

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

**IgGs COMO MEDIADORAS DA ERITROFAGOCITOSE: Possível
contribuição na anemia em infecções por *Plasmodium vivax* e influência dos
grupos sanguíneos do sistema ABO**

CAMILA MAIA PANTUZZO MEDEIROS

BELO HORIZONTE - MG
2016

CAMILA MAIA PANTUZZO MEDEIROS

IgGs COMO MEDIADORAS DA ERITROFAGOCITOSE: Possível contribuição na anemia em infecções por *Plasmodium vivax* e influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia

Orientadora: Professora Dr^a Érika Martins Braga

BELO HORIZONTE-MG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - UFMG
JANEIRO 2016

Trabalho realizado no Laboratório de Malária, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação da Profa. Dra. Érika Martins Braga. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG (PPM-00057-13 2013-2015), Conselho Nacional de Pesquisa/CNPq, Projeto Universal 2012-2015 (472540/2012-2) e Bolsa de mestrado (2014/2016). Projeto aprovado no Comitê de Ética (CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481).

Dedico este trabalho ao meu pai José Geraldo, à minha mãe Cláudia e ao meu irmão Rafael, por serem as pessoas mais importantes em minha vida! Dedico também ao Weverlin, pois ele é quem mais sabe o quanto foi árduo, além de ter se entregado junto comigo a essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade, por me guiarem e me acolherem, por acalmarem meu coração sempre que foi preciso e principalmente por me darem a vida e a capacitação intelectual.

Ao meu amado pai, por me apoiar e me amar incondicionalmente. Por ser o mais generoso, bondoso e carinhoso de todos os pais. Por criar nosso lar e mantê-lo com muito amor e boas energias. Por existir e ser meu papaizinho. Sem você eu nada seria! Este trabalho é fruto do que nós dois colhemos.

À minha querida mãe, por ser a luz da minha vida e a minha melhor amiga. Obrigada pelo imenso amor, por todas as palavras de apoio, todas as preocupações, todos os conselhos e principalmente por todos os ensinamentos. Obrigada por me mostrar o quão desvirtuoso é a ignorância. Você é o meu orgulho!

Ao meu irmão, que mesmo não sabendo tem sido imensamente importante na minha vida. Mesmo à distância você esteve presente neste mestrado, pois todos os dias você está nos meus pensamentos e sigo seus passos como exemplo de vida. Obrigada por me amar e apoiar sempre.

À Érika, por todos os conhecimentos transmitidos, não só os profissionais, mas também os de vida. Apesar de nunca ter falado, minha admiração por você é imensa! Como mulher, mãe, esposa, professora, pesquisadora e orientadora. Obrigada por propiciar meu crescimento e amadurecimento profissional e principalmente por me fazer descobrir um amor verdadeiro pela ciência, que eu ainda não sabia que existia. Isso só foi possível pela confiança depositada em mim e pela grande liberdade, me permitindo e me incentivando a ser e a fazer o melhor de mim. Agradeço ainda pelo exemplo de ética e honestidade, valores que eu levarei sempre comigo.

À minha espetacular tia Cláudia, formadora do meu caráter e a quem ofereço imenso amor e gratidão. Obrigada por ter sido responsável pelos dias mais doces da minha vida, por toda a sua ternura, pelos conselhos, apoio e incentivo. Você é uma das pessoas mais importantes da minha vida!

Ao Weverlin, por ser meu melhor amigo e meu companheiro. Por todo o apoio, amor e carinho. Por ter sido a melhor parte dos meus dias e por acreditar tanto em mim, mesmo quando eu não acreditei. Obrigada também por todo o cuidado, paciência e dedicação. Pelas palavras de motivação, pela preocupação e pela imensa ajuda. Sem você não sei se conseguiria.

À minha família, que sempre se interessou pelo meu trabalho e me apoiou. Agradeço a todos os meus tios e tias, minha avó Marly, minhas primas e primos. Agradeço em especial a Bárbara, a Letícia e a Beatriz que me ajudaram muito durante a confecção desta dissertação.

Aos meus amigos, grandes debatedores de ideias e promotores do meu crescimento pessoal e intelectual. Agradeço a todos os amigos da “Casa da Madá”, do “Cleide”, do João Pinheiro e outros, que de alguma forma fizeram parte deste trabalho. Agradeço em especial minhas queridas amigas Bianca e Thamyris, por contribuírem tanto para meu bem estar e por serem minhas confidentes e meu porto seguro. Agradeço também a Natália (Tchongues) e a Ana Caroline, pela amizade e pelo carinho e a Raquel, pela preocupação, pelas conversas e pelo apoio.

À Luiza, por ser a pessoa mais bondosa que eu já conheci! Pelas nossas conversas pessoais e profissionais, pela imensurável ajuda, pela paciência, pelo carinho e pelas risadas. Obrigada também por me deixar participar da sua vida, de forma a criarmos laços de amizade. Te adoro demais Lu! Você foi fundamental para este trabalho, assim como para o meu bem estar no laboratório.

A todos do laboratório de Malária, pelas grandes discussões e por toda ajuda. Agradeço em especial a Daniela pela amizade e pelas ótimas e engraçadas conversas. Agradeço a Paula, a Raquel, ao Gabriel, ao Francisco, ao Asmat, ao Oscar, a Jamila, a Lúcia, a Graziella, a Zélia, ao Marcus e ao Giulio. Todos vocês contribuíram de forma muito especial para este trabalho.

Ao Newton e ao Hugo, pela enorme ajuda com a parte estatística.

À Nina, pela extrema dedicação e boa vontade. Agradeço também pela maturidade, pelo zelo, pelas conversas, pelas sugestões e ainda pela amizade construída. Sem você o caminho seria muito mais árduo.

À todos os meus colegas do mestrado, por tornarem este processo muito mais fácil e divertido. Agradeço em especial a Luiza, por ter se tornado uma grande amiga.

Aos ausentes, Bruno, Madalena e Vovó Darci, por estarem todos os dias nos meus pensamentos e no meu coração. Sei que vocês estão comemorando comigo agora e que fizeram parte deste mestrado.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Departamento de Parasitologia, por propiciarem a realização deste trabalho.

Às agências de fomento, FAPEMIG e CNPq, pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos pacientes, que permitiram a realização deste trabalho, em prol de um bem maior.

A todos os doadores de sangue para este trabalho, por contribuírem imensamente para a busca do conhecimento.

Aos Prof. Dr. Cor Jesus Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), em Manaus (AM), por fornecer os soros e os resultados do hemograma dos pacientes com malária residentes no Brasil.

Ao Prof. Dr. Christian Baldeviano, da *US Naval Medical Research Unit No. 6*, Peru, por fornecer os soros e resultados hematológicos dos pacientes com malária residentes no Peru.

Ao Prof. Dr. Aristóboles Mendes da Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais, por fornecer as células THP-1, o PMA e disponibilizar o microscópio invertido para a avaliação das mesmas.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia, pelos grandes ensinamentos durante a minha formação acadêmica.

À Sumara e à Sibeles, secretárias da Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia, por toda a atenção e o carinho.

Ao Sr. Nery, pelos maravilhosos lanches e pelas conversas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. (Fonte: WHO, 2012).....24
- Figura 2.** Mapa de risco da malária, por município, no Brasil, em 2014. Baixo risco (IPA < 10/1000 habitantes), médio risco ($10,0 \leq \text{IPA} \leq 49,9/1000$ habitantes) e alto risco (IPA > 50,0/1000 habitantes), sendo que a IPA é Índice Parasitário Anual (número de casos registrados por cada 1000 habitantes de determinada área). (Fonte: Sinan/ SVS/ MS e Sivep-Malária disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>. Acesso em: 17 de dezembro de 2015 às 21:08 horas).....27
- Figura 3.** Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*. **1.** Inoculação dos esporozoítos no hospedeiro vertebrado através da picada de fêmeas infectadas do mosquito *Anopheles*. **2.** Migração dos esporozoítos até os vasos sanguíneos. **3.** Chegada dos esporozoítos ao fígado e após algumas gerações de merozoítos podem se desenvolver em: **4.** Hipnozoítos, que são formas latentes ou **5.** Novos trofozoítos e esquizontes tissulares com posterior formação de merozoítos. **6.** Formação do merossoma através da membrana do hepatócito e rompimento da mesma nos vasos sanguíneos deste órgão. **7.** Liberação dos merozoítos e infecção dos reticulócitos. **8.** Dentro dos reticulócitos ocorre o desenvolvimento dos merozoítos em trofozoítos e posteriormente em **9.** Esquizontes. **10.** Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos e infecção de novos reticulócitos, alguns se diferenciam em gametócitos ao invés de trofozoítos. **11.** Os gametócitos são as formas infectantes para o mosquito, que ao ingeri-los durante o repasto se infecta. **12.** Na membrana peritrófica do mosquito os gametócitos se desenvolvem e ocorre a fecundação, originando um zigoto. **13.** O zigoto se encista no epitélio do intestino médio do mosquito e se desenvolve em oocisto e esporozoítos **14.** O oocisto se rompe liberando os esporozoítos na hemolinfa que atingem a glândula salivar **15.** Os esporozoítos migram para o ducto da glândula onde serão inoculados no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva, reiniciando o ciclo. (Fonte: Adaptado de MUELLER *et al.*, 2009).....32
- Figura 4.** Eritropoiese na medula óssea. Células tronco hematopoiéticas (*Hematopoietic Stem Cell [HSC]*), unidade formadora de “explosão” de eritróides (*Burst-Forming Unit-Erythroid*

[*BFU-E*]), unidade formadora de colônias de eritróides (*Colony-Forming Unit-Erythroid [CFU-E]*), Pró-eritroblastos (*Proerythroblast [ProE]*), Eritroblastos basófilos (*Basophilic Erythroblast [BasoE]*), Eritroblastos Policromáticos (*Polychromatic Erythroblast [PolyE]*), Eritroblastos Ortocromáticos (*Orthochromatic Erythroblast [OrthoE]*), Reticulócitos (*Reticulocyte [Retic]*), Células vermelhas sanguíneas (*Red Blood Cell [RBC]*), Eritropoietina [*EPO*] (Fonte: Adaptado de PALIS, 2014).....42

Figura 5. Anemia na malária vivax. Possíveis mecanismos imunológicos associados à destruição de eritrócitos infectados e não infectados. **Diseritropoiese:** A ruptura do eritrócito infectado leva a liberação do parasito e de seus metabólitos na corrente sanguínea. Estes metabólitos podem ser diretamente tóxicos para as células hematopoiéticas ou podem estimular a produção de citocinas inflamatórias, que também têm efeito tóxico para estas células. **Citoaderência:** Recentemente foi descoberta a capacidade do *P. vivax* de citoaderir, principalmente na microvasculatura da placenta, mas também no baço e na medula óssea, porém pouco se sabe sobre o papel deste mecanismo na anemia. **Formação de rosetas:** A formação de agregados de eritrócitos não infectados ao infectado pode levar a destruição destes, porém os mecanismos também não são conhecidos. (Fonte: Adaptado de CASTRO-GOMES *et al.*, 2014).....47

Figura 6. Anemia na malária vivax. Possíveis mecanismos imunológicos associados à destruição de eritrócitos infectados e não infectados. A ruptura do eritrócito infectado leva a liberação do parasito, de seus antígenos e debris na corrente sanguínea. Esses antígenos e debris podem se depositar na membrana dos eritrócitos não infectados ou produzir, indiretamente, mudanças nas moléculas destes eritrócitos, levando à opsonização do eritrócito não infectado e culminando na fagocitose por macrófagos do baço (**Eritrofagocitose**) ou na destruição pelo sistema do complemento (**Lise mediada pelo sistema do complemento**) (Fonte: Adaptado de CASTRO-GOMES *et al.*, 2014).....54

Figura 7. Avaliação das células THP-1, cultivadas no Laboratório de Malária do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em microscópio ótico invertido, após 72 horas de ativação com PMA. **A:** Macrófagos ativados. Verifica-se formato irregular, presença de vesículas

(setas pretas), pseudópodes (setas vermelhas) e tamanho celular aumentado. **B:** Monócito. Verifica-se a morfologia arredondada, ausência de vesículas e pseudópodes.....63

Figura 8: Mapa do Brasil evidenciando as áreas de estudo e os centros de referência de atendimento dos pacientes.....67

Figura 9. Mapa de Incidência da malária no Peru, em 2015 (**B** e **C**) e mapa da Floresta Amazônica (**A**). **A:** Amazônia Peruana em destaque. **B:** Incidência por região do Peru. **C:** Incidência em Loreto. Baixo risco ($0.01 \leq \text{I.P.A} \leq 0.99/1000$ habitantes), médio risco ($1.00 \leq \text{I.P.A} \leq 9.99/1000$ habitantes) alto risco ($10.00 \leq \text{I.P.A} \leq 49.99/1000$ habitantes), altíssimo risco ($\text{I.P.A} \geq 50.000$) sendo que I.P.A é o Índice Parasitário Anual (Fonte: RENACE, DGE, MINSA; 2015, 2014. Disponível em: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2015/SE18/malaria.pdf> Acesso em: 19 de dezembro de 2015 às 17:12 horas).....79

Figura 10: Fotos de lâminas com fagocitose de eritrócitos, obtidas como resultados dos experimentos de padronização dos ensaios de eritrofagocitose no laboratório de malária do ICB, UFMG. **Setas:** Eritrócitos fagocitados. **A, B e C:** Macrófago com um eritrócito fagocitado **D e E:** Macrófago com mais de um eritrócito fagocitado. **F:** Dois macrófagos pareados com um eritrócito no citoplasma fundido. Eritrofagocitose atribuída ao macrófago com * por proximidade ao núcleo da célula.....86

Figura 11. Diagrama de caixas (*Boxplot*) da porcentagem de células THP-1 com fagocitose de eritrócitos O+, saudáveis, opsonizados ou não com IgGs. **Controle:** não foram adicionadas IgGs aos eritrócitos. **α -Eritrócito:** Eritrócitos opsonizados com anticorpo policlonal comercial α -Eritrócito. **Saudável:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do soro de indivíduo não anêmico e não infectado (n=1). **Anêmico:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do *pool* de soros de indivíduos infectados anêmicos (n=7). **Não Anêmico:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do *pool* de soros de indivíduos infectados não anêmicos (n=7). **a, b e c** indicam o resultado do teste estatístico de comparação Múltipla de Dunn. As caixas representam os intervalos interquartis, os valores máximos e mínimos

(*Wiskers*) estão representados pelos traços paralelos que se ligam às caixas e os traços que dividem as caixas representam as médias.....88

Figura 12. NMDS bi-dimensional utilizando a dissimilaridade de Bray-Curtis para ordenação das taxas de eritrofagocitose dos grupos sanguíneos A, B e O. Foram utilizados 6 indivíduos para cada grupo sanguíneo e os eritrócitos coletados foram opsonizados ou não com IgGs (Tratamentos: Controle, α - Eritrócito, Saudável, Não anêmico, Anêmico). Cada ponto representa uma taxa de eritrofagocitose substituída por uma dissimilaridade de Bray-Curtis (n=540), sendo que a maioria dos pontos está sobreposta. As elipses representam um intervalo de 95% confiança das taxas no centro e conectam padrões similares.....90

Figura 13. *Boxplot* da porcentagem de células THP-1 com fagocitose de eritrócitos dos grupos sanguíneos O, B e A, saudáveis, opsonizados ou não com IgGs. **Controle:** não foram adicionadas IgGs aos eritrócitos. **α -Eritrócito:** Eritrócitos opsonizados com anticorpo policlonal α -Eritrócito. **Saudável:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do soro de indivíduo não anêmico e não infectado (n=1). **Anêmico:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do *pool* de soros de indivíduos infectados anêmicos (n=7). **Não Anêmico:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do *pool* de soros de indivíduos infectados não anêmicos. (n=7) Foram coletados eritrócitos saudáveis de 6 indivíduos para cada grupo sanguíneo. Asteriscos representam as diferenças entre as médias, sendo que para todas o P foi menor que 0,0001 nas análises estatísticas de GLM.....93

Figura 14. *Boxplot* da porcentagem de células THP-1 com fagocitose de eritrócitos saudáveis, opsonizados ou não com IgGs (tratamentos: Controle, α -Eritrócito, Saudável, Anêmico, Não Anêmico). **1.** Foram coletados eritrócitos saudáveis de 6 indivíduos do grupo sanguíneo O. **2.** Foram coletados eritrócitos saudáveis de 6 indivíduos do grupo sanguíneo B. **3.** Foram coletados eritrócitos saudáveis de 6 indivíduos do grupo sanguíneo A. Os asteriscos representam as diferenças encontradas através da GLM dentro de cada grupo sanguíneo e não comparável entre as figuras 1, 2 e 3, sendo o P<0,001 para todas.....95

Figura 15. Correlação entre as taxas de eritrofagocitose de eritrócitos opsonizados com soros inativados dos 18 pacientes infectados por *P. vivax* anêmicos ou não e os níveis de

hemoglobina e hematócrito desses pacientes mensurados no momento da infecção (Teste de Correlação de Pearson).....97

Figura 16. PCA para ordenação dos dados das seis variáveis hematológicas (creatinina, hemoglobina, hematócrito, proteínas totais e alanina aminotransferase) para cada um dos pacientes (n = 18). Cada ponto representa um paciente. As elipses representam um intervalo de 95% confiança das taxas no centro e conectam padrões similares. As setas representam a influência das variáveis na ordenação dos dados resultantes. CP1: Componente principal 1 que explica 62,5% da nova ordenação. CP2: Componente principal 2 que explica 19% da nova ordenação.....98

Organograma 1. Organização dos experimentos de eritrofagocitose utilizando eritrócitos saudáveis de 18 doadores voluntários.....77

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Manifestações da malária grave por *Plasmodium falciparum* em adultos e crianças segundo a Organização Mundial de Saúde (Fonte: adaptado de WHO, 2014).....34
- Quadro 2.** Definição de algumas manifestações clínicas ou índices laboratoriais para fins de pesquisa ou levantamento epidemiológico segundo a Organização Mundial de Saúde (Fonte: Adaptado de WHO, 2014).....35
- Quadro 3.** Dados hematológicos do doador de eritrócitos saudáveis do tipo O+ utilizados nos ensaios de padronização dos testes de eritrofagocitose *in vitro*.....65
- Quadro 4.** Manifestações clínicas relatadas pelos 14 pacientes incluídos no estudo, no momento do atendimento médico.....69
- Quadro 5.** Valores médios obtidos nos exames laboratoriais realizados a partir do sangue dos 14 indivíduos incluídos neste estudo.....70
- Quadro 6.** Comparação entre os grupos de pacientes anêmicos e não anêmicos infectados por *P. vivax*.....71
- Quadro 7.** Sintomatologia clínica relatada pelos pacientes infectados por *P. vivax* anêmicos e não anêmicos.....72
- Quadro 8.** Resultados hematológicos dos 6 indivíduos saudáveis do grupo sanguíneo O doadores de eritrócitos não infectados utilizados em ensaios de eritrofagocitose *in vitro*.....75

Quadro 9. Resultados hematológicos dos 6 indivíduos saudáveis do grupo sanguíneo A doadores de eritrócitos não infectados utilizados em ensaios de eritrofagocitose *in vitro*.....76

Quadro 10. Resultados hematológicos dos 6 indivíduos saudáveis do grupo sanguíneo B doadores de eritrócitos não infectados utilizados em ensaios de eritrofagocitose *in vitro*.....76

Quadro 11. Resultado dos exames laboratoriais realizados a partir do sangue coletado dos 18 pacientes infectados por *P. vivax* incluídos neste estudo e idade dos mesmos. Em negrito estão aqueles classificados como grave.....81

Quadro 12. Lista de exames laboratoriais apresentados por todos os 18 pacientes incluídos neste estudo. Todos os resultados destes exames foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico de Mann Whitney U comparando os pacientes graves (n=11) com os pacientes não graves (n=7).....84

Quadro 13. Médias e desvios padrões das taxas de eritrofagocitose (n=540) obtidas através de 18 experimentos (um para cada doador de eritrócitos saudáveis) de acordo com o grupo sanguíneo do doador de eritrócitos saudáveis e tratamento com IgGs.....91

Quadro 14. Valores de *Loading* para cada variável dentro de cada Componente Principal (CP) e Componente (C).....99

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMA-1** - *Apical Membrane Antigen 1* / Antígeno 1 da membrana apical
- BFU-E** - *Burst-Forming Unit-Erythroid* / Unidade formadora de “explosão” de eritróide
- BasoE** - *Basophilic Erythroblast* / Eritroblasto basófilo
- CFU-E** - *Colony-Forming Unit-Erythroid* unidade formadora de colônias de eritróide
- CHMC** - Concentração da hemoglobina corpuscular média
- CLLF** - Capacidade latente de ligação do ferro
- CP** - Componente Principal
- CR1** - *Complement Receptor 1* / Receptor do complemento 1
- CS** - *Circum-sporozoite* / Circum-esporozoíto
- CTLF** - Capacidade total de ligação do ferro
- DAF** - *Decay-Accelerating Factor* / Fator acelerador do decaimento
- EPO** - Eritropoietina
- DGE** - *Dirección General de Epidemiología* / Direção geral de epidemiologia
- FBS** - *Fetal Bovine Serum* / Soro Fetal Bovino
- GLM** - *General Linear Model* / Modelo linear generalizado
- GPI** - *Glycosylphosphatidylinositol* / Glicosilfosfatidilinositol
- GWAS** - *genome wide association studies* / Estudos de associação genômica
- Hb** - Hemoglobina
- HMC** - Hemoglobina Corpuscular Média
- HSC** - *Hematopoietic Stem Cell* / Células tronco hematopoiéticas
- HSPG** - *Heparan Sulfate ProteoGlycans* / Proteoglicanos de heparana-sulfato
- ICB** - Instituto de Ciências Biológicas
- IFN- γ** - Interferon gama
- IgG** - Imunoglobulina G
- IL-10** - Interleucina -10
- IST** - Índice de saturação da transferrina
- MAPKs** - *Mitogen Activated Protein Kinases* / Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
- MCP-1** - *Monocyte Chemoattractant Protein-1* / Proteína 1 quimioatrativa de monócitos
- MIF** - *Migration Inhibitory fator* / Fator de inibição de migração
- MINSA** - *Ministerio de Salud del Perú*
- MS** - Ministério da Saúde do Brasil

Nab - *Natural occurring Antibody* / Anticorpo de ocorrência natural

NMDS - *Non-metric multidimensional scaling* / Escalonamento multidimensional não métrico

NO - *Nitric Oxide* / Óxido Nítrico

OMS - Organização mundial de saúde

OrthoE - *Orthochromatic Erythroblast* / Eritroblasto Ortocromático

PBS - *Phosphate Buffered Saline* / Tampão fosfato-salino

PCA - *Principal Component Analysis* / Análise de componentes principais

PCR - *Polymerase chain Reaction* / Reação em Cadeia de Polimerase

PERMANOVA - *Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices* / Análise de variância multivariável por permutações

PIB - Produto Interno Bruto

PKC - *Protein Kinase C* / Proteína quinase C

PMA - *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate* / Forbol-12Miristato-13-Acetato

PolyE - *Polychromatic Erythroblast* / Eritroblasto Policromático

ProE - *Proerythroblast* / Pró-eritroblasto

PS - *PhosphatidylSerine* / Fosfatidilserina

RBCs - *Red Blood Cell* / Células vermelhas sanguíneas

RENACE - *Rede Nacional de Epidemiologia* / Rede Nacional de Epidemiologia

Retic - *Reticulocyte* / Reticulócito

RON 2 - *Rhoptry neck protein 2* / Proteína 2 de roptria

ROS - *Reactive Oxygen Species* / Espécies reativas de oxigênio

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SIRP- α - *Signal Immunoreceptor Regulatory Protein Alpha* / Imunoreceptor de sinal regulador da proteína alfa

SIVEP - Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica

SVS - Secretaria de Vigilância à Saúde

TE - Taxa de eritrofagocitose

THP-1 - Linhagem de monócitos humanos comerciais

TLR-9 - *Toll Like Receptor-9* / Receptor tipo Toll-9

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRAP - *Thrombospondin Related Anonymous Protein* / Proteína anônima relacionada à trombospondina

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VCM - Volume Corpuscular Médio

α -RBC / α - Eritrócito - Anticorpo policlonal comercial anti- eritrócito

RESUMO

A remoção de eritrócitos não parasitados é uma das principais causas da anemia em infecções por *Plasmodium vivax*, mas os principais mecanismos patofisiológicos envolvidos nesta destruição ainda são desconhecidos. Estudos realizados com *Plasmodium falciparum* têm sugerido que a fagocitose de eritrócitos não infectados por macrófagos do baço é um dos principais mecanismos que pode explicar tal remoção, porém, pouco se sabe no que se refere a infecções por *P. vivax*. Já foi demonstrado que a eritrofagocitose de eritrócitos parasitados, bem como a de eritrócitos senescentes é dependente de modificações na membrana dessas células provocadas por uma série de fatores, dentre os quais pode se citar, a deposição de imunoglobulinas. Uma vez que, durante a malária, ocorre um aumento na produção de anticorpos, principalmente de IgGs, o objetivo deste estudo foi investigar o papel dessas imunoglobulinas, purificadas dos soros de indivíduos com diferentes status clínicos, na indução da fagocitose de eritrócitos não infectados, bem como estabelecer possíveis associações entre os diferentes fenótipos do sistema sanguíneo ABO e a anemia na malária vivax. Para isso, ensaios de eritrofagocitose foram realizados *in vitro*, utilizando-se células THP-1 e eritrócitos obtidos de indivíduos saudáveis de diferentes grupos sanguíneos. Essas células foram sensibilizadas com IgGs purificadas provenientes de soros de pacientes infectados por *P. vivax* anêmicos e sem anemia além de IgGs como controles positivo e negativo (IgG comercial policlonal anti-eritrócito e IgGs de indivíduos saudáveis, respectivamente). Verificou-se uma maior taxa de eritrofagocitose para os eritrócitos opsonizados com as IgGs purificadas de pacientes anêmicos em relação aos eritrócitos sensibilizados com IgGs de pacientes não anêmicos e, também, em relação ao controle negativo. Por meio das análises multivariadas (NMDS e GLM) foi possível constatar que os eritrócitos do grupo sanguíneo O são mais suscetíveis à eritrofagocitose *in vitro* quando comparados aos dos grupos A ou B. Investigou-se, também em nosso trabalho, a relação entre a eritrofagocitose e a gravidade da doença. Para isto, utilizaram-se soros inativados de pacientes internados com quadro grave e, também, soros de pacientes sem manifestações clínicas graves. Verificou-se uma correlação inversa entre as taxas de eritrofagocitose e os níveis de hemoglobina e hematócrito dos pacientes, resultados estes que indicam ser a eritrofagocitose um fator importante na gênese da anemia. Por fim, o efeito da eritrofagocitose na gravidade da infecção foi analisado por meio de uma análise de componentes principais corroborando a importância da eritrofagocitose como um biomarcador de morbidade na malária vivax. Nossos achados ampliam a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na anemia e poderão direcionar as pesquisas para estratégias de controle dessa importante doença.

ABSTRACT

The removal of non-parasitized erythrocytes is a major cause of anemia in *Plasmodium vivax* infection. However, the main pathophysiological mechanisms involved in their destruction are still unknown. Studies conducted with *Plasmodium falciparum* have suggested that phagocytosis of non-infected red blood cells by splenic macrophages is one of the main mechanisms that could explain such removal, but little is known with regard to infection caused *P. vivax*. It has been shown that erythrophagocytosis of non-parasitized erythrocytes, as well as senescent erythrocytes is related to changes in the membrane of these cells by several factors, including the immunoglobulins's deposition. During the malarial infection an increase in the production of antibodies, mainly IgG occurs. Thus, the aim of this study was to investigate the role of such immunoglobulins purified from sera from individuals with different clinical status in inducing phagocytosis of uninfected erythrocytes as well as to establish possible associations between the different phenotypes of the ABO blood system and anemia in vivax malaria. Erythrophagocytosis assays were performed *in vitro*, using THP-1 cells and red blood cells obtained from healthy individuals of different blood types. IgGs purified from sera of anemic or non-anemic infected patients were used to conduct *in vitro* experiments. There was a greater erythrophagocytosis rate for erythrocyte opsonized with IgG purified from anemic patients compared to erythrocytes sensitized with IgGs non-anemic patients, and also compared to the negative control (IgGs from healthy donor). Using two different multivariate analyses (NMDS and GLM) we demonstrated that red cells of blood group O were more susceptible to erythrophagocytosis when compared to groups A or B. We also investigated the relationship between erythrophagocytosis and the disease severity. Thus, inactivated sera from patients hospitalized with a severe outcome and also sera from patients without severe clinical manifestations were used to opsonize erythrocytes *in vitro*. There was an inverse correlation between the erythrophagocytosis rates and hemoglobin or hematocrit levels of those patients suggesting that erythrophagocytosis could be considered an important factor in the genesis of anemia. Finally, the effect of erythrophagocytosis on the disease severity was examined by a principal component analysis confirming that erythrophagocytosis could be considered as an important biomarker of severity in vivax malaria. Our findings extend our understanding of the mechanisms involved in anemia and may contribute to improve the control strategies to this important disease.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE QUADROS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1- INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Situação atual da malária no mundo.....	24
1.1.1. Situação atual de distribuição e impacto de <i>P. vivax</i> no mundo.....	25
1.1.2. Situação da malária na América Latina e no Brasil.....	26
1.2. Ciclo biológico dos plasmódios humanos.....	28
1.2.1. Hospedeiro vertebrado.....	28
1.2.2. Hospedeiro invertebrado.....	31
1.3. Malária e suas manifestações clínicas.....	32
1.4. Malária grave.....	33
1.4.1. Malária grave em infecções por <i>P. vivax</i>	35
1.5. Anemia em infecções por <i>P. vivax</i>	37
1.5.1. Patogênese da anemia em infecções por <i>P. vivax</i>	38
1.5.2. Possíveis mecanismos determinantes da anemia na malária vivax.....	40
1.5.2.1. Diseritropoiese.....	42
1.5.2.2. Citoaderência.....	45
1.5.2.3. Formação de rosetas.....	46
1.5.2.4. Eritrofagocitose.....	48
1.5.2.5. Lise mediada pelo sistema do Complemento.....	52
1.6. Relações entre os grupos sanguíneos do Sistema ABO e a malária.....	55
2- JUSTIFICATIVA.....	58
3- OBJETIVOS.....	60
3.1. Objetivo geral.....	60
3.1.1. Objetivos específicos.....	60

4- MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1. Objetivo específico 1: Padronização dos ensaios de eritrofagocitose <i>in vitro</i> utilizando células THP-1 e eritrócitos de doadores saudáveis opsonizados por anticorpos policlonais IgGs direcionados às proteínas de membrana dos eritrócitos.....	61
4.1.1. Cultivo celular.....	61
4.1.2. Ativação dos monócitos.....	62
4.1.3. Coleta e lavagem dos eritrócitos frescos não parasitados e saudáveis.....	64
4.1.4. Caracterização hematológica do doador de eritrócitos O+.....	64
4.1.5. Ensaio de opsonização dos eritrócitos não infectados.....	65
4.1.6. Ensaio de eritrofagocitose.....	65
4.2. Objetivo específico 2: Avaliação da relação entre a anemia nas infecções por <i>P. vivax</i> e as taxas de eritrofagocitose de eritrócitos previamente sensibilizados por IgGs purificadas de soros de pacientes com diferentes <i>status</i> clínicos.....	66
4.2.1. Área e população de estudo.....	67
4.2.2. Coleta dos soros e caracterização hematológica dos pacientes.....	69
4.2.3. Caracterização dos grupos de pacientes e preparação dos <i>Pools</i> de soros.....	70
4.2.4. Purificação de imunoglobulinas G (IgGs) dos soros dos pacientes.....	72
4.2.5. Coleta dos eritrócitos O+.....	73
4.2.6. Opsonização dos eritrócitos não infectados.....	74
4.2.7. Análise estatística.....	74
4.3. Objetivo específico 3: Análise da influência do sistema ABO (grupos sanguíneos A, B e O) nas taxas de eritrofagocitose.....	75
4.3.1. Caracterização hematológica dos doadores de eritrócitos saudáveis dos grupos A, B e O.....	75
4.3.2. Análise estatística.....	78
4.4. Objetivo específico 4: Avaliação da relação entre gravidade da infecção e as taxas de eritrofagocitose.....	78
4.4.1. Área e população de estudo.....	79
4.4.2. Coleta dos soros.....	82
4.4.3. Opsonização dos eritrócitos não infectados.....	82
4.4.4. Análise estatística.....	83

5- RESULTADOS.....	85
5.1. Padronização dos experimentos de eritrofagocitose.....	85
5.2. Avaliação da fagocitose de eritrócitos não parasitados, por células THP-1, após a opsonização com IgGs purificadas de pacientes com malária vivax anêmicos e não anêmicos.....	87
5.3. Análise da influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO nas taxas de eritrofagocitose.....	88
5.3.1. Análise de padrões de dissimilaridades das taxas de eritrofagocitose nos três grupos sanguíneos.....	89
5.3.2. Variações detalhadas das taxas de fagocitose de eritrócitos opsonizados por diferentes tratamentos com IgGs entre os grupos sanguíneos A, B e O e entre tais tratamentos.....	91
5.4. Avaliação da relação entre as taxas de eritrofagocitose e a gravidade da infecção por <i>P. vivax</i>	96
5.4.1. Correlação entre as taxas de eritrofagocitose e a os níveis de hemoglobina e hematócrito em pacientes infectados por <i>P. vivax</i>	96
5.4.2. As taxas de eritrofagocitose possuem cargas elevadas de influência na componente principal 2, que determina um quinto da distribuição dos pacientes em graves e não graves.....	97
6- DISCUSSÃO.....	100
7- CONCLUSÃO.....	107
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
ANEXO.....	130

1- INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. O gênero compreende centenas de espécies causadoras da malária, porém, destas, somente cinco parasitam o homem, sendo elas: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) e *Plasmodium knowlesi* (Giuseppe, 1927), esta última em caráter zoonótico (COX-SINGH *et al.*, 2008).

Os plasmódios são transmitidos ao homem através de vetores, sendo eles mosquitos pertencentes à ordem Díptera, à família Culicidae e ao gênero *Anopheles* (Meigan, 1818). No Brasil as principais espécies transmissoras são: *Anopheles darlingi* (Root, 1926), *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932) e *Anopheles albitalis* (Lynch, 1878), e outras menos importantes como *Anopheles bellator* (Dyar & Knab, 1906) e *Anopheles cruzii* (Dyar & Knab, 1906) (REBÊLO *et al.*, 1997).

A malária é uma doença muito antiga, conhecida desde a era pré-cristã, porém apesar de todos os estudos a respeito das interações entre este parasito e o homem, as estratégias de controle desenvolvidas ainda não conseguiram eliminar essa doença das áreas tropicais e subtropicais do mundo. A falta de um controle adequado, somada a associação desta enfermidade às altas taxas de mortalidade e morbidade, resulta na permanência da malária como um dos maiores problemas de saúde pública (MILLER *et al.*, 2002).

Dentre as cinco espécies que infectam o homem, *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes em todo o mundo, no entanto, cada uma possui características próprias e consequentes diferenças em sua distribuição global.

O *P. falciparum* é a espécie considerada como a de maior impacto na saúde pública, pois leva a altas taxa de mortalidade e apresenta alta resistência a antimaláricos, principalmente no continente Africano, onde ela é mais prevalente. Por este motivo tal espécie já é muito bem caracterizada e estudada.

A malária causada por *P. vivax* era conceituada como uma infecção benigna, que não levava ao registro de altas taxas de óbitos ou mesmo de internações. Atualmente houve uma mudança neste conceito, visto que diversos estudos relataram casos graves de malária vivax

em diferentes países. Isto, em conjunto com outros fatores, como a dificuldade de controle e a ampla distribuição geográfica, fez desta infecção um motivo de preocupação no que concerne a saúde pública, especialmente nas áreas onde é endêmica. Sendo assim o número de estudos com *P. vivax* vem aumentando, porém sua simples comparação com o *P. falciparum* não é pertinente.

1.1. Situação atual da malária no mundo

Atualmente a malária está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo endêmica em 96 países (Organização Mundial de Saúde [OMS], *World Health Organization [WHO]*, 2015) (Figura 1).

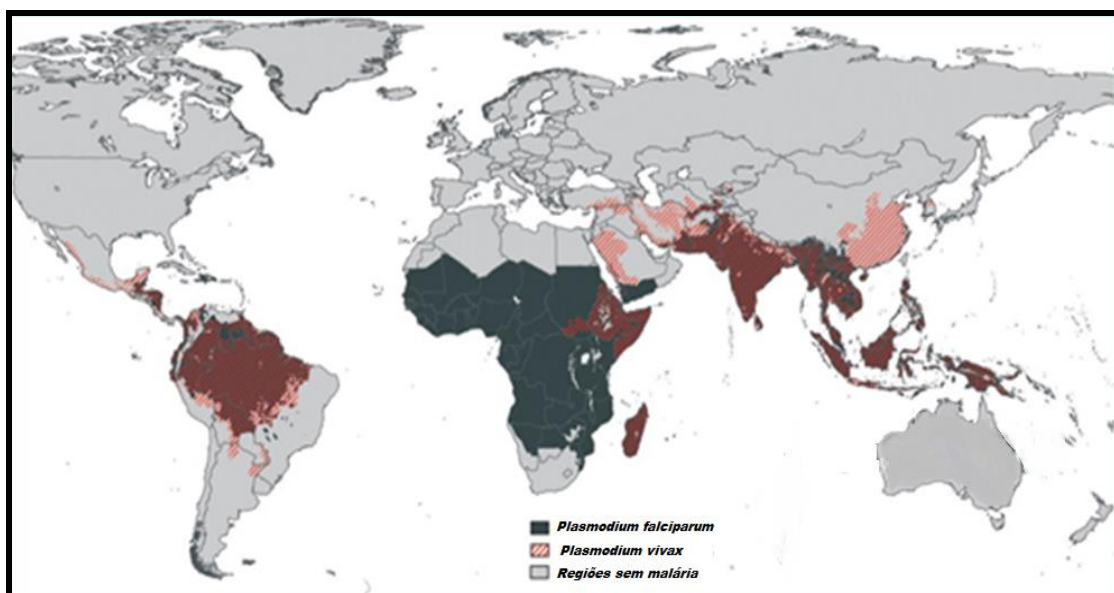


Figura 1. Distribuição mundial de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. Fonte: WHO, 2012.

Os motivos de predomínio nestas regiões são os fatores climáticos (chuva intensa, temperatura elevada constante e alta umidade) que são propícios para a formação de criadouros do mosquito vetor *Anopheles*, e a pobreza. Os gastos totais estimados, dirigidos à saúde anualmente são de R\$ 5,1 bilhões e destes, R\$ 2,6 bilhões foram destinados às intervenções em malária no ano de 2015 (WHO, 2015). Na África, em 2013, os países que possuíram as maiores taxas de mortalidade por malária foram aqueles que apresentaram altas taxas de pobreza extrema e estima-se uma redução anual de aproximadamente 1,3% do Produto Interno Bruto (PIB) de todos os países endêmicos, demonstrando uma nítida associação entre malária e pobreza (SACHS & MALANEY, 2002; WHO, 2014).

Em 2015 foram estimados 214 milhões de casos de malária no mundo, levando a notificação de 438 mil mortes por complicações da doença, ocorridas majoritariamente na África Subsaariana (88%), sendo que durante o período de 2001 a 2015, 95% do total de óbitos foram registrados em crianças com menos de 5 anos (WHO, 2015). Estes dados são bastante expressivos e acredita-se ainda que eles não representem o número real de casos, pois muitos indivíduos portadores da doença não se integram às estatísticas. Os motivos da não-integração compreendem: a habitação de tais indivíduos à regiões onde não são incluídos pelo sistema de notificação dos governos locais, a não procura e/ou recebimento de atendimento hospitalar, e também o não diagnóstico por exames laboratoriais (GUERRA *et al.*, 2006; GREENWOOD, 2008).

Tudo isso revela o enorme impacto socioeconômico global que essa enfermidade produz e ainda demonstra a importância da sua eliminação para a prosperidade econômica e social dos países afetados.

1.1.1. Situação atual de distribuição e impacto do *P. vivax* no mundo

O *P. vivax* apresenta uma distribuição geográfica mais ampla se comparado ao *P. falciparum*, estando presente nos cinco continentes, com maior prevalência nas Américas, Sul da Ásia e Oceania, acarretando em uma estimativa de 2,85 bilhões de pessoas residentes em áreas de risco de contrair a infecção (GUERRA *et al.*, 2010) (Figura 1). Esses números são relevantes, uma vez que em 2015 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou 3,2 bilhões de pessoas em áreas de risco de infecção por *Plasmodium*.

São diversos os fatores que levaram a essa organização espacial do *P. vivax* e entre eles: estão o desenvolvimento do parasito no *Anopheles* que pode ocorrer em baixas temperaturas e altas altitudes, os estágios evolutivos denominados hipnozoítos, cuja sobrevivência por longos períodos pode levar a recaídas tardias da doença e a precoce produção de gametócitos, formas evolutivas sexuadas responsáveis pela contaminação do mosquito vetor, ambas dificultando o controle (PRICE *et al.*, 2007, KASLIWAL *et al.*, 2009, MUELLER *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2012).

Essa espécie é responsável por 50% dos casos de malária fora da África, totalizando, em 2015, 13,8 milhões de registros dessa infecção. Sendo assim, o total de óbitos atribuídos a essa espécie foi estimado entre 1.400 e 14.900 ainda em 2015 e, ao comparar com 2014,

quando se estimou 1.400 a 12.900 casos, pode-se perceber a emergência anual da malária vivax grave (WHO, 2014; 2015).

1.1.2. Situação da malária na América Latina e no Brasil

O total de casos de malária, em 2015, na América Latina, foi de 660.000 (3% do total de casos registrados no mundo) e o número de óbitos chegou a 500, sendo 100 considerados para crianças menores de 5 anos (WHO, 2014). Nesta região a espécie mais prevalente é o *P. vivax* e estima-se 121 milhões de pessoas habitantes de áreas de risco para esta infecção e 20 milhões sob alto risco (transmissão intensa), distribuídas em 21 países (GUERRA *et al.*, 2010). Ainda na América Latina, o número de casos estimados por esta espécie foi de 500.000 (71% dos casos de malária para esta região), e 140 mortes, neste mesmo ano (WHO, 2015). No ano de 2014 foram registradas 79 mortes, sendo 50% delas no Brasil.

No Brasil, a malária é endêmica em todos os estados da Amazônia Legal, sendo eles: Acre (AC), Amapá (AP), Amazonas (AM), Pará (PA), Rondônia (RO) e Roraima (RR), além das regiões a oeste do Estado do Maranhão (MA), ao noroeste do Estado do Tocantins (TO) e algumas áreas do Estado do Mato Grosso (MT) (Sistema de Informação de Agravos de Notificação [Sinan]/ Secretaria de Vigilância à Saúde [SVS]/ Ministério da Saúde [MS] e Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica – Malária [Sivep-Malária], 2015) (Figura 2).

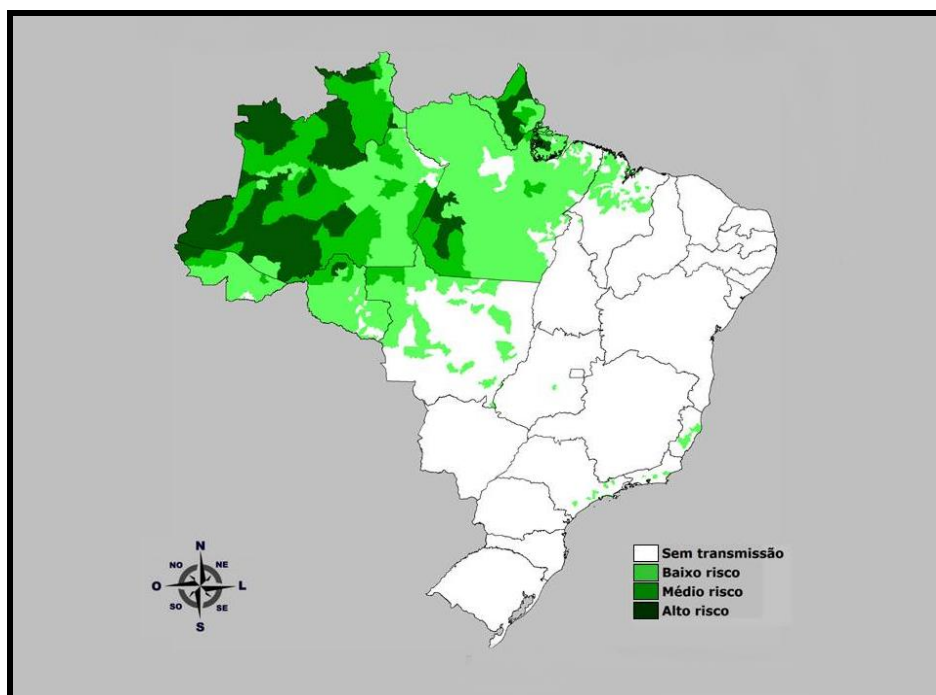


Figura 2. Mapa de risco da malária, por município, no Brasil, em 2014. Baixo risco ($IPA < 10/1000$ habitantes), médio risco ($10,0 \leq IPA \leq 49,9/1000$ habitantes) e alto risco ($IPA > 50,0/1000$ habitantes), sendo que a IPA é Índice Parasitário Anual (número de casos registrados por cada 1000 habitantes de determinada área). **Fonte:** Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/jpg/2015/junho/24/Mapa-de-risco-2014.jpg>. Acesso em: 17 de dezembro de 2015 às 21:08 horas.

Em 2015, essa região contabilizou 108.325 casos de malária, sendo a maioria no Amazonas (60.715) e no Acre (18.401), seguido de Amapá (9.043), Pará (6.752), Rondônia (6.816), Roraima (5.493) e ainda de Mato Grosso (686), Maranhão (411) e Tocantins (8). O número de casos notificados vem sofrendo reduções a cada ano (em 2013, 139.869 casos, ao passo que, em 2014, 110.209 casos) e essa diminuição é resultado de um esforço conjunto de municípios, estados e do Ministério da Saúde no combate à malária. Porém ainda há a necessidade de melhoria nos processos de prevenção e controle da doença, envolvendo capacitação de recursos humanos, além de aperfeiçoamento na identificação e contenção de surtos da doença (Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS, 2013; 2014; 2015).

É importante ressaltar que o *P. vivax* é a espécie predominante no Brasil sendo responsável por aproximadamente 90% do total de casos registrados. Entretanto, apenas 93 internações por esta espécie foram registradas no ano de 2015, sendo a maioria delas no estado do Amazonas (30 internações) com verificação de menos de 10 óbitos (Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS, 2015).

1.2. Ciclo Biológico dos plasmódios humanos

1.2.1. Hospedeiro vertebrado

A infecção do hospedeiro vertebrado tem início com a picada de fêmeas parasitadas de mosquitos do gênero *Anopheles*, que possuem no interior das glândulas salivares os esporozoítos infectantes. Os esporozoítos são formas evolutivas alongadas, com núcleo central e extremidades afiladas, e são inoculados na pele do hospedeiro juntamente com a saliva, durante o repasto sanguíneo do mosquito, em números que variam de 15 a 200 esporozoítos (MEDICA & SINNIS, 2005) (Figura 3.1).

Essas formas evolutivas, apesar de não possuírem cílios ou flagelos, são móveis e se locomovem através da reorientação das proteínas Circum-esporozoíto (*Circum-sporozoite [CS]*) e Proteína Adesiva Associada à Trombospondina (*Thrombospondin-Related Anonymous Protein [TRAP]*). A reorientação e a ligação dessas proteínas adesivas ao substrato impulsionam um motor de actino-miosina localizado abaixo da membrana celular, que dá a força para a movimentação. Tal locomoção é denominada “deslizamento” (*gliding*) e é caracterizada por ausência de modificações óbvias no formato celular do protozoário, como projeções de pseudópodes e pela dependência do substrato (VANDERBERG, 1974; MÉNARD, 2001). Devido ao *gliding*, estas formas evolutivas inoculadas na parte avascular da pele podem: migrar até os vasos linfáticos, onde serão drenadas até os linfonodos mais próximos e a maioria será destruída por células dendríticas, ou ainda, migrar e alcançar a corrente sanguínea, sendo carregadas passivamente até o fígado, onde conseguirão completar o ciclo biológico e estabelecer a infecção. Sabe-se ainda que os esporozoítos podem se desenvolver em células da derme, porém nesse local uma grande quantidade é destruída por células de defesa do hospedeiro (YAMAUCHI *et al.*, 2007; revisto por EJIGIRI & SINNIS, 2009 e MÉNARD *et al.*, 2013). Aproximadamente 50% do total de esporozoítos inoculados deixam o local da picada e destes, aproximadamente 70% atingem a circulação sanguínea (AMINO *et al.*, 2006) (Figura 3.2).

Os esporozoítos que alcançam o fígado, através da corrente sanguínea, necessitam atravessar o estreito espaço de Disse, que é uma lâmina basal descontínua e povoada por células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado), localizada entre a parede do capilar sinusóide e os hepatócitos. Sabendo-se que as janelas do espaço de Disse são muito pequenas para a passagem dos esporozoítos, acredita-se que eles atravessem as células de

Kupffer, já que alguns estudos vêm demonstrando a migração destes transversalmente em várias células sem efetivação da infecção e sem reconhecimento específico, através de rompimento da membrana plasmática das mesmas (MOTA *et al.*, 2001; MOTA *et al.*, 2002; ISHINO *et al.*, 2004; AMINO *et al.*, 2008; FORMAGLIO *et al.*, 2014). Alguns estudos observaram também que os esporozoítos atravessam vários hepatócitos antes de se desenvolverem no interior de um deles (MOTA *et al.*, 2001; MOTA *et al.*, 2002). Esse tipo de migração rápida parece ser muito importante na evasão do sistema imune durante esta fase inicial da malária (AMINO *et al.*, 2008, revisado por EJIGIRI & SINNIS, 2009) (Figura 3.3).

Os esporozoítos ao chegarem aos hepatócitos, devem mudar o fenótipo de migrante para invasor e essa mudança parece ser devido aos proteoglicanos de heparan-sulfato (*Heparan Sulfate Proteoglycans [HSPG]*). Estas moléculas estão presentes em grande concentração nos hepatócitos e acredita-se que os esporozoítos, durante a migração, sofram mudanças conformacionais na proteína CS, expondo as regiões I e II desta proteína, que reconhecem e se ligam às HSPGs (COPPI *et al.*, 2005; revisto por PRUDÊNCIO *et al.*, 2006). Um trabalho conduzido com *P. berghei* demonstrou que o parasito migrava pelas células com baixa expressão de HSPG na membrana, mas que ao ter contato com células ricas em HSPG o *P. berghei* invadia e estabelecia a infecção através da formação do vacúolo parasitóforo (COPPI *et al.*, 2007; revisto por EJIGIRI & SINNIS, 2009) (Figura 3.3).

Dentro dos hepatócitos, os trofozoítos se multiplicam assexuadamente por esquizogonia, gerando esquizontes teciduais (formas evolutivas arredondadas, composta de uma massa citoplasmática e vários núcleos) e posteriormente milhares de merozoítos (formas evolutivas mais arredondadas e menores que os esporozoítos) (revisto por SILVIE *et al.*, 2008). Esta fase, chamada de ciclo pré-eritrocítico, tem a duração de aproximadamente uma semana em infecções por *P. vivax* e por *P. falciparum*. É importante lembrar que exclusivamente nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítos dentro dos hepatócitos podem se desenvolver em formas evolutivas denominadas hipnozoítos (KROTOSKI, 1985; WHITE, 2011) (Figura 3.4 e 3.5).

A liberação dos merozoítos ocorre através da formação de merossomos, que são vesículas constituídas a partir da envaginação da membrana dos hepatócitos. Tais vesículas são capazes de passar pelo espaço de Disse por diapedese e ao chegarem ao vaso sanguíneo têm a sua membrana desintegrada, liberando os merozoítos na corrente sanguínea. Assim, os

merozoítos conseguem, novamente, evadir o sistema imune para garantir a eficiente infecção das células sanguíneas (STURM *et al.*, 2006; BAER *et al.*, 2007) (Figura 3.6).

Desta forma inicia-se a fase eritrocítica, onde os merozoítos sanguíneos irão infectar os eritrócitos de forma específica, através da adesão, da reorientação do parasito, da secreção das organelas do complexo apical, da formação das junções móveis e da invasão. O *P. vivax* é capaz de aderir aos eritrócitos através do reconhecimento do antígeno glicoproteico do grupo sanguíneo Duffy presente nos eritrócitos e os merozoítos dessa espécie possuem um forte tropismo por invadir reticulócitos, que são eritrócitos jovens contabilizando cerca de 1% dos eritrócitos totais circulantes (KITCHEN *et al.*, 1938; HANS *et al.*, 2005). Já nas infecções por *P. falciparum* ocorre a infecção de eritrócitos de diferentes graus de maturidade além do reconhecimento de diferentes moléculas de ligação na superfície das células hospedeiras (SIMPSON *et al.*, 1999; TOLIA *et al.*, 2005) (Figura 3.7).

Após a adesão, os merozoítos rolam sob o eritrócito até que a porção do apicomplexo se encontre com a membrana do eritrócito para que assim, as organelas presentes neste secretem as proteínas antígeno 1 da membrana apical (*Apical Membrane Antigen 1 [AMA-1]*) e proteína 2 de roptria (*Rhoptry neck protein 2 [RON2]*) (SRINIVASAN *et al.*, 2011; BARGIERI *et al.*, 2013; revisto por MILLER *et al.*, 2013). Estas proteínas são fundamentais na formação da junção móvel, e esta, por sua vez, desencadeia um estímulo ainda desconhecido no motor de actina e miosina, impulsionando o parasito para dentro do eritrócito. Posteriormente ocorre formação do vacúolo parasitóforo, através da fusão da membrana do parasito com a membrana do eritrócito do hospedeiro (COWMAN & CRABB, 2006; MILLER *et al.*, 2013). Dentro dos eritrócitos os merozoítos evoluem para trofozoítos, cuja multiplicação por esquizogonia gera milhares de merozoítos sanguíneos que deixam o eritrócito por rompimento da membrana deste. Os merozoítos sanguíneos liberados na corrente sanguínea irão infectar novos eritrócitos e após algumas gerações alguns irão, dentro do eritrócito infectado, sofrer diferenciação em gametócitos masculino e feminino. Os gametócitos não se multiplicam por esquizogonia, pois são os estágios sexuais e só terminam seu desenvolvimento no *Anopheles*. Apenas a fase eritrocítica é responsável pela sintomatologia da doença, através do rompimento dos eritrócitos e liberação de antígenos, pigmentos maláricos e do próprio parasito na circulação sanguínea (GLUSHAKOVA *et al.*, 2005) (Figura 3.8-10).

1.2.2 Hospedeiro invertebrado

As fêmeas do mosquito *Anopheles* são infectadas durante o repasto sanguíneo ao ingerirem os gametócitos. A partir da ingestão dessas formas o ciclo sexuado ou esporogônico continua no intestino médio do mosquito (Figura 3.11).

Neste órgão, devido ao aumento do pH e temperatura inferior a 30°C os gametócitos terminam a gametogênese e assim o gametócito feminino se desenvolve em um macrogametócito e o masculino em oito microgametócitos. Ocorre a fecundação ainda no intestino médio, aproximadamente 2 horas após a ingestão, gerando um zigoto. O zigoto sofre meiose e após 24 horas começa a se movimentar por contrações e passando a ser denominado de oocineto. Esse é capaz de atravessar a matriz peritrófica e chegar até a parede do intestino médio onde se encista na parede externa deste órgão, adquire morfologia mais arredondada e passa a ser chamado de oocisto (Figura 3.12-13).

Esta forma evolutiva se multiplica por esporogonia originando vários esporozoítos e após 9 a 14 dias, contados desde a infecção, ocorre a ruptura da parede do oocisto e liberação dos esporozoítos para a hemolinfa do mosquito vetor. Carreados passivamente pela hemolinfa os esporozoítos atingem as glândulas salivares, migram para o canal central da glândula e posteriormente para o ducto salivar onde serão inoculados no hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo do mosquito, reiniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado (revisto por MILLER *et al.* 2002) (Figura 3.14-15).

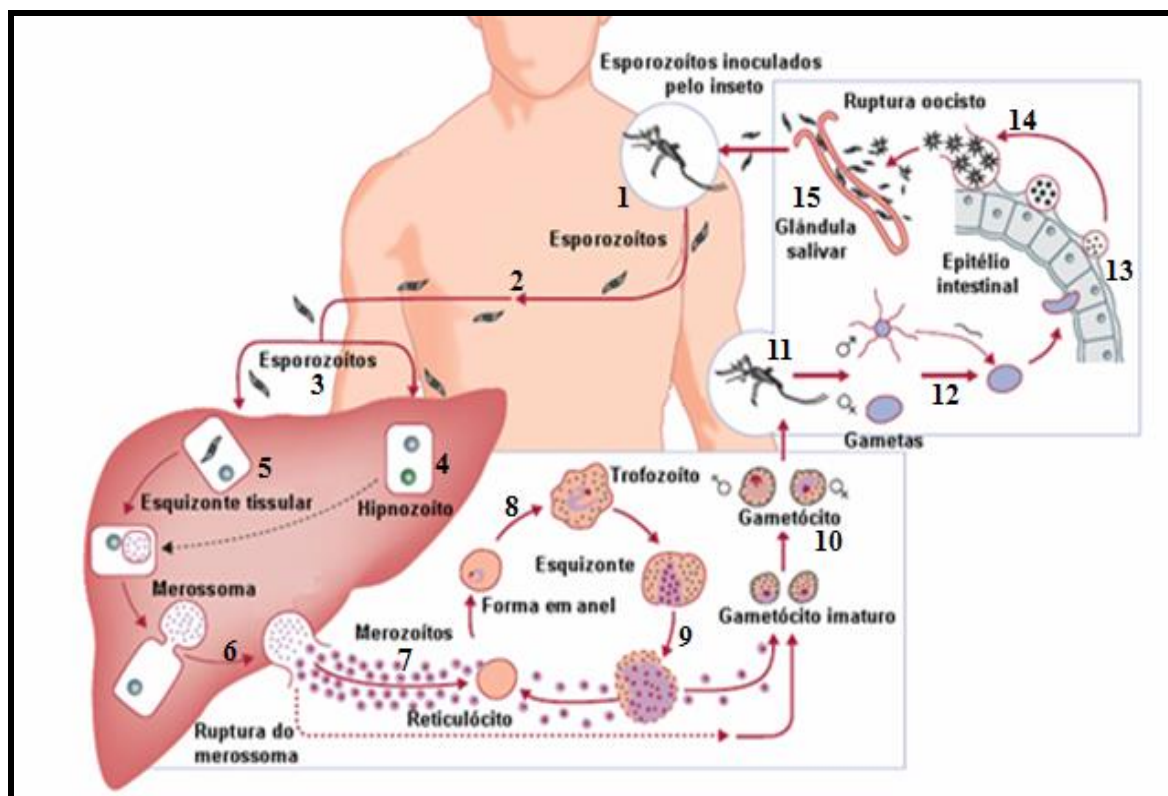


Figura 3. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*. 1. Inoculação dos esporozoítos no hospedeiro vertebrado através da picada de fêmeas infectadas do mosquito *Anopheles*. 2. Migração dos esporozoítos até os vasos sanguíneos. 3. Chegada dos esporozoítos ao fígado e após algumas gerações de merozoítos podem se desenvolver em: 4. Hipnozoítos, que são formas latentes ou 5. Novos trofozoítos e esquizontes tissulares com posterior formação de merozoítos. 6. Formação do merossoma através da membrana do hepatócito e rompimento da mesma nos vasos sanguíneos deste órgão. 7. Liberação dos merozoítos e infecção dos reticulócitos. 8. Dentro dos reticulócitos ocorre o desenvolvimento dos merozoítos em trofozoítos e posteriormente em 9. Esquizontes. 10. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos e infecção de novos reticulócitos, alguns se diferenciam em gametócitos ao invés de trofozoítos. 11. Os gametócitos são as formas infectantes para o mosquito, que ao ingeri-los durante o repasto se infecta. 12. Na membrana peritrofica do mosquito os gametócitos se desenvolvem e ocorre a fecundação, originando um zigoto. 13. O zigoto se encista no epitélio do intestino médio do mosquito e se desenvolve em oocisto e esporozoítos 14. O oocisto se rompe liberando os esporozoítos na hemolinfa que atingem a glândula salivar 15. Os esporozoítos migram para o ducto da glândula onde serão inoculados no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva, reiniciando o ciclo. **Fonte:** Adaptado de MUELLER *et al.*, 2009.

1.3. Malária e suas manifestações clínicas

A malária tem como principais sintomas clínicos: calafrios, vômitos, mal-estar, cefaléia, febre e mialgia, porém esses sintomas iniciais são gerais e não permitem a diferenciação entre malária vivax e falciparum, assim como entre outras doenças febris. Geralmente, em indivíduos já expostos previamente à malária, ou seja, semi-imunes, observa-se a duração dos paroxismos febris (momento de maior intensidade da febre), que é de 4-8 horas e a periodicidade que é de 48-56 horas. Ao contrário das infecções por *P. falciparum*, os

paroxismos febris por *P. vivax* são mais rápidos e bem delineados, devido a uma maior sincronização da ruptura do eritrócito contendo merozoítos sanguíneos, e a febre alta e os calafrios são mais comuns (YOUNG, 1944; KITCHEN, 1949; KARUNAWEEERA *et al.*, 1992).

Porém, isso não é suficiente para identificar clinicamente a malária vivax, já que nos pacientes não imunes, os primeiros episódios de febre não apresentam o típico paroxismo. Esses indivíduos, na maioria das vezes, apresentam febre como sintoma único e, até apresentarem o sincronismo da esquizogonia, que demanda tempo, e o característico paroxismo, já poderão estar em situações clínicas graves, além de que eles, por não serem pré-imunizados, têm mais chances de evoluírem para a malária grave (KITCHEN, 1949). Por isso é importante ressaltar que, para o diagnóstico seguro é necessária a utilização de testes laboratoriais como a Gota Espessa ou a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction [PCR]*) (Kary, 1983), ou ambos em caso de dúvidas, já que os sintomas clínicos, como dito anteriormente, possuem um amplo espectro de variação (SCOPEL *et al.*, 2004).

Essa fase inicial da malária dificilmente leva a altas taxas de mortalidade, e para que isso ocorra é necessário a associação de um conjunto de fatores como co-infecções, desnutrição, ausência de tratamento, existência de outras doenças debilitantes, cepa do parasito, hospedeiro, fatores sociais e localização geográfica (WHO, 2014).

1.4. Malária grave

A maior causa de mortalidade e de morbidade em infecções por *Plasmodium* é devida à evolução da doença inicial para a malária grave e complicada, onde crianças menores de cinco anos, grávidas e adultos não imunes são os mais afetados, refletindo a falta de habilidade dos mecanismos da resposta imune adaptativa em prevenir a evolução da doença (RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2006; GENTON *et al.*, 2008; TJITRA *et al.*, 2008; POESPOPRODJO *et al.*, 2009).

A malária grave é uma desordem caracterizada pelo dano vascular em um órgão ou tecido específico, porém ela pode afetar vários órgãos e tecidos, mesmo quando a principal manifestação pareça envolver apenas um, e, durante esse estágio não se observa com frequência o característico paroxismo, mas a febre continua persistente. As complicações mais

observadas abrangem a anemia grave, a malária cerebral, a malária placentar, coma (perda de consciência), estresse respiratório, danos agudos nos rins, hipoglicemia e trombocitopenia (WHO, 2014).

Segundo a OMS, a malária grave é definida pela presença de uma ou mais manifestações clínicas ou características laboratoriais apresentadas no Quadro 1, quando infectados por *P. falciparum* e sem outras causas confirmadas para a sintomatologia apresentada. Alguns estudos realizados no Brasil demonstraram que os critérios da OMS podem ser estendidos para a malária vivax, já que foram sensíveis em identificar crianças que requeriam admissão para cuidados intensos e em identificar pacientes em risco de morte (WHO, 2000; LACERDA *et al.*, 2012; LANÇA *et al.*, 2012; WHO, 2014).

Quadro 1. Manifestações da malária grave por *Plasmodium falciparum* em adultos e crianças segundo a Organização Mundial de Saúde.

Valor Prognóstico (+ a +++)		Manifestações clínicas	Frequência (+ a +++)	
Crianças	Adultos		Crianças	Adultos
+++	+++	Perda de consciência	+++	++
+++	+++	Estresse respiratório	+++	++
+	++	Convulsões múltiplas	+++	+
+	+	Prostração	+++	+++
+++	+++	Choque	+	+
+++	+++	Edema pulmonar	+/-	+
+++	++	Sangramento anormal	+/-	+
++	+	Icterícia	+	+++
Índices Laboratoriais				
+	+	Anemia grave	+++	+
+++	+++	Hipoglicemia	+++	++
+++	+++	Acidose	+++	++
+++	+++	Hiperlactatemia	+++	++
++	++	Disfunção renal	+	+++
+/-	++	Hiperparasitemia	++	+

Fonte: Adaptado de WHO, 2014

Para fins de pesquisa e levantamento epidemiológico a definição é mais específica e, assim como a primeira, esta também foi avaliada em infecções por *P. falciparum*, mas pode ser válida para infecções por *P. vivax* (Quadro 2).

Quadro 2. Definição de algumas manifestações clínicas ou índices laboratoriais para fins de pesquisa ou levantamento epidemiológico segundo a Organização Mundial de Saúde.

Acidose	Déficit basal de >8 meq/l ou, se não avaliado, bicabornato no plasma <15mM ou lactato no plasma venoso >5mM. Acidose grave manifesta clinicamente como estresse respiratório- Respiração rápida, profunda e forçada.
Hipoglicemia	Glicose sanguínea ou plasmática <2.2mM (<40mg/dL)
Anemia grave por malária	Concentração de hemoglobina <5g/dL ou hematócrito <15% em crianças <12 anos de idade (<7g/dL e <20%, respectivamente, em adultos)
Disfunção renal (Danos agudos aos rins)	Creatinina plasmática ou do soro >265 µM (3mg/dL) ou uréia sanguínea >20mM
Icterícia	Bilirrubina plasmática ou do soro >50 µM (3mg/dL) junto com a contagem de parasitemia >100.000/µl

Fonte: Adaptado de WHO, 2014

1.4.1 Malária grave em infecções por *P. vivax*

Durante muito tempo acreditou-se que as infecções por *P. vivax* não evoluíssem, ou evoluíssem raramente para malária grave e conseqüentemente a óbitos e por isso o título de doença benigna. Porém, nas últimas décadas vêm sendo publicados diversos estudos e relatos de casos na literatura médica que, em conjunto, demonstraram uma alta taxa de pacientes com malária vivax grave e altos índices de óbitos decorrentes dessa infecção se comparado a estudos anteriores, em países onde essa espécie é endêmica. Alguns estudos foram realizados no Brasil (BARCUS *et al.*, 2007; ALEXANDRE *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2010; revisado por COSTA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2012), Indonésia (TJITRA *et al.*, 2008; LAMPAH *et al.*, 2011), Papua- Nova guiné (GENTON *et al.*, 2008; MANNING *et al.*, 2011), Índia (KOCHAR *et al.*, 2005; KOCHAR *et al.*, 2009; YADAV *et al.*, 2012), Tailândia (LUXEMBURGUER *et al.*, 1996), Venezuela (RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2008), Malásia (BARBER *et al.*, 2012) e Sudão (MAHGOUB *et al.*, 2012).

No Brasil, ocorreu uma inversão no quadro epidemiológico, com uma redução nos casos de *P. falciparum* em paralelo a um aumento no número de hospitalizações por *P. vivax*, sendo que entre 1998 e 2008 foram relatadas 234 mortes por essa espécie. Porém, a partir de 2009 o número de óbitos foi sofrendo reduções (SANTOS-CIMINERA *et al.*, 2007; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; WHO, 2011)

Nas áreas endêmicas fatores como pouca idade, desnutrição, recaídas precoces e frequentes, níveis de transmissão intensos, pouco acesso ao diagnóstico e ao tratamento precoce e altas prevalências de outras comorbidades como verminoses e bacterioses são associados ao risco de gravidade da doença, assim como a imunidade do indivíduo parasitado, como já foi dito anteriormente, que também é um dos principais responsáveis pela diversidade clínica da doença (PRICE *et al.*, 2009; QUINTERO *et al.*, 2011; ANSTEY *et al.*, 2012; WHO, 2014).

Diversos estudos compararam as manifestações clínicas da malária vivax grave com as encontradas em infecções por *P. falciparum* e encontraram o mesmo perfil clínico de evolução da doença, entre eles três grandes estudos realizados na Ilha de Nova Guiné, onde todas as quatro espécies de *Plasmodium* causadoras de malária em humanos coexistem em prevalências suficientes a ponto de se obter uma comparação de morbidade e mortalidade apropriada para cada espécie (BARCUS *et al.*, 2007; GENTON *et al.*, 2008; TJITRA *et al.*, 2008).

Tjitra e colaboradores (2008) realizaram um desses estudos na Papua-Nova Guiné (lado oriental da ilha de Nova Guiné) e ele foi fundamental para demonstrar a malignidade de *P. vivax*, pois além dos fatores desta ilha descritos acima, contou com uma população amostral muito grande, abrangendo 60,226 indivíduos com malária por *Plasmodium sp.*, destes, 39.434 com *P. falciparum*, 16.113 com *P. vivax* e o restante com infecções mistas e outras espécies. Estes pesquisadores demonstraram que a taxa de pacientes com malária vivax grave foi de 40%, sendo que o risco de complicação da doença foi maior em pacientes infectados por *P. vivax* (23%) se comparado aos infectados por *P. falciparum* (20%). Eles observaram também que as taxas de mortalidade em pacientes internados não diferiram estatisticamente entre as duas espécies (1,6% *P. vivax*, 2,2% *P. falciparum*). Verificou-se um maior número de casos de anemia grave seguido por estresse respiratório e perda de consciência, sendo que o perfil foi bastante similar para as duas espécies, como por exemplo, a anemia grave foi encontrada em 87% dos pacientes com malária vivax e em 73% dos com malária falciparum.

1.5. Anemia em infecções por *P. vivax*

A complicação mais frequente por malária vivax no Brasil e no mundo é a anemia, sendo um dos maiores problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento (GENTON *et al.*, 2008; TJITRA *et al.*, 2008, LANÇA *et al.*, 2012; WHO, 2014). Segundo a OMS, a anemia nestes países, independente do motivo, é definida como Hb <11.0 g/dL em crianças menores de 5 anos e a anemia grave por malária é definida como apresentado no Quadro 2, na presença de qualquer parasitemia (MURRAY *et al.*, 1997; WHO, 2000; GOMES *et al.*, 2011).

De acordo com o estudo da Tjitra e colaboradores (2008) já destacado anteriormente, uma taxa de 10% de adultos hospitalizados com anemia grave decorrente de infecções por *P. vivax* foi relatada entre pacientes da Papua- Nova Guiné. Outros estudos realizados na Índia e no Brasil contabilizaram quase 33% de pacientes com anemia grave dentre o total de adultos infectados graves (KOCHAR *et al.*, 2009; ANDRADE, 2010a). Esses dados, em conjunto, mostram que a anemia grave, mesmo em adultos, é uma complicação comum da malária vivax. Porém, em termos de frequência, gravidade e fatalidade, ela é mais deletéria para crianças e mulheres grávidas, assim como para as outras complicações por *P. vivax* (MURPHY & BREMAN, 2001; TJITRA *et al.*, 2008; POESPOPRODJO *et al.*, 2009; LANÇA *et al.*, 2012).

No Brasil este quadro epidemiológico não é diferente, uma vez que estudos realizados na Amazônia Brasileira concluíram que a anemia grave atribuída ao *P. vivax* foi maior na infância (30,4%) se comparado ao *P. falciparum* (20.5%) e que a frequência de anemia nas crianças e adolescentes infectadas por *P. vivax* é aproximadamente de 80%, demonstrando o impacto da doença nessa faixa etária (VENTURA *et al.*, 1999; VENTURA *et al.*, 2010; LANÇA *et al.*, 2012). Outros estudos realizados no Brasil e na América Latina verificaram taxas de cerca de 80% de anemia em mulheres grávidas infectadas por *P. vivax*, sendo que esta, quando é grave, se porta como uma emergência obstétrica, além de estar associada à redução do peso do recém-nascido (CHAGAS *et al.*, 2009; ALEXANDRE *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2010).

1.5.1. Patogênese da anemia em infecções por *P. vivax*

A anemia associada à malária, apesar de muito relevante, tem sido pobremente estudada se comparada a outras áreas como desenvolvimento de vacinas, genômica e resposta imune, principalmente no que concerne às infecções por *P. vivax* que foram negligenciadas pela comunidade científica por muito tempo. Como consequência, a patogênese e etiologia da anemia vivax ainda não são bem elucidadas e muitas são as questões que ainda necessitam de respostas para o entendimento geral dos mecanismos promotores da anemia nessas infecções (CHANG *et al.*, 2004; CASTRO-GOMES *et al.*, 2014).

Por a malária ser uma doença majoritariamente intravascular resultante da presença e multiplicação do parasito no interior dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, durante o ciclo eritrocítico, distúrbios hematológicos podem ser decorrentes da destruição dos eritrócitos infectados. Estas células sofrem alterações estruturais, bioquímicas e funcionais que promovem o rompimento e liberação dos parasitos, assim como de seus metabólitos na circulação sanguínea (hemólise intravascular) (GLUSHAKOVA *et al.*, 2005; MILLHOLLAND *et al.*, 2011). Porém, para explicar a anemia grave decorrente de infecções por *P. vivax*, somente a hemólise intravascular dos eritrócitos infectados ocorrendo como efeito direto da biologia do parasito por si só não é suficiente. Isso porque os merozoítos dessa espécie tem preferência por infectar reticulócitos e a biomassa total de tais células destruídas seria facilmente repostada pela medula óssea durante o processo de eritropoiese (KITCHEN *et al.*, 1938; WICKRAMASINGLE & ABDALLA, 2000; QUINTERO *et al.*, 2011). Diversos estudos realizados em áreas endêmicas têm apontado uma falta de correlação entre a carga parasitária detectada e a gravidade da doença, corroborando o fato descrito acima (DONDORP *et al.*, 1999; revisto por MUELLER *et al.*, 2009). É bem evidente, também, que a anemia decorrente da infecção malárica é normocítica e normocrômica, logo não ocorrem mudanças no tamanho do eritrócito nem diminuição na quantidade de hemoglobina presente nessas células (ABRO *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 2005).

Esse conjunto de fatores, associado a estudos que demonstram a persistência da anemia em pacientes já tratados e sem infecção detectada, corroboram o fato de que a anemia vivax é então, multifatorial e possui um caráter complexo, sendo uma consequência indireta da presença do parasito (COLLINS *et al.*, 2003; ANSTEY *et al.*, 2009).

Existem amplas evidências de que durante a malária, a vida-média dos eritrócitos não infectados é reduzida devido a uma acelerada destruição dos mesmos e que a remoção destes persiste por pelo menos 5 semanas após o tratamento com antimaláricos (WOODRUFF *et al*; 1979; LOOAREESUWAN *et al*, 1987; SALMON *et al*, 1997).

Collins e colaboradores (2003) realizaram um estudo retrospectivo da anemia desencadeada por *P. vivax*, analisando arquivos entre 1940 a 1963 de pacientes portadores de neurosífilis submetidos a tratamento com essa espécie, e esse trabalho foi essencial para quantificar a biomassa de eritrócitos não infectados destruídos durante essas infecções. Para isso eles analisaram dois fatores: a contagem diária de parasitos por microlitro de sangue e a medida semanal da concentração de hemoglobina [Hb]. A partir desses fatores, foi empregado o seguinte método de análise: considerando que a contagem diária da parasitemia em uma semana resulta no valor de 4 ciclos eritrocíticos, já que cada um dura aproximadamente 42 horas, e uma semana é o intervalo entre as medidas de hemoglobina, as 7 contagens diárias de parasitemia multiplicado por quatro ciclos resulta na quantidade de eritrócitos infectados e destruídos durante cada intervalo, dessa forma a primeira medida de [Hb] dividida pela segunda medida de [Hb] é igual a porcentagem de redução ou aumento na concentração de Hb. Ao fim do trabalho eles chegaram à conclusão de que a porcentagem de [Hb] diminuiu em quantidades incompatíveis às observadas pela atividade biológica do parasito e estimaram que apenas 0.39% do total de 13.37% de eritrócitos destruídos no intervalo de uma semana foi consequência direta da presença do parasito, resultando em uma estimativa de destruição de um eritrócito infectado para 34 não infectados.

Esse trabalho se baseou no estudo mais antigo de Jakeman e colaboradores (1999) em pacientes também portadores de neurosífilis e submetidos a tratamento com *P. falciparum*, onde foi estimado que para cada eritrócito infectado, aproximadamente 9 não infectados eram destruídos, concluindo-se então, dos dois estudos, que a taxa de remoção de eritrócitos não infectados é aproximadamente 4 vezes maior para infecções por *P. vivax*, se comparado ao *P. falciparum*. Por tudo isso, Collins e colaboradores (2003), assim como vários outros trabalhos, apontam a remoção excessiva dos eritrócitos não infectados como um dos principais mecanismos promotores da anemia vivax (DOUGLAS *et al.*, 2012; CASTRO-GOMES *et al.*, 2014; WHO, 2014).

Dito isto, investigações nesta área da malária vivax têm sido desenvolvidas a fim explicar os mecanismos patofisiológicos que levam a remoção da grande quantidade de biomassa de eritrócitos não infectados, visto que aumentar o entendimento da patogênese da

anemia da malária é um pré-requisito para o desenvolvimento de efetivas estratégias de tratamento e prevenção (PANICHAKUL *et al.*, 2012).

1.5.2. Possíveis mecanismos determinantes da anemia na malária vivax

Atualmente propõem-se a existência de vários mecanismos de perda de eritrócitos- tanto infectados como não infectados- determinantes dos quadros de anemia na malária vivax. Mas o principal foco dos estudos atuais é direcionado ao entendimento dos mecanismos envolvidos na destruição dos eritrócitos não parasitados e à produção ineficiente de eritrócitos (supressão da eritropoiese). Estes mecanismos são, em sua maioria, observados em estudos conduzidos com *P. falciparum*, mas, também propostos para *P. vivax*, a partir do uso de processos patofisiológicos representativos, respeitando as diferenças entre essas duas espécies. Em sua grande maioria também, esses mecanismos são amplamente dependentes da resposta imune do hospedeiro vertebrado desencadeada pela infecção.

Já é bem definido que o *P. vivax* apresenta um baixo limiar pirogênico (nível de parasitemia associado à febre) e esse baixo limiar foi correlacionado à alta resposta inflamatória, mensurada por níveis de TNF- α plasmáticos (KARUNAWEEERA *et al.*, 1992). Além disso, diversos estudos diferentes foram realizados no intuito de medir a resposta inflamatória e verificaram um desequilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias nas infecções por *P. vivax* em comparação às infecções por *P. falciparum* (KARUNAWEEERA *et al.*, 1992; HEMMER *et al.*, 2006; YEO *et al.*, 2010b, ANDRADE *et al.*, 2010b). Estudos realizados em órgãos específicos mostraram uma resposta inflamatória maior nestas infecções também se comparado ao *P. falciparum* na presença de uma biomassa de parasitos similar (ANSTEY *et al.*, 2007) e finalmente foi observado uma maior ativação endotelial por esta espécie (YEO *et al.*, 2010b).

Outros trabalhos vêm demonstrando que a alta resposta inflamatória ocorre em paralelo com um alto estresse oxidativo no eritrócito levando à consequente produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species [ROS]*) e que as baixas concentrações de enzimas antioxidantes no plasma como glutatona peroxidase e catalase têm sido associadas à gravidade da malária vivax (EREL *et al.*, 1997; SHARMA *et al.*, 2004; BILGIN *et al.*, 2012).

Os mecanismos pelos quais o *P. vivax* desencadeia esse desequilíbrio ainda não são bem elucidados e especula-se sobre o papel de duas ‘toxinas maláricas’ que em *P. falciparum* são as principais causadoras da febre: o Glicosilfosfatidilinositol (*Glycosylphosphatidylinositol [GPI]*) e o DNA do *Plasmodium* associado à hemozoína (BOUTLIS *et al.*, 2005; PARROCHE *et al.*, 2007). Pode ser que haja alguma diferença estrutural entre o GPI das duas espécies tornando o *P. vivax* mais pirogênico, porém faltam estudos nesse âmbito. O que se sabe é que o teor de GC (Guanina e Citosina) do genoma de *P. vivax* é quase o dobro do teor desses nucleotídeos em *P. falciparum* e que nas infecções por *P. falciparum* o CpG, quando associado à hemozoína e internalizado, estimula receptores do tipo Toll 9 móveis (TLR-9) (CARLTON *et al.*, 2008). Este estímulo também gera uma grande resposta inflamatória, porém investigações com o *P. vivax* ainda não foram desenvolvidas (revisado por ANSTEY *et al.*, 2009).

Durante o processo da anemia desencadeada pela malária vivax, esse quadro imunológico não é diferente, uma vez que a alta resposta inflamatória também já foi encontrada em pacientes anêmicos. Estudos relataram altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (*Tumor necrosis factor- α [TNF- α]* e *Interferon- γ [IFN- γ]*) no plasma de pacientes com anemia média e altos níveis da proteína quimioatrativa de monócitos 1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1 [MCP-1]*) em pacientes com anemia moderada a grave se comparados à pacientes não anêmicos (FERNANDES *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2010b).

A interleucina IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória, também é vista em altos níveis no plasma de pacientes anêmicos infectados por vivax e sabidamente ela tem papel regulador na expressão de receptores TNF- α . Entretanto, razões elevadas de TNF- α /IL-10 nos soros desses pacientes têm sido associadas à anemia grave em diferentes estudos e o inverso à proteção (OTHORO *et al.*, 1999; FERNANDES *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010b).

Uma recente revisão do nosso grupo discutiu os prováveis processos de remoção dos eritrócitos não infectados e infectados associando-os, principalmente a fatores imunológicos e dividindo-os em dois grandes grupos:

- (i) diseritropoiese, citoaderência e formação de rosetas (Figura 5).
- (ii) lise mediada pelo sistema do complemento e eritrofagocitose (Figura 6).

1.5.2.1. Diseritropoiese

A eritropoiese é o processo de formação de reticulócitos anucleados na medula óssea através da proliferação e diferenciação dos eritróides progenitores, com o intuito de manter a população de eritrócitos no sangue que tem vida-média de aproximadamente 120 dias. O desenvolvimento dos eritróides progenitores até eritroblastos precusores é dependente de Ferro (Fe^{2+}), que vêm em sua maioria da lise e fagocitose dos eritrócitos senescentes e em sua minoria da dieta diária do indivíduo (HENTZE *et al.*, 2004) (Figura 4).

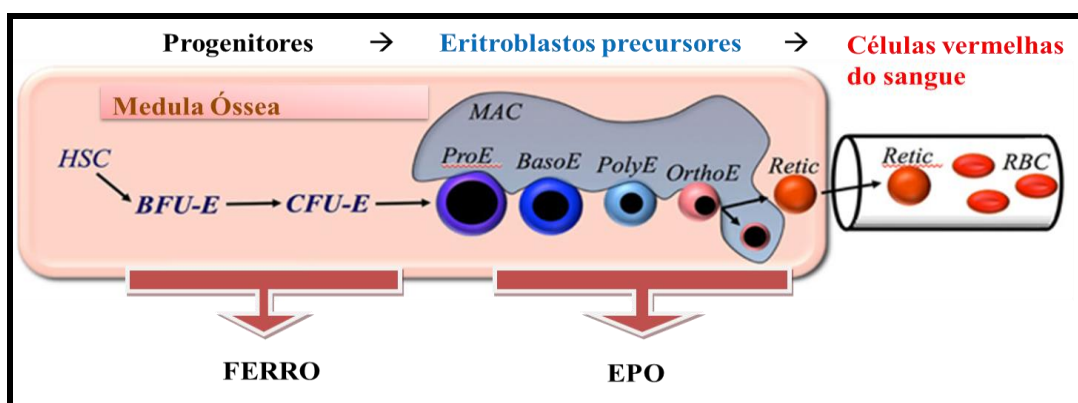


Figura 4. Eritropoiese na medula óssea. Células tronco hematopoiéticas (*Hematopoietic Stem Cell [HSC]*), unidade formadora de “explosão” de eritróides (*Burst-Forming Unit-Erythroid [BFU-E]*), unidade formadora de colônias de eritróides (*Colony-Forming Unit-Erythroid [CFU-E]*), Pró-eritroblastos (*Proerythroblast [ProE]*), Eritroblastos basófilos (*Basophilic Erythroblast [BasoE]*), Eritroblastos Policromáticos (*Polychromatic Erythroblast [PolyE]*), Eritroblastos Ortocromáticos (*Orthochromatic Erythroblast [OrthoE]*), Reticulócitos (*Reticulocyte [Retic]*), Células vermelhas sanguíneas (*Red Blood Cell [RBC]*), Eritropoietina [*EPO*]. **Fonte:** Adaptado de PALIS, 2014

Os macrófagos são essenciais na eritropoiese, pois além de realizarem a reciclagem do Fe^{2+} , retirando-os dos eritrócitos senescentes e fornecendo aos eritróides para a síntese do heme, ainda fagocitam o núcleo expelido durante o desenvolvimento do eritroblasto para reticulócito (BESSIS & BRETON-GORIUS, 1962). Por este motivo, todo esse fenômeno ocorre em ilhas eritroblásticas, onde as células em desenvolvimento se dispõem de forma a circundar um macrófago (BESSIS, 1958). Os macrófagos podem, ainda, agir como reguladores, pois durante as inflamações, eles liberam citocinas, interleucinas e quimiocinas que atuam como inibidores da eritropoiese, incluindo o $TNF-\alpha$ e o $IFN-\gamma$ (MEANS, 2004; revisto por BACK *et al.*, 2014)

O que frequentemente se observa em casos de anemia decorrente de infecções maláricas é um distúrbio na eritropoiese, que tem como principais causas a supressão da

eritropoiese com consequente diseritropoiese (produção de eritroblastos portadores de anormalidades morfológicas). Diversos estudos observaram microscopicamente os aspectos morfológicos dos eritroblastos, através de aspiração medular, em pacientes anêmicos com malária vivax ou falciparum, e encontraram diversas alterações morfológicas nessas células como núcleos com formatos irregulares, perda ou mielinização de partes da membrana celular, longas fissuras intranucleares e vacuolização citoplasmática, sendo todos estes fortes indicativos de diseritropoiese (ABDALLA *et al.*, 1980; WICKRAMASINGHE *et al.*, 1989; ABDALLA, 1990; WICKRAMASINGHE *et al.*, 2000). Wickramasinghe e colaboradores (1989) analisaram os mesmos pacientes após o tratamento e observaram a redução das células anormais, associando então, a diseritropoiese à presença do parasito. Eles também verificaram a presença de eritroblastos policromáticos com alterações morfológicas degradados no interior de macrófagos dos pacientes anêmicos infectados por *P. vivax*. Assim eles sugeriram que a eritrofagocitose é um importante mecanismo de destruição de eritroblastos danificados e quando em excesso pode culminar na supressão da eritropoiese.

Apesar das amplas evidências de diseritropoiese para ambas as espécies, os mecanismos pelos quais o *P. vivax* leva a esse fenômeno ainda precisam ser esclarecidos, já que a maioria dos trabalhos foram conduzidos com *P. falciparum*. Acredita-se que o *P. vivax* atue de duas formas simultâneas: através do parasitismo dos eritroblastos e através da liberação de seus metabólitos na circulação durante o ciclo eritrocítico. Estes metabólitos podem ser diretamente tóxicos para as células hematopoiéticas ou podem agir sob as células T e os macrófagos, culminando em produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (Figura 5).

Um relato de caso ocorrido na China demonstrou, pela primeira vez, a presença de *P. vivax* no interior de eritroblastos de dois pacientes com anemia, sendo que o parasitismo dessas células nunca foi visto em infecções por *P. falciparum* (RU *et al.*, 2009). No Brasil foi relatada a presença de esquizontes dentro das células vermelhas do aspirado medular, de um paciente com trombocitopenia e esplenomegalia, sendo ambos os estudos sem detecção da infecção no sangue periférico (LACERDA *et al.*, 2008). O parasitismo de eritroblastos pode ser explicado pelo fato de que nas infecções por *P. vivax* os eritrócitos infectados apresentam um aumento na deformabilidade, o que faz com que essas células passem até mesmo pelas fendas estreitas interendoteliais dos sinusóides do baço, sem gerar obstruções (dimensões aproximadas 1,89 x 0,65µm). Assim este parasito é capaz de alcançar os eritroblastos e

infectá-los, ao contrário do *P. falciparum*, onde os eritrócitos infectados não se apresentam tão deformáveis (SUWANARUSK *et al.*, 2004; HANDAYANI *et al.*, 2009).

Um estudo conduzido *in vitro*, com cultivo de células CD43⁺ derivadas de sangue do cordão umbilical, demonstrou que o *P. vivax* pode inibir diretamente a eritropoiese (PANICHAKUL *et al.*, 2012). Os pesquisadores evidenciaram redução de eritróides maduros na presença de reticulócitos infectados lisados ou intactos com capacidade de inibir o desenvolvimento e diferenciação das células progenitoras de eritrócitos, sem induzir a morte celular.

A hemozoína (produto da digestão da hemoglobina pelo parasito) também pode suprimir a eritropoiese, mas através da indução de apoptose nos eritroblastos ou através de estímulo para os macrófagos, aumentando a produção de citocinas (CASALS-PASCUAL *et al.*, 2006; LAMIKANRA *et al.*, 2009). A produção exacerbada de óxido nítrico (*Nitric Oxide [NO]*), que é uma espécie reativa de oxigênio, em resposta às citocinas pró-inflamatórias, também foi associada a apoptose dos eritroblastos e a anemia em infecções por *P. falciparum*, porém nada foi elucidado para *P. vivax* (MACIEJEWSKI *et al.*, 1995; ANSTEY *et al.*, 1999; GYAN *et al.*, 2002).

O papel de TNF- α no distúrbio eritropoiético foi elucidado por Roodman e colaboradores (1987). Os autores verificaram que essa citocina sozinha, ou combinada com outras citocinas/quimiocinas, podia inibir as células unidade formadora de “explosão” de eritróides (*Burst-Forming Unit-Erythroid [BFU-E]*) e unidade formadora de colônias de eritróides (*Colony-Forming Unit-Erythroid [CFU-E]*). O TNF- α induz uma acelerada apoptose nestas células, interfere na diferenciação dos eritróides através da regulação de fatores de transcrição e, ainda, reduz a produção de Eritropoietina (EPO, hormônio regulador da eritropoiese, fundamental para a o desenvolvimento das células progenitoras) (JELKMANN, 1998). O IFN- γ também inibe a eritropoiese atuando da mesma forma que o TNF- α nos eritróides progenitores (DAI & KRANTZ, 1999; LIBREGTS *et al.*, 2011). Além destas duas citocinas, o fator de inibição de migração (*Migration Inhibitory fator [MIF]*), citocina imunoregulatória produzida por macrófagos, também já foi observado em altas concentrações no plasma de pacientes anêmicos infectados por *P. vivax* e identificado como sendo um potente inibidor da diferenciação de eritróides (MCDEVITT *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2010).

1.5.2.2. Citoaderência

A citoaderência é o processo caracterizado pela capacidade do eritrócito infectado de se ligar e aderir às células endoteliais da microvasculatura do hospedeiro. É um mecanismo inibidor da remoção dos estágios maduros do parasito pelo baço, pois leva ao sequestro, principalmente, dos eritrócitos contendo trofozoítos maduros e esquizontes da circulação sanguínea periférica (BIGNAMI & BASTIANELLI, 1889; MILLER *et al.*, 1994). Porém, em excesso, pode levar à obstrução microvascular e conseqüentemente causar danos aos órgãos. Este processo é muito bem caracterizado para *P. falciparum*, principalmente na malária cerebral, porém pouco se sabe no que concerne às infecções por *P. vivax* (PONGPONRATN *et al.*, 2003) (Figura 5).

Durante muito tempo acreditou-se que *P. vivax* não possuía essa habilidade, pois todos os estágios evolutivos sanguíneos do parasito são observados nos esfregaços ou gota espessa dos pacientes infectados (RUDOLF & RAMSAY, 1927). Atualmente a citoaderência em malária vivax passou a ser considerada pela comunidade científica, pelos seguintes motivos: a comprovada malignidade desta espécie juntamente com as semelhanças no perfil evolutivo da doença clínica com o *P. falciparum* e pelas observações frequentes de baixo peso em recém-nascidos de grávidas com malária vivax grave (NOSTEN *et al.*, 1999; POESPOPRODJO *et al.*, 2008; RIJKEN *et al.*, 2012a). Sabendo-se que em infecções por *P. falciparum* o baixo peso ocorre em decorrência do acúmulo de eritrócitos infectados que aderem à placenta culminando em um retardo do crescimento intrauterino do bebê, esse mecanismo também foi proposto para *P. vivax* e foi a chave para o início dos estudos de citoaderência nessas infecções (BERENDT *et al.*, 1990; CHOTIVANICH *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2010).

Como esperado, surgiram alguns trabalhos a respeito do tema, sendo a maioria deles realizados *in vitro* ou *ex vivo* (LOPES *et al.*, 2014; ANSTEY *et al.*, 2007). Devido à dificuldade de realização de estudos de necropsia, poucas evidências de citoaderência *in vivo* foram reportadas para esta espécie (revisto por ANSTEY *et al.*, 2009). Carvalho e colaboradores (2010) demonstraram que eritrócitos infectados, coletados de pacientes no Brasil, foram capazes de citoaderir, com a mesma força de ligação, a receptores do endotélio, da placenta, do cérebro e dos pulmões, semelhantes aos utilizados por *P. falciparum*, porém, em menores níveis. Diversos outros trabalhos também demonstraram a ligação dos eritrócitos infectados a receptores de sulfato de condroitina A e ácido hialurônico da placenta e dos

pulmões (CARVALHO *et al.*, 2010; CHOTIVANICH *et al.*, 2012; LAS SALAS *et al.*, 2013). Del Portillo e colaboradores (2004) propuseram que os eritrócitos infectados por *P. vivax* aderiam às células de barreira do baço- fibroblastos contráteis- que ficam localizados nas áreas protegidas deste órgão e sabidamente são aumentados durante as infecções maláricas. Deste modo os eritrócitos não são removidos pelos macrófagos, permitindo a sobrevivência do parasito e estabelecimento da infecção crônica.

A citoadesão, com a conseqüente formação de microêmbolos ao longo da microvasculatura e obstrução da mesma, pode ter também, um papel importante na perda de eritrócitos infectados, assim como na patogênese da malária grave, porém o papel específico da citoadesão na anemia vivax ainda necessita de grandes investigações (ANSTEY *et al.*, 2009).

1.5.2.3. Formação de Rosetas

O processo de formação de rosetas é também um processo de citoadesão, porém neste os eritrócitos infectados se ligam e aderem a dois ou mais eritrócitos não infectados formando um aglomerado similar a uma roseta. Este mecanismo também pode causar obstrução da microvasculatura e ao fim, dano aos órgãos. É também um processo bem elucidado para *P. falciparum* e sabidamente associado à gravidade e patofisiologia da doença (CARLSON *et al.*, 1990) (Figura 5).

Os estudos relacionados a esse processo também foram realizados *in vitro* e *ex vivo*, e, ao contrário da citoaderência esse fenômeno nunca foi visto, nem evidenciado *in vivo*. O trabalho pioneiro foi realizado por Udomsanpetch e colaboradores (1995) na Tailândia, demonstrando a formação de rosetas por *P. vivax ex vivo*, e após esse, outros três também demonstraram esse fenômeno, mas todos na Ásia. O recente trabalho de Lee e colaboradores (2014) foi de extrema importância para o entendimento desse mecanismo nas infecções vivax, já que eles observaram uma preferência dos reticulócitos infectados em aderir à normócitos (90% das rosetas formadas) e não a outros reticulócitos. Com isso houve o abandono da proposição de que a roseta em vivax poderia facilitar a invasão dos reticulócitos pelos merozoítos. Alguns trabalhos também observaram um papel importante da glicoforina C na mediação deste fenômeno (CHOTIVANICH *et al.*, 1998; RUSSELL *et al.*, 2011). Um estudo realizado no Brasil, por Marín-Menéndez e colaboradores (2013), obtendo eritrócitos de

pacientes infectados por esta espécie, observou que a frequência de rosetas em pacientes anêmicos era maior que nos não anêmicos, que o hematócrito e a hemoglobina eram inversamente proporcionais ao nível de rosetas e que o modelo de regressão utilizado selecionou somente a anemia como associado à roseta, excluindo outras manifestações da malária grave.

Apesar destes estudos, os mecanismos pelos quais o parasito leva à formação de rosetas e como esse processo poderia contribuir para a anemia vivax ainda não são elucidados. Recentemente Uyoga e colaboradores (2012) verificaram, *in vitro*, que a 4-hidroxinonenal produto da peroxidação de lipídeos da biomembrana devido à presença da hemozoína difundiu de eritrócitos infectados para não infectados nas rosetas. Esta mudança na membrana dos eritrócitos poderia culminar na fagocitose dos mesmos pelos macrófagos. Desta forma eles propuseram que este poderia ser um dos mecanismos responsáveis pela destruição de eritrócitos não infectados nas infecções por *P. falciparum*, auxiliando na promoção da anemia.

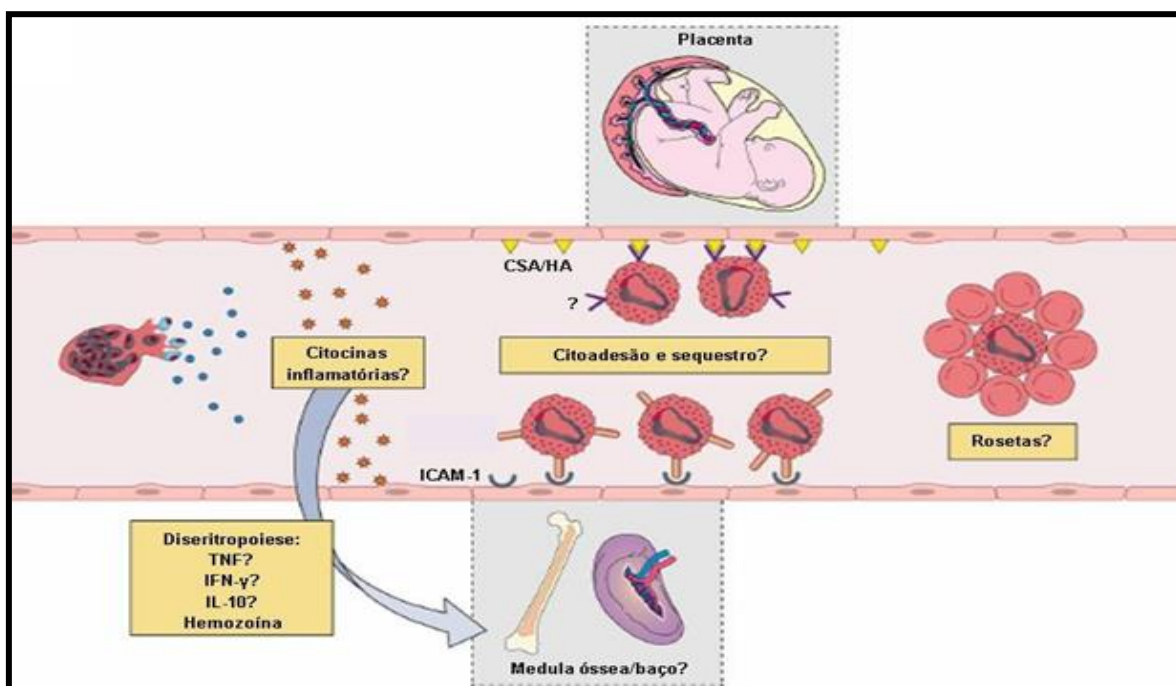


Figura 5. Anemia na malária vivax. Possíveis mecanismos imunológicos associados à destruição de eritrócitos infectados e não infectados. **Diseritropoiese:** A ruptura do eritrócito infectado leva à liberação do parasito e de seus metabólitos na corrente sanguínea. Estes metabólitos podem ser diretamente tóxicos para as células hematopoiéticas ou podem estimular a produção de citocinas inflamatórias, que também têm efeito tóxico para estas células. **Citoaderência:** Recentemente foi descoberta a capacidade do *P. vivax* de citoaderir, principalmente na microvasculatura da placenta, mas também no baço e na medula óssea, porém pouco se sabe sobre o papel deste mecanismo na anemia. **Formação de rosetas:** A formação de agregados de eritrócitos não infectados ao infectado pode levar à destruição destes, porém os mecanismos também não são conhecidos. **Fonte:** Adaptado de CASTRO-GOMES *et al.*, 2014.

1.5.2.4. Eritrofagocitose

A eritrofagocitose (fagocitose de eritrócitos) é um mecanismo de destruição dos eritrócitos portadores de alguma modificação e/ou dano na membrana celular. Sendo assim este mecanismo é essencial para a homeostase da população de eritrócitos e conseqüentemente do sangue, mantendo-o saudável através da remoção dos eritrócitos danificados da circulação sanguínea.

As principais células fagocíticas que atuam na eritrofagocitose são os macrófagos. Eles estão presentes na maioria dos tecidos do organismo e são considerados como as principais células de defesa, sendo essenciais para os seres humanos (NATHAN, 2008). Estas células, além do enorme papel na imunidade e na remoção dos eritrócitos não saudáveis da corrente sanguínea, são também, os principais encarregados pela remoção dos eritrócitos senescentes da circulação (KAY, 1975; revisado por LUTZ, 1987 e por BRATOSIN *et al.*, 1998). Como os eritrócitos são as únicas células anucleadas do organismo humano, elas apresentam uma longevidade de aproximadamente 120 dias (revisado por BERLIN & BERK, 1975). Também pela falta do núcleo, elas não são capazes de entrar em apoptose (morte celular programada), pois não produzem novas proteínas. Sendo relevante a quantidade destas células no sangue (cerca de $4,5$ a $6,0 \times 10^6/\text{mm}^3$), uma enorme biomassa de eritrócitos senescentes precisa ser removida da circulação diariamente e foi estimado que a eritrofagocitose contribui para a remoção de 80% destes eritrócitos (GARBY, 1959). Isto leva a destruição de aproximadamente 2×10^{11} eritrócitos, por dia, pelos macrófagos (hemólise extravascular), reciclando quase 3 Kg de Fe^{2+} por ano, ocorrendo principalmente no baço (ARESE & FLORA, 1991, revisado por MOSSER & EDWARDS, 2008).

A eritrofagocitose é dependente de modificações na superfície dos eritrócitos, pois assim os macrófagos passam a reconhecer essas células como “não próprias”. Além disso, essas modificações precisam ser promovidas por agentes externos ou por mudanças em proteínas existentes, já que essas células são incapazes de sintetizarem novas proteínas. Assim o reconhecimento destas pelos macrófagos ocorre de forma específica, através de interações receptores-ligantes. Tendo em vista que os macrófagos possuem diversos receptores expressos na membrana plasmática, incluindo receptores para citocinas pró-inflamatórias, proteínas do complemento e imunoglobulinas, diversos estudos foram realizados no intuito de verificar possíveis modificações nas membranas dos eritrócitos senescentes que culminassem na

ligação destes com os receptores dos macrófagos. As modificações propostas serão discutidas mais adiante (revisado por BACK *et al.*, 2014).

Durante as infecções maláricas, a eritrofagocitose é aumentada e atua na remoção dos eritrócitos infectados de forma a combater o parasito. Diversos estudos já observaram a presença destes eritrócitos em macrófagos do baço, fígado, medula óssea (relatado no tópico de diseritropoiese) e até mesmo dos monócitos circulantes de pacientes infectados (TALIAFERRO & MULLIGAN, 1937; PONGPORATN *et al.*, 1987; HO & WEBSTER, 1989; KLEIN & RONES, 2012). Alguns estudos já analisaram a fagocitose dos eritrócitos infectados por *P. falciparum in vitro* (CELADA *et al.*, 1982; YUTHAVONG *et al.*, 1988; TURRINI *et al.*, 1992) e outros averiguaram a sensibilidade e eficácia destes ensaios (GALLO *et al.*, 2012; CELADA *et al.*, 1983). Além disso, um trabalho avaliou a maturação do fagossomo e a degradação dos eritrócitos parasitados por *P. falciparum* nos macrófagos, observando uma eficiência nesse processo (BETTIOL *et al.*, 2010) e alguns descobriram ainda um tropismo por fagocitose de eritrócitos contendo formas maduras do parasito, associando-a à proteção do hospedeiro (TURRINI *et al.*, 1992; GALLO *et al.*, 2012). O que se verifica nos eritrócitos infectados por *P. falciparum* é uma enorme similaridade com as modificações de membrana observadas nas células senescentes, resultando na fagocitose de ambas.

Uma destas modificações envolve a exposição da fosfatidilserina (*Phosphatidylserine [PS]*), que é um fosfolípídeo localizado na camada interna da bicamada lipídica constituinte da membrana celular, e que, quando exposto leva ao reconhecimento dessa molécula pelos macrófagos (SCHROIT *et al.*, 1984). Este mecanismo também é chamado de eriptose, sendo análogo a apoptose (LANG *et al.*, 2005; FOLLER *et al.*, 2008). Ele é corroborado para células senescentes por estudos que demonstraram uma maior expressão de PS na superfície da membrana dos eritrócitos mais velhos se comparado aos mais novos (BRATOSIN *et al.*, 1997; BOAS *et al.*, 1998) e identificaram alguns receptores para PS na membrana dos macrófagos, como Tim4 e Stabilin-2 (KOBAYASHI *et al.*, 2007; revisado por BACK *et al.*, 2014). Nos eritrócitos infectados também já foram observadas a exposição de PS na membrana (FACER & AGIOSTRATIDOU, 1994; SHERMAN, 1997; ADA & SHERMAN, 2002; PATTANAPANYASAT *et al.*, 2010), apesar de existirem trabalhos com dados controversos (TAVERNE *et al.*, 1995; MOLL *et al.*, 1990).

Outro mecanismo compreende a expressão da proteína CD47 na membrana dos eritrócitos, pois estas, ao se ligarem ao imunoreceptor de sinal regulador da proteína α (*Signal Immunoreceptor Regulatory Protein Alpha [SIRP- α]*) presente na membrana celular dos macrófagos inibem a fagocitose do mesmo, sendo excelente marcador de “próprio” (OLDENBORG *et al.*, 2000; SEKIGAMI *et al.*, 2006). Redução na expressão de CD47 em células mais velhas também foi observada em modelos murinos, corroborando a importância desse mecanismo (FOSSATI-JIMACK *et al.*, 2002; ANNISS & SPARROW, 2002; KHANDELWAL *et al.*, 2007; revisado por MATOZAKI *et al.*, 2009). Alguns trabalhos neste âmbito já foram realizados com *P. falciparum*, mas nenhum deles obteve resultados que corroborassem este mecanismo (CHAMBERS *et al.*, 2002; AYI *et al.*, 2009; HEMPEL *et al.*, 2014).

Em contrapartida, a principal alteração da membrana dos eritrócitos senescentes parece ser devida à deposição de anticorpos, principalmente das imunoglobulinas Gs (IgGs), marcando-as para a fagocitose, já que os macrófagos possuem receptores Fc que reconhecem e se ligam à porção Fc das imunoglobulinas. Nestas células a deposição de IgGs na membrana já foi bem relatada, assim como o aumento da eritrofagocitose dos eritrócitos velhos opsonizados, sendo que as IgGs mais encontradas são as anti-banda 3 (KAY, 1981; 1983). Diversos estudos demonstraram que nos eritrócitos mais velhos muitas proteínas banda 3, que são proteínas de membrana do eritrócito (LOW, 1986; ZHANG *et al.*, 2000), aparecem em forma de agrupamento (*Clustering*) e que isto ocorre principalmente em função do estresse oxidativo decorrente do declínio da atividade metabólica nestes eritrócitos (LUTZ *et al.*, 1987). Estes agrupamentos da molécula original são modificações tais, que elas passam a ser alvo de ligações bivalentes de auto-anticorpos IgGs anti-banda 3 (*Natural occurring Antibodies [NAbs]*) levando a opsonização dos eritrócitos. Desta forma eles se tornam reconhecidos pelos macrófagos culminando na eritrofagocitose (KAY *et al.*, 1983; HORNIG & LUTZ, 2000; PANTALEO *et al.*, 2008). Nos eritrócitos infectados por *P. falciparum* também foram observados *clusterings* de banda 3 na membrana, ligação dos NAbs à esses *clusterings* e fagocitose destes pelos macrófagos (GIRIBALDI *et al.*, 2000).

Por todas estas evidências, durante muito tempo, a eritrofagocitose foi associada à proteção do hospedeiro resultando na destruição dos eritrócitos e dos parasitos em seu interior (observar que muitos trabalhos são bem antigos, demonstrando que este mecanismo já é bem elucidado para as células infectadas). Porém acredita-se que, apesar do papel protetor, a eritrofagocitose também participe na promoção da anemia e da malária grave para ambas as

infecções, através da remoção dos eritrócitos não infectados (LOOAREESUWAN *et al.*, 1991; EKVALL, 2003; DOUGLAS *et al.*, 2012; revisado por CASTRO-GOMES *et al.*, 2014). A eritrofagocitose destes eritrócitos já foi relatada diversas vezes (ABDALLA, 1988; LA RAJA, 2002), mas os mecanismos pelos quais o parasito leva a este fenômeno não são bem elucidados.

As maiores evidências provêm de trabalhos com eritrócitos opsonizados por IgGs. Obviamente, na malária, os anticorpos são associados à proteção do hospedeiro, principalmente contra a doença grave (COHEN & BUTCHER, 1971; SABCHAREON *et al.*, 1991), mas existem evidências de associações destes à patogenicidade, sendo que o papel protetor ou patogênico será determinado pelo nível de produção dos mesmos e suas funções efetoras. Já foi verificado, em alguns estudos, uma forte resposta das células B policlonais- principais células de produção de anticorpos- à antígenos do *P. falciparum* (PANUPHAK *et al.*, 1983) resultando em hipergamaglobulinemia (aumento de imunoglobulinas no sangue) (MCGREGOR *et al.*, 1956; ABELE *et al.*, 1965; DONATI *et al.*, 2006; KORIR; *et al.*, 2012).

De acordo com estudos conduzidos com *P. falciparum*, propõe-se que as IgGs podem se depositar na superfície da membrana dos eritrócitos não infectados através de duas principais modificações de membrana, culminando na eritrofagocitose:

- ➔ Ligação das IgGs aos antígenos do *P. falciparum* depositados na membrana dos eritrócitos não infectados (FACER *et al.*, 1979; FACER *et al.*, 1980; MENDIS *et al.*, 1988; STERKERS *et al.*, 2007; AWAH *et al.*, 2009; AWAH *et al.*, 2011).
- ➔ Ligações das IgGs à modificações de moléculas de membrana dos eritrócitos não infectados, como por exemplo a Banda 3 (GIRIBALDI *et al.*, 2000; LUGINBÜHL *et al.*, 2007).

A maioria dos trabalhos a respeito da eritrofagocitose e do papel das IgGs como contribuidoras para este processo foram conduzidos com *P. falciparum* como descritos acima e por isso o conhecimento deste mecanismo para *P. vivax*, assim como evidências deste processo são ínfimos na literatura. Sendo assim, o objetivo principal desta dissertação é elucidar o papel das IgGs presentes no soro de pacientes anêmicos e não anêmicos infectados por *P. vivax* na indução da eritrofagocitose *in vitro*. Nossa hipótese é que a ligação das IgGs presentes nos soros dos pacientes infectados por *P. vivax* (tanto das direcionadas à antígenos do parasito, quanto das NAbs) às membranas dos eritrócitos não infectados e consequente

opsonização dessas células, resulta na remoção das mesmas por fagocitose, através dos macrófagos do baço, contribuindo para a anemia (Figura 6).

1.5.2.5. Lise periférica mediada pelo Sistema do Complemento

Da mesma forma que as IgGs podem se depositar na membrana dos eritrócitos não infectados e marcá-los para destruição pelos macrófagos elas também podem ativar o sistema do complemento culminando na lise intravascular desses eritrócitos, sendo que esses dois processos não se excluem e podem ocorrer em conjunto. Esse modelo também é observado em infecções por *P. falciparum* e proposto para *P. vivax* (STOUTE *et al.*, 2003).

O sistema do complemento é o componente central da resposta imune inata, contando com uma rede complexa de mais de trinta proteínas associadas à membrana ou de fase fluída circulantes no plasma. Ele é capaz de induzir uma resposta imune inflamatória e citolítica altamente eficiente e muito bem regulada para a destruição de células marcadas como “não próprias”, através de uma cascata de sinalização proteolítica hierárquica (WALPORT, 2001). Existem três principais vias de ativação do sistema do complemento, todas elas convergindo para a clivagem da proteína C3, resultando na ativação de produtos efetores como C3a, C5a, C3b e (C5b-C9), sendo que a via denominada Clássica é dependente de imunoglobulinas (revisado por SILVER *et al.*, 2010).

Este sistema, quando ativado em excesso pode resultar em doenças, já que é altamente eficiente na destruição celular. Por isso ele necessita de reguladores igualmente eficazes, a fim de impedir dano tecidual. A regulação se dá, então, através de inibidores que atuam na produção dos efetores e entre eles estão as serino proteases Fator 1 e seus cofatores, incluindo o receptor de complemento 1 (*Complement Receptor 1 [CR1]*, também chamado de CD35) e os Fatores de Aceleração do Decaimento (*Decay Accelerating Factor [DAF]*), incluindo a CD55. Todas essas proteínas se localizam na membrana dos eritrócitos do hospedeiro, assim como em outras células (SJÖBERG *et al.*, 2009; DUNKELBERGER & SONG, 2010; revisto por SILVER *et al.*, 2010).

O que a literatura dispõe sobre a anemia em infecções por *P. falciparum* associada ao sistema do complemento, já que não há nada descrito para *P. vivax*, é que as proteínas reguladoras do complemento CR1, CD55 possam contribuir para a patofisiologia da anemia. Diversos estudos, conduzidos em pacientes anêmicos infectados de áreas endêmicas,

analisaram o perfil de expressão desses receptores e observaram que os níveis de CR1 e CD55 estavam reduzidos (WAITUMBI *et al.*, 2000, STOUTE *et al.*, 2003; WAITUMBI *et al.*, 2004) e alguns observaram que após o tratamento eles retornavam ao normal na membrana. Eles propuseram, então, que com a habilidade de regulação do sistema do complemento reduzida, a excessiva ativação do mesmo levaria a um aumento da deposição de C3b (principal agente opsonizador), na membrana dos eritrócitos infectados ou não, levando à sua lise mediada pelo sistema do complemento.

Além disso, a deposição de C3b na membrana dos eritrócitos somada à deposição de imunocomplexos de IgGs podem culminar na hemólise do eritrócito de forma mais eficiente, já que a IgG ativa a via Clássica do sistema do complemento, contribuindo para a excessiva ativação deste sistema (MAHAJAN *et al.*, 2011; GWAMAKA *et al.*, 2011; STOUTE *et al.*, 2003; LUTZ *et al.*, 1993; KAY, 2005; DINKLA *et al.*, 2012). Owuor e colaboradores (2008) mediram *in vitro* a deposição de C3b em eritrócitos de pacientes anêmicos e não anêmicos infectados e observaram uma maior deposição dessa proteína nos anêmicos, assim como no trabalho de Odhiambo e colaboradores (2010).

Estes dados mostram, em conjunto, que deficiências nas proteínas regulatórias do sistema do complemento nos eritrócitos não infectados pode aumentar a sensibilidade dos mesmos à lise pelo sistema do complemento, através, principalmente da deposição de C3b e de IgGs na membrana deles e este mesmo mecanismo foi proposto para infecções por *P. vivax* (Figura 6).

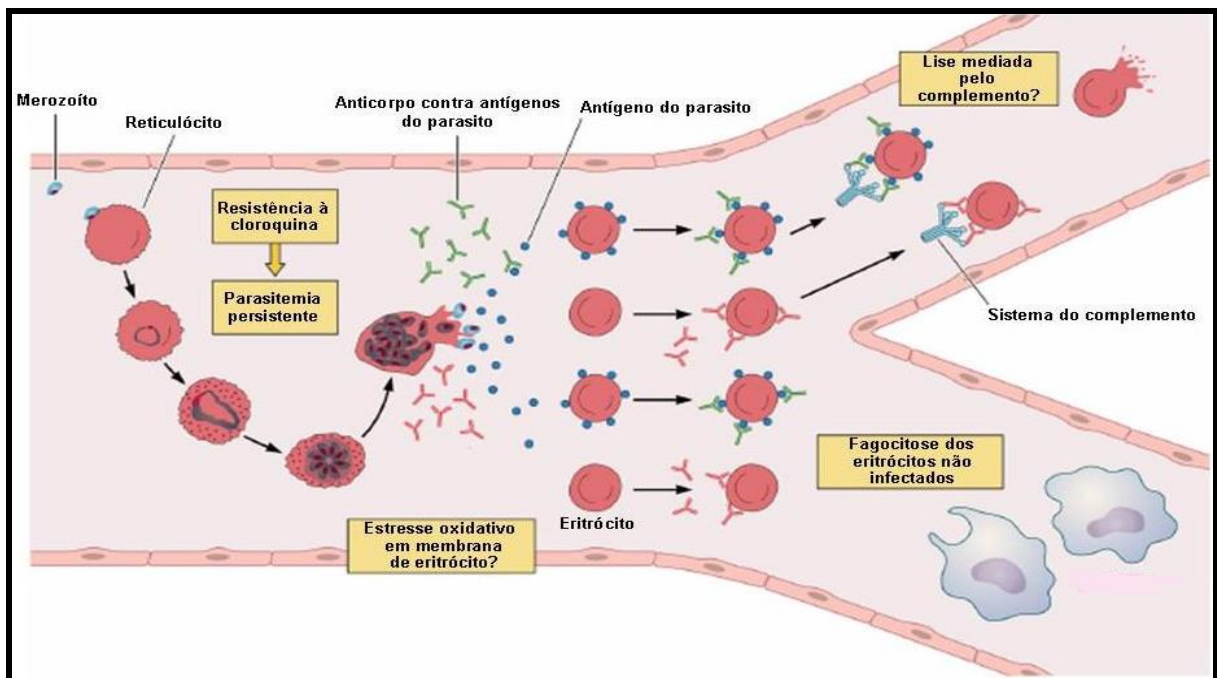


Figura 6. Anemia na malária vivax. Possíveis mecanismos imunológicos associados à destruição de eritrócitos infectados e não infectados. A ruptura do eritrócito infectado leva a liberação do parasito, de seus antígenos e debris na corrente sanguínea. Esses antígenos e debris podem se depositar na membrana dos eritrócitos não infectados ou produzir, indiretamente, mudanças nas moléculas destes eritrócitos, levando à opsonização do eritrócito não infectado e culminando na fagocitose por macrófagos do baço (**Eritrofagocitose**) ou na destruição pelo sistema do complemento (**Lise mediada pelo sistema do complemento**) **Fonte:** Adaptado de CASTRO-GOMES *et al.*, 2014.

Explicitados os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos na anemia, conclui-se que a resposta imune do hospedeiro desencadeada pela presença do parasito e de seus metabólitos na corrente sanguínea certamente tem papel fundamental para o desencadeamento de processos anêmicos graves e para o desenvolvimento de síndromes fatais em determinados indivíduos, necessitando de mais investigações a fim de se prevenir ou tratar essa enfermidade. Nesta dissertação, foi avaliado o papel do mecanismo de eritrofagocitose na remoção dos eritrócitos não infectados, opsonizados com IgGs e sua contribuição para a anemia nas infecções por *P. vivax*, com o cuidado necessário de eliminação das proteínas do sistema do complemento do soro dos pacientes, a fim de verificar a influência unicamente das IgGs na eritrofagocitose.

1.6. Relações entre os grupos sanguíneos do Sistema ABO e a malária

O sistema ABO é um sistema de grupo sanguíneo que compreende três antígenos (antígeno A, B e H) produzidos a partir da expressão de genes alelos do mesmo locus gênico do cromossomo 9. Este sistema é composto por cinco principais alelos: os alelos H/h determinam a produção do antígeno H composto pela seguinte sequência de carboidratos N-acetilgalactosamina, D-galactose, N-acetilglicosamina, D-galactose, que é a base para a produção dos antígenos A e B; os alelos A e B apresentam co-dominância e determinam a adição de uma L-fucose à maioria dos antígenos H ou de uma D-galactose aos mesmos, produzindo assim muitos antígenos A ou B respectivamente. Já o alelo O apresenta recessividade nas heranças genéticas e determina a não produção de antígenos A e B. Os fenótipos resultantes são A, B, AB e O, onde o indivíduo do grupo sanguíneo A apresenta antígenos A e H na membrana dos eritrócitos e anticorpos anti-B no soro, o indivíduo do tipo B apresenta antígenos B e H na membrana dos eritrócitos e anticorpos anti-A no soro, o AB apresenta os antígenos A, B e H e nenhum desses anticorpos e o O apresenta somente antígenos H e ambos os anticorpos (revisto por STORRY & OLSSON, 2009). Sabe-se também que o alelo O é idêntico ao alelo A até o nucleotídeo 261, onde houve a deleção de uma Guanina, resultando na formação de um códon de parada. Essa mutação impossibilitou a produção de enzimas transferases funcionais e por isso resultou na não produção do antígeno A, desta forma acredita-se que o grupo sanguíneo O é uma mutação do A originada em um único ponto na evolução humana (DANIELS & REID, 2010; HOSOI, 2008; ROUBINET *et al.*, 2004).

Os grupos sanguíneos A, B e O foram descobertos em 1900 por Karl Landsteiner e em 1902, DesCasterllo & Sturli descreveram o tipo AB. Este sistema é o mais importante clinicamente dentre os 30 sistemas de grupos sanguíneos já descobertos, pois apresenta uma grande potencialidade imunogênica e em casos de transfusão sanguínea incompatível pode resultar na morte do paciente.

A relação entre o sistema ABO e a malária foi descrita pela primeira vez há mais de 40 anos e existem fortes evidências de que a malária modelou a distribuição dos alelos do grupo ABO nos humanos. Cserti & Dzik discutem na revisão (2007) que como o grupo sanguíneo O é distribuído em todo o mundo, a mutação no alelo A provavelmente surgiu antes da migração da nossa espécie para fora da África e que o *P. falciparum* estabilizou-se na África no mesmo

período da origem dos *Homo sapiens*. Eles revisaram a distribuição dos grupos sanguíneos em algumas localidades e verificaram que nas áreas que já foram, ou ainda são endêmicas para *P. falciparum* existe uma enorme prevalência do grupo sanguíneo O e em contraste, o grupo sanguíneo A foi majoritariamente distribuído em regiões frias, onde não são relatados muitos casos de malária. Na região Amazônica, onde essa espécie já foi considerada endêmica verifica-se 90% de prevalência do grupo O (ATHREYA & CORELL, 1967).

Vários trabalhos foram realizados no intuito de elucidar a relação entre os grupos sanguíneos A, B e O e a suscetibilidade à malária falciparum (MARTIN *et al.*, 1979; KASSIM & EJEZIE, 1982; AKINBOYE & OGUNRINADE, 1987; PANT *et al.*, 1992; PANT *et al.*, 1992; PANT *et al.*, 1998; NABIAS *et al.*, 2000; UNEKE *et al.*, 2006) sendo que alguns incluíram o *P. vivax* (MONTROYA *et al.*, 1994; BEIGUELMAN *et al.*, 2003; GUPTE *et al.*, 2012). Muitos resultados foram contraditórios devido, principalmente, ao tamanho da população amostral, já que em estudos deste tipo, para a observação de pequenos efeitos, é necessário um grande número de pacientes, e também a falta de grupos controles. Porém, quatro desses trabalhos associaram o grupo ABO com a gravidade da malária, sendo então, um melhor marcador de suscetibilidade do que a prevalência ou incidência da parasitemia. Todos estes quatro estudos concluíram que o grupo sanguíneo A foi mais associado à gravidade (FISCHER & BOONE, 1998; LELL *et al.*, 1999; LOSCERTALES, 2006; PATHIRANA *et al.*, 2005). Como estes trabalhos propuseram que o grupo sanguíneo O confere resistência à malária, o A é mais suscetível e o B possui um efeito intermediário, a pressão seletiva da malária derivada da antiga coevolução do *P. falciparum* com o *H. sapiens* foi considerada consistente com a distribuição mundial do sistema ABO, porém esses autores não excluem a existência de outros fatores seletivos.

Os trabalhos encontrados na literatura para explicar os possíveis mecanismos da pressão seletiva em favor do grupo O e contra o grupo A foram realizados analisando a formação de rosetas e a citoadesão. Eles verificaram que a formação de rosetas, tanto em relação ao tamanho (quantidade de eritrócitos não infectados aderidos), quanto ao número, foi bem maior em indivíduos dos grupos não-O (WOMAS *et al.*, 2012; SILVA & MOTA, 2015). Já a citoadesão mediada por antígenos do sistema sanguíneo Von Willebrand, que são expressos em menores níveis nos eritrócitos do grupo O, é aumentada nos indivíduos também dos grupos não-O (GOEL *et al.*, 2015). Além disso, dois grandes estudos de associação genômica (*genome wide association studies [GWAS]*) confirmaram a associação entre malária grave e haplotipos não-O (FRY *et al.*, 2008; TIMMANN *et al.*, 2012). Todos estes estudos

foram conduzidos com *P. falciparum*, que apresenta a malária cerebral como principal evolução da doença, a qual é causada principalmente pela citoadesão e formação de rosetas, levando a obstrução da microvasculatura neste órgão.

Em relação à gravidade da doença causada por infecções por *P. vivax* e os grupos sanguíneos, o único trabalho da literatura foi realizado para analisar a formação de rosetas (LEE *et al.*, 2014) e não encontrou relação com o sistema ABO. Sabendo-se que durante essas infecções a anemia é a principal causa da morbidade e mortalidade, um dos objetivos desta dissertação é analisar a influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na eritrofagocitose e conseqüentemente na anemia vivax.

2- JUSTIFICATIVA

Apesar de antiga e muito estudada, a malária ainda é responsável por elevada morbidade e mortalidade, principalmente em áreas tropicais e subtropicais do mundo, onde é endêmica. Estima-se que mais de 3 bilhões de pessoas residam em áreas onde existe o risco de contraí-la. Esse número é bastante elevado e equivale a quase um terço da população mundial. No ano de 2015, estimou-se em 214 milhões o número de casos de malária, os quais provocaram 438 mil óbitos no mundo, mostrando que a malária ainda é uma doença preocupante dado o seu fardo (WHO, 2015).

A maioria dos óbitos registrados ocorre na África e são causados, principalmente por *P. falciparum*, que é a espécie mais letal dentre os plasmódios, e, por isso, a mais estudada. Já *P. vivax*, embora seja considerada menos virulenta que *P. falciparum*, é a espécie mais distribuída no mundo (GUERRA *et al.*, 2010). Recentemente, diferentes estudos têm relatado a ocorrência de casos graves de malária vivax em diversos países endêmicos, podendo, inclusive, levar ao óbito, o que mostra que a malária vivax não é tão benigna como anteriormente se pensava (KOCHAR *et al.*, 2005; ANSTEY *et al.*, 2007; ANSTEY *et al.*, 2009; KASLIWAL *et al.*, 2009). Como consequência desses relatos, um novo enfoque tem sido dado a essa espécie e, com isso, vários estudos têm sido desenvolvidos no intuito de gerar informações que norteiem o planejamento de estratégias de combate a essa importante enfermidade, porém o conhecimento sobre a espécie em questão ainda é escasso, principalmente no que se refere à patogênese. Como *P. vivax* possui algumas particularidades biológicas, dentre as quais o estágio evolutivo de hipnozoítos capazes de causar as recaídas tardias da doença e a rápida produção de gametócitos, que propicia uma transmissão precoce, o controle desta espécie é dificultado. Esses fatores somados aos recentes relatos de óbitos aumentam ainda mais a preocupação em relação a essa espécie.

No Brasil, *P. vivax* é a espécie responsável por aproximadamente 90% dos casos, e frequentes relatos de hospitalizações e óbitos por *P. vivax* têm ocorrido na Amazônia Legal (SANTOS-CIMINERA *et al.*, 2007; ALEXANDRE *et al.*, 2010). A anemia é a complicação mais frequente entre os casos graves de malária vivax no Brasil e no mundo e a principal causa de mortalidade nas crianças e nas gestantes (MURPHY & BREMAN, 2001; TJITRA *et al.*, 2008).

Apesar de sua enorme importância, a anemia na malária ainda é pouco estudada se comparada a outras áreas do conhecimento e, por isso, a sua etiologia ainda não é totalmente conhecida (CHANG *et al.*, 2004).

A principal causa desta complicação parece estar relacionada à remoção de uma grande biomassa de eritrócitos não infectados, já que *P. vivax* infecta reticulócitos, células que correspondem a aproximadamente 1% do total das células sanguíneas (KITCHEN *et al.*, 1938). Essa hipótese é corroborada por estudos que mostram que: o grau de anemia não se correlaciona à carga parasitária (DONDORP *et al.*, 1999); ocorre uma diminuição da vida-média de eritrócitos não parasitados durante a infecção (COLEMAN *et al.*, 1976; LOOAREESUWAN *et al.*, 1987); a anemia persiste por até 5 semanas após o tratamento (WOODRUFF *et al.*, 1979) e a destruição de 34 eritrócitos não infectados para cada um infectado (COLLINS *et al.*, 2003).

Diferentes mecanismos biológicos têm sido propostos para explicar a patofisiologia da remoção de eritrócitos saudáveis. A maioria deles envolve processos imunológicos e foi sugerida a partir de experimentos conduzidos com *P. falciparum* (revisto por CASTRO-GOMES *et al.*, 2014). Logo, quase não existem evidências no que se refere à *P. vivax*. Nesse sentido, a fagocitose de tais eritrócitos mediada por IgGs parece ser um componente importante da anemia. Assim, o estudo da eritrofagocitose, bem como a sua associação à anemia durante infecções por *P. vivax*, permitiram determinar o papel de imunoglobulinas G produzidas durante a infecção na remoção de eritrócitos não parasitados. Os resultados deste estudo ampliam a compreensão sobre a etiologia da anemia promovida pelo *P. vivax*, podendo auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle eficientes, através da produção de quimioterápicos eficazes para o tratamento dos enfermos e, até mesmo, vacinação adequada. Além disso, este estudo permitiu elucidar a influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO na eritrofagocitose e, com essas informações, será possível determinar o fenótipo capaz de modular a gravidade da infecção. É importante destacar que essas associações ainda não foram estudadas em infecções por *P. vivax* e ainda são um tema controverso na malária falciparum.

3- OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel dos anticorpos IgG na indução da eritrofagocitose e sua possível contribuição na anemia em infecções por *Plasmodium vivax*, assim como analisar a influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO nesse processo.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Padronizar os ensaios de eritrofagocitose *in vitro* utilizando células THP-1 e eritrócitos de doadores saudáveis opsonizados por anticorpos policlonais IgGs direcionados às proteínas de membrana dos eritrócitos;
- 2- Avaliar a relação entre a anemia nas infecções por *P. vivax* e as taxas de fagocitose de eritrócitos previamente sensibilizados por IgGs purificadas de soros de pacientes infectados com e sem anemia;
- 3- Analisar a influência do sistema ABO (grupos sanguíneos A, B e O) nas taxas de eritrofagocitose;
- 4- Avaliar a relação entre gravidade da infecção e as taxas de eritrofagocitose.

4- MATERIAL E MÉTODOS

Esta sessão da Dissertação será apresentada de acordo com cada objetivo específico explicitado acima.

Todo o estudo foi aprovado pelo Sistema Nacional de Informação Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (SISNEP) através do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 01496013.8.0000.5149, recomendação 519.481. Além disso, todos os indivíduos incluídos neste estudo foram convidados a participar após receberem uma explicação oral do estudo pelo pesquisador/doutor, tendo assinado um termo de consentimento antes da coleta do sangue.

4.1. Objetivo específico 1: Padronização dos ensaios de eritrofagocitose *in vitro* utilizando células THP-1 e eritrócitos de doadores saudáveis opsonizados por anticorpos policlonais IgGs direcionados às proteínas de membrana dos eritrócitos

Para realização dos experimentos de eritrofagocitose *in vitro* utilizando células THP-1 e eritrócitos de doadores saudáveis, foi necessária a implementação e manejo do cultivo celular de células THP-1 no Laboratório de Malária do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Desta forma, foram realizados 11 experimentos até a obtenção de um ensaio de eritrofagocitose *in vitro* padrão.

4.1.1. Cultivo celular

As células THP-1 são monócitos comerciais imortalizados, derivados do sangue periférico de um menino com um ano de idade que possuía leucemia monocítica aguda e foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Aristóbolo Mendes da Silva, do Departamento de Biologia Celular do ICB, UFMG. Elas foram utilizadas por serem células com reconhecida

capacidade fagocítica possuindo o receptor Fc que proporciona a ligação de IgGs, justificando assim, sua ampla utilização em ensaios de eritrofagocitose *in vitro*.

Essas células foram mantidas em garrafas de 75cm² (*Corning Flask*, Corning Incorporation, Corning, NY, USA) em meio RPMI-1640 (Merck-Millipore, Bilerica, USA) contendo 300mg/L de L-Glutamina, 25mM de HEPES e suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino inativado a 56°C por 1 hora (*Fetal Bovine Serum [FBS]*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100u de penicilina, 0,1mg de estreptomicina e 0,25µg de anfotericina B por ml de meio (*Antibiotic Antimycotic Solution 100X Stabilised*, Sigma-Aldrich).

As garrafas permaneceram em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e as células foram repicadas a cada dois dias, mantendo-se uma quantidade de 3x10⁵ células/ml. A L-Glutamina (*L-Glutamine*, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Loughborough, UK), por ser um aminoácido rapidamente degradado, foi repostada a cada 15 dias no meio de cultura.

4.1.2. Ativação dos monócitos

As células TPH-1, por serem monócitos, necessitam de ativação para que se desenvolvam em macrófagos, com maior potencial fagocítico. Neste caso foi utilizado um éster de forbol (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate [PMA]*, Sigma-Aldrich) que é um excelente ativador de macrófagos, pois atravessa a membrana celular do monócito e se liga às proteínas quinases C (*Protein Kinase Cs [PKCs]*). Esta ligação ativa algumas vias de proteíno-quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases [MAPKs]*) que culminam na diferenciação celular através de produção de proteínas c-jun e c-fos (WEINSTEIN, 1985; NISHIZUKA, 1995).

Inicialmente, as células foram ressuspendidas para uma concentração final de 5x10⁵ células/ml e ativadas com 100nM de PMA em concentração de 1µl/ml de meio RPMI-1640, 72 horas antes do ensaio de eritrofagocitose. A suspensão de células foi então transferida para lâminas de cultivo com 4 poços (*Slide cell culture, 4 well*, Millicell- Thermo Fisher Scientific) sendo mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

Ao final das 72 horas, aproximadamente 80% dos monócitos foram ativados e para a confirmação da ativação, essas células foram submetidas à microscopia em microscópio invertido. Quando ativados por PMA, os macrófagos aumentam a capacidade de expansão e

aderência às superfícies, o tamanho celular, o número de vesículas pinocíticas e por fim a formação de pseudópodes que gera um formato ameboide nessas células (Figura 7A). Já os monócitos são cultivados em suspensão no meio celular, pequenos, bem arredondados e não formam pseudópodes (Figura 7B). Toda essa morfologia foi observada durante a microscopia segundo orientações estabelecidas por Shigeru e colaboradores (1982).

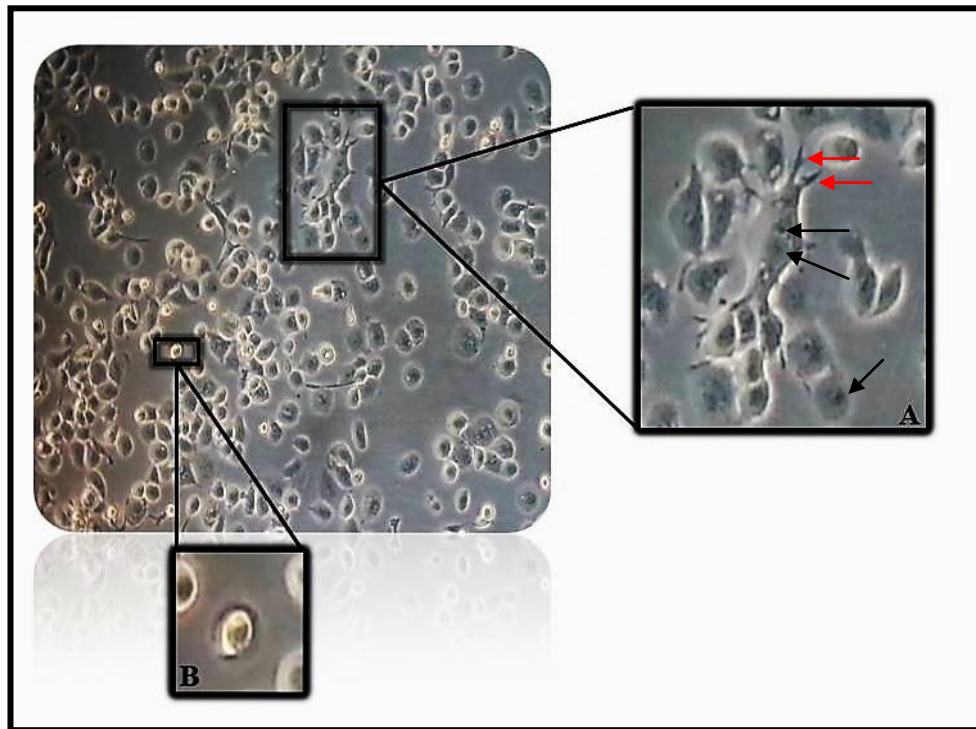


Figura 7. Avaliação das células THP-1, cultivadas no Laboratório de Malária do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em microscópio óptico invertido, após 72 horas de ativação com PMA. **A:** Macrófagos ativados. Verifica-se formato irregular, presença de vesículas (setas pretas), pseudópodes (setas vermelhas) e tamanho celular aumentado. **B:** Monócito. Verifica-se a morfologia arredondada, ausência de vesículas e pseudópodes.

4.1.3. Coleta e lavagem dos eritrócitos frescos não parasitados e saudáveis

Os eritrócitos saudáveis foram coletados de doadores voluntários, sempre no dia do experimento de eritrofagocitose, a fim de evitar que o armazenamento e congelamento danificasse a membrana destes, garantindo assim maior fidedignidade aos resultados.

Foram retirados 3 ml de sangue de cada doador através de punção venosa, utilizando tubos Vacutainer (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) contendo o anticoagulante heparina sódica. Esse conteúdo foi adicionado a um tubo de 15 ml (Falcon 2074, BD Biosciences) e centrifugado a 200g por 10 minutos à temperatura ambiente, para a remoção do plasma, no intuito de remover componentes celulares que poderiam influenciar nos experimentos. Após a centrifugação, os eritrócitos foram lavados com tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline [PBS]*, pH 7.4, NaCl 150 mM) em uma proporção de 5:1 ml de sangue e novamente centrifugados a 200 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram realizadas três lavagens e em seguida os eritrócitos foram contados na câmara de Neubauer (Vieira, 2000) (Prolab, São Paulo, BR) e ressuspensos para 5×10^6 células/ml em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, GER) contendo PBS.

4.1.4. Caracterização hematológica do doador de eritrócitos O+

Eritrócitos de um único doador saudável foram utilizados para os 11 experimentos. Trata-se de um indivíduo do gênero feminino, do tipo sanguíneo O⁺, residente em Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), área considerada não endêmica para a doença que possuía 32 anos de idade no momento das coletas. Além disso, o indivíduo relatou que nunca teve caso confirmado por malária anteriormente e os exames laboratoriais de gota espessa e PCR descartaram infecções recentes por *Plasmodium*.

O resultado do hemograma do doador indicou que todos os parâmetros avaliados estavam dentro dos índices de normalidade, excluindo-se assim, qualquer tipo de anemia. Para o presente estudo foi utilizada a definição de anemia como $Hb \leq 11.0$ g/dL de sangue para os pacientes sem infecção ou com infecção não grave por *P. vivax*, independente do sexo ou idade. Para os pacientes com malária grave foi adotada a definição segundo a OMS, como já

foi descrita. A eletroforese de hemoglobina excluiu possíveis doenças associadas à hemoglobinas e talassemias (Quadro 3).

Quadro 3. Dados hematológicos do doador de eritrócitos saudáveis do tipo O+ utilizados nos ensaios de padronização dos testes de eritrofagocitose *in vitro*.

Hemograma		Valores de referência (Adultos)*
Eritrócitos	4.600.000 Células/mm ³ sangue	3.800.000 a 5.800.000
Hemoglobina	14,6 g/dL	12,5 a 16,5
Hematócrito	43,4 %	37,0 a 47,0
Volume Corpuscular Médio (VCM)	94,3 fl	80,0 a 96,0
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	31,8 pg	28,0 a 33,0
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	33,7 g/dL	32,0 a 36,0
Red Cell Distribution Width (RDW)	12,0 %	11,3 a 15,3
Leucócitos	8.100 Células/mm ³ sangue	3.800 a 10.000
Plaquetas	227.000 Células/mm ³ sangue	150.000 a 450.000

*Valores de referência de acordo com o Laboratório Hermes Pardini

4.1.5. Ensaio de opsonização dos eritrócitos não infectados

Aos eritrócitos já lavados, foi adicionado o anticorpo comercial policlonal α -eritrócitos humanos (α -Red Blood Cells [α -RBCs], antibodiesonline.com) em concentração final de 2%. Este anticorpo foi produzido em coelhos e por serem policlonais se ligam a diversas proteínas de membrana dos eritrócitos humanos. Em outro tubo foi adicionado somente PBS aos eritrócitos constituindo assim, o controle negativo do experimento. Os eritrócitos foram incubados por 1h a 37°C em agitador e após esse tempo eles foram lavados com PBS, centrifugados a 200 g por 10 min à temperatura ambiente para remoção dos anticorpos não ligantes e ressuspensos em meio RPMI-1640 completo para subsequente ensaio de eritrofagocitose.

4.1.6. Ensaio de eritrofagocitose

Os eritrócitos opsonizados com cada um dos tratamentos e ressuspensos em meio RPMI-1640, foram adicionados às células THP-1 previamente ativadas nas lâminas de cultivo e ficaram incubados em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 2 horas. Após este tempo cada lâmina foi lavada duas vezes com PBS e, para a lise dos eritrócitos não fagocitados foi

adicionado 1 ml de H₂O destilada gelada por 30 segundos. Após esse tempo foi realizada mais uma lavagem com PBS e a lâmina foi seca e fixada com metanol seguindo-se coloração com *Giemsa stain* (Merck-Millipore, Darmstadt, GER) por 25 minutos.

As lâminas fixadas e coradas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus CH30), no aumento de 100x, sob imersão em óleo, por dois microscopistas diferentes. Cada contagem baseou-se em um total de 400 macrófagos e a eritrofagocitose foi considerada quando eram observados eritrócitos no citoplasma do macrófago. Após uma extensa revisão da literatura foi observado que em todos os trabalhos de eritrofagocitose, medidos por microscopia óptica, não havia diferenciação entre eritrócitos ligados à membrana do macrófago e eritrócitos fagocitados, devido às limitações desta técnica, logo, no presente estudo esta diferença também não foi considerada.

A taxa de eritrofagocitose (TE) foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\text{TE} = \frac{\text{Número de macrófagos contendo eritrócitos fagocitados (Eritrofagocitose)}}{\text{Número total de macrófagos contados (400)}} \times 100$$

4.2. Objetivo específico 2: Avaliação da relação entre a anemia nas infecções por *P. vivax* e as taxas de fagocitose de eritrócitos previamente sensibilizados por IgGs purificadas de soros de pacientes com diferentes *status* clínicos

A principal hipótese testada no presente trabalho é de que IgGs dirigidas contra componentes de membrana de eritrócitos saudáveis podem funcionar como mediadoras da fagocitose de eritrócitos não infectados auxiliando no desencadeamento dos quadros de anemia frequentemente observados nas infecções por *P. vivax*. Com o intuito de avaliar se existe alguma relação entre a taxa de eritrofagocitose e a anemia, eritrócitos frescos de doadores voluntários, sem relato de infecção prévia por *Plasmodium sp.* e sem anemia, foram opsonizados com IgG purificadas dos soros de pacientes anêmicos e não anêmicos infectados por *P. vivax*, antes do ensaio de eritrofagocitose.

O material e métodos utilizados para alcançar estes objetivos são descritos a seguir e incluem a caracterização da população de estudo, a coleta dos soros e sua subsequente caracterização nos grupos de estudo, a purificação das IgGs dos soros de pacientes anêmicos e não anêmicos e a análise estatística. Para assegurar a reprodutibilidade dos experimentos, foram realizados cinco experimentos de eritrofagocitose em dias diferentes, com intervalo de uma semana entre os dias.

4.2.1. Área e população de estudo

Quatorze pacientes com infecção confirmada por *P. vivax* a partir do diagnóstico realizado por exame microscópico de gota espessa, e confirmado por PCR, para exclusão de infecções mistas e aquelas causadas por outras espécies de *Plasmodium* foram incluídos no estudo (SCOPEL *et al.*, 2004). Destes 14, sete eram do gênero feminino (50%) e sete do gênero masculino (50%), com idade oscilando entre 21 e 68 anos (média de 40,6 anos). Os pacientes foram selecionados dentre aqueles que procuraram atendimento médico em dois estados da Amazônia Brasileira, o Amazonas (AM) e o Mato Grosso (MT), no período entre Fevereiro de 2006 e Janeiro de 2008, como descrito anteriormente por nosso grupo (MOURÃO *et al.*, 2012) (Figura 8).



Figura 8: Mapa do Brasil evidenciando as áreas de estudo e os centros de referência de atendimento dos pacientes.

Dez (71,4%) pacientes deram entrada no Hospital Universitário Júlio Muller, em Cuiabá (MT) e foram avaliados clinicamente pelo Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes. Apesar de esta não ser uma região de transmissão intensa de malária, os pacientes relataram visitas de curto prazo a outras áreas endêmicas da Amazônia onde provavelmente se infectaram.

Quatro (28,6%) pacientes deram entrada na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM) que é referência para atenção terciária de doenças infecciosas no estado do Amazonas, tendo sido atendidos pela equipe do Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda. Estudos realizados nesse município revelaram que a malária tem caráter epidêmico na localidade e diversos casos de malária grave decorrentes de *P. vivax* já foram reportados (VENTURA *et al.*, 1999; LACERDA *et al.*, 2007; ALEXANDRE *et al.*, 2010; VENTURA *et al.*, 2010; LANÇA *et al.*, 2012).

Para todos os pacientes atendidos foi aplicado um questionário padrão, previamente testado e elaborado, contendo informações sobre dados pessoais, clínicos, parasitológicos e epidemiológicos (Anexo 1).

Quanto ao número de episódios prévios de malária, observou-se que esses pacientes relatavam poucas malárias prévias (Média \pm Desvio Padrão; $3,71 \pm 7,16$) sendo a maioria infecções por *P. vivax* (87,5%) e a idade da primeira malária oscilou entre 12 e 68 anos ($36,9 \pm 17,0$ anos). Durante a consulta médica, os pacientes infectados relataram diversas manifestações clínicas e as mais frequentes foram: febre (100%), calafrio (92,9%), cefaléia (92,9%), fraqueza (92,9%) e mialgia (92,9%). Também foram relatadas epigastralgia (85,7%), náusea (71,4%), tontura (71,4%) e vômito (64,4%), sendo que a duração da sintomatologia durou cerca de uma semana (mediana de 7 dias) (Quadro 4).

Quadro 4. Manifestações clínicas relatadas pelos 14 pacientes incluídos no estudo, no momento do atendimento médico.

Manifestações Clínicas		
Sintomas	Número de Casos (n=14)	
	N	%
Febre	14	100
Cefaléia	13	92,9
Calafrio	13	92,9
Mialgia	13	92,9
Fraqueza	13	92,9
Epigastralgia	12	85,7
Náusea	10	71,4
Tontura	10	71,4
Vômito	9	64,4
Tempo de Sintomatologia (Dias)	(Mediana)	(Intervalo Interquartil)
	7,0	5,0 - 9,0

Todos os pacientes que apresentaram malária foram tratados de acordo com a política nacional de tratamento da malária no Brasil, conforme preconizado no Guia prático de tratamento da malária no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

4.2.2. Coleta dos soros e caracterização hematológica dos pacientes

O sangue dos pacientes foi coletado através de punção venosa, em tubos Vacutainer (BD Biosciences) contendo anticoagulante heparina, para o exame microscópico, extração de DNA, avaliação do hemograma completo. Após a coleta, o sangue ele foi centrifugado a 200g por 10 minutos à temperatura ambiente e o soro foi removido e distribuído em alíquotas.

Os resultados dos exames laboratoriais realizados - gota espessa e hemograma - revelaram média de dosagem de hemoglobina de $12,0 \pm 1,8$ g/dL e média de hematócrito de $35,8 \pm 5,2\%$. Em relação às plaquetas, foi observada uma média de 87.500 ± 48.543 células/mm³ de sangue e leucócitos uma média 6.037 ± 1.412 células/mm³ de sangue. A parasitemia foi determinada a partir do exame de 100 campos microscópicos, com um aumento de 1000x (10x na lente ocular e 100x na lente objetiva) sob imersão em óleo revelando um valor médio de 4.754 ± 3.786 parasitos/ μ L de sangue (Quadro 5).

Quadro 5. Valores médios obtidos nos exames laboratoriais realizados a partir do sangue dos 14 indivíduos incluídos neste estudo.

Exames Laboratoriais	Média ± Desvio Padrão	Valores de referência (Adultos)*
Parasitemia (Parasitos/ μ L sangue)	4.754 \pm 3.786	-
Hemoglobina (g/dL)	12,0 \pm 1,8	12,5 a 16,5
Hematócrito (%)	35,8 \pm 5,2	37,0 a 47,0
Plaquetas (Células/ mm^3 sangue)	87.500 \pm 48.543	150.000 a 450.000
Leucócitos (Células/ mm^3 sangue)	6.037 \pm 1.412	3.800 a 10.000

*Valores de referência de acordo com o Laboratório Hermes Pardini

4.2.3. Caracterização dos grupos de pacientes e preparação dos *Pools* de soros

A partir dos resultados dos hemogramas, os 14 indivíduos infectados por *P. vivax* incluídos neste estudo foram divididos em dois grupos de acordo com a ausência ou presença da anemia e cada grupo contou com sete indivíduos (n=7). O primeiro grupo, intitulado de “Anêmico” foi composto de 5 (71,4%) indivíduos do gênero feminino e 2 (28,6%) do gênero masculino e o segundo grupo intitulado de “Não anêmico” por 2 mulheres e 5 homens. A média das idades foi a mesma para os dois grupos (40,6 anos) e a média da parasitemia foi bem similar conforme pode se verificar no Quadro 6.

Quadro 6. Comparação entre os grupos de pacientes anêmicos e não anêmicos infectados por *P. vivax*.

Características Epidemiológicas e Exames Laboratoriais dos grupos de pacientes infectados por <i>P. vivax</i>	Anêmico (Hb ≤ 11g/dL)	Não anêmico (Hb > 11g/dL)
Número de pacientes (n)	7	7
Gênero Masculino (n/ %)	2/ 28,6	5/ 71,4
Gênero Feminino (n/ %)	5/ 71,4	2/ 28,6
Idade (Média ± Desvio Padrão)	40,6 ± 18,0	40,6 ± 13,3
Parasitemia (Média ± Desvio Padrão)	4704 ± 3904 (Parasitas/μL sangue)	4804 ± 3976 (Parasitas/μL sangue)
Hemoglobina (Média ± Desvio Padrão) *	10,5 ± 0,4(g/dL)	13,57 ± 1,2 (g/dL)
Hematócrito (Média ± Desvio Padrão) *	31,9 ± 1,6 (%)	39,6 ± 4,5 (%)
Plaquetas (Média ± Desvio Padrão)	104.857 ± 61.556 (Células/mm ³ sangue)	70.147 ± 24.768 (Células/mm ³ sangue)
Leucócitos (Média ± Desvio Padrão)	6274 ± 1327 (Células/mm ³ sangue)	5800 ± 1558 (Células/mm ³ sangue)

*Diferença significativa entre os grupos (Hemoglobina P=0,0004; Hematócrito P=0.0097)

Como esperado e com base no critério de definição dos grupos, os valores de hemoglobina e hematócrito diferiram estatisticamente entre os grupos, sendo a média e o desvio padrão 10,5 ± 0,4 (g/dL) para o grupo anêmico e 13,57 ± 1,2 (g/dL) para o grupo não anêmico.

Os pacientes anêmicos foram classificados em anêmicos normocíticos e normocrômicos de acordo com os valores de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e de Volume Corpuscular Médio (VMC).

A sintomatologia clínica relatada pelos pacientes durante o atendimento médico e a duração da sintomatologia, não apresentaram grandes variações entre os dois grupos, exceto para os relatos de náusea, tontura e vômitos (Quadro 7).

Quadro 7. Sintomatologia clínica relatada pelos pacientes infectados por *P. vivax* anêmicos e não anêmicos

Sintomatologia clínica	Anêmico		Não anêmico	
	N	(%)	N	(%)
Febre	7	(100%)	7	(100%)
Calafrio	6	(85,7%)	7	(100%)
Cefaléia	7	(100%)	6	(85,7%)
Mialgia	6	(85,7%)	7	(100%)
Epigastria	6	(85,7%)	6	(85,7%)
Tontura	4	(57,1%)	6	(85,7%)
Náusea	6	(85,7%)	4	(57,1%)
Vômito	6	(85,7%)	3	(42,8%)
Fraqueza	6	(85,7%)	7	(100%)
Tempo de sintomatologia				
(Mediana)	(6,0)		(7,0)	
(Intervalo Interquartil)	4,8-10,3		6,0-10,0	

Dois *pools* de soros, um constituído pelos 7 soros dos indivíduos anêmicos e outro pelos 7 soros dos indivíduos não anêmicos foram preparados após a definição e categorização dos dois respectivos grupos de pacientes.

IgGs oriundas de um indivíduo saudável nunca exposto à malária e com todos os parâmetros hematológicos dentro da normalidade também foram utilizadas para opsonização de eritrócitos não infectados constituindo assim, um controle negativo nos ensaios de eritrofagocitose *in vitro*. Os *pools* de soros, bem como o soro do indivíduo controle saudável não infectado e não anêmico foram submetidos à purificação de IgGs conforme descrito a seguir.

4.2.4. Purificação de imunoglobulinas G (IgGs) dos soros dos pacientes

Para purificação das IgGs dos soros dos pacientes e eliminação de todos os outros componentes do plasma que poderiam interferir na eritrofagocitose como por exemplo, as proteínas do sistema do complemento, os soros foram primeiramente descongelados, centrifugados a 4°C, 3000g por 30 minutos. Em seguida o sobrenadante foi coletado e transferido para um béquer contendo uma barra magnética para homogeneização sob um homogeneizador magnético (Tecnal TE089).

Depois de homogeneizadas, as IgGs dos soros foram precipitadas com uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4°C, pH 7.4), adicionando gota a gota ao béquer para alcançar 50% de saturação do sulfato de amônio (50% v/v) e permaneceram incubadas com essa solução por 18 horas a 4°C. Em sequência, as amostras foram transferidas para um microtubo cônico e centrifugadas a 3000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspendido para 50% do volume inicial em PBS e exaustivamente dialisado por 18 horas, ainda com PBS, a 4°C, sob agitação constante e submetido a três trocas do mesmo tampão durante este período de tempo.

Após a diálise, os anticorpos humanos IgG foram purificados por cromatografia de afinidade usando a coluna HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA). Para isto, a coluna foi lavada com dez volumes (10v) de solução de NaH_2PO_4 20 mM, pH 7,0 (*binding* buffer) antes de aplicar os soros dos pacientes na coluna. Após a lavagem inicial os soros foram aplicados e, em seguida, a coluna foi lavada novamente com 10v de *binding* buffer.

A concentração de IgGs foi estimada por leitura em espectrofotômetro (280 nm) e as frações que continham as IgGs purificadas foram, então, reunidas em um mesmo tubo e dialisadas contra PBS, utilizando-se as mesmas condições citadas anteriormente, para posterior divisão em alíquotas e congelamento à 20°C até a realização dos ensaios de opsonização.

4.2.5. Coleta dos eritrócitos O+

Foram coletados eritrócitos de um único doador saudável, para os cinco experimentos, da mesma forma descrita para os experimentos de padronização. Trata-se também do mesmo indivíduo e por isto seus dados hematológicos estão descritos no Quadro 3. A lavagem destes eritrócitos também seguiu conforme descrito anteriormente.

4.2.6. Oponização dos eritrócitos não infectados

Aos eritrócitos já lavados, foram adicionadas as IgGs purificadas em concentração de 1mg/ml ou anticorpos comerciais em concentração final de 2% por 1 hora, a 37°C sob agitação, constituindo, assim, os grupos experimentais/tratamentos descritos a seguir:

- IgGs do *pool* de soros de pacientes anêmicos infectados por *P.vivax* → Anêmico;
- IgGs do *pool* de soros de pacientes não anêmicos infectados por *P. vivax* → Não anêmico;
- IgGs do soro do indivíduo não infectado e não anêmico → Saudável;
- Anticorpo policlonal α -eritrócitos, como controle positivo do experimento → α -Eritrócito;
- Apenas PBS sem adição de quaisquer IgGs como controle negativo do experimento → Controle

Os experimentos de eritrofagocitose foram realizados como descrito anteriormente.

4.2.7. Análise estatística

Para a análise do efeito da oponização de eritrócitos não infectados por diferentes IgGs purificadas nas respectivas taxas de eritrofagocitose foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) verificando-se, assim, a existência de possíveis diferenças entre as médias das taxas de cada tratamento. Além disso, foi realizado o teste *pos hoc* de comparação Múltipla de Dunn (Dunn, 1974) que permitiu identificar as diferenças entre os tratamentos. Todas estas análises e gráficos foram realizados no programa *GRAPHPAD PRISM 6* (GraphPad Software, Inc., Califórnia, USA).

4.3. Objetivo específico 3: Análise da influência do sistema ABO (grupos sanguíneos A, B e O) nas taxas de eritrofagocitose

A fim de verificar se existe alguma influência dos grupos sanguíneos A, B e O na indução de fagocitose de eritrócitos não infectados opsonizados por diferentes IgGs purificadas, eritrócitos saudáveis de diferentes doadores de cada um dos grupos sanguíneos avaliados foram utilizados para a realização dos 18 experimentos de eritrofagocitose *in vitro*.

4.3.1. Caracterização hematológica dos doadores de eritrócitos saudáveis dos grupos A, B e O

Para os experimentos de eritrofagocitose, foram coletados eritrócitos não parasitados e saudáveis de diferentes doadores voluntários dos três grupos sanguíneos, sem levar em consideração o fator Rh, sendo 6 indivíduos incluídos para cada grupo. Foram utilizados diferentes doadores para garantir a redução da influência dos fatores individuais nas análises.

As médias e desvios padrão dos dados hematológicos desses indivíduos para cada um dos grupos sanguíneos O, A e B estão descritos nos Quadros 8, 9 e 10 respectivamente. Percebe-se com base nestes resultados laboratoriais, que os indivíduos doadores não apresentavam anemia no momento da coleta do sangue, atendendo, assim, aos requisitos para inclusão no estudo.

Quadro 8. Resultados hematológicos dos 6 indivíduos saudáveis do grupo sanguíneo O doadores de eritrócitos não infectados utilizados em ensaios de eritrofagocitose *in vitro**

Hemograma	Média ± Desvio padrão	Valores de referência (Adultos)*
Eritrócitos	4.863.000 ± 638.900 Células/mm ³ sangue	3.800.000 a 5.800.000
Hemoglobina	13,1 ± 1,7 g/dL	12,5 a 16,5
Hematócrito	40,0 ± 4,4 %	37,0 a 47,0
Volume Corpuscular Médio (VCM)	85,5 ± 5,4 fl	80,0 a 96,0
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	28,0 ± 2,2 pg	28,0 a 33,0
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	32,8 ± 0,8 g/dL	32,0 a 36,0
Red Cell Distribution Width (RDW)	13,2 ± 0,5 %	11,3 a 15,3
Leucócitos	6.720 ± 1.264 Células/mm ³ sangue	3.800 a 10.000
Plaquetas	263.500 ± 54.250 Células/mm ³ sangue	150.000 a 450.000

*Dois indivíduos (33,34%) eram do gênero masculino e quatro (66,66%) eram do gênero feminino.

*Valores de referência de acordo com o Laboratório Hermes Pardini

Quadro 9. Resultados hematológicos dos 6 indivíduos saudáveis do grupo sanguíneo A doadores de eritrócitos não infectados utilizados em ensaios de eritrofagocitose *in vitro**

Hemograma	Média ± Desvio padrão	Valores de referência (Adultos)*
Eritrócitos	5.200.000 ± 777.000 Células/mm ³ sangue	3.800.000 a 5.800.000
Hemoglobina	13,9 ± 1,6g/dL	12,5 a 16,5
Hematócrito	45,2 ± 3,0 %	37,0 a 47,0
Volume Corpuscular Médio (VCM)	87,4 ± 7,1 fl	80,0 a 96,0
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	29,6 ± 2,5 pg	28,0 a 33,0
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	33,6 ± 1,0 g/dL	32,0 a 36,0
Red Cell Distribution Width (RDW)	13,0 ± 0,2 %	11,3 a 15,3
Leucócitos	7.393 ± 2216 Células/mm ³ sangue	3.800 a 10.000
Plaquetas	254.883 ± 24.010 Células/mm ³ sangue	150.000 a 450.000

* Três (50%) eram do gênero masculino e três (50%) eram do gênero feminino.

*Valores de referência de acordo com o Laboratório Hermes Pardini

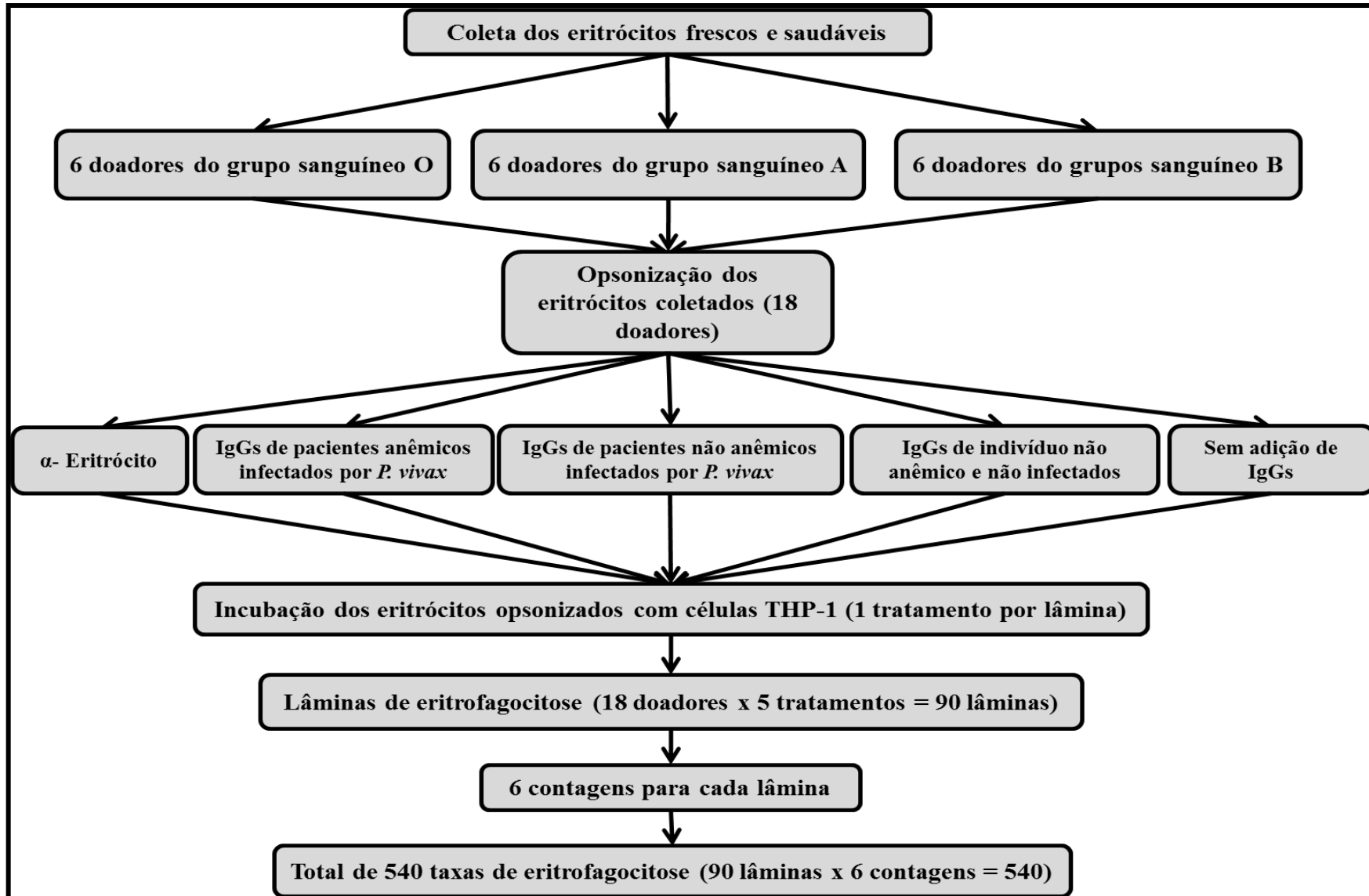
Quadro 10. Resultados hematológicos dos 6 indivíduos saudáveis do grupo sanguíneo B doadores de eritrócitos não infectados utilizados em ensaios de eritrofagocitose *in vitro**

Hemograma	Média ± Desvio padrão	Valores de referência (Adultos)*
Eritrócitos	4.530.000 ± 650.000 Células/mm ³ sangue	3.800.000 a 5.800.000
Hemoglobina	13,8 ± 1,7 g/dL	12,5 a 16,5
Hematócrito	41,4 ± 3,9%	37,0 a 47,0
Volume Corpuscular Médio (VCM)	91,4 ± 8,5 fl	80,0 a 96,0
Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)	30,5 ± 3,1pg	28,0 a 33,0
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	33,4 ± 1,1g/dL	32,0 a 36,0
Red Cell Distribution Width (RDW)	12,7 ± 0,4%	11,3 a 15,3
Leucócitos	6.800 ± 1.753 Células/mm ³ sangue	3.800 a 10.000
Plaquetas	230.667 ± 37.040 Células/mm ³ sangue	150.000 a 450.000

*Dois (33,34%) eram do gênero masculino e 4 (66,66%) eram do gênero feminino.

*Valores de referência de acordo com o Laboratório Hermes Pardini

Os ensaios de eritrofagocitose incluindo as etapas de coleta, lavagem e opsonização dos eritrócitos foram realizadas conforme descrito anteriormente e todo o processo está representado no Organograma 1.



Organograma 1. Organização dos experimentos de eritrofagocitose utilizando eritrócitos saudáveis de 18 doadores voluntários.

4.3.2. Análise estatística

Para o exame dos dados foi utilizada uma análise estatística de escalonamento multidimensional não métrico (*Non-metric multidimensional scaling [NMDS]*) (Bell Folks, 1960) a fim de buscar padrões gerais na distribuição dos valores da taxa eritrofagocitose entre os diferentes grupos sanguíneos. Em seguida, foi realizada uma análise de variância multivariável por permutações (*Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices [PERMANOVA]*) (Anderson, 2001) para testar as significâncias encontradas no NMDS e assim determinar a influência de cada grupo sanguíneo nas taxas de eritrofagocitose. Toda a análise e o gráfico foram realizados no *software R* (Ihaka & Gentleman, 1993).

Em seguida os dados foram submetidos a uma nova análise estatística através de um modelo linear generalizado (*General Linear Model [GLM]*) (Nelder & Wedderburn, 1972) para determinar o efeito dos tratamentos nas taxas de eritrofagocitose. O modelo foi submetido a uma verificação de resíduos para avaliação do erro de distribuição. Foram determinadas a significância estatística dos tratamentos (Anêmico, Não anêmico, Saudável, Controle e α -Eritrócito), dos grupos sanguíneos (A, B e O) e a interação entre estas variáveis. Todas as análises foram realizadas no *software R* e os gráficos confeccionados no *GRAPHPAD PRISM 6*.

4.4. Objetivo específico 4: Avaliação da relação entre gravidade da infecção e as taxas de eritrofagocitose

Com a finalidade de avaliar a relação das taxas de fagocitose de eritrócitos saudáveis opsonizados e a gravidade da infecção por *P. vivax*, foram utilizados soros individuais de pacientes internados classificados como graves ou pacientes não internados classificados como não graves. Nesta etapa do trabalho utilizaram-se soros de pacientes provenientes de uma área de alta endemicidade na Amazônia Peruana. Além disso, diferente dos experimentos anteriormente descritos, nesta etapa utilizaram-se soros inativados e não IgGs purificadas.

4.4.1. Área e população de estudo

Foram utilizados soros de pacientes residentes na região de Loreto, cidade de Iquitos a 1.011 km de distância de Lima, no Peru. A malária é endêmica na Amazônia Peruana, atingindo 12 regiões, sendo que destas Loreto é a mais afetada (Figura 9).

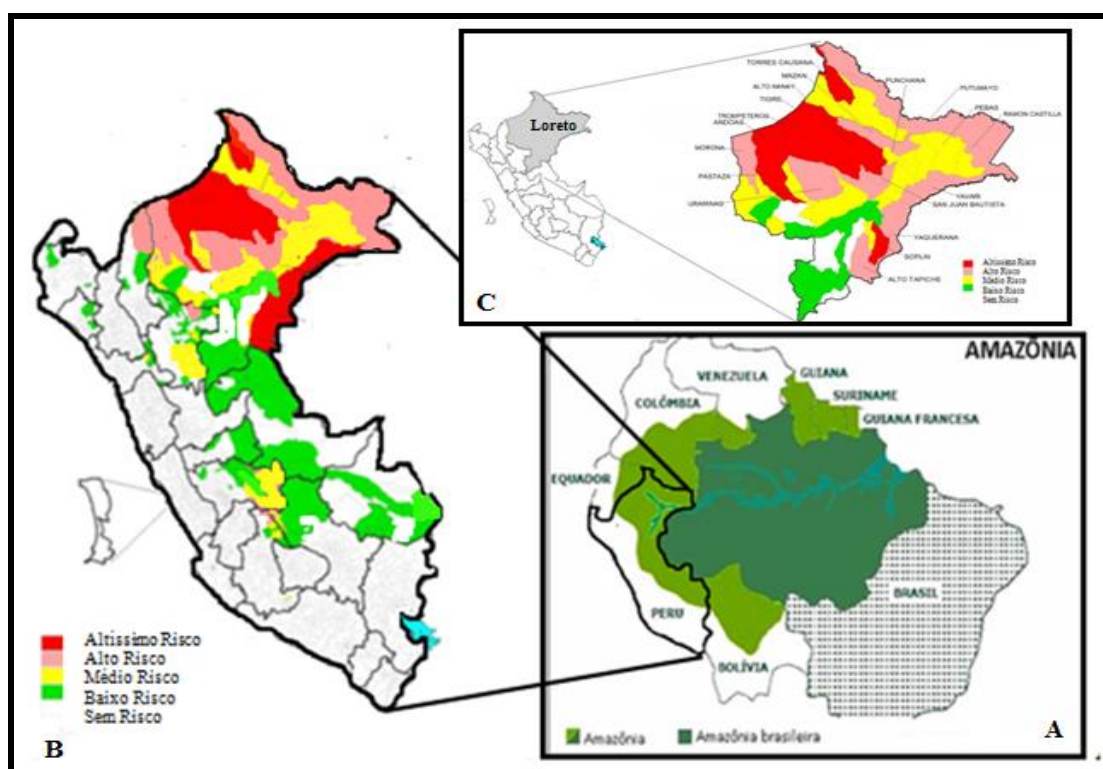


Figura 9. Mapa de Incidência da malária no Peru, em 2015 (**B** e **C**) e mapa da Floresta Amazônica (**A**). **A:** Amazônia Peruana em destaque. **B:** Incidência por região do Peru. **C:** Incidência em Loreto. Baixo risco ($0.01 \leq \text{I.P.A} < 0.99/1000$ habitantes), médio risco ($1.00 \leq \text{I.P.A} < 9.99/1000$ habitantes) alto risco ($10.00 \leq \text{I.P.A} < 49.99/1000$ habitantes), altíssimo risco ($\text{I.P.A} \geq 50.000$) sendo que I.P.A é o Índice Parasitário Anual. **Fonte:** RENACE, DGE, MINSA; 2015, 2014. Disponível em: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2015/SE18/malaria.pdf> Acesso em: 19 de dezembro de 2015 às 17:12 horas.

Até a 18ª semana de 2015, esta região registrou 13.831 casos de malária e, ao fim de 2014 contabilizou 60.566 dos 64.676 casos de malária registrados no Peru durante todo o ano. Nota-se então que essa região é quase que majoritariamente, a região mantenedora da malária no Peru (*Rede Nacional de Epidemiologia [RENACE], Dirección General de Epidemiología [DGE], Ministerio de Salud del Perú [MINSA]; 2014; 2015*).

Ao analisar os números de casos registrados no Peru entre 2010 e 2014, verifica-se de forma semelhante à situação já descrita para o Brasil, que *P. vivax* é a espécie responsável pela maioria destes, sendo que do total de casos registrados em 2014, 54.886 (84,9%) foram devidos à esse parasito. Quanto a distribuição dos casos ainda neste mesmo ano, apenas três regiões notificaram casos de *P. falciparum*, e (10.243) 99,6% foram em Loreto. Casos de *P. vivax* foram registrados nas 12 regiões, apresentando maiores taxas também em Loreto (50.323 casos), seguido de Juanin (2.051). Esses dados demonstram a alta prevalência de *P. vivax* na população do Peru que culminou na morte de 4 pessoas neste ano (RENACE, DGE, MINSA, 2014; 2015).

Se comparado ao Brasil, este país apresenta maior risco de infecção nas áreas onde a doença é endêmica e isso gera um grande número de casos graves por *P. vivax* que dificilmente são encontrados no Brasil. Em 2014, na região de Loreto, foram registrados 164 internações por malária somente durante um mês e uma semana (21 de Agosto a 01 de Outubro), o que já é maior que todas as internações registradas no Brasil, no ano de 2014 (86 internações) (DIRESA, Loreto, 2014). Por este motivo recorreremos a Loreto para estudar a malária vivax grave, já que no Brasil a dificuldade de conseguir amostras de pacientes hospitalizados é enorme.

Foram incluídos 18 pacientes com infecção confirmada por *P. vivax* a partir do diagnóstico realizado por exame microscópico de gota espessa, e confirmado por PCR, para exclusão de infecções mistas ou aquelas causadas por outras espécies de *Plasmodium* (SCOPEL *et al.*, 2004). Dentre estes pacientes, seis eram crianças e adolescentes com idade entre 5 e 16 anos ($9,2 \pm 4,3$ anos) e 12 adultos com idade entre 18 e 53 anos ($27,9 \pm 10,0$ anos), seis eram do gênero feminino (33,34%) e doze do gênero masculino (66,66%), com idade total oscilando entre 5 e 53 anos ($21,8 \pm 12,3$ anos) (Quadro 11).

Quadro 11. Resultado dos exames laboratoriais realizados a partir do sangue coletado dos 18 pacientes infectados por *P. vivax* incluídos neste estudo e idade dos mesmos. Em negrito estão aqueles classificados como grave.

	Idade (anos)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Plaquetas (Células/mm ³ sangue)	Leucócitos (Células/mm ³ sangue)	Volume Corpuscular Médio (VCM) (fl)	Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (pg)	Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL)
Paciente 1*	21	5.2	18.0	110.000	7.800	78.2	23.1	29.5
Paciente 2	5	7.1	23.0	169.000	3.900	80.9	25.2	31.1
Paciente 3	7	7.5	23.0	150.000	6.500	79.7	25.9	32.5
Paciente 4	16	7.7	23.2	120.000	3.100	87.2	28.9	33.2
Paciente 5	18	7.8	24.0	76.000	3.100	90.0	29.0	32.2
Paciente 6	53	8.0	23.0	80.000	3.000	85.3	28.7	33.6
Paciente 7	23	9.3	27.4	160.000	8.100	81.3	27.6	33.9
Paciente 8	19	9.5	28.0	110.000	12.800	84.9	28.9	33.7
Paciente 9	7	9.7	30.0	90.000	6.700	80.9	25.8	31.9
Paciente 10	24	10.5	34.0	62.000	5.200	91.5	27.9	30.5
Paciente 11	7	10.7	34.0	120.000	6.000	81.3	25.7	31.6
Paciente 12	24	13.4	40.0	150.000	8.000	89.4	29.6	33.2
Paciente 13	38	14.0	41.0	70.000	-	-	-	-
Paciente 14	33	14.7	45.0	85.000	1.400	85.1	27.7	32.5
Paciente 15	24	14.9	44.0	140.000	3.300	89.3	30.1	33.7
Paciente 16	27	15.0	44.0	146.000	-	-	-	-
Paciente 17	32	15.9	45.0	60.000	1.000	90.2	31.7	35.2
Paciente 18	23	16.1	47.0	154.000	1.500	85.1	28.9	34.0

*Único paciente com anemia grave segundo a OMS (Hb<7g/dL).

4.4.2. Coleta dos soros

As amostras de soro foram coletadas como parte de um estudo clínico executado entre 2006 – 2008, coordenado pelo Prof. Dr. Christian Baldeviano da *Immunology and Vaccine Development Unit; U.S. Naval Medical Research Unit Nro. 6 (NAMRU-6)*, Peru. Os pacientes foram incluídos no estudo mediante vigilância passiva em dois hospitais de Iquitos, capital de Loreto, o Hospital de Iquitos e o Hospital de Apoyo de Iquitos. Todos os pacientes que apresentaram malária foram tratados de acordo com a política nacional de tratamento para malária daquele país.

Os resultados dos exames hematológicos são apresentados no Quadro 11, de forma individual, já que estes soros não foram analisados a partir de *pools*. Com base nos valores dos níveis de hemoglobina observa-se que 11 pacientes eram anêmicos e 7 eram não anêmicos. Dos 11 anêmicos, apenas 1 paciente era anêmico grave. Todos os casos anêmicos apresentaram anemia normocítica e normocrômica, já que a maioria desses valores se enquadraram nos valores de referência (VCM: 80 – 100 fl; HCM: 27 – 34 pg; CHCM: 31-36 %).

Os 18 indivíduos foram classificados em pacientes com malária grave ou não de acordo com os critérios da OMS para a malária grave, e a divisão dos dois grupos está expressa em negrito no Quadro 11, sendo possível observar que todos os pacientes graves estavam anêmicos no momento da coleta do sangue e todos os pacientes não graves possuíam hemoglobina em níveis normais. Porém a anemia foi o fator considerado para a classificação em grave de apenas 1 paciente, marcado com * na tabela. De acordo com a OMS a anemia grave por malária ocorre ao mensurar níveis de $Hb < 7g/dL$ em adultos.

4.4.3. Oponização dos eritrócitos não infectados

Todos os 18 soros foram inativados a 56°C por 1 hora em banho de água quente para a desnaturação de proteínas, principalmente as do sistema do complemento. Após esse tempo eles foram armazenados em *freezer* a -20°C até os ensaios de oponização e eritrofagocitose. Os soros inativados ou anticorpos comerciais em concentração final de 2% foram adicionados

aos eritrócitos já lavados obtidos do doador saudável do tipo sanguíneo O⁺ (Quadro 3). O anticorpo policlonal comercial α - Eritrócito foi utilizado como controle positivo e como controle negativo foram considerados aqueles eritrócitos que não foram pré-incubados com quaisquer anticorpos. Os ensaios de eritrofagocitose foram realizados também conforme já descrito anteriormente.

4.4.4. Análise estatística

Para verificação da possível relação entre os níveis de hemoglobina e hematócrito dos pacientes infectados por *P. vivax* e as taxas de eritrofagocitose e assim inferir sobre a gravidade da doença, foi realizado o teste estatístico de Correlação e, por esses dados apresentarem distribuição normal utilizou-se o coeficiente de Correlação de Pearson. Essas análises foram realizadas no programa *GRAPHPAD PRISM 6*.

Com o intuito de analisar e comparar a influência de diversas variáveis hematológicas com a influência das taxas de eritrofagocitose na gravidade da doença, foram selecionados alguns exames laboratoriais entre todos os exames coletados dos 18 pacientes durante as consultas médicas e/ou internações (Quadro 12). Os exames selecionados foram aqueles que apresentaram diferenças estatísticas entre os resultados dos exames dos pacientes do grupo grave com os do grupo não grave através da análise estatística de Mann Whitney U (Mann & Whitney, 1947), indicando possível papel na gravidade. Esta análise foi realizada no programa *GRAPHPAD PRISM 6*.

Após a determinação da significância estatística, estes valores foram, juntamente com as taxas de eritrofagocitose, utilizados como variáveis no teste de Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis [PCA]*) (Karl Pearson, 1901). Esse teste permite que os valores das variáveis promovam uma transformação na distribuição dos dados, de forma que a nova distribuição apresente nos eixos X e Y componentes compostas por estas variáveis responsáveis pela mudança. Desta maneira é possível analisar a influência das componentes selecionadas (dados hematológicos e taxas de eritrofagocitose) na distribuição dos 18 pacientes e ainda determinar, dentro dessas componentes, quais foram as principais variáveis responsáveis pela nova distribuição. Esta análise foi desenvolvida no *software R*.

Quadro 12. Lista de exames laboratoriais apresentados por todos os 18 pacientes incluídos neste estudo. Todos os resultados destes exames foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico de Mann Whitney U comparando os pacientes graves (n=11) com os pacientes não graves (n=7).

Lista de exames analisados por Mann Whitney U por ordem alfabética	
Alanina aminotransferase*	Fosfatase Alcalina
Albumina	Gama glutamil-transferase
Aspartato aminotransferase	Glicose
Basofilia	Hematócrito*
Basófilos	Hemoglobina*
Bastões	HCM
Bicarbonato	Leucócitos
Bilirrubina direta	Proteínas Totais*
Bilirrubina indireta	Linfócitos
Bilirrubina total	Monócitos
CHCM	Plaquetas
Creatinina*	Potássio
Desidrogenase Láctica	Sódio
Eosinofilia	Temperatura
Eosinófilos	Ureia
Eritrócitos	VCH
Ferritina	

* Exames que apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos Grave e Não grave

5- RESULTADOS

Os resultados também serão apresentados de acordo com os objetivos descritos neste trabalho.

5.1. Padronização dos experimentos de eritrofagocitose

Os testes preliminares para padronização dos ensaios de eritrofagocitose avaliando-se diferentes concentrações de eritrócitos e de macrófagos ($3,0 \times 10^7$ eritrócitos para $1,0 \times 10^6$ macrófagos; $1,0 \times 10^7$ para $2,0 \times 10^5$; $3,0 \times 10^5$ para $3,0 \times 10^5$; $4,0 \times 10^6$ para $4,0 \times 10^5$ e finalmente $5,0 \times 10^6$ para $5,0 \times 10^5$) nos permitiu verificar que as melhores lâminas foram obtidas quando se utilizava $5,0 \times 10^6$ eritrócitos e $5,0 \times 10^5$ macrófagos em cada ensaio, correspondendo a uma razão de 10:1. Assim as lâminas ficaram mais homogêneas e os macrófagos bem distribuídos. Logo, estabeleceu-se como padrão para os experimentos posteriores de eritrofagocitose o uso de tal proporção de células. Além disso, esses experimentos permitiram-nos determinar o tempo necessário para a ativação dos monócitos após a incubação dessas células com PMA. Verificou-se que o tempo ótimo foi de 72 horas, após teste com os tempos de 24, 36, 48 e 72 horas, pois nesse tempo a maioria das células (aproximadamente 80%) já estavam ativadas (Figura 7).

As lâminas foram coradas com *Giemsa* e, portanto, os macrófagos apresentaram seus citoplasmas corados em roxo (basófilo) e os núcleos em rosa (acidófilo) conforme evidenciado na Figura 10. Os eritrócitos fagocitados apresentaram coloração amarronzada, permitindo sua identificação e contagem dos macrófagos com eritrócitos englobados (Figura 10, setas pretas).

Cada experimento foi contado 6 vezes (pseudo réplicas) a fim de se obter um número representativo de contagens e assim aumentar a precisão da estimativa da taxa de eritrofagocitose. As contagens foram padronizadas conforme descrito a seguir:

- (i) Foi considerada 1 taxa de eritrofagocitose ao visualizarmos, no campo microscópico, um eritrócito no citoplasma de um macrófago (Figura 10A-C).
- (ii) A quantidade de eritrócitos dentro de um mesmo macrófago não foi levada em consideração, já que não foi objetivo deste trabalho mensurar a quantidade de eritrócitos destruídos. Sendo assim, quando foi visualizado mais de um

eritrócito dentro de um mesmo macrófago a taxa de eritrofagocitose foi igual a 1 (Figura 10D e 10E).

- (iii) Em casos onde se observou apenas um eritrócito junto a dois ou mais macrófagos fundidos, a taxa de eritrofagocitose também foi igual a 1 (Figura 10F). Quando foi necessária a identificação do macrófago responsável pela fagocitose, foi considerado aquele cujo núcleo apresentava menor distância em relação ao eritrócito englobado (Figura 10F, *).

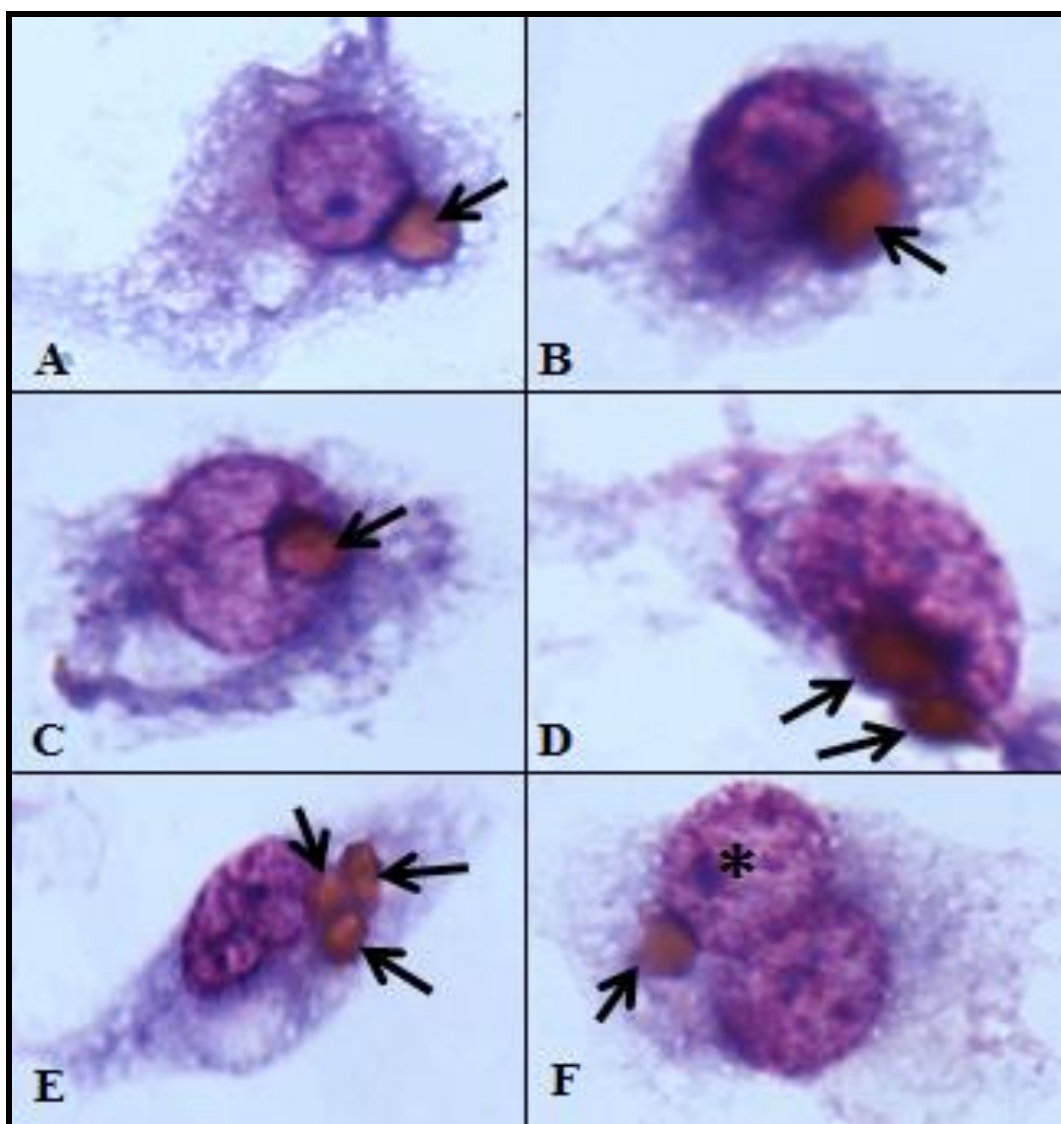


Figura 10: Fotos de lâminas com fagocitose de eritrócitos, obtidas como resultados dos experimentos de padronização dos ensaios de eritrofagocitose no laboratório de malária do ICB, UFMG. **Setas:** Eritrócitos fagocitados. **A, B e C:** Macrófago com um eritrócito fagocitado **D e E:** Macrófago com mais de um eritrócito fagocitado. **F:** Dois macrófagos pareados com um eritrócito no citoplasma fundido. Eritrofagocitose atribuída ao macrófago com * por proximidade ao núcleo da célula.

5.2. Avaliação da fagocitose de eritrócitos não parasitados, por células THP-1, após a opsonização com IgGs purificadas de pacientes com malária vivax anêmicos e não anêmicos

Após estabelecidas as melhores condições para os ensaios de eritrofagocitose, a próxima etapa consistiu em avaliar o potencial das IgGs purificadas de grupos de pacientes com diferentes status clínico em mediar a fagocitose de eritrócitos não infectados. Para cada grupo de anticorpo testado, cinco experimentos foram realizados com eritrócitos saudáveis O⁺ obtidos de um mesmo doador. A figura 11 mostra a média de eritrofagocitose obtida ao final dos cinco experimentos para cada um dos anticorpos avaliados. Verificou-se que as maiores taxas de eritrofagocitose ($12,3 \pm 3,4\%$) ocorreram para eritrócitos opsonizados com IgG do anticorpo policlonal comercial. Constatou-se, ainda, que a taxa de eritrofagocitose de eritrócitos opsonizados com IgGs de indivíduos saudáveis ($3,3 \pm 2,2\%$), bem como a de eritrócitos opsonizados com IgGs de pacientes com malária não anêmicos ($3,3 \pm 1,9\%$), foi estatisticamente semelhante à observada para o controle sem a adição de qualquer anticorpo ($3,1 \pm 1,6\%$) e inferior à obtida para eritrócitos opsonizados com IgG α - Eritrócito. Por fim, cabe ressaltar que os eritrócitos opsonizados com IgGs de pacientes anêmicos foram fagocitados evidenciando taxa superior à observada para os eritrócitos opsonizados com IgGs de indivíduos saudáveis e com IgGs de pacientes sem anemia. Esses resultados indicam claramente que eritrócitos O⁺ não infectados opsonizados com IgGs de pacientes anêmicos são mais suscetíveis à eritrofagocitose quando comparados às IgGs dos demais grupos, indicando o papel deste mecanismo, assim como das IgGs produzidas, na anemia vivax.

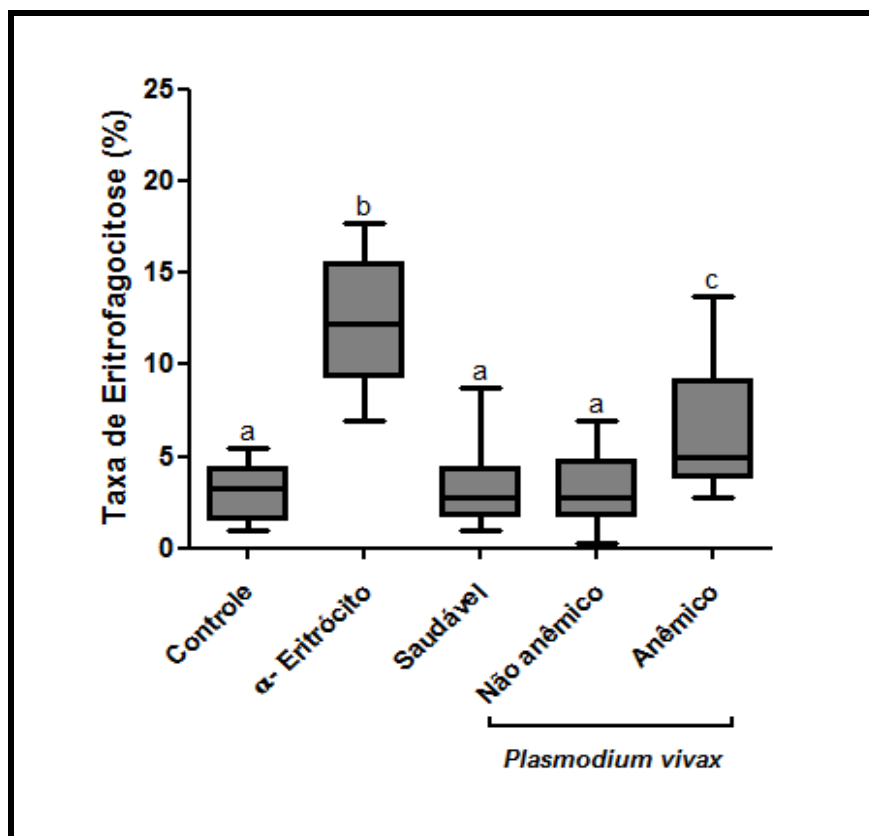


Figura 11. Diagrama de caixas (*Boxplot*) da porcentagem de células THP-1 com fagocitose de eritrócitos O+, saudáveis, opsonizados ou não com IgGs. **Controle:** não foram adicionadas IgGs aos eritrócitos. **α-Eritrócito:** Eritrócitos opsonizados com anticorpo policlonal comercial α-Eritrócito. **Saudável:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do soro de indivíduo não anêmico e não infectado (n=1). **Anêmico:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do *pool* de soros de indivíduos infectados anêmicos (n=7). **Não Anêmico:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do *pool* de soros de indivíduos infectados não anêmicos (n=7). **a, b e c** indicam o resultado do teste estatístico de comparação Múltipla de Dunn. As caixas representam os intervalos interquartis, os valores máximos e mínimos (*Wiskers*) estão representados pelos traços paralelos que se ligam às caixas e os traços que dividem as caixas representam as médias.

5.3. Análise da influência dos grupos sanguíneos do sistema ABO nas taxas de eritrofagocitose

Uma vez que evidências obtidas de estudos realizados com *P. falciparum* têm sugerido que o grupo sanguíneo influencia na evolução da infecção plasmodial e, como não existem estudos na literatura quanto a *P. vivax*, principalmente no que se refere à anemia, investigou-se, ainda, no presente estudo, a associação entre os grupos sanguíneos do sistema ABO e a anemia, através da influência destes grupos nas taxas de eritrofagocitose.

5.3.1. Análise de padrões de dissimilaridades das taxas de eritrofagocitose nos três grupos sanguíneos

Com o intuito de buscar padrões na distribuição das taxas de eritrofagocitose, entre os três grupos sanguíneos, foi realizada uma análise estatística de NMDS.

Esta análise incorporou pontos para cada uma das taxas de eritrofagocitose obtidas (n=540, Organograma 1) no espaço escolhido (Bray-Curtis), criando uma matriz de forma que as distâncias entre as dissimilaridades dos pontos preservem tão bem quanto possível as distâncias entre as dissimilaridades originais. É uma técnica de ordenação de dados onde há um ganho na compreensão das similaridades/diferenças entre os objetos de estudo que não seria possível a partir da análise das distâncias reais, mas em contrapartida existe uma perda de dados, já que as distâncias apresentadas na matriz não são iguais às originais. Desta forma o NMDS nos permitiu verificar se há ou não, distinção entre os grupos sanguíneos na indução da fagocitose de eritrócitos não infectados opsonizados por diferentes IgGs.

Foi escolhido o espaço de Bray-Curtis (Clarke & Warwick, 2001), pois este método foi considerado o mais robusto para diversos tipos de conjuntos de dados se comparado às outras técnicas de ordenação (MINCHIN, 1987) e o processo de NMDS foi realizado nos seguintes passos pelo *software R*:

- (i) Definição da posição original das taxas de eritrofagocitose em um espaço multidimensional através da atribuição de coordenadas e medição das distâncias entre cada taxa;
- (ii) Redução das várias dimensões a duas (eixo 1 = NMDS 1 e eixo 2 = NMDS 2), que são arbitrárias;
- (iii) Representação das distâncias originais nas duas dimensões através de novas coordenadas, por tentativas aleatórias, até que a correlação destas coordenadas com as originais seja a maior possível;
- (iv) Determinação do stress (*Standardized Residual Sum of Squares [STRESS]*) que é a medida do quanto a nova configuração 2-D preserva a posição original das taxas no espaço multidimensional, através das duas medidas de distância. Stress < 0,05 indica uma excelente representação na configuração 2-D, < 0,1 é ótimo, < 0,2 é bom/aceitável, mas não é possível discutir detalhes minuciosos já que algumas distâncias podem estar mal representadas e stress > 0.2 é ruim, sendo

que entre 0,35 e 0,4 indicam um posicionamento aleatório das amostras, mantendo pouca ou nenhuma similaridade com a representação original.

- (v) Inserção de centroides conectando padrões similares

De acordo com esta análise observou-se uma nítida separação do grupo sanguíneo O se comparado aos demais e o stress foi igual a 0,22. Este número é considerado aceitável, mas indica que algumas distâncias podem se diferenciar das reais (Figura 12).

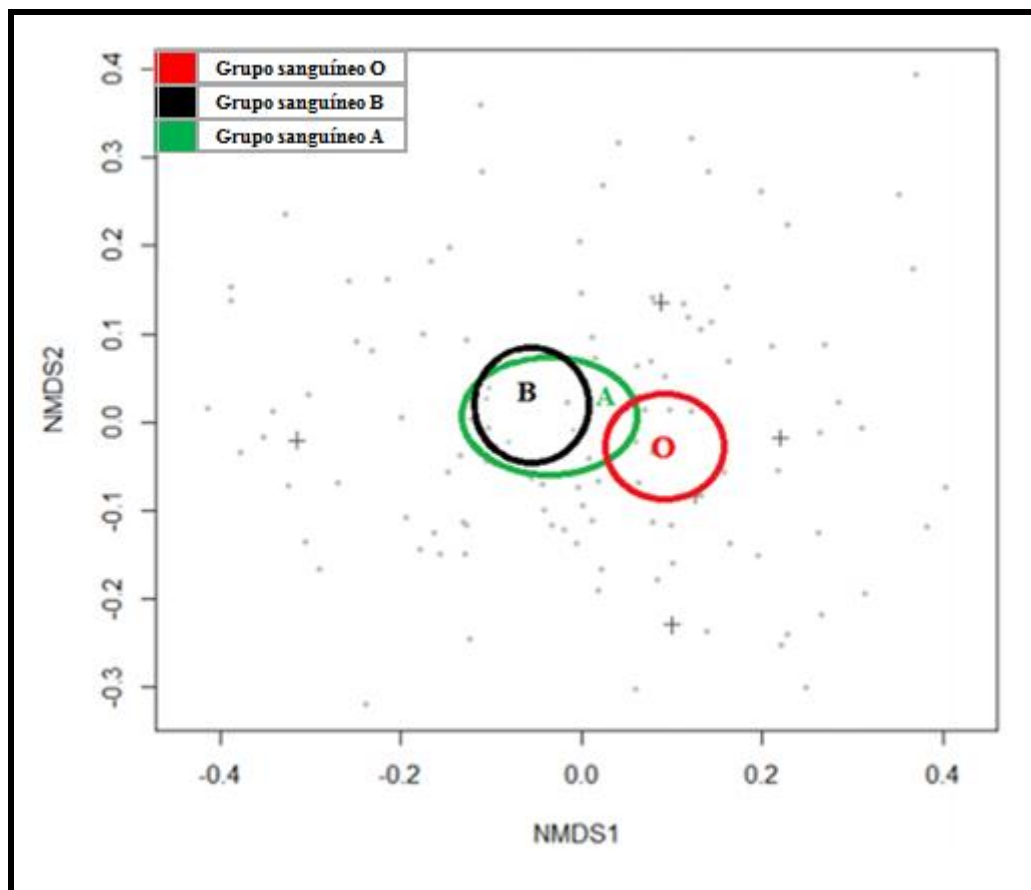


Figura 12. NMDS bi-dimensional utilizando a dissimilaridade de Bray-Curtis para ordenação das taxas de eritrofagocitose dos grupos sanguíneos A, B e O. Foram utilizados 6 indivíduos para cada grupo sanguíneo e os eritrócitos coletados foram opsonizados ou não com IgGs (Tratamentos: Controle, α - Eritrócito, Saudável, Não anêmico, Anêmico). Cada ponto representa uma taxa de eritrofagocitose substituída por uma dissimilaridade de Bray-Curtis (n=540), sendo que a maioria dos pontos está sobreposta. As elipses representam um intervalo de 95% confiança das taxas no centro e conectam padrões similares.

Para testar a significância deste resultado foi realizada uma PERMANOVA. Este método estatístico é uma análise de permutações que avalia a variância usando as distâncias nas matrizes, sendo, portanto ideal para análises de NMDS, no espaço de Bray-Curtis (ANDERSON, 2001; MCARDLE & ANDERSON, 2001). Ele produz um valor de estatística F sendo análogo a ANOVA paramétrica (CLARKE & GREEN, 1988) e o resultado obtido foi

de $F=14,998$ e $P<0,001$, demonstrando que a dissimilaridade observada do grupo O é estatisticamente significativa. Estes dados mostram que por diferenças entre as atividades fagocíticas dos macrófagos para com os eritrócitos saudáveis de cada um dos grupos sanguíneos, o grupo sanguíneo O foi separado do A e do B.

5.3.2 Variações detalhadas das taxas de fagocitose de eritrócitos opsonizados por diferentes tratamentos com IgGs entre os grupos sanguíneos A, B e O e entre tais tratamentos

As taxas de eritrofagocitose ($n=540$) obtidas para eritrócitos saudáveis de doadores de diferentes grupos sanguíneos opsonizadas por diferentes tratamentos com IgGs e grupo controle estão apresentadas no Quadro 13, em forma de médias das 6 contagens para cada tratamento/lâmina e para cada um dos 6 indivíduos doadores de eritrócitos saudáveis dos grupos A, B e O (Organograma 1).

Quadro 13. Médias e desvios padrões das taxas de eritrofagocitose ($n=540$) obtidas através de 18 experimentos (um para cada doador de eritrócitos saudáveis) de acordo com o grupo sanguíneo do doador de eritrócitos saudáveis e tratamento com IgGs

Tratamento	Média ± Desvio Padrão por grupo sanguíneo das taxas de eritrofagocitose (%)		
	Grupo sanguíneo O	Grupo sanguíneo B	Grupo sanguíneo A
Controle	4,0 ± 1,6	3,1 ± 1,7	1,9 ± 1,5
α- Eritrócito	11,6 ± 4,1	12,6 ± 3,4	7,1 ± 2,7
Saudável	5,5 ± 2,3	4,3 ± 2,1	1,6 ± 0,6
Não anêmico	4,2 ± 1,7	3,0 ± 1,4	1,7 ± 1,0
Anêmico	8,4 ± 2,1	4,3 ± 1,3	2,6 ± 1,1

Todas as taxas obtidas ($n=540$) foram analisadas por meio de GLMs, que determinou as significâncias estatísticas entre as médias dessas taxas (Quadro 13) a fim de se investigar as possíveis associações entre as taxas de eritrofagocitose e as variáveis referentes aos grupos sanguíneos e aos anticorpos dos diferentes grupos de indivíduos utilizados. Por meio dessa análise, foi possível constatar que o grupo sanguíneo do doador de eritrócitos saudáveis influenciou significativamente a taxa de eritrofagocitose ($P<0,001$). De uma forma geral, observou-se que as médias das taxas de eritrofagocitose foram significativamente maiores

para os eritrócitos não parasitados do grupo sanguíneo O ($P < 0,001$) em relação aos dois outros grupos sanguíneos, dados estes apresentados na Figura 13. De forma interessante, observou-se que para o grupo sanguíneo B, a taxa de eritrofagocitose verificada após opsonização com o anticorpo policlonal anti-eritrócito comercial foi semelhante àquela observada para eritrócitos O saudáveis opsonizados por este mesmo anticorpo. Para os demais tratamentos incluindo os outros anticorpos purificados de pacientes infectados por *P. vivax*, observou-se padrão similar entre as taxas de eritrofagocitose verificadas para os eritrócitos saudáveis dos grupos sanguíneos O e B. Constatou-se, assim, que os eritrócitos do grupo O seguido do B são significativamente mais fagocitados quando comparados aos eritrócitos do grupo A, independente do anticorpo utilizado para a opsonização dessas células. Em síntese, eritrócitos do grupo sanguíneo O opsonizados por anticorpos se tornam mais eficientemente fagocitados por macrófagos *in vitro* (Quadro 13, Figura 13).

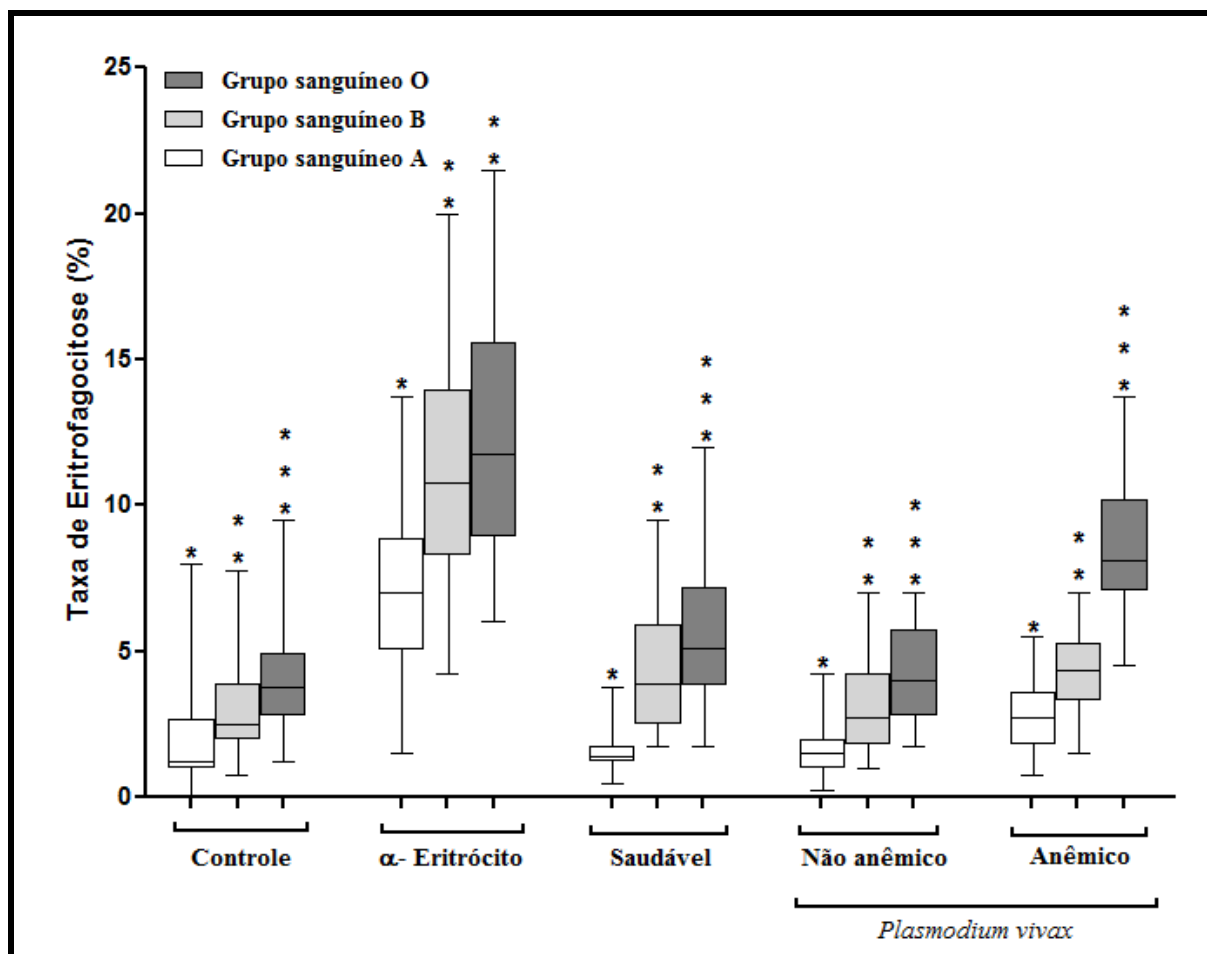


Figura 13. *Boxplot* da porcentagem de células THP-1 com fagocitose de eritrócitos dos grupos sanguíneos O, B e A, saudáveis, opsonizados ou não com IgGs. **Controle:** não foram adicionadas IgGs aos eritrócitos. **α-Eritrócito:** Eritrócitos opsonizados com anticorpo policlonal α-Eritrócito. **Saudável:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do soro de indivíduo não anêmico e não infectado (n=1). **Anêmico:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do *pool* de soros de indivíduos infectados anêmicos (n=7). **Não Anêmico:** Eritrócitos opsonizados com IgGs purificadas do *pool* de soros de indivíduos infectados não anêmicos. (n=7) Foram coletados eritrócitos saudáveis de 6 indivíduos para cada grupo sanguíneo. Asteriscos representam as diferenças entre as médias, sendo que para todas o P foi menor que 0,0001 nas análises estatísticas de GLM.

Não foi possível verificar diferenças entre as taxas de fagocitose para os eritrócitos não opsonizados (controle) e aqueles opsonizados por IgGs de pacientes não anêmicos. Em outras palavras, as taxas de eritrofagocitose verificadas para eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B ou O foram consideradas basais uma vez que foram similares àquelas observadas para eritrócitos não sensibilizados por anticorpos, indicando que anticorpos direcionados à proteínas de membrana dos eritrócitos de pacientes infectados, mas não anêmicos apresentam baixa capacidade de induzirem fagocitose *in vitro*. Entretanto, a análise por GLM mostrou valores significativos superiores das taxas de fagocitose para eritrócitos opsonizados por esses anticorpos de pacientes anêmicos com malária vivax quando comparadas às taxas basais

verificada para o grupo controle, independente do grupo sanguíneo avaliado. Esses dados indicam que as IgGs de pacientes anêmicos induzem fagocitose *in vitro* de maneira significativa e que esta habilidade não depende do grupo sanguíneo dos eritrócitos englobados.

Ao analisar a influência de cada grupo sanguíneo, separadamente, sobre as taxas de eritrofagocitose, verificou-se que as médias das taxas de fagocitose dos eritrócitos opsonizados com o anticorpo IgG policlonal α - Eritrócito foram maiores para todos os grupos sanguíneos ($P < 0,001$) (Quadro 13, Figura 14). Como mencionado, as médias das taxas de fagocitose para eritrócitos opsonizados com IgGs de pacientes não anêmicos infectados mantiveram um padrão similar àsquelas verificadas para o grupo controle (eritrócitos não opsonizados) de acordo com cada tipo sanguíneo (Quadro 13, Figura 14). De acordo com estes dados, observou-se que os eritrócitos sensibilizados com as IgGs de pacientes anêmicos infectados, foram mais suscetíveis a eritrofagocitose se comparado àsquelas sensibilizados com IgGs de pacientes não anêmicos no grupo sanguíneo A, assim como no B e no O, corroborando a GLM inicial e demonstrando a permanência desta característica em todos os grupos sanguíneos (Quadro 13, Figura 14).

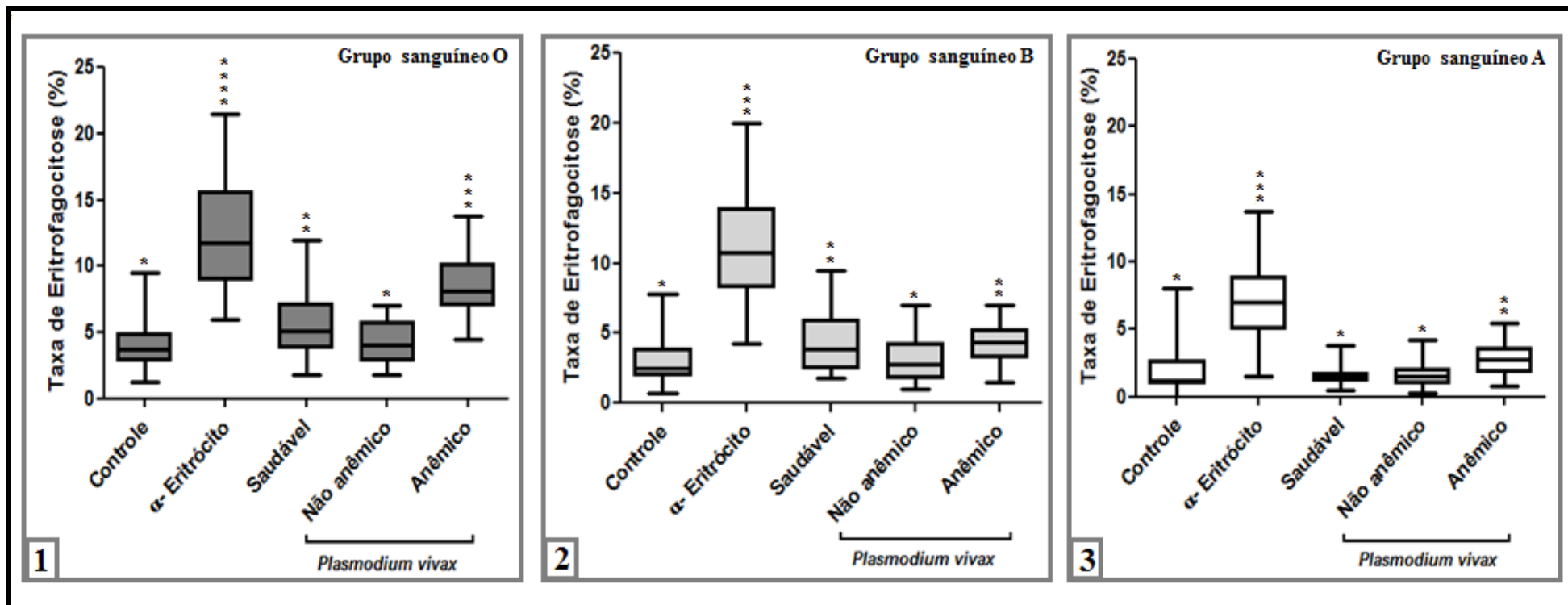


Figura 14. *Boxplot* da porcentagem de células THP-1 com fagocitose de eritrócitos saudáveis, opsonizados ou não com IgGs (tratamentos: Controle, α-Eritrócito, Saudável, Anêmico, Não Anêmico). **1.** Foram coletados eritrócitos saudáveis de 6 indivíduos do grupo sanguíneo O. **2.** Foram coletados eritrócitos saudáveis de 6 indivíduos do grupo sanguíneo B. **3.** Foram coletados eritrócitos saudáveis de 6 indivíduos do grupo sanguíneo A. Os asteriscos representam as diferenças encontradas através da GLM dentro de cada grupo sanguíneo e não comparável entre as figuras 1, 2 e 3, sendo o $P < 0,001$ para todas.

5.4. Avaliação da relação entre as taxas de eritrofagocitose e a gravidade da infecção por *P. vivax*

Com o intuito de verificar se a eritrofagocitose está relacionada à gravidade da doença, primeiramente foi realizado um teste estatístico de correlação, com a finalidade de verificar a existência de relações entre as taxas de eritrofagocitose e os níveis de hemoglobina e hematócrito, indicativos de malária grave. Após esta análise, os mesmos dados foram submetidos a uma análise de PCA a fim de quantificar a influência destas taxas de eritrofagocitose na gravidade da infecção por *P. vivax*.

5.4.1. Correlação entre as taxas de eritrofagocitose e os níveis de hemoglobina e hematócrito em pacientes infectados por *P. vivax*

A partir do teste estatístico de correlação foi confirmada a existência de associações entre as taxas de eritrofagocitose dos eritrócitos opsonizados por incubação com soros inativados de 18 pacientes infectados por *P. vivax* e os níveis de hemoglobina ($P=0,0012$) e hematócrito ($P=0,0010$) destes, mensurados por testes laboratoriais durante a infecção.

Os níveis de hemoglobina variaram entre 5,2 e 16,1 g/dL e os de hematócrito entre 18 e 47% (Quadro 11). As taxas de eritrofagocitose variaram de 2,0 a 5,8% (Figura 15).

Após a determinação do coeficiente de correlação de Pearson foi possível observar uma correlação de direção inversa entre níveis de hemoglobina e hematócrito e as taxas de eritrofagocitose, ou seja, a maioria das taxas de eritrofagocitose diminuem com o aumento dos níveis de hemoglobina e/ou de hematócrito dos pacientes infectados. Foi observado também um importante grau de correlação (hemoglobina: $r = -0,71$, hematócrito: $r = -0,70$) que demonstra a força desta associação.

De maneira interessante, foi possível observar que a maior taxa de eritrofagocitose foi atribuída ao paciente com o menor valor de hemoglobina e apresentando anemia vivax grave segundo a OMS ($Hb=5,2g/dL$).

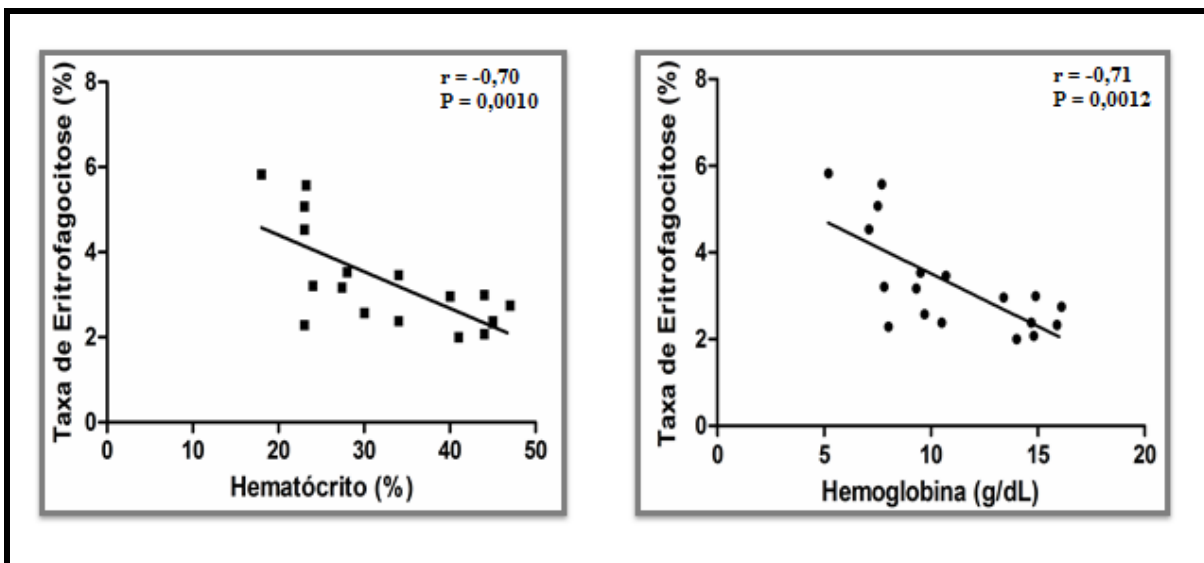


Figura 15. Correlação entre as taxas de eritrofagocitose de eritrócitos opsonizados com soros inativados dos 18 pacientes infectados por *P. vivax* anêmicos ou não e os níveis de hemoglobina e hematócrito desses pacientes mensurados no momento da infecção (Teste de Correlação de Pearson).

5.4.2. As taxas de eritrofagocitose possuem cargas elevadas de influência na componente principal 2, que determina um quinto da distribuição dos pacientes em graves e não graves

De posse dos dados hematológicos e laboratoriais verificados para os 18 pacientes peruanos infectados por *P. vivax*, foi possível verificar que as variáveis creatinina, hemoglobina, hematócrito, proteínas totais e alanina aminotransferase, de alguma forma, foram associadas à gravidade da infecção. Desta forma, essas variáveis foram analisadas em paralelo às taxas de eritrofagocitose a partir da análise estatística de PCA.

Esta é uma análise de ordenação dos dados, assim como o NMDS, porém é capaz de analisar diversas variáveis simultaneamente, buscando explicar a maior quantidade de variação dos dados das variáveis entre os grupos de interesse. Ele reduz as variáveis originais, que podem ou não ser correlacionadas, a valores de máxima variância entre os grupos dentro do menor número possível de componentes não correlacionadas. Logo, o número de componentes, nunca pode ultrapassar o de variáveis. Como a malária grave pode ser consequência de diversos fatores, esta análise foi ideal para avaliar os diversos fatores hematológicos que possivelmente estão relacionados à gravidade, assim como quantificar a influência destas variáveis na gravidade.

Para este experimento foram criadas, inicialmente, sete componentes (número máximo de componentes permitido) e em seguida cada componente foi avaliada de acordo com os

valores de inércia obtidos, para verificação do papel de cada componente na nova ordenação dos dados. De acordo com os resultados, as componentes 1 e 2 foram as principais responsáveis pela nova ordenação dos dados na matriz, explicando, juntas, 81,5% da variação dos dados. Verificou-se ainda, que a componente principal 1 foi a que mais contribuiu para a nova distribuição, explicando 62,5% da variação observada.

Neste modelo estatístico não há uma sobreposição de dados como no NMDS, evitando a perda de informação. O que ele faz é produzir uma rotação espacial dos valores das variáveis de forma que os eixos X e Y se tornem as componentes principais responsáveis pela rotação e pela nova distribuição dos dados. Sendo assim, o gráfico obtido apresentou a componente principal 1 no eixo X e a componente principal 2 no eixo Y (Figura 16).

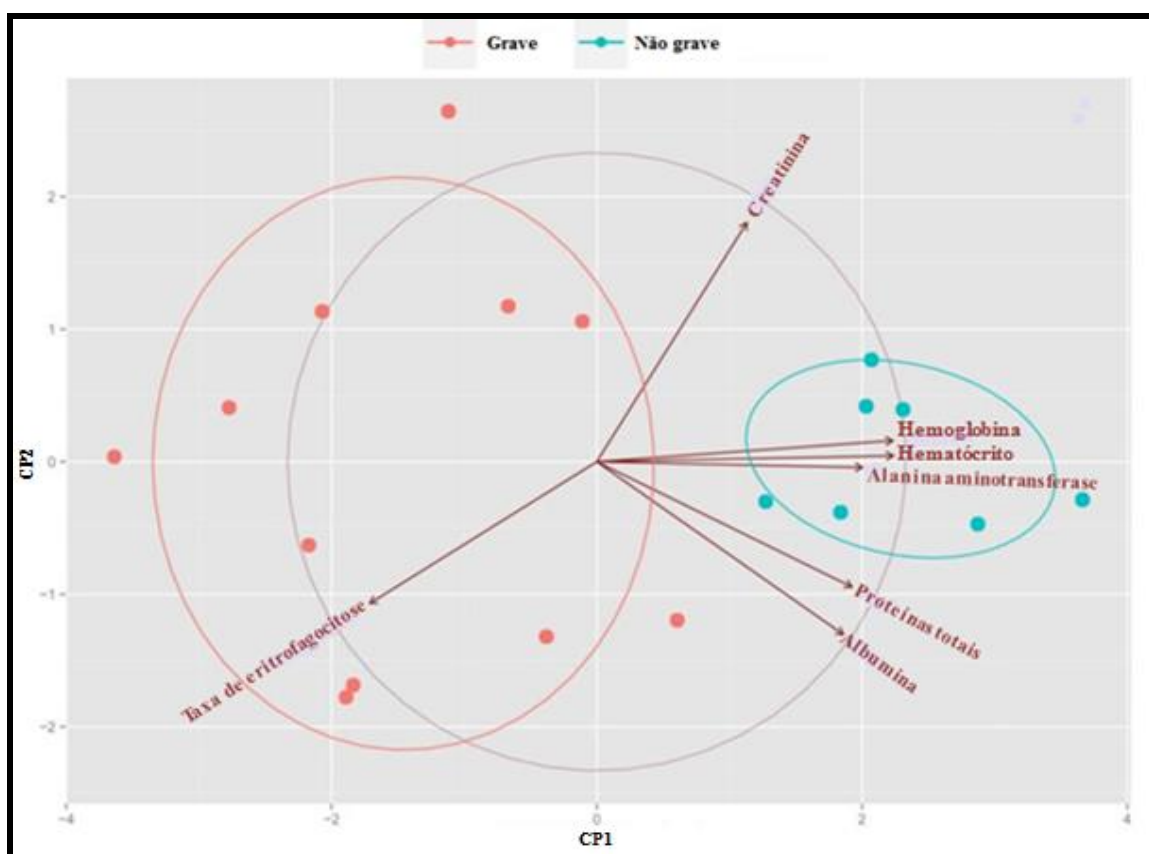


Figura 16. PCA para ordenação dos dados das seis variáveis hematológicas (creatinina, hemoglobina, hematócrito, proteínas totais e alanina aminotransferase) para cada um dos pacientes (n = 18). Cada ponto representa um paciente. As elipses representam um intervalo de 95% confiança das taxas no centro e conectam padrões similares. As setas representam a influência das variáveis na ordenação dos dados resultantes. CP1: Componente principal 1 que explica 62,5% da nova ordenação. CP2: Componente principal 2 que explica 19% da nova ordenação.

Dentro de cada componente principal, podemos analisar quais variáveis originais (creatinina, hemoglobina, hematócrito, proteínas totais e alanina aminotransferase) possuem

maior variância entre os grupos grave e não grave, já que elas são constituídas por valores de *loading*, que quantificam a carga de cada variável na componente. Os valores de *loading* em cada componente estão expressos no Quadro 14. De acordo com este modelo estatístico verificou-se que as variáveis hemoglobina e hematócrito possuíram os maiores *loading* na CP1 (0.456 e 0.459 respectivamente), que foi a principal determinante da rotação. Já na PC2 o maior *loading* foi atribuído à taxa de eritrofagocitose (0.475), que foi a segunda principal responsável pela ordenação.

Quadro 14. Valores de *Loading* para cada variável dentro de cada Componente Principal (CP) e Componente (C).

Variáveis	CP1	CP2	C3	C4	C5	C6	C7
Hemoglobina	0.456	-0.076	0.165	0.171	0.491	-0.134	-0.686
Hematócrito	0.459	-0.030	0.172	0.208	0.430	-0.076	0.725
Creatinina	0.159	-0.710	-0.112	-0.664	0.092	0.086	0.041
Alanina aminotransferase	0.335	0.092	-0.924	0.120	-0.053	-0.087	-0.001
Proteínas totais	0.400	0.331	0.202	-0.423	-0.395	-0.596	0.007
Albumina	0.414	0.381	0.091	-0.243	-0.122	0.774	-0.044
Taxa de eritrofagocitose	-0.335	0.475	-0.165	-0.484	0.626	-0.088	0.030

Através deste achado, nota-se que a taxa de eritrofagocitose apresenta carga alta dentro da PC2 e como esta explica 19% da rotação esta análise nos mostrou um importante papel da taxa de eritrofagocitose na distribuição dos pacientes graves e não graves, sendo que os maiores contribuintes para esta divisão foram os níveis de hemoglobina e hematócrito, como já era esperado, já que são indicadores de malária grave definidos pela OMS.

6- DISCUSSÃO

A etiologia da anemia na malária vivax é ainda pouco elucidada, porém já existe um consenso na literatura de que a destruição de uma grande biomassa de eritrócitos não infectados exerça um importante papel na determinação desta forma clínica da infecção. Mecanismos associados a fatores imunológicos, desencadeados durante a infecção, podem explicar a patofisiologia da remoção desses eritrócitos. Entretanto, esses mecanismos se baseiam em estudos conduzidos com *P. falciparum* e raras são as evidências da participação dos mesmos na destruição de eritrócitos na malária vivax. A fagocitose de eritrócitos parasitados ou mesmo daqueles não infectados por macrófagos do baço é um dos mecanismos propostos, mas o seu papel na anemia ainda não está totalmente elucidado (revisto por CASTRO-GOMES *et al.*, 2014).

A forte resposta inflamatória observada durante as infecções por *P. vivax* pode ser um grande contribuinte para este mecanismo e conseqüentemente um fator importante na determinação da anemia. A produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias resulta no aumento e ativação da população de macrófagos no baço, principalmente pela ação de TNF- α e INF- γ , podendo culminar no aumento da taxa de hemólise extravascular. Esta hiperativação, assim como o aumento da população de macrófagos no baço já foram descritos na anemia vivax (LACERDA *et al.*, 2007; 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2012). Littman (1974) demonstrou a importância deste órgão na anemia ao avaliar um paciente esplenectomizado que apresentou recaída da infecção, mas sem relato de anemia apesar de seu histórico de anemia grave antes da remoção do órgão.

Levando em consideração que a remoção de eritrócitos não infectados persiste mesmo após a eliminação do parasito da circulação, é possível que a hemólise extravascular aumentada também se estenda determinando os quadros graves de anemia (LOOAREESUWAN *et al.*, 1987). Em pacientes com neurosífilis tratados para malária, a rápida anemia grave desenvolvida era acompanhada de uma distensão do baço e estes resultados são consistentes com a hiperativação dos macrófagos e com a magnitude de destruição de eritrócitos durante a anemia (KITCHEN, 1949). Esplenomegalia em pacientes com anemia grave na malária vivax também já foi observada por diferentes autores (ECHEVERRI *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010a). Índícios da

fagocitose de eritrócitos não parasitados durante o quadro de anemia também já foram observados (ADBALLA, 1988; LA RAJA, 2002).

A eritrofagocitose apresenta-se aumentada quando é mediada por IgGs e a deposição de IgGs na membrana dos eritrócitos não infectados já foi relatada em pacientes anêmicos infectados (ABDALLA, 1988; WAITUMB *et al.*, 2000). No estudo realizado por Waitumbi e colaboradores (2000) foi encontrado uma alta taxa de deposição de IgGs na membrana dos eritrócitos infectados e não infectados nas infecções por *P. falciparum*, sendo que as taxas de eritrofagocitose se correlacionaram com a quantidade de deposição das IgGs na membrana. Estudos anteriores também já haviam analisado crianças anêmicas infectadas por *P. falciparum* e evidenciaram a presença de imunoglobulinas direcionadas contra os eritrócitos (ABDALLA, 1988; FACER *et al.*, 1980). Sendo assim, nosso grupo investigou o possível papel das IgGs na anemia decorrente de infecções por *P. vivax*, demonstrando uma correlação positiva entre altos níveis de auto-anticorpos dirigidos contra proteínas de eritrócitos saudáveis e baixos níveis de hemoglobina (ZITHA, 2014).

A presença do *P. vivax* desencadeia um estresse oxidativo em paralelo à resposta inflamatória, com conseqüente acúmulo de ROS e redução na expressão de enzimas antioxidantes. O papel deste estresse oxidativo na indução de *clusters* de banda 3, a principal proteína de membrana de eritrócitos, em células infectadas por *P. vivax* nunca foi descrito embora se reconheça a importância deste mecanismo na destruição de eritrócitos parasitados por *P. falciparum* (PANTALEO *et al.*, 2008). Na tentativa de elucidar a participação deste mecanismo na anemia na malária vivax, nosso grupo demonstrou a partir de estudos de imunoproteômica, o reconhecimento exclusivo de *spots* que representam a banda 3 por soros de pacientes anêmicos infectados (MOURÃO, 2015).

Com o intuito de elucidar o papel da eritrofagocitose induzida por IgGs na remoção de eritrócitos não infectados durante a anemia vivax, utilizamos IgGs purificadas dos soros de pacientes anêmicos e não anêmicos infectados para opsonizar eritrócitos saudáveis *in vitro*.

As taxas de eritrofagocitose das células sensibilizadas com IgGs purificadas de pacientes anêmicos atingiram valores elevados quando comparados às taxas verificadas para a opsonização com outras IgGs, sejam de pacientes não anêmicos ou indivíduos saudáveis (Figura 11). Essa observação nos leva a concluir que IgGs dos pacientes anêmicos podem participar da destruição de eritrócitos não infectados e desta forma, contribuir para a remoção dessas células da circulação podendo levar aos quadros de anemia.

As moléculas-chave reconhecidas por esses anticorpos foram investigadas por nosso grupo em outro trabalho e os resultados mostraram que soros de pacientes anêmicos reconhecem de forma diferencial *spots* exclusivos que representam a banda 3. Se aliarmos essa observação aos dados de eritrofagocitose obtidos no presente trabalho, podemos inferir que a ligação das IgGs à banda 3 induza a fagocitose podendo destruir células não parasitadas durante a infecção por *P. vivax*. Certamente este é um tema intrigante e ainda pouco investigado. De fato, dois importantes trabalhos analisaram a eritrofagocitose de eritrócitos não parasitados opsonizados por IgGs em pacientes infectados por *P. falciparum*. No primeiro trabalho, realizado por Waitumb e colaboradores (2000) a eritrofagocitose foi realizada com o total dos eritrócitos coletados dos pacientes, logo abrangeu eritrócitos infectados e não infectados. Este trabalho obteve como resultado maiores taxas de eritrofagocitose para os pacientes anêmicos se comparado à pacientes com malária cerebral ou assintomáticos e os eritrócitos não foram opsonizados, já que eles já haviam verificado uma grande deposição de IgGs na membrana destes. As taxas obtidas para os eritrócitos de pacientes anêmicos se correlacionaram a quantidade de IgGs depositadas. No segundo trabalho foi diferenciada a eritrofagocitose de eritrócitos parasitados e não parasitados, através de marcadores de DNA, e, portanto ambos os eritrócitos utilizados foram obtidos do cultivo de *P. falciparum*. Este estudo encontrou uma considerável taxa de eritrofagocitose para os eritrócitos não infectados, mas as maiores taxas foram atribuídas aos parasitados por formas maduras (GALLO *et al.*, 2012).

Tendo em vista os nossos resultados e o fato de que na anemia vivax espera-se que a quantidade de eritrócitos não infectados removidos da circulação seja pelo menos quatro vezes maior que nas infecções por *P. falciparum*, podemos inferir que a remoção extravascular de eritrócitos não infectados pelo baço tenha um papel relevante na determinação dos quadros de anemia durante as infecções por *P. vivax*. Atualmente, o nosso grupo tem se dedicado ao estudo das alterações biomecânicas provocadas pela deposição de anticorpos na membrana de eritrócitos saudáveis. Nossos resultados preliminares têm demonstrado que IgGs de pacientes com anemia infectados por *P. vivax* alteram a capacidade de deformabilidade dos eritrócitos saudáveis do tipo O+, tornando-os mais rígidos e portanto, mais suscetíveis à destruição no baço (DONDORP *et al.*, 1999; HANDAYANI *et al.*, 2009).

Como esses resultados têm sido obtidos com hemácias do tipo sanguíneo O, nosso próximo objetivo foi avaliar a influência dos grupos sanguíneos A, B e O na eritrofagocitose *in vitro*. As interações entre o parasito e as proteínas e antígenos dos grupos sanguíneos já são

bastante conhecidas na malária, principalmente no que tange ao entendimento dos mecanismos envolvidos na invasão dos eritrócitos por estes parasitos (CHANG *et al.*, 2005; revisto por MILLER *et al.*, 2013). A influência destes grupos sanguíneos na gravidade da doença também é bem relatada para as infecções por *P. falciparum*, mas o papel de cada grupo sanguíneo na determinação da gravidade por esta espécie parasitária ainda é bastante controverso. Isso se dá principalmente pelas limitações metodológicas dos estudos como tamanho populacional amostral inadequado e a falta de nítida associação com a gravidade/proteção nas infecções por *P. falciparum*. Nestas condições, os trabalhos utilizados para considerar a influência de cada grupo sanguíneo na determinação de gravidade foram aqueles que associaram a distribuição dos grupos sanguíneos e os achados clínicos (FISCHER & BOONE, 1998; LELL *et al.*, 1999; LOSCERTALES, 2005; PATHIRANA *et al.*, 2005; FRY *et al.*, 2008; TIMMANN *et al.*, 2012; WOMAS *et al.*, 2012; GOEL *et al.*, 2015; SILVA & MOTA, 2015). Estes trabalhos demonstraram o papel protetivo do grupo sanguíneo O para as infecções por *P. falciparum*, evidenciando que os mecanismos patofisiológicos como a citoadesão e formação de rosetas seriam os mais importantes (BARRAGAN *et al.*, 2000; ROWE *et al.*, 2007; WOMAS *et al.*, 2012; GOEL *et al.*, 2015; SILVA & MOTA, 2015), assim como a remoção dos eritrócitos infectados por eritrofagocitose no baço (WOLOFSKY *et al.*, 2012).

Na malária vivax a anemia é a complicação mais frequente. Entretanto, não existem relatos de associação entre os grupos sanguíneos e a gravidade da infecção. Nesta direção utilizamos os parâmetros clínicos, como os níveis de hemoglobina e hematócrito como determinantes de anemia e precedemos à avaliação da influência dos grupos sanguíneos nas taxas de eritrofagocitose. Para isso, 18 indivíduos doadores de eritrócitos saudáveis foram avaliados, sendo 6 de cada grupo sanguíneo (A, B e O) através da opsonização dos eritrócitos coletados com IgGs purificadas de soros de pacientes anêmicos, não anêmicos, indivíduo saudável e anticorpo policlonal comercial α -eritrócitos. Foi utilizado um controle sem adição de IgGs (Organograma 1).

De acordo com os resultados da análise de escalonamento, NMDS, evidenciamos padrões diferenciais entre todas as taxas de eritrofagocitose de acordo com os grupos sanguíneos A, B e O. Eritrócitos do tipo O opsonizados por IgGs de pacientes infectados por *P. vivax* formaram claramente um cluster separado dos agrupamentos verificados para os dados com eritrócitos dos grupos A e B (Figura 12). A ordem de grandeza destas taxas de eritrofagocitose verificada estatisticamente pelo modelo generalizado, GLM, foi $A < B < O$,

demonstrando que os eritrócitos do grupo sanguíneo O são significativamente mais suscetíveis à eritrofagocitose *in vitro* (Figura 13). O agrupamento dos grupos sanguíneos A e B por NMDS pode ser explicada por características intrínsecas do método como o alto valor do stress (0,22) verificado, que apesar de aceitável indica que algumas distâncias de dissimilaridades entre as amostras podem se diferenciar das reais. A análise por GLM, mais detalhada e sensível por evitar qualquer perda de dados, permitiu a melhor separação entre os grupos A e B. As análises de GLM demonstraram, ainda, que entre todos os grupos sanguíneos os eritrócitos opsonizados com IgGs de pacientes anêmicos foram removidos de maneira mais eficiente por macrófagos do que aqueles opsonizados por IgGs de pacientes não anêmicos (Figura 13).

A variação das taxas dos eritrócitos tratados com IgGs de pacientes anêmicos dentro de cada grupo sanguíneo, sendo maior que as taxas do saudável nos grupos A e O e estatisticamente igual a do saudável do grupo B e ainda maior que as dos não anêmicos em todos os grupos sanguíneos, demonstra a potencialidade de remoção dos eritrócitos do grupo O se comparado aos demais (Quadro 13, Figura 14).

O único trabalho na literatura que elucida o papel dos grupos sanguíneos na eritrofagocitose foi conduzido com *P. falciparum* utilizando eritrócitos infectados e por isso demonstrou o papel protetor do grupo sanguíneo O (WOLOFSKY *et al.*, 2012). Os eritrócitos infectados deste grupo sanguíneo apresentaram taxas de eritrofagocitose maiores que os do B ou do A, evidenciando a maior remoção dos eritrócitos pertencentes ao grupo sanguíneo O. Este trabalho também incluiu eritrócitos não parasitados, que apresentaram baixas taxas de remoção pelos macrófagos *in vitro* e *in vivo* nos modelos murinos, se comparado aos infectados e nenhuma diferença entre os grupos sanguíneos. Como estes eritrócitos não foram opsonizados, as baixas taxas encontradas podem ser justificadas pela ausência de imunoglobulinas opsonizantes. Este estudo avaliou, ainda, a formação de *clusterings* de banda 3 na membrana dos eritrócitos infectados e perceberam que ela foi maior no grupo sanguíneo O.

Como a observação de associação entre os grupos sanguíneos e anemia na malária vivax nunca foi relatada antes, podemos concluir, através dos nossos resultados, que num primeiro momento o grupo sanguíneo O seria protetor como já relatado nas infecções para o *P. falciparum*, propiciando melhor remoção dos eritrócitos infectados por *P. vivax* da circulação, porém como eritrócitos deste grupo sanguíneo são mais suscetíveis à fagocitose *in vitro* podem levar a maior remoção dos eritrócitos não parasitados com o andamento da

infecção e desta forma contribuir para a anemia. Sendo assim, o grupo sanguíneo O a partir da sua maior habilidade de ligar à IgGs pode ter um papel protetor uma vez que os eritrócitos infectados podem ser mais facilmente removidos da circulação, entretanto devido exatamente a essa maior capacidade de ligação à anticorpos e conseqüentemente à maior suscetibilidade de eritrócitos do tipo O à fagocitose, estas células seriam facilmente removidas da circulação mesmo não estando infectadas pelo parasito.

Após a obtenção de resultados positivos da relação da eritrofagocitose com a anemia o último objetivo desta dissertação foi avaliar a influência da gravidade na distribuição das taxas de eritrofagocitose, e, para isso foram utilizados soros individuais inativados provenientes de pacientes graves e não graves para a sensibilização dos eritrócitos saudáveis avaliando-se posteriormente a correlação das taxas de eritrofagocitose e os níveis de hemoglobina e hematócrito.

Os resultados das análises estatísticas de correlação demonstraram uma correlação inversa entre estas duas variáveis, indicando que as taxas de eritrofagocitose aumentam com a diminuição dos níveis de hemoglobina e hematócrito dos pacientes (Figura 15). Todos os pacientes graves incluídos neste estudo eram anêmicos no momento da coleta dos soros, mas apenas um foi classificado como grave pelos baixos níveis de hemoglobina em conformidade com a OMS e este único paciente foi o que apresentou a maior média das taxas de eritrofagocitose (5,58%). Entretanto, cabe ressaltar que os critérios de definição de gravidade nas infecções por *P. vivax* são bastante controversos e aqueles valores e medidas utilizados para *P. falciparum* não necessariamente podem ser considerados na malária vivax. Mas, claramente esses resultados apontam para a participação da eritrofagocitose na destruição dos eritrócitos podendo contribuir para os quadros graves de anemia.

As taxas de eritrofagocitose obtidas para os 18 pacientes foram reanalisadas por um modelo estatístico de ordenação que permitiu avaliar a influência de diversas variáveis na nova ordenação dos dados, assim como a utilização de variáveis inicialmente correlacionadas. Sendo assim, todos os fatores hematológicos dos pacientes foram primeiramente analisados por Mann Whitney U, a fim de verificar diferenças entre os resultados destes exames nos pacientes graves e não graves, sugerindo um possível papel na gravidade da doença. Os parâmetros selecionados foram: hemoglobina e hematócrito, ambos indicativos de anemia, creatinina que é indicativo de dano renal, alanina aminotransferase que é indicativo de dano ao fígado e, por último, albumina e proteínas totais que não são bons indicadores de complicações clínicas importantes (Quadro 12). Todos os resultados destes exames,

juntamente com as taxas de eritrofagocitose, para cada paciente, foram reordenadas pela análise de componentes principais, PCA, demonstrando nítida separação entre os pacientes graves dos não graves, sendo que as taxas de eritrofagocitose apresentaram relevante influência na separação (Figura 16). Levando em consideração que a anemia é multifatorial e que a gravidade também o é, podemos inferir a partir deste resultado que a eritrofagocitose contribui de maneira importante para a gravidade na malária vivax. A nossa próxima meta será a avaliação do papel dos grupos sanguíneos na gravidade na malária vivax.

Em síntese, nossos resultados evidenciaram um relevante papel da fagocitose mediada por IgGs na destruição de eritrócitos não infectados *in vitro*, sendo que estes, quando pertencentes ao grupo sanguíneo O, são mais suscetíveis à esta destruição. Além disso, evidenciamos nítida relação entre as taxas de eritrofagocitose e a gravidade da malária vivax. Desta forma, acreditamos ter gerado dados importantes que ampliarão a compreensão sobre os mecanismos envolvidos na anemia em infecções por *P. vivax*.

7- CONCLUSÕES

- A opsonização de eritrócitos não infectados por IgGs purificadas do soro de pacientes com malária vivax e anêmicos induz a uma expressiva fagocitose por macrófagos *in vitro*.
- Eritrócitos não infectados do grupo sanguíneo O são mais suscetíveis a eritrofagocitose *in vitro* quando comparados aos eritrócitos dos grupos A e B.
- A eritrofagocitose *in vitro* pode ser considerada um biomarcador de morbidade na malária vivax.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA SH. Hematopoiesis in human malaria. *Blood Cells*, v.(16), p.401–419, 1990.

ABDALLA SH. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. *Annals of Tropical Paediatric*, v.(8), p.250–258, 1988.

ABDALLA SH, WEATHERALL DJ, WICKRAMASINGHE SN, HUGHES M. The anaemia of *P. falciparum* malaria. *Br. Journal of Haematology*, v.(46), p.171–183, 1980.

ABELE DC, TOBIE JE, HILL GJ, CONTACOS PG, EVANS CB. Alterations in serum proteins and 19s antibody production during the course of induced malarial infections in man. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.(14), p.191-197, 1965.

ABRO AH, USTADI AM, YOUNIS NJ, ABDOU AS, HAMED DA, SALEH AA. Malaria and hematological changes. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, v.(24), p.287-291, 2008.

ADA S, SHERMAN IW. Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem*, v.(12), p.373–384, 2002.

AKINBOVE DO, OGUNRINADE AF. Malaria and loiasis among blood donors at Ibadan, Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine*, v.(81), p.398-399, 1987.

ALEXANDRE MA, FERREIRA CO, SIQUEIRA AM, MAGALHÃES BL, MOURÃO MPG, LACERDA MV, ALECRIM MGC. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian. *Emerging Infectious Diseases Journal*, v (16), p.1611–1614, 2010.

ALMEIDA LB, BARBOSA M, MATINEZ-ESPINOSA FE. Malaria among women aged 10 to 49 years, according to SIVEP-Malaria, Manaus, State of Amazonas, 2003–2006. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.(43), p.304–308, 2010.

AMINO R, GIOVANNINI D, THIBERGE S, GUEIRARD P, BOISSON B, DUBREMETZ JF, PREVOST MC, ISHINO T, YUDA M, MENARD R. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe*, v.(3), p.88–96, 2008.

AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, CELLI S, SHORTE S, FRSCHKNECHT F, MÉNARD R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, v.12, p.220-224, 2006.

ANDERSON MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, v.(26), P. 32–46, 2001.

ANDRADE BB. Identificação de potenciais determinantes imunológicos de gravidade da malária humana. P.158, (Doutorado em Patologia Humana). Universidade federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Bahia (Brasil), 2010a.

ANDRADE BB, REIS-FILHO A, SOUZA-NETO SM, CLARENCIO J, CAMARGO LM, BARRAL A, BARRAL-NETO M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, v.(9), p.13, 2010b.

ANNIS AM & SPARROW RL. Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfusion*, v.(27), p.233-238, 2002.

ANSTEY NM, DOUGLAS NM, POESPOPRODJO JR, PRICE RN. Chapter 3 – *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in Parasitology*, v.80, p. 151-201, 2012.

ANSTEY NM, GRANGER DL, HASSANALI MY, MWAIKAMBO ED, DUFFY PE, WEINBERG JB. Nitric oxide, malaria, and anemia: Inverse relationship between nitric oxide production and hemoglobin concentration in asymptomatic, malaria-exposed children. *The American Journal of Tropical Medicine*, v.(61), p.249-252, 1999.

ANSTEY NM, HANDOJO T, PAIN MCF, KENANGALEM E, TJITRA E, PRICE RN, MAGUIRE P. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *The Journal of Infectious Diseases*, v.195, p.589-596, 2007.

ANSTEY NM, RUSSELL B, YEO TW, PRICE RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends in Parasitology Journal*, v.(25), p.220-227, 2009.

ARESE P, TURRINI F, GINSBURG H. Erythrophagocytosis in Malaria: Host Defence or Menace to the Macrophage? *Parasitology Today*, v.(7), p.25-28, 1991.

ATHREYA BH, CORIELL LL. Relation of blood groups to infection a survey and review of data suggesting possible relationship between malaria and blood groups. *The American Journal Epidemiology*, v.(86),p.292-304, 1967.

AWAH NW, BALOGUN H, ACHIDI E, MARIUBA LA, NOGUEIRA PA, ORLANDI P, TROYE-BLOMBERG M, GYSIN J, BERZINS K. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RAP-2/RSP-2 in relation to anemia in Cameroonian children. *Parasite Immunology*, v.(33), p. 104-115, 2011.

AWAH NW, TROYE-BLOMBERG M, BERZINS K, GYSIN J. Mechanisms of malarial anaemia: potential involvement of the *Plasmodium falciparum* low molecular weight rhoptry-associated proteins. *Acta Tropica*, v.(112), p.295-302, 2009.

AYI K, FINNEY C, LILES WC, CONRAD W, KEVIN KK. Modification of CD47 levels on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, p. 244-244, 2009.

BACK DZ, KOSTOVA EB, KRAAIJ MV, BERG TKVD, BRUGGEN RV. Os macrophages and red blood cells; a complex love story. *Frontiers in Physiology*, v.(5), p.1-11, 2014.

BAER K, ROOSEVELT M, CLARKSON Jr AB, ROOIJEN N, SHNIEDER T, FREVERT U. Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cell Microbiology*, v.(9), p.397-412, 2007.

BARBER BE, WILLIAM T, GRIGG M. A prospective comparative study of knowlesi, falciparum and vivax malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from *Plasmodium knowlesi* and *P. vivax* but no mortality with early referral and artesunate therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v.(56), p.383–397, 2012.

BARCUS MJ, BASRI H, PICARIMA H, MANYAKORI C, SEKARTUTI, ELYAZAR I, BANGS MJ, MAGUIRE JD, BAIRD JK. Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in Northeastern Indonesian Papua, *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v.(77), p.984-991, 2007.

BARGIERI DY, ANDENMATTEN N, LAGAL V, THIBERGE S, WHITELAW JA, TARDIEUX I, MEISSNER M, MÉNARD R. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. *Nature*, v.4, p.2552, 2013.

BARRAGAN A, KREMSNER PG, WAHLGREN M, CARLSON J. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* resetting. *Infection and Immunity*, v.(68), p.2971-2975, 2000

BEIGUELMAN B, ALVES FP, MOURA MM. The association of genetic markers and malaria infection in the Brazilian western Amazonian region. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v.(98), p.455-460, 2003.

BESSIS M. Erythroblastic island, functional unity of bone marrow. *Review hematology*, v.(13), p. 8-11, 1958.

BESSIS MC & BRETON-GORIUS J. Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review. *Blood*, v.(19), p. 635-663, 1962.

BETTIOL E, HOEF DLV, CARAPAU D, RODRIGUEZ A. Efficient phagosomal maturation and degradation of *Plasmodium*-infected erythrocytes by dendritic cells and macrophages. *Parasite Immunology*, v.(32), p.389-398, 2010.

BERENDT AR, FERGUSON DJP, NEWBOLD CI. Sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: Sticky cells and sticky problems. *Parasitology Today*, v.(6), p.247-254, 1990

BERLIN NI, & BERK PD. The biological life of the red cell. na *The Red Blood Cell*. Surgenor DM (ed.). *New York: Academic Press*, p. 957–1019, 1975.

BIGNAMI A & BASTIANELLI A. Observations of estivo-autumnal malaria. *Riforma Medica*, 1889

BILGIN R, YALCIN MS, YUCEBILGIC g, KOLTAS IS, YAZAR S. Oxidative stress in vivax malaria. *Korea Journal of Parasitology*, v.50, p.375-377, 2012.

BOAS FE, FORMAN L, BEUTLER E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*, v.(95), p.3077–3081, 1998.

BOU TLIS CS, RILEY EM, ANSTEY NM, DE SOUZA JB. Glycosylphosphatidylinositols in malaria pathogenesis and immunity: potential for therapeutic inhibition and vaccination. *Microbiology Immunology*, v.(297), p.145-185, 2005.

BRATOSIN D, MAZURIER J, TISSIER P, ESTAQUIER J, HUART JJ, AMEISEN JC, AMINOFF D, MONTREUIL J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. *Biochimie*, v.(80), p.173-195, 1998.

BRATOSIN D, MAZURIER J, TISSIER JP, SLOMIANNY C, ESTAQUIER J, RUSSO-MARIE F, HUART JJ, FREYSSINET JM, AMINOFF D, AMEISEN JC, MONTREUIL J. Molecular mechanisms of erythrophagocytosis. Characterization of the senescent erythrocytes that are phagocytized by macrophages. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, v. (320), p.811-818, 1997.

CARLSON J, HELMBY H, HILL AV, BREWSTER D, GREENWOOD BM, WAHLGREN M. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet*, v.(336), p.1457-1460, 1990

CARLTON JM, ADAMS JH, SILVA JC, BIDWELL SL, LORENZI H, CALER E, CRABTREE J, ANGIUOLI SV, MERINO EF, AMEDEO P, CHENG Q, COULSON RM, CSERTI CM & DZIK WH. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*, v.(110), 2007.

CARVALHO BO, LOPES SC, NOGUEIRA PA, ORLANDI PP, BARGIERI DY, BLANCO YC, MAMONI R, LEITE JA, RODRIGUES MM, SOARES IS, OLIVEIRA TR, WUNDERLICH G, LACERDA MV, DEL PORTILLO HA, ARAUJO MO, RUSSEL B, SUWANARUSK R, SNOUNOU G, RENIA L, COSTA FT. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *Journal of Infectious Disease*, v.(202), p.638-647, 2010.

CASALS-PASCUAL C, KAI O, CHEUNG JO, WILLIAMS S, LOWE B, NYANOTI M, WILLIAMS TN, MAITLAND K, MOLYNEUX M, NEWTON CR, PESHU N, WATT SM, ROBERTS DJ. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, v.(108), p.2569-2577, 2006.

CELADA A, CRUCHAUD A, PERRIN LH. Assessment of immune phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. A method for visualizing infected red blood cells ingested by phagocytes. *Journal of Immunological Methods*, v.(63), p.263-271, 1983.

CELADA A, CRUCHAUD A, PERRIN LH. Opsonic activity of human immune serum on *in vitro* phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells by monocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, v.(47), p.635, 1982.

CHAGAS EC, DO NASCIMENTO CT, DE SANTANA FILHO FS, BOTTO-MENEZES CH, MARTINEZ-ESPINOSA FE. Impact of malaria during pregnancy in the Amazon region. *Revista Panamericana de Salud Publica*, v.(26), p.203-208, 2009.

- CHAMBERS DR, PROCTER J, MURATOVA O. In vitro RBC exposure to *Plasmodium falciparum* has no effect on RBC antigen expression. *Transfusion Medicine*, v.(12), p.213-219, 2002.
- CHANG K, STEVENSON MM. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood stage malaria. *International Journal for Parasitology*, v.(34), p.1501-1516, 2004.
- CHOTIVANICH KT, PUKRITTAVAKAMEE S, SIMPSON JA, WHITE NJ, UDOMSANGPETCH R. Characteristics of *Plasmodium vivax*-infected erythrocyte rosettes. *The American Journal of Tropical Medical and Hygiene*, v.(59), p.73–76, 1998.
- CHOTIVANICH K, UDOMSANGPETCH R, SUWANARUSK R, PUKRITTAYAKAMEE S, WILAIRATANA P, BEESON JG, DAY NP, WHITE NJ. *Plasmodium vivax* adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS One*, V.(7), P.34509, 2012.
- CLARKE KR & GREEN RH. Statistical design and analysis for a ‘biological effects’ study. *Marine Ecology Progress Series*, v.(46), p.213–226. 1988.
- COHEN S, BUTCHER GA. Serum antibody in acquired malarial immunity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.(65), p.125–13, 1971.
- COLEMAN MC, BRUCE A, RENCRICCA NJ. Malaria: decreased survival of transfused normal erythrocytes in infected rats. *Journal of Parasitology*, v.(1), p.138-140, 1976.
- COLLINS WE, JEFFERY GM, ROBERTS JM. A retrospective examination of reinfection of humans with *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v.(70), p.642–644, 2004.
- COPPI A, PINZON-ORTIZ C, HUTTER C, SINNIS P. The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *The Journal of Experimental Medicine*. v.(201), p.27-33, 2005
- COPPI A, TEWARI R, BISHOP J, LAWRENCE R, ESKO J, BILLKER O, SINNIS P. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and to productively invade cells. *Cell Host Microbe*, v.(2), p.316–327, 2007.
- COSTA FT, LOPES SC, ALBRECHT L, ATAÍDE R, SIQUEIRA AM, SOUZA RM, RUSSELL B, RENIA L, MARINHO CR, LACERDA MV. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. *International Journal for Parasitology*, v.(42), p.1099-1105, 2012.
- COWMAN AF, CRAB BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, v.(124), p.755-766, 2006.
- COX-SINGH J, DAVIS TME, LEE KS, SHASUL SSG, MATUSOP A, RATNAMS, RAHMAN HA, CONWAY DJ, SINGH B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Disease*, v.46, p.165-171, 2008.

CRABB BS, DEL PORTILLO HA, ESSIEN K, FELDBLYUM TV, FERNANDEZ-BECERRA C, GILSON PR, GUEYE AH, GUO X, KANG'A S, KOOIJ TW, KORSINCZKY M, MEYER EV, NENE V, PAULSEN I, WHITE O, RALPH SA, REN Q, SARGEANT TJ, SALZBERG SL, STOECKERT CJ, SULLIVAN SA, YAMAMOTO MM, HOFFMAN SL, WORTMAN JR, GARDNER MJ, GALINSKI MR, BARNWELL JW, FRASER-LIGGETT CM. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*, v. (455), p.757-763, 2008.

DAÍ C, KRANTZ SB. Interferon induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. *Blood*, v.(93), p.3309–3316, 1999.

DANIELS G, REID ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*, v.(50), p.281-289, 2010.

DEL PORTILLO HA. Spleen rupture in a case of untreated *Plasmodium vivax* infection. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 6, e. 1934, 2012.

DINKLA S, NOYOTNY VM, JOOSTEN I, BOSMAN GJ. Storage-induced changes in erythrocyte membrane proteins promote recognition by autoantibodies. *PLoS One*, V.(7), P.42250, 2012.

DONATI D, MOK B, CHENE A, XU H, THANGARAJH M, GLAS R, CHEN Q, WAHLGREN M, BEJANARO MT. Increased B cell survival and preferential activation of the memory compartment by a malaria polyclonal B cell activator. *The Journal of Immunology*, v.(177), p.3035-3044, 2006.

DONDORP AM, ANGUS BJ, CHOTIVANICH K, SILAMUT K, RUANGVEERAYUTH R, HARDEMAN MR, KAGER PA, VREEKEN J, WHITE NJ. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.(60), p.733-737, 1999.

DOUGLAS NM, ANSTEY NM, BUFFET PA, POESPOPRODJO JR, YEO TW, WHITE NJ, PRICE RN. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal* v.(11), p.135, 2012.

DUNKELBERGER JR, SONG WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell*, v.(20), p.34–50, 2010.

ECHEVERRI M, TOBÓN A, ALVAREZ G, CARMONA J, BLAIR S. Clinical and laboratory findings of *Plasmodium vivax* malaria in Colombia, 2001. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v.(45), p.29-34, 2003,

EJIGIRI I, SINNIS P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current Opinion in Microbiology*, v.(12), p.401-407, 2009.

EKVALL H. Malaria and anemia. *Current Opinion of Hematology*, v.(10), p. 108-114, 2003.

EREL O, KOCYIGIT A, AVCI S, AKTEPE N, BULUT V. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clinical Biochemistry*, v.(30), p.631-639, 1997.

FACER CA, AGIOSTRATIDOU G. High levels of anti-phospholipid antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* and in *P. vivax* malaria. *Clinical & Experimental Immunology*, v.(95), p.304–309, 1994.

FACER CA, BRAY RS, BROWN J. Direct Coombs antiglobulin reactions in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. I. Incidence and class specificity. *Clinical and Experimental Immunology*, v.35, p.119-127, 1979.

FACER CA. Direct Coombs antiglobulin reaction in Gambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and Experimental Immunology*, v.39, p.279-288, 1980.

FERNANDES AA, CARVALHO LJ, ZANINI GM, VENTURA AM, SOUZA JM, COTIAS PM, SILVA-FILHO IL, DANIEL-RIBEIRO CT. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.(15), p.650–658, 2008.

FISCHER PR, BOONE P. Short report: Severe malaria associated with blood group. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.(58), p.122-123, 1998.

FOLLER M, HUBER SM, LANG F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, v.(60), p.661-668, 2008.

FORMAGLIO P, TAVARES J, MÉNARD R, AMINO R. Loss of host cell plasma membrane integrity following cell traversal by *Plasmodium* sporozoites in the skin. *Parasitology International*, v.63, p.237-244, 2014.

FOSSATI-JIMACK L, AZEREDO DA SILVEIRA S, MOLL T, KINA T, KUYPERS FA, OLDENBORG PA, REININGER L, IZUI S. Selective increase of autoimmune epitope expression on aged erythrocytes in mice: implications in anti-erythrocyte autoimmune responses. *Journal Autoimmunity*, v.(18), p.17-25, 2002.

FRY AE, GRIFFITHS MJ, AUBURN S. Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Human Molecular Genetics*, v.(17), p,567–576, 2008.

GALLO V, SKOROKHOD AO, SCHWARZER E, ARESE P. Simultaneous determination of phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized and non-parasitized red blood cells by flow cytometry. *Malaria Journal*, v.(11), p.428, 2012.

GARBY L, NOYES WD. Studies on hemoglobin metabolism. II. Pathways of hemoglobin iron metabolism in normal man. *Journal Clinical Investigation*, v.(38), p.1484-1486, 1959.

GENTON B, D'ACREMONT V, RARE L, BAEA K, REEDER JC, ALPERS MP, MULLER I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLOS Medicine*, v.(5), p.127, 2008.

GIRIBALDI G, ULLIERS D, MANNU F. Growth of *Plasmodium falciparum* induces stage dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of

complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes. *British journal of Haematology*, v.(113), p.492-499,2001.

GLUSHAKOVA S, YIN D, LI D, ZIMMERBERG J. Membrane Transformation during Malaria Parasite Release from Human Red Blood Cells. *Current Biology*, v.(15), p.1645-1650, 2005.

GOEL S, PALMKVIST M, MOLL K, JOANNIN N, LARA P, AKHOURI RR, MORADI N, OJEMALM K, WESTMAN M, ANGELETTI D, KJELLIN H, LEHTIO J, BLIXT O, IDESTROM L, GAHMBERG CG, STORRY JR, HULT AK, OLSSON ML, HEIJNE GV, NILSSON I, WAHLGREN M. Rifins are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature Medicine*, v.(21), p.314-317, 2015.

GOMES AP, VITORINO RR, COSTA AP, MENDONÇA EG, OLIVEIRA MGA, BATISTA RS. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v.(23) p.3, 2011.

GREENWOOD BM, FIDOCK DA, KYLE DE, KAPPE SHI, ALONSO PL, COLLINS HF. Malaria: progress, perfils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation*, v.(118), p.1266, 2008.

GUERRA CA, HOWES RE, PATIL AP, GETHING PW, VAN BOECKEL TP, TEMPERLEY WH, KABARIA CW, TATEM AJ, MANH BH, ELYAZAR IR, BAIRD JK, SNOW RW, HAY SI. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.(4), p.774, 2010.

GUERRA CA, SNOW RW, HAY SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends in Parasitology*, v.(22), p.353-358, 2006.

GUPTE SC, PATEL AG, PATEL TG. Association of ABO groups in malaria infection of variable severity. *Journal of Vector Borne Disease*, v.(49), p.78-81, 2012.

GWAMAKA M, FRIED M, DOMINGO G, DUFFY PE. Early and extensive CD55 loss from red blood cells supports a causal role in malarial anemia. *Malaria Journal*, v.10, p.386, 2011.
HAN C, LIN Y, SHANG G, ZHANG Z, SUN X, WANG Z, WEI C, DENG Y, ZHANG L, BU L, SHAO D, WANG H. Plasma concentrations of malaria parasite-derived macrophage migration factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity. *Clinical and Vaccine immunology*, v.(17), p.1524 –1532, 2010.

GYAN B, KURTZHALS JAL, AKANMORI BD, OFORI M, GOKA BQ, HVIID L, BEHR C. Elevated levels of nitric oxid and low levels of haptoglobin are associated with severe malarial anaemia in african children. *Acta Tropica*, v. 83, p. 133-140, 2002

HANDAYANI S, CHIU DT, TJITRA E, KUO JS, LAMPAH D, KENANGALEM E, RENIA L, SNOUNOU G, PRINCE RN, ANSTEY NM, RUSSELL B. High deformability of *Plasmodium vivax*-infected red blood cells under microfluidic conditions. *The Journal of Infectious Diseases*, v.(199), p.445-450, 2009.

HANS D, PATTNAIK P, BHATTACHARYYA A, SHAKRI AR, YAZDANI SS, SHARMA M, CHOE H, FARZAN M, CHITNIS CE. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax*

domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Molecular Microbiology*, v.55, p.1423-1434, 2005.

HEMMER CJ, HOLST FG, KERN P, CHIWAKATA CB, DIETRICH M, REISINGER EC. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or ovale than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Tropical Medicine & International Health*, v.11, p.817-823, 2006.

HEMPEL C, KOHNKE H, MARETTY L, JENSEN PO. *Plasmodium falciparum* avoids change in erythrocytic surface expression of phagocytosis markers during inhibition of nitric oxide synthase activity. *Molecular and Biochemical*, v.(198), p.29-38, 2014.

HENTZE MW, MUCKENTHALER MU, ANDREWS NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, v.(117), p.285, 2004.

HO M, WEBSTER HK. Immunology of human malaria. A cellular perspective. *Parasite Immunology*, v.(11), p.105-116, 1989.

HORNIG R, LUTZ HU. Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-band 3 and anti-spectrin antibodies. *Experimental Gerontology*, v.(35), p.1025–1044, 2000.

HOSOI E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *The journal of medical investigation*, v.(55), p.174-182, 2008.

ISHINO T, YANO K, YUDA M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLOS Biology*, v.(2), p.4, 2004.

JAIN M, KAUR M. Comparative study of microscopic detection methods and haematological changes in malaria. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, v.(48), p.464-467, 2005.

JAIN V, SINGH PP, SILAWAT N, PATEL R, SAXENA A, BHARTI PK, SHUKLA M, BISWAS S, SINGH N. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. *Acta Tropical*, v.(113), p.263-268, 2010.

JAKEMAN GN, SAUL A, HOGARTH WL, COLLINS WE. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology*, v.(119), p.127–133, 1999.

JELKMANN W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J. Interferon Cytokine Res*, v.(18), p.555–559, 1998.

KARUNAWEEERA ND, GRAU GE, GAMAGE P, CARTER R, MENDIS KN. Dynamics of fever and serum levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical paroxysms in *Plasmodium vivax* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v.(89), p.3200-3203, 1992.

KASLIWAL P, RAO MS, KUJUR R. *Plasmodium vivax* malaria: an unusual presentation. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, v.(13), p.103-105, 2009.

KASSIM OO, EJEZIER GC. ABO blood groups in malaria and schistosomiasis haematobium. *Acta Tropica*, v.(39), p.179-184, 1982.

KAY MM, GOODMAN SR, SORENSEN K, WHITFIELD CF, WONG P, ZAKI L, RUDLOFF V. Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*, v.(80), p.1631–1635, 1983.

KAY MM. Immunoregulation of cellular life span. *Ann. N. Y. Acad. Scienci*, v.(1057), p.85–111, 2005.

KAY MM. Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells. *Nature*, v.(289), p.491-494, 1981.

KAY MM. Mechanism of removal of-senescent cells by human macrophages *in situ*. *Proceedings of the National Academy os Sciences*, v.(72), p.3521-3525, 1975.

KIM A, PARK YK, LEE JS, CHUNG MH, KIM ES. A case of symptomatic splenic infarction in vivax malaria. *Korean Journal of Parasitology*, v.(45), p.55-58, 2007.

KITCHEN SF, SAUNDERS WB. Symptomatology: general considerations in falciparum malaria. *In Malariology*, v.(2), p.996-1017, 1949.

KLEIN E, RONEZ E. Peripheral hemophagocytosis in malaria infection. *Blood*, v.(119), p.910, 2012

KOBAYASHI N, KARISOLA P, PENA-CRUZ V, DORFMAN DM, JINUSHI M, UMETSU SE, BUTTE MJ, NAGUNO H, CHERNOVAL I, ZHU B, SHARPE AH, ITO S, DRANOFF G, KAPLAN GG, CASASNOVAS JM, UMETSU DT, DEKRUYFF RH, FREEMAN GJ. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity*, v.(27), p.927–940, 2007.

KOCHAR DK, DAS A, KOCHAR SK, SAXENA V, SIROCHI P, KOCHAR A, KHATRI MP, GUPTA V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in Northwestern India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygyene*, v.(80), p.194-198, 2009.

KOCHAR DK, SAXENA V, SINGH N, KOCHAR SK, KUMAR SV, DAS A. *Plasmodium vivax* malária. *Emerging Infectious Diseases*, v.(11), p.132-134, 2005.

KORIR JC, MAGAMBO JK, MWATHA JK, WAITUMBI JN. B-cell activity in children with malaria. *Malaria Journal*, v.11, p.e66, 2012.

KROTOSKI WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, v.(79), p.1-11, 1985.

LACERDA MVG, FRAGOSO SC, ALECRIM MG, ALEXANDRE MA, MAGALHÃES BM, SIQUEIRA AM, FERREIRA LC, ARAÚJO JR, MOURÃO MP, FERRER M, CASTILLO P, MARTIN-JAULAR L, FERNANDEZ-BECERRA C, DEL PORTILLO H, ORDI J, ALONSO PL, BASSAT Q. Postmortem characterization of patients with clinical

diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clinical Infectious Disease*, v.(55), p.67-74, 2012.

LACERDA MVG, HIPÓLITO JR, PASSOS LNM. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*, v.(41), p.522–523, 2008.

LAMIKANRA AA, THERON M, KOUIJ TW, ROBERTS DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One*, v.(4), p.8446, 2009.

LAMPAH DA, YEO TW, HARDIANTO SO, TJITRA E, KENANGALEM E, SUGIARTO P, PRICE RN, ANSTEY NM. Coma associated with microscopy-diagnosed *Plasmodium vivax*: a prospective study in Papua, Indonesia. *PloS Neglected Tropical Disease*, v.(5), p.1032, 2011.

LANÇA EF, MAGALHÃES BM, VITOR-SILVA S, SIQUEIRA AM, BENZECRY SG, ALEXANDRE MA, O'BRIEN C, BASSAT Q, LACERDA MV. Risk factors and characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to pediatric intensive care units in the Brazilian Amazon. *PLoS One*, v.(7), p.35406, 2012.

LANG KS, LANG PA, BAUER C, DURANTON C, WIEDER T, HUBER SM, LANG F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiology Biochemistry*, v.(15), p.195-202, 2005.

LA RAJA M. Erythrophagocytosis by peripheral monocytes in *Plasmodium falciparum* malária. *Haematologica*, v.(87), 2002.

LAS SALAS B, SEGURA C, PABÓN A, LOPES SCP, COSTA FTM, BLAIR S. Adherence to human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) of *Plasmodium vivax* isolates from Colombia. *Journal Malaria*, v.(12), p.347, 2013.

LEE WC, MALLERET B, LAU YL, MAUDUIT M, FONG MY, CHO JS, SUWANARUSK R, ZHANG R, ALBRECHT L, COSTA FT, PREISER P, MCGREADY R, RENIA L, NOSTEN F, RUSSELL B. Glycophorin C (CD236R) mediates vivax malaria parasite rosetting to normocytes. *Blood*, v.(123), p.100-109, 2014.

LELL B, MAY J, SCHMIDT-OTT RJ, LEHMAN LG, LUCKNER D, GREVE B, MATOUSEK P, SCHMID D, HERBICH K, MOCKENHAUPT FP, MEYER CG, BIENZLE U, KREMSNER PG. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clinical Infectious Diseases*, v.(28), p. 794-799, 1999.

LIBREGTS SF, GUTIÉRREZ L, BRUIN AM, WENSVEEN FM, PAPADOPOULOS P, IJCKEN W, OZGUR Z, PHILIPSEN S, NOLTE MA. Chronic IFN- γ production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood*, v.118, p. 2578-2588, 2011.

LITTMAN E. Splenectomy in hereditary spherocytosis: effect on course of relapsing vivax malaria. *American Journal Medical Sciences*, v.(267), p.53-56, 1974.

LOOAREESUWAN S, DAVIS TM, PUKRITTAYAKAMEE S, SUPANARANOND W, DESAKORN V, SILAMUT K, KRISHNA S, BOONAMRUNG S, WHITE NJ. Erythrocyte survival in severe falciparum malaria. *Acta Tropical*, v.(48), p. 263-270, 1991.

LOOAREESUWAN S, HO M, WATTANAGOON Y, WHITE NJ, WARRELL DA, BUNNAG D, HARINASUTA T, WYLER DJ. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *The New England Journal of Medicine*, v.(11), p.675-679, 1987.

LOPES SCP, ALBRECHT L, CARVALHO BO, SIQUEIRA AM, THOMSON-LUQUE R, NOGUEIRA PA, FERNADEZ-BECERRA C, DEL PORTILLO HA, RUSSEL BRUCE M, RÉNIA L, LACERDA MVG, COSTA FTM. Paucity of *Plasmodium vivax* mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. *The Journal of Infectious Diseases*, v.(209), p.1403-1407, 2014.

LOSCERTALES MP & BRABIN BJ. ABO phenotypes and malaria related outcomes in mothers and babies in The Gambia: a role for histo-blood groups in placental malaria? *Malaria Journal*, v.(5), p.1-6, 2006.

LOW PS. Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.(864), p.145–167, 1986.

LUGINBUHL A, NIKOLIC M, BECK HP, WAHLGREN M, LUTZ U. Complement factor D, albumin, and immunoglobulin G anti-band 3 protein antibodies mimic serum in promoting rosetting of malaria-infected red blood cells. *Infection and Immunity*, v.75, p. 1771-1777, 2007.

LUTZ HU, BUSSOLINO F, FLEPP R, FASLER S, STAMMLER P, KAZATCHKINER MD, ARESE P. Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.(84), p.7368–7372, 1987.

LUTZ HU, NATER M, STAMMLER P. Naturally occurring anti-band 3 antibodies have a unique affinity for C3. *Immunology*, v.(80), p.191-196, 1993.

LUTZ HU. Red cell clearance. *Biomed Biochim*, v.(46), p.65-71, 1987.

LUXEMBURGER C, THWAI KL, WHITE NJ, WEBSTER HK, KYLE DE, MAELANKIRRI L, CHONGSUPHAJASIDDHI T, NOSTEN F. The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.(90), p.105–111, 1996.

MACIEJEWSKI JP, SELLEN C, SATO T, CHO HJ, KEEFER LK, NATHAN CF, YOUNG NC. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis *in vitro*. *The Journal of Clinical Investigation*, v.96, p. 1085-1092, 1995.

MAHAJAN RC, NARAIN K, MAHANTA J. Anemia & expression levels of CD35, CD55 & CD59 on red blood cells in *Plasmodium falciparum* malaria patients from India. *Indian Journal of Medical Research*, v.(133), p.662–664, 2011.

MAHGOUB H, GASIM GI, MUSA IR, ADAM I. Severe *Plasmodium vivax* malaria among sudanese children at New Halfa Hospital, Eastern Sudan. *Parasite Vectors*, v.(30), p.154, 2012.

MAIER AG, ALAN FC, LEANN T. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nature Reviews Microbiology*, v.(7), p.341-354, 2009.

MANNING L, LAMAN M, LAW I, BONA C, AIPIT S, TEINE D, WARRELL J, ROSANAS-URGELL A, LIN E, KINIBORO B, VINCE J, HWAIWHANJE I, KARUNAJEEWA H, MICHON P, SIBA P, MUELLER I, DAVIS TM. Features and prognosis of severe malaria caused by *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed *Plasmodium* species in Papua New Guinean children. *PLoS One*, v.(6), 2011.

MATUZAKI T, MURATA Y, OKAZAWA H, OHNISHI H. Functions and molecular mechanisms of the CD47–SIRP α signalling pathway. *Trends in cell biology*, v.(19), p.72-80, 2009.

MARÍN-MENÉNDEZ A, BARDAJÍ A, MARTÍNEZ-ESPINOSA FE, BÔTTO-MENEZES C, LACERDA MV, ORTIZ J, CISTERÓ P, PIQUERAS M, FELGER I, MÜELLER I, ORDI J, DEL PORTILLO H, MENÉNDEZ C, WAHLGREN M, MAYOR A. Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.(4), 2013.

MARTIN SK, MILLER LH, HICKS CU, DAVID-WEST A, UGBODE C, DEANE M. Frequency of blood group antigens in Nigerian children with falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine*, v.(73), p.216-218, 1979.

MCARDLE BH, ANDERSON MJ. Fitting multivariate models to community data: A comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology*, v.(82), p. 290–297, 2001.

MCDEVITT MA, XIE J, SHANMUGASUNDARAM G, GRIFFITH J, LIU A, McDONALD C, THUMA P, GORDEUK VR, METZ CN, MITCHELL R, KEEFER J, DAVID J, LENG L, BUCALA R. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *The Journal of Experimental Medicine*, v.(203), p.1185–1196, 2006.

MCGREGOR IA, TURNER MW, WILLIAMS K, HALL P. Soluble antigens in the blood of African patients with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, v. (7548), p.881-884, 1956.

MEANS RT. Heparin and cytokines in anaemia. *Hematology*, v.(9), p.357-362, 2004.

MEDICA DL, SINNIS P. Quantitative dynamics of *Plasmodium yoelii* sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infection Immunity*, v.(73), p.4363-4369, 2005.

- MÉNARD R. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell Microbiology*, v.(3), p.63–73, 2001.
- MÉNARD R, TAVARES J, COCKBURN I, MARKUS M, ZAVALA F, AMINO R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Immunology*, v.(11), p.711-712, 2013.
- MENDIS KN, THALAMULLA RI, DAVIS PH. Diversity of *Plasmodium vivax*-induced antigens on the surface of infected human erythrocytes. *The American Journal of Medicine tropical and hygiene*, v.(38), p.42–46, 1988.
- MILLER LH, ACKERMAN HC, SU XZ, WELLEMS TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature*, v.(19), p.156-167,2013;
- MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v.415, p.673-679, 2002.
- MILLER LH, GOOD MF, MILON G. Malaria pathogenesis. *Science*, v.(264), p.1878-1883,1994.
- MILLHOLLAND MG, CHANDRAMOHANADAS R, PIZZARRO A, WEHR A, SHI H, DARLING C, LIM CT, GREENBAUM DC. The malaria parasite progressively dismantles the host erythrocyte cytoskeleton for efficient egress. *Molecular & Cellular Proteomics*, v.(10), p.M111.010678, 2011.
- MINCHIN PR. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination. *Vegetatio*, v.(69), p.98-107, 1987
- MINISTERIO DE SALUD. Malaria en el Perú. Reporte Epidemiológico 2015; Semana N° 18. OGE; 2015.
- MINISTERIO DE SALUD. Malaria en el Perú. Reporte Epidemiológico 2014; Semana N° 52. OGE; 2014.
- MINISTERIO DE SALUD. Dirección de Salud de Loreto. Boletín de Programa de Control de Malaria 1998. Loreto; MINSA, p. 58-9;1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2010, Série A. Normas e Manuais técnicos.
- MOLL GN, VIAL HJ, BEVERS EM, ANCELIN ML, ROELOFSEN B, COMFURIUS P, SLOTBOOM AJ, ZWAAL RF, KAMP OPJA, DEENEN LL. Phospholipid asymmetry in the plasma membrane of malaria infected erythrocytes. *Biochem Cell Biol*, v.(68), p.579–585, 1990.
- MONTOYA F, RESTREPO M, MONTOYA AE, ROJAS W. Blood groups and malaria. *Revista do Instituto de Medicina de São Paulo*, v.(36), p.33-38, 1994.

MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature*, v.(12), p.958-969, 2008.

MOTA MM, HAFALLA JC, RODRIGUEZ A. Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. *Nature Medicine*, v.(8), p.1318-1322, 2002.

MOTA MM, PRADEL G, VANDERBER JP, HAFALLA JC, FREVERT U, NUSSENZWEIG RS, NUSSENZWEIG V, RODRIGUEZ A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, v.(291), p.141-144, 2001.

MOURÃO LC, 2015. Anticorpos direcionados a proteínas de membrana de hemácias e sua associação à anemia em infecções por *Plasmodium vivax*. (Doutorado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

MUELLER I, GALINSKI MR, BAIRD JK, CARLTON JM, KOCHAR DK, ALONSO PL, DEL PORTILLO HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, v.(9), p.555-566, 2009.

MURPHY SC & BREMAN JG. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.64, p. 57-67, 2001.

MURRAY CJL, LOPES AD. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. *The Lancet*, v.(349), p.1498-1504, 1997.

MIGOT-NABIAS F, MOMBO LE, LUTY AJ, DUBOIS B, NABIAS R, BISSEYE C, MILLET P, LU CY, DELORON P. Human genetic factors related to susceptibility to mild malaria in Gabon. *Genes Immunology*, v.(1), p.435-441, 2000.

NATHAN C. Metchnikoff's legacy in 2008. *Nature*, v.(9), p.695-698, 2008.

NISHIZUKA Y, NAKAMURA S. Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*, v.(22), p.202-203, 1995.

NOSTEN F, MCGREAD R, SIMPSON JA, THWAI KL, BALKAN S, THEIN CHO, HKJRIJAROEN L, LOOAREESUWAN S, WHITE NJ. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet*, v.(354), p.546-549, 1999.

NOSTEN F, RUSSEL B. Glycophorin C (CD236R) mediates vivax malaria parasite rosetting to normocytes. *Blood*, v.(123). p. 100-109, 2014.

ODHIAMBO CO, OTIENO W, ADHIAMBO C, ODERA MM, STOUTE JA. Increased deposition of C3b on red cells with low CR1 and CD55 in a malaria-endemic region of western Kenya: Implications for the development of severe anemia. *Malaria Journal*, v.(9), p.28, 2010.

OLDENBORG PA, GRESHAM HD, LINDBERG FP. CD47- signal regulatory protein alpha (SIRP alpha) regulates Fc gamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*, v.(193), p.855-862, 2001.

OLDENBORG PA, ZHELEZNYAK A, FANG YF, LAGENAUR CF, GRESHAM HD, LINDBERG FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, v.(288), p.2051–2054, 2000.

OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA MV, BRASIL P, LADISLAU JL, TAUIL PL, DANIEL-RIBEIRO CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal* 2010, 9: 115.

OTHORO C, LAL AA, NAHLEN B, KOECH D, ORAGO AS, UDHAYAKUMAR V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *Journal of Infectious Diseases*, v.(179), p. 279-282, 1999.

PALIS J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Frontiers in Physiology*, v.(28), 2014.

PANICHAKUL T, PAYUHAKRIT W, PANBURANA P, WONGBORISUTH C, HONGENG S, UDORNANGPETCH R. Suppression of erythroid development *in vitro* by *Plasmodium vivax*. *Malaria Journal*, v.(11), p.173, 2012.

PANTALEO A, GIRIBALDI G, MANNU F, ARESE P, TURRINI F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmunity Review*, v.(7), p.457–462, 2008.

PANT CS, GUPTA DK, BHATT RM, GAUTAM AS, SHARMA RC. An epidemiological study of G-6-PD deficiency, sickle cell haemoglobin, and ABO blood groups in relation to malaria incidence in Muslim and Christian communities of Kheda, Gujarat, (India). *The Journal of Communicable Diseases*, v.(24), p.199-205, 1992.

PANT CS, GUPTA DK, GUPTA DK, SHAMA RC, GAUTAM AS, BHATT RM. Frequency of ABO blood groups, sickle-cell haemoglobin, G-6 PD deficiency and their relation with malaria in scheduled castes and scheduled tribes of Kheda district, Gujarat. *Indian Journal Malariol*, v.(29), p.235-239, 1992.

PANT CS, SRIVASTAVA HC, YADAV RS. Prevalence of malaria and ABO blood groups in a seaport area in Raigad, Maharashtra. *Indian Journal Malariology*, v.(35), p.225-228, 1998.

PARROCHE P, LAUW FN, GOUTAGNY N, LATZ E, MONKS BG, VISINTIN A, HALMEN KA, LAMPHIER M, M OLIVIER, BARTHOLOMEU DC, GAZZINELLI RT, GOLENBOCK DT. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.(104), p.1919-1924, 2007.

PATHIRANA SL, ALLES HK, BANDARA S, PHONE-KYAW M, PERERA MK, WICKREMASINGHE AR, MENDIS KN, HANDUNNETTI SM. ABO-blood-group types and protection against severe, *Plasmodium falciparum* malaria. *Annals of Tropical Paediatric*, v.(99), p.119-124, 2005

PATTANAPANYASAT K, SRATONGNO P, CHIMMA P, CHITJAMNONGCHAI S, POLSRILA K, CHOTIVANICH K. Febrile temperature but not proinflammatory cytokines

promotes phosphatidylserine expression on *Plasmodium falciparum* malaria-infected red blood cells during parasite maturation. *Cytometry Part A*, v.(77), p.515-523, 2010.

PHANUPHAK P, TIRAWATNPONG S, HANVANICH M, PANMUONG W, MOOLLAOR P, VEJAJIVA S, SITPRIJA V, INTARAPRASERT R, PHANTHUMKOSOL D. Autoantibodies in falciparum malaria: a sequential study in 183 Thai patients. *Clinical Experiment Immunology*, v.(53), p.627-633, 1983.

POESPOPRODJO JR, FOBIA W, KENANGALEM E, LAMPAH DA, HASANUDDIN A, WARIKAR N, SUGIARTO P, TJITRA E, ANSTEY NM, PRICE RN. Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. *Clinical Infectious Diseases*, v.(48), p.1704-1712, 2009.

POESPOPRODJO JR, FOBIA W, KENANGALEM E, LAMPAH DA, WARIKAR N, SEAL A, MCGREADY R, SUGIARTO P, TJITRA E, ANSTEY NM, PRICE RN. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant *plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections are endemic. *Clinical Infectious Diseases*, v.(46), p.1374-1381, 2008.

PONGPONRATN E, RIGANTI M, BUNNAG D, HARINASUTA T. Spleen in falciparum malaria: Ultrastructural study. *The Southeast Asian journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.(18), p.491, 1987.

PONGPONRATN E, TURNER GD, DAY NP, PHU NH, SIMPSON JA, STEPNIEWSKA K, MAI NT, VIRIYAVEJAKUL P, LOOAREESUWAN S, HIEN TT, FERGUSON DJ, WHITE NJ. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, v.(69), p.345-359, 2003.

PRICE RN, DOUGLAS NM, ANSTEY NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.(22), p.430-435, 2009.

PRICE RN, TJITRA E, GUERRA CA, YEUNG S, WHITE NJ, ANSTEY NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *The American Journal of tropical Medicine*, v.(77), p.79-87, 2007.

PRUDÊNÇIO M, RODRIGUEZ A, MOTA MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews*, v.4, p.849-856, 2006.

QUINTERO, JP, SIQUEIRA AM, TOBÓN A, BLAIR S, MORENO A, ARÉVALO-HERRERA M, LACERDA MVG, VALENCIA SH. Malaria-related anemia: a Latin American perspective. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.106, p.91-104, 2011.

REBÊLO JMM, DA SILVA RA, FERREIRA LA, VIEIRA JA. Anopheles (Culicidae, Anophelinae) e a malária em Buriticupu-Santa Luzia, pré-Amazônia maranhense. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.(30), p.2, 1997.

RIJKEN MJ, MCGREADY R, BOEL ME, POESPOPRODJO R, SINGH N, SYAFRUDDIN D, ROGERSON S, NOSTEN F. Malaria in pregnancy in the Asia-Pacific region. *Lancet Infectious Disease*, v.(12), p.75-88, 2012.

RODRIGUEZ-MORALES AJ, BENITEZ JA, ARRIA M. Malaria mortality in Venezuela: focus on deaths due to *Plasmodium vivax* in children. *Journal of Tropical Pediatrics*, v.(54), p.94-101, 2008.

RODRIGUEZ-MORALES AJ, SANCHEZ E, VARGAS M, PICCOLO C, COLINA ARRIA M, FRANCO-PAREDES C. Pregnancy outcomes associated with *Plasmodium vivax* malaria in northeastern Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine*, v.(74), p.755-75, 2006.

ROUBINET F, DESPIAU S, CALAFELL F, JIN F, BERTRANPETIT J, SAITOU N, BLANCHER A. Evolution of the O alleles of the human ABO blood group gene. *Transfusion*, v.(44), p.707-715, 2004.

ROWE JA, MOULDS JM, NEMBOLD CI, MILLER LH. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature*, v.(388), p.292-295, 1997.

RUDOLF GM & RAMSAY JC. Enumeration of Parasites in Therapeutic. *Malaria Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v(1), p.1-8, 1927.

RU YX, MAO BY, ZHANG FK, PANG TX, ZHAO SX, LIU JH, WICKRAMASINGHE SN. Invasion of erythroblasts by *Plasmodium vivax*: A new mechanism contributing to malarial anemia. *Ultrastructural pathology*, v.(33), p.236-242, 2009.

SABCHAREON A, BURNOUF T, OUTTARA D, ATTANATH P, TAYOUN H, CHANTAVANICH P, FOUCAULT C, CHONGSUPHAJASIDDHI T, DRUILHE P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.(45), p.297-308, 1991.

SACHS J, MALANEY P. The economic and social burden of malaria. *Nature*, v.415, p.680-685, 2002.

SALMON MG, SOUZA JB, BUTCHER GA, PLAYFAIR JHL. Premature removal of uninfected erythrocytes during malarial infection of normal and immunodeficient mice. *Clinical & Experimental Immunology*, v.(3), p.471-476, 1997.

SANTOS-CIMINERA PD, ROBERTS DR, ALECRIM MG, COSTA MRF, QUINNAN JR GV. Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.1597-1599, 2007.

SCHROIT AJ, TANAKA Y, MADSEN J, FILDER IJ. The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry, *Biology of the Cell*, v.(51), p.227-238, 1984.

SCOPEL KKG, FONTES CJF, NUNES AC, HORTA MF, BRAGA EM. High prevalence of *Plasmodium* malaria infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás—Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Tropica*, v.(90), p.61-64, 2004.

- SEKIGAMI TI, KANEKO Y, OKAZAWA H, TOMIZAWA T, OKAJO J, SAITO Y, OKUZAWA C, YOKOO MS, NISHIMA U, OHNISHI H, MATOZAKI T, NOJIMA Y. SHPS-1 promotes the survival of circulating erythrocytes through inhibition of phagocytosis by splenic macrophages. *Blood*, v. (1), p.341-348
- SHARMA A, EAPEN A, SUBBARAO SK. Parasite killing in *Plasmodium vivax* malaria by nitric oxide: implication of aspartic protease inhibition. *Journal of Biochemistry*, v.(136), p.329–334, 2004.
- SHERMAN IW, PRUDHOMME J, TAIT JF. Altered membrane phospholipids asymmetry in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitol Today*, V.(13), P.242–243, 1997.
- SIDJANSKI S, VANDERBERG JP. Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *The American Journal of Tropical Medicine*, v.(57), p.426–429, 1997.
- SILVA LM, MOTA MM. A mediator for malaria stickiness in A versus O blood. *Nature Medicine*, v.(21), p.307-308, 2015.
- SILVIE O, MATUSCHEWSKI K, MOTA MM, PRUDENCIO M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Current Opinion in Microbiology*, v.(11), p.352–359, 2008.
- SILVER KL, HIGGINS SJ, MCDONALD CR, KAIN KC. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cellular Microbiology*, v.(12), p.1036-1045, 2010.
- SIMPSON JA, SILAMUT K, CHOTIVANICH K, PUKRITTAYAKAMEE S, WHITE NJ. Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.93, p.165–168, 1999.
- SJOBER AP, TROUW LA, BLOM AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol*, v.(30), p.83–90, 2009.
- SRINIVASAN P, BEATTY WL, DIOUF A, HERRERA R, AMBROGGIOD X, MOCH K, TYLER JS, NARUM DL, PIERCE SK, BOOTHROYD JC, HAYNESE JD, MILLER LH. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.(108), p.13275-13280, 2011.
- STERKES Y, SCHEIDING C, ROCHA M, LEPOLARD C, GYSIN J, SCHERF A. Members of the low-molecular-mass rhoptry protein complex of *plasmodium falciparum* bind to the surface of normal erythrocytes, *The Journal of Infectious Diseases*, v.(196), p.617-621, 2007.
- STORRY JR, OLSSON ML. The ABO blood group system revisited. *Immunohematology*, v.(25), p.48-59, 2009.
- STOUTE JA, ODINDO AO, OWUOR BO, MIBEI EK, OPOLLO MO, WAITUMBI JN. Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia. *Journal of Infectious Diseases*, v.187, p.522-525, 2003.

STURM A, AMINO R, VAN DE SAND C, REGEN T, RETZLAFF S, RENNENBERG A, KRUEGER A, POLLOK JM, MENARD R, HEUSSLER VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v.(313), p.1287-1290, 2006.

SULTAN AA, THATHY V, FREVERT U, ROBSON KJH, CRISANTI A, NUSSENZWEIG V, NUSSENZWEIG RS, ROBERT MÉNARD R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell*,v.(90), p.511-522, 1997.

SUWANARUSK R, COOKE BM, DONDORP AM, SILAMUT K, SATTABONGKOT J, WHITE NJ, UNDMANGPETCH R. The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *The Journal of Infectious Diseases*, v.(189), p.190-194, 2004.

TALIAFERRO WH, MULLIGAN HW. The histopathology of malaria with special reference to the function and origin of macrophages in defense. v.(29), 1937.

TAVERNE J, VAN SCHIE R, PLAYFAIR J, REUTELINGSPERGER C. Malaria: phosphatidylserine expression is not increased on the surface of parasitized erythrocytes. *Parasitology Today*, v.(11), p.298-299, 1995.

TIMMANN C, THYE T, VENS M, ET AL. Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature*, v.(489), p.443–446, 2012.

TJITRA E, ANSTEY NM, SUGIARTO P, WARIKAR N, KENANGALERN E, KARYANA M, LAMPAH DA, PRICE RN. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLOS Medicine*, v.(5), p.128, 2008.

TURRINI F, GINSBURG H, BUSSOLINO F, PESCARMONA GP, SERRA MV, ARESE P. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*- infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood*, v.(80), p.801-808, 1992

UDOMSANPETCH R, THANIKKUL K, PUKRITTAYAKAMEE S, WHITE NJ. Rosette formation by *Plasmodium vivax*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.(89), p.635–637, 1995.

UNEKE CJ, OGBU O, NWOJJI V. Potential risk of induced malaria by blood transfusion in South-eastern Nigeria. *Journal of Medicine*, v.(9), p.8-13, 2006.

UYOGA S, SKOROKHOD OA, OPIYO M, ORORI EN, WILLIAMS TN, ARESE P, SCHWARZER E. Transfer of 4-hydroxynonenal from parasitized to non-parasitized erythrocytes in rosettes. Proposed role in severe malaria anemia. *British Journal of Haematology*, v.157, p.116-124, 2012

VANDERBERG JP. Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoites. *The journal of protozoology*, v.(21), p.527–537, 1974.

VAN TJ, PLAYFAIR SR, REUTELINGSPERGER JC. Malaria: Phosphatidylserine expression is not increased on the surface of parasitized erythrocytes. *Parasitol Today*, v.(11), p.298–299, 1995.

VENTURA AMRS. Anemia da malária por *Plasmodium vivax*: estudo clínico e laboratorial em crianças e adolescentes. *Journal of Pediatrics*, v.(75), p.187-194, 1999.

VENTURA AMRS, PINTO AY, SILVA RS, CALVOSA VS, SILVA FMG, SOUZA JM. *Plasmodium vivax* malaria in children and adolescents - epidemiological, clinical and laboratory features. *Journal Pediatric*, v.(75), p.187-194, 1999.

WAITUMBI JN, DONVITO B, KISSERLI A, COHEN JH, STOUTE JA. Age-related changes in red blood cell complement regulatory proteins and susceptibility to severe malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v.190, p.1183-1191, 2004.

WAITUMBI JN, OPOLLO MO, MUGA RO, MISORE AO, STOUTE JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood*, v.(95), p.1481-1486, 2000.

WALPORT MJ. Complement. First of two parts. *New England journal of Medicine*, v.(344), p.1058–1066, 2001.

WAUSGH SM, WILLARDSON BM, KANNAN R, LABOTKA RJ, LOW PS. Heinz bodies induce clustering of band 3, glycophorin, and ankyrin in sickle cell erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, v.(78), p.1155–1160, 1986.

WHITE JN. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malária. *Journal malaria*, v.(10), p.297, 2011.

WHO. Severe falciparum malaria; World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.(94), 2000.

WHO. World Malaria Report 2011. World Health Organization, Geneva, 2011.

WHO. World Malaria Report 2012. World Health Organization, Geneva, 2012.

WHO. World Malaria Report 2013. World Health Organization, Geneva, 2013.

WHO. World Malaria Report 2014. World Health Organization, Geneva, 2014.

WHO. World Malaria Report 2015. World Health Organization, Geneva, 2015.

WICKRAMASINGHE SN, ABDALLA SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v.(13), p.277-299, 2000.

WICKRAMASINGHE SN, LOOAREESUWAN S, NAGACHINTA B, WHITE NJ. Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. *Br. Journal of Haematology*, v.(72), p.91–99, 1989.

WINOGRAD E, PRUDHOMME G, SHERMAN IW. Band 3 clustering promotes the exposure of neoantigens in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, V.(142), P.98–105, 2005.

WOLOFSKY KT, AYI K, BRANCH DR, HULT AK, OLSSON ML, LILES WC, CSERTI-GAZDEWICH CM, KAIN KC. ABO blood groups influence macrophage-mediated phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *PLoS Pathogeny*, v.(8), 2012.

WOMAS VI, GUILLOTTE M, JUILLERAT A, HESSEL A, RAYNAL B, ENGLAND P, COHEN JH, BERTRAND O, PEYRARD T, BENTLEY GA, LEWIT-BENTLEY A, MERCEREAU-PUJALON O. Structural basis for the ABO blood-group dependence of *Plasmodium falciparum* rosetting. *PLoS Pathogeny*, v.(8), p.98-105, 2012.

WOODRUFF AW, ANSDELL VE, PETTITT LE. Cause of anaemia in malaria. *Lancet*, v.(1), 1055-1057, 1979.

YAMAUCHI LM, COPPI A, SNOUNOU G, SINNIS P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, v.9, p.1215-1222, 2007.

YEO TW, LAMPAH DA, TJITRA E, PIERA K, GITAWATI R, KENANGALEM E, PRICE RN, ANSTEY NM. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *Journal of Infectious Diseases*, v.202, p.109-112, 2010.

YOUNG MD. Studies on the Periodicity of Induced *Plasmodium vivax*. *Journal of the National Malaria Society*, v.(3), P.237-240, 1944.

YUTHAVONG Y, BUTTHEP P, BUNYARATVEJ A, FUCHAREON S, KHUSMITH S. Impaired parasite growth and increased susceptibility to phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected alpha thalassemia or hemoglobin constant spring red blood cells. *American Journal of Clinical Pathology*, v.(89), p.521-525, 1988.

ZHANG D, KIYATKIN A, BOLIN JT, LOW OS. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood*, v.(96), p.2925–2933, 2000.

ZHITA, 2014. Caracterização do perfil isotópico de imunoglobulinas G e sua associação à anemia na infecção por *Plasmodium vivax*. (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal de Minas Gerais.

ANEXO

Anexo 1. Questionário padrão aplicado aos pacientes que foram atendidos no ambulatório do Hospital Júlio Miller, em Cuiabá (MT) ou na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM).

PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DE TRATAMENTO DE PACIENTES COM MALÁRIA - HJUM			
Número:	Data: ___/___/___	Nome:	
Endereço de residência (colocar 3 pontos de referência):			
Rua:			
Bairro	<input type="checkbox"/> Cuiabá <input type="checkbox"/> V. Grande <input type="checkbox"/> Outro		
Fone 1:	Fone 2:	Fone 3:	Fone 4:
Solicitar outros nomes e endereços de pessoas para facilitar a localização:			
Idade:	Sexo: 1 <input type="checkbox"/> M 2 <input type="checkbox"/> F	Cor: 1 <input type="checkbox"/> Branca 2 <input type="checkbox"/> Negra 3 <input type="checkbox"/> Amarela 4 <input type="checkbox"/> Parda	
Escolaridade: 1 <input type="checkbox"/> analfabeto 2 <input type="checkbox"/> 1º grau 3 <input type="checkbox"/> 2º grau 4 <input type="checkbox"/> 3º grau			Ocupação:
Se mulher, possibilidade de gestação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Pretende viajar nos próximos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Pretende viajar nos próximos 6 meses? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			Quantas malárias já teve na vida?
Idade da primeira malária:		Há quanto tempo teve a última malária (em meses)?	
Viajou para área endêmica após o último tratamento? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Tomou corretamente a medicação da última malária? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Teve diarreia ou vômito durante o tratamento? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Espécie da última malária: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista			
Espécies que já teve já vida: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Não sabe			
Quanto tempo você viveu em área endêmica (especificar se foi permanente ou esporádica) (em dias):			
Usou algum medicamento nos últimos 10 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			Quais?
Há quantos dias está com sintomas?		<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Calafrio <input type="checkbox"/> Sudorese <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Epigastria <input type="checkbox"/> Tontura <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Vômito <input type="checkbox"/> Fraqueza <input type="checkbox"/> Hiporexia <input type="checkbox"/> Colúria Temperatura axilar se tiver com febre hoje:	
Febre nos últimos 7 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Febre nos últimos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Em qual município pegou malária?			UF:
Deixou de fazer atividades por causa da malária? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Principais achados físicos:			

Peso (Kg):		Baço palpável: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N – a _____ cm do RCE	
Resultado da gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Optimal: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> NF 3 <input type="checkbox"/> Neg		Outro TDR: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> NF 3 <input type="checkbox"/> Neg	Hemograma: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N
Papel-Filtro 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	Guanidina: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	DNA: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	Soro: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N
Fezes: 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Tratamento: <input type="checkbox"/> Cloroquina <input type="checkbox"/> Mefloquina <input type="checkbox"/> Primaquina <input type="checkbox"/> Doxicilina <input type="checkbox"/> Quinina <input type="checkbox"/> Artesunato Esquemas (dose e tempo):			
Conclusão do caso: 1 <input type="checkbox"/> Primoinfecção 2 <input type="checkbox"/> Recrudescência 3 <input type="checkbox"/> Reacaída 4 <input type="checkbox"/> Reinfecção			

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 7 DIAS (D7)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 14 DIAS (D14)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 21 DIAS (D21)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO APÓS 28 DIAS (D28)

Resultado gota: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Neg		Parasitemia/200 campos:	
Outro exame:		Viajou para área endêmica? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N	
Diarréia ou vômito até a 1ª hora de medicação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Houve melhora dos sintomas acima: <input type="checkbox"/> Completa <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Piora	