

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Camila Dutra Moreira de Miranda

**RESPOSTA ERITROPOIÉTICA ENVOLVIDA NA SUSCETIBILIDADE DE
CAMUNDONGOS INFANTES À MALÁRIA**

Belo Horizonte

2022

Camila Dutra Moreira de Miranda

**RESPOSTA ERITROPOIÉTICA ENVOLVIDA NA SUSCETIBILIDADE DE
CAMUNDONGOS INFANTES À MALÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte

2022

043

Miranda, Camila Dutra Moreira de.

Resposta eritropoiética envolvida na suscetibilidade de camundongos infantês à malária [manuscrito] / Camila Dutra Moreira de Miranda. - 2022.
43 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Malária. 3. Eritropoese. 4. Macrófagos do Fígado. 5. Suscetibilidade a Doenças. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE CAMILA DUTRA MOREIRA DE MIRANDA

ENTRADA 2ª/2019 2019720862

Às quatorze horas do dia 31 de janeiro de 2022, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "RESPOSTA ERITROPOIÉTICA ENVOLVIDA NA SUSCETIBILIDADE DE CAMUNDONGOS INFANTES À MALÁRIA", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Dr. Gustavo Batista de Menezes, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	APROVADA
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	APROVADA
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	APROVADA

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador)

Dr^a. Erika Cristina Jorge

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 01/02/2022, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Batista de Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 01/02/2022, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Mattos Jardim Costa, Professor do Magistério Superior**, em 01/02/2022, às 18:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 03/02/2022, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1227562** e o código CRC **D5C5D321**.

Este trabalho foi realizado no Center for Gastrointestinal Biology, do Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG e CNPq.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me manter em paz e confiante em momentos de dificuldades. À minha família que sempre contribuiu com apoio emocional e financeiro, incentivando a minha formação. Em especial, à minha mãe, que é minha maior inspiração de luta e persistência, e que diariamente me encoraja com sábias palavras e me protege em orações.

Ao meu namorado, Rodrigo, por sempre estar ao meu lado, por ser companheiro, confiante, compreensível, e principalmente por me incentivar a realizar meus sonhos. Ao meu orientador, Gustavo, por me permitir fazer parte de seu excelente grupo de pesquisa, por sua disponibilidade e atenção em ensinar, por sua luta diária pela pesquisa no Brasil, garantindo que não faltasse recursos para a realização dos nossos trabalhos, e por sua bondade como ser humano.

Aos amigos do CGB, pela hospitalidade e paciência nos ensinamentos. E que além de serem exemplo de excelentes pesquisadores, também compartilharam muitos momentos de alegria dentro e fora do laboratório. Aos que, hoje, estão brilhando em outros lugares do mundo, mas que me deram o privilégio de muitos aprendizados. À Cris, por toda solicitude e organização. Malu, Lice, Horts, Kassi e “Matheus(es)”, que estiveram sempre dispostos e disponíveis. Brenda e Karen, que não mediram esforços para me ajudar nesta “reta final” e que sustentaram todo o processo até aqui, de uma maneira muito amável e especial!

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, e seu corpo docente, inclusive a banca avaliadora.

À agência de fomento FAPEMIG

Muito obrigada!

RESUMO

Malária continua sendo uma grande ameaça à saúde pública mundial, e crianças menores de 5 anos são as principais vítimas fatais da doença. O fígado possui papel essencial no curso da infecção, em que as características particulares do endotélio hepático, juntamente com diferentes populações de células imunes, inclusive de macrófagos residentes do fígado, estão diretamente envolvidas em complicações grave, como a anemia da malária grave, responsável por grande parte dos óbitos infantis. Estudos prévios realizados por nosso grupo apontam que o fígado passa por uma transição hematopoiética, caracterizada pela mudança de um perfil mieloide para linfóide, ao longo do desenvolvimento pós-natal, e que o baço e medula óssea de neonatos também apresentam perfis celulares diferentes de adultos. Entretanto, faltam entendimentos da relação do desenvolvimento hematopoiético com a gravidade da malária. Além disso, há ausência de modelos experimentais que reproduzam a suscetibilidade infantil à malária. **Objetivo:** Propor um modelo experimental em camundongos que possa ser útil no entendimento da maior susceptibilidade de crianças à malária, caracterizando a dinâmica e os mecanismos envolvidos na eritropoiese em resposta à infecção por *Plasmodium chabaudi*. **Resultados e conclusão:** Padronizamos a infecção em animais de diferentes idades ao longo da vida e observamos que a parasitemia é maior em camundongos infantis do que em neonatos e adultos. Além disso, camundongos infantis infectados por *P. Chabaudi* apresentam anemia no pico da infecção e não sobrevivem. Por citometria de fluxo, vimos que os nichos hematopoiéticos de infantis (medula óssea, baço e fígado) apresentam aumento dos precursores eritroides durante a infecção por *P. chabaudi*, enquanto que os adultos suprimem a eritropoiese. Também mostramos que em resposta à infecção, há maior quantidade de precursores de eritrócitos no sangue periférico de animais infantis do que em adultos, e que estes precursores também podem ser infectados por *P. Chabaudi*, e contribuir para a hiperparasitemia do grupo e conseqüente letalidade.

Palavras-chave: Malária, eritropoiese, fígado, células de Kupffer, suscetibilidade infante.

ABSTRACT

Malaria remains a major threat to public health worldwide, and children under 5 years old are the main fatal victims of this disease. The liver plays an essential role in the course of infection. The singular characteristics of the hepatic endothelium, together with different immune cell populations, including tissue macrophages, are directly involved in serious complications, such as severe malarial anemia, responsible for a large number of infant deaths. Studies developed by our group show that the liver undergoes a hematopoietic transition throughout postnatal development, and the spleen and bone marrow of neonates have different cell profiles when compared to adults. However, studies on the relationship between hematopoietic development and the severity of malaria and experimental models that reproduce childhood susceptibility are lacking. **Aim:** To propose an experimental model in mice that can be useful in understanding the mortality of children from malaria, characterizing the dynamics and mechanisms involved in erythropoiesis in response to *Plasmodium chabaudi* infection. **Results and conclusion:** We standardized malaria infection in mice in different ages throughout life, and a higher parasitemia in infant mice than in neonates and adults was observed. In addition, infant mice infected with *P. chabaudi* presented anemia at the peak of infection and did not survive. Using flow cytometry, we saw that the hematopoietic niches of infants - bone marrow, spleen and liver - showed increased erythroid precursors during malarial infection, whereas adults suppress erythropoiesis. We also showed that there is a greater number of erythrocyte precursors in the peripheral blood of infant animals than in adults, and these precursors can be infected by *P. chabaudi*, contributing to the group's hyperparasitemia and consequent lethality.

Keywords: Malaria, erythropoiesis, liver, Kupffer cells, infant susceptibility.

Lista de ilustrações e figuras

Ilustração 1 – Ranking das principais causas de mortalidade infantil no mundo

Ilustração 2 - Estágios da infecção: mecanismos envolvidos na suscetibilidade à malária

Figura 1 - Suscetibilidade de camundongos infantis à infecção por *Plasmodium chabaudi*

Figura 2 – Parâmetros hematológicos

Figura 3 – Indução de anemia por administração de fenilhidrazina (phz)

Figura 4 – Análise de progenitor eritroide por citometria de fluxo

Figura 5 – Análise de parasitemia em precursores eritróides por citometria de fluxo

Figura 6 – Análise de células de kupffer por citometria de fluxo.

Figura 7 – Análise de células de Kupffer por microscopia confocal

Lista de abreviaturas

BFU-E - Unidade formadora de crescimento rápido eritroide

CFU-E - Unidade formadora de colônia eritroide

HSPGS - Proteoglicanos de heparanossulfato

IFN – Interferon

IL – Interleucina

I.P. - Intraperitoneal

iRBC - Eritrócito infectado

I.V. – Intravenoso

IVM - Microscopia intravital

KCs - Células de Kupffer

NaCl - Cloreto de sódio

NKT - Células T natural killer

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PBS - Tampão salina-fosfato

PHZ - Fenilhidrazina

SMA - Anemia da malária grave

TGF - Fator de crescimento transformador

SUMÁRIO

1 Introdução	10
1.1 Características epidemiológicas e patológicas da malária	10
1.2 Estágios da infecção: mecanismos envolvidos na suscetibilidade à malária	
11	
1.2.1 Fase hepática da infecção	11
1.2.2 Fase sistêmica da infecção	12
2. Justificativa	19
3 Objetivos	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4 Material e Métodos	21
4.1 Animais experimentais.....	21
4.2 Modelo de infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i>	21
4.3 Parâmetros hematológicos	21
4.4 Indução de anemia hemolítica pela administração de Fenilhidrazina	22
4.5 Isolamento de células não-parenquimais hepáticas	22
4.6 Avaliação do perfil celular por Microscopia Confocal Intravital	22
4.7. Isolamento de células eritróides dos órgãos hematopoiéticos	23
4.8 Citometria de fluxo	23
4.8.1 Análise de células de Kupffer.....	23
4.8.2 Análise de progenitores eritróides dos compartimentos hematopoiéticos.	23
4.9 Extração de mRNA e PCR em tempo real.....	24
4.10 Análise estatística	25
5. Resultados	26
5.1 Camundongos infantis são mais suscetíveis à infecção por <i>Plasmodium</i>	
<i>chabaudi</i>	26

5.2 O modelo de infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i> causa anemia em camundongos infantis e adultos	28
5.3 Indução de anemia hemolítica contínua é letal para camundongos infantis e adultos	30
5.4 Camundongos infantis promovem eritropoiese compensatória durante a infecção por <i>Plasmodium chabaudi</i>	31
5.5 Eritrócitos imaturos de camundongos infantis são nichos que contribuem para hiperparasitemia	33
5.6 Células de Kupffer reduzem acentuadamente em adultos infectados, mas não se alteram em infantis.....	34
5.7. Há aumento da expressão de genes relacionados à eritropoiese no fígado de camundongos infantis infectados	38
6 Discussão	39
7 Considerações finais	43
8 Referências Bibliográficas	44

1 Introdução

1.1 Características epidemiológicas e patológicas da malária

A malária é uma doença infecto-parasitária que afeta cerca de 219 milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais, sendo responsável por cerca de 435.000 mortes anualmente (Weiss *et al.*, 2019). Crianças menores de 5 anos de idade representam aproximadamente 70% das vítimas sendo, portanto, um dos grupos mais vulneráveis afetados pela malária, o que a considera uma das principais causas de mortalidade infantil (Ilustração 1) (WHO, 2019).

A maioria das mortes por malária em humanos é causada por duas principais espécies de parasitos protozoários: *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (Achidi *et al.*, 1996). Várias espécies de parasitos, como por exemplo *Plasmodium chabaudi* infectam roedores, mas não humanos (Craig *et al.*, 2012). Diferentes cepas de parasitos de roedores utilizados em laboratórios induzem uma gama de condições imunológicas e patológicas, que se assemelha àquelas condições fisiopatológicas da infecção por plasmódio em humanos (Craig *et al.*, 2012). Como tal, camundongos infectados com diferentes cepas de parasitos são modelos úteis para estudar distintas condições clínicas sistêmicas e órgão-específicas da malária.

Os protozoários induzem patologias complexas, específicas e dependente do estágio de infecção, podendo ter desde sintomas leves, como febres periódicas características, calafrios, tontura, mal-estar, desconforto abdominal e náuseas, e à medida que a infecção progride e a carga parasitária aumenta, os processos patogênicos seguem, resultando em anemia grave, acidose sanguínea, malária cerebral, esplenomegalia e hepatomegalia (Guha *et al.*, 2006, Bhalla *et al.*, 2006).

A maioria das mortes por malária em humanos é causada por duas principais espécies de protozoários parasitos: *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Várias espécies de parasitos, como por exemplo *Plasmodium Chabaudi* infectam roedores, mas não humanos. Diferentes cepas de parasitos de roedores usados em laboratórios exibem uma gama de condições imunológicas e patológicas, assemelhando-se a um amplo espectro de condições fisiopatológicas da infecção por malária humana (Craig *et al.*, 2012). Em adição, camundongos infectados com *P. chabaudi* são modelos úteis para estudar distintas condições clínicas sistêmicas e

órgão-específicas da malária humana, por se assemelhar hematologicamente com *P.falciparum* (Stephens *et al.*, 2014).

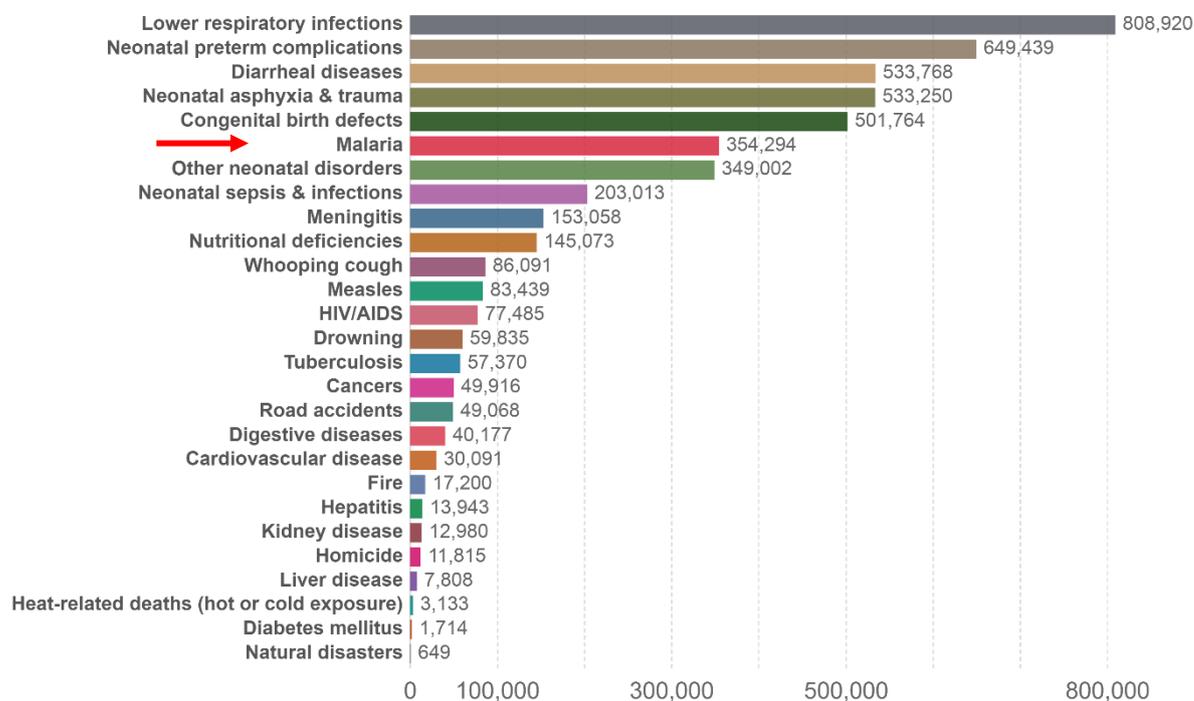


Ilustração 1: Principais causas de mortalidade infantil no mundo: Malária é a 6ª principal causa de mortalidade infantil em crianças menores de 5 anos. Adaptado de Organização da Mundial da Saúde, 2019.

1.2 Estágios da infecção: mecanismos envolvidos na suscetibilidade à malária

1.2.1 Fase hepática da infecção

A infecção malárica começa quando o vetor, o mosquito do gênero *Anopheles*, infectado pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, inocula um número substancial de esporozoítos no hospedeiro vertebrado, que são capazes de passar pela barreira epitelial e atingir a corrente sanguínea do indivíduo (Crompton *et al.*, 2014). Esses esporozoítos entram no fígado, como primeiro alvo, onde infectam os hepatócitos (célula parenquimal do fígado) (Mota *et al.*, 2001). Os esporozoítos passam, por via paracelular, por vários hepatócitos antes de selecionar um para invasão (Loubens, 2020). O mecanismo molecular da passagem de esporozoítos, para invasão, permanece mal compreendida, mas pode ser determinada pelos níveis de sulfatação de proteoglicanos de heparanossulfato de hepatócitos (HSPGs) (Loubens, 2020). Quando a invasão é bem-sucedida, o esporozoíto (forma infectante

do plasmódio) se estabelece dentro de um vacúolo parasitóforo, com a membrana derivada de hepatócitos, formando a interface com o citoplasma do mesmo. O vacúolo parasitóforo é essencial para a sobrevivência do parasito e é extensivamente remodelado, tanto para escapar das defesas dos hepatócitos, quanto para utiliza-lo como um canal para a absorção de nutrientes derivados da célula hospedeira (Nyboer, 2021). Se essas perturbações iniciais forem bem-sucedidas, o parasito sofre extensa replicação de suas organelas, resultando na formação de esquizontes multinucleados (forma multinucleada do plasmódio) e resulta na formação de merozoítos (forma infectante de eritrócito) (Vaughan, 2017). Este período representa o primeiro estágio da infecção, referido como o estágio hepático ou fase exoeritrocítica, que é o estágio silencioso da doença, não induzindo o desenvolvimento de sintomas ao hospedeiro (Sturm *et al.*, 2006). Após a maturação do parasito, os hepatócitos liberam novos merozoítos na corrente sanguínea.

Embora seja um estágio silencioso, assintomático, os hepatócitos infectados por parasitos produzem IFN (interferon) tipo I em resposta a detecção citosólica do RNA do parasito (Miller *et al.*, 2014). Esta resposta de citocinas contribui para a morte dos hepatócitos infectados por parasitos, através da ação de linfócitos natural killer (NKT), expondo os componentes do parasito a células apresentadoras de antígenos (APCs) (Liehl *et al.*, 2014). As APCs, principalmente células dendríticas e macrófagos, podem potencialmente reconhecer os parasitos expostos. Além disso, alguns esporozoítos que entram na circulação sanguínea podem não invadir os hepatócitos e morrer (Holz *et al.*, 2016).

1.2.2 Fase sistêmica da infecção

Os merozoítos são liberados dos hepatócitos infectados e, quando maduros, perdem a capacidade de infectar hepatócitos. No entanto, merozoítos maduros passam a infectar eritrócitos. Logo após a infecção dos glóbulos vermelhos (iRBCs), os parasitos aparecem morfológicamente como anéis dentro de iRBCs (Chang *et al.*, 2004). Os parasitos, então, se desenvolvem em trofozoítos e finalmente sofrem esquizogonia (divisão celular do plasmódio) para formar merozoítos diferenciados, que são liberados na corrente sanguínea. Cada eritrócito amadurecido na fase esquizonte libera novos merozoítos, que podem invadir outros glóbulos vermelhos. Este ciclo de invasão de eritrócitos e do crescimento do parasito é chamado de infecção sanguínea ou fase eritrocítica (Mota *et al.*, 2001).

No estágio intraeritrocítico, os eritrócitos parasitados pelos plasmódios são sequestrados em pequenos vasos sanguíneos e induzem o comprometimento do fluxo sanguíneo local, levando a distúrbios e falhas em vários órgãos, inclusive no fígado (Yazdani *et al.*, 2006). Os sinusóides hepáticos são vasos estreitos, nos quais o fluxo sanguíneo é mais lento do que em outros capilares. Esse padrão incomum de fluxo sanguíneo é contribuído pelo estreito diâmetro dos sinusóides, pela contração dos esfíncteres dos músculos lisos contráteis nas paredes das arteríolas hepáticas (Macswen e Scothorne, 1979; Macphee *et al.*, 1995). O fluxo sanguíneo lento e essencial para permitir que antígenos presentes na circulação entrem em contato com as células de Kupffer (KCs), macrófagos que residem no lúmen dos sinusóides hepáticos (McCuskey e Reilly, 1993). Essa arquitetura única favorece, também, as interações entre leucócitos circulantes e células hepáticas por interações via moléculas de adesão. No fígado, as células Kupffer, que se encontram ancoradas às células endoteliais sinusoidais, formam a primeira linha de células imunes hepáticas, detectando e orquestrando respostas contra toxinas, bactérias e parasitos transmitidas pelo sangue (Heymann *et al.*, 2015). A localização estratégica das células de Kupffer, portanto, lhes permite detectar os iRBCs infectados aderidos ao endotélio vascular hepático desde os estágios iniciais da infecção (Lai *et al.*, 2018).

Além disso, durante o ciclo de replicação intraeritrocítico, ocorre a formação da hemozoína, um pigmento produzido pelo *Plasmodium spp.*, que é produto da metabolização da hemoglobina hospedeira, promovendo a agregação de moléculas tóxicas formadas pelas porções heme (Egan, 2002). Uma vez que o esquizonte passou por replicação dentro do iRBC do hospedeiro, o eritrócito se rompe, liberando hemozoína que pode ser fagocitado por monócitos e neutrófilos circulantes e macrófagos teciduais (Krugliak *et al.*, 2002; Awandare *et al.*, 2011) A característica mais generalizada observada no fígado é a hiperplasia das células de Kupffer com deposição de hemozoína (Akilesh *et al.*, 2019).

As células de Kupffer (KCs) respondem à infecção parasitária sistêmica através de mecanismos de morte celular, liberando alarminas que, por sua vez induzem o recrutamento de monócitos inflamatórios que, ao final da resposta inflamatória contribui para o repovoamento da população de KCs (Lai *et al.*, 2018).

A fagocitose dos eritrócitos, plaquetas e leucócitos pode ser um dos principais contribuintes para as citopenias agudas, incluindo a anemia. Além disso, as células de Kupffer, podem ser hiperativadas durante a infecção por plasmódio, e

fagocitar não só eritrócitos infectados e defeituosos, mas também eritrócitos saudáveis, contribuindo para a anemia grave da malária (Akilesh *et al.*, 2019).

Após ativação, as células de Kupffer podem produzir mediadores inflamatórios, IL-1 β (interleucina-1 beta), TNF (fator de necrose tumoral), radicais de oxigênio e proteases necessárias para degradação do parasito. Tais mediadores inflamatórios podem causar ativação e dano ao tecido circundante, especialmente quando produzidos em grandes quantidades. Os leucócitos sanguíneos também se infiltram no fígado e produzem mediadores inflamatórios, aumentando assim a inflamação hepática (Brugat *et al.*, 2020).

Portanto, o fígado contribui significativamente para a patologia grave da malária, através da fagocitose de glóbulos vermelhos infectados (iRBC) e hemozoína, como já foi evidenciado pela abundante deposição de pigmento em amostras histológicas hepáticas de pacientes (Bahlla *et al.*, 2006; Awandare *et al.*, 2011). Além disso, em modelos de malária em camundongos, os níveis mais altos de hemozoína são encontrados no fígado em comparação com outros órgãos, incluindo o baço, e os níveis totais desse pigmento aumentam com a severidade da doença (Awandare *et al.*, 2011).

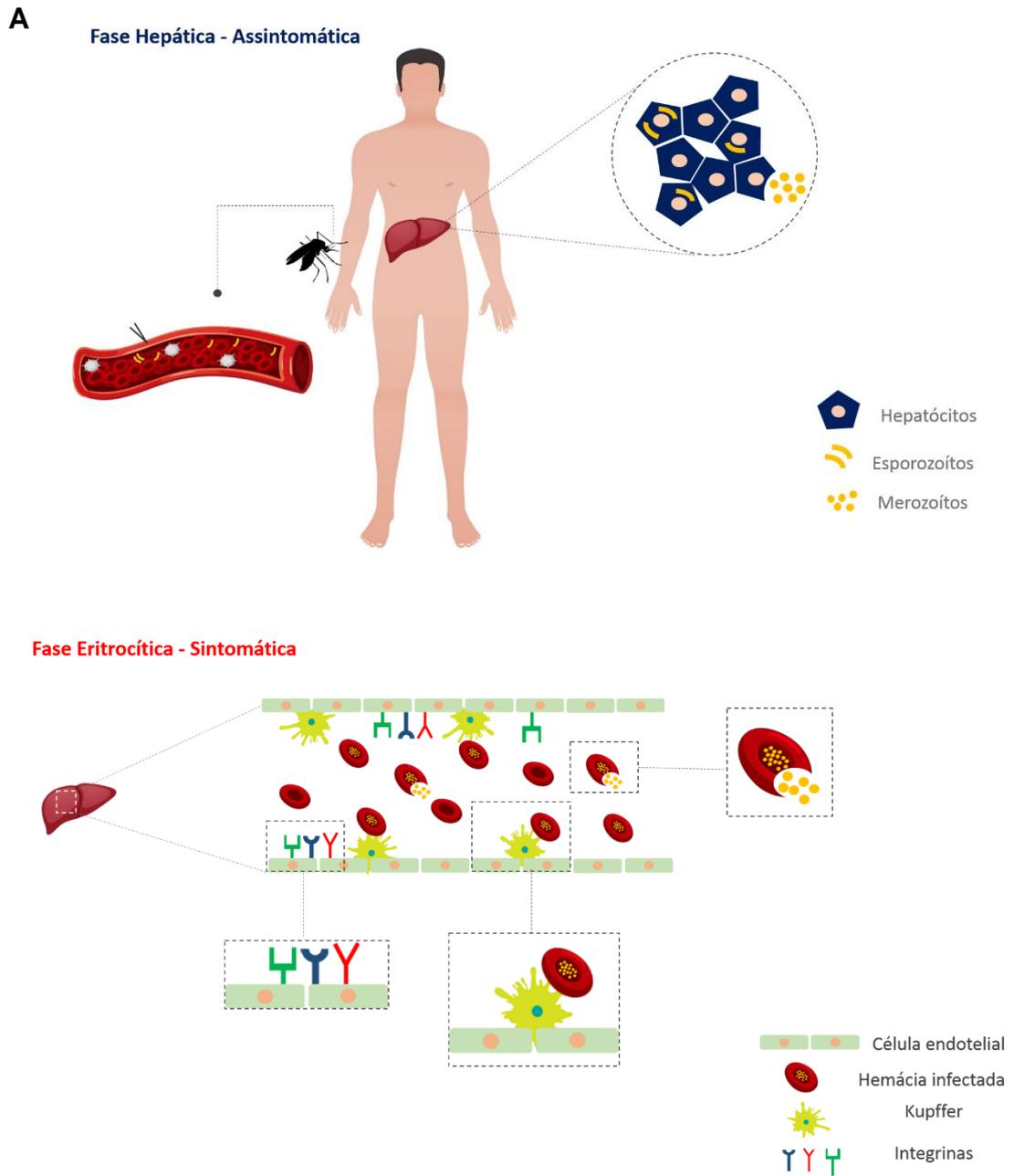


Ilustração 2: Fases da infecção por *Plasmodium spp.* A) Fase hepática assintomática. B) Fase Sintomática: Hemólise, ativação endotelial pelo aumento da expressão de integrinas, hemofagocitose pela ativação de macrófagos teciduais.

1.3. Eritropoiese durante o desenvolvimento pós-natal e em decorrência da malária

A eritropoiese é a formação, crescimento e maturação dos eritrócitos, desde a célula-tronco hematopoiética, passando pelas células progenitoras hematopoiéticas (HSCs) e se diferenciando em células multipotentes: linfoides (que darão origem aos linfócitos) e em mieloides (Hanspal *et al.*, 1994). As últimas originam além dos eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. Na medula óssea, a eritropoiese, normalmente, se faz pela diferenciação da célula tronco em célula da linhagem eritrocitária, o proeritroblasto, que pela ação de fatores bioquímicos específicos se diferencia nas seguintes células: eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático e reticulócito, esse último, é liberado para a circulação sanguínea periférica (Hanspal *et al.*, 1994).

Em organismos adultos e em homeostase, esse processo é regulado por elementos do microambiente da medula óssea, como fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas, por exemplo o hormônio eritropoietina, produzido pelos rins e hepatócitos (Mikkola e Orkin, 2006). Além disso, a eritropoiese ocorre em nichos especializados denominados “ilhas eritroblásticas”, compostas de eritroblastos em torno de um macrófago central (Hanspal *et al.*, 1994). Acredita-se que esses macrófagos promovam a proliferação e maturação de eritroblastos e fagocitam o pirenócito nucleado (o restante da divisão celular final que cria o reticulócito enucleado) (McGrath *et al.*, 2015).

Durante o desenvolvimento embrionário e fetal, no entanto, a eritropoiese ocorre em diferentes órgãos: saco vitelino, linfonodos, fígado fetal e baço. (McGrath, 2015). Em camundongos, no dia embrionário 9.5, o fígado inicia seu papel hematopoiético, sendo o principal sítio de hematopoiese fetal (Lee *et al.*, 2012). À medida que o feto se desenvolve, o número de células eritroides aumenta, sendo a eritropoiese, a principal função do órgão nesse período. À medida que ocorre a diferenciação dos hepatoblastos e maturação dos hepatócitos, o órgão não suporta mais essa função hematopoiética, que então, é assumida pela medula óssea antes do nascimento, e continua por toda vida. (Gruppuso e Sanders, 2016). Entretanto, em determinadas circunstâncias patológicas, principalmente como mecanismo compensatório pela destruição da função própria da medula óssea, a gênese dos eritrócitos se desloca para outros órgãos, como baço e fígado. Este processo,

chamado eritropoiese extramedular, é uma característica importante, mas pouco compreendida, de doenças hematológicas e de infecções, como a malária (Barberá-Guillem, 1989; Yang *et al.*, 2020).

Sabemos também, que a hematopoiese hepática pode persistir após o nascimento por um período de duas semanas em camundongos (Grossi, 1985). Dados publicados pelo nosso grupo (Nakagaki e Mafra *et al.*, 2018) revelou que o fígado murino passa por um período de alterações após o nascimento até a fase adulta, onde observamos a transição da população mieloide em neonatos para uma população linfóide em adultos. Também mostramos a diferença na organização celular e vascular, em que nos primeiros dias após o nascimento não apresentam um padrão claro de organização, com ilhas de células imunes no parênquima hepático e vasos em forma de colmeia, e vão se modificando até ficarem completamente organizados em cordões de hepatócitos entremeados por sinusóides com células imunes dentro dos vasos, em adultos. Neste mesmo estudo, evidenciamos a incapacidade de células de Kupffer de capturar bactérias e também de apresentarem uma baixa expressão de genes relacionados com a função de captura de patógenos em camundongos neonatos (Nakagaki e Mafra *et al.*, 2018).

Tendo em vista estas descobertas do desenvolvimento hematopoiético pós-natal, e a importância dos fatores envolvidos na suscetibilidade infantil à malária, pretendemos com o presente estudo caracterizar a dinâmica das células hematológicas envolvidas no processo que corresponde a malária grave, visto que pode haver uma importante relação entre a transição da hematopoiese durante o desenvolvimento, e a gravidade da infecção malárica em crianças.

1.4. Suscetibilidade infantil: anemia da malária grave

A anemia é a principal complicação da malária responsável pela alta taxa de mortalidade em crianças, sendo também considerada a principal manifestação clínica da malária infantil, podendo ser responsável por mais de 40% de mortalidade nas populações pediátricas com malária (GBD, 2016). É importante ressaltar que altos níveis de parasitemia podem resultar em infecção e hemólise maciça de eritrócitos, resultando em anemia profunda (Chang *et al.*, 2004, Awandare *et al.*, 2007). Na tentativa de controlar a parasitemia, o hospedeiro libera uma série de citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas efetoras, como parte da resposta imunológica (Like *et al.*, 2004). Dependendo da magnitude e do

momento da liberação do mediador inflamatório, a resposta imune à malária pode resultar em controle bem-sucedido da parasitemia ou, alternativamente, em um desequilíbrio do meio inflamatório que pode induzir dano ao hospedeiro, incluindo a supressão da atividade eritropoética, o que acaba contribuindo para o grave quadro de anemia (Awandare *et al.*, 2007).

Em humanos adultos infectados por *P. falciparum* há dano parenquimatoso da medula óssea, hiper celularidade e hiperplasia eritroide, mas ausência de dano à unidade formadora de eritrócitos (BFU-E) ou unidade formadora de colônias-eritrócito (CFU-E). Além disso, há o envolvimento de citocinas e outros mediadores da inflamação na eritropoiese inadequada durante a malária pois sabe-se que as citocinas desempenham um papel na maturação de células eritroides (Chasis e Mohandas, 2008). A IL-6 induz a expressão da hepcidina, que é um regulador principal da mobilização de ferro, levando à diminuição da disponibilidade de ferro para a eritropoiese, o TGF inibe a proliferação de eritroblastos, o TNF α induz a clivagem do principal fator de transcrição eritróide, GATA-1, e a produção de IFN- γ induzidos por macrófagos expressando TRAIL (ligante indutor de apoptose) inibindo a diferenciação de eritroblastos (Lyke *et al.*, 2004).

Embora existam estudos que identificaram que há grande presença da hemozoína em monócitos e macrófagos em crianças com eritropoiese ineficaz, e que progenitores eritróides localizados nas proximidades de macrófagos contendo hemozoína têm anormalidades do desenvolvimento celular, ainda não foi elucidado o mecanismo pelo qual a eritropoiese é prejudicada (Egan, 2002; Casals-Pascual *et al.*, 2006). Em crianças, portanto, o mecanismo de supressão da eritropoiese não é bem compreendido, comprometendo o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para amenizar a principal complicação clínica da malária infantil (Were *et al.*, 2009, Helleberg *et al.*, 2005).

2. Justificativa

Embora exista há milhares de anos, e muitas organizações concentrem esforços na tentativa de erradicar a malária, ainda há muitas lacunas no entendimento de aspectos patológicos, principalmente dos envolvidos na letalidade de crianças (Organização Mundial da Saúde, 2020). Aplicação e desenvolvimento de vacinas direcionados aos estágios hepáticos ou sanguíneos do *Plasmodium spp.* sofrem de falta de eficácia a longo prazo em áreas endêmicas (Doll e Harty, 2014; Laurens, 2020; Agnandji *et al.*, 2012), e os medicamentos antimaláricos são frequentemente comprometidos pela resistência emergente do parasito (Crompton *et al.*, 2014).

Aspectos hepáticos estão fortemente relacionados com o estabelecimento da malária, tanto durante a fase inicial, onde o parasito usa a estrutura do órgão como primeiro sitio de replicação, quanto durante o desenvolvimento e progressão da doença, em que o perfil e a dinâmica da população imune hepática se modificam, a arquitetura vascular é comprometida, e a disfunção de eritropoiese acontece. No entanto, a capacidade do fígado e dos demais órgãos eritropoiéticos; medula óssea e baço, durante o desenvolvimento pós-natal, de realizar a eritropoiese compensatória no decorrer da anemia induzida por malária, bem como a contribuição para a doença de células imunes hepáticas, que passam por período de transição, não é bem compreendida. Visto que o desenvolvimento hematopoiético após o nascimento pode ser determinante no estabelecimento e evolução da infecção em crianças, nesse estudo, visamos fornecer novos entendimentos dos mecanismos envolvidos na mortalidade e sequelas da malária, fornecendo bases para novas alternativas terapêuticas e abordagens clínicas para tratar os sintomas da malária infantil.

3 Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um modelo experimental em camundongos que possa ser útil no entendimento da mortalidade de crianças por malária, caracterizando a dinâmica e os mecanismos envolvidos na eritropoiese em resposta à infecção por *Plasmodium chabaudi*.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Padronizar o modelo de infecção por *P. chabaudi* em camundongos em diferentes idades após o nascimento.

3.2.2 Avaliar a sobrevivência e a cinética da parasitemia dos camundongos infectados por *P. chabaudi*.

3.2.3 Avaliar parâmetros hematológicos em camundongos infantes e adultos infectados por *P. chabaudi*.

3.2.4 Avaliar a produção de progenitores eritroides em resposta à infecção, em diferentes nichos hematopoiéticos, em camundongos infantes e adultos, por citometria de fluxo.

3.2.5 Quantificar a população de células de kupffer em camundongos infantes e adultos infectados, por citometria de fluxo e microscopia confocal.

3.2.6 Avaliar a expressão de genes reguladores da eritropoiese por RT-PCR no tecido hepático

4 Material e Métodos

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 provenientes do biotério do Centro de Biologia Gastrointestinal (ICB/UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais de diferentes idades, a partir do dia do nascimento (dia 0), uma semana (dia 7), duas semanas (dia 14), três semanas (dia 21), quatro semanas (dia 28) e oito semanas (adulto), foram gerados de matrizes (grupos de duas fêmeas para cada um macho), e acondicionados em microisoladores com ração (NUVILAB) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Os procedimentos experimentais foram aprovados e realizados de acordo com às normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA – UFMG) sob o protocolo 133/2021.

4.2 Modelo de infecção por *Plasmodium chabaudi*

Amostras criopreservadas da cepa de *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS), foram descongeladas em temperatura ambiente e posteriormente inoculadas via intraperitoneal (100µL/animal). A manutenção da cepa foi feita em passagens seriais em camundongos C57BL/6, uma vez por semana, até dez vezes (dez semanas). Para infecção experimental, os camundongos foram inoculados por via intravenosa, com 1×10^5 eritrócitos infectados, nas diferentes idades: 0 (recém-nascido, no dia do nascimento), 1, 2, 3, 4 e 8 semanas. Os animais do grupo “controle” receberam o mesmo volume de PBS estéril, administrado via intravenosa. A parasitemia foi quantificada por esfregaços sanguíneos, corados por panótico rápido (Laborclin) e analisada em microscópio óptico, a cada dois dias, e a sobrevivência dos animais infectados foi analisada durante trinta dias após a infecção.

4.3 Parâmetros hematológicos

As amostras de sangue foram coletadas via plexo retro-orbital e depositadas em microtubos contendo Na₂-EDTA e posteriormente adquiridas em um analisador hematológico automático (Celltac MEK 6550J/K) e os índices hematimétricos foram obtidos. Para análise manual, foi retirado 1µL de sangue, por punção da veia caudal, em seguida diluído em PBS (1:200), a contagem do número total de eritrócitos por

mm³ foi feita através da observação do quadrante central da câmara de Neubauer por microscópio óptico. A concentração de hemoglobina foi mensurada através do ensaio colorimétrico de cianometahemoglobina (Bioclin ref. K023) de acordo com o protocolo do fabricante, e lida em espectrofotômetro (VERSAmax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) a 540 nm.

4.4 Indução de anemia hemolítica pela administração de Fenilhidrazina

Os camundongos de 4 e 8 semanas de idade, receberam por via intraperitoneal, 0,05 mg/g de fenilhidrazina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), por dois dias consecutivos (tratamento de duas doses) ou por sete dias consecutivos (tratamento contínuo) e a curva de mortalidade foi analisada. No 4º dia após o tratamento, foi feita a contagem total dos eritrócitos e a dosagem de hemoglobina (Item 4.3), de ambos os grupos tratados.

4.5 Isolamento de células não-parenquimais hepáticas

Os animais foram anestesiados, com injeção subcutânea de ketamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) (Syntec), diluídos em salina fisiológica. Os animais receberam 4ul/g do anestésico. Após a anestesia, foram submetidos à laparotomia seguida da retirada do fígado. O fígado retirado foi macerado e digerido numa solução de RPMI 1640 e colagenase a 0,5 mg/mL, sob agitação, a 37°C. Após a digestão, os hepatócitos foram separados por centrifugação diferencial, recuperando-se então as células não-parenquimais hepáticas.

4.6 Avaliação do perfil celular por Microscopia Confocal Intravital

Os animais receberam por via intravenosa (i.v.), uma solução de 0,1 mL/g contendo os anticorpos conjugados aos fluorocromos para evidenciar células endoteliais: anti-CD31 conjugado à BV421 (3 µg/20g, BD Bioscience) e células de Kupffer: anti-F4/80 conjugado a BV480 (3 µg/20g, BD Bioscience). Após 10 minutos, os animais foram anestesiados por via subcutânea com ketamina (80 mg/Kg, Syntec) e xilazina (15 mg/Kg, Syntec) e submetidos a cirurgia para exposição do fígado. O animal com o fígado exposto foi posicionado sobre lamínula em suporte de acrílico adaptado para uso no microscópio. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1 (Nikon, Japão) e analisadas com o auxílio do software NIS-Elements (Nikon, Japão).

4.7. Isolamento de células eritróides dos órgãos hematopoiéticos

Os animais de 4 e 8 semanas de idade, no sétimo dia após a infecção e os animais do grupo controle, foram anestesiados, com injeção subcutânea de ketamina (80mg/kg) e xilazina (15mg/kg) (Syntec), diluídos em salina em concentração fisiológica. Após a anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia seguida exsanguinação pela veia cava inferior, retirada do fígado, baço e medula óssea. O sangue foi coletado em heparina a 5000UI/ml e centrifugado a 400 x g por 10 minutos para obtenção de células eritroides e progenitores. O fígado retirado foi macerado e digerido numa solução de RPMI 1640 e colagenase VII a 0,5 mg/mL, sob agitação, a 37°C. Após a digestão, os hepatócitos foram separados por centrifugação diferencial, recuperando-se, então, as células não-parenquimais hepáticas. O baço foi macerado mecanicamente e centrifugado a 400 x g por 10 minutos para obtenção dos progenitores de eritrócitos. A medula óssea foi adquirida através da lavagem do fêmur e tibia com solução RPMI 1640, seguida da mesma centrifugação para obtenção dos precursores eritróides.

4.8 Citometria de fluxo

4.8.1 Análise de células de Kupffer

Após isolamento das células não-parenquimais hepáticas, 5 x 10⁵ de células, de cada amostra, foram marcadas com anticorpos acoplados a fluorocromos, específicos para leucócitos; anti-CD45 conjugado a APC e para células de Kupffer; anti-F4/80 conjugado a FITC. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Accuri C6 (Beckinton Dickinson – BD) e analisadas no software FlowJo v10.

4.8.2 Análise de progenitores eritróides dos compartimentos hematopoiéticos

As células obtidas do isolamento do sangue, fígado, baço e medula óssea, foram contadas, e 1x10⁶ células de cada amostra foram marcadas com os anticorpos anti-CD71 conjugado à PE (0,2mg/ml BD, Bioscience) e anti-Ter119 conjugado à APC (BD, Bioscience) para identificação da população de precursores eritroides, em seguida, foi realizada a aquisição das amostras no citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter CytoFlex,) e as análises dos dados realizadas no software FlowJo 10.

4.8.3 Análise da parasitemia em precursores eritroides e em eritrócitos maduros do sangue periférico

Foram coletados 5 µl do sangue periférico, por punção da veia caudal, e depositados em tubos contendo 195 µL da solução de coloração: 5 µM Hoechst 33342, FVS-510 (BD, Bioscience), CD71 conjugado à PE (0,2mg/ml BD, Bioscience) e anti-Ter119 conjugado à APC (BD, Bioscience), heparina (30 U/mL) e PBS. Após o protocolo de marcação celular, as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter CytoFlex,) e as análises dos dados realizadas no software FlowJo 10.

4.9 Extração de mRNA e PCR em tempo real

A extração de RNA do fígado total foi realizada a partir de 20 mg de tecido, com o Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega) seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi eluído em água livre de nuclease. A quantidade de RNA total foi quantificada em NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e foram utilizados 60 ng de RNA para a transcrição reversa utilizando o KIT iScript™ cDNA Synthesis. O cDNA resultante foi amplificado por PCR utilizando-se kit iTaq™ Universal SYBR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden Germany). Os primers utilizados nesse trabalho estão descritos na seguinte tabela:

GENE	Primer	Sequência
GAPDH	Foward	5' ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA 3'
	Reverse	5' CGGCCAAATCCGTTACACCCGA 3'
IL-6	Foward	5' TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC 3'
	Reverse	5' TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC 3'
HAMP	Foward	5' AAGCAGGGCAGACATTGCGAT 3'
	Reverse	5' GAGGATGTGGCTCTAGGCTATGT 3'

A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor de Ct (threshold cycle) e na eficiência de amplificação. Os Cts obtidos para os genes de interesse foram normalizados subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (GAPDH) de cada amostra. Com esse valor, agora chamado de ΔCt , calculou-se o $\Delta\Delta\text{Ct}$, que corresponde ao ΔCt amostra – ΔCt do controle. Nesse estudo, utilizamos os controles (não infectados) de cada idade (4 e 8 semanas) para a comparação dos respectivos grupos infectados. A relação da expressão gênica entre a amostra e o controle foi calculada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “curva de melting”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

4.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados, bem como a elaboração dos gráficos, foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 8.0.1. Os valores foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média). A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se two-way ANOVA. Os grupos foram considerados significativamente diferentes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.

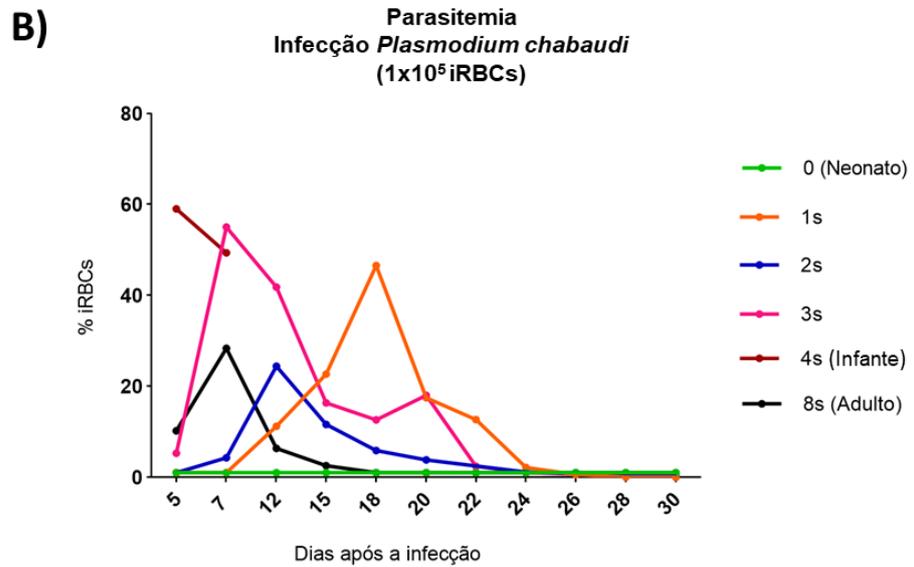
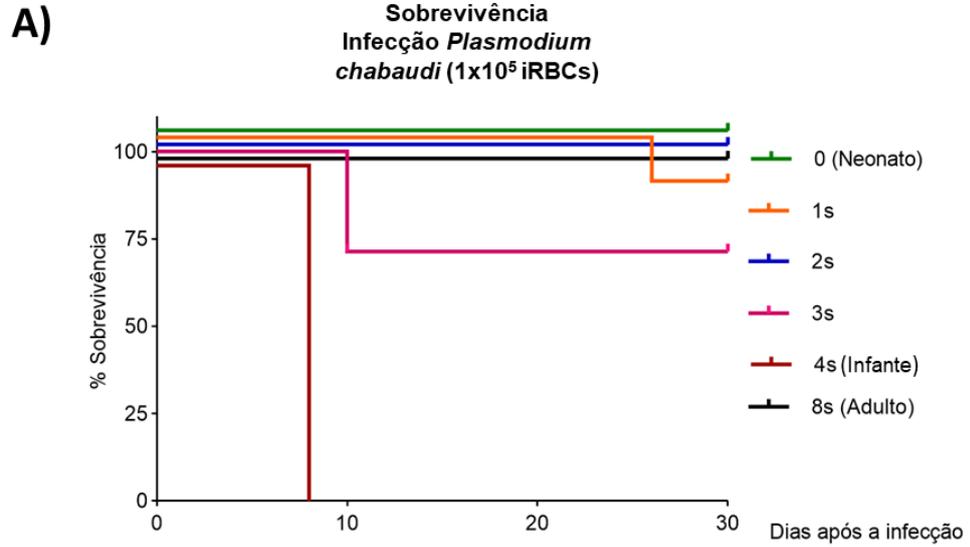
5. Resultados

5.1 Camundongos infantis são mais suscetíveis à infecção por *Plasmodium chabaudi*

Visando padronizar o modelo de infecção malárica em camundongos ao longo do desenvolvimento, inoculamos 1×10^5 eritrócitos infectados com *Plasmodium chabaudi*, por via intravenosa, em animais nas idades de 1, 2, 3, 4, e 8 semanas de vida. Através de esfregaços sanguíneos, corados com panótico rápido e analisados em microscópio óptico, observamos que animais adultos (8 semanas) possuem o pico de parasitemia no 7º dia após a infecção, com a média de 28% de eritrócitos infectados (**Figura 1**). Curiosamente, os animais que receberam o inóculo no dia do nascimento (dia 0) não apresentaram parasitemia evidente (<1%) ao longo dos 30 dias observados (**Figura 1B**). De maneira interessante, os animais que receberam o inóculo com 1, 3 e 4 semanas de idade, foram os que apresentaram o maior pico de parasitemia (média > 50%) (**Figura 1B**). A maior suscetibilidade à infecção foi observada em animais infantis, que morreram após a 3ª semana de vida. Dentre estes grupos de camundongos infantis suscetíveis, o que apresentou a maior taxa de letalidade foi o grupo de 4 semanas de idade, infectado, o qual teve o pico de parasitemia no 7º dia após o inóculo, com a média de 59% de eritrócitos parasitados e 100% de mortalidade (**Figura 1A-B**). A partir destes achados, selecionamos os grupos de animais infantis (4 semanas), por serem os mais suscetíveis e o 7º dia após a infecção, por ser o pico da parasitemia, para representar nosso modelo de suscetibilidade infante por malária, o comparando com o grupo de adultos (8 semanas) nos experimentos realizados.

Esse conjunto de dados nos indica que camundongos infantis infectados por *P. chabaudi* são mais suscetíveis, por possuírem hiperparasitemia (superior a 50% de iRBCs) e menor sobrevida quando comparado com animais neonatos e adultos

(Figura 1). Portanto, nosso modelo de infecção é útil para ser abordado no contexto de suscetibilidade infantil à malária.



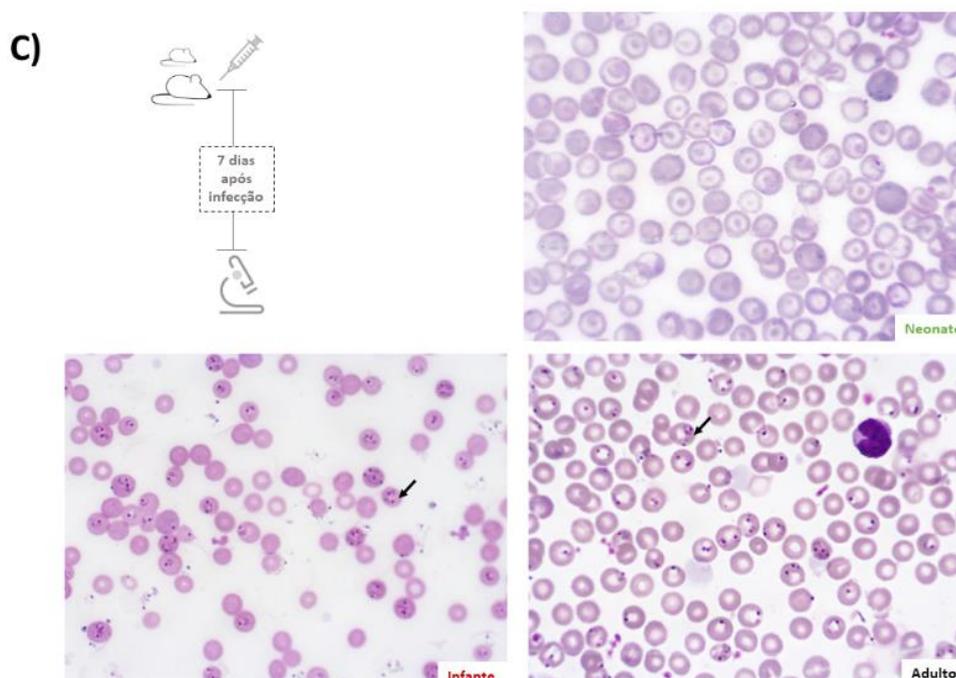


Figura 1: Suscetibilidade de camundongos infantis à infecção por *P. chabaudi*. A) Curva de sobrevivência ao inóculo, i.v. de 1×10^5 (iRBC) eritrócitos infectados. B) Pico de parasitemia durante 30 dias após o inóculo de 1×10^5 iRBC. C) Esfregaço de sangue de animais infectados com *P. chabaudi* (setas pretas), corados com panótico rápido, observados ao microscópio óptico, 7 dias após o inóculo. Objetiva 100x. Número de animais por grupo = 18, em 3 experimentos independentes.

5.2 O modelo de infecção por *Plasmodium chabaudi* causa anemia em camundongos infantis e adultos

Para avaliarmos os índices hematimétricos, frente à infecção, coletamos amostras de sangue, via plexo retro-orbital, dos animais infantis (4 semanas) e adultos (8 semanas), no 7º dia após a infecção, e analisamos em um contador hematológico automatizado. Através desta quantificação, notamos que os animais infectados, tanto os adultos, quanto os infantis, apresentam redução do número de eritrócitos (**Figura 2A**) e da concentração de hemoglobina (**Figura 2B**), diminuição de plaquetas (**Figura 2C**), e também apresentaram menores índices de plaquetócrito (**Figura 2D**) e hematócrito (**Figura 2E**), quando comparados com os animais saudáveis. A redução destes parâmetros hematológicos nos indica anemia nos grupos dos animais infectados. Embora os animais adultos saudáveis, apresentem mais leucócitos que animais infantis saudáveis, a infecção não altera a contagem total de leucócitos nos animais infantis e adultos (**Figura 2F**). A população de linfócitos parece ser responsável pelo aumento no número de leucócitos (**Figura 2H**), enquanto que os granulócitos parecem não ser diferente significativamente (**Figura 2G**).

Os resultados dos parâmetros hematológicos, obtidos aqui, nos informa que a infecção por *P. chabaudi* causa anemia e trombocitopenia em camundongos adultos e infantes de maneira similar (**Figura 2 A-E**). Além disso, em condições de homeostase, animais adultos possuem maior número de leucócitos circulantes, entretanto, a infecção não altera esse índice entre os grupos analisados.

Tendo em vista que a mortalidade de animais infantes infectados, começa no 7º dia após a infecção (**Figura 1A**) e coincide com o período de redução de eritrócitos e hemoglobina observados (**Figura 2 A-C**), podemos indicar, portanto, a anemia como um fator patológico em camundongos infantes, no nosso modelo de infecção.

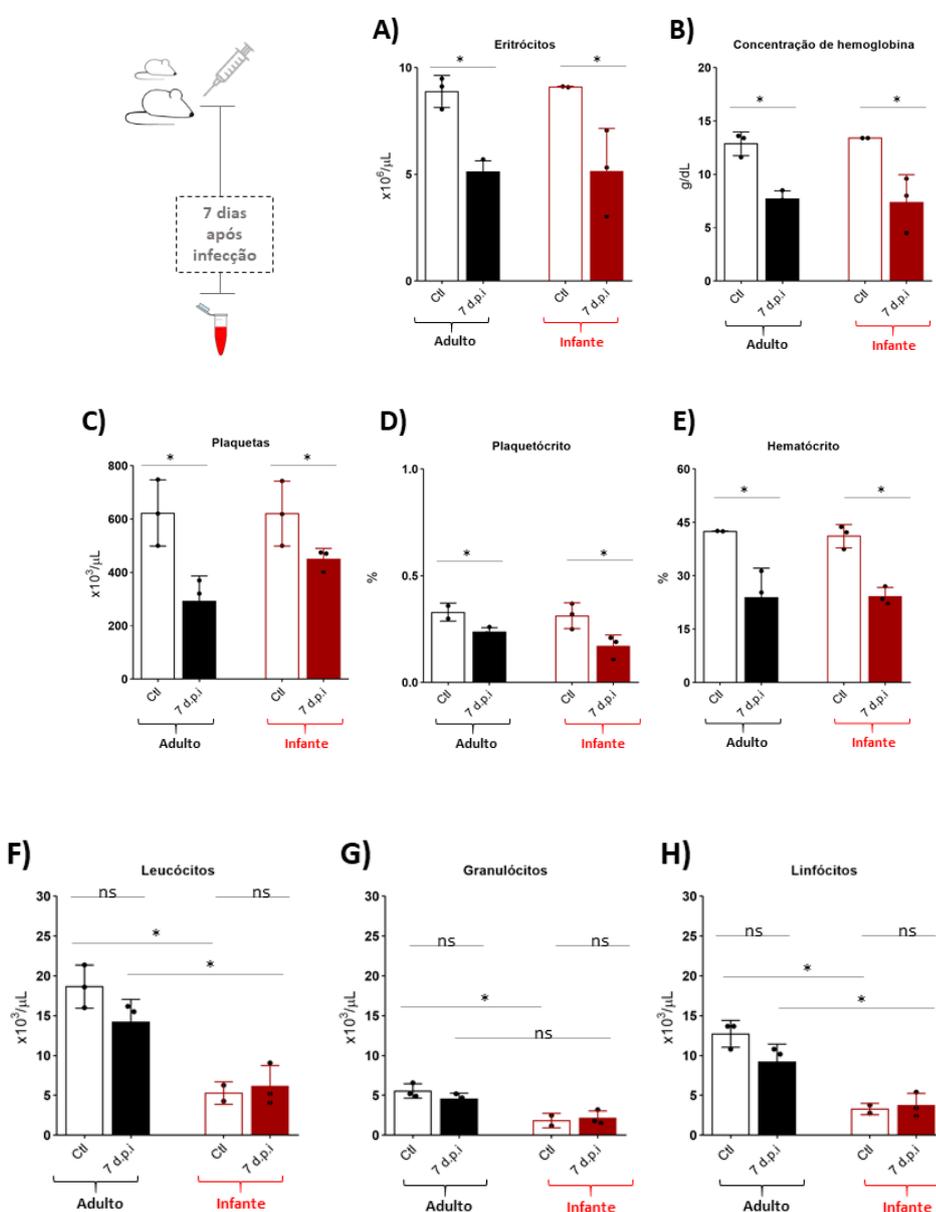
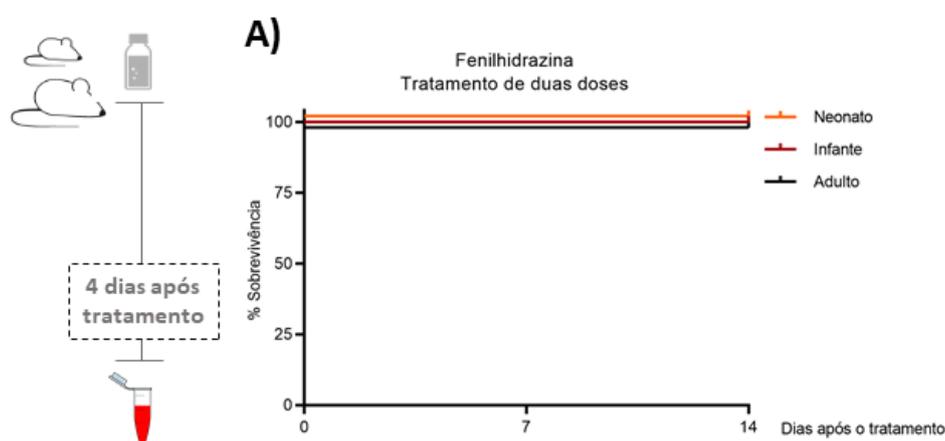


Figura 2: Parâmetros hematológicos. Análise de sangue total por contador hematológico automático. A) Contagem total de eritrócitos. B) Concentração de hemoglobina em g/dL. C) Hematócrito em % do sangue total. E) Contagem total de plaquetas. F) Contagem total de leucócitos. G) Contagem total de granulócitos H) Contagem total de linfócitos. N=3 animais por grupo. * $p < 0.05$. ns: não significativo estatisticamente.

5.3 Indução de anemia hemolítica contínua é letal para camundongos infantes e adultos

Para verificarmos se somente a anemia hemolítica poderia ser responsável pela mortalidade dos animais infantes (4 semanas de idade), induzimos a hemólise nos animais infantes e adultos, através da administração de fenilhidrazina (phz), por 2 ou 7 doses, em intervalos de 24 horas, por via intraperitoneal, e subsequente contagem dos eritrócitos e dosagem de hemoglobina, após o 4º dia de tratamento. Notamos que todos os grupos de animais tratados com duas doses de fenilhidrazina sobrevivem (**Figura 3A**), apesar de apresentarem anemia (**Figura 3B-C**), com redução de hemácias (~50%) e também diminuição de hemoglobina (~70%). Embora a hemólise aguda não seja letal para os grupos de animais analisados, em um modelo crônico de anemia hemolítica, através da administração de fenilhidrazina por 7 dias, vimos que 100% dos animais tratados não sobrevivem (**Figura 3D**).

Os achados, apresentados aqui, nos mostra que a anemia aguda não é letal para camundongos infantes e adultos, em contrapartida, ambos os grupos não sobrevivem à indução de hemólise crônica (**Figura 3**). Portanto, esse resultado é importante ao compararmos a anemia da malária grave, em que há ruptura contínua das hemácias devido ao crescimento e atividade dos merozoítos.



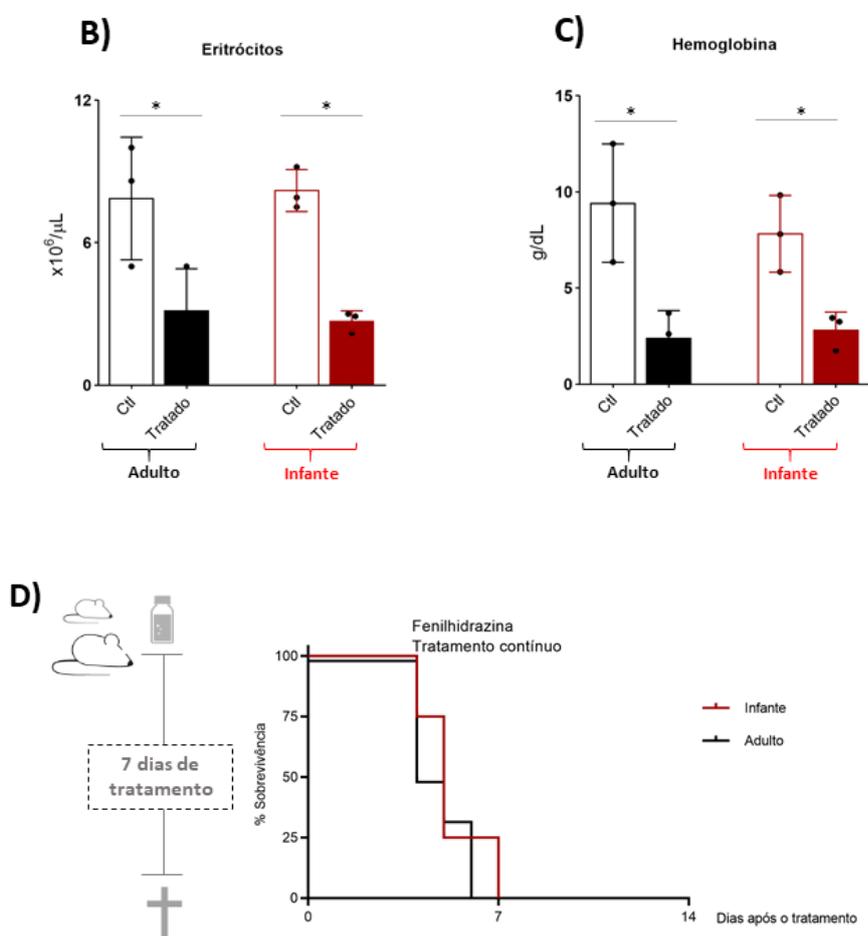


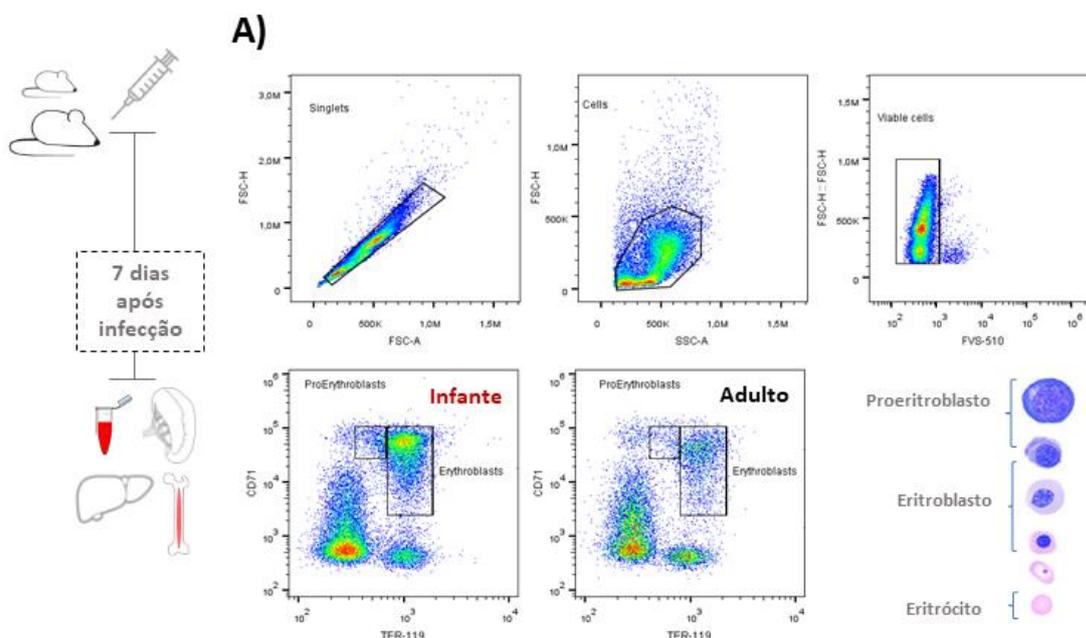
Figura 3: Indução de anemia por administração de fenilhidrazina (phz). A) Curva de sobrevivência ao tratamento de duas doses de 0,05 mg/g de fenilhidrazina. B) Contagem total de eritrócitos em câmara de Neubauer, 4 dias após o tratamento de duas doses de fenilhidrazina. C) Concentração de hemoglobina por teste de colorimétrico de cianometahemoglobina. D) Curva de sobrevivência ao tratamento de doses contínuas de 0,05 mg/g, por dia, de fenilhidrazina. N=3 animais por grupo. * $p < 0.05$.

5.4 Camundongos infantis promovem eritropoiese compensatória durante a infecção por *Plasmodium chabaudi*

Para caracterizarmos a dinâmica da resposta eritropoiética nos camundongos infantis durante a infecção, isolamos as células eritróides da medula óssea, baço, fígado e sangue, como descrito no item 4.7, e posteriormente analisamos os precursores de eritrócitos por citometria de fluxo, através dos marcadores CD71 e TER119 (**Figura 4A**). Demonstramos que animais adultos no 7^o dia após a infecção, não alteram significativamente a porcentagem de proeritroblastos

(CD71^{high} Ter119^{low}) nos órgãos hematopoiéticos e sangue comparados com adultos saudáveis (**Figura 4B-E**), enquanto animais infantis mostraram aumento (~90%) destes progenitores na medula óssea (**Figura 4B**) e baço (**Figura 4C**). Não encontramos diferenças significativas na porcentagem de proeritroblastos (marcadores de proeritroblastos) no fígado (**Figura 4D**) e sangue (**Figura 4E**) de animais infantis infectados comparados com o respectivo controle. Ao analisarmos a porcentagem de eritroblastos (CD71⁺ TER119⁺) na medula óssea, notamos redução significativa dessas células em adultos infectados se comparados a adultos saudáveis (**Figura 4F**), sugerindo a supressão da eritropoiese medular durante a malária. Curiosamente, de maneira oposta, os camundongos infantis mostraram aumento da porcentagem de eritroblastos durante a infecção por *P. chabaudi* em todos os órgãos analisados quando comparados com os animais do grupo infantis saudáveis (**Figura 4 B-I**).

Em conjunto, os dados apresentados, nos mostra que camundongos adultos infectados, suprimem a eritropoiese na medula óssea, e de maneira interessante, os camundongos infantis têm respostas contrárias a supressão da eritropoiese, e em todos os órgãos hematopoiéticos, bem como no sangue, há aumento de precursores eritroides (**Figura 4**).



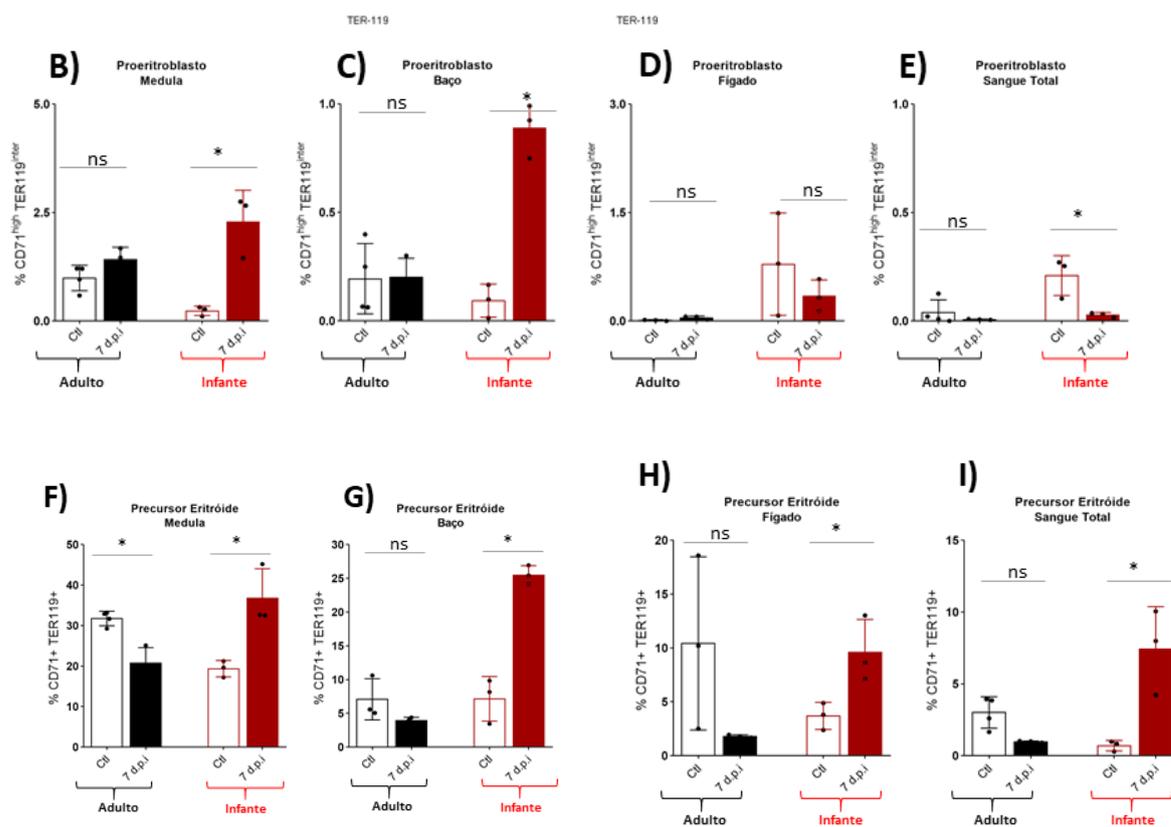


Figura 4: Análise de progenitor eritroide por citometria de fluxo. A) Estratégia de análise. Proeritroblastos (% CD71^{High} Ter119^{low}) na medula óssea (B), baço (C), fígado (D) e sangue (E). Eritroblastos (% CD71^{High} Ter119⁺) medula óssea (F), baço (G), fígado (H) e sangue (I). N=3 animais por grupo. **p* < 0.05. ns: não significativo estatisticamente.

5.5 Eritrócitos imaturos de camundongos infantis são nichos que contribuem para hiperparasitemia

Objetivando saber se a produção de progenitores de eritrócitos poderia ser um nicho para invasão de *P. chabaudi* em camundongos infantis, e portando, responsável pela hiperparasitemia observada no grupo, investigamos se o *P. chabaudi* seria capaz de infectar progenitores. Para isso, utilizamos o Hoechst, um intercalante de DNA, permeável à membrana plasmática, com finalidade de identificarmos a presença do plasmódio, e analisamos eritroblastos parasitados (CD71⁺ TER119⁺ Hoechst⁺). Além disso, também verificamos a parasitemia em eritrócitos maduros (CD71⁻ TER119⁺ Hoechst⁺) (**Figura 5A**). Confirmamos que animais infantis possuem maior porcentagem de parasitos em progenitores eritroides, se comparados com os animais adultos infectados (**Figura 5B**), e vimos o mesmo em eritrócitos maduros: o aumento de ~50% da parasitemia.

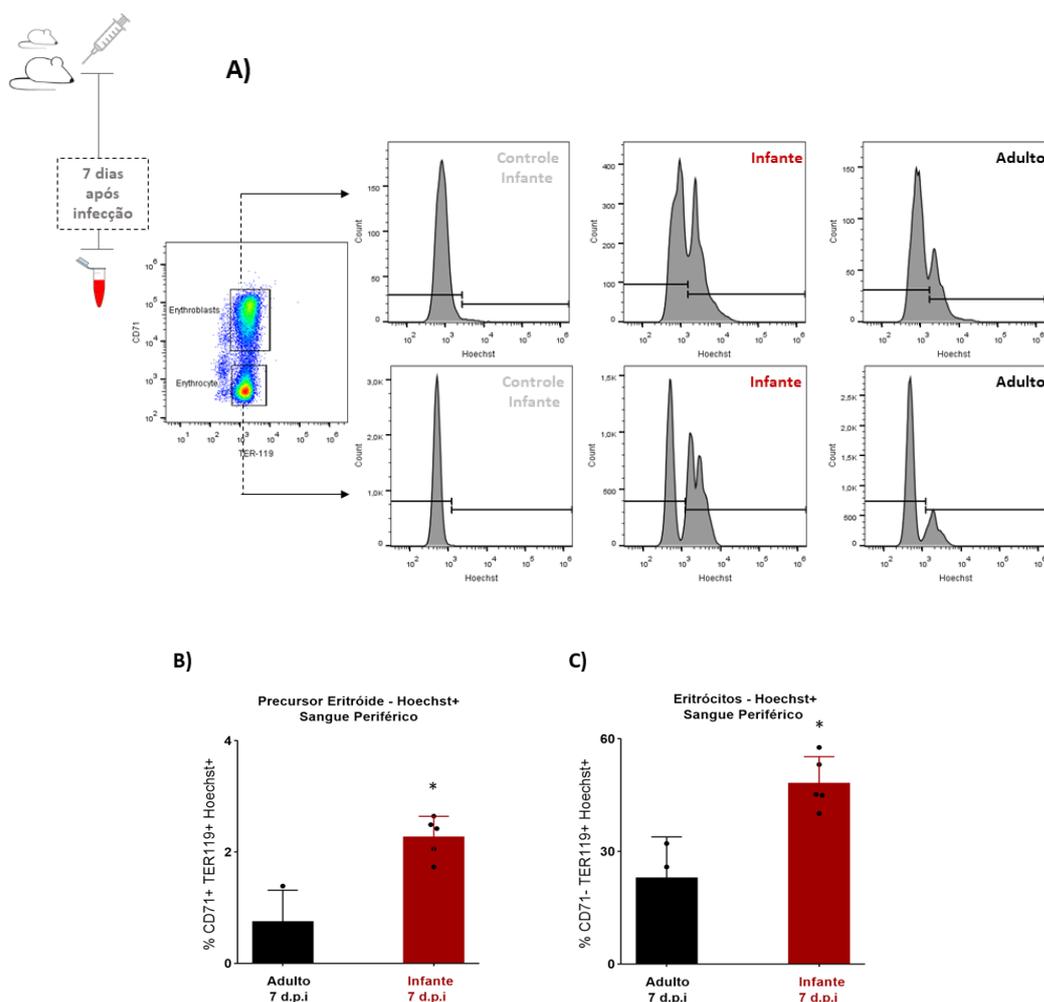


Figura 5: Análise de parasitemia em precusores eritróides por citometria de fluxo. A) Estratégia de análise. B) Parasitemia em precusores eritróides (CD71⁺ TER119⁺ Hoescht⁺). C) Parasitemia em eritrócitos maduros (CD71⁻ TER119⁺ Hoescht⁺). N=5 animais por grupo. * $p < 0.005$

5.6 Células de Kupffer reduzem acentuadamente em adultos infectados, mas não se alteram em infantes

Para analisarmos a população de células de Kupffer (F4/80⁺), bem como sua dinâmica no fígado após a infecção por *P. chabaudi*, utilizamos a técnica de citometria de fluxo (**Figura 6**) combinada com microscopia confocal (**Figura 7**). Por citometria de fluxo, podemos observar uma tendência de redução da porcentagem da população de F4/80⁺ durante a infecção, tanto em infantes quanto em adultos, embora não represente diferença estatisticamente significativa (**Figura 6B**). Por microscopia confocal, confirmamos a redução da população de células de Kupffer, de aproximadamente 33% durante a infecção em animais adultos (**Figura 7B e D**). Entretanto, em animais infantes, não notamos diferença na contagem de células de Kupffer em resposta a infecção (**Figura 7A e D**). Porém, é interessante notar que no

fígado de animais infantis saudáveis há maior número de células F4/80⁺, do que no fígado de animais adultos saudáveis, portanto, no momento da infecção, animais infantis possuem maior quantidade de células de kupffer do que os animais adultos (**Figura 7D**). Ao analisarmos pela luz transmitida do microscópio confocal, observamos a presença de hemozoína, cristal formado pelo *P. chabaudi* ao metabolizar a hemoglobina. Ainda, notamos que há maior acúmulo de hemozoína nos fígados de animais infantis infectados, do que em adultos infectados. (**Figura 7C**).

Em suma, as análises de células de Kupffer, no ambiente hepático, nos indica que ao contrário do que ocorre em animais adultos infectados, camundongos infantis não reduzem a população de células F4/80⁺, e ainda, que no ambiente hepático, há maior acúmulo de hemozoína nesse grupo analisado (**Figura 7**).

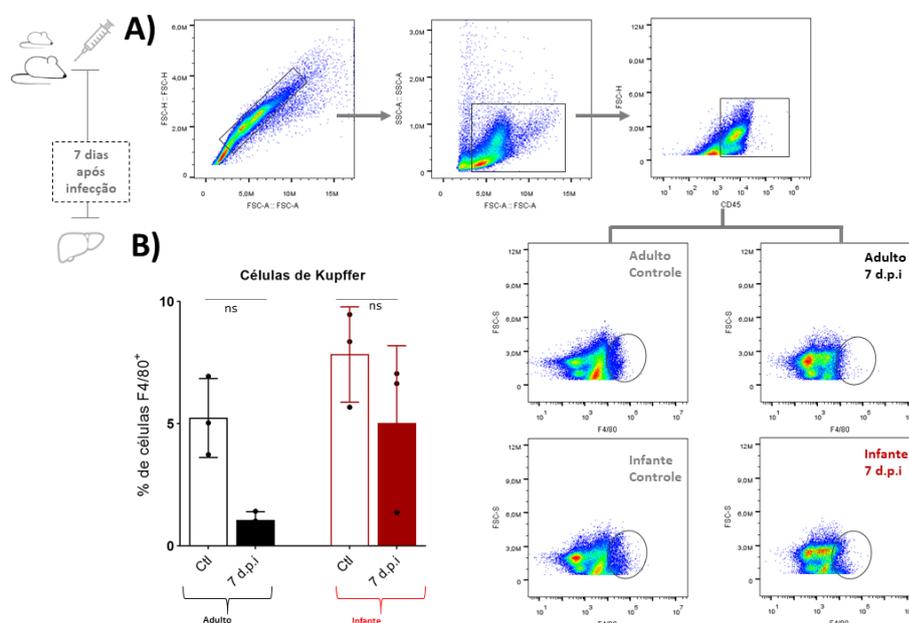
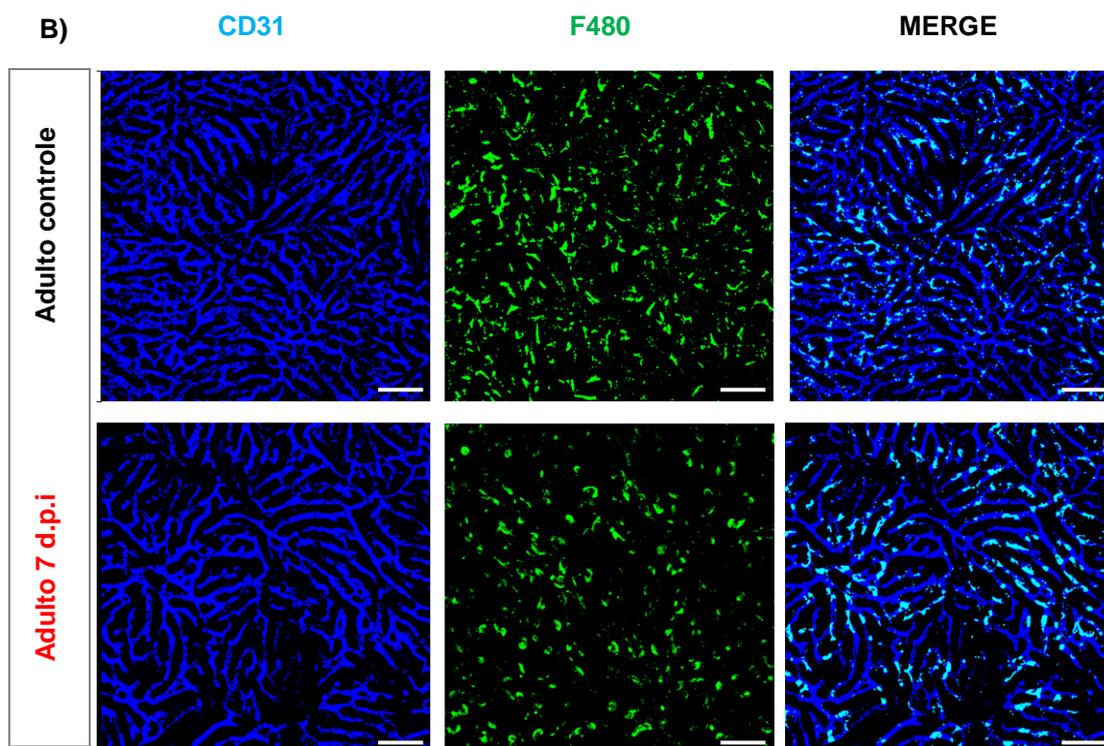
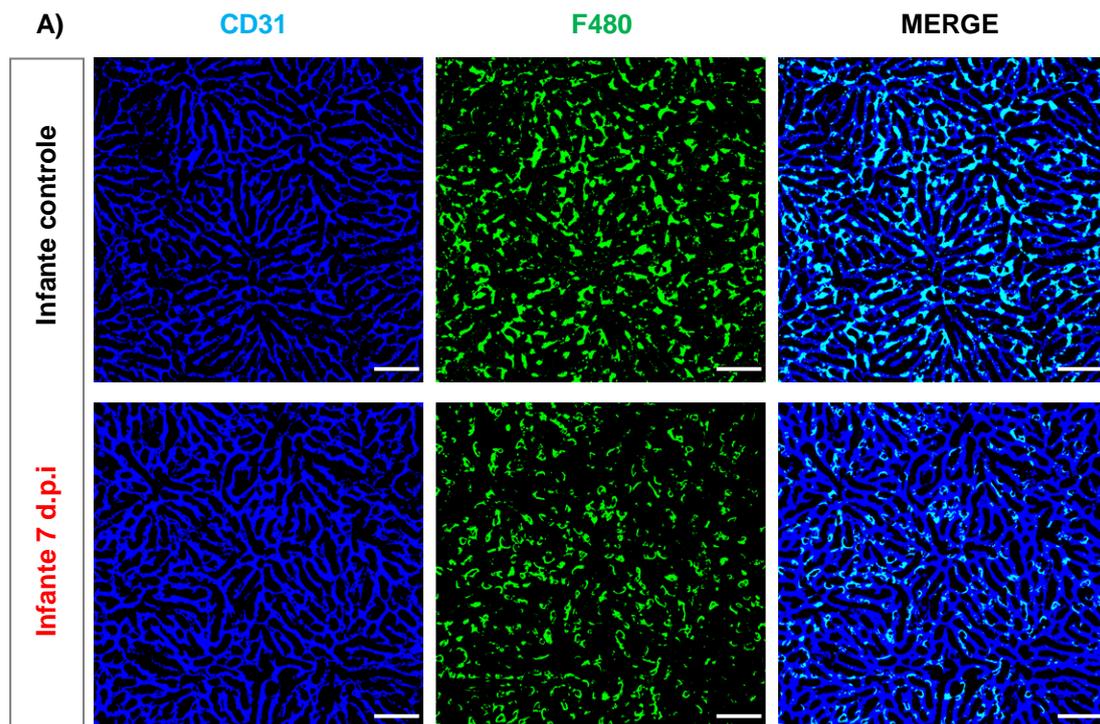


Figura 6: Análise de células de células F4/80⁺ por citometria de fluxo. A) Estratégia de análise. B) % de células de Kupffer (F4/80⁺). N=3, por grupo. ns: não significativa estatisticamente.



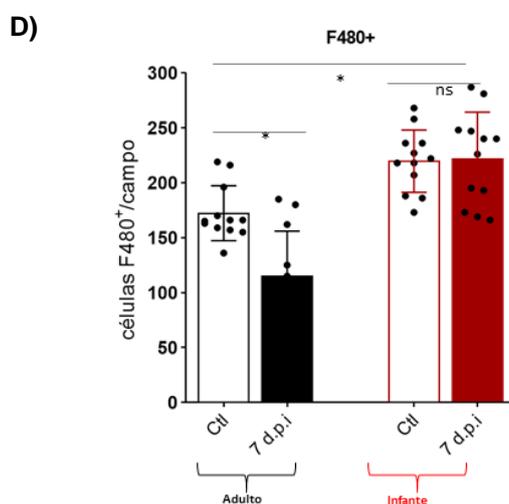
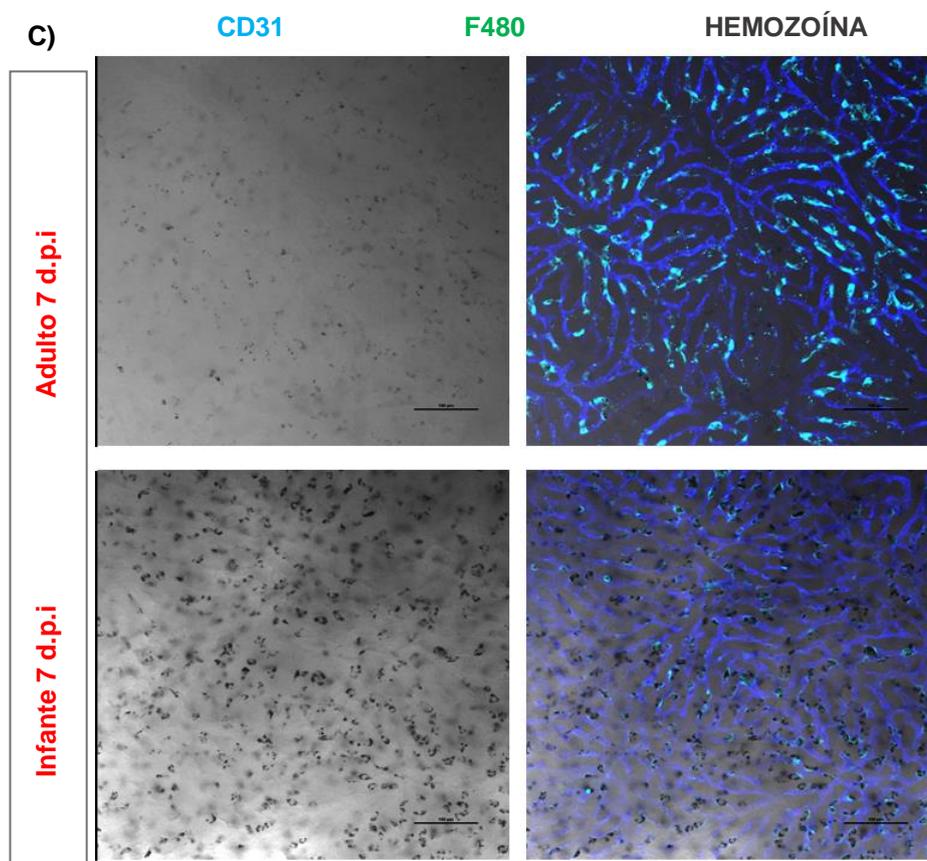


Figura 7: Quantificação de células de Kupffer por microscopia confocal. A) Microscopia confocal do fígado de camundongos adultos: controle e infectados, B) infantes: controle e infectados. C) Observação de cristais de hemozoína através da luz transmitida. D) Quantificação de células F4/80⁺ por campo. N=3 animais por grupo e 4 imagens por animal. * $p < 0,05$. ns: não significante estatisticamente. Barra: 100 μ m

5.7. Há aumento da expressão de genes relacionados à eritropoiese no fígado de camundongos infantes infectados

Com o objetivo de identificar possíveis alterações na expressão de genes, relacionados com a disfunção da eritropoiese, no fígado de animais infantes e adultos infectados, coletamos 20 mg do tecido hepático, e posteriormente analisamos a expressão gênica de IL-6 e HAMP, que codifica hepcidina, um importante regulador de ferro sistêmico (**Figura 8**). A partir disso, observamos que animais adultos, não alteram a expressão hepática de IL-6, entretanto, notamos aumento significativo de IL-6 no fígado de camundongos infantes infectados (**Figura 8A**).

A expressão de HAMP, embora apresentasse tendência de aumento em animais infantes infectados, não se mostrou significativa estatisticamente (**Figura 8B**).

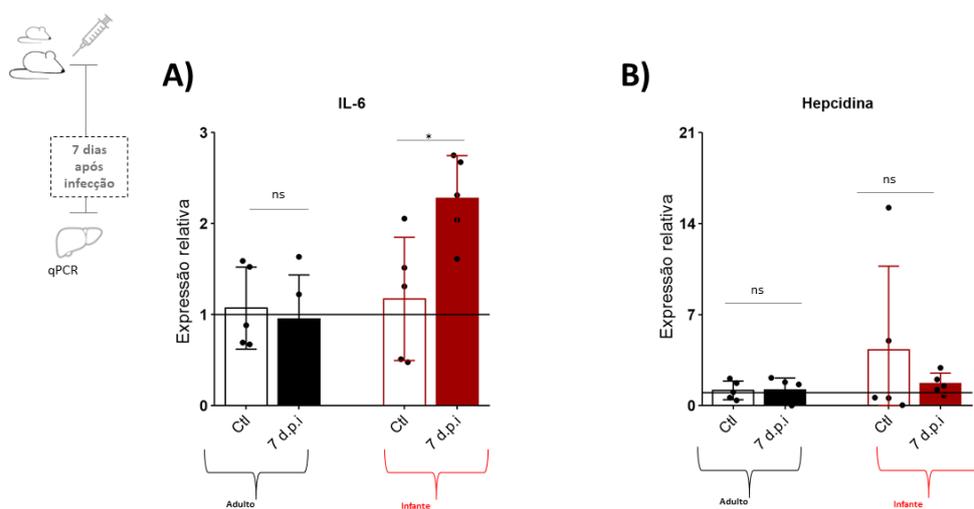


Figura 8: Avaliação da expressão gênica do fígado de camundongos infantes e adultos durante a infecção. A) IL-6 B) HAMP. Os dados estão representados como a média da expressão dos genes alvo em relação ao seu respectivo grupo controle ($\Delta\Delta CT$). Os dados foram normalizados pela média geométrica dos CTs do gene constitutivo GAPDH. N = 5 por grupo. *p < 0,05. ns: não significativa estatisticamente.

6 Discussão

Crianças menores de 5 anos representam o grupo mais vulnerável à malária, no entanto, faz-se necessária a subdivisão desse grupo para o melhor entendimento e correlação com os estudos em condições experimentais controladas. Isso porque eles incluem subgrupos (neonatos, bebês, crianças e crianças da primeira infância), que têm diferentes características imunológicas e interações parasita-hospedeiro (Achidi *et al.*, 1996; Crompton *et al.*, 2014). Aqui, padronizamos o modelo de infecção por *Plasmodium chabaudi* que representa a resistência de neonatos e a suscetibilidade de infantes durante a malária. Nossos resultados, de parasitemia e sobrevivência, de camundongos neonatos infectados, se correlacionam com a literatura, em que recém-nascidos humanos são resistentes à Malária por *Plasmodium falciparum* em áreas endêmicas, e por isso, a doença grave é rara durante os primeiros meses de vida e as infecções tendem a ser de baixa densidade e relativamente assintomáticas durante este período (Snow, 1998; Achidi, 2015). Nosso foco nesse estudo, entretanto, foi desenvolver um modelo murino de suscetibilidade infante à infecção por plasmódio. Além de reproduzirmos a letalidade infantil por malária, mostramos fatores que podem contribuir para a gravidade da doença, como a hiperparasitemia e a anemia.

Nossos resultados dos índices hematimétricos, indicativos de anemia, durante a infecção por *P. chabaudi* em camundongos, corroboram com os dados da literatura, tanto em modelos de infecção experimental (Chang *et al.*, 2004; Lamikanra *et al.*, 2007), quanto identificado nos hemogramas de pacientes adultos e crianças infectadas (Achidi *et al.*, 1996; Davenport *et al.*, 2010), além disso, mostramos que os animais infantes no 7º dia após a infecção, quando estão no pico de sua parasitemia, apresentam anemia, no momento em que a mortalidade do grupo se inicia, e portanto, não se recuperam. Portanto, em nosso modelo, podemos representar a anemia da malária grave, que é a complicação da doença responsável pela maioria dos óbitos infantis (GBD, 2016).

A anemia induzida por malária, pode ser provocada por uma hemólise contínua, devido aos sucessivos ciclos de replicação dos plasmódios nos eritrócitos. (Langhorne *et al.*, 2002; Rodriguez-Morales *et al.*, 2006). Para entendermos se a diminuição dos eritrócitos e hemoglobina, provocada pela hemólise, poderia estar relacionada com a mortalidade dos camundongos infantes infectados, induzimos a anemia hemolítica por fenilhidrazina (phz) em ambos os grupos de camundongos

infantes e adultos, e vimos que duas doses da droga causa a anemia, mas não é letal para nenhum dos grupos analisados. Então, testamos se em um modelo de indução de anemia continuada, por 7 dias de tratamento de phz, poderia causar mortalidade nos mesmos grupos de animais. Vimos que, adultos e infantes não resistem à indução crônica de hemólise, sendo um resultado importante ao compararmos a infecção malárica, em que há ruptura contínua das hemácias devido ao crescimento e atividade dos merozoítos (Langhorne *et al.*, 2002). Diante disso, entendemos que a suscetibilidade, vista em nosso modelo de infecção, pode estar relacionada a parasitemia, e também a falhas na reposição de novos eritrócitos, uma vez que os animais adultos começam a recuperar da anemia malárica a partir no 9º dia após a infecção (dados não mostrados).

Em condições normais em adultos, a medula óssea é responsável pela hematopoiese, entretanto, em condições patológicas, como anemia malárica, o baço e fígado podem assumir a eritropoiese (Yang *et al.*, 2020). Além disso, sabemos que há uma transição hematopoiética do fígado ao longo do desenvolvimento pós-natal (Nakagaki e Mafra *et al.*, 2018). Para avaliarmos a hipótese que camundongos infantes possam ter disfunção da eritropoiese, em comparação com camundongos adultos que se recuperam da anemia e sobrevivem à infecção, verificamos se os compartimentos eritropoiéticos; medula óssea, baço e fígado estavam respondendo de maneira eficaz durante a infecção por *P. chabaudi*. Vimos que camundongos adultos infectados suprimem a eritropoiese na medula óssea, em consonância com a literatura (Chang *et al.*, 2004). De maneira interessante, no nosso trabalho, mostramos que os camundongos infantes têm respostas contrárias a supressão da eritropoiese, e em todos os órgãos hematopoiéticos, bem como no sangue, que analisamos, há um aumento dos precursores de eritrócitos.

A supressão da eritropoiese é descrita como um mecanismo de controle da parasitemia, uma vez que promove a redução de nichos para o *Plasmodium spp.* replicar, dessa maneira, é importante ressaltar que altos níveis de parasitemia, podem certamente resultar em lise maciça e eliminação de eritrócitos, resultando em anemia profunda (Chang *et al.*, 2004; Davenport *et al.*, 2010). Embora há aumento de precursores eritrocitários em resposta à infecção, em todos os nichos hematopoiéticos de camundongos infantes analisados, sabemos que não há a reposição de eritrócitos maduros suficiente para que os animais recuperem da anemia, uma vez 100% dos animais infantes morrem. Aqui, mostramos que os eritrócitos imaturos também podem

ser parasitados, o que contribuiria para não maturação dos mesmos, e consequente para hiperparasitemia observada no grupo. Diante disso, mostramos em nosso modelo de infecção, que há uma interessante dinâmica da resposta eritropoiética em camundongos infantis à infecção, que pode ser devida a transição hematopoiética que acontece após o nascimento, sendo que no período de 3-4 semanas de vida do camundongo, há mudanças drásticas do fígado de camundongos (Nakagaki e Mafrá *et al.*, 2018).

O fígado é cada vez mais reconhecido como um órgão efetor contra a malária no estágio sanguíneo, devido ao seu sistema imunológico intrínseco, seu sistema específico de eliminação de ferro e sua capacidade de remover eritrócitos senescentes e eritrócitos parasitados (Akilesh *et al.*, 2019). Conhecendo a importância dos macrófagos teciduais no contexto da patologia malárica, e em especial, o papel das células de Kupffer na hemofagocitose e metabolismo de ferro, e em consequência, a regulação da eritropoiese que requer a disponibilidade de ferro para produção de hemoglobina (Akilesh *et al.*, 2019). Durante a malária em animais adultos, há a redução de células de Kupffer, seguido de infiltrado de monócitos, que resultam no repovoamento dos macrófagos hepáticos (Theurl *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2018). No nosso trabalho, além de mostramos a maior densidade de células de Kupffer em animais infantis quando comparados com animais adultos saudáveis, mostramos também, que estas células parecem não reduzir em animais infantis frente à infecção, se opondo ao que acontece em adultos.

As células de Kupffer podem participar da regulação da eritropoiese através da produção de mediadores inflamatórios, como a IL-6, que irá induzir a expressão de hepcidina pelos hepatócitos. A hepcidina inibe a liberação de ferro pelos macrófagos, levando à hipoferremia e consequente diminuição da disponibilidade de ferro para a eritropoiese (Like *et al.*, 2004). Analisamos a expressão gênica de IL-6 no tecido hepático, e curiosamente, encontramos aumento significativo da sua expressão em animais infantis após a infecção, o que não acontece ao analisarmos os fígados de camundongos adultos, infectados. Entretanto, frente à infecção, não achamos diferença significativa na expressão de HAMP, que codifica a hepcidina, entre adultos e infantis. Dessa maneira, torna-se necessário, análises aprofundadas das vias de metabolismo de ferro, para nossa melhor compreensão do papel de células de Kupffer em camundongos infantis infectados. Além disso, sabemos que outras células estão em transição no órgão, no período pós-natal; células endoteliais, células linfoides, e

células mieloides (Nakagaki e Mafra *et al.*, 2018) portanto, seria interessante uma análise estendida à estas células, no papel da patogênese da malária em camundongos infantis.

No trabalho, aqui apresentado, demonstramos, de maneira inédita, particularidades da dinâmica eritropoiética do fígado de camundongos infantis, que são indicativos de mecanismos que contribuem para a suscetibilidade à malária, e ainda que estes mecanismos podem estar relacionados com a transição hematopoiética que acontece ao longo do desenvolvimento pós-natal. Dessa maneira, o presente estudo fornece bases para novas alternativas terapêuticas e abordagens clínicas para tratar os sintomas da malária infantil.

7 Considerações finais

No presente trabalho, estabelecemos um modelo de infecção malárica, em camundongos infantis, que é útil no entendimento da severidade da doença em crianças. Além disso, mostramos, de maneira inédita, particularidades da dinâmica eritropoiética em resposta à infecção por *P. chabaudi*, que pode estar relacionada com a hiperparasitemia e, conseqüentemente anemia grave em camundongos infantis. Ainda, discutimos se a transição hematopoiética e metabólica hepática, que acontece ao longo do desenvolvimento pós-natal, inclusive as alterações vistas em células de Kupffer, podem estar relacionados com a disfunção da eritropoiese, devido ao metabolismo de ferro ineficiente. Dessa maneira, trouxemos novos esclarecimentos dos processos envolvidos na suscetibilidade infantil à malária

8 Referências Bibliográficas

- ACHIDI, E. A.; SALIMONU, L. S.; ASUZU, M. C.; BERZINS, K. et al. Studies on Plasmodium falciparum parasitemia and development of anemia in Nigerian infants during their first year of life. **Am J Trop Med Hyg**, 55, n. 2, p. 138-143, Aug 1996.
- AKILESH, H. M.; BUECHLER, M. B.; DUGGAN, J. M.; HAHN, W. O. et al. Chronic TLR7 and TLR9 signaling drives anemia via differentiation of specialized hemophagocytes. **Science**, 363, n. 6423, 01 11 2019.
- AWANDARE, G. A.; KEMPAIAH, P.; OCHIEL, D. O.; PIAZZA, P. et al. Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. **Am J Hematol**, 86, n. 2, p. 155-162, Feb 2011.
- AWANDARE, G. A.; OUMA, Y.; OUMA, C.; WERE, T. et al. Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. **Infect Immun**, 75, n. 1, p. 201-210, Jan 2007.
- BARBERÁ-GUILLEM, E.; AYALA, R.; VIDAL-VANACLOCHA, F. Differential location of hemopoietic colonies within liver acini of postnatal and phenylhydrazine-treated adult mice. **Hepatology**, 9, n. 1, p. 29-36, Jan 1989.
- BHALLA, A.; SURI, V.; SINGH, V. Malarial hepatopathy. **J Postgrad Med**, 52, n. 4, p. 315-320, 2006 Oct-Dec 2006.
- CASALS-PASCUAL, C.; KAI, O.; CHEUNG, J. O.; WILLIAMS, S. et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. **Blood**, 108, n. 8, p. 2569-2577, Oct 15 2006.
- CHANG, K. H.; STEVENSON, M. M. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. **Int J Parasitol**, 34, n. 13-14, p. 1501-1516, Dec 2004.
- COLLABORATORS, G. C. M. Global, regional, national, and selected subnational levels of stillbirths, neonatal, infant, and under-5 mortality, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, 388, n. 10053, p. 1725-1774, Oct 2016.
- CRAIG, A. G.; GRAU, G. E.; JANSE, C.; KAZURA, J. W. et al. The role of animal models for research on severe malaria. **PLoS Pathog**, 8, n. 2, p. e1002401, Feb 2012.

CROMPTON, P. D.; MOEBIUS, J.; PORTUGAL, S.; WAISBERG, M. et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annu Rev Immunol**, 32, p. 157-187, 2014.

DAVENPORT, G. C.; OUMA, C.; HITTNER, J. B.; WERE, T. et al. Hematological predictors of increased severe anemia in Kenyan children coinfectd with Plasmodium falciparum and HIV-1. **Am J Hematol**, 85, n. 4, p. 227-233, Apr 2010.

DÖRMER, P.; DIETRICH, M.; KERN, P.; HORSTMANN, R. D. Ineffective erythropoiesis in acute human P. falciparum malaria. **Blut**, 46, n. 5, p. 279-288, May 1983.

EGAN, T. J. Physico-chemical aspects of hemozoin (malaria pigment) structure and formation. **J Inorg Biochem**, 91, n. 1, p. 19-26, Jul 2002.

GORDILLO, M.; EVANS, T.; GOUON-EVANS, V. Orchestrating liver development. **Development**, 142, n. 12, p. 2094-2108, Jun 15 2015.

GROSSI, C. E.; VELARDI, A.; COOPER, M. D. Postnatal liver hemopoiesis in mice: generation of pre-B cells, granulocytes, and erythrocytes in discrete colonies. **J Immunol**, 135, n. 4, p. 2303-2311, Oct 1985.

GUHA, M.; KUMAR, S.; CHOUBEY, V.; MAITY, P. et al. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. **FASEB J**, 20, n. 8, p. 1224-1226, Jun 2006.

HANSPAL, M.; HANSPAL, J. S. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. **Blood**, 84, n. 10, p. 3494-3504, Nov 15 1994a.

HEYMANN, F.; PEUSQUENS, J.; LUDWIG-PORTUGALL, I.; KOHLHEPP, M. et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. **Hepatology**, 62, n. 1, p. 279-291, Jul 2015.

HOLZ, L. E.; FERNANDEZ-RUIZ, D.; HEATH, W. R. Protective immunity to liver-stage malaria. *Clin Transl Immunology*, 5, n. 10, p. e105, Oct 2016.

KRUGLIAK, M.; ZHANG, J.; GINSBURG, H. Intraerythrocytic Plasmodium falciparum utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. **Mol Biochem Parasitol**, 119, n. 2, p. 249-256, Feb 2002.

LAI, S. M.; SHENG, J.; GUPTA, P.; RENIA, L. et al. Organ-Specific Fate, Recruitment, and Refilling Dynamics of Tissue-Resident Macrophages during Blood-Stage Malaria. **Cell Rep**, 25, n. 11, p. 3099-3109.e3093, Dec 2018.

LIEHL, P.; ZUZARTE-LUÍS, V.; CHAN, J.; ZILLINGER, T. et al. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. **Nat Med**, 20, n. 1, p. 47-53, Jan 2014.

LYKE, K. E.; BURGESS, R.; CISSOKO, Y.; SANGARE, L. et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. **Infect Immun**, 72, n. 10, p. 5630-5637, Oct 2004.

MACKINTOSH, C. L.; BEESON, J. G.; MARSH, K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. **Trends Parasitol**, 20, n. 12, p. 597-603, Dec 2004.

MCGRATH, K. E.; FRAME, J. M.; PALIS, J. Early hematopoiesis and macrophage development. **Semin Immunol**, 27, n. 6, p. 379-387, 12 2015.

Mikkola, H. K. and Orkin, S. H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. **Development** 133(19): 3733-3744

MILLER, J. L.; SACK, B. K.; BALDWIN, M.; VAUGHAN, A. M. et al. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. **Cell Rep**, 7, n. 2, p. 436-447, Apr 2014a.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C. et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. **Science**, 291, n. 5501, p. 141-144, Jan 2001.

NAKAGAKI, B. N.; MAFRA, K.; DE CARVALHO, É.; LOPES, M. E. et al. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **J Hepatol**, 69, n. 6, p. 1294-1307, 12 2018.

PHILLIPS, R. E.; LOOAREESUWAN, S.; WARRELL, D. A.; LEE, S. H. et al. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. **Q J Med**, 58, n. 227, p. 305-323, Mar 1986.

SNOW, R. W.; NAHLEN, B.; PALMER, A.; DONNELLY, C. A. et al. Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. **J Infect Dis**, 177, n. 3, p. 819-822, Mar 1998.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, 313, n. 5791, p. 1287-1290, Sep 2006.

WEISS, D. J.; LUCAS, T. C. D.; NGUYEN, M.; NANDI, A. K. et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000-17: a spatial and temporal modelling study. **Lancet**, 394, n. 10195, p. 322-331, 07 2019.

WERE, T.; DAVENPORT, G. C.; YAMO, E. O.; HITTNER, J. B. et al. Naturally acquired hemozoin by monocytes promotes suppression of RANTES in children with malarial anemia through an IL-10-dependent mechanism. **Microbes Infect**, 11, n. 8-9, p. 811-819, 2009 Jul-Aug 2009.

WHO. World malaria report 2019. ISBN: 978-92-4-156572-1

YANG, X.; CHEN, D.; LONG, H.; ZHU, B. The mechanisms of pathological extramedullary hematopoiesis in diseases. **Cell Mol Life Sci**, 77, n. 14, p. 2723-2738, Jul 2020.

YAZDANI, S. S.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S.; CHITNIS, C. E. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. **Curr Mol Med**, 6, n. 2, p. 187-203, Mar 2006a.