ethics approval**

10 Not applicable.

11 **Consent to participate**

12 Not applicable.

13 **Consent for publication**

14 Not applicable.

15 **Availability of data and materials**

16 Not applicable.

17 **Code availability**

18 Not applicable.

19 **Authors' contributions**

20 PR and MA performed the experiments. NA and GA conduct the immunofluorescence assays.

21 JL performed flow cytometry analysis. PR and RD wrote the manuscript. SH and RD

22 designed the experiments and critically reviewed the manuscript. All authors read and

23 approved the final manuscript.

1 **Abstract**

2 Malaria is caused by apicomplexan parasites of the *Plasmodium* genus and is a major world
3 problem. During malaria blood-stage cycle, merozoites invade erythrocytes, but are also
4 found in other host cells of spleen and liver. No simple method is available to obtain infective
5 merozoites, restricting the experimentation of this parasite form with host cells. We report the
6 obtainment of *P. chabaudi* merozoites naturally egressed from synchronous erythrocyte
7 population infected with schizonts forms. Egressed merozoites were filtered and its viability,
8 infectivity and ultrastructure were analyzed. Interaction assays were performed with mice
9 erythrocytes, epithelial LLC-MK2 cells and classically activated mice peritoneal
10 macrophages. Obtained merozoites presented excellent viability, were able to kill mice,
11 efficiently infect erythrocytes, and lower merozoite:erythrocyte ratio resulted in higher
12 percentage of infected erythrocytes. Merozoites infected classically activated macrophages,
13 but did not persist in these cells; LLC-MK2 cells were not infected. We describe a simple and
14 improved method for obtaining viable and infective merozoites. Classically activated
15 macrophages killed merozoites suggesting that these host cells may not serve as reservoirs for
16 these parasites. These findings have important implications for our understanding of *P.*
17 *chabaudi* merozoites biology and may improve the comprehension of their host-parasite
18 relationship.

19
20 **Keywords** *Plasmodium chabaudi*; merozoites; filtration; erythrocytes; activated macrophages

21 22 **1. Introduction**

23 Malaria is one of the world's leading parasitic disease (WHO 2000). The study of
24 human malaria is complex. Therefore, the use of experimental models has led to numerous
25 contributions to the biology of the parasites and of the disease. Mice infection by *Plasmodium*

1 *chabaudi* is one of the closest models to the human disease caused by *P. falciparum* (Stephens
2 *et al.* 2012).

3 There is an urgent need for an effective vaccine and for new antimalarial agents to
4 reduce the burden of malaria and to fight drug resistance. Thus, further investigation about the
5 host-parasite interaction is needed. One of the most relevant pathogenic processes occurs
6 during blood infection when merozoites invade erythrocytes (Cowman and Crabb 2006;
7 Dowse *et al.* 2008). Parasite develops in erythrocytes with precise periodicity and at the end
8 of each cycle hundreds of merozoites egress lysing erythrocytes in the process (Greenwood *et*
9 *al.* 2008). The ability of the host to overcome malaria infection depends partially on the
10 phagocytic system (Hamburger and Kreier 1975). Free merozoites in the blood interact with
11 other cells (Wykes *et al.* 2011) and latent merozoites have been found in mice macrophages
12 and dendritic cells (Landau *et al.* 1999; Wykes *et al.* 2011).

13 Little is known about merozoites after blood release, including survival and the
14 kinetics of the host cell infection. However, the understanding of the host-parasite relationship
15 is essential for the development of a vaccine and to improve medications (Boyle *et al.* 2010).
16 Methods based on the natural release of merozoites have been developed for malaria of
17 human and other primates (Boyle *et al.* 2010; Brooks and Kreier 1978; Mitchell *et al.* 1977).
18 In these techniques, erythrocytes infected with schizonts are concentrated and matured *in*
19 *vitro*. Erythrocytes with immature parasites have been separated by agglutination and
20 merozoites released, but low viability have been reported (Mitchell *et al.* 1977). The use of a
21 cell-sieve permits the isolation of a large number of intact and infective merozoites of
22 *Plasmodium knowlesi* (Dennis *et al.*, 1975). The involved apparatus, however, is relatively
23 complex and this method was not considered useful for other plasmodial species probably due
24 to differences in size and deformability of the erythrocytes infected with schizonts (David *et*
25 *al.* 1978). In the case of rodent *Plasmodium* spp., free parasites can be obtained by artificial
26 lysis of infected erythrocytes but this kind of preparation is frequently heavily contaminated

1 by immature forms (Nillni *et al.* 1985). Indeed, most of the attempts to purify merozoites that
2 maintain their invasive capacity were unsuccessful (Blackman 1994) or resulted in non-viable
3 merozoites (Boyle *et al.* 2010). This has impaired the comprehension of many aspects of the
4 parasite biology, including the invasion process.

5 In this work we describe the obtainment of *P. chabaudi* merozoites with high purity,
6 viability and invasive capabilities into erythrocytes by adapting a protocol described by
7 Chimanuka *et al.*, 1997. These authors describe a protocol to obtain ring-infected erythrocytes
8 that were injected in mice resulting in animals with similar infection rates that were used to
9 analyze total and differential parasitaemia curves. However, the methodology was not used to
10 study the biology of the obtained merozoites, and their viability and capacity to infect other
11 host cells were not reported. We adapted this protocol by adding a filtering step and
12 demonstrated a highly efficient method for obtaining viable and erythrocyte invasive *P.*
13 *chabaudi* free merozoites. We also characterized the obtained merozoites and described the
14 kinetics of the interaction with classically activated mice peritoneal macrophages.

15

16

17 **2. Materials and Methods**

18 **2.1. Mice Infection and natural synchronization**

19 Balb/c mice (6-8 weeks) were kept in a room with a 12h light (10:00 – 22:00) and 12h dark
20 (22:00 – 10:00) period. *Plasmodium chabaudi* (AJ strain) was kept by inoculation of infected
21 erythrocytes in the peritoneal cavity of mice every 6-7 days. As *P. chabaudi* is synced with
22 the host's melatonin (Wendt *et al.* 2016), it is possible to obtain erythrocytes enriched with a
23 specific form of the parasite depending on the hour in which the blood of the animal is
24 collected (Chimanuka *et al.* 1997). Animal usage was approved by the Animal Ethics
25 Committee of the *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro*, protocol ID
26 320.

1 **2.2. Obtaining *Plasmodium chabaudi* merozoites**

2 Blood was taken with a syringe with 0.1 ml of 3.7% of sodium citrate by cardiac puncture 3h
3 before the first hour of light (7:00) for the obtainment of erythrocytes with mature schizonts.
4 Blood taken from 2 animals (± 1 ml per animal) was centrifuged at 200g for 10 min, the
5 supernatant was discarded and 5 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
6 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) was added to the pellet and further
7 incubated for 30 min at 37°C to egress of merozoites. The solution was centrifuged at 200g
8 for 10 min and the supernatant with free merozoites was centrifuged at 4000g for 20 min in 4
9 microtubes (1.5 ml). The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 10 ml of
10 DMEM that was filtered (3.0 μm – Millipore filter ref. TSTP02500) or not. Because
11 merozoites cannot be seen directly by phase of differential interference microscopy, this form
12 was quantified by direct counting of parasites on slides obtained after cytocentrifugation.
13 Briefly, 100 μl of the parasite suspension was mounted on slides with a cytospin and stained
14 with Diff-Quick. Quantification was performed by counting merozoites in 5 distinct and
15 random microscopic fields observed with the 100x objective lens. The obtained mean number
16 of merozoites was multiplied by a factor (622) that corresponds to the number of times the
17 area of the observed microscopic field ($4.5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) fit the whole area of the cytospin ($2.8 \times$
18 $10^7 \mu\text{m}^2$). The resulting number was the number of merozoites in 100 μl of the parasite
19 suspension.

20

21 **2.3. Flow cytometry evaluation**

22 Beads of known sizes were used to define in the side-scatter and forward-scatter dot plot a
23 specific gate that corresponded to the estimated size of merozoites (FluoSpheres #2,
24 Molecular Probes). To analyze the viability, obtained merozoites, filtered or not, were
25 incubated with propidium iodide (PI) (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 5 min, cells were assessed on a
26 FACScalibur flow cytometer. Data were analyzed in the FlowJo X10.0.7 program.

1 **2.3. Evaluation of *in vivo* viability**

2 Balb/c mice were separated into two groups of 5 animals. One group received
3 intraperitoneally 1×10^6 filtered merozoites, obtained as described above. The second group
4 was intraperitoneally injected with 1×10^6 infected erythrocytes, as in the routine passage.
5 Survival of both groups was assessed daily and was presented as a Kaplan-Meyer graph.

6

7 **2.4. Preparation of cytopsin slides**

8 Glass slides were mounted with cytocentrifuge filter paper (CIENLAB) and placed in a
9 cytocentrifuge (Fanen, mod. 218). A total of 100 μ l solution containing free merozoites,
10 infected or non-infected mouse erythrocytes were submitted to rotation at 30g for 4 min. The
11 slides were stained with Diff-Quick and observed by bright field microscopy.

12

13 **2.5. Erythrocyte infection**

14 Blood from Balb/c mice was obtained by cardiac puncture into syringes with 0.1 ml of 3.7%
15 sodium citrate. Blood was centrifuged, erythrocytes were washed with 10 ml of RPMI-1640
16 supplemented with 20 ml 1M HEPES buffer, 5 mg hypoxanthine, 2 g glucose, 2 mg
17 gentamicin, 10 ml of 200 mM L-glutamine and 42 ml of 5% sodium bicarbonate solution per
18 liter. The erythrocyte suspension was supplemented with 10% mice serum obtained from
19 adult Swiss mice. Then, 1×10^7 and 0.5×10^7 merozoites were added to 1×10^7 erythrocytes
20 in a final volume of 2 ml per tube. Samples (100 μ l) were obtained after 30, 60, 120 min and
21 cytopsin prepared. Erythrocytes with and without ring forms were counted in duplicate
22 cytopsin in three independent experiments to determine the infection index. A total of 300
23 cells per cytopsin were counted.

24

25 **2.6. Activation of peritoneal macrophages and interaction with parasites**

1 Macrophages were obtained by peritoneal lavage (5 ml of acidified DMEM, pH=5) of Balb/c
2 mice that had their peritoneal cavity stimulated 4 days earlier with 1 ml of 3% sodium
3 thioglycolate. Macrophages were centrifuged, counted and plated on glass coverslips on 24-
4 well-culture plates. After 1 h of adhesion at 37°C, cells were washed with phosphate buffered
5 saline (PBS) at 37°C, and cultivated for 24 h with DMEM containing 5% FBS,
6 lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml) and interferon- γ (IFN- γ) (50 U/ml) at 37°C, in a 5%
7 CO₂ atmosphere (Seabra *et al.* 2004). After 24 h, cells were washed and merozoites added to
8 macrophages in a 10:1 ratio between parasites and macrophage. After 2 h, cells were washed
9 with PBS, some cells adhered to coverslips were collected, and the remaining cells were
10 further cultivated for 24 and 48 h in the same culture medium.

11

12 **2.7. Optical microscopy and quantification of the infection**

13 Cells adhered to coverslips were fixed in a 4% formaldehyde PBS solution, stained with
14 Giemsa, dehydrated in acetone-xylol solutions and mounted on slides with Entellan. Cells
15 were observed by bright field and polarized microscopy in a Zeiss Axioplan microscope.

16 Parasite development was evaluated by counting infected and non-infected macrophages and
17 merozoites number per infected cell. At least 300 macrophages per coverslips were counted.
18 Each time point was evaluated in triplicate, in three independent experiments.

19

20 **2.8. Production of anti-merozoite polyclonal**

21 An anti-merozoite polyclonal antibody was obtained using a standard immunization protocol.
22 Naïve and previously infected for 4 months with *P. chabaudi* (AS strain) CB57BL/6 mice
23 (weighing about 20 g) were inoculated intraperitoneally with 200 μ l of PBS containing 1 x
24 10⁵ dead merozoites. Merozoites were obtained as described above, filtered, quantified and
25 submitted to three cycles of freeze and thaw. Naïve and previously infected animals were
26 inoculated 4 times, once a week. In the first 2 inoculations 1 mg of Al(OH)₃ per animal was

1 used as an adjuvant. In the 5th week, animals were euthanized, blood removed and plasma
2 obtained. The presence of anti-merozoites antibodies was assayed by immunolocalizing
3 merozoites in macrophages.

4

5 **2.9. Immunofluorescence**

6 After interactions for 2 and 24 h of *P. chabaudi* merozoites with activated macrophages, the
7 cells were fixed with 4% formaldehyde in PHEM buffer (60 mM Pipes, 20 mM HEPES, 10
8 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 70 mM KCl), pH 7.2. Cells were permeabilized with 0.5% Triton
9 X-100 in PBS, incubated with ammonium chloride (50mM in PBS) and 3% bovine serum
10 albumin (BSA) in PHEM buffer (BSA-PHEM). Cells were incubated with anti-merozoite
11 antibody diluted 1:800 in BSA-PHEM for 1 h. Cells were washed with PBS, incubated for 10
12 min with BSA-PHEM, and incubated with TRITC anti-mouse (Sigma) diluted 1:400 in BSA-
13 PHEM for 1 h. Cells were washed and mounted with ProlongGold with DAPI (Invitrogen)
14 and observed in a Zeiss fluorescence Axioplan microscope equipped with epifluorescence
15 illumination and HBO100 mercury lamp. Images were captured and processed in Adobe
16 Photoshop CS3.

17

18 **2.10. Preparation of samples for transmission electron microscopy**

19 Merozoite suspension was fixed with 2.5% glutaraldehyde and 4% recently prepared
20 formaldehyde in sodium cacodylate buffer (0.1M, pH 7.2) for 2 h. Merozoites infected
21 macrophages cultured in 25 cm² culture flasks were also fixed as above and removed from the
22 flasks via cell scraping. Cells were washed with sodium cacodylate buffer and post-fixed with
23 1% osmium tetroxide, 1.6% potassium ferrocyanide and 5 mM calcium chloride in sodium
24 cacodylate buffer for 1 h. Cells were dehydrated with acetone serial concentrations of 30%,
25 40%, 50%, 70% and 100%. Inclusion was performed with epoxy resin. Ultrafine sections

1 were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed in a Jeol JEM-1400 Plus
2 transmission electron microscope.

3

4 **2.11. LLC-MK2 cell cultivation**

5 Epithelial cells LLC-MK2 (ATCC® CCL-7™, Rockville, MD, USA) of Rhesus monkey
6 kidney (*Macaca mulatta*) were grown in 25 cm² cell culture flasks with DMEM supplemented
7 with 10% FBS at 37°C, 5% CO₂ atmosphere. Every 48 h or after the formation of confluent
8 monolayers, cultures were treated with trypsin/EDTA solution (Sigma-Aldrich, USA) to
9 obtain subcultures. The removed cells were counted, and seeded over glass coverslips in 24-
10 well-plates and cultured with DMEM supplemented with 10% FBS for 24 h. These cells were
11 infected as macrophages (above).

12

13 **2.12. Statistical analysis**

14 The results were expressed as means and standard deviation. The variances between three
15 independent experiments were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA),
16 followed by Tukey's multiple comparisons post-test in the Graph-Pad Prism 5.0 statistical
17 program. $P < 0.05$ values were considered significant.

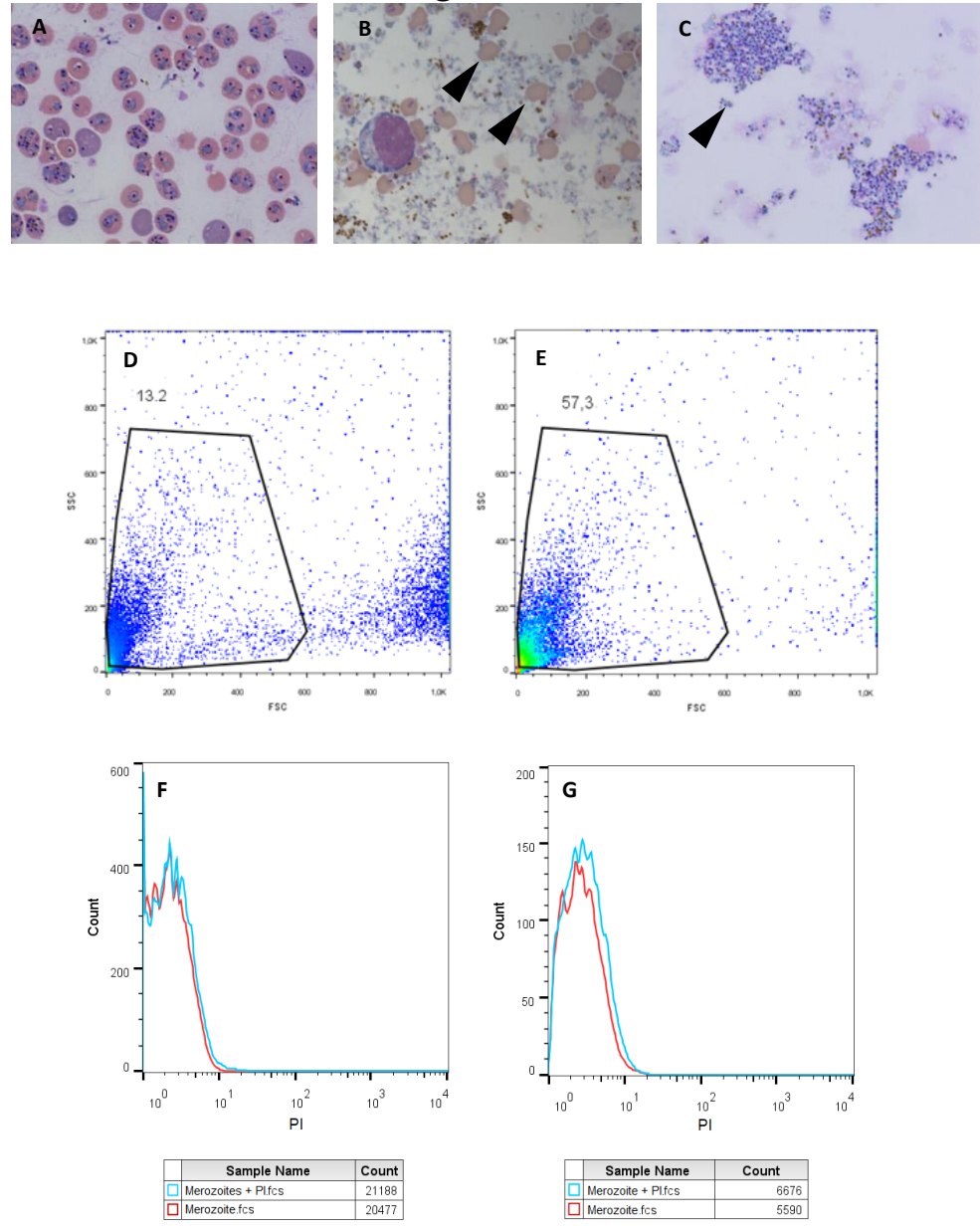
18

19 **3. Results**

20 In Chimanuka *et al.* 1997 protocol, the obtained merozoites were mixed with a great
21 number of erythrocytes and leukocytes (Fig. 1 b), but filtration was able to remove all
22 leukocytes and most erythrocytes (Fig. 1 c). This was further confirmed by flow cytometry
23 analysis where the number of events corresponding to merozoites increased with filtration and
24 the number of events with higher FSC profile were mostly absent (Fig. 1 d, e). We used beads
25 of known sizes to define a gate that corresponded to the size of merozoites. This confirmed
26 that the events that appeared in the set gate were mostly merozoites (not shown). Merozoites

1 presented high viability after incubation with PI (Fig. 1 f), which did not alter after the
 2 filtration step (Fig. 1 g). Viability and infectivity of merozoites were further confirmed as
 3 these obtained forms were able to infect and kill mice (Fig. 2).

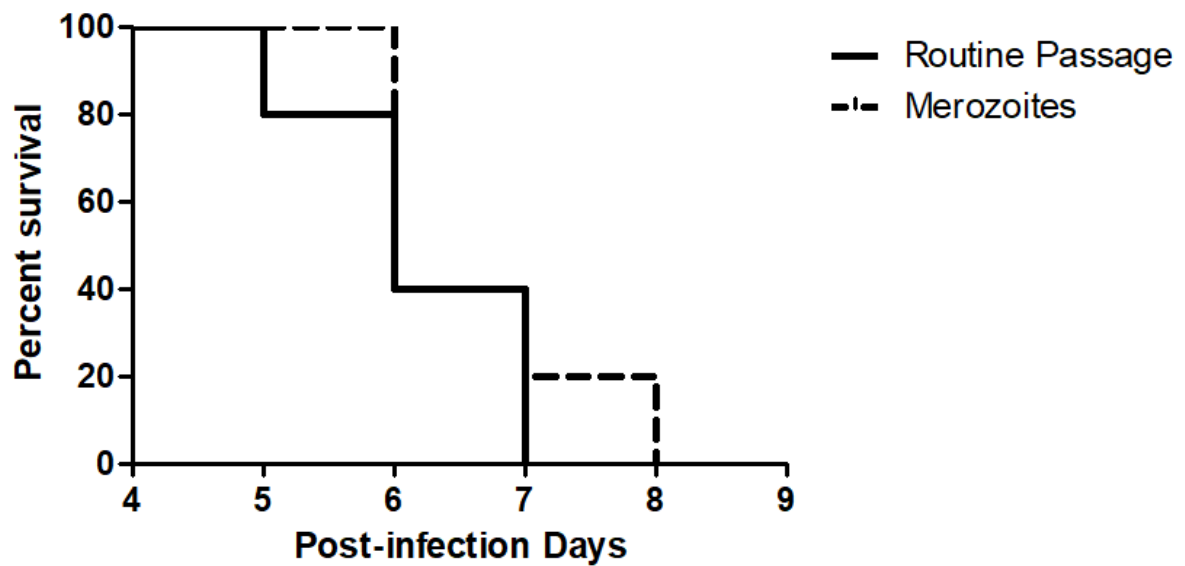
4 **Figure 1**



22 **Fig. 1** - Bright field microscopy of cytopsin slides and flow cytometry of obtained *Plasmodium chabaudi*
 23 merozoites. (a) Cytopsin slides of infected blood stained with Diff-Quick. Most erythrocytes have schizonts. (b)
 24 Cytopsin of obtained merozoites without filtration presented leukocytes (arrow) and erythrocytes (arrowheads).
 25 (c) Cytopsin of filtered merozoites presented enriched parasite (arrowhead). Bar = 5 μ m. Flow cytometry side-
 26 scatter and forward-scatter dot plots of unfiltered (d) and filtered (e) merozoites. Percentages of events are
 27 depicted above the gate. Cell viability analysis by flow cytometry after PI labeling of unfiltered (f) and filtered
 28 (g) merozoites.

1
2
3

Figure 2



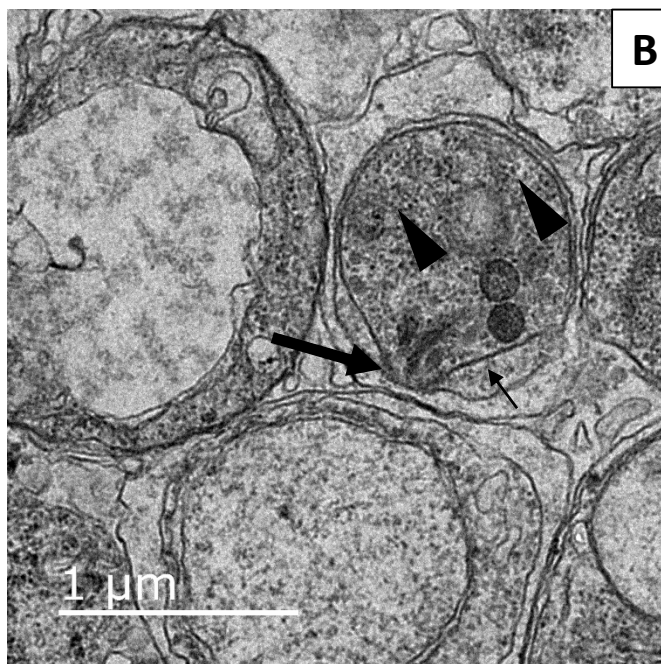
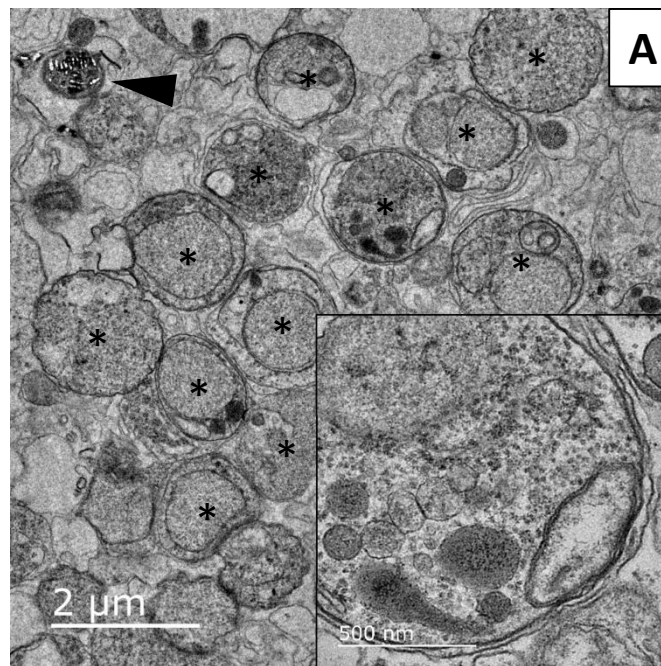
4
5
6
7
8
9

Fig. 2 - Survival of mice infected with *Plasmodium chabaudi*. Mice were infected with filtered merozoites or with infected erythrocytes obtained from infected mice routinely used to maintain the parasite. No difference was detected between both groups (n = 5 per group).

10 Transmission electron microscopy analysis showed a homogeneous population of
11 merozoites after filtration (Fig. 3 a) with the presence of some clusters of hemozoin (Fig. 3 a).
12 Merozoite presented well preserved organelles. The apical complex was clearly seen, as was
13 the inner membrane complex, rhoptry, dense granules, mitochondrion, nucleus and ribosomes
14 (Fig. 3 b).

15

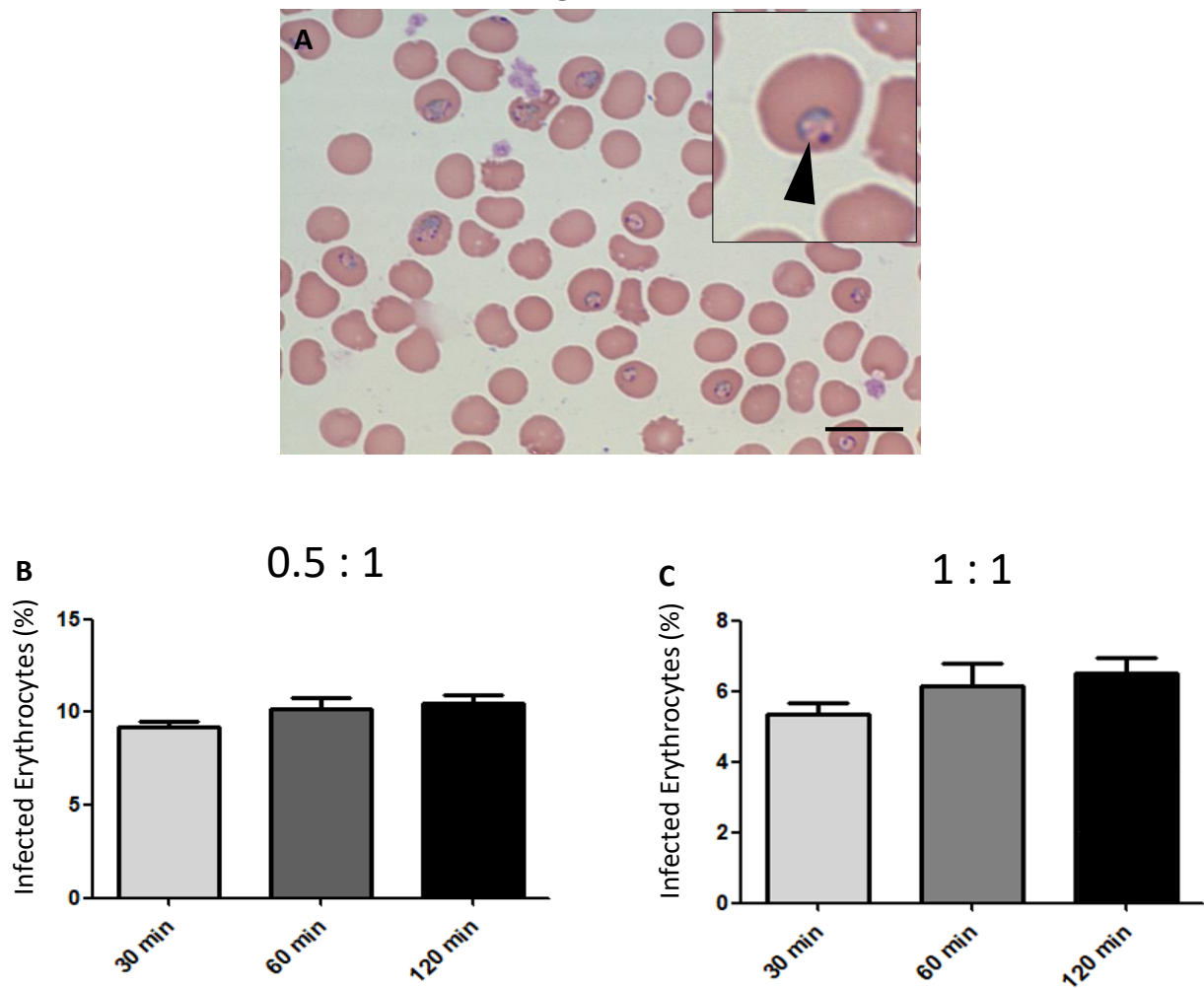
Figure 3



22 **Fig. 3** - Transmission electronic microscopy images of filtered merozoites of *Plasmodium chabaudi*. (a)
23 Obtained merozoites (*asterisk*) presented preserved ultrastructure and hemozoin cluster was seen (*arrowhead*).
24 (b) The apical complex (*large arrow*) can be seen as the inner membrane complex (*arrow*) and ribosomes
25 (*arrowheads*). N – Nucleus, Rp – Rhoptry, DG – Dense Granules, M – Mitochondrion.

1 Merozoites obtained after filtration were able to infect erythrocytes and established as
2 ring forms (Fig. 4 a). Filtered merozoites were able to infect erythrocytes after 30 min of
3 interaction (Fig. 4 b, c). Quantification of the invasion demonstrated that longer periods of
4 infection did not increase the infection rate of erythrocytes (Fig. 4 b, c). The efficiency of
5 merozoite invasion was inversely proportional to the merozoite:erythrocyte ratio as the lower
6 ratio led to higher percentage of infected erythrocyte (Fig. 4 b, c). LLC-MK2 cells were not
7 found infected by merozoites.

8 **Figure 4**



30 **Fig. 4** - Erythrocyte invasion assay with filtered merozoites of *Plasmodium chabaudi*. Erythrocytes suspension
31 was incubated with filtered merozoites for 30, 60 and 120 min, cytopins slides were prepared. (a) Merozoites
32 were able to invade erythrocytes and to develop into ring forms (*arrowhead*). Bar = 15 μ m. Quantification of the
33 percentage of infected erythrocytes after invasion using a 0.5:1 (b) or 1:1 (c) merozoites:erythrocyte ratios.

1 Merozoites were found in activated macrophages 2 h post infection (Fig. 5 a) and
2 hemozoin was seen by polarized microscopy (Fig. 5 b). During the course of the infection, the
3 amount of merozoites decreased in macrophages (Fig. 5 c, e). After 48 h post-infection, it was
4 difficult to find merozoites in macrophages, but hemozoin was visible (Fig. 5 e, f).
5 Quantification of the infection revealed a drastic decrease of infected macrophages (Fig. 5 g)
6 and of the mean number of merozoites per macrophage (Fig. 5 h).

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

Figure 5

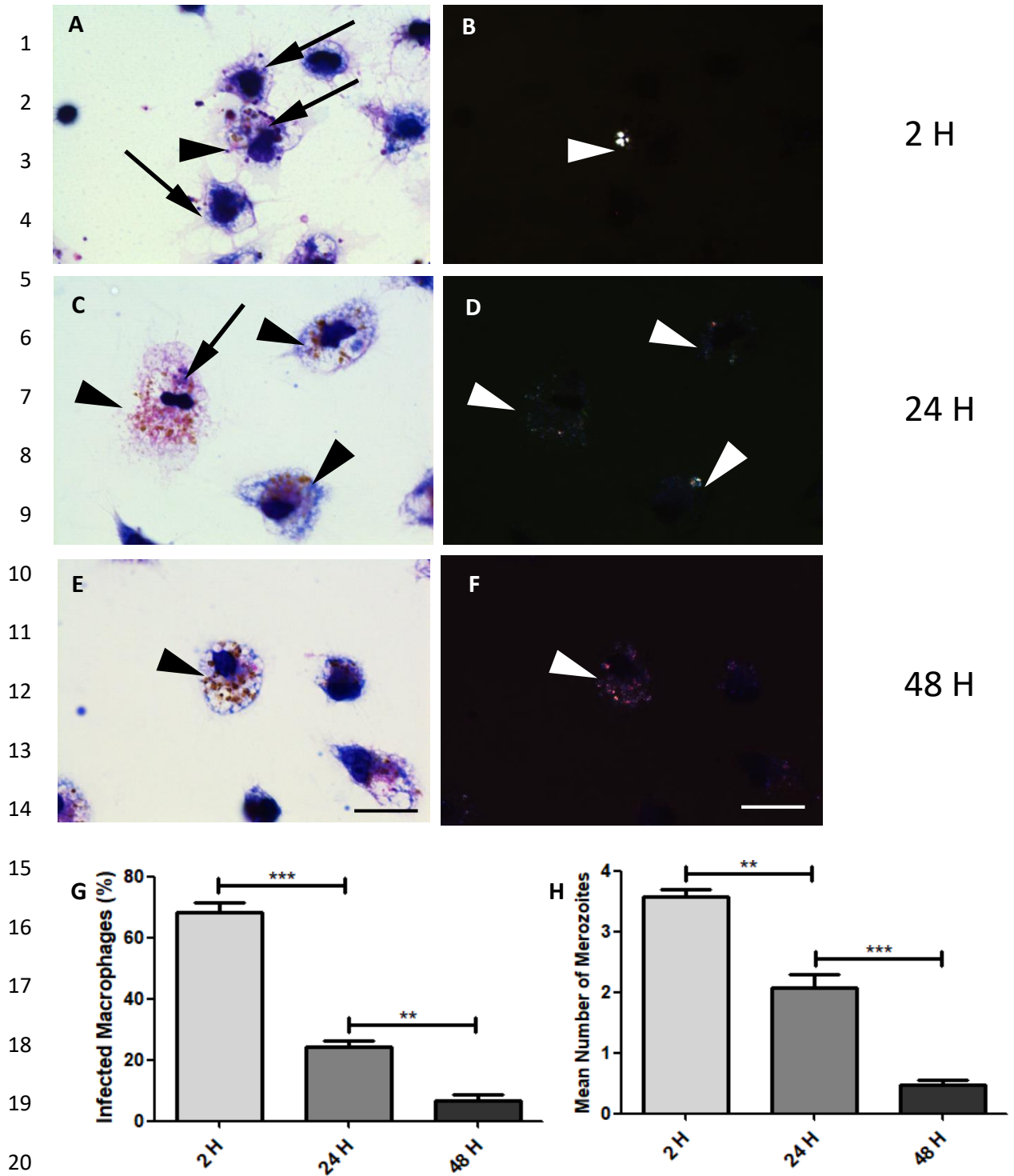


Fig. 5 - Bright field microscopy of Giemsa stained (a, c, e) and polarized light microscopy (b, d, f) of activated mice peritoneal macrophages infected with *Plasmodium chabaudi* filtered merozoites for 2 h (a, b), 24 h (c, d) and 48 h (e, f). After 2 h of infection merozoites (arrows) and hemozoin (arrowhead) are seen. Only hemozoin can be seen after 48 h (arrowhead). Bar = 15µm. Quantification of the percentage of infected macrophages (g) and the mean number of merozoites per macrophage (h). Significantly different by the one-way analysis of variance: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

1 Immunofluorescence revealed that mice chronically infected with *P. chabaudi* of the
2 AS strain produced a polyclonal antibody that labeled merozoites in macrophages. However,
3 naïve animals that received the same inoculations as chronically infected mice did not
4 produce antibodies capable of labeling merozoites. Uninfected macrophages were negative for
5 merozoite labeling (control) showing that the antibody produced was specific. Interestingly
6 enough, the polyclonal antibody 2 h post-infection labeled merozoites inside macrophages
7 with a clear round pattern (Fig. 6 a, b, c), but labelling after 24 h of infection changed to a
8 fussy pattern (Fig. 6 d, e, f). Analysis by transmission electron microscopy of infected
9 macrophages for 24 h shows several vacuoles in the cytoplasm and no merozoites (Fig. 7 a,
10 b), indicating that merozoites were degraded at this period of infection. Membrane profiles
11 were seen inside some of these vacuoles (Fig. 7 b).

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

Figure 6

2 h

24 h

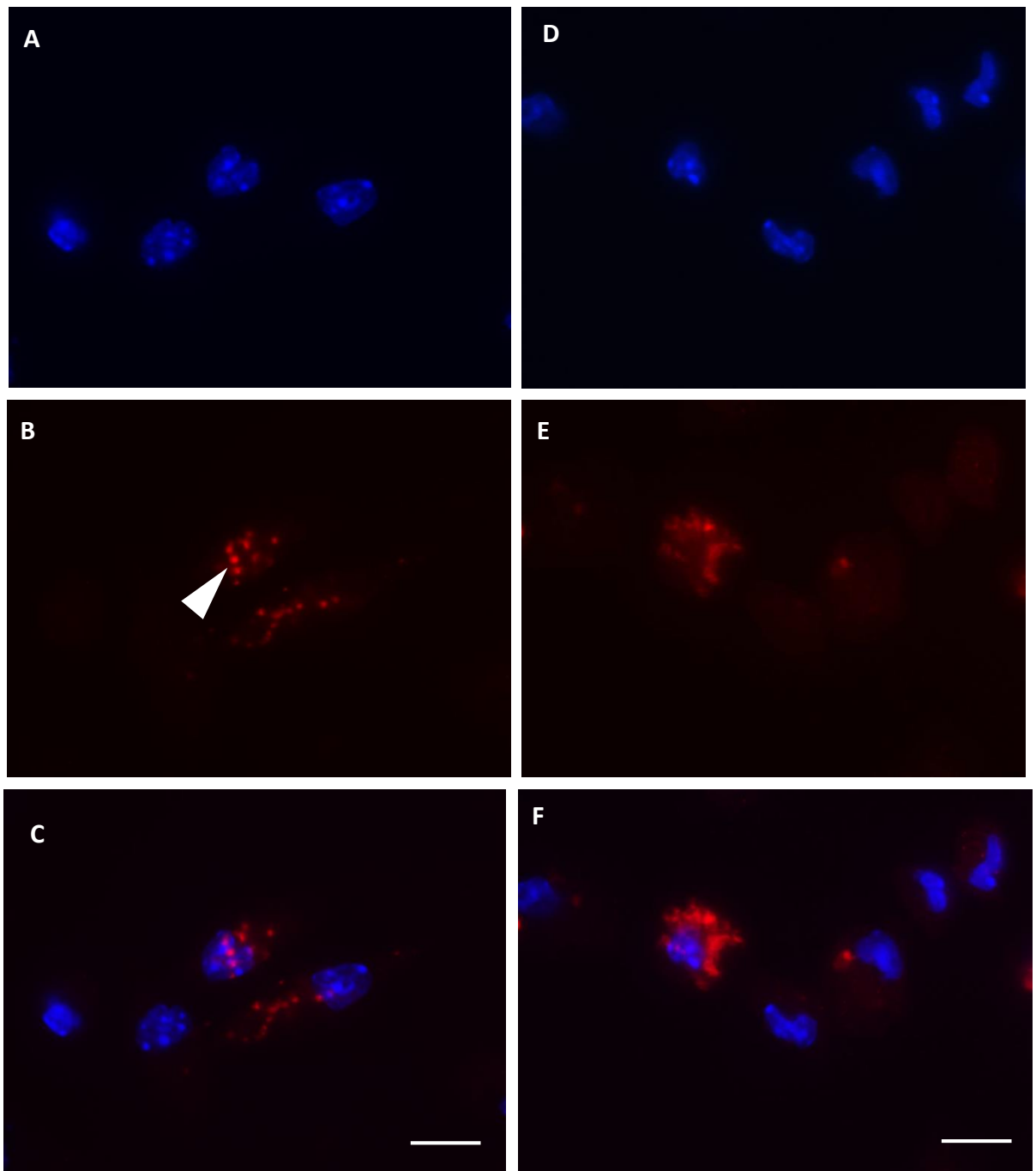
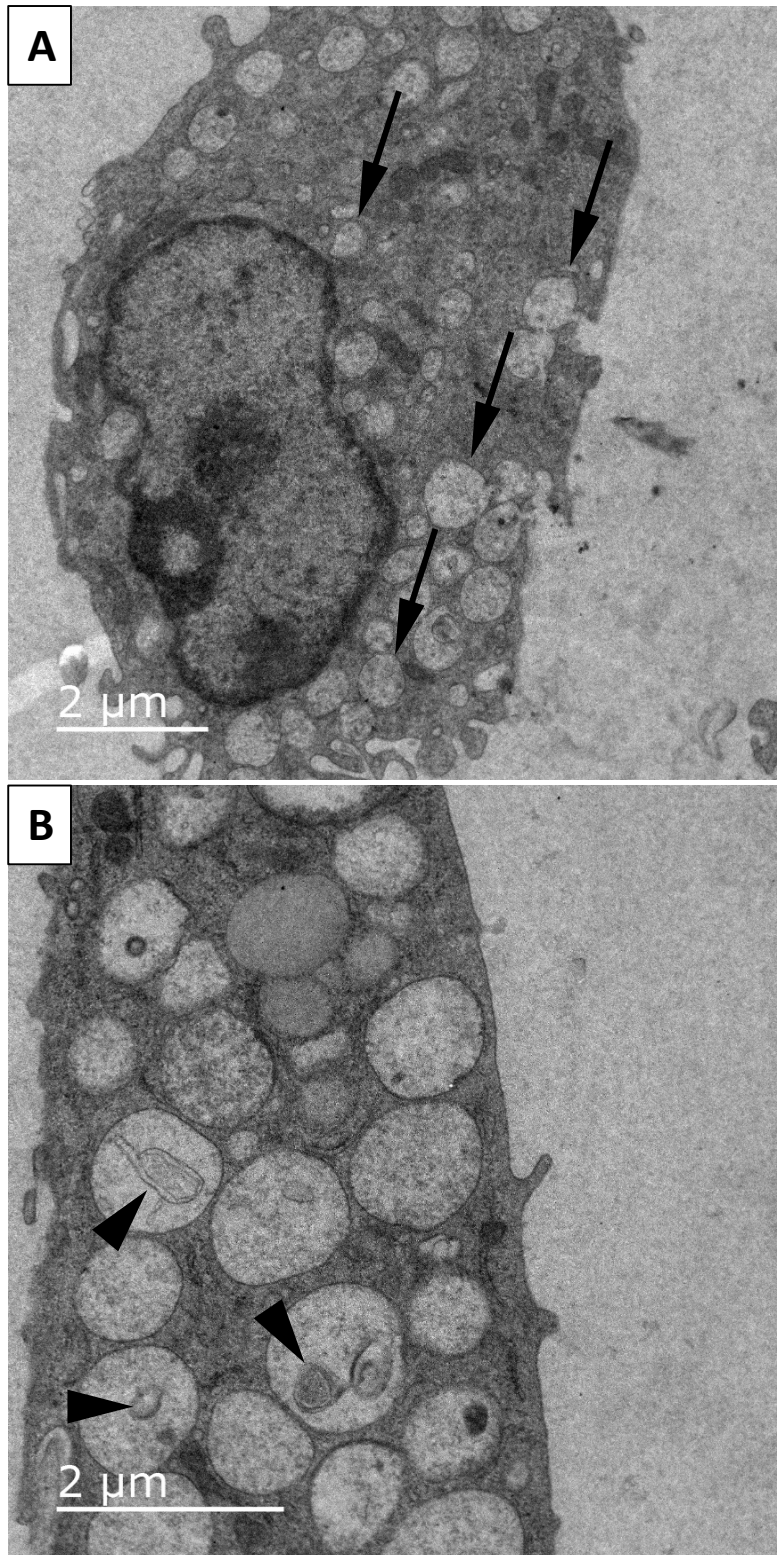


Fig. 6 - Immunolocalization of *Plasmodium chabaudi* filtered merozoites after infection of activated mice peritoneal macrophages. The produced polyclonal antibody was used to label merozoites in macrophages after 2 h (a, b, c) and 24 h (d, e, f) of infection. (a, d) - DAPI; (b, e) - antibody labeling (*red*); (c, f) - Merge. Labeling changed from round (*arrowhead*) to a fussy pattern after 24 h of infection. Bar = 20 μ m.

Figure 7



24 **Fig. 7** - Transmission electronic microscopy of activated macrophages infected for 24 h with *Plasmodium*
25 *chabaudi* filtered merozoites. (a) Vacuoles can be seen throughout the cell cytoplasm (*arrows*). (b) Some of
26 these vacuoles contained membrane profiles (*arrowheads*).

1 **4. Discussion**

2 Malaria is one of the most prevalent parasitic diseases in tropical countries (WHO
3 2000). Several studies describe different procedures to obtain *Plasmodium* spp. merozoites. It
4 has been reported that merozoites obtained by schizont rupture and differential centrifugation
5 have low viability. Poor viability after schizont rupture may be the main reason why attempts
6 to isolate merozoites are often unsuccessful (Boyle *et al.* 2010). Merozoites obtained by these
7 methods are usually used long after schizont rupture and involves several handling and
8 washing steps (Blackman 1994). Here we developed a simple methodology to obtain infective
9 merozoites to study distinct aspects of their biology. We reported the obtainment of highly
10 purified merozoites with excellent viability and preserved ultrastructure. Filtered merozoites
11 were capable of infecting erythrocytes. In addition, it was demonstrated that the infective
12 merozoites could not survive in activated mice peritoneal macrophages, indicating that these
13 cells may control the survival of these parasites.

14 The obtained merozoites were filtered, but viability of the parasites was preserved.
15 Furthermore, merozoites in suspension were pelleted by centrifugation resulting in
16 agglutination of these cells. Agglutination of merozoites by centrifugation has been reported
17 before (Boyle *et al.* 2010) but did not alter the infectivity of these forms. This is in agreement
18 with merozoites obtained here, which were capable of infecting erythrocytes and activated
19 macrophages indicating that their infectivity was not altered by this agglutination.
20 Transmission electron microscopy of the filtered merozoites showed a homogeneous
21 population with a well-preserved ultrastructure. As expected, it was possible to see hemozoin
22 clusters in the merozoite preparations. During schizont formation, hemozoin is concentrated
23 in a food vacuole in the center of this form (Wendt *et al.* 2016) and when rupture occurs, this
24 food vacuole containing hemozoin is released. Further purification steps, such as magnetic
25 column usage (Hill *et al.* 2014; Mata-Cantero *et al.* 2014), could be used to remove hemozoin
26 from this preparation.

1 Merozoites were able to infect erythrocytes as ring forms were clearly seen. Higher
2 erythrocyte invasion rates were obtained with the lower merozoite:erythrocyte ratio.
3 O'Donovan and Dalton (1993) obtained similar result using a different strain of *P. chabaudi*.
4 However, they perform an assay using infected erythrocytes in co-culture with uninfected
5 erythrocytes. Thus, it was not possible to determine an exact number of merozoites that came
6 from *in vitro* infected erythrocytes. Boyle *et al.* 2010 also obtained a similar result with
7 merozoites of *P. falciparum* whereby increasing the merozoite:erythrocyte ratio results in a
8 lower erythrocyte infection rate. They suggest that a period of competitive exclusion could
9 limit invasion of erythrocytes, supporting that efficient invasion may be limited by an excess
10 of merozoites. Such a hypothesis also seems to apply to *P. chabaudi* merozoites as
11 demonstrated here. The erythrocyte invasion assay described here may serve as an interesting
12 methodology to study the different aspects of the merozoite capacity to infect these cells,
13 allowing testing of invasive blocking compounds and a better understanding of the invasive
14 biology of these forms.

15 Erythrocyte was thought to be the only host cell supportive for the replication and
16 release of *Plasmodium* spp. merozoites. However, studies indicate that *Plasmodium* spp. has a
17 more complex blood-stage life cycle (Huff 1957) as merozoites egressed from erythrocytes
18 invade and replicate in other types of non-phagocytic cells in avian (Huff 1957) and mice
19 (Gueirard *et al.* 2010). In our tests, *P. chabaudi* merozoites were unable to infect LLC-MK2
20 cells *in vitro*. This may be due to the non-phagocytic nature of this cell lineage, limitations of
21 the *in vitro* system, or merozoites may present specie specificity as LLC-MK2 cells are from
22 *Macaca mulatta* kidney.

23 Previous study investigating blood-stage parasites of rodent *Plasmodium* spp. report
24 the existence of sacks of merozoites within macrophages (Landau *et al.* 1999). Interestingly,
25 during *P. yoelii* mice infection, macrophages of the spleen contained vesicles with up to 40
26 merozoites (Mora-Silvera *et al.* 1997). Thus, cells other than erythrocytes were shown to

1 serve as host to blood-stage parasites, and it was suggested that they were in a latent stage in
2 these cells. Here, we infected activated macrophages as a way to test if these cells may serve
3 as a reservoir for merozoites of *P. chabaudi*. Our results showed that after long periods post-
4 infection merozoites were not seen in activated macrophages, and only hemozoin was
5 detected by polarized microscopy. In addition, the generated polyclonal antibody clearly
6 labeled merozoites in macrophages after 2 h post-infection, but merozoite labeling changed to
7 a fussy pattern after long post-infection periods, suggesting parasite degradation followed by
8 dispersion of their antigens. This degradation was further confirmed by transmission electron
9 microscopy where no merozoites were observed in activated macrophages after 24 h post-
10 infection. Therefore, we concluded that merozoites were not able to persist in activated mice
11 peritoneal macrophages. This may be due to high activation by IFN- γ and LPS of
12 macrophages obtained from mice peritoneal cavity stimulated with thioglycolate resulting in
13 macrophages that were too microbicidal. Alternatively, several studies have shown that
14 *Plasmodium* spp. is intimately linked with the host spleen (Bachmann *et al.* 2009; Tsuchida *et*
15 *al.* 1982; Wyler *et al.* 1977) and merozoites may be adapted to deal with macrophages from
16 this organ, even after activation of the immune system. In addition, the parasite of the
17 apicomplexa phylum *Toxoplasma gondii* has a protein known as inhibitor of STAT1-
18 dependent transcription, responsible for blocking IFN- γ dependent transcription, avoiding
19 activation of host cells (Gay *et al.* 2016; Olias *et al.* 2016). Further studies are needed to
20 confirm whether *P. chabaudi* has a similar mechanism that prevents macrophage activation
21 after being infected, explain the obtained results by Landau *et al.* 1999.

22

23 **5. Conclusion**

24 We present a highly efficient methodology for obtaining *P. chabaudi* merozoites. The
25 obtained merozoites may help to improve vaccine and drug development. The interaction

1 kinetics of merozoites with erythrocytes and activated mouse peritoneal macrophages increase
2 our understanding of host-parasite interaction.

3

4 **6. References**

- 5 Bachmann A, Esser C, Petter M, Predehl S, von Kalckreuth V, Schmiedel S, Bruchhaus I,
6 Tannich E (2009) Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family
7 expression in *Plasmodium falciparum* from a splenectomized malaria patient PloS one
8 4:e7459 doi:10.1371/journal.pone.0007459
- 9 Blackman MJ (1994) Purification of *Plasmodium falciparum* merozoites for analysis of the
10 processing of merozoite surface protein-1 Methods in cell biology 45:213-220
- 11 Boyle MJ, Wilson DW, Richards JS, Riglar DT, Tetteh KK, Conway DJ, Ralph SA, Baum J,
12 Beeson JG (2010) Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define
13 erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development Proceedings of the
14 National Academy of Sciences of the United States of America 107:14378-14383
15 doi:10.1073/pnas.1009198107
- 16 Brooks C, Kreier JP (1978) Role of the surface coat in in vitro attachment and phagocytosis
17 of *Plasmodium berghei* by peritoneal macrophages Infection and immunity 20:827-835
- 18 Chimanuka B, Francois G, Timperman G, Vanden Driessche T, Plaizier-Vercammen J (1997)
19 Chronobiology of *Plasmodium chabaudi chabaudi*: analysis of hourly recorded total and
20 differential parasitaemia during a schizogonic cycle Parasite (Paris, France) 4:319-323
21 doi:10.1051/parasite/1997044319
- 22 Cowman AF, Crabb BS (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites Cell 124:755-
23 766 doi:10.1016/j.cell.2006.02.006
- 24 David PH, Hommel M, Benichou JC, Eisen HA, da Silva LH (1978) Isolation of malaria
25 merozoites: release of *Plasmodium chabaudi* merozoites from schizonts bound to

1 immobilized concanavalin A Proceedings of the National Academy of Sciences of the
2 United States of America 75:5081-5084 doi:10.1073/pnas.75.10.5081

3 Dennis ED, Mitchell GH, Butcher GA, Cohen S. (1975) In vitro isolation of *Plasmodium*
4 *knowlesi* merozoites using polycarbonate sieves. Parasitology 71:475-481
5 doi:10.1017/s0031182000047235

6 Dowse TJ, Koussis K, Blackman MJ, Soldati-Favre D (2008) Roles of proteases during
7 invasion and egress by *Plasmodium* and *Toxoplasma* Sub-cellular biochemistry 47:121-
8 139 doi:10.1007/978-0-387-78267-6_10

9 Gay G, Braun L, Brenier-Pinchart MP, Voltaire J, Josserand V, Bertini RL, Varesano A,
10 Touquet B, De Bock PJ, Coute Y, Tardieux I, Bougdour A, Hakimi MA (2016)
11 *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-
12 dependent gene regulation and IFN-gamma-mediated host defenses The Journal of
13 experimental medicine 213:1779-1798 doi:10.1084/jem.20160340

14 Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE (2008)
15 Malaria: progress, perils, and prospects for eradication The Journal of clinical investigation
16 118:1266-1276 doi:10.1172/jci33996

17 Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ,
18 Menard R, Amino R (2010) Development of the malaria parasite in the skin of the
19 mammalian host Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
20 America 107:18640-18645 doi:10.1073/pnas.1009346107

21 Hamburger J, Kreier JP (1975) Antibody-mediated elimination of malaria parasites
22 (*Plasmodium berghei*) in vivo Infection and immunity 12:339-345

23 Hill DL, Eriksson EM, Schofield L (2014) High yield purification of *Plasmodium falciparum*
24 merozoites for use in opsonizing antibody assays Journal of visualized experiments : JoVE
25 doi:10.3791/51590

1 Huff CG (1957) Organ and tissue distribution of the exoerythrocytic stages of various avian
2 malarial parasites *Experimental parasitology* 6:143-162 doi:10.1016/0014-4894(57)90012-
3 7

4 Landau I, Chabaud AG, Mora-Silvera E, Coquelin F, Boulard Y, Renia L, Snounou G (1999)
5 Survival of rodent malaria merozoites in the lymphatic network: potential role in chronicity
6 of the infection *Parasite (Paris, France)* 6:311-322 doi:10.1051/parasite/1999064311

7 Mata-Cantero L, Lafuente MJ, Sanz L, Rodriguez MS (2014) Magnetic isolation of
8 *Plasmodium falciparum* schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized
9 in vitro culture *Malaria journal* 13:112 doi:10.1186/1475-2875-13-112

10 Mitchell GH, Richards WH, Butcher GA, Cohen S (1977) Merozoite vaccination of
11 douroucouli monkeys against falciparum malaria *Lancet* 1:1335-1338 doi:10.1016/s0140-
12 6736(77)92551-x

13 Mora-Silvera E, F. Coquelin, P. Vuong, E. Deharo, P. Gautret, L. Renia, A. Chabaud, I.
14 Landau (1997) Role of macrophages as possible transporters of *Plasmodium yoelii*
15 *nigeriensis* merozoites through the lymphatic system. Preliminary note *Parasite (Paris,*
16 *France)* 4:83-85 doi:10.1051/parasite/1997041083

17 Nillni EA, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB, Wallach DF (1985) Extracellular development
18 of *Plasmodium knowlesi* erythrocytic stages in an artificial intracellular medium *Molecular*
19 *and biochemical parasitology* 17:219-237 doi:10.1016/0166-6851(85)90020-9

20 O'Donovan SM, Dalton JP (1993) An improved medium for *Plasmodium chabaudi* in vitro
21 erythrocyte invasion assays *The Journal of eukaryotic microbiology* 40:152-154
22 doi:10.1111/j.1550-7408.1993.tb04896.x

23 Olias P, Etheridge RD, Zhang Y, Holtzman MJ, Sibley LD (2016) Toxoplasma Effector
24 Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN-
25 gamma-Dependent Gene Expression *Cell host & microbe* 20:72-82
26 doi:10.1016/j.chom.2016.06.006

1 Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA (2004) *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine
2 inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion Biochemical and
3 biophysical research communications 324:744-752 doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.114

4 Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ (2012) The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our
5 understanding of malaria Trends in parasitology 28:73-82 doi:10.1016/j.pt.2011.10.006

6 Tsuchida H, Yamaguchi K, Yamamoto S, Ebisawa I (1982) Quartan malaria following
7 splenectomy 36 years after infection The American journal of tropical medicine and
8 hygiene 31:163-165 doi:10.4269/ajtmh.1982.31.163

9 Wendt C, Rachid R, de Souza W, Miranda K (2016) Electron tomography characterization of
10 hemoglobin uptake in *Plasmodium chabaudi* reveals a stage-dependent mechanism for
11 food vacuole morphogenesis Journal of structural biology 194:171-179
12 doi:10.1016/j.jsb.2016.02.014

13 WHO (2000) Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable
14 Diseases Cluster Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 94
15 Suppl 1:S1-90

16 Wykes MN, Kay JG, Manderson A, Liu XQ, Brown DL, Richard DJ, Wipasa J, Jiang SH,
17 Jones MK, Janse CJ, Waters AP, Pierce SK, Miller LH, Stow JL, Good, MF (2011) Rodent
18 blood-stage *Plasmodium* survive in dendritic cells that infect naive mice Proceedings of the
19 National Academy of Sciences of the United States of America 108:11205-11210
20 doi:10.1073/pnas.1108579108

21 Wyler DJ, Miller LH, Schmidt LH (1977) Spleen function in quartan malaria (due to
22 *Plasmodium inui*): evidence for both protective & suppressive roles in host defense The
23 Journal of infectious diseases 135:86-93 doi:10.1093/infdis/135.1.86

24

1 **4.2. Trabalho 2 (a ser submetido)**

2
3 ***Plasmodium chabaudi* merozoites expose phosphatidylserine and modulate**
4 **nitric oxide production of activated macrophages**

5 Pedro Souto Rodrigues^{1,2}, Natália de Souza Almeida¹, João Luiz Mendes Wanderley³, Sergio
6 Henrique Seabra^{1,2*}, Renato Augusto DaMatta^{1*}

7
8 1- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual,
9 Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, 28013-602

10 2- Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia, Rio
11 de Janeiro, RJ, Brasil, 23070-200

12 3- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Imunoparasitologia, Macaé, RJ, Brasil, 27930-560

13 * Correspondence:

14 Sergio Henrique Seabra: seabrash@gmail.com,

15 Renato Augusto DaMatta: renato@uenf.br

16 **Abstract**

17 Malaria is one of the most prolific parasitic diseases. This disease occurs during the blood-stage
18 of the parasite's life cycle, where the parasite is thought to replicate exclusively within
19 erythrocytes. *Plasmodium* spp. can persist after the original bout of infection has apparently
20 cleared in the blood, suggesting that host cells other than erythrocytes and hepatocytes may
21 harbor these blood-stage parasites, thereby assisting their escape from host immunity. Some
22 intracellular parasites expose phosphatidylserine (PS) generating anti-inflammatory responses,
23 such as lower production of nitric oxide (NO) by macrophages, a concept known as "apoptotic
24 mimicry". We verified whether merozoites of *Plasmodium chabaudi*, an excellent model for
25 human malaria caused by *P. falciparum*, expose PS, reduce NO production by macrophages,
26 modulated the expression of inducible NO synthase (iNOS) and verified lysosomal fusion to
27 vacuoles containing merozoites. About 50% of the *P. chabaudi* merozoites exposed PS.
28 Macrophages infected with merozoites for 24 and 48 h produced less NO. This result was
29 confirmed by the detection of lower iNOS expression after 24 h of infection of macrophages.
30 In addition, lysosomal fusion to vacuoles containing merozoites, as assayed by localizing
31 lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1), was observed after 6 h of macrophage
32 infection. We show evidence that *P. chabaudi* performs apoptotic mimicry, generating an anti-

1 inflammatory response in macrophages. However, this response was not strong enough to
2 prevent fusion with lysosomes.

3

4 **Introduction**

5 It is well established that apoptotic cells play a role in parasitic infections [1].
6 Translocation of PS to the outer layer of the plasma membrane is a characteristic of apoptotic
7 cells [2]. Parasitic protozoa avoid the host's immune system to establish an infection. It is
8 possible that the success of *Plasmodium* spp. infection is related to the evasive mechanism
9 called apoptotic mimicry. Classical apoptotic mimicry is centered in the exposure of PS at the
10 outer layer of the plasma membrane by viable cells or viruses and consists in an evasion
11 mechanism of the host's immune system described in at least 3 protozoan parasites [3-5]. The
12 recognition of PS by phagocytes of the host immune system triggers endocytosis of the target
13 cell and induces an anti-inflammatory and immunosuppressive responses [6]. The effects
14 caused by the recognition of PS in the regulation of inflammation is advantageous for the
15 success of the parasite [7]. Apoptotic mimicry has been recognized as an evasion mechanism
16 used by intracellular parasites in which the exposed PS acts as a signal for the internalization
17 of the parasite in host cells and induces a decrease in the production of NO by macrophages,
18 the main microbicidal agent against parasites [8].

19 Some *Plasmodium* spp. infections persist for years and sometimes for the life of the
20 host, but the process are not fully understood [9]. The existence of sacks of merozoites within
21 macrophages and polymorphonuclear leukocytes in the spleen has been reported in an *in vivo*
22 murine model [10]. Therefore, it is possible that some macrophages serve as reservoirs,
23 responsible for host re-infection [9]. Apoptotic mimicry may be responsible for allowing
24 merozoites of *P. chabaudi* to survive inside murine spleen macrophages, by modulating the
25 expression of the iNOS enzyme and consequently NO production.

26 Rodrigues *et al.* submitted [11], demonstrated an efficient technique to obtain
27 merozoites from *P. chabaudi* through natural egress, differential centrifugations and a filtering
28 process. To verify whether apoptotic mimicry may be extended to merozoites of *Plasmodium*
29 *chabaudi*, PS exposure was analyzed and activated murine macrophages were infected, and
30 production of NO and expression of iNOS were evaluated. In addition, lysosomal fusion to
31 internalized merozoites was evaluated. We suggest that apoptotic mimicry may be extended to
32 *P. chabaudi* merozoites reinforcing the hypothesis that this is a mechanism common to
33 intracellular parasitic protozoa.

1 **Methods**

2 **Mice Infection and natural synchronization**

3 Balb/c mice (6-8 weeks) were kept in a room with a 12h light (10:00 – 22:00) and 12h dark
4 (22:00 – 10:00) period. *Plasmodium chabaudi* (AJ strain) was maintained by inoculation of
5 infected erythrocytes in the peritoneal cavity of mice every 6-7 days. As *P. chabaudi* is synced
6 with the host's melatonin [12], it is possible to obtain erythrocytes enriched with a specific
7 blood parasite form depending on the hour in which the blood of the animal is collected [13].
8 Animal usage was approved by the Animal Ethics Committee of the *Universidade Estadual do*
9 *Norte Fluminense Darcy Ribeiro*, protocol ID 320.

10

11 **Obtaining *Plasmodium chabaudi* merozoites**

12 Merozoites were obtained as described by Rodrigues *et al.* submitted [11]. Blood was taken
13 with a syringe with 0.1 ml of 3.7% of sodium citrate by cardiac puncture 3 h before the first
14 hour of light (7:00) for the obtainment of erythrocytes enriched with mature schizonts. Blood
15 taken from 2 animals (± 1 ml per animal) was centrifuged at 200g for 10 min, the supernatant
16 was discarded and 5 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with
17 10% fetal bovine serum (FBS) was added to the pellet and further incubated for 30 min at 37°C
18 for the natural egress of merozoites. The solution was centrifuged at 200g for 10 min and the
19 supernatant with free merozoites was centrifuged at 4000g for 20 min in 4 microtubes (1.5 ml).
20 The supernatant was discarded, the pellet resuspended in 10 ml of DMEM and filtered (3.0 μ m
21 – Millipore filter ref. TSTP02500). Merozoites were quantified by direct counting of parasites
22 on slides obtained after cytocentrifugation as described by Rodrigues *et al.* submitted [11].

23 **Flow cytometry evaluation**

24 Merozoites were incubated for 30 min with Annexin V-Alexa Fluor 488 (1 μ g / 1×10^5 cells)
25 in calcium buffer (25 μ M CaCl₂, 100 μ M HEPES, 14 mM NaCl), 5 min before reading
26 propidium iodide (PI) (3 μ g/mL) was added to the parasite suspension. For control of PS
27 labeling, merozoites were incubated for 30 min with Annexin V-Alexa Fluor 488 and PI as
28 above but in phosphate buffered saline (PBS) containing 5 μ M of ethylene glycol-bis (β -
29 aminoethyl ether) -N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA). For control of PI staining, parasites
30 were incubated with Annexin V-Alexa Fluor 488 and PI as above in PBS containing 0.5%
31 Triton X-100 for 15 min. To ensure that the events came from merozoites and not from other
32 blood components, merozoites were also incubated with polyclonal anti-merozoite antibody

1 (see below) and Annexin V-Alexa Fluor 488 in calcium buffer. Cells were assessed on a
2 FACScalibur flow cytometer. Data were analyzed in the FlowJo X10.0.7 program.

3

4 **Activation of peritoneal macrophages and interaction with parasites**

5 Macrophages were obtained by peritoneal lavage (5 ml of acidified DMEM, pH=5) of Balb/c
6 mice that had their peritoneal cavity stimulated 4 days earlier with 1 ml of 3% sodium
7 thioglycolate. Macrophages were centrifuged, counted and plated on glass coverslips on 24-
8 well-culture plates. After 1 h of adhesion at 37°C, cells were washed with PBS at 37°C, and
9 cultivated for 24 h with DMEM containing 5% FBS, lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml) and
10 interferon- γ (IFN- γ) (50 U/ml) at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. After 24 h, cells were washed
11 and merozoites added to macrophages in a 10:1 parasites:macrophage ratio. After 2 h, cells
12 were washed with PBS, some cells adhered to coverslips were collected, and the remaining
13 cells were further cultivated for 24 and 48 h in the same culture medium.

14

15 **Analysis of nitric oxide production**

16 Analysis of NO production was evaluated indirectly by the colorimetric reading of nitrite in the
17 different culture supernatants (24 and 48 h) using the Griess reagent. The supernatants will be
18 mixed in a 1: 1 ratio with the Griess reagent (1 volume of 1% sulfanilamide in 5%
19 orthophosphoric acid in deionized water with an equal volume of 0.1% N- [1-Naphthyl]
20 Ethylenediamine in deionized water). After 10 minutes, the mixture was analyzed in an ELISA
21 reader (540 nm) and the quantification of NO production based on the standard curve will be
22 done with defined amounts of sodium nitrite, diluted in the DMEM culture medium.

23

24 **Production of anti-merozoite polyclonal**

25 An anti-merozoite polyclonal antibody was obtained using a standard immunization protocol.
26 CB57BL/6 mice (weighing about 20 g) previously infected for 4 months with *P. chabaudi* (AS
27 strain) were inoculated intraperitoneally with 200 μ l of PBS containing 1×10^5 dead merozoites.
28 Merozoites were obtained as described by Rodrigues *et al.*, submitted, filtered, quantified and
29 submitted to three cycles of freeze and thaw. Previously infected animals were inoculated 4
30 times, once a week. In the first 2 inoculations 1 mg of Al(OH)₃ per animal was used as an
31 adjuvant. In the 5th week, animals were euthanized, blood removed and plasma obtained. The

1 presence of anti-merozoites antibodies was assayed by immunolocalizing merozoites in
2 macrophages.

3

4 **Analysis of the expression of the iNOS enzyme in activated peritoneal macrophages of** 5 **mice infected with *P. chabaudi***

6 After interactions for 24 h of *P. chabaudi* merozoites with activated macrophages, the
7 expression of the iNOS enzyme was analyzed. The cells were fixed with 4% nascent
8 formaldehyde in PHEM buffer (60 mM Pipes, 20 mM Hepes, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 70
9 mM KCl), pH 7.2. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PHEM buffer for 10
10 min, and incubated with ammonium chloride (50mM) in the same buffer and 3% bovine serum
11 albumin (BSA) in PHEM buffer, respectively, for 10 min. Cells were incubated with anti-iNOS
12 antibody diluted 1: 100 in 3% BSA in PHEM buffer for 1 h and with polyclonal anti-merozoite
13 antibody, diluted 1: 800 in the same buffer for 1 h. The cells were washed, blocked with 3%
14 BSA in PHEM buffer and incubated for 1 h with secondary Alexa anti-rabbit-488 antibody
15 (Molecular Probes) and anti-mouse TRITC (Sigma) diluted in 3% BSA in PHEM. The cells
16 were washed and mounted with ProlongGold with DAPI (Invitrogen), and observed under an
17 Axioplan Zeiss fluorescence microscope equipped with epifluorescence illumination and
18 HBO100 mercury lamp. The images were captured with the actiovision program (Zeiss) and
19 processed in Adobe Photoshop CS3.

20

21 **Analysis of the occurrence of lysosomal fusion using LAMP-1**

22 After interactions for 6 h of *P. chabaudi* merozoites with activated macrophages, cells were
23 fixed with 4% nascent formaldehyde in PHEM buffer, pH 7.2. The samples were processed as
24 described above for double labeling of iNOS and parasites. Cells labeled to detect LAMP1 (BD
25 Bioscience) before mounting with ProlongGold with DAPI (Invitrogen) and observed under an
26 Axioplan Zeiss fluorescence microscope equipped with epifluorescence illumination and
27 HBO100 mercury lamp. The images were captured and processed as before.

28

29 **Statistical analysis**

30 The results were expressed as means and standard deviation. The variances between three
31 independent experiments were analyzed using the One Way ANOVA test, followed by Tukey's

1 post-test in the Graph-Pad Prism 5.0 statistical program. $P < 0.05$ values were considered
2 significant.

3

4 **Results**

5 PS exposure profile of merozoites was performed before and after filtration. About half
6 of the *P. chabaudi* merozoite population exposed PS (Fig. 1 A). The filtering process did not
7 change the merozoites PS exposure profile, but removed contaminating blood cells increasing
8 the events corresponded to the parasite. Annexin-V only binds PS in the presence of calcium
9 [5]. Our control showed that annexin-V labeling was specific since merozoites were incubated
10 with Annexin-V in PBS with EGTA (calcium chelator) were negative for annexin-V. Cells
11 incubated with Triton X-100 and PI were used as a viability control, showing that, in fact, *P.*
12 *chabaudi* merozoites expose PS and are viable (Fig. 1C, F). PS exposure was confirmed by
13 labeling parasites, filtered or not, with the polyclonal anti-merozoite antibody and Annexin-V
14 (Fig 2).

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

Figure 1

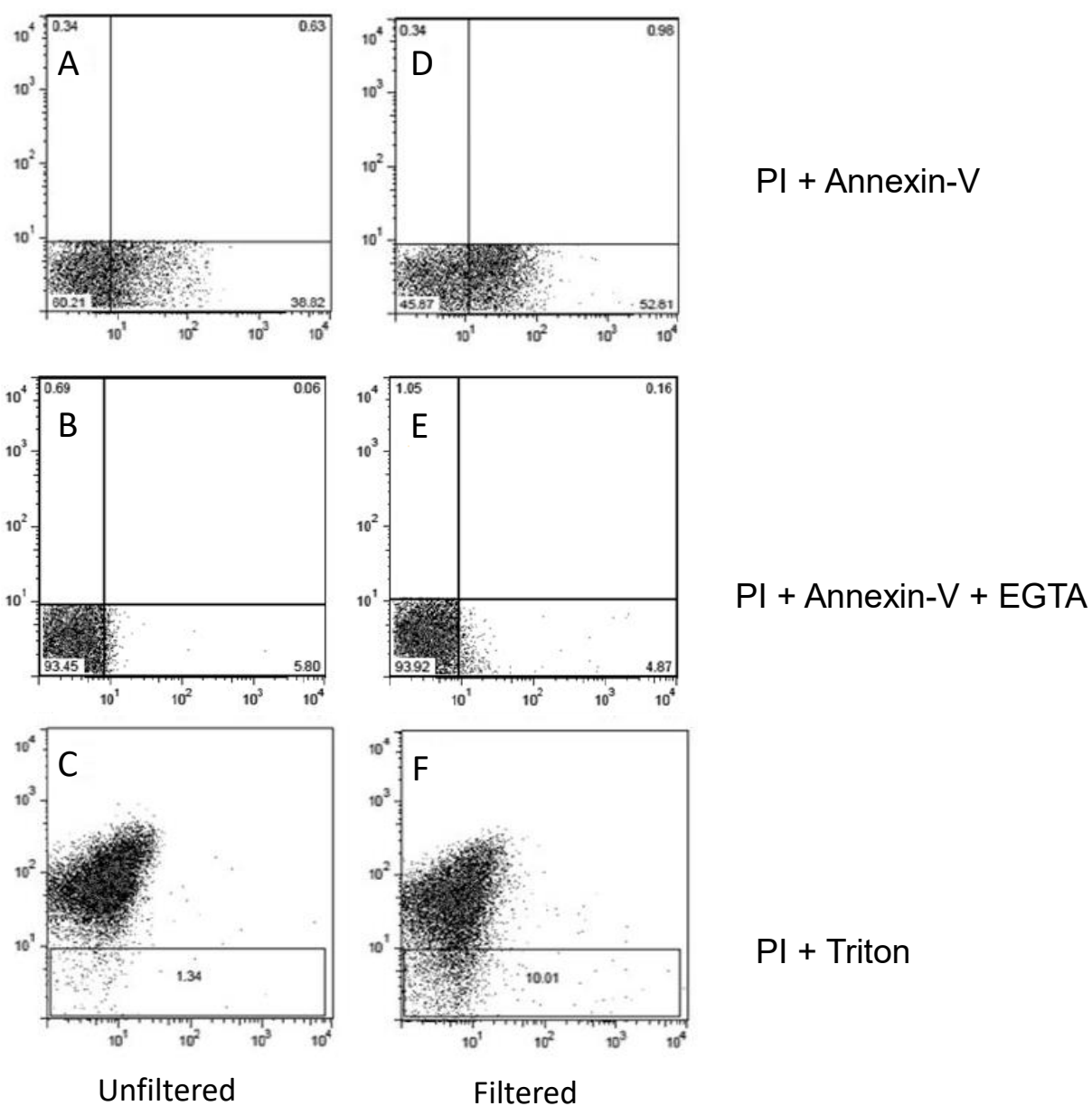


Figure 1 - Flow cytometry analyses of phosphatidylserine exposure of merozoites of *Plasmodium chabaudi* obtained without (A – C) or after filtration (D – F). A and D, merozoites stained with propidium iodide (PI) and annexin-V. B and E, merozoites stained with PI and annexin-V in EGTA buffer. C and F, merozoites stained with PI and annexin-V in buffer containing Triton x-100.

Figure 2

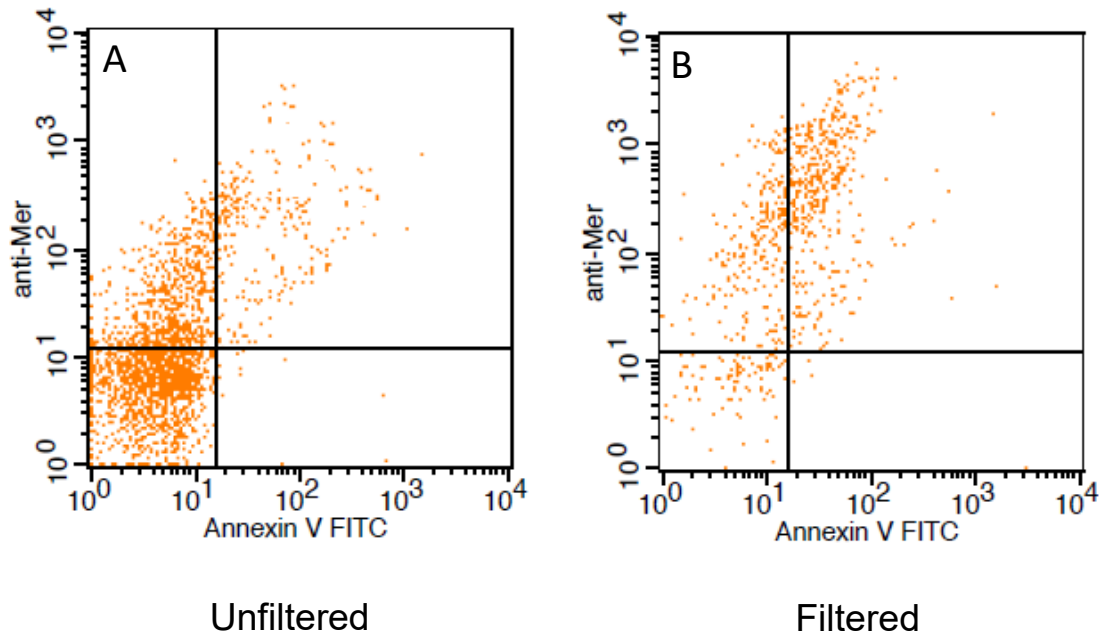
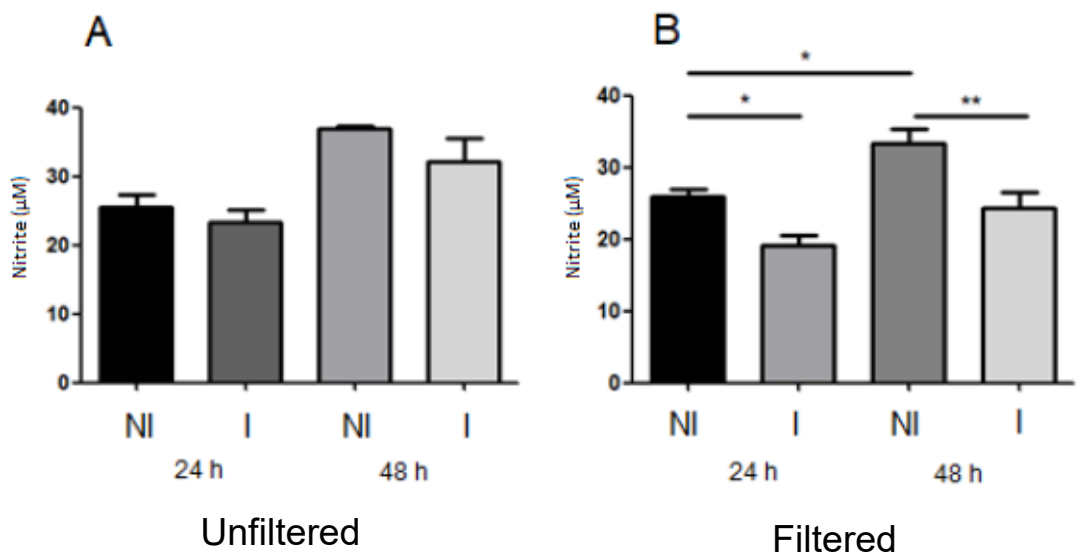


Figure 2 - Analysis of phosphatidylserine exposure by flow cytometry of unfiltered (A) and filtered (B) *P. chabaudi* merozoites labeled with polyclonal anti-merozoite antibody, annexine-V and PI. The exposure pattern looks consistent with the one shown in Figure 1.

1 Macrophage infection with unfiltered merozoites could not decrease NO production
 2 (Fig. 3A). However, filtered merozoites were able to reduce NO production after 24 h and 48 h
 3 of infection (Fig. 3 B). Such results were compatible with the iNOS expression that was lower
 4 in infected macrophages (Fig. 4). In addition, lysosomal fusion to merozoites containing
 5 vacuoles were observed in activated macrophages after 6 h of interaction (Fig. 5).

6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 Figure 3



15
 16
 17
 18 Figure 3 - Nitric oxide (µM) production of activated mouse peritoneal macrophages infected (I) or not (NI) with
 19 merozoites of *Plasmodium chabaudi* for 24 h and 48 h. Merozoites were used to infect macrophages without (A)
 20 or after filtration (B). Significantly different by the one-way ANOVA with Tukey post-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

Figure 4

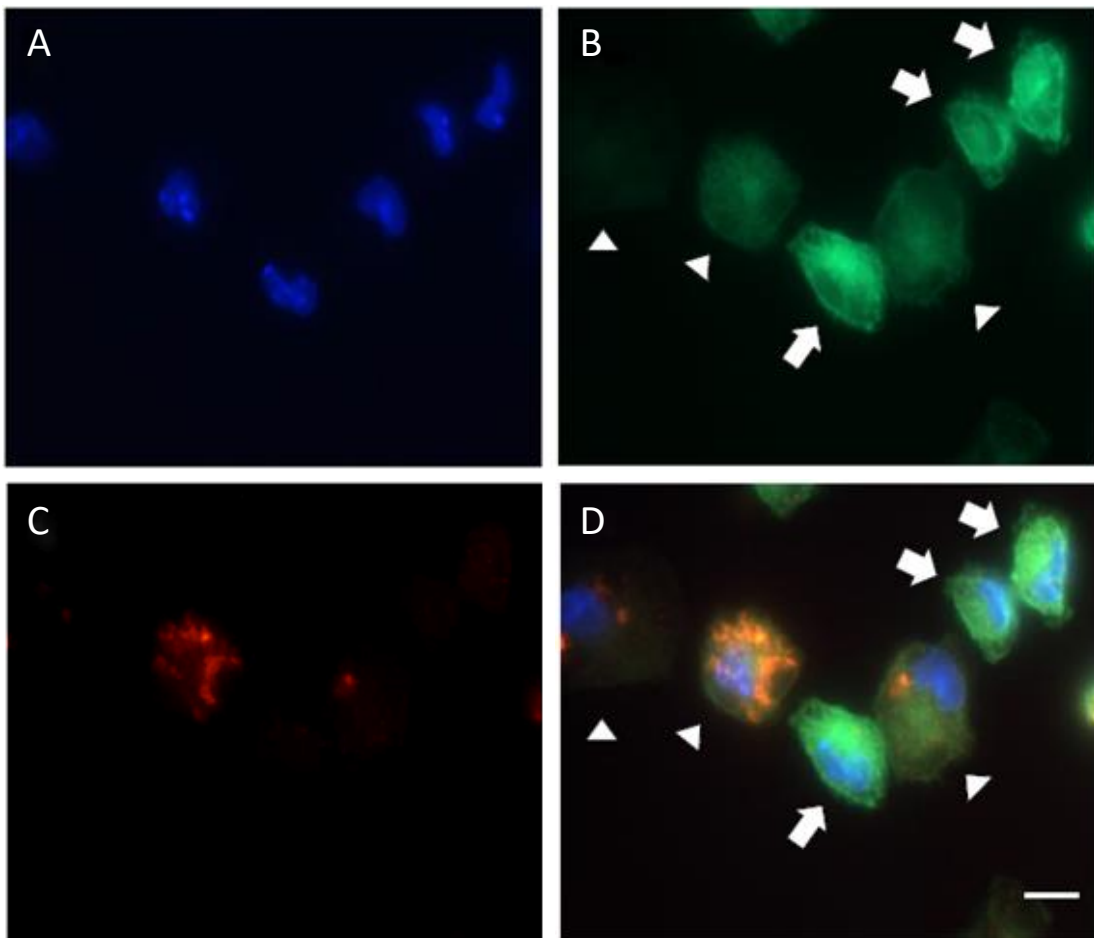


Figure 4 - Immunolocalization of merozoites and iNOS after 24 h of infection of activated mouse peritoneal macrophages. Note that infected macrophages (arrowheads) have lower iNOS expression than uninfected macrophages (arrows). A- DAPI, B- iNOS, C- Merozoites, D- Merge. Bar=20 μ m.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Figure 5

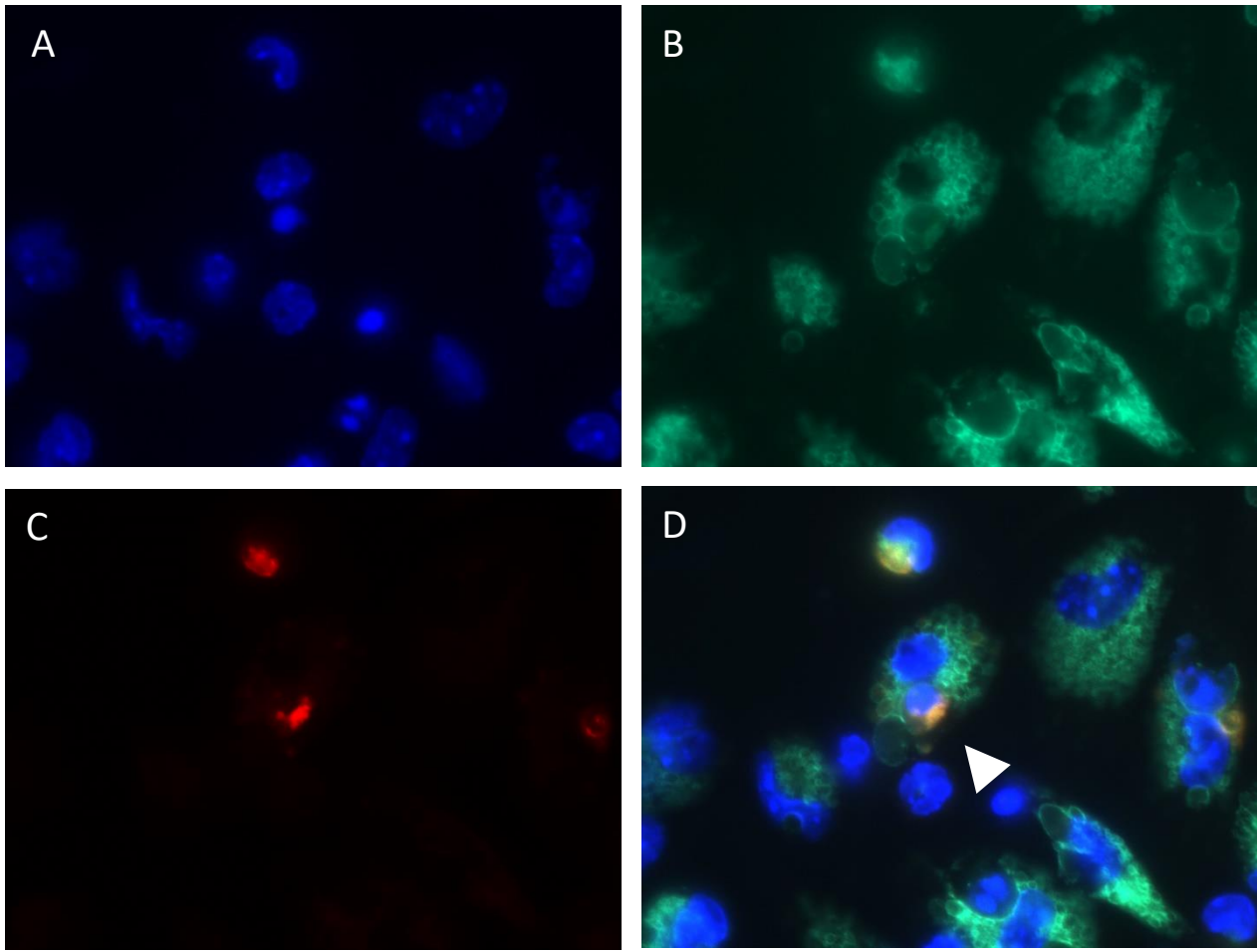


Figure 5 - Analysis of lysosomal fusion to vacuoles containing merozoites of *Plasmodium chabaudi* by labeling lysosomal associated membrane protein 1(LAMP-1) of activated peritoneal macrophages after 6 h of infection. Note that it is possible to observe the lysosomal fusion with the vacuole (arrowhead). A- DAPI, B- LAMP-1, C- Merozoites, D- Merge. Bar=20μm.

1 Discussion

2

3 Phosphatidylserine, a phospholipid found in the plasma membrane, may be exposed by
4 cells, and causes lower production of NO in activated macrophages [2]. Since *Leishmania* spp.
5 [5], *Toxoplasma gondii* [3] and *Trypanosoma cruzi* [4] expose PS generating anti-inflammatory
6 response, we verified if *P. chabaudi* merozoites expose this phospholipid and reduce NO
7 production of macrophages. Half of the *P. chabaudi* merozoite population exposes PS even
8 though they are viable. This result was confirmed using a polyclonal anti-merozoite antibody,
9 thus ensuring that the events shown are related to merozoites and not to other blood
10 components. Merozoites were able to partially inhibit the production of NO in activated
11 macrophages by decreasing the expression of iNOS. However, in an analysis using LAMP-1
12 labeling, it was seen that merozoites are unable to prevent lysosomal fusion, being eventually
13 degraded. Although merozoites were inhibiting NO production of infected macrophages, they
14 could not avoid lysosomal fusion possibly explaining why they were destroyed in activated
15 macrophages.

16 Exposure of PS by merozoites was confirmed and, surprisingly, the proportion of the
17 population that exposes PS is the same as infective forms of *Leishmania* spp. [5], *T. gondii* [3]
18 and *T. cruzi* [4]. There was a concern that contaminating erythrocytes and other blood cells
19 would be present in our samples, giving a false negative for PS exposure and for that reason we
20 performed analyzes using a polyclonal anti-merozoite antibody. Thus, we guarantee that all
21 events analyzed would also be positive for merozoites labeling. The methodology described by
22 Rodrigues *et al.*, [11] proved to be very efficient, generating merozoites with a very low degree
23 of contamination and because of this, the results using anti-merozoite polyclonal antibodies and
24 annexin-V were compatible with the results obtained using annexin-V and PI labeling. In a
25 study using tachyzoites from *T. gondii*, Santos *et al.* [14] isolated subpopulations that expose
26 PS and the other that do not. The subpopulation that exposed PS was the only one capable of
27 active invasion of host cells and inhibited production of NO in activated macrophages.
28 However, mice infection showed that both subpopulations are necessary for the balance of the
29 immune response, since an infection with only the subpopulation that exposes PS leads to a
30 high parasitic load. An infection with the subpopulation that does not expose PS leads to an
31 exacerbated inflammatory process. In both cases, the animal's viability is compromised. We
32 believe that PS is also important in the balance of the host's immune response in infections by
33 *Plasmodium* spp., since the same proportion of parasites were exposing PS as found in other
34 species of intracellular parasites.

1 *Plasmodium chabaudi* was able to partially inhibit NO production in activated
2 macrophages. Surprisingly, merozoites were only able to inhibit the expression of iNOS and,
3 consequently, the NO levels after being filtered as described in the method of Rodrigues *et al.*
4 submitted [11]. This is probably due to the presence of hemozoin, which is partially removed
5 in the filtration process. Hemozoin is often associated with malaria DNA and although the
6 malaria genome is extremely rich in AT, its DNA is highly pro-inflammatory [15]. *Plasmodium*
7 *chabaudi* is capable of modulating NO production by regulating iNOS expression. This
8 mechanism has been demonstrated in infective forms of several parasitic protozoa [3-5],
9 suggesting that apoptotic mimicry may be extended to *P. chabaudi*. Further studies blocking
10 merozoite PS with annexin-V or antibodies against PS are necessary to confirm the role of PS
11 exposure in NO production modulation. It has been demonstrated with *P. chabaudi* merozoites
12 survive in a latent form within macrophages from the spleen of infected mice [10]. Our
13 hypothesis is that the *P. chabaudi* merozoites perform apoptotic mimicry and generate an anti-
14 inflammatory response in these macrophages, which allows them to remain in a latent state.
15 However, Rodrigues *et al.* [11] reported that merozoites do not survive after interaction with
16 classically activated murine macrophages. We believe that this can be explained by the
17 macrophages used by Rodrigues *et al.* [11], being previously activated, whereas those used by
18 Landau *et al.* [10] would initially be residents (not activated), since the experiments were
19 carried out *in vivo*. Resident macrophages could be prevented from being activated by a protein
20 with a similar role to inhibitor of STAT1-dependent transcription, which is found in *T. gondii*
21 (TgIST). In *T. gondii*, TgIST is responsible for blocking IFN- γ dependent transcription,
22 avoiding activation of host cells [16, 17]. We searched for the conserved protein between *T.*
23 *gondii* and *P. chabaudi*, using data obtained from the ToxoDB database, without success.
24 Further studies are needed to confirm whether *P. chabaudi* has an analogous protein that
25 prevents macrophage activation after being infected, explaining the conflicting results obtained
26 by Landau *et al.* [10] and Rodrigues *et al.* [11].

27 Analysis of the presence of lysosomal fusion using LAMP-1 showed that *P. chabaudi*
28 merozoites were unable to inhibit lysosomal fusion in activated macrophages. This is a probable
29 explanation for merozoites to be degraded after interaction with activated macrophages, even
30 though they have the ability to partially inhibit the production of NO in these cells, they cannot
31 generate a pro-inflammatory response capable to inhibit lysosomal fusion. Wykes *et al.* [9]
32 found similar results using *P. berghei*. They report that some parasites are able to inhibit
33 lysosomal fusion in dendritic cells, while others are degraded.

1 In conclusion, *P. chabaudi* merozoites may realize “apoptotic mimicry”, reinforcing the
2 hypothesis that such evasive mechanism is common to parasitic protozoa that interact with
3 macrophages. The PS exposure seems to have fundamental role in the parasitic protozoa
4 infective process.

6 References

- 7 1. DosReis GA, Barcinski MA: Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host
8 immune response. *Adv Parasitol* 2001, 49:133-161.
- 9 2. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure
10 of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition
11 and removal by macrophages. *J Immunol* 1992, 148:2207-2216.
- 12 3. Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA: Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine
13 inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys*
14 *Res Commun* 2004, 324:744-752.
- 15 4. DaMatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhaes L, Goldenberg S, de
16 Souza W: Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS*
17 *Microbiol Lett* 2007, 266:29-33.
- 18 5. de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G,
19 Pirmez C, Barcinski MA: Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite
20 downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 2001, 11:1870-1873.
- 21 6. Erwig LP, Henson PM: Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*
22 2008, 15:243-250.
- 23 7. Wanderley JLM, DaMatta RA, Barcinski MA: Apoptotic mimicry as a strategy for the
24 establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived phosphatidylserine as key
25 molecule. *Cell Commun Signal* 2020, 18:10.
- 26 8. James SL: Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev* 1995, 59:533-
27 547.
- 28 9. Wykes MN, Kay JG, Manderson A, Liu XQ, Brown DL, Richard DJ, Wipasa J, Jiang
29 SH, Jones MK, Janse CJ, et al: Rodent blood-stage Plasmodium survive in dendritic cells that
30 infect naive mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:11205-11210.
- 31 10. Landau I, Chabaud AG, Mora-Silvera E, Coquelin F, Boulard Y, Renia L, Snounou G:
32 Survival of rodent malaria merozoites in the lymphatic network: potential role in chronicity of
33 the infection. *Parasite* 1999, 6:311-322.
- 34 11. Rodrigues PS AM, Almeida NS, Almeida GGCG, Wanderley JLM, Seabra SH,
35 DaMatta RA.: *Plasmodium chabaudi* merozoites obtained through an improved method do
36 not survive in activated macrophages *in vitro*. *Exp Parasitol* 2020.

- 1 12. Wendt C, Rachid R, de Souza W, Miranda K: Electron tomography characterization of
2 hemoglobin uptake in Plasmodium chabaudi reveals a stage-dependent mechanism for food
3 vacuole morphogenesis. *J Struct Biol* 2016, 194:171-179.
- 4 13. Chimanuka B, Francois G, Timperman G, Vanden Driessche T, Plaizier-Vercammen
5 J: Chronobiology of Plasmodium chabaudi chabaudi: analysis of hourly recorded total and
6 differential parasitaemia during a schizogonic cycle. *Parasite* 1997, 4:319-323.
- 7 14. Santos TA, Portes Jde A, Damasceno-Sa JC, Caldas LA, Souza W, DaMatta RA,
8 Seabra SH: Phosphatidylserine exposure by Toxoplasma gondii is fundamental to balance the
9 immune response granting survival of the parasite and of the host. *PLoS One* 2011, 6:e27867.
- 10 15. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, Halmen KA,
11 Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu DC, et al: Malaria hemozoin is immunologically inert
12 but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9.
13 *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:1919-1924.
- 14 16. Olias P, Etheridge RD, Zhang Y, Holtzman MJ, Sibley LD: Toxoplasma Effector
15 Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN-gamma-
16 Dependent Gene Expression. *Cell Host Microbe* 2016, 20:72-82.
- 17 17. Gay G, Braun L, Brenier-Pinchart MP, Vollaire J, Josserand V, Bertini RL, Varesano
18 A, Touquet B, De Bock PJ, Coute Y, et al: Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin
19 repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN-gamma-mediated host
20 defenses. *J Exp Med* 2016, 213:1779-1798.

21

1 **5. Discussão**

2 A malária é uma das doenças parasitárias mais prevalentes nos países tropicais (WHO
3 2000). Vários estudos descrevem diferentes procedimentos para obter merozoítos de espécies
4 de *Plasmodium*, mas merozoítos normalmente tem baixa viabilidade após a ruptura do
5 esquizonte (Mitchell *et al.* 1977; Boyle *et al.* 2010) e essa pode ser a principal razão pela qual
6 as tentativas de descrever um método capaz de isolar os merozoítos geralmente não são bem-
7 sucedidas (Boyle *et al.* 2010). O principal motivo para isso é que merozoítos obtidos por esses
8 métodos geralmente são usados muito tempo após a ruptura do esquizonte e envolvem várias
9 etapas de lavagem e centrifugações (Blackman 1994). Desenvolvemos uma metodologia
10 simples e altamente reproduzível para obtenção de merozoítos infectivos com objetivo de
11 estudar aspectos distintos de sua biologia. Relatamos a obtenção de merozoítos purificados com
12 excelente viabilidade e ultraestrutura preservada. Além disso, com o objetivo de entender
13 melhor o mecanismo pelo qual merozoítos sobrevivem dentro de macrófagos (Landau *et al.*
14 1999) e outras células fagocíticas (Wykes *et al.* 2011), avaliamos a exposição de PS por
15 merozoítos e medimos a produção de NO por macrófagos ativados após a infecção.

16 Os merozoítos obtidos foram filtrados e esse procedimento não alterou a sua viabilidade.
17 Durante a preparação, os merozoítos em suspensão foram centrifugados e isso resultou em
18 aglutinação dessas células. A aglutinação de merozoítos devido a centrifugação já foi relatada
19 antes (Boyle *et al.* 2010), mas isso não alterou a sua infectividade, pois foram capazes de
20 infectar eritrócitos, macrófagos ativados e camundongos. A microscopia eletrônica de
21 transmissão dos merozoítos filtrados mostrou uma população homogênea com uma
22 ultraestrutura bem preservada. David *et al.* 1978 relataram resultados semelhantes. No entanto,
23 apesar de seus merozoítos estarem com a ultraestrutura bem preservada, a taxa de viabilidade
24 foi baixa e a sua habilidade de infectar outras células não foi avaliada. Durante a esquizogonia,
25 a hemozoína é concentrada em um vacúolo (Wendt *et al.* 2016) e quando ocorre a ruptura, esse
26 vacúolo contendo hemozoína é liberado. Foi possível visualizar aglomerados de hemozoína
27 provenientes de esquizontes nas preparações de merozoítos. Outras etapas de purificação, como
28 o uso de colunas magnéticas (Hill *et al.* 2014; Mata-Cantero *et al.* 2014), podem ser usadas para
29 remover a hemozoína desta preparação. Entretanto, merozoítos perdem a sua habilidade de
30 infectar eritrócitos *in vitro* em poucos minutos (Boyle *et al.* 2010; Johnson *et al.* 1980) e o uso
31 de coluna magnética provavelmente diminuiria a infectividade dessas células pois envolve
32 diversas etapas que demandam um certo tempo.

33 Os merozoítos obtidos após a filtração foram capazes de infectar eritrócitos, visto que
34 formas em anel eram claramente observadas após 30 minutos de interação *in vitro*. Taxas mais

1 altas de invasão de eritrócitos foram obtidas com a menor razão merozoito: eritrócito.
2 O'Donovan & Dalton (1993) obtiveram resultados semelhantes usando uma cepa diferente de
3 *P. chabaudi*. No entanto, eles realizam um ensaio usando eritrócitos infectados em co-cultura
4 com eritrócitos não infectados. Assim, não foi possível determinar um número exato de
5 merozoítos provenientes de eritrócitos infectados *in vitro*. Boyle *et al.* 2010 também obtiveram
6 resultados semelhantes usando merozoítos de *P. falciparum*, com uma maior proporção de
7 merozoítos: eritrócitos, resultando em uma menor taxa de infecção por eritrócitos. É sugerido
8 que um período de exclusão competitiva pode limitar a invasão de eritrócitos, sugerindo que a
9 invasão eficiente pode ser limitada por um excesso de merozoítos. Nossos resultados sugerem
10 que tal hipótese também parece se aplicar aos merozoítos de *P. chabaudi*. Futuros experimentos
11 de invasão utilizando outras variáveis como temperatura, pH e tempos menores são necessários
12 para determinar o efeito do ambiente no processo de invasão de eritrócitos.

13 O eritrócito não é única célula capaz de suportar a invasão, replicação e liberação de
14 merozoítos de espécies de *Plasmodium*, visto que os merozoítos egressos dos eritrócitos
15 invadem e se replicam em outros tipos de células não fagocíticas em aves (Huff 1957) e
16 camundongos (Gueirard *et al.* 2010). Em nossos testes, os merozoítos de *P. chabaudi* não foram
17 capazes de infectar células LLC-MK2 *in vitro*, provavelmente porque merozoítos de *P.*
18 *chabaudi* apresentam alguma especificidade de espécie, pois as células LLC-MK2 são do rim
19 de *Macaca mulata*. Células endoteliais tem uma forte relação com *Plasmodium* spp. e já foi
20 visto que esporozoítos e merozoítos são capazes de invadir e realizar esquizogonia nessas
21 células, liberando novos merozoítos que chegam ao sistema linfático (Huff 1957; Gueirard *et*
22 *al.* 2010). Novos ensaios de interação utilizando merozoítos obtidos pela nossa metodologia e
23 células endoteliais de camundongos C166 (ATCC CRL-2581) são necessários para verificar o
24 provável processo infectivo.

25 Estudos anteriores investigando parasitos em estágio sanguíneo de roedores
26 *Plasmodium* spp. relatam a existência de sacos de merozoítos dentro de macrófagos (Landau *et*
27 *al.* 1999). Curiosamente, durante a infecção de camundongos usando *P. yoelii nigeriensis*, os
28 macrófagos do baço também continham vesículas com até 40 merozoítos (Mora-Silvera *et al.*
29 1997). Assim, outras células que não os eritrócitos servem de reservatórios para os parasitos do
30 estágio sanguíneo. Infectamos macrófagos ativados como uma maneira de testar se essas células
31 podem servir como reservatório de merozoítos de *P. chabaudi*. Nossos resultados mostraram
32 que após longos períodos de interação não foram observados merozoítos em macrófagos
33 ativados, e somente hemozoína foi detectada por microscopia de polarização.

1 O controle do anticorpo policlonal produzido se mostrou específico, uma vez que não
2 houve marcação ao incubar com macrófagos não infectados. Além disso, o anticorpo produzido
3 marcou merozoítos em macrófagos após 2 h de interação, mas essa marcação mudou para um
4 padrão difuso após longos períodos, sugerindo degradação do parasito seguida de dispersão de
5 seus antígenos. Esta degradação foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão,
6 onde não foram observados merozoítos em macrófagos ativados após 24 h de interação.
7 Portanto, concluímos que os merozoítos não foram capazes de persistir em macrófagos
8 peritoneais de camundongos ativados. Tais resultados são aparentemente conflitantes com os
9 da literatura, visto que estudos mostraram formas latentes de merozoítos dentro de macrófagos
10 em infecções *in vivo* (Landau *et al.* 1999; Mata-Cantero *et al.* 1997). O parasito, do filo
11 apicomplexa, *T. gondii* possui uma proteína conhecida como inibidor da transcrição dependente
12 de Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (TgIST), responsável por bloquear a
13 transcrição dependente de IFN- γ , evitando a ativação de células hospedeiras (Gay *et al.* 2016;
14 Olias *et al.* 2016). Estudos usando macrófagos residentes e com diferentes perfis de ativação
15 são necessários para confirmar se *P. chabaudi* possui um mecanismo parecido para impedir a
16 ativação de macrófagos após a infecção e conseqüentemente inibindo a expressão de iNOS e
17 produção de NO, explicando a discrepância dos resultados obtidos por Landau *et al.* 1999 com
18 os nossos.

19 Alternativamente, outra possível explicação é que em uma infecção *in vivo*, merozoítos
20 entram em contato com macrófagos que se encontram em um primeiro momento residentes e,
21 portanto, pouco microbicidas. A modulação do mecanismo microbicida em macrófagos através
22 da exposição de PS já foi relatada em alguns protozoários parasitos intracelulares e pode ser
23 um fator importante no processo infectivo. PS é encontrado na membrana plasmática das células
24 e ao ser exposta causa menor produção de NO em macrófagos ativados (Fadok *et al.* 1992).
25 Desde que *Leishmania* spp. (de Freitas Balanco *et al.* 2001), *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al.*
26 2004) e *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al.* 2007) expõem PS gerando resposta anti-
27 inflamatória, verificamos se os merozoítos de *P. chabaudi* expõem esse fosfolípídeo e reduzem
28 a produção de NO de macrófagos. A exposição de PS pelos merozoítos foi confirmada e,
29 surpreendentemente, a proporção da população que expõe o PS é a mesma das formas
30 infectantes de *Leishmania* spp. (de Freitas Balanco *et al.* 2001), *T. gondii* (Seabra *et al.* 2004)
31 e *T. cruzi* (DaMatta *et al.* 2007).

32 Havia uma preocupação de que os eritrócitos contaminantes e outras células sanguíneas
33 estivessem presentes em nossas amostras, resultando em falso negativo para a exposição de PS
34 e, por esse motivo, realizamos análises usando um anticorpo policlonal anti-merozoíto. Assim,

1 garantimos que todos os eventos analisados seriam provenientes de merozoítos. A nossa
2 metodologia mostrou-se muito eficiente, gerando merozoítos com um grau muito baixo de
3 contaminação e, por isso, os resultados de exposição de PS utilizando anticorpos policlonais
4 anti-merozoíto e anexina-V foram compatíveis com os resultados obtidos de maneira clássica,
5 usando as marcações com anexina-V e PI. *Plasmodium chabaudi* foi capaz de inibir
6 parcialmente a produção de NO em macrófagos murinos ativados. Surpreendentemente, os
7 merozoítos só foram capazes de inibir a produção de NO após serem filtrados. Provavelmente,
8 isso se deve à presença de hemozoína, que é parcialmente removida no processo de filtração. A
9 hemozoína é imunologicamente inerte, mas está frequentemente associada ao DNA do parasito
10 e, seu genoma é altamente pró-inflamatório (Parroche *et al.* 2007). *Plasmodium chabaudi* foi
11 capaz de modular a produção de NO regulando a expressão da iNOS. Esse mecanismo foi
12 demonstrado em formas infectantes de vários protozoários parasitos (DaMatta *et al.* 2007; de
13 Freitas Balanco *et al.* 2001; Seabra *et al.* 2004), indicando que o mimetismo apoptótico se
14 estende a *P. chabaudi*. Um futuro experimento bloqueando a PS do parasito com anexina e/ou
15 anticorpo anti-PS, mimetizando uma população que não expõe PS se faz necessário para
16 determinar o exato papel dessa molécula no processo de modulação de iNOS e produção de
17 NO.

18 Foi demonstrado que merozoítos de *P. chabaudi* são capazes de sobreviver de forma
19 latente nos macrófagos do baço de camundongos infectados (Landau *et al.* 1999). Nossa
20 hipótese era que merozoítos de *P. chabaudi* realizam mimetismo apoptótico e geram uma
21 resposta anti-inflamatória nesses macrófagos, o que lhes permite permanecer em um estado
22 latente. No entanto, nossos experimentos mostraram que os merozoítos não sobrevivem a uma
23 interação com macrófagos murinos classicamente ativados. Acreditamos que isso possa ser
24 explicado devido aos macrófagos que utilizamos serem previamente ativados e, portanto,
25 altamente microbicidas. Os macrófagos utilizados por Landau *et al.* 1999 inicialmente são
26 residentes, já que os experimentos foram realizados *in vivo*. Merozoítos de *P. chabaudi* podem
27 realizar mimetismo apoptótico, mas não geram uma resposta boa o suficiente para impedir a
28 sua degradação em macrófagos ativados, mas a modulação de NO pela exposição de PS pode
29 ter papel crucial em uma infecção de macrófagos residentes, permitindo a sobrevivência do
30 parasito por modular a expressão de iNOS antes que os níveis de NO estejam muito altos. A
31 análise da presença de fusão lisossomal através de LAMP-1 mostrou que os merozoítos de *P.*
32 *chabaudi* são incapazes de inibir a fusão com lisossomos em macrófagos ativados. Esta é uma
33 explicação provável para a degradação dos merozoítos após períodos mais longos de interação,
34 embora eles tenham a capacidade de inibir parcialmente a produção de NO em macrófagos

1 ativados, eles não podem gerar uma resposta boa o suficiente para inibir a fusão com
2 lisossomos. Wykes *et al.* (2011) encontraram resultados semelhantes usando *P. berghei*. Eles
3 usaram células dendríticas isoladas de camundongos e cultivadas *in vitro* em co-cultura com
4 esquizontes numa proporção de 1:3. Nenhum fator de ativação foi usado. Alguns parasitos que
5 infectaram células dendríticas foram capazes de inibir a fusão lisossômica, enquanto outros
6 foram degradados.

7 Apresentamos uma metodologia altamente eficiente para a obtenção de merozoítos
8 infectivos de *P. chabaudi*. Os merozoítos obtidos podem ajudar a melhorar o desenvolvimento
9 de vacinas e medicamentos. O ensaio de invasão de eritrócitos aqui descrito pode servir como
10 uma metodologia interessante para estudar os diferentes aspectos da capacidade dos merozoítos
11 de infectar essas células, permitindo o teste de compostos bloqueadores invasivos e uma melhor
12 compreensão da biologia invasiva dessas formas. A cinética de interação de merozoítos com
13 eritrócitos e macrófagos peritoneais de camundongo ativados aumenta nossa compreensão da
14 interação parasito-hospedeiro. Resultados sugerem que merozoítos de *P. chabaudi* realizam
15 “mimetismo apoptótico”, reforçando a hipótese de que esse mecanismo evasivo é comum a
16 protozoários parasitos que interagem com macrófagos. A exposição ao PS parece ter papel
17 fundamental no processo infeccioso dos protozoários parasitários.

18

1 **6. Conclusões**

2 I. Desenvolvemos uma metodologia mais eficiente para a obtenção de merozoítos viáveis e
3 infectivos de *P. chabaudi*;

4

5 II. Merozoitos de *P. chabaudi* possivelmente possuem um mecanismo de “compensação” como
6 descrito em *P. falciparum*, uma vez que maior índice de infecção em eritrócitos foi alcançado
7 com menor proporção merozoítos:eritrócitos;

8

9 III. Apresentamos evidências que sugerem que merozoitos de *P. chabaudi* realizam mimetismo
10 apoptótico, visto que cerca de metade da população expõe PS mesmo estando viável;

11

12 IV. Merozoítos de *P. chabaudi* não persistiram em longos períodos de interação com
13 macrófagos peritoneais ativados, mesmo sendo capazes de inibir parcialmente a produção de
14 NO pela diminuição da expressão de iNOS;

15

16 V. A marcação com LAMP-1 indicou que merozoítos de *P. chabaudi* não conseguem inibir a
17 fusão lisossomal em macrófagos murinos ativados e mesmo que sejam capazes de inibir
18 parcialmente o mecanismo microbicida nessas células, provavelmente por isso são degradados.

19

7. Referências

- Alkhunaizi AM, Al-Tawfiq JA, Al-Shawaf MH (2008) Transfusion-transmitted malaria in a kidney transplant recipient. How safe is our blood transfusion? Saudi medical journal 29:293-295
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R (2006) Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal Nature medicine 12:220-224 doi:10.1038/nm1350
- Arab A, Jackson MC, Kongoli C (2014) Modelling the effects of weather and climate on malaria distributions in West Africa Malaria journal 13:126 doi:10.1186/1475-2875-13-126
- Bachmann A *et al.* (2009) Absence of erythrocyte sequestration and lack of multicopy gene family expression in *Plasmodium falciparum* from a splenectomized malaria patient PLoS one 4:e7459 doi:10.1371/journal.pone.0007459
- Baird JK (2009) Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax* Clinical microbiology reviews 22:508-534 doi:10.1128/cmr.00008-09
- Barcinski MA, Moreira ME, Balanco JM, Wanderley JL, Bonomo AC (2003) The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? Kinetoplastid biology and disease 2:6 doi:10.1186/1475-9292-2-6
- Bargieri D, Lagal V, Tardieux I, Menard R (2012) Host cell invasion by apicomplexans: what do we know? Trends in parasitology 28:131-135 doi:10.1016/j.pt.2012.01.005
- Bartoloni A, Zammarchi L (2012) Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria Mediterranean journal of hematology and infectious diseases 4:e2012026 doi:10.4084/MJHID.2012.026
- Baum J *et al.* (2006) A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites The Journal of biological chemistry 281:5197-5208 doi:10.1074/jbc.M509807200
- Beare NA, Taylor TE, Harding SP, Lewallen S, Molyneux ME (2006) Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria The American journal of tropical medicine and hygiene 75:790-797
- Beeson JG, Brown GV (2002) Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation Cellular and molecular life sciences : CMLS 59:258-271 doi:10.1007/s00018-002-8421-y
- Bell AS, de Roode JC, Sim D, Read AF (2006) Within-host competition in genetically diverse malaria infections: parasite virulence and competitive success Evolution; international journal of organic evolution 60:1358-1371
- Belyaev NN *et al.* (2010) Induction of an IL7-R(+)-c-Kit(hi) myelolymphoid progenitor critically dependent on IFN-gamma signaling during acute malaria Nature immunology 11:477-485 doi:10.1038/ni.1869
- Blackman MJ (1994) Purification of *Plasmodium falciparum* merozoites for analysis of the processing of merozoite surface protein-1 Methods in cell biology 45:213-220
- Blackman MJ (2004) Proteases in host cell invasion by the malaria parasite Cellular Microbiology 6:893-903 doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00437.x
- Borges S *et al.* (2011) Genomewide scan reveals amplification of *mdr1* as a common denominator of resistance to mefloquine, lumefantrine, and artemisinin in *Plasmodium chabaudi* malaria parasites Antimicrobial agents and chemotherapy 55:4858-4865 doi:10.1128/aac.01748-10
- Bosch J *et al.* (2007) Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:7015-7020 doi:10.1073/pnas.0605301104

- 1 Boyle MJ *et al.* (2010) Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define
2 erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development Proceedings of
3 the National Academy of Sciences of the United States of America 107:14378-14383
4 doi:10.1073/pnas.1009198107
- 5 Brasil P *et al.* (2017) Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic
6 Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation The Lancet Global
7 health 5:e1038-e1046 doi:10.1016/s2214-109x(17)30333-9
- 8 Carter R (1978) Studies on enzyme variation in the murine malaria parasites *Plasmodium*
9 *berghei*, *P. yoelii*, *P. vinckei* and *P. chabaudi* by starch gel electrophoresis Parasitology
10 76:241-267
- 11 Chartrain NA *et al.* (1994) Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the
12 human inducible nitric oxide synthase gene The Journal of biological chemistry
13 269:6765-6772
- 14 Cheesman S, Raza A, Carter R (2006) Mixed strain infections and strain-specific protective
15 immunity in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice
16 Infection and immunity 74:2996-3001 doi:10.1128/iai.74.5.2996-3001.2006
- 17 Cheng Q, Saul A (1994) The dihydrofolate reductase domain of rodent malarias: point
18 mutations and pyrimethamine resistance Molecular and biochemical parasitology
19 65:361-363
- 20 Clark IA, Cowden WB (2003) The pathophysiology of falciparum malaria Pharmacology &
21 therapeutics 99:221-260
- 22 Cogswell FB (1992) The hypnozoite and relapse in primate malaria Clinical microbiology
23 reviews 5:26-35
- 24 Collins WE (2007) Further understanding the nature of relapse of *Plasmodium vivax* infection
25 The Journal of infectious diseases 195:919-920 doi:10.1086/512246
- 26 Collins WE, Jeffery GM (2002) A retrospective examination of sporozoite-induced and
27 trophozoite-induced infections with *Plasmodium ovale*: development of parasitologic
28 and clinical immunity during primary infection The American journal of tropical
29 medicine and hygiene 66:492-502
- 30 Contamin H, Fandeur T, Rogier C, Bonnefoy S, Konate L, Trape JF, Mercereau-Puijalon O
31 (1996) Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected
32 during successive clinical malaria episodes in Senegalese children The American
33 journal of tropical medicine and hygiene 54:632-643
- 34 Costa AdP *et al.* (2010) Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-
35 Amazônia Brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no estado do Rio de
36 Janeiro Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43:571-574
- 37 Cowman AF, Berry D, Baum J (2012) The cellular and molecular basis for malaria parasite
38 invasion of the human red blood cell The Journal of cell biology 198:961-971
39 doi:10.1083/jcb.201206112
- 40 Cowman AF, Crabb BS (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites Cell 124:755-
41 766 doi:10.1016/j.cell.2006.02.006
- 42 Cox FE (2010) History of the discovery of the malaria parasites and their vectors Parasites &
43 vectors 3:5 doi:10.1186/1756-3305-3-5
- 44 Cox J, Semoff S, Hommel M (1987) *Plasmodium chabaudi*: a rodent malaria model for in-vivo
45 and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs Parasite
46 immunology 9:543-561
- 47 Cross CE, Langhorne J (1998) *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS): inflammatory cytokines
48 and pathology in an erythrocytic-stage infection in mice Experimental parasitology
49 90:220-229 doi:10.1006/expr.1998.4335
- 50 Cullen KA, Arguin PM, Centers for Disease C, Prevention (2014) Malaria surveillance--United
51 States, 2012 Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries 63:1-22

- 1 DaMatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhaes L, Goldenberg S, de Souza W
2 (2007) Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism FEMS
3 microbiology letters 266:29-33 doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00495.x
- 4 David PH, Hommel M, Benichou JC, Eisen HA, da Silva LH (1978): Isolation of malaria
5 merozoites: release of *Plasmodium chabaudi* merozoites from schizonts bound to immobilized
6 concanavalin A. Proc Natl Acad Sci, 75:5081-5084.
- 7 de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C,
8 Barcinski MA (2001) Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite
9 downregulates macrophage microbicidal activity Current biology : CB 11:1870-1873
- 10 Fadok VA, Bratton DL, Henson PM (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells:
11 recognition, uptake, and consequences The Journal of clinical investigation 108:957-
12 962 doi:10.1172/jci14122
- 13 Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of
14 phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition
15 and removal by macrophages Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 148:2207-
16 2216
- 17 Ferguson HM, Read AF (2004) Mosquito appetite for blood is stimulated by *Plasmodium*
18 *chabaudi* infections in themselves and their vertebrate hosts Malaria journal 3:12
19 doi:10.1186/1475-2875-3-12
- 20 Foley M, Tilley L (1998) Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and
21 prospects for new agents Pharmacology & therapeutics 79:55-87 doi:10.1016/s0163-
22 7258(98)00012-6
- 23 Franca TCC, dos Santos MG, Figueroa-Villar JD (2008) Malaria: Historical aspects and
24 chemotherapy Quim Nova 31:1271-1278 doi:Doi 10.1590/S0100-40422008000500060
- 25 Fritsche G, Larcher C, Schennach H, Weiss G (2001) Regulatory interactions between iron and
26 nitric oxide metabolism for immune defense against *Plasmodium falciparum* infection
27 The Journal of infectious diseases 183:1388-1394 doi:10.1086/319860
- 28 Gadsby N, Lawrence R, Carter R (2009) A study on pathogenicity and mosquito transmission
29 success in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi adami* International journal
30 for parasitology 39:347-354 doi:10.1016/j.ijpara.2008.07.005
- 31 Gay G *et al.* (2016) Toxoplasma gondii TgIST co-opts host chromatin repressors dampening
32 STAT1-dependent gene regulation and IFN-gamma-mediated host defenses The
33 Journal of experimental medicine 213:1779-1798 doi:10.1084/jem.20160340
- 34 Giao PT, de Vries PJ (2001) Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents Clinical
35 pharmacokinetics 40:343-373 doi:10.2165/00003088-200140050-00003
- 36 Gilks CF, Walliker D, Newbold CI (1990) Relationships between sequestration, antigenic
37 variation and chronic parasitism in *Plasmodium chabaudi chabaudi*--a rodent malaria
38 model Parasite immunology 12:45-64
- 39 Good MF, Doolan DL (2007) Malaria's journey through the lymph node Nature medicine
40 13:1023-1024 doi:10.1038/nm0907-1015
- 41 Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE (2008)
42 Malaria: progress, perils, and prospects for eradication The Journal of clinical
43 investigation 118:1266-1276 doi:10.1172/jci33996
- 44 Gregory DJ, Olivier M (2005) Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite
45 Leishmania Parasitology 130 Suppl:S27-35 doi:10.1017/s0031182005008139
- 46 Gregson A, Plowe CV (2005) Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates
47 Pharmacological reviews 57:117-145 doi:10.1124/pr.57.1.4
- 48 Gueirard P *et al.* (2010) Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host
49 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
50 107:18640-18645 doi:10.1073/pnas.1009346107

- 1 Haldar K, Mohandas N (2007) Erythrocyte remodeling by malaria parasites Current opinion in
2 hematology 14:203-209 doi:10.1097/MOH.0b013e3280f31b2d
- 3 Hartman TK, Rogerson SJ, Fischer PR (2010) The impact of maternal malaria on newborns
4 Annals of tropical paediatrics 30:271-282 doi:10.1179/146532810X12858955921032
- 5 Heddi A *et al.* (2001) Binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to soluble
6 platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): frequent recognition
7 by clinical isolates The American journal of tropical medicine and hygiene 65:47-51
- 8 Hill DL, Eriksson EM, Schofield L (2014) High yield purification of *Plasmodium falciparum*
9 merozoites for use in opsonizing antibody assays Journal of visualized experiments :
10 JoVE doi:10.3791/51590
- 11 Huff CG (1957) Organ and tissue distribution of the exoerythrocytic stages of various avian
12 malarial parasites Experimental parasitology 6:143-162 doi:10.1016/0014-
13 4894(57)90012-7
- 14 Ignarro LJ (2000) The unique role of nitric oxide as a signaling molecule in the cardiovascular
15 system Italian heart journal : official journal of the Italian Federation of Cardiology 1
16 Suppl 3:S28-29
- 17 Janse CJ *et al.* (2011) A genotype and phenotype database of genetically modified malaria-
18 parasites Trends in parasitology 27:31-39 doi:10.1016/j.pt.2010.06.016
- 19 Jarra W, Brown KN (1985) Protective immunity to malaria: studies with cloned lines of
20 *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei* in CBA/Ca mice. I. The effectiveness and inter-
21 and intra-species specificity of immunity induced by infection Parasite immunology
22 7:595-606
- 23 Johnson JG, Epstein N, Shiroishi T, Miller LH (1980) Factors affecting the ability of isolated
24 *Plasmodium knowlesi* merozoites to attach to and invade erythrocytes Parasitology
25 80:539-550 doi:10.1017/s0031182000000998
- 26 Jones MK, Good MF (2006) Malaria parasites up close Nature medicine 12:170-171
27 doi:10.1038/nm0206-170
- 28 Kebaier C, Voza T, Vanderberg J (2009) Kinetics of mosquito-injected *Plasmodium*
29 sporozoites in mice: fewer sporozoites are injected into sporozoite-immunized mice
30 PLoS pathogens 5:e1000399 doi:10.1371/journal.ppat.1000399
- 31 Kelly-Hope LA, Hemingway J, McKenzie FE (2009) Environmental factors associated with
32 the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in Kenya Malaria
33 journal 8:268 doi:10.1186/1475-2875-8-268
- 34 Krotoski WA *et al.* (1982) Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted
35 *Plasmodium vivax* infection The American journal of tropical medicine and hygiene
36 31:1291-1293
- 37 Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ (2007)
38 Malarial anemia: of mice and men Blood 110:18-28 doi:10.1182/blood-2006-09-
39 018069
- 40 Landau I (1965) [DESCRIPTION OF *PLASMODIUM CHABAUDI* N. SP., PARASITE OF
41 AFRICAN RODENTS] Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des
42 sciences 260:3758-3761
- 43 Landau I, Chabaud AG (1994) *Plasmodium* species infecting *Thamnomys rutilans*: a zoological
44 study Advances in parasitology 33:49-90
- 45 Landau I, Chabaud AG, Mora-Silvera E, Coquelin F, Boulard Y, Renia L, Snounou G (1999)
46 Survival of rodent malaria merozoites in the lymphatic network: potential role in
47 chronicity of the infection Parasite (Paris, France) 6:311-322
48 doi:10.1051/parasite/1999064311
- 49 Li Y, Wu YL (2003) An over four millennium story behind qinghaosu (artemisinin)--a fantastic
50 antimalarial drug from a traditional chinese herb Current medicinal chemistry 10:2197-
51 2230 doi:10.2174/0929867033456710

- 1 Mac-Daniel L, Menard R (2015) *Plasmodium* and mononuclear phagocytes Microbial
2 pathogenesis 78:43-51 doi:10.1016/j.micpath.2014.11.011
- 3 Mackinnon MJ, Walker PR, Rowe JA (2002) *Plasmodium chabaudi*: rosetting in a rodent
4 malaria model Experimental parasitology 101:121-128
- 5 Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K (2004) Clinical features and pathogenesis of severe
6 malaria Trends in parasitology 20:597-603 doi:10.1016/j.pt.2004.09.006
- 7 MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function Annual review
8 of immunology 15:323-350 doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.323
- 9 Mata-Cantero L, Lafuente MJ, Sanz L, Rodriguez MS (2014) Magnetic isolation of
10 *Plasmodium falciparum* schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and
11 synchronized in vitro culture Malaria journal 13:112 doi:10.1186/1475-2875-13-112
- 12 Matz JM, Beck JR, Blackman MJ (2020) The parasitophorous vacuole of the blood-stage
13 malaria parasite Nature reviews Microbiology doi:10.1038/s41579-019-0321-3
- 14 Mayer DC *et al.* (2009) Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum*
15 erythrocyte-binding ligand, EBL-1 Proceedings of the National Academy of Sciences
16 of the United States of America 106:5348-5352 doi:10.1073/pnas.0900878106
- 17 Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria Nature
18 415:673-679 doi:10.1038/415673a
- 19 Mills CD (2012) M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease Critical reviews in
20 immunology 32:463-488 doi:10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10
- 21 Mitchell GH, Richards WH, Butcher GA, Cohen S (1977) Merozoite vaccination of
22 douroucouli monkeys against falciparum malaria Lancet 1:1335-1338
23 doi:10.1016/s0140-6736(77)92551-x
- 24 Mohan K, Stevenson MM (1998) Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with
25 malaria correlate with deficient interleukin-12 production British journal of
26 haematology 103:942-949
- 27 Moore SA, Surgey EG, Cadwgan AM (2002) Malaria vaccines: where are we and where are
28 we going? The Lancet Infectious diseases 2:737-743
- 29 Mora-Silvera E *et al.* (1997) Role of macrophages as possible transporters of *Plasmodium yoelii*
30 nigeriensis merozoites through the lymphatic system. Preliminary note Parasite (Paris,
31 France) 4:83-85 doi:10.1051/parasite/1997041083
- 32 Munter S *et al.* (2009) *Plasmodium* sporozoite motility is modulated by the turnover of discrete
33 adhesion sites Cell host & microbe 6:551-562 doi:10.1016/j.chom.2009.11.007
- 34 Neves D, De Melo AL, Linardi, PM, Vitor RWA. (2004) Parasitologia Humana. Atheneu.
- 35 Newbold CI, Pinches R, Roberts DJ, Marsh K (1992) *Plasmodium falciparum*: the human
36 agglutinating antibody response to the infected red cell surface is predominantly variant
37 specific Experimental parasitology 75:281-292
- 38 O'Donovan SM, Dalton JP (1993) An improved medium for *Plasmodium chabaudi* *in vitro*
39 erythrocyte invasion assays The Journal of eukaryotic microbiology 40:152-154
40 doi:10.1111/j.1550-7408.1993.tb04896.x
- 41 Olias P, Etheridge RD, Zhang Y, Holtzman MJ, Sibley LD (2016) Toxoplasma Effector
42 Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN-
43 gamma-Dependent Gene Expression Cell host & microbe 20:72-82
44 doi:10.1016/j.chom.2016.06.006
- 45 Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT (2010)
46 Malaria in Brazil: an overview Malaria journal 9:115 doi:10.1186/1475-2875-9-115
- 47 Otten M *et al.* (2009) Initial evidence of reduction of malaria cases and deaths in Rwanda and
48 Ethiopia due to rapid scale-up of malaria prevention and treatment Malaria journal 8:14
49 doi:10.1186/1475-2875-8-14
- 50 Parham PE, Michael E (2010) Modeling the effects of weather and climate change on malaria
51 transmission Environmental health perspectives 118:620-626 doi:10.1289/ehp.0901256

- 1 Parroche P *et al.* (2007) Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances
2 innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9 Proceedings of the
3 National Academy of Sciences of the United States of America 104:1919-1924
4 doi:10.1073/pnas.0608745104
- 5 Phillips MA, Rathod PK (2010) *Plasmodium* dihydroorotate dehydrogenase: a promising target
6 for novel anti-malarial chemotherapy Infectious disorders drug targets 10:226-239
7 doi:10.2174/187152610791163336
- 8 Post JA (2010) Ferri's Color Atlas and Text of Clinical Medicine Mayo Clinic Proceedings
9 85:e50 doi:10.4065/mcp.2010.0226
- 10 Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM (2006) The silent path to thousands of merozoites: the
11 *Plasmodium* liver stage Nature reviews Microbiology 4:849-856
12 doi:10.1038/nrmicro1529
- 13 Pukrittayakamee S, Imwong M, Singhasivanon P, Stepniewska K, Day NJ, White NJ (2008)
14 Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in *P. vivax* malaria The
15 American journal of tropical medicine and hygiene 79:378-384
- 16 Richards JS, Beeson JG (2009) The future for blood-stage vaccines against malaria
17 Immunology and cell biology 87:377-390 doi:10.1038/icb.2009.27
- 18 Robert A, Benoit-Vical F, Dechy-Cabaret O, Meunier B (2001) From classical antimalarial
19 drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin Pure and
20 Applied Chemistry 73:1173-1188 doi:10.1351/pac200173071173
- 21 Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and
22 pathophysiology of reproduction Human reproduction update 4:3-24
- 23 Sachs J, Malaney P (2002) The economic and social burden of malaria Nature 415:680-685
24 doi:10.1038/415680a
- 25 Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA (2004) *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine
26 inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion Biochemical
27 and biophysical research communications 324:744-752 doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.114
- 28 Silvie O, Mota MM, Matuschewski K, Prudencio M (2008) Interactions of the malaria parasite
29 and its mammalian host Current opinion in microbiology 11:352-359
30 doi:10.1016/j.mib.2008.06.005
- 31 Stephens R, Culleton RL, Lamb TJ (2012) The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our
32 understanding of malaria Trends in parasitology 28:73-82 doi:10.1016/j.pt.2011.10.006
- 33 Stuehr DJ, Marletta MA (1987) Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by
34 BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma Journal of immunology (Baltimore,
35 Md : 1950) 139:518-525
- 36 Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY (1993) The role of TH1
37 and TH2 cells in a rodent malaria infection Science (New York, NY) 260:1931-1934
- 38 Taylor-Robinson AW, Smith EC (1999) A role for cytokines in potentiation of malaria vaccines
39 through immunological modulation of blood stage infection Immunological reviews
40 171:105-123
- 41 Taylor WR, White NJ (2004) Antimalarial drug toxicity: a review Drug safety 27:25-61
42 doi:10.2165/00002018-200427010-00003
- 43 Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM (2003) Clinical review: Severe malaria Critical
44 care 7:315-323 doi:10.1186/cc2183
- 45 Tsuchida H, Yamaguchi K, Yamamoto S, Ebisawa I (1982) Quartan malaria following
46 splenectomy 36 years after infection The American journal of tropical medicine and
47 hygiene 31:163-165 doi:10.4269/ajtmh.1982.31.163
- 48 van der Heyde HC, Gu Y, Zhang Q, Sun G, Grisham MB (2000) Nitric oxide is neither
49 necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice Journal
50 of immunology (Baltimore, Md : 1950) 165:3317-3323

- 1 Vaughan AM, Aly AS, Kappe SH (2008) Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection:
2 gliding and hiding Cell host & microbe 4:209-218 doi:10.1016/j.chom.2008.08.010
- 3 Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS (1994) Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma
4 cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro Infection and immunity
5 62:5177-5182
- 6 Walliker D, Carter R, Morgan S (1971) Genetic recombination in malaria parasites Nature
7 232:561-562
- 8 Wanderley JLM, DaMatta RA, Barcinski MA (2020) Apoptotic mimicry as a strategy for the
9 establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived phosphatidylserine as
10 key molecule Cell Commun Signal 18:10 doi:10.1186/s12964-019-0482-8
- 11 Wanderley JLM DR, Barcinski MA. (2020) Apoptotic mimicry as a strategy for the
12 establishment of parasitic infections: parasite and host-derived phosphatidylserine as
13 key molecule Cell Commun Signal 18
- 14 Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ
15 (2002) Malaria and the red cell Hematology American Society of Hematology
16 Education Program:35-57
- 17 Wei XQ *et al.* (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase
18 Nature 375:408-411 doi:10.1038/375408a0
- 19 Weissbuch I, Leiserowitz L (2008) Interplay between malaria, crystalline hemozoin formation,
20 and antimalarial drug action and design Chemical reviews 108:4899-4914
21 doi:10.1021/cr078274t
- 22 Wendt C, Rachid R, de Souza W, Miranda K (2016) Electron tomography characterization of
23 hemoglobin uptake in *Plasmodium chabaudi* reveals a stage-dependent mechanism for
24 food vacuole morphogenesis Journal of structural biology 194:171-179
25 doi:10.1016/j.jsb.2016.02.014
- 26 White NJ (2008) *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite Clinical infectious
27 diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 46:172-
28 173 doi:10.1086/524889
- 29 White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM (2014) Malaria
30 The Lancet 383:723-735 doi:10.1016/s0140-6736(13)60024-0
- 31 WHO (2000) Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases
32 Cluster Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 94 Suppl
33 1:S1-90
- 34 WHO (2016) World Malaria Report. World Health Organization.
- 35 Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M (2003) New antimalarial drugs Angewandte
36 Chemie 42:5274-5293 doi:10.1002/anie.200200569
- 37 Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH (2007) A review
38 of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT) The American
39 journal of tropical medicine and hygiene 77:119-127
- 40 Wykes MN *et al.* (2011) Rodent blood-stage *Plasmodium* survive in dendritic cells that infect
41 naive mice Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
42 America 108:11205-11210 doi:10.1073/pnas.1108579108
- 43 Wyler DJ, Miller LH, Schmidt LH (1977) Spleen function in quartan malaria (due to
44 *Plasmodium inui*): evidence for both protective and suppressive roles in host defense
45 The Journal of infectious diseases 135:86-93 doi:10.1093/infdis/135.1.86
- 46 Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P (2007) *Plasmodium* sporozoites trickle out of
47 the injection site Cellular Microbiology 9:1215-1222 doi:10.1111/j.1462-
48 5822.2006.00861.x
- 49 Yap GS, Stevenson MM (1994) Differential requirements for an intact spleen in induction and
50 expression of B-cell-dependent immunity to *Plasmodium chabaudi* AS Infection and
51 immunity 62:4219-4225