

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Thayane Modesto Fontes

**INVESTIGAÇÃO DA APOPTOSE PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR
HEME E PELA HEMOZOÍNA NA MALÁRIA VIVAX**

Juiz de Fora
2021

THAYANE MODESTO FONTES

**INVESTIGAÇÃO DA APOPTOSE PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR
HEME E PELA HEMOZOÍNA NA MALÁRIA VIVAX**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias.

Orientador: Eugenio Damaceno Hottz

Juiz de Fora
2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fontes, Thayane Modesto.

Investigação da apoptose plaquetária induzida por heme e pela hemozoína na malária vivax / Thayane Modesto Fontes. -- 2021.

66 p. : il.

Orientador: Eugenio Damaceno Hottz

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2021.

1. Malária. 2. Plaquetopenia. 3. Apoptose plaquetária. 4. Heme. 5. Hemozoína. I. Hottz, Eugenio Damaceno, orient. II. Título.

THAYANE MODESTO FONTES

INVESTIGAÇÃO DA APOPTOSE PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR HEME E PELA
HEMOZOÍNA NA MALÁRIA VIVAX.

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia e Doenças Infecto- Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 12 / 11 / 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eugenio Damaceno Hottz

Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

FIOCRUZ

Bruno Mietto

Digitally signed by Bruno Mietto
Date: 2021.11.12 11:11:54 -0300

Prof. Dr. Bruno de Siqueira Mietto
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente À Deus, pela vida e por ter me dado forças pra prosseguir no momento mais difícil.

Aos meus avós, Marlene e José Modesto, por terem me amado tanto e por terem cuidado tão bem de mim. A saudade é grande, mas o sentimento de gratidão sempre prevalecerá.

A minha mãe, por todo amor e apoio incondicional e por apostar em mim. Ao meu irmão Thiago pelo companheirismo e até mesmo pelas brigas. Vocês são a minha maior motivação.

Ao prof. Dr. Eugenio, agradeço pela porta que me abriu. Pelos tantos ensinamentos e por toda a paciência e compreensão para com as minhas limitações.

À todos do laboratório de Imunotrombose pela ajuda e pelas discussões sempre produtivas. À Fernanda, pela amizade e parceria, pelas ótimas conversas e pelas incontáveis risadas que tornaram tudo muito mais fácil.

Aos meus tios, principalmente à minha tia e madrinha Andréa, por nunca ter duvidado do meu potencial e por ter acreditado nos meus sonhos.

Aos meu primos, que foram os primeiros amigos que tive na vida, obrigada por aguentarem a minha chatice e por me amarem do jeito que eu sou, especialmente minha prima Ana Clara, por estar sempre comigo e por trazer leveza à minha vida.

Às minhas amigas Glasiane, Luna, Camilla e Naiany pela alegria que trazem à minha vida e por nunca terem soltado a minha mão, mesmo nos momentos em que estive ausente. Ao meu braço direito, Tamires, obrigada por todo o amparo e pela tranquilidade de saber que sempre poderei contar com você.

Aos colaboradores da FIOCRUZ, em especial à Dr^a Isabel Matos, Dr. Hugo Caire e Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda que fizeram nascer este projeto de pesquisa.

À todo o grupo dos laboratórios do ICB/UFJF: laboratório de biologia celular; laboratório de gliconjugados, em especial aos Profs. Jair Aguiar e Valquíria de Medeiros; Aos Profs. Henrique Teixeira, Jacy Gameiro e Gilson Macedo do departamento de Imunologia por permitirem o acesso e utilização dos laboratórios facilitando o desenvolvimento deste trabalho. À Barbala e ao Rogério do Laboratório Integrado de Pesquisa, e à Leidinha por todo auxílio e assistência indispensáveis durante os experimentos.

Às agência de fomento, CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro e ao PPGCBio/UFJF por tornar possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A malária é uma doença causada pelo parasita *Plasmodium* que é transmitido pelo mosquito *Anopheles*. Ainda que a maior parte dos casos de malária no mundo sejam causados pelo *P. falciparum*, no Brasil a maioria das notificações se devem a infecções por *P. vivax*. A malária vivax foi por muito tempo negligenciada pois era considerada uma infecção benigna, porém têm sido relatadas formas graves e complicações da doença, incluindo diminuição abrupta na contagem de plaquetas. Uma das hipóteses para explicar a plaquetopenia é a apoptose plaquetária, que pode estar sendo induzida por estímulos liberados durante a infecção. Para compreender se fatores liberados durante a malária vivax estariam induzindo a apoptose plaquetária, plaquetas de doadores saudáveis foram incubadas com plasma de pacientes infectados por *P. vivax*. Foi observado que o plasma de pacientes induziu o fenótipo apoptótico nas plaquetas, evidenciado pela exposição de fosfatidilserina, despolarização da membrana mitocondrial interna e encolhimento celular. Já foi demonstrado que o heme e a hemozoina, duas toxinas liberadas após a lise de hemácias infectadas, induzem a apoptose em células do trofoblasto e em astrócitos. Contudo, a apoptose de plaquetas induzida por heme e hemozoina ainda não foi descrita. Para investigar isso, plaquetas de voluntários saudáveis foram incubadas com heme ou hemozoina sintética (sHz) e foi observado que tanto heme quanto a sHz induziram a apoptose plaquetária. Uma vez que o balanço antagônico entre proteínas pró e anti-apoptóticas regula a apoptose e que a degradação de Bcl-xL em resposta ao heme foi recentemente evidenciada pelo nosso grupo, investigamos qual via de degradação de proteínas, proteossoma ou calpaínas, estaria envolvida nesse processo. Plaquetas de doadores saudáveis foram então pré-tratadas com o inibidor de proteossoma, Bortezomib, ou com o quelante de cálcio, Bapta-AM previamente ao estímulo com heme e sHz. Observamos que o tratamento com Bortezomib ou Bapta-AM não foi capaz de impedir a apoptose plaquetária induzida por heme e sHz. Finalmente, a adição de hemopexina, um quelante de heme, reverteu o efeito apoptótico do plasma de pacientes com malária vivax sobre as plaquetas, sugerindo o envolvimento do heme na apoptose plaquetária. Nossos resultados indicam portanto que as toxinas heme e hemozoina, através da indução da apoptose plaquetária, podem estar contribuindo para a plaquetopenia observada na malária vivax.

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by the Plasmodium parasite that is transmitted by the Anopheles mosquito. Although most cases of malaria in the world are caused by *P. falciparum*, in Brazil most reports are due to infections by *P. vivax*. Vivax malaria has long been neglected as it was considered a benign infection, but severe forms and complications of the disease, including a sudden drop in platelet count, have been reported. One of the hypotheses to explain thrombocytopenia is platelet apoptosis, which may be induced by stimuli released during infection. To understand whether factors released during vivax malaria were inducing platelet apoptosis, platelets from healthy donors were incubated with plasma from patients infected with *P. vivax*. It was observed that patient plasma induced the apoptotic phenotype in platelets, evidenced by phosphatidylserine exposure, inner mitochondrial membrane depolarization, and cell shrinkage. It has been shown that heme and hemozoin, two toxins released after the lysis of infected red blood cells, induce apoptosis in trophoblast cells and astrocytes. However, heme- and hemozoin-induced platelet apoptosis has not yet been described. To investigate this, platelets from healthy volunteers were incubated with heme or synthetic hemozoin (sHz) and it was observed that both heme and sHz induced platelet apoptosis. Since the antagonistic balance between pro and anti-apoptotic proteins regulates apoptosis and the degradation of Bcl-xL in response to heme was recently evidenced by our group, we investigated which protein degradation pathway, proteasome or calpains, would be involved in this process. Platelets from healthy donors were then pretreated with the proteasome inhibitor, Bortezomib, or the calcium chelator, Bapta-AM, prior to stimulation with heme and sHz. We observed that treatment with Bortezomib or Bapta-AM was not able to prevent platelet apoptosis induced by heme and sHz. Finally, the addition of hemopexin, a heme chelator, reversed the apoptotic effect of plasma from vivax malaria patients on platelets, suggesting the involvement of heme in platelet apoptosis. Our results therefore indicate that heme and hemozoin toxins, through the induction of platelet apoptosis, may be contributing to the thrombocytopenia observed in vivax malaria.

Keywords: malaria vivax; thrombocytopenia; platelet apoptosis; heme; hemozoin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição global da malária de 2000 a 2019.....	14
Figura 1.2 Municípios prioritários para a malária no Brasil em 2019 e 2020.....	15
Figura 1.3: Numero de casos de malária segundo a espécie de Plasmódio notificados no Brasil entre 1959 e 2019.....	15
Figura 1.4: Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i> no hospedeiro vertebrado humano e no vetor <i>Anopheles</i>	18
Figura 1.5: Diagrama da degradação da hemoglobina em hemácias parasitadas por plasmódio, gerando heme que é convertido em hemozoina.....	22
Figura 1.6: Hemozoína nativa (nHz) e hemozoína sintética (sHz) ativam TLR9.....	23
Figura 1.7: Esquema representativo de uma plaqueta e de seus componentes.....	26
Figura 1.8: Esquema representativo das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.....	32
Figura 1.9: Degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaquetas estimuladas por heme.....	33
Figura 1.10: Vias de degradação de proteínas em plaquetas.....	35
Figura 4.1: Efeito do plasma de pacientes com malária vivax na apoptose de plaquetas de doadores saudáveis.....	44
Figura 4.2.1: Efeito do heme na apoptose de plaquetas de doadores saudáveis.....	46
Figura 4.2.2: Efeito da hemozoína sintética (sHz) na apoptose de plaquetas de doadores saudáveis.....	47
Figura 4.3.1: Efeito do inibidor de proteassoma Bortezomib, e do quelante de cálcio Bapta-AM na apoptose de plaquetas estimulados com heme.....	48
Figura 4.3.2: Efeito do inibidor de proteassoma Bortezomib, e do quelante de cálcio Bapta-AM na apoptose de plaquetas estimulados com sHz.....	49
Figura 4.4 – Efeito da Hemopexina (Hx) na apoptose plaquetária induzida pelo plasma de pacientes com malária vivax.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACD – Anticoagulante contendo ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose;
- ADP – Adenosina difosfato;
- AIF – Fator indutor de apoptose;
- APAF-1 – Fator-1 de ativação de protease apoptótica;
- ATP – Adenosina trifosfato;
- ARDS – Síndrome da angústia respiratória aguda;
- Bcl-2 – Linfoma de células B2;
- DAMP – Padrão molecular associado ao dano;
- DIABLO – Proteína de ligação direta a IAP com baixo PI;
- DISC – Complexo de sinalização indutor de morte;
- DMSO – Dimetilsulfóxido;
- DNA – Ácido desoxirribonucleico;
- EPM – Erro padrão da média
- ERK – Quinases reguladas por sinal extracelular;
- FADD – Domínio de morte associado a Fas;
- FasL – Ligante de Fas;
- FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado;
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol;
- GTP – Guanosina trifosfato;
- HEPES – do inglês, *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid*;
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana;
- HO – Heme oxigenase;
- ICAM – Molécula de adesão intercelular;
- IFN – Interferon;

IL – Interleucina;

KC – Quimioatraente de queratinócitos;

MCP – Proteína quimioatraente de macrófagos;

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade;

MIF – Fator inibidor da migração de macrófagos;

MIP-1 α – Proteína inflamatória de macrófago 1 α ;

MPTP – Poro de transição de permeabilidade mitocondrial;

mRNA – RNA mensageiro;

NETS– Armadilhas extracelulares dos neutrófilos;

NF-kB – Fator nuclear kappa-B;

NLRP3 – NLR contendo domínio pirina 3;

OMS – Organização Mundial da Saúde;

PAMP – Padrão molecular associado a patógeno;

PBS – Tampão fosfato e salina;

PCR – Reação em cadeia da polimerase;

PECAM-1 – Molécula 1 de adesão de plaquetas a células endoteliais;

PF4 – Fator plaquetário 4;

PfEMP-1– Proteína de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum*;

PGE1– Prostaglandina E1;

PPP – Plasma pobre em plaquetas;

PRP – Plasma rico em plaquetas;

PS – Fosfatidilserina;

PSG – Tampão PIPES, salina e glicose;

PSGL-1 – Glicoproteína ligante 1 de Pselectina;

RANTES – do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*;

RNA – Ácido ribonucleico;

sHz – Hemozoína sintética;

SDS – Dodecil sulfato de sódio;

SMAC – do inglês, *second mitochondria-derived activator of caspase*;

SVS – Secretaria de vigilância em saúde;

TLR – receptor do tipo *Toll*;

TMRE – Tetrametilrodamina;

TNF – Fator de necrose tumoral;

TRADD – Domínio de morte associado ao receptor do fator de necrose tumoral;

TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF;

VCAM – Molécula de adesão de célula vascular;

vWf – Fator de von Willebrand;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DA MALÁRIA.....	14
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO, VETOR E CICLO BIOLÓGICO.....	16
1.3 COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA VIVAX.....	18
1.4 PATOGÊNESE DA MALÁRIA.....	20
1.5 PLAQUETAS E SUAS FUNÇÕES NA IMUNIDADE E INFLAMAÇÃO.....	25
1.6 PLAQUETAS NA MALÁRIA.....	28
1.7 APOPTOSE PLAQUETÁRIA.....	30
1.8 RACIONAL.....	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 MATERIAL e MÉTODOS	38
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO DE VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS E DE PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX.....	38
3.2 ISOLAMENTO DE PLAQUETAS.....	39
3.3 PREPARO DO HEME E DA HEMOZOÍNA SINTÉTICA.....	40
3.4 ESTÍMULO DE PLAQUETAS COM HEME E HEMOZOÍNA SINTÉTICA.....	41
3.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO.....	41
3.6 ENSAIO COM PLASMAS.....	42
3.7 CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4 RESULTADOS	43
4.1 O PLASMA DE PACIENTES INFECTADOS POR <i>P. vivax</i> INDUZ A APOPTOSE PLAQUETÁRIA.....	43
4.2 HEME E HEMOZOÍNA SINTÉTICA INDUZEM A APOPTOSE PLAQUETÁRIA.....	44
4.3 HEME E sHz INDUZEM A APOPTOSE PLAQUETÁRIA DE MODO INDEPENDENTE DE PROTEASSOMA.....	47
4.4 HEMOPEXINA (Hx) REDUZ O EFEITO APOPTÓTICO DO PLASMA DE PACIENTES INFECTADOS POR <i>P. vivax</i>	49

5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO.....	54
7 PERSPECTIVAS.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DA MALÁRIA

A malária ainda constitui um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo uma doença infecciosa que atinge principalmente regiões tropicais e subtropicais, com destaque para a região Africana, onde crianças menores de cinco anos de idade e mulheres gestantes são os grupos mais atingidos. Em 2019, a malária acometeu cerca de 229 milhões de pessoas e causou aproximadamente 409 mil mortes ao redor do mundo, sendo que 94% dos casos e dos óbitos registrados ocorreram na África. A grande maioria dos casos de 2019 foram causados pelo parasito *Plasmodium falciparum* e apenas 3% foram causados por *Plasmodium vivax*. Contudo, na região das Américas, onde Brasil, Colômbia e Venezuela contabilizam 86% dos casos, *P. vivax* é o principal causador da malária, sendo responsável por 72,3% das notificações (Figura 1.1) (WHO, 2020).

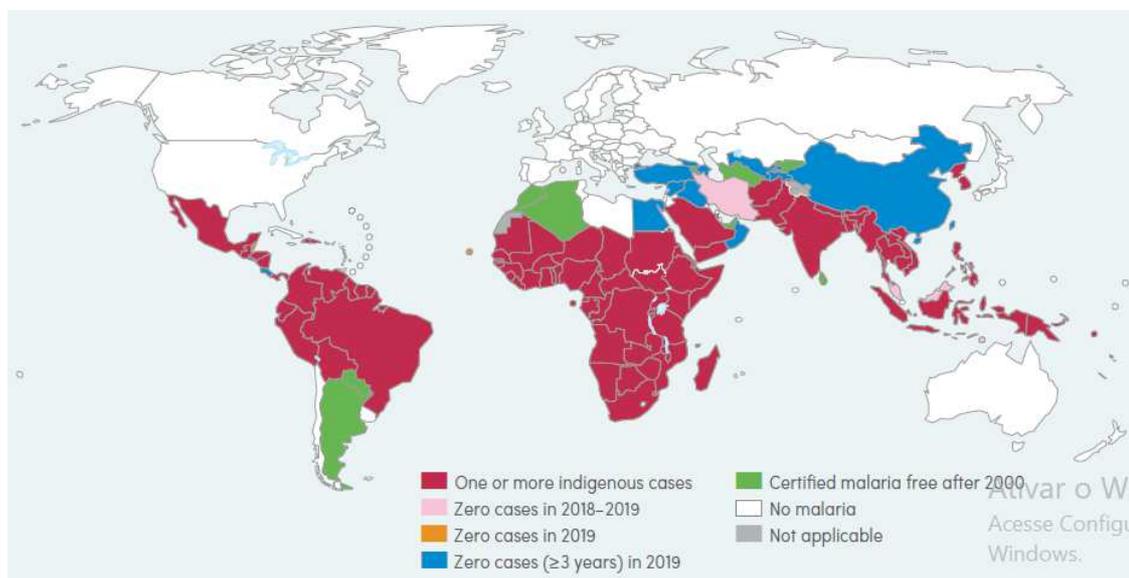


Figura 1.1: Distribuição global da malária de 2000 a 2019 (WHO, 2020).

No Brasil foram notificados 157.454 casos em 2019, sendo que a região Amazônica, área endêmica da doença no país, concentrou 99,9% desses casos. No território brasileiro as espécies causadoras da malária são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, com a maioria dos casos decorrentes de infecção por *P. vivax*, seguido

dos casos de *P. falciparum*, respectivamente 89,3% e 10,7% dos casos notificados em 2019 (Figura 1.2 e 1.3) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE., 2020).

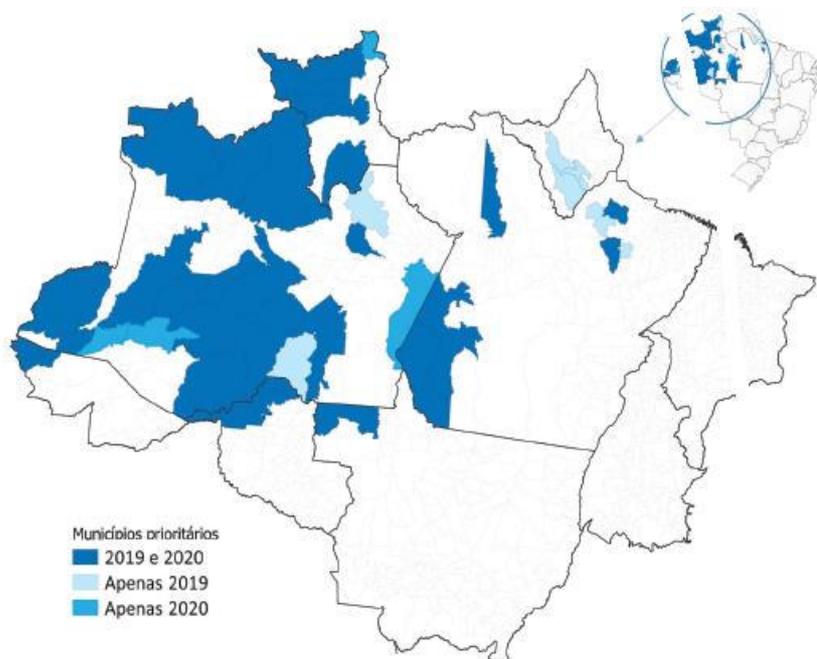


Figura 1.2: Municípios prioritários para a malária no Brasil em 2019 e 2020 (SVS/MS, 2020).

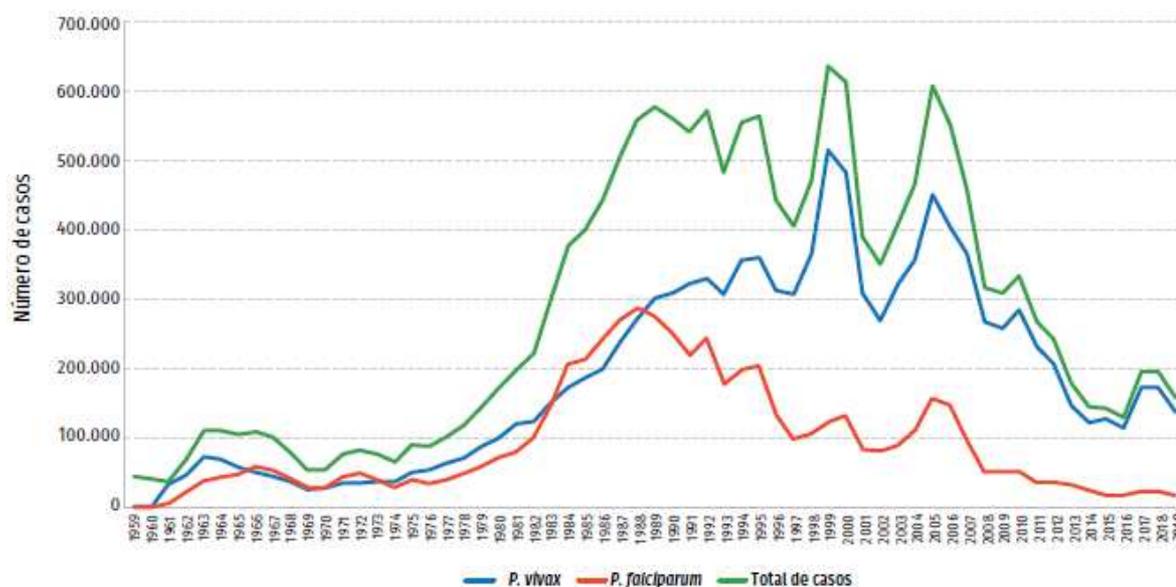


Figura 1.3: Numero de casos de malária segundo a espécie de Plasmodium notificados no Brasil entre 1959 e 2019 (SVS/MS, 2020).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO, VETOR E CICLO BIOLÓGICO

O agente etiológico causador malária é o protozoário parasito pertencente a família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*, sendo principalmente relacionadas à malária humana as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*. *P. knowlesi* também podem infectar humanos, além de macacos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE., 2020; SINGH; DANESHVAR, 2013).

P. falciparum causa a malária que no passado era conhecida como febre terçã maligna, caracterizada por surtos febris a cada 48 horas, e é comumente responsável pela forma mais grave da doença. *P. vivax* é o causador da malária conhecida como terçã benigna, que também possui ciclos febris a cada 48 horas. Apesar de *P. falciparum* ser a espécie mais letal e prevalente no mundo, *P. vivax* tem maior distribuição geográfica e ainda que apresente menor mortalidade, *P. vivax* é responsável por maior morbidade, levando a um impedimento do avanço econômico e social das comunidades afetadas (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). O *P. ovale* tem distribuição natural limitada a África e é o causador de uma variedade da febre terçã benigna, com picos de febre em intervalos de 48 horas. *P. malariae* se distribui em sobreposição a *P. falciparum* e causa a febre quartã com acessos febris a cada 72 horas (COLLINS; JEFFERY, 2007). *P. knowlesi* foi descrito inicialmente como um parasita causador da malária em macacos, mas posteriormente foi identificada sua capacidade para infectar naturalmente também o homem (SINGH; DANESHVAR, 2013).

Todas as espécies de *Plasmodium* são transmitida pela picada da fêmea do mosquito vetor do gênero *Anopheles*. Apesar de serem conhecidas centenas de espécies de *Anopheles*, apenas algumas conseguem transmitir a doença e no Brasil o principal vetor é o *A. darlingi*. Ainda que *A. darlingi* esteja presente em 80% do território brasileiro, a ocorrência da malária é limitada quase exclusivamente a região Amazônica (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Ciclo biológico

Os plasmódios humanos possuem ciclo evolutivo heteroxênico, com uma

fase assexuada que acontece no hospedeiro vertebrado humano e uma fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado anofelino. A infecção começa quando, através da picada da fêmea do inseto, são inoculadas na pele do hospedeiro humano as formas infectantes do *Plasmodium* chamadas esporozoítos, que podem se desenvolver no local da picada ou então atingir a circulação sanguínea cerca de 1 hora após a infecção (GUEIRARD *et al.*, 2010; AMINO *et al.*, 2006).

Os esporozoítos após caírem na circulação migram até o fígado e invadem os hepatócitos onde se desenvolverão e darão início a reprodução assexuada que caracteriza o ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica (tecidual). Durante este período, os parasitos agora chamados esquizontes, são mantidos em estruturas denominadas vacúolos parasitóforos (STURM *et al.*, 2006). Os esporozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* podem permanecer quiescentes nos hepatócitos por meses, dando origem aos hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas tardias observadas nessas infecções (WHITE, 2011).

Após se multiplicarem várias vezes, os esquizontes formam milhares de elementos filhos, os merozoítos. Estes então saem dos hepatócitos e caem na corrente sanguínea, dentro de estruturas vesiculares chamadas merossomos que são originadas da membrana plasmática dos hepatócitos. Essas vesículas se romperão liberando no sangue milhares de merozoítos que posteriormente invadirão as hemáceas, iniciando o segundo momento da reprodução assexuada, o ciclo eritrocítico (STURM *et al.*, 2006; WHITE *et al.*, 2014).

Dentro dos eritrócitos, os merozoítos se desenvolvem até levar ao rompimento dos mesmos, sendo então liberados na circulação sanguínea podendo invadir novos eritrócitos. *P. falciparum* possui a capacidade de infectar eritrócitos de qualquer idade, enquanto *P. vivax* infecta exclusivamente eritrócitos jovens, denominadas reticulócitos (DAYANAND; ACHUR; GOWDA, 2018). Durante o ciclo eritrocítico é possível acompanhar a parasitemia e é nesta fase que ocorrem as principais manifestações clínicas da doença, incluindo a febre de caráter intermitente que ocorre ao final de cada ciclo eritrocítico com a liberação dos merozoítos no sangue. O intervalo entre os surtos febris são característicos da infecção por cada tipo de plasmódio: 36 a 48 horas para *P. falciparum*, 48 horas para *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae*. Contudo, este padrão regular é pouco constatado atualmente devido ao tratamento precoce, de forma que, o que se observa é uma

febre irregular cotidiana (WHITE *et al.*, 2014).

Ainda nas hemácias, alguns parasitos se diferenciam em formas sexuadas infectantes ao inseto vetor, os gametócitos masculinos e femininos. Ao serem ingeridos pelos mosquitos no momento do repasto sanguíneo, os gametócitos seguem para o trato digestivo destes onde ocorrerá a reprodução sexuada. Os gametócitos passam então pelo processo de maturação sexual, transformando-se em gametas que se fundem para gerar o zigoto diploide. O zigoto se desenvolve em uma forma móvel, denominada oocineto, que penetra a parede do intestino do anofelino gerando uma forma fixa, o oocisto. No interior do oocisto são produzidos milhares de esporozoítos os quais são liberados quando o oocisto se rompe. Os esporozoítos então invadem a hemolinfa do inseto e posteriormente alcançam suas glândulas salivares, sendo inoculados em um novo hospedeiro durante o repasto sanguíneo (MÉNARD *et al.*, 2013) (Figura 1.4).

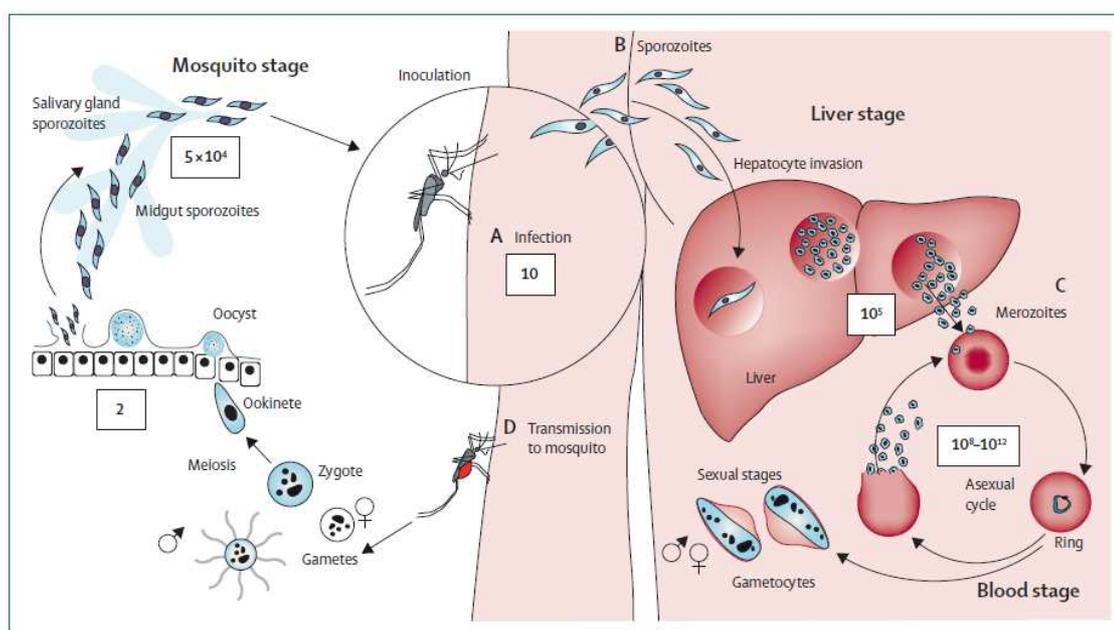


Figura 1.4: Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado humano e no vetor *Anopheles* (WHITE *et al.*, 2014).

1.3 COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA VIVAX

A malária vivax geralmente está associada a febre intermitente, calafrios, dor de cabeça, náuseas, vômitos e outras condições clínicas também comuns as outras malárias. Por muito tempo a infecção por *P. vivax* foi considerada

relativamente benigna quando comparada a malária falciparum. Todavia, estudos recentes tem demonstrado manifestações clínicas graves na infecção por *P. vivax* (DAYANAND; ACHUR; GOWDA, 2018).

A anemia é uma manifestação importante e bastante comum na malária e decorre de vários fatores como hemólise de eritrócitos parasitados e não parasitados e supressão da eritropoiese mediado por citocinas pró-inflamatórias (GAZZINELLI *et al.*, 2014; HALDAR; MOHANDAS, 2009; WHITE, 2018). Estudos tem demonstrado que a ocorrência de anemia grave é maior nas infecções por *P. vivax* do que nas infecções por *P. falciparum* (DOUGLAS *et al.*, 2012; WHITE, 2018). A malária vivax tem sido reportada na literatura como uma importante causa da anemia grave, principalmente em crianças (DOUGLAS *et al.*, 2012). A infecção por *P. vivax* também foi mostrada como responsável por anemia materna durante a gestação, redução do peso dos recém-nascidos e desnutrição aguda durante a primeira infância, fatores associados ao aumento da mortalidade infantil (BRUMMAIER *et al.*, 2020; WILLIAMS *et al.*, 1997).

A injúria pulmonar aguda também foi relatada em casos de malária grave, estando associada a dificuldade respiratória, edema pulmonar, obstrução das vias aéreas, função comprometida de alvéolos e diminuição das trocas gasosas. Casos de injúria pulmonar aguda, onde foram encontradas hemácias parasitadas por *P. vivax*, também foram relatados em estudo de autópsias de adultos infectados que apresentaram angústia respiratória aguda (ARDS do inglês *acute respiratory distress syndrome*) mesmo após o tratamento com antimaláricos (LACERDA *et al.*, 2012).

Outra complicação bastante comum e bem documentada na infecção por *P. vivax* é a diminuição na contagem de plaquetas, denominada plaquetopenia ou trombocitopenia. Estudos demonstraram que até 94% dos pacientes infectados por *P. falciparum* ou por *P. vivax* desenvolveram trombocitopenia durante a doença, sendo que na malária vivax essa plaquetopenia é mais grave (LACERDA *et al.*, 2011). Geralmente os pacientes apresentam uma plaquetopenia leve sem ocorrência de sangramento, porém em alguns casos essa manifestação clínica pode ser agravada. Ainda assim, não existem recomendações precisas sobre o manejo adequado da plaquetopenia associada a malária vivax. O mecanismo envolvido nessa complicação hematológica, bem como sua real contribuição para o quadro clínico da malária vivax ainda não estão bem estabelecidos (LACERDA *et al.*, 2011; NAING; WHITTAKER, 2018).

1.4 PATOGÊNESE DA MALÁRIA

A patogênese da malária é caracterizada por eventos que são interligados e que estão relacionados as manifestações clínicas da malária. O primeiro consiste na detecção e fagocitose de hemácias parasitadas por macrófagos do baço, levando a lise dessas hemácias, contribuindo assim para a anemia frequentemente observada na malária (GAZZINELLI *et al.*, 2014). A fagocitose das hemácias parasitadas faz com que os macrófagos liberem uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias como por exemplo IL-1 β e TNF que são responsáveis pela febre (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019). TNF também está envolvido na supressão da eritropoiese sendo também um fator determinante da anemia (LAMIKANRA *et al.*, 2015).

O segundo evento envolve o sequestro de hemácias parasitadas, que de outra forma seriam destruídas no baço, representando assim um importante mecanismo de escape do parasito. Esse sequestro pode ocorrer em diversos órgãos como pulmão, cérebro, fígado, entre outros, e depende de mudanças morfológicas nas hemácias parasitadas que passam a exibir um fenótipo adesivo, permitindo que elas possam se aderir ao endotélio destes órgãos. Esse fenômeno é conhecido como citoaderência, e em infecções por *P. falciparum* envolve proteínas como a proteína de membrana do eritrocito 1 (PfEMP-1) que se liga a receptores como ICAM-1, VCAM-1, entre outros. Hemáceas parasitadas e não parasitadas podem ainda se ligar a plaquetas, através da interação entre CD36, expresso pelas plaquetas, e a proteína PfEMP1. Contudo, o sequestro dessas hemáceas infectadas leva a uma obstrução no fluxo sanguíneo e a uma resposta inflamatória localizada que contribuem para o desenvolvimento de formas graves da doença (WHITE *et al.*, 2013; MILNER, 2017). Estudos recentes tem demonstrado a capacidade de citoaderência por *P. vivax*, envolvendo a participação da proteína fosfatidilserina expressa na membrana de hemáceas parasitadas (TOTINO; LOPES, 2017). Contudo, a capacidade de aderir ao endotélio de hemáceas parasitadas por *P. vivax* é menor do que nas hemáceas parasitadas por *P. falciparum* e portanto o sequestro de hemáceas é menor na malária vivax, levando a maior remoção destas no baço (DOUGLAS *et al.*, 2012). As hemácias parasitadas também podem se ligar a outras hemácias não parasitadas, levando a formação de rosetas, aumentando

assim a quantidade de hemácias removidas da circulação contribuindo também para a anemia (ZHANG *et al.*, 2016).

Na malária, diversas citocinas pró-inflamatórias são liberadas principalmente por macrófagos e monócitos, estando relacionadas ao controle da parasitemia e na eliminação do parasito (GAZZINELLI *et al.*, 2014). Porém o nível excessivo desses mediadores, pode levar a uma resposta inflamatória exacerbada, levando ao desenvolvimento de formas graves da doença. Assim, o balanço entre mediadores inflamatórios parece conduzir o desfecho da infecção (ANDRADE *et al.*, 2010). Nesse contexto, elevados níveis das citocinas IL-10, TNF- α , IL-1 α e IL-16 foram relacionados com quadros de malária grave. As citocinas pró-inflamatórias induzem efeitos sistêmicos durante a malária, como por exemplo TNF- α e IL-1 β que são importantes pirógenos e que podem também levar a ativação endotelial e disfunção vascular (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019).

A inflamação sistêmica é fundamental em diversas síndromes associadas a malária sendo de suma importância entender os mecanismos pelos quais componentes do parasito ativam o sistema imune (GAZZINELLI *et al.*, 2014). Uma vez que a invasão pelo parasito é detectada, o sistema imune do hospedeiro inicia uma rápida e robusta resposta inflamatória afim de erradicar a infecção. Os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) são uma forma clássica através da qual o sistema imunológico percebe invasores. Nesse contexto, existem três principais PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) plasmodiais que são reconhecidos por PRRs expressos na célula hospedeira dando assim início a resposta imune: o glicosilfosfatidilinositol (GPI), DNA plasmodial e a hemozoína. O GPI é responsável pela interação da membrana plasmática do parasito com receptores do tipo Toll presentes na superfície da célula hospedeira, TLR2 e TLR4. Através dessa interação, o GPI pode induzir a produção de mediadores inflamatórios implicados na patogênese da malária, tais como TNF- α , IL-1, IL-12 e óxido nítrico, assim como pode aumentar a expressão de diversas moléculas de adesão por células endoteliais (CAI; HU; YU, 2020; DURAI; GOVINDARAJ; CHOI, 2013). O DNA plasmodial também é um importante gatilho pra resposta imunológica, através da ativação do receptor endossomal TLR9. O DNA do plasmódio é transportado para dentro dos endossomos através do terceiro principal PAMP plasmodial, a hemozoína, que amplifica a resposta imune contra o plasmódio (KALANTARI *et al.*, 2014; RIVERA-CORREA *et al.*, 2017).

Durante seu desenvolvimento nas hemácias, o plasmódio digere a hemoglobina de dentro de seu vacúolo digestivo para obtenção de nutrientes. Esse processo libera heme livre, uma molécula altamente tóxica e oxidativa tanto para o parasito quanto para o hospedeiro. Para se proteger, o parasito converte o heme em cristais de hemozoína em seu vacúolo digestivo (Figura 1.5) (CORONADO; NADOVICH; SPADAFORA, 2014; PARROCHE *et al.*, 2007). Inclusive, a formação da hemozoína tem sido inibida farmacologicamente no tratamento da malária, como é o caso do fármaco cloroquina que se liga ao heme livre impedindo que ele seja transformado na hemozoína inócua ao parasito (SULLIVAN *et al.*, 1996).

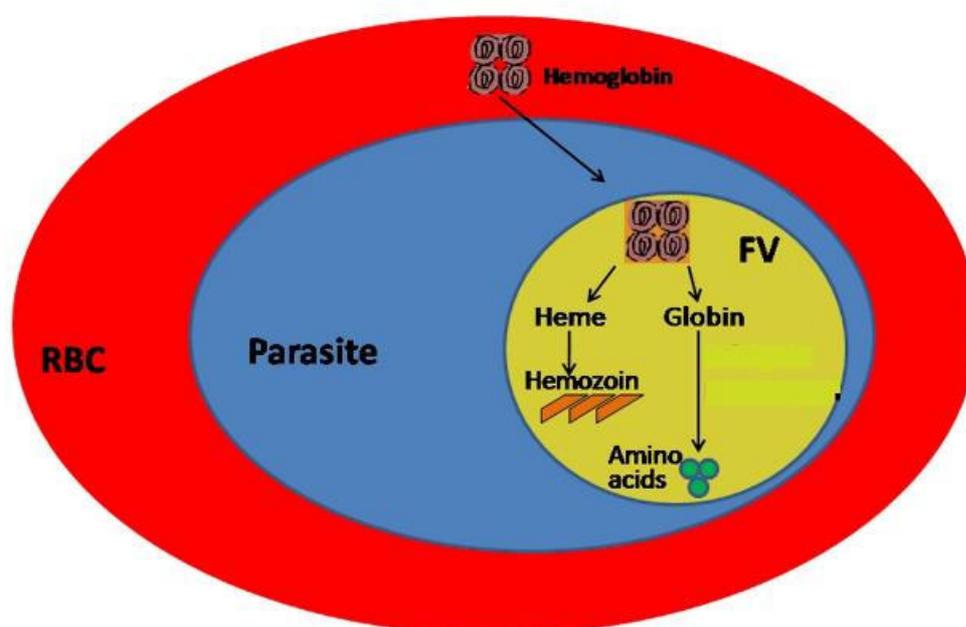


Figura 1.5: Diagrama da degradação da hemoglobina em hemácias parasitadas por plasmódio, gerando heme que é convertido em hemozoína. RBC, do inglês *red blood cell*: hemácia; FV, do inglês *food vacuole*: vacúolo digestivo (Adaptado de CORONADO; NADOVICH; SPADAFORA, 2014).

Hemácias parasitadas contendo hemozoína são normalmente fagocitadas por células imunológicas como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Alternativamente, após a lise de hemácias infectadas com a liberação da hemozoína na circulação, esta também pode ser capturada por fagócitos circulantes e residentes do fígado e baço. A carga de hemozoína nos fagócitos reflete a parasitemia, coincidindo com os acessos febris e elevados níveis das citocinas piréticas IL-1 β e TNF (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2019). Esse acúmulo de hemozoína nos fagócitos tem sido correlacionado a gravidade da doença por alguns estudos que relataram que pacientes que vieram a óbito devido a malária falciparum grave, tiveram maior quantidade de monócitos e neutrófilos contendo hemozoína em

comparação com pacientes que sobreviveram (AMODU *et al.*, 1998; PHU *et al.*, 1995). Outro estudo demonstrou que o estímulo de macrófagos murinos com hemozoína derivada de *P. chabaudi chabaudi* ou com hemozoína sintética, levou a uma apresentação antigênica defeituosa, sugerindo que a fagocitose da hemozoína poderia causar a perda da capacidade de processar e apresentar antígenos (SCORZA *et al.*, 1999).

Foi demonstrado que assim como a hemozoína natural (nHz), a hemozoína sentética (sHz) ou β -hematina também pode eliciar respostas inflamatórias *in vitro* e *in vivo* através da ativação de TLR9 (Figura 1.6) (COBAN *et al.*, 2005).

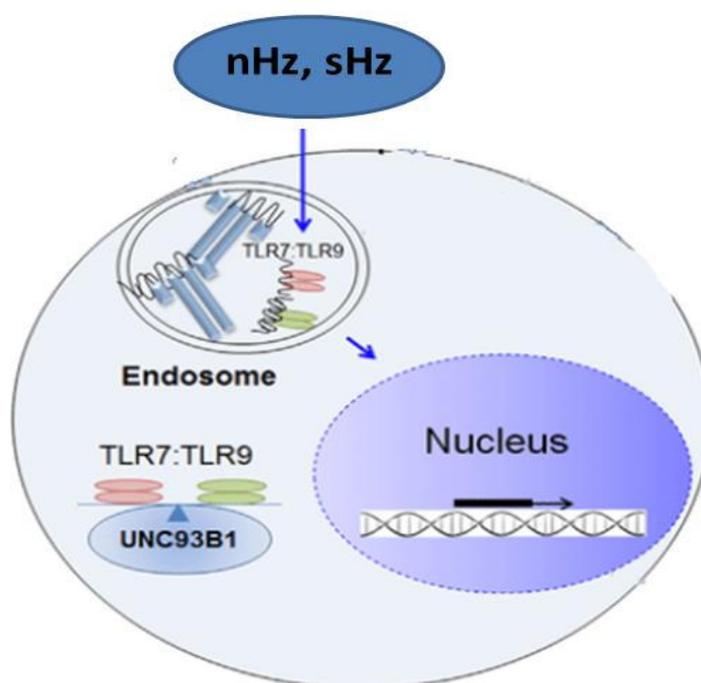


Figura 1.6: Hemozoína nativa (nHz) e hemozoína sintética (sHz) ativam TLR9 (CORONADO; NADOVICH; SPADAFORA, 2014)(Adaptado de SUTHERS; SARANTOPOULOS, 2017).

Controversalmente, um estudo descreveu que a sHz é imunologicamente inerte e que a ativação de TLR9 descrita anteriormente é devido ao DNA plasmodial conjugado a hemozoína natural (PARROCHE *et al.*, 2007). Essa discordância por ser explicada pelo fato de que a nHz está normalmente associadas a proteínas, lipídios e DNA e a sua obtenção a partir da cultura do plasmódio pode não ser totalmente pura, a depender da metodologia de isolamento empregada. Da mesma forma a preparação da sHz também pode ser influenciada pelo método utilizado (JARAMILLO *et al.*, 2009). Dados na literatura mostram que a injeção intraperitoneal

de sHz em camundongos é capaz de ativar o inflamossoma NLRP3 além de induzir a migração de neutrófilos e a produção de mediadores inflamatórios, tais como MCP-1 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*), KC (do inglês, *keratinocyte chemoattractant*), IL-6, IL-1 α e IL-1 β (GRIFFITH *et al.*, 2009). Outros trabalhos também mostram que o estímulo de macrófagos murinos com sHz pode levar a ativação de NF- κ B, fosforilação de ERK1/2 (do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*) e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (JARAMILLO *et al.*, 2009; JARAMILLO; GODBOUT; OLIVIER, 2005). DEROOST e colaboradores (2013) demonstraram que há uma forte correlação positiva entre a inflamação pulmonar e a concentração de hemozoína. Além disso, observaram que a injeção de hemozoína de *P. falciparum* gerou um quadro inflamatório pulmonar, através da produção de mediadores inflamatórios como as citocinas como IL-1B, IL-6, IL-10, TNF e TGF-B, de forma similar ao que acontece na malária. Tomados em conjunto, esses dados sugerem uma importante participação da hemozoína no quadro inflamatório da malária

O heme (ferro protoporfirina IX), que dá origem a hemozoína, desempenha importantes processos biológicos necessários às células. Ele é constituinte de proteínas que atuam transportando e armazenando o oxigênio, hemoglobina e mioglobina respectivamente, e é crucial para o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, estando presente na citocromo c (SHIMIZU *et al.*, 2019). Porém em sua forma livre (sem a sua porção protéica), o heme é uma molécula extremamente oxidante e tóxica, passando a ser considerado um importante DAMP (padrões moleculares associados ao dano) ligante de TLR4, podendo assim levar a respostas inflamatórias (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Como resultado da adaptação ao estresse oxidativo, mecanismos de proteção contra os efeitos prejudiciais do heme livre foram selecionados. Um desses mecanismos é a proteína haptoglobina, que está presente no soro e que em condições normais de hemólise se liga a hemoglobina livre com alta afinidade, impedindo sua ligação com a óxido nítrico e a consequente liberação de heme livre. Em condições de intensa hemólise e grande liberação de hemoglobina, como o que acontece na malária, as moléculas de haptoglobina são saturadas de forma que a hemoglobina livre se acumula na circulação (ANDERSEN *et al.*, 2017; DI MASI *et al.*, 2020). Um mecanismo protetivo adicional se dá pela ação da hemopexina, outra proteína sérica, que ao se ligar com alta afinidade ao heme é capaz de inibir suas propriedades oxidativas, enquanto

macrófagos o transporta para dentro das células onde será catabolizado pela enzima heme-oxigenase (HO) em monóxido de carbono, ferro e em biliverdina (DUTRA; BOZZA, 2014). Posteriormente a biliverdina é convertida em bilirrubina. Com o aumento do catabolismo de hemoglobina, a elevação dos níveis de bilirrubina pode levar à icterícia (DUTRA; BOZZA, 2014; FARGO; GROGAN; SAGUIL, 2017).

Caso a taxa de hemólise ultrapasse a capacidade do soro de remover o heme livre da circulação, vários órgãos podem sofrer dano tecidual. O heme pode levar a ativação de células do endotélio induzindo a expressão de moléculas de adesão e de fator tecidual, assim como é capaz de recrutar neutrófilos, ativar macrófagos através de TLR4 e induzi-los a produzir citocinas como TNF, KC e IL-1 β , amplificando a resposta inflamatória (DUTRA *et al.*, 2014; DUTRA; BOZZA, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Também foi demonstrado que o heme pode induzir a morte programada por apoptose em uma linhagem celular derivada do trofoblasto (BeWo), e também em células do endotélio vascular cerebral humana (LIU *et al.*, 2013; LIU; HASSANA; STILES, 2016). Porém ainda não está descrito na literatura o efeito do heme bem como da hemozoína na morte celular programada de plaquetas, e sua possível contribuição na plaquetopenia associada à malária.

1.5 PLAQUETAS E SUAS FUNÇÕES NA IMUNIDADE E INFLAMAÇÃO

Plaquetas são pequenas células discóides que circulam no sangue por 7 a 10 dias. Apesar de não possuírem núcleo, elas contêm outras organelas, incluindo mitocôndrias, grânulos secretores especializados, spliceossomos, polirribossomos e RNAm que possibilitam o controle da síntese protéica (DENIS *et al.*, 2005; MORRELL *et al.*, 2014; NEU; GUTSCHNER, 2020; HWA *et al.*, 2019). O processo biológico pelo qual as plaquetas são produzidas, denominado trombopoiese, ocorre geralmente na medula óssea e acontece a partir da fragmentação do citoplasma de suas células precursoras, os megacariócitos. Cada megacariócito produz entre 100 e 1000 plaquetas que são liberadas através da formação de ramificações citoplasmáticas, denominadas pró-plaquetas. A seguir, plaquetas maduras brotam da extremidade dessas ramificações, herdando dos megacariócitos as organelas e grânulos fundamentais às suas funções, sendo então liberadas na circulação sanguínea (MACHLUS; ITALIANO, 2013; NEU; GUTSCHNER, 2020).

Durante muito tempo acreditou-se que as plaquetas eram exclusivamente

agentes de processos trombóticos e de manutenção da hemostasia atuando na coagulação sanguínea. Porém recentemente tem sido demonstrado o papel dessas células na inflamação e na resposta imunológica (Figura 1.7) (CHEN *et al.*, 2020; GARRAUD; COGNASSE, 2015). As plaquetas possuem em seu citoplasma dois tipos de grânulos que são críticos nesses processos, os grânulos densos e os grânulos α . Os grânulos densos são menos numerosos e estocam ADP, ATP, GTP, magnésio, cálcio, histamina e serotonina. Já os grânulos α são mais abundantes no citoplasma e estocam diversas moléculas envolvidas na adesão plaquetária a outra células, como a P-selectina, fator de von Willebrand (vWf) e fibrinogênio. Os grânulos α armazenam ainda diversos mediadores inflamatórios, entre eles quimiocinas como PF4 (CXCL4), RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3) e NAP2 (CXCL7) e citocinas como IL-1 α e MIF (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009; MORRELL *et al.*, 2014; STRÜSSMANN *et al.*, 2013; VIEIRA-DE-ABREU *et al.*, 2012).

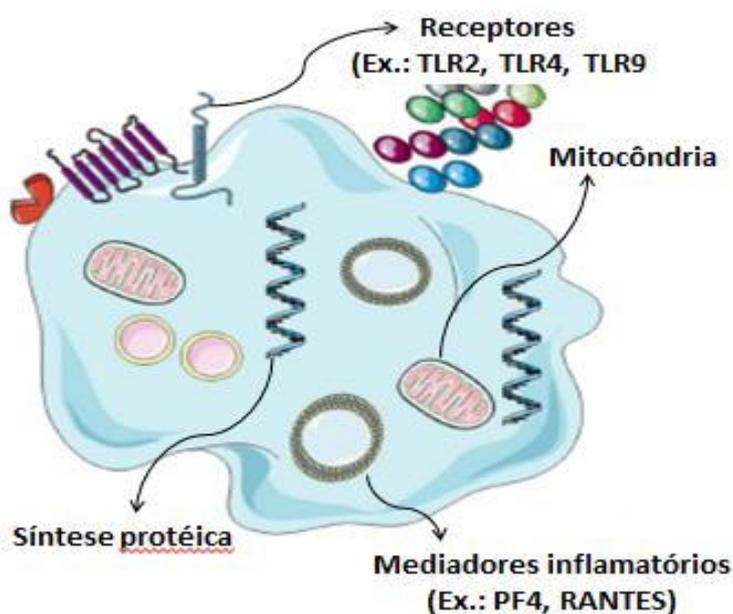


Figura 1.7: Esquema representativo de uma plaqueta e de seus componentes (Adaptado de GARRAUD; COGNASSE, 2015).

Outra característica importante que argumenta a favor do status imunológico das plaquetas, é a presença de PRRs que reconhecem PAMPs e DAMPs elicitando o processo inflamatório. Os TLRs (do inglês *Toll-like receptors*), uma classe de PRRs marcadores da imunidade inata, já foram demonstrados em plaquetas, entre eles TLR2, TLR4 e TLR9 (CHEN *et al.*, 2020; COGNASSE *et al.*, 2005). Entre outros

receptores expressos por plaquetas descritos na literatura temos o DC-SIGN que reconhece o vírus da dengue e receptores do tipo NLR (do inglês *NOD-like receptors*), sendo o NLRP3 (do inglês, *NOD-like receptors pyrin domain containing 3*) o mais bem caracterizado, que está relacionado com a ativação do inflamassoma nas plaquetas durante a dengue e outros agravos (DAVIS; WEN; TING, 2011; HOTTZ *et al.*, 2013; HOTTZ *et al.*, 2016; ZHOU; YAZDI; MENU, 2011).

As plaquetas podem ainda modular a resposta de diversas células imunológicas. Nesse sentido, estudos demonstraram que plaquetas ativadas por LPS via TLR4, podem induzir nos neutrófilos a secreção de NETs (do inglês *neutrophil extracellular traps*), uma importante “armadilha” antimicrobiana (YANG *et al.*, 2020). Kraemer e colaboradores (2011) observaram que plaquetas participam da resposta anti-bacteriana liberando compostos antimicrobianos, como por exemplo a β -defensina que é sintetizada a partir de RNAm, frente ao estímulo da α -toxina de *S. Aureus* levando a formação de NETs.

Outra célula com a qual as plaquetas podem interagir por meio da ligação da P-selectina ao PSGL-1 são os monócitos. Foi demonstrado em um estudo do nosso grupo, a presença de agregados plaqueta-monócito no sangue de pacientes com dengue, sobretudo em pacientes trombocitopênicos. Neste mesmo trabalho foi observado que a interação de plaquetas ativadas e apoptóticas com monócitos podem induzir a secreção de IL-1 β , IL-8 e IL-10 nestes, sugerindo assim uma importante contribuição das plaquetas na patogênese da dengue (HOTTZ *et al.*, 2014).

Outros estudos também demonstraram o envolvimento de plaquetas em infecções virais, como a HIV (vírus da imunodeficiência humana), influenza, COVID-19 (doença por corona vírus 2019) e dengue (HOTTZ; BOZZA; BOZZA, 2018; MANNE *et al.*, 2021). Tal envolvimento inclui a secreção de citocinas e quimiocinas por plaquetas, e a interação destas com leucócitos, contribuindo assim para amplificar a resposta inflamatória. Elas podem ainda ser uma forma alternativa de disseminação viral, como o que ocorre no HIV com propagação do vírus abrigado em plaquetas para células T CD4+ e macrófagos (REAL *et al.*, 2020).

As plaquetas podem ainda expressar moléculas de MHC de classe 1 sendo capazes de realizar apresentação antigênica às células T, tendo um estudo demonstrado que plaquetas podem apresentar antígenos derivados de plasmódio às célula T levando a ativação destas células em modelos murinos de malária

experimental (CHAPMAN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2020).

1.6 PLAQUETAS NA MALÁRIA

Apesar do evidente envolvimento das plaquetas em diversas doenças inflamatórias, a contribuição destas na infecção malárica ainda não está totalmente compreendida. Alguns estudos tem mostrado um papel deletério das plaquetas durante a malária. Nesse contexto, foi reportado o acúmulo de plaquetas associadas ao pigmento malárico e a leucócitos, na microvasculatura cerebral de crianças que vieram a óbito por malária grave (GRAU *et al.*, 2003). Outro trabalho relatou o envolvimento de micropartículas plaquetárias (MPPs) no curso da malária grave causada por *P. falciparum*. Foi demonstrado que essas MPPs presentes no plasma interagem preferencialmente com hemáceas parasitadas, através da ligação da proteína PfEMP-1, expressa na membrana de hemáceas parasitadas, às moléculas CD36 e PECAM-1, expressas em plaquetas. Foi observado também nesse estudo que as micropartículas plaquetárias (MPPs) aumentam drasticamente a citoaderência das hemáceas parasitadas ao endotélio cerebral humano (FAILLE *et al.*, 2009). Mfonkeu e colaboradores (2010) observaram que em pacientes com malária grave, os elevados níveis das MPPs estavam correlacionados com a profundidade do coma e com a plaquetopenia. Campos e colaboradores (2010) demonstraram que pacientes com malária vivax exibiram aumento no número de MPPs. Esses dados, portanto, reforçam a contribuição das MPPs na infecção malárica. Além disso, camundongos nocautes para PF4 (do inglês *platelet factor 4*) e seu receptor CXCR3, tiveram menor incidência de malária grave do que os camundongos selvagens, sugerindo que PF4 é um mediador na patogênese da infecção malárica grave (SRIVASTAVA *et al.*, 2008).

Em contrapartida, alguns trabalhos mostraram um papel protetor de plaquetas que ao se ligar a hemácias parasitadas, liberam PF4 podendo assim matar diretamente espécies de plasmódio, sobretudo *P. vivax* (KHO *et al.*, 2018; MCMORRAN *et al.*, 2012, 2009). Além disso, já foi demonstrado que crianças com malária grave possuíam menores níveis de RANTES em comparação com crianças com malária não grave, estando os níveis de RANTES relacionados a mortalidade infantil por malária grave. Uma vez que plaquetas são a principal fonte de RANTES na circulação, a plaquetopenia comumente observada durante a malária, pode ser

uma uma explicação para esse fenômeno (JOHN *et al.*, 2006; SATCHIKO *et al.*, 2017).

A plaquetopenia, definida como contagem de plaquetas abaixo de 150.000/ μ l, está associada a diversas doenças como HIV, influenza, dengue, entre outras. Durante o surto pandêmico por H1N1 em 2009, foi observado que muitos dos pacientes que precisaram de internação na unidade de terapia intensiva (UTI) apresentavam plaquetopenia, sendo essa observação ainda mais pronunciada em pacientes que vieram a óbito, sugerindo assim uma associação entre a redução na contagem de plaquetas e pior prognóstico de doenças virais (JENNE; KUBES, 2015; PUTRI *et al.*, 2018). A plaquetopenia também é frequentemente observada tanto na malária falciparum quanto na malária vivax (LACERDA *et al.*, 2011; PUTRI *et al.*, 2018). Kochar e colaboradores (2010) mostram ainda que a plaquetopenia grave (contagem de plaquetas <50.000/ μ L) é uma alteração hematológica comum em pacientes com malária vivax.

As causas da plaquetopenia observada na infecção malárica ainda não estão totalmente esclarecidas, parecendo ser um problema multifatorial. Um dos mecanismos propostos para explicar esse fenômeno inclui sequestro esplênico e não esplênico de plaquetas mediado por anticorpos. O sequestro no baço ocorre como resultado da ligação específica de IgG a antígenos maláricos ligados a plaquetas (LACERDA *et al.*, 2011). O maior consumo de plaquetas ativadas aderidas ao endotélio é outra possível causa da plaquetopenia. De Mast e colaboradores (2007) observaram que pacientes com malária falciparum apresentaram maiores níveis de vWF que se correlacionaram negativamente com a contagem de plaquetas. Outras evidências sugerem uma relação entre a plaquetopenia e a fagocitose de plaquetas por monócitos, tendo um estudo observado que plaquetas de pacientes plaquetopênicos com malária vivax eram mais fagocitadas por monócitos *ex vivo*, do que plaquetas de pacientes não plaquetopênicos (COELHO *et al.*, 2013). O estresse oxidativo também tem sido sugerido como explicação para a plaquetopenia. Araújo e colaboradores (2008) observaram que pacientes com malária vivax plaquetopênicos apresentaram maior níveis de malondialdeído (um marcador de peroxidação lipídica devido a estresse oxidativo) no plasma do que pacientes não plaquetopênicos.

Somado a isso, trabalhos tem sugerido uma relação entre a plaquetopenia e a ativação e apoptose plaquetária. Foi relatado já no início da infecção malárica, um

aumento do status de ativação e agregação das plaquetas possivelmente estimuladas por ADP liberado de hemácias infectadas. As plaquetas agregadas seriam então removidas da circulação, contribuindo assim para a diminuição do número de plaquetas circulantes (ASARE *et al.*, 2020; GHOSH; SHETTY, 2008). Hottz e colaboradores (2014) reportaram que na dengue, uma doença onde a trombocitopenia também é comum, as plaquetas estavam ativadas com expressão da P-selectina. Em outro estudo do mesmo grupo, em plaquetas de pacientes com dengue foram observados parâmetros indicativos de apoptose como disfunção mitocondrial, expressão de fosfatidilserina e ativação de caspases (HOTTZ *et al.*, 2013).

1.7 APOPTOSE PLAQUETÁRIA

Tem sido recentemente demonstrado que as plaquetas podem entrar em processo de morte celular através de várias vias como autofagia, ferroptose e necroptose, contudo a via mais estudada em plaquetas é a da apoptose (VISHALAKSHI *et al.*, 2021). Apoptose, um dos tipos de morte celular programada, é um processo biológico que limita a vida útil das células e durante muito tempo foi imputada exclusivamente às células nucleadas. Apesar das plaquetas serem desprovidas de núcleo, a apoptose plaquetária tem sido amplamente descrita e relacionada a plaquetopenia observada em várias doenças incluindo a malária (LEYTIN, 2012; MASON *et al.*, 2007).

Nas células nucleadas a apoptose pode ser desencadeada por 2 vias (Figura 1.7). A primeira é a via extrínseca à célula que se inicia através da interação entre os ligantes de morte da superfamília do TNF (do inglês *tumor necrosis factor*), como por exemplo TNF, FasL e TRAIL (do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) com seus receptores de morte. Os receptores de morte são proteínas transmembranares da superfamília do receptor de TNF, como por exemplo TNFR 1 e 2, Fas e TRAIL-R1 e -2. Em seguida, as porções citoplasmáticas dos receptores de morte se ligam as proteínas adaptadoras FADD (do inglês *Fas-associated death domain*) e ou/ TRADD (do inglês *TNF-receptor associated death domain*), levando ao recrutamento e ativação das procaspases-8 e -10, formando assim o complexo DISC (do inglês *death-inducing signaling complex*). Então as caspases-8 e/ou -10 ativadas clivam e ativam as caspases efetoras -3, -6 e -7 que por sua vez clivam

proteínas celulares vitais, movendo o processo apoptótico para seu estágio efetor, ponto a partir do qual não há mais volta (LEYTIN, 2012). Ainda não está claro se a via extrínseca de apoptose ocorre em plaquetas.

A segunda maneira pela qual a apoptose pode ocorrer é a via intrínseca à célula, já bem definida em plaquetas. Também chamada via de apoptose dependente da mitocôndria, é iniciada por alterações na integridade mitocondrial. Os eventos que constituem essa alteração incluem despolarização da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$), liberação de proteínas apoptogênicas como citocromo c, AIF (do inglês *apoptosis inducing factor*) e Smac (do inglês *second mitochondria-derived activator of caspases*)/DIABLO do espaço intermembranar das mitocôndrias para o citosol. Esses eventos são regulados pelas proteínas da família Bcl-2, que interagem com a membrana mitocondrial externa levando a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) com subsequente liberação de fatores apoptogênicos (KILE, 2014; LEYTIN, 2012).

A família de proteínas Bcl-2 atua como o principal regulador da via intrínseca e é funcionalmente dividida em proteínas pró e antiapoptóticas. Bax e Bak possuem atividade pró-apoptótica, sendo críticas para a permeabilização da membrana mitocondrial e liberação para o citosol do citocromo c. Estando no citoplasma, o citocromo c se liga a proteína Apaf-1 (do inglês *apoptotic protease-activating factor-1*), formando o apoptossomo, que atua recrutando e ativando a procaspase-9 que em seguida irá ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7. Outro exemplo de proteínas pró-apoptóticas são as Bad e Bim, responsáveis por se ligar e inibir proteínas Bcl-2 com função anti-apoptótica, tais como Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1 e Bcl-xL (JOSEFSSON; VAINCHENKER; JAMES, 2020; LEYTIN, 2012).

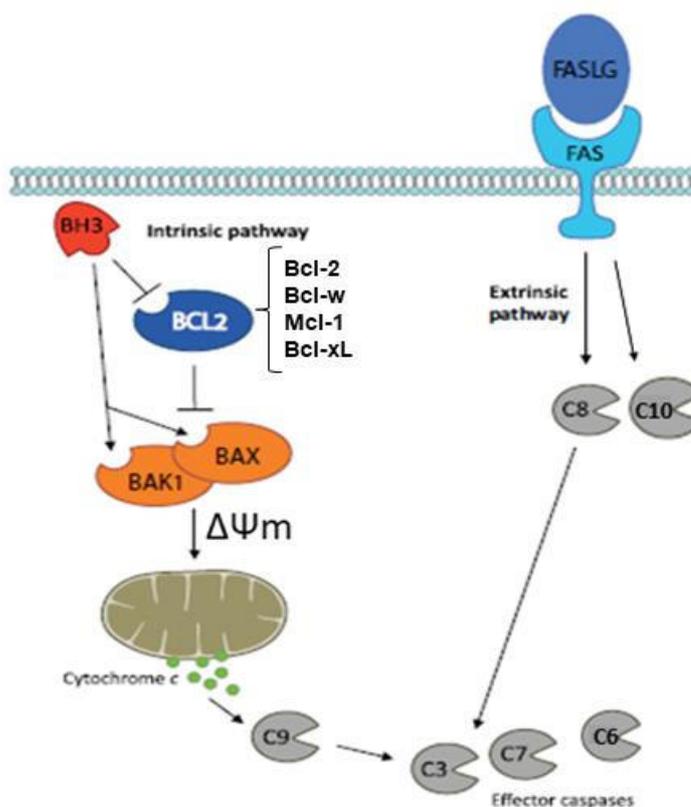


Figura 1.8: Esquema representativo da vias extrínseca e intrínseca da apoptose (Adaptado de Kile, 2014).

Muitos estudos relataram a expressão de proteínas da família Bcl-2 por plaquetas, tais como Bcl-2 e Bcl-xL (anti-apoptóticas), Bak e Bax (pró-apoptóticas) e está claro que o balanço antagônico entre essas proteínas é o que regula a meia-vida das plaquetas (JOSEFSSON; VAINCHENKER; JAMES, 2020; KILE, 2014; LEYTIN, 2012). Mason e colaboradores (2007) demonstraram que a Bcl-xL é fundamental para a sobrevivência das plaquetas, uma vez que mutações em seu gene codificante (Bcl-x) ou sua inibição farmacológica, levaram a redução da meia-vida das plaquetas circulantes, indução da apoptose e da plaquetopenia em camundongos. Dessa forma, com a degradação de Bcl-xL e predomínio de Bax/Bak as plaquetas seguem para a morte celular.

A ativação da cascata de caspases é responsável pela clivagem de proteínas intracelulares e ocorre tanto na via extrínseca quanto na via intrínseca. Esse evento culmina na apoptose que tem como características a condensação da cromatina e desintegração nuclear (ausente em plaquetas), diminuição do tamanho da célula, vacuolização do citoplasma e vesiculação da membrana plasmática, cuja

integridade é preservada até o final do processo (DANIAL; KORSMEYER, 2004; HOTCHKISS *et al.*, 2009).

Diversos mecanismos capazes de induzir a apoptose plaquetária pela via intrínseca foram descritos, entre eles alta força de cisalhamento, armazenamento por tempo excessivo, ou ação de estímulos agonistas em altas doses, como trombina, ADP, epinefrina, colágeno, entre outros. Os parâmetros celulares de apoptose induzidos por esse estímulos incluem despolarização do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$); formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial; liberação de citocromo c para o citosol; expressão, ativação e translocação das proteínas pró-apoptóticas Bax, Bak e Bid para a mitocôndria; ativação das caspases 3 e 9; exposição de fosfatidilserina e redução do tamanho da plaqueta (GYULKHANDANYAN *et al.*, 2012; KILE, 2014; LEYTIN, 2012). Dados preliminares do nosso grupo, mostraram uma redução dos níveis de Bcl-xL em plaquetas estimuladas com heme (Figura 1.8). No entanto os mecanismos envolvidos na degradação dessa proteína e sua importância no processo apoptótico de plaquetas na malária permanecem elusivos.

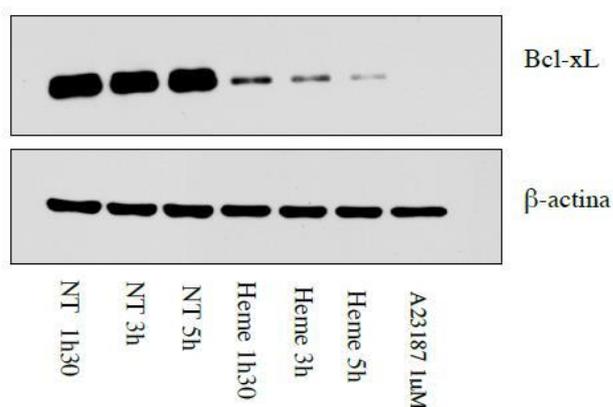


Figura 1.9: Degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaquetas estimuladas por heme. NT, controle não tratado; A23187, controle positivo. Dado não publicado.

Uma vez que proteínas sejam destinadas a degradação e remoção do proteoma celular, essas proteínas podem ser eliminadas por duas principais formas. A primeira se dá pela atividade proteolítica de uma grande maquinaria poliprotéica chamada proteassoma (BUDENHOLZER *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que plaquetas contém vários componentes do proteassoma, incluindo mRNA e proteínas, e exibem atividade proteassomal (Figura 1.9) (KRAEMER; WEYRICH;

LINDEMANN, 2013). Foi demonstrado um papel crítico do proteassoma na trombopoiese, uma vez que sua inibição farmacológica impediu a formação de proplaquetas nos megacariócitos humanos e murinos (SHI *et al.*, 2014). Foi observado ainda um efeito do proteassoma na modulação de funções plaquetárias. Nesse contexto, um estudo relatou que plaquetas pré-tratadas com um inibidor de proteassoma (Bortezomib) tiveram menor agregação em resposta aos seus agonistas (GUPTA *et al.*, 2014). Outro estudo observou que a inibição do proteassoma plaquetário levou a um aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, sendo que essas plaquetas apresentaram despolarização da membrana mitocondrial interna e aumento da expressão de fosfatidilserina, dois parâmetros indicativos de apoptose. Esses dados sugerem então um papel do proteassoma na sobrevivência plaquetária por meio da remoção constitutiva de Bax (NAYAK; KULKARNI; DASH, 2013). Apesar dessas evidências, a contribuição do proteassoma na apoptose plaquetária e seu envolvimento na plaquetopenia observada na malária ainda não está totalmente esclarecida.

A segunda maneira pela qual proteínas podem ser degradadas nas plaquetas é através das calpaínas, que são proteases presentes no citoplasma como enzimas inativas, sendo translocadas para a membrana quando a concentração intracelular de cálcio aumenta. Os estímulos capazes de induzir o aumento dos níveis citosólicos de cálcio ativando as calpaínas, incluem os ionóforos de cálcio, trombina e proteínas do citoesqueleto (KRAEMER; WEYRICH; LINDEMANN, 2013; SUZUKI *et al.*, 2004). Existem evidências de que as calpaínas exercem funções importantes em diversos processos biológicos, como reorganização do citoesqueleto, motilidade e proliferação celular, homeostasia e também na apoptose (ONO; SAIDO; SORIMACHI, 2016). Foi mostrado que as calpaínas atuam regulando a secreção, agregação e espalhamento plaquetário, já que a inibição farmacológica ou deleção genética da calpaína pode levar a uma diminuição nessas funções das plaquetas induzida por agonistas clássicos como trombina, colágeno e ADP (AZAM *et al.*, 2001; CROCKET *et al.*, 1999). Nayak e colaboradores (2013) observaram que plaquetas tratadas com inibidores de proteassoma, exibiram maior ativação das calpaínas e níveis de cálcio citoplasmáticos significativamente aumentados. Essas plaquetas apresentaram um fenótipo apoptótico independente da ativação de caspases, indicando um envolvimento das calpaínas na morte celular (Figura 1.9). Entretanto o papel preciso das calpaínas na apoptose plaquetária e

consequentemente na plaquetopenia frequentemente relatada malária permanece elusivo.

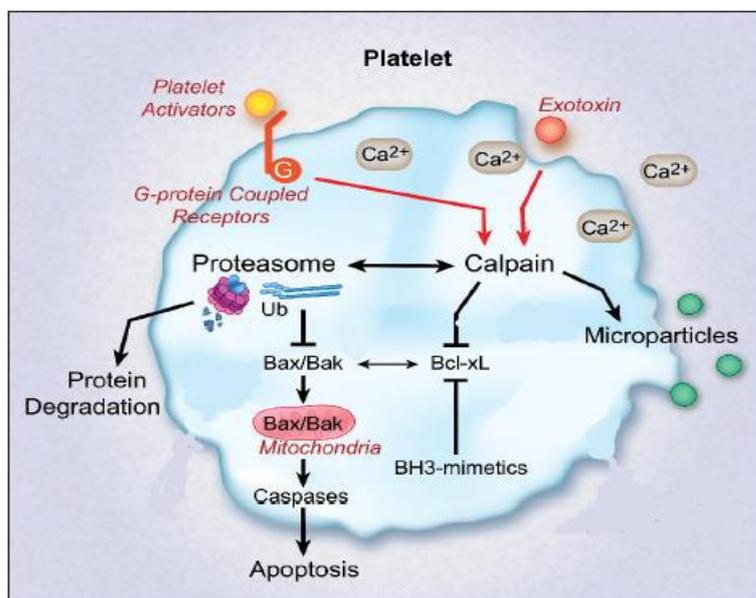


Figura 1.10: Vias de degradação de proteínas em plaquetas (Adaptado de KRAEMER; WEYRICH; LINDEMANN, 2013)

1.8 RACIONAL

A malária ainda representa um dos principais problemas a serem enfrentados pela saúde pública. No Brasil a maioria dos casos de malária são decorrentes da infecção pelo *Plasmodium vivax*. Durante muito tempo a malária vivax foi considerada uma infecção benigna, porém tem sido relatado formas mais graves da doença com complicações bastante comuns como anemia e diminuição na contagem de plaquetas, denominada plaquetopenia. Apesar da participação das plaquetas na patogênese da doença ainda não ser clara, trabalhos tem demonstrado um papel protetor das mesmas pela sua capacidade de matar diretamente *P. falciparum* através da liberação de PF4 (KHO *et al.*, 2018). As causas da plaquetopenia recorrente na malária vivax ainda não estão totalmente elucidadas, porém tem sido sugerida uma relação entre a plaquetopenia e a morte programada de plaquetas por apoptose. Estudos relatam uma maior ocorrência tanto da anemia, quanto da plaquetopenia nas infecções por *P. vivax* em comparação a *P. falciparum* (WHITE, 2018; LACERDA *et al.*, 2011). Frente a isso, levantamos a hipótese de que toxinas liberadas durante o processo hemolítico que é mais recorrente na malária vivax, estejam levando a indução da apoptose plaquetária e dessa forma contribuindo para a maior plaquetopenia observada em pacientes com malária vivax. Diversos estímulos são capazes de induzir a apoptose plaquetária, porém ainda não existem estudos reportando o efeito das toxinas heme e hemozoína na apoptose de plaquetas. Dessa forma, compreender o mecanismo que leva a morte plaquetária na malária é essencial para um melhor entendimento do papel das plaquetas na fisiologia da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o envolvimento das toxinas heme e hemozoína na apoptose plaquetária na malária vivax.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Identificar a participação de fatores presentes no plasma de pacientes infectados por *P. vivax* na apoptose de plaquetas;

2.2.2 Avaliar parâmetros celulares de apoptose em plaquetas de voluntários saudáveis estimuladas com heme e hemozoína sintética (sHz);

2.2.3 Identificar mecanismos moleculares envolvidos na apoptose de plaquetas estimuladas com heme e sHz;

2.2.4 Compreender a participação de heme circulante em pacientes com malária vivax na apoptose plaquetária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO DE VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS E DE PACIENTES COM MALÁRIA VIVAX

Foram obtidas amostras de sangue periférico de voluntários saudáveis do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (ICB-UFJF). Os critérios para inclusão de voluntários saudáveis incluíram ter mais de 18 anos, não ter feito uso de anti-inflamatórios por no mínimo 7 dias antes da coleta, não ter consumido qualquer alimento ou bebida contendo cafeína, e não ter tido nenhum episódio de doenças infecciosas ou alérgicas por no mínimo 7 dias antes da coleta da amostra.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HU-UFJF (n. 65064117.9.0000.5133). Todos os voluntários consentiram em participar do estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, regido pelas normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

As amostras de plasma foram obtidas de pacientes diagnosticados com malária vivax, recrutados na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Amazonas, Manaus (FMT-HVD). Para confirmação da infecção por *P. vivax* foi feito qPCR. Foram excluídos pacientes com dengue ou infectados por outra espécie de plasmódio. As amostras de plasma dos pacientes estão estocadas em biorepositório no laboratório de Imunofarmacologia (IOC-/FIOCRUZ). Esse projeto multicêntrico foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (FMTV-HD #04572612.4.0000.0005 e #47564715.9.0000.0005, IOC/FIOCRUZ #42999214.1. 1001.5248 e HU-UFJF 65064117.9.0000.5133). As características demográficas e hematológicas dos pacientes com malária e voluntários saudáveis incluídos no estudo podem ser observadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Características demográficas e hematológicas dos pacientes infectados por *Plasmodium vivax* e dos voluntários saudáveis. Foi considerada significativa a diferença estatística quando $p < 0,05$.

Dados clínicos	Controles (n=10)	Pacientes (n=10)	Valores de Referência*	p valor
Idade (anos)	30,6 (24-43)	30,7 (21-44)	-	0,9405
Gênero Masculino (%)	4 (40%)	5 (50%)	-	1,0
Plaquetometria (x 10 ³ /μL)	-	63,5 (37-170)	150-450	-
Hemoglobina (g/dL)	-	11,55 (9,1-20,5)	14–18	-

Dados apresentados como mediana (mínimo-máximo) ou número (percentual -%).

*Intervalos de referência para testes laboratoriais segundo Conselho Americano de Medicina Interna (ABIM).

As variáveis numéricas foram avaliadas usando teste T de Student e as variáveis qualitativas foram avaliadas usando X² com teste de Fisher.

3.2 ISOLAMENTO DE PLAQUETAS

As plaquetas foram isoladas a partir do sangue de voluntários saudáveis, conforme método descrito por Hamburger & McEver (1990). Utilizando uma seringa contendo 3 mL de ACD (8 g/L de ácido cítrico, 22,4 g/L de citrato de sódio e 2 g/L de dextrose; pH 5,1), foram coletados 17 mL de sangue periférico de voluntários sadios. Após a coleta, o sangue foi homogeneizado e transferido para tubo cônico estéril de 50 mL. O sangue foi então submetido a uma centrifugação de 205 x g, por 20 minutos, à temperatura ambiente, com parada sem freio, obtendo-se ao final do processo o plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi coletado e transferido para outro tubo cônico estéril de 50 ml e à ele adicionou-se 100 nM de prostaglandina E1 (PGE1). Após isso, outra centrifugação foi realizada a 550 x g, por 20 minutos, à temperatura ambiente, com parada sem freio, e ao fim, o sobrenadante (contendo o plasma pobre em plaquetas (PPP)) foi descartado. O pellet de plaquetas foi então ressuspendido em 25 mL de PSG (5 mM de PIPES, 145 mM de NaCl, 4 mM de KCl,

50 μ M de Na_2HPO_4 , 1 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5,5 mM de glicose; pH 6,8) e 100 nM PGE1 e foi realizada uma última centrifugação a 500 x g, por 20 minutos, à temperatura ambiente, com parada sem freio. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspendido em 1 mL de meio 199 (M199 com EBSS, L-Glutamina e HEPES; Lonza 12-117F). Após contagem das plaquetas feita em microhematócrito, a concentração plaquetária foi ajustada para 1×10^8 plaquetas/mL.

3.3 PREPARO DO HEME E DA HEMOZOÍNA SINTÉTICA

Tanto o heme quanto a hemozoína sintética (sHz) foram preparados a partir de hemina. O heme foi preparado adicionando-se 13,2 mg de hemina à 1 mL de DMSO (concentração final de 20 mM). Essa solução estoque foi protegida da luz e mantida a -20°C até o momento do uso. No dia do experimento, depois da solução estoque ter sido descongelada a temperatura ambiente, ela foi submetida ao ultrassom por 20 minutos e diluída 10 vezes em NaOH 0,25N. Posteriormente, a solução de heme foi diluída em meio 199 para então ser usada no estímulo de plaquetas em diferentes concentrações.

Para o preparo da sHz, foram dissolvidos 39,2 mg de hemina em 8 mL de NaOH 0,1M. A solução foi agitada no shaker por 1 hora e em seguida adicionou-se a ela 49 mmol de ácido acético. Posteriormente, a solução foi transferida para tubos eppendorfs que foram incubados a 75°C *overnight*. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 21.693 x g por 20 minutos, e após isso, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de água Milli Q. Os tubos foram agitados no shaker por 1 minuto e depois foram novamente centrifugados a 21.693 x g por 20 minutos. O processo de descarte de sobrenadante, adição de água Milli Q, agitação no shaker e centrifugação foi repetido mais 4 vezes. Após o último descarte de sobrenadante, adicionou-se 1 ml de solução de NaHCO_3 0,1 N e SDS 2,5% (pH 9,1). Os tubos foram agitados no shaker durante 5 minutos e depois centrifugados a 21.693 x g por 20 minutos. A adição de solução de NaHCO_3 e SDS, agitação no shaker, centrifugação e descarte do sobrenadante foi repetida mais 4 vezes. Após a última centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de água Milli Q em cada tubo para lavar os cristais. Homogeneizou-se o pellet com a pipeta e centrifugou-se a 21.693 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente. Repetiu-se

esse processo de lavagem mais 3 vezes e na última lavagem, o sobrenadante foi descartado. Os tubos contendo a sHz foram colocados dentro do fluxo laminar para que secassem e, em seguida, foram armazenados em geladeira até o uso.

Para realizar a quantificação da sHz foi preparada uma curva padrão. Para esse fim, foi feita uma alíquota da solução estoque de heme preparada previamente. Essa alíquota foi então diluída em NaOH 0,1M obtendo-se a concentração de 1 mM, que foi utilizada como o primeiro ponto da curva. Posteriormente, foi feita uma diluição seriada em NaOH. Uma alíquota da sHz preparada foi diluída em 500 uL de NaOH 0,1N e, juntamente com a curva padrão, foi lida em espectrofotômetro a 400 nm.

3.4 ESTÍMULO DE PLAQUETAS COM HEME E HEMOZOÍNA SINTÉTICA

As plaquetas isoladas de voluntários saudáveis foram estimuladas pelo heme, nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 20 μ M e pela hemozoína sintética nas concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 20 μ M. O grupo controle do estímulo com heme recebeu os veículos DMSO a 14,1 mM e NaOH a 2,5 mM enquanto o controle do estímulo com a sHz recebeu o veículo NaOH a 0,4 mM. Em seguida, as plaquetas foram incubadas em estufa a 37°C por 5h e após o tempo de incubação, seguiram para análise por citometria de fluxo conforme protocolos de dupla marcação para análise de exposição de fosfatidilserina e de despolarização da membrana mitocondrial interna descritos a seguir.

3.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO

Plaquetas isoladas do sangue de voluntários sadios foram incubadas por 15 minutos com o inibidor de proteassoma Bortezomib (1 μ M) ou com o quelante de cálcio Bapta-AM (20 μ M) ou com DMSO (14,1 mM) que foi usado como veículo. Posteriormente, as plaquetas foram estimuladas com heme (20 μ M) ou sHz (20 μ M) e incubadas em estufa a 37°C por 5h. Após o tempo de incubação, foi feita a análise por citometria de fluxo conforme protocolos de dupla marcação para análise de exposição de fosfatidilserina e de despolarização da membrana mitocondrial interna descritos a seguir.

3.6 ENSAIO COM PLASMAS

Ao final do isolamento, plaquetas de voluntários sadios foram ressuspensas em 500 μ L de PBS estéril. As plaquetas de um voluntário saudável foram ajustadas para uma concentração de 1×10^8 /ml e ressuspensas em plasma de 10 voluntários saudáveis heterólogos ou em plasma de 10 pacientes com malária vivax na presença ou ausência de hemopexina. Posteriormente as plaquetas foram incubadas em estufa a 37°C por 5h e depois foi feita a dupla marcação para análise de exposição de fosfatidilserina e de despolarização da membrana mitocondrial interna por citometria de fluxo.

3.7 CITOMETRIA DE FLUXO

A fim de identificar parâmetros de apoptose, foi realizada uma dupla marcação de plaquetas para análise da exposição de fosfatidilserina e despolarização da membrana mitocondrial interna. Para detecção da exposição de fosfatidilserina na membrana, plaquetas previamente isoladas do sangue de doadores saudáveis e estimuladas por heme, sHz ou por plasma, foram incubadas com tampão de ligação de Anexina V que acompanha o kit (BD Pharmingen). Em seguida, adicionou-se a Anexina V conjugada a FITC (BD Pharmingen) e incubou-se por 15 minutos, protegido da luz e a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram diluídas em 380 μ L do tampão de ligação à anexina. Em seguida, as plaquetas foram incubadas com a sonda TMRE ajustada para uma concentração final de 100 nM e então as amostras foram lidas no citômetro de fluxo o mais rápido possível.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se GraphPad Prism 6.0 for Windows (GraphPadSoftware, San Diego California USA). Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foram avaliados quanto à distribuição normal pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os dados não paramétricos foram analisados utilizando-se o teste de Friedman e para os dados normais utilizou-se ANOVA one-way ou teste T de Student, sendo a

significância estatística considerada sempre que $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 O PLASMA DE PACIENTES INFECTADOS POR *P. vivax* INDUZ A APOPTOSE PLAQUETÁRIA

Uma vez que a plaquetopenia é frequentemente relatada na infecção malárica, sobretudo na malária vivax (LACERDA *et al.*, 2011), hipotetizamos que fatores presentes no plasma de pacientes infectados por *P. vivax* poderiam induzir a apoptose plaquetária, contribuindo assim para a plaquetopenia observada em pacientes com malária vivax. Para isso, incubamos plaquetas isoladas do sangue de um doador sadio com plasmas de pacientes infectados por *P. vivax* ou plasmas de controles sadios heterólogos pareados por sexo e idade (Tabela 4.1). Posteriormente foi feita a marcação com Anexina V para análise da exposição de fosfatidilserina (PS) e com TMRE para análise do potencial de membrana mitocondrial.

Observamos que a incubação com plasma de pacientes com malária vivax levou ao aumento da exposição de PS e à despolarização da membrana mitocondrial interna de plaquetas em comparação ao grupo controle (Figura 4.1 A). Além disso, Observamos que a incubação do plasma de pacientes com malária vivax com plaquetas de um doador sadio foi capaz de levar a uma diminuição significativa do tamanho das plaquetas em relação ao grupo controle (plaquetas incubadas com plasma heterólogo de doadores sadios) (Figura 4.1 B).

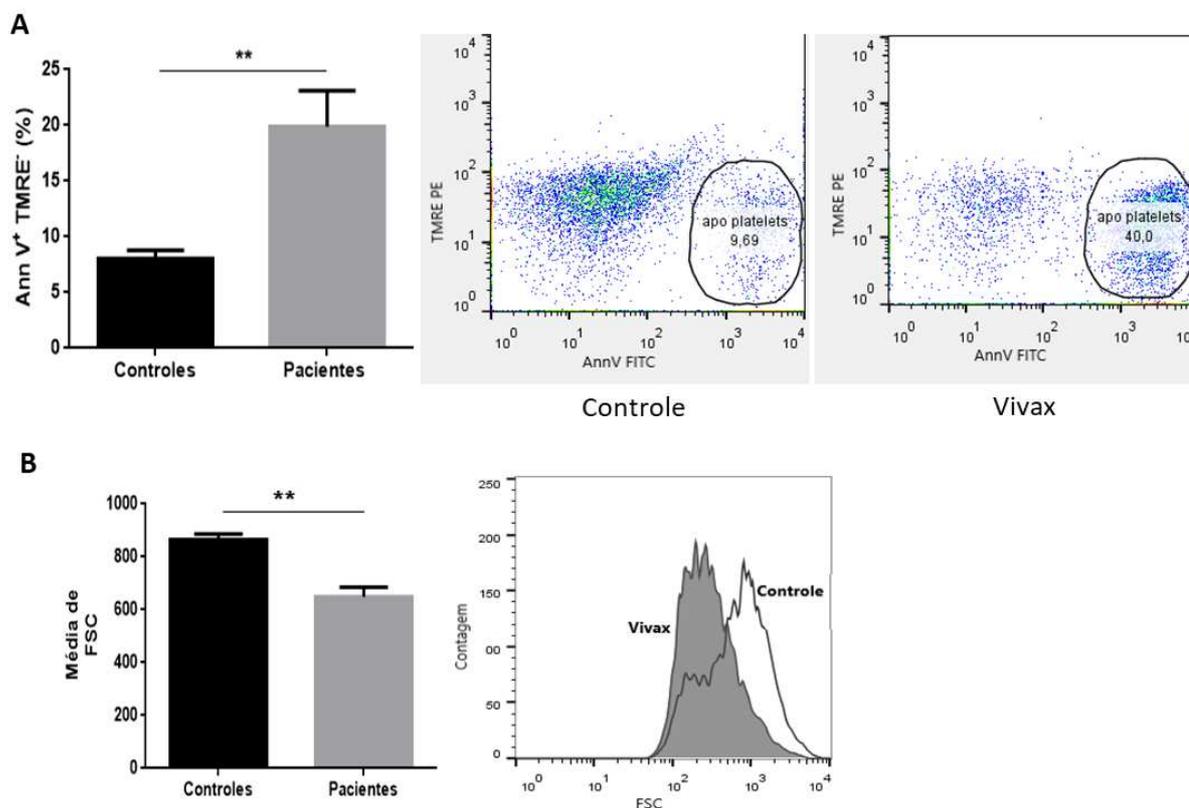


Figura 4.1 – Efeito do plasma de pacientes com malária vivax na apoptose de plaquetas de doadores saudáveis. Plaquetas isoladas de um voluntário sadio foram incubadas com plasmas de pacientes infectados por *P. vivax* ou com plasmas heterólogos de controles sadios, em estufa a 37° por 5h. Em seguida, realizou-se a duplo-marcação com as sondas Anexina V e TMRE para análise por citometria de fluxo. Foram consideradas apoptóticas as plaquetas positivas para a marcação com anexina V, indicando a exposição de fosfatidilserina (PS), e negativas para a sonda TMRE, indicando despolarização da membrana mitocondrial interna. O painel **A** mostra o percentual de plaquetas positivas para a Anexina V e negativas para o TMRE. Os dot plots representativos mostram a análise em plaquetas de um doador saudável incubadas com plasma de um controle heterólogo sadio e de um paciente. O painel **B** mostra a média do parâmetro FSC, que indica o tamanho das plaquetas, e a sobreposição de histogramas representativos de plaquetas de um doador sadio incubadas com plasma de um paciente e com plasma heterólogo de um controle sadio. Os gráficos são representativos de um experimento, sendo cada barra a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de plaquetas incubadas com plasmas de 10 pacientes com malária ou 10 voluntários saudáveis. Os asteriscos (**) indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle sendo $p < 0,01$.

4.2 HEME E HEMOZOÍNA SINTÉTICA INDUZEM A APOPTOSE PLAQUETÁRIA

Uma vez que heme e sHz são duas toxinas que atuam de maneira importante na patogênese da malária (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; GRIFFITH *et al.*, 2009), e que dados não publicados do nosso grupo demonstraram que heme e sHz induzem a ativação plaquetária, levantamos a hipótese de que essas toxinas poderiam também induzir a apoptose de plaquetas, sendo assim um dos responsáveis pela plaquetopenia tão observada em pacientes com malária vivax.

Plaquetas isoladas do sangue de doadores saudáveis foram estimuladas com diferentes concentrações de heme e sHz por 5h. Posteriormente essas plaquetas foram marcadas com Anexina V para análise da expressão de PS e com TMRE para análise do potencial de membrana mitocondrial.

As plaquetas incubadas, tanto com heme quanto com sHz, mostraram aumento significativo da exposição de PS e despolarização da membrana mitocondrial interna, em comparação aos grupos controles (heme 0 uM e sHz 0 uM), de forma dependente da dose, sendo que as plaquetas que receberam os maiores estímulos (heme 20 uM e sHz 20 uM) exibiram resultados mais robustos (Figura 4.2.1 e Figura 4.2.2). Observamos também que apenas a incubação com heme a 20 uM foi capaz de levar a uma diminuição significativa do tamanho das plaquetas em relação ao controle não tratado (heme 0 uM), enquanto que as três concentrações de sHz (1, 10 e 20 uM) foram capazes de reduzir o tamanho das plaquetas (Figura 4.2.1 e Figura 4.2.2).

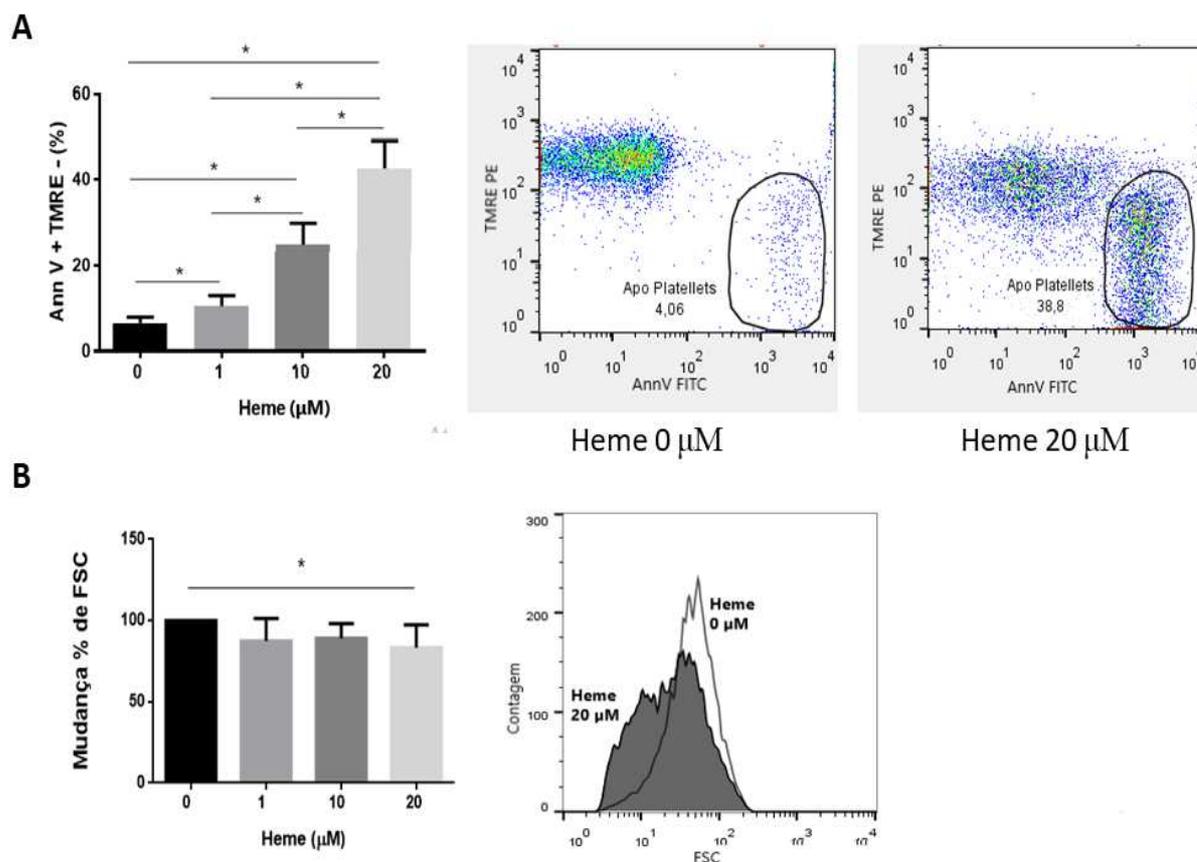


Figura 4.2.1 – Efeito do heme na apoptose de plaquetas de doadores saudáveis. Plaquetas isoladas do sangue de doadores saudáveis foram incubadas com heme nas concentrações de 1, 10 e 20 μM em estufa a 37° por 5h. Em seguida, realizou-se a duplo-marcação com as sondas Anexina V e TMRE para análise por citometria de fluxo. Foram consideradas apoptóticas as plaquetas positivas para a marcação com anexina V, indicando a exposição de fosfatidilserina (PS), e negativas para a sonda TMRE, indicando despolarização da membrana mitocondrial interna. O painel **A** mostra o percentual de plaquetas positivas para a Anexina V e negativas para o TMRE. Os dot plots são representativos da análise de plaquetas de um doador saudável não estimuladas (heme 0 μM) ou estimuladas com heme a 20 μM . O painel **B** mostra a mudança percentual do parâmetro FSC, que indica o tamanho das plaquetas, e a sobreposição de histogramas representativos de plaquetas de um doador saudável não estimuladas (heme 0 μM) ou estimuladas com heme a 20 μM . Os gráficos são representativos de cinco experimentos independentes com plaquetas de doadores distintos, sendo cada barra a média \pm E.P.M. do percentual de plaquetas Ann V+/TMRE⁻ (**A**) e da mudança percentual de FSC (**B**). O asterisco (*) indica a diferença estatística em relação ao grupo controle sendo $p < 0,05$.

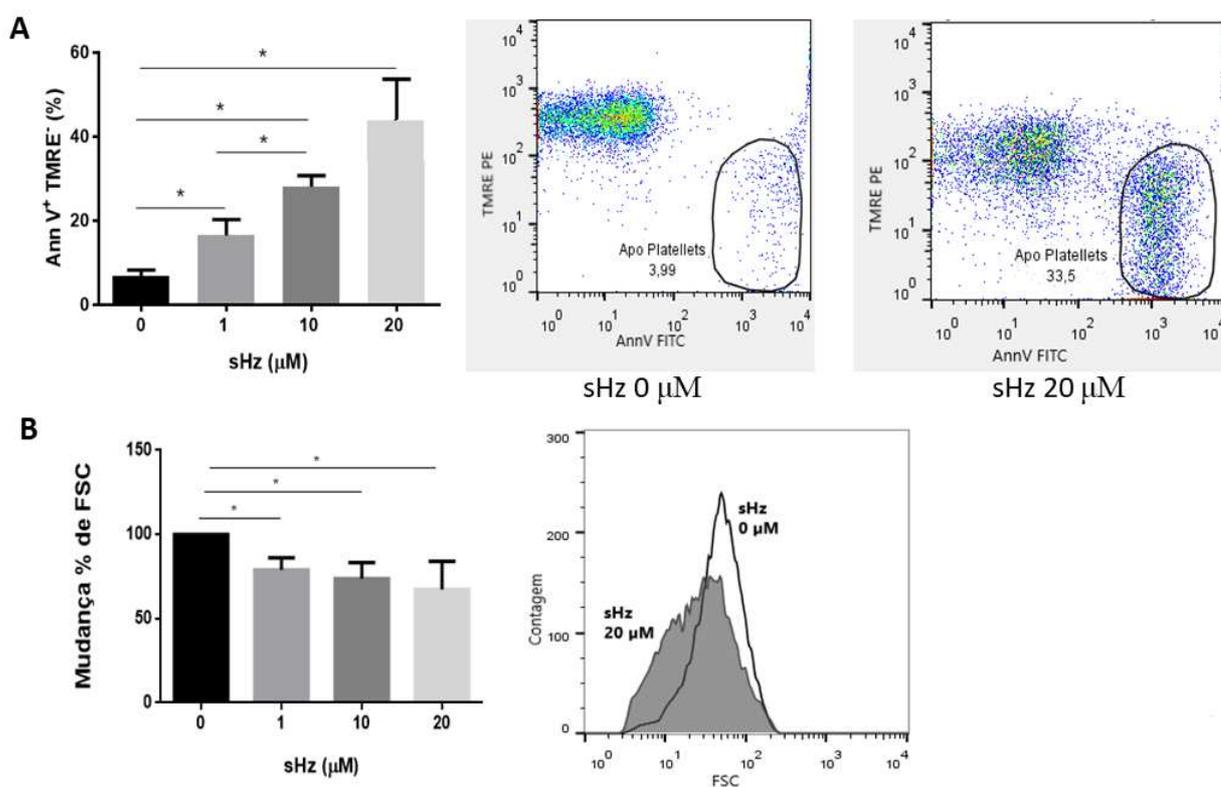


Figura 4.2.2 – Efeito da hemozoína sintética (sHz) na apoptose de plaquetas de doadores saudáveis. Plaquetas isoladas do sangue de doadores saudáveis foram incubadas com sHz nas concentrações de 1, 10 e 20 μM em estufa a 37° por 5h. Em seguida, realizou-se a duplo-marcação com as sondas Anexina V e TMRE para análise por citometria de fluxo. Foram consideradas apoptóticas as plaquetas positivas para a marcação com anexina V, indicando a exposição de fosfatidilserina (PS), e negativas para a sonda TMRE, indicando despolarização da membrana mitocondrial interna. O painel **A** mostra o percentual de plaquetas positivas para a Anexina V e negativas para o TMRE. Os dot plots são representativos da análise de plaquetas de um doador saudável não estimuladas (sHz 0 μM) ou estimuladas com sHz a 20 μM . O painel **B** mostra a mudança percentual do parâmetro FSC, que indica o tamanho das plaquetas, e a sobreposição de histogramas representativos de plaquetas de um doador saudável não estimuladas (sHz 0 μM) ou estimuladas com sHz a 20 μM . Os gráficos são representativos de cinco experimentos independentes com plaquetas de doadores distintos, sendo cada barra a média \pm E.P.M. do percentual de plaquetas Ann V+/TMRE⁻ (**A**) e da mudança percentual de FSC (**B**). O asterisco (*) indica a diferença estatística em relação ao grupo controle sendo $p < 0,05$.

4.3 HEME E sHz INDUZEM A APOPTOSE PLAQUETÁRIA DE MODO INDEPENDENTE DE PROTEASSOMA

Posto que o balanço antagônico entre proteínas pró e anti-apoptóticas regula a apoptose (KILE, 2014; LEYTIN, 2012), e a degradação de Bcl-xL em resposta ao heme foi recentemente evidenciado por nosso grupo, decidimos investigar qual via de degradação de proteínas, proteassoma ou calpaínas, está envolvida na degradação de Bcl-xL e conseqüentemente na apoptose plaquetária induzida por

heme e sHz. Para esse fim, incubamos plaquetas de voluntários saudáveis, por 15 minutos, com o inibidor de proteassoma Bortezomib; ou com o quelante de cálcio Bapta-AM, já que as calpaínas são dependentes de aumento dos níveis intracelulares de cálcio; ou com DMSO que foi usado como veículo. Posteriormente as plaquetas foram estimuladas com heme (20 μ M) ou sHz (20 μ M) durante 5 h e o fenótipo apoptótico foi avaliado como descrito anteriormente.

Observamos que tanto o Bortezomib quanto Bapta-AM não foram capazes de impedir a apoptose de plaquetas estimuladas por heme (Figura 4.3.1). De modo semelhante, observamos que o tratamento com Bortezomib ou Bapta-AM também não foi capaz de impedir a apoptose plaquetária estimulada pela sHz (Figura 4.3.2).

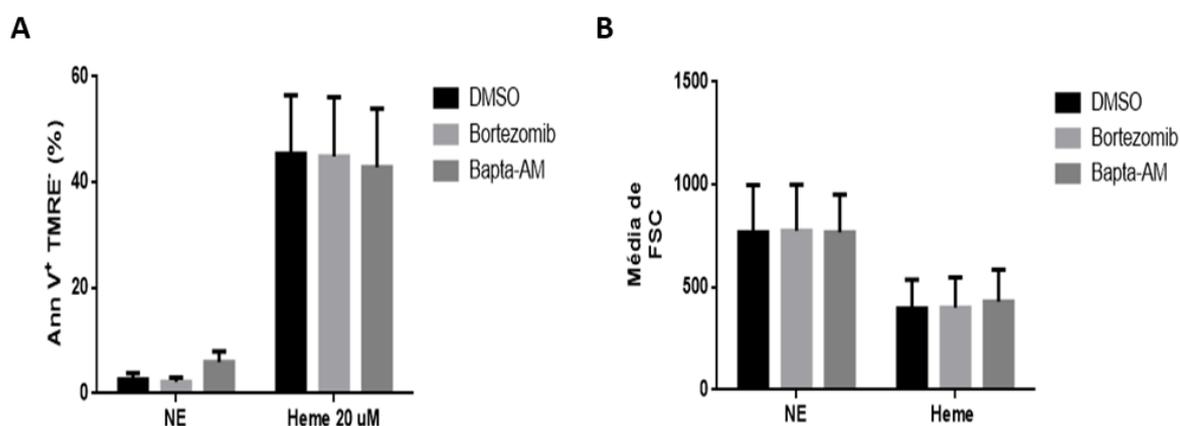


Figura 4.3.1 - Efeito do inibidor de proteassoma Bortezomib, e do quelante de cálcio Bapta-AM na apoptose de plaquetas estimulados com heme. Plaquetas isoladas do sangue de doadores saudáveis foram incubadas por 15 minutos com Bortezomib (1 μ M), com Bapta-AM (20 μ M) ou com o veículo de carregamento DMSO (14,1 mM). Posteriormente as plaquetas foram estimuladas com heme (20 μ M) em estufa a 37° por 5h, e em seguida foram incubadas com as sondas Anexina V e TMRE para análise no citômetro de fluxo. Em **A** é mostrado o percentual de plaquetas positivas para a Anexina V e negativas para o TMRE e em **B** é mostrada a média do parâmetro FSC. Os gráficos são representativos de quatro experimentos independentes com plaquetas de doadores distintos, sendo cada barra a média \pm E.P.M. do percentual de plaquetas Ann V⁺/TMRE⁻ (**A**) e da média de FSC (**B**).

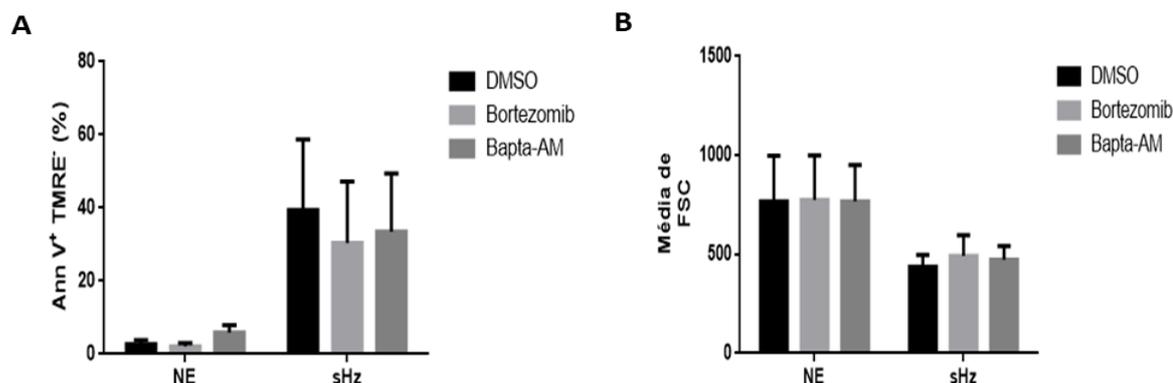


Figura 4.3.2 - Efeito do inibidor de proteassoma Bortezomib, e do quelante de cálcio Bapta-AM na apoptose de plaquetas estimulados com sHz. Plaquetas isoladas do sangue de doadores saudáveis foram incubadas por 15 minutos com Bortezomib (1 μ M), com Bapta-AM (20 μ M) ou com o veículo de carregamento DMSO (14,1 mM). Posteriormente as plaquetas foram estimuladas com sHz (20 μ M) em estufa a 37° por 5h, e em seguida foram incubadas com as sondas Anexina V e TMRE para análise no citômetro de fluxo. Em **A** é mostrado o percentual de plaquetas positivas para a Anexina V e negativas para o TMRE e em **B** é mostrada a média do parâmetro FSC. Os gráficos são representativos de quatro experimentos independentes com plaquetas de doadores distintos, sendo cada barra a média \pm E.P.M. do percentual de plaquetas Ann V⁺/TMRE⁻ (**A**) e da média de FSC (**B**).

4.4 HEMOPEXINA (Hx) REDUZ O EFEITO APOPTÓTICO DO PLASMA DE PACIENTES INFECTADOS POR *P. vivax*

Para avaliar se o heme liberado durante a malária vivax participa da apoptose induzida em plaquetas expostas ao plasma de pacientes maláricos, plasmas de pacientes infectados por *P. vivax* foram previamente incubados na presença ou ausência do quelante de heme hemopexina. Posteriormente, plaquetas obtidas de um voluntário sadio foram adicionadas aos plasmas dos pacientes ou plasmas heterólogos de controles sadios pareados por sexo e idade. Verificamos que o pré-tratamento dos plasmas de pacientes com malária vivax com a hemopexina preveniu o efeito apoptótico do plasma, em comparação ao plasma de pacientes não tratados com hemopexina. Esse dado indica a apoptose plaquetária induzida por heme livre liberado na circulação durante a malária vivax (Figura 4.4).

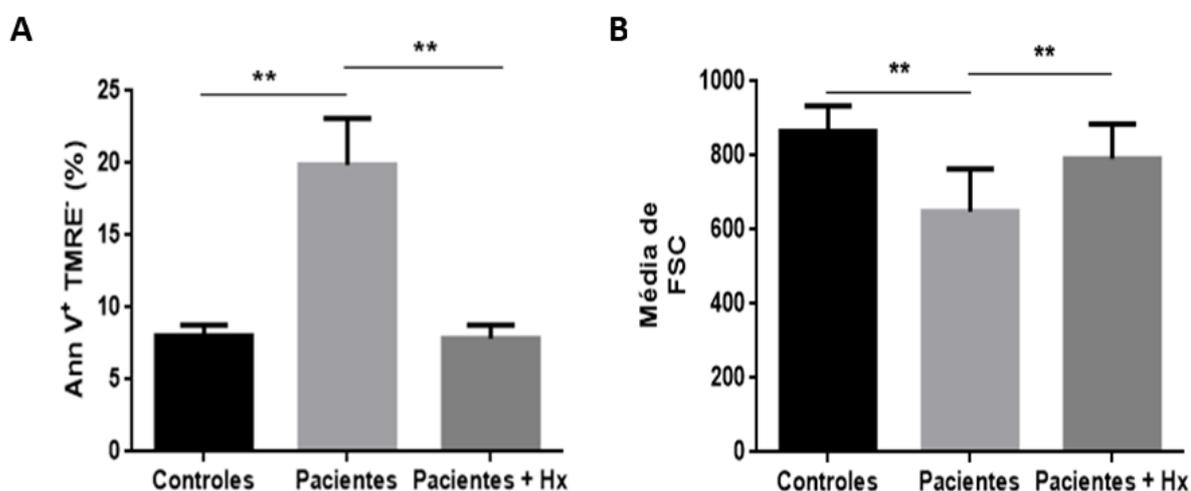


Figura 4.4 – Efeito da Hemopexina (Hx) na apoptose plaquetária induzida pelo plasma de pacientes com malária vivax. Plasmas de pacientes infectados por *P. vivax* foram incubados na presença ou ausência de Hx por 15 minutos e após esse tempo, assim como os plasmas de controles sadios, foram incubados com plaquetas de outro doador sadio em estufa a 37° por 5h. Posteriormente foi feita a marcação com as sondas Anexina V e TMRE para análise no citômetro de fluxo. Em **A** é mostrado o percentual de plaquetas positivas para a Anexina V e negativas para o TMRE e em **B** é mostrada a média do parâmetro FSC. Os gráficos são representativos de um experimento, sendo cada barra a média \pm E.P.M. de plaquetas incubadas com o plasma de 10 pacientes ou 10 controles saudáveis. Os asteriscos (**) indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle sendo $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

Por muito tempo a malária vivax foi negligenciada pois acreditava-se que se tratava de uma infecção benigna, porém tem sido constantemente relatado casos graves da doença com síndromes clínicas como anemia grave, ARDS e plaquetopenia grave (ANSTEY *et al.*, 2009; KOCHAR *et al.*, 2010; LACERDA, MARCUS V.G. *et al.*, 2012). A plaquetopenia é uma alteração hematológica bastante comum na malária e estudos mostram que até 80% dos pacientes tiveram diminuição da contagem de plaquetas durante a infecção por *P. falciparum* ou por *P. vivax* (LACERDA *et al.*, 2011).

Entre os diversos mecanismos biológicos propostos para explicar a plaquetopenia observada na malária, a apoptose plaquetária também tem sido apontada como possível causa desse fenômeno (GHOSH; SHETTY, 2008; HOTTZ *et al.*, 2013). Dados não publicados do nosso grupo mostraram que, em uma análise do transcriptoma de plaquetas de pacientes com malária vivax que se apresentavam plaquetopênicos, foi observada expressão diferencial de genes relacionados a morte

celular e que as plaquetas desses pacientes apresentavam sinais de apoptose tais como ativação das caspases 3 e 9. Esses dados evidenciam uma importante contribuição da apoptose de plaquetas na plaquetopenia observada durante a malária vivax.

Comparativamente à malária falciparum, é relatada na malária vivax uma maior ocorrência de anemia - decorrente entre outros fatores, de hemólise mais intensa - e de plaquetopenia (WHITE, 2018; DOUGLAS *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2011). Frente a isso, hipotetizamos que mediadores provenientes da hemólise que ocorre na malária vivax, quando liberadas na circulação, poderiam induzir a apoptose de plaquetas, contribuindo assim para a plaquetopenia. De fato, observamos que plaquetas de um doador saudável incubadas com plasma de pacientes infectados por *P. vivax* demonstraram sinais de apoptose, como a despolarização da membrana mitocondrial interna, exposição de fosfatidilserina e redução do tamanho das plaquetas (Figura 4.1). A mesma observação foi feita em estudos prévios não publicados pelo nosso grupo, em que plaquetas incubadas com plasma de pacientes infectados por *P. vivax* também apresentaram sinais apoptóticos, como a ativação de caspases. De maneira similar, Hojo-Souza e colaboradores (2015) demonstram que em amostras de sangue total de doadores com malária vivax foi observado um aumento percentual de células apoptóticas (T CD4+ e monócitos) na circulação em comparação a doadores saudáveis. Esse mesmo estudo ainda demonstrou a expressão diferencial de 10 genes envolvidos tanto na via extrínseca, quanto na via intrínseca da apoptose em pacientes infectados por *P. vivax*. Esses dados sugerem portanto, que fatores liberados na circulação após a destruição de hemáceas parasitadas, podem estar induzindo a apoptose de células, incluindo as plaquetas.

Sendo a malária uma doença caracterizada por intensa hemólise, com liberação na circulação de heme livre e do produto de sua detoxificação pelo parasito, hemozoína, levantamos a hipótese de que essas toxinas poderiam estar fornecendo um estímulo à apoptose de plaquetas, contribuindo dessa forma para o quadro plaquetopênico observado nos pacientes maláricos.

Na literatura já está bem estabelecido o efeito tóxico e oxidativo do heme podendo levar diversos tipos celulares a morte, como astrócitos e células do endotélio vascular cerebral humanas (LAIRD *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2013). Em nossos resultados, observamos que plaquetas de voluntários saudáveis incubadas

com heme apresentaram-se apoptóticas, conforme evidenciado pela despolarização da membrana mitocondrial interna, exposição de fosfatidilserina, e encolhimento celular, de forma dependente da dose (Figura 4.2.1). Larsen e colaboradores (2010), ao observarem a morte de hepatócitos estimulados com heme, chamaram este fenômeno de “sensibilização do heme à morte celular programada”, relatando que o efeito citotóxico do heme só é visível na presença de outros agonistas, como o TNF. Nossos dados mostraram, no entanto, que apenas o estímulo com heme foi suficiente para induzir a apoptose em plaquetas. Uma vez que o heme possui um potente efeito oxidante, a liberação de heme na circulação durante a hemólise de eritrócitos parasitados, pode causar disfunção mitocondrial em plaquetas levando-as a morte.

De forma semelhante, o estímulo de plaquetas de voluntários saudáveis com a hemozoína sintética (sHz) também induziu despolarização da membrana mitocondrial interna, exposição de fosfatidilserina e encolhimento celular. Esse fenótipo apoptótico foi induzido pela sHz de forma dose-dependente (Figura 4.2.2). Lamikanra e colaboradores (2009) também relataram que a hemozoína isolada de *P. falciparum* induziu a apoptose de células progenitoras de eritrócitos que tiveram uma redução no potencial da membrana mitocondrial e ativação das caspases 3, 8 e 9. Martiney e colaboradores (2007) também observaram características de apoptose em astrócitos incubados com sHz, como a vesiculação da membrana plasmática.

Uma vez que o balanço antagônico entre proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 regula a apoptose (KILE, 2014; LEYTIN, 2012), foi anteriormente mostrado por nosso grupo (dado não publicado) a degradação de Bcl-xL, uma proteína anti-apoptótica, em plaquetas estimuladas com heme. A partir disto, resolvemos investigar qual via de degradação de proteínas em plaquetas, proteassoma ou calpaínas, estaria envolvida na degradação de Bcl-xL e consequentemente na apoptose plaquetária induzida por heme e sHz.

As calpaínas são proteases que para serem ativadas necessitam de aumento nos níveis intracelulares de cálcio, seja por influxo de cálcio ou pela liberação pelo retículo endoplasmático (KRAEMER; WEYRICH; LINDEMANN, 2013; SUZUKI *et al.*, 2004). Observamos que o quelante de cálcio Bapta-AM não foi capaz de impedir a apoptose de plaquetas estimuladas por heme. O tratamento com o inibidor de proteassoma Bortezomib também não impediu a apoptose de plaquetas estimuladas por heme (Figura 4.3.1). Nossos resultados sugerem que a apoptose plaquetária

induzida por heme é independente de proteassoma e do aumento dos níveis de cálcio. Porém, resultados prévios do nosso grupo demonstraram que o tratamento de plaquetas com EGTA, um quelante de cálcio permeável à célula, inibiu a degradação de Bcl-xL induzida por heme. Kraemer e colaboradores (2013) também demonstraram a degradação de Bcl-xL dependente do aumento dos níveis intracelulares de cálcio e da ativação de calpaínas em plaquetas. Uma possível explicação para essa discordância de observações, pode ser o pequeno tamanho amostral do nosso estudo, e que caso seja aumentado, possa refletir uma diferença significativa entre os grupos tratados com Bapta-AM e tratados com o veículo (DMSO), uma vez que uma tendência entre eles pode ser percebida. Além disso, novos experimentos serão necessários com inibidores específicos de calpaínas para esclarecer essa questão.

De modo semelhante, podemos observar na figura 4.3.2 que tanto o Bortezomib quanto Bapta-AM também não foram capazes de impedir a apoptose de plaquetas estimuladas pela sHz. Esse resultado sugere que a sHz induz a apoptose de plaquetas de modo independente de proteassoma e do aumento dos níveis celulares de cálcio. No entanto, Nayak e colaboradores (2013) observaram que a inibição do proteassoma de plaquetas levou a despolarização da membrana mitocondrial interna e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e da fosfatidilserina. Desta forma, não podemos descartar que o tratamento com Bortezomib per se apresenta efeito apoptótico.

Por fim, após a confirmarmos que o plasma de pacientes com malária vivax induziu a apoptose em plaquetas de um voluntário sadio, o próximo passo foi investigar se a apoptose plaquetária estaria sendo induzida por heme liberado na circulação durante a malária vivax. Para esse fim utilizamos a hemopexina, um quelante de heme. Durante processos inflamatórios, a concentração da hemopexina no plasma aumenta drasticamente, sendo assim considerada uma proteína de fase aguda. Resultados prévios do nosso grupo demonstraram que houve um acréscimo na quantidade de hemopexina no plasma de indivíduos infectados por *P. vivax*, o que pode ser explicado pelo aumento nos níveis das citocinas IL-6 e IL-1B que são estímulos para a produção de hemopexina pelos hepatócitos (SMITH; MCCULLOH, 2015). Em nossos resultados observamos que a hemopexina reduziu a capacidade do plasma de pacientes infectado por *P. vivax* de induzir a apoptose em plaquetas de doadores saudáveis (Figura 4.4). Outro trabalho também demonstrou que a

hemopexina inibe os efeitos citotóxicos do heme em hepatócitos murinos e humanos, uma vez que a hemopexina impediu a morte celular programada de hepatócitos induzida por heme livre (LARSEN *et al.*, 2010).

Esses dados, portanto, nos fornecem indícios de que o heme e a toxina malárica hemozoína, liberados na circulação durante a malária vivax, são capazes de induzir a apoptose de plaquetas, como visto pela exposição da fosfatidilserina, despolarização da membrana mitocondrial interna e encolhimento celular, podendo assim contribuir para plaquetopenia observada durante a malária causada por *P. vivax*. Novos estudos serão necessários para identificar os mecanismos da apoptose plaquetária induzida por heme e sHz.

6 CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que as toxinas heme e hemozoína, provenientes da intensa hemólise que ocorre durante a infecção por *P. vivax*, induzem a apoptose plaquetária, podendo ser os desencadeadores da plaquetopenia característica da fisiopatologia da malária vivax.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliação da inibição das calpaínas por inibidores específicos na apoptose plaquetária induzida por heme;
- Dosagem de heme nos plasmas de pacientes infectados por *P. vivax* e de voluntários sadios;
- Avaliação de marcadores de outras vias de morte celular, além dos marcadores de apoptose, em plaquetas de doadores saudáveis incubadas com plasmas de pacientes com malária vivax ou estimuladas com heme e sHz;
- Avaliação do efeito de inibidores de proteassoma e calpaína na apoptose plaquetária induzida pelo plasma de pacientes com malária vivax;
- Avaliação da apoptose de outros tipos celulares induzida pelo plasma de pacientes com malária vivax;

REFERÊNCIAS

AMODU, O. K. *et al.* Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 1, p. 54–56, 1998.

ANDERSEN, Christian Brix Folsted *et al.* Haptoglobin. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 26, n. 14, p. 814–831, 2017.

ANDRADE, Bruno B. *et al.* Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2010.

ANSTEY, Nicholas M. *et al.* The pathophysiology of vivax malaria. *Trends in Parasitology*, v. 25, n. 5, p. 220–227, 2009.

ARAÚJO, Cláudio F. *et al.* The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 6, p. 517–521, 2008.

ASARE, Renate *et al.* Assessment of platelet indices and platelet activation markers in children with Plasmodium falciparum malaria. *Malaria Journal*, p. 1–7, 2020.

AZAM, Mohammad *et al.* Disruption of the Mouse μ -Calpain Gene Reveals an Essential Role in Platelet Function. *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, n. 6, p. 2213–2220, 2001.

BLAIR, Price; FLAUMENHAFT, Robert. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, v. 23, n. 4, p. 177–189, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Malária - 2020. *Boletim Epidemiológico.*, v. Novembro, n. Número Especial, p. 1–118, 2020.

BRUMMAIER, Tobias *et al.* Vivax malaria in pregnancy and lactation: A long way to

health equity. *Malaria Journal*, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2020.

BUDENHOLZER, Lauren *et al.* Proteasome Structure and Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 2017.

CAI, Chunmei; HU, Zhiqiang; YU, Xiao. Accelerator or Brake : Immune Regulators in Malaria. v. 10, n. December, p. 1–18, 2020.

CAMPOS, Fernanda Mf *et al.* Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2010.

CHAPMAN, Lesley M. *et al.* Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I. *The Journal of Immunology*, v. 189, n. 2, p. 916–923, 2012.

CHEN, Yufei *et al.* Role of platelet biomarkers in inflammatory response. p. 2–8, 2020.

COBAN, Cevayir *et al.* Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *Journal of Experimental Medicine*, v. 201, n. 1, p. 19–25, 2005.

COELHO, Helena Cristina C. *et al.* Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* Malaria Is Related to Platelets Phagocytosis. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, p. 3–9, 2013.

COGNASSE, Fabrice *et al.* Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and Cell Biology*, v. 83, n. 2, p. 196–198, 2005.

COLLINS, William E.; JEFFERY, Geoffrey M. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 4, p. 579–592, 2007.

CORONADO, Lorena M.; NADOVICH, Christopher T.; SPADAFORA, Carmenza. Malarial hemozoin: From target to tool. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1840, n. 6, p. 2032–2041, 2014.

CROCET, Kevin *et al.* Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 51, p. 36321–36327, 1999.

DANIAL, Nika N.; KORSMEYER, Stanley J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 205–219, 2004.

DAVIS, Beckley K; WEN, Haitao; TING, Jenny P. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. 2011.

DAYANAND, Kiran K.; ACHUR Rajeshwara N.; GOWDA, D. Channe. Epidemiology, drug resistance and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector Borne Dis.*, v. 55 (1), p 1-8, 2018.

DE MAST, Quirijn *et al.* Thrombocytopenia and release of activated von Willebrand factor during early *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 196, n. 4, p. 622–628, 2007.

DENIS, Melvin M *et al.* Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets. v. 122, p. 379–391, 2005.

DEROOST, Katrien *et al.* Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 48, n. 5, p. 589–600, 2013.

DI MASI, Alessandra *et al.* Haptoglobin: From hemoglobin scavenging to human health. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 73, n. March, p. 100851, 2020.

DOBBS, Katherine R; CRABTREE, Juliet N; DENT, Arlene E. Innate immunity to malaria — The role of monocytes. v. 293, n. October, p. 1–17, 2019.

DOUGLAS, Nicholas M. *et al.* The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal*, v. 11, p. 1–14, 2012.

DURAI, Prasannavenkatesh; GOVINDARAJ, Rajiv Gandhi; CHOI, Sangdun.

Structure and dynamic behavior of Toll-like receptor 2 subfamily triggered by malarial glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum. v. 280, 2013.

DUTRA, Fabianno F. *et al.* Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 39, p. E4110–E4118, 2014.

DUTRA, Fabianno F.; BOZZA, Marcelo T. Heme on innate immunity and inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5 MAY, n. May, p. 1–21, 2014.

FAILLE, Dorothée *et al.* Platelet microparticles: A new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB Journal*, v. 23, n. 10, p. 3449–3458, 2009.

FARGO, Matthew V.; GROGAN, Scott P.; SAGUIL, Aaron. Evaluation of jaundice in adults. *American Family Physician*, v. 95, n. 3, p. 164–168, 2017.

FIGUEIREDO, Rodrigo T. *et al.* Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 28, p. 20221–20229, 2007.

GARRAUD, Olivier; COGNASSE, Fabrice. Are platelets cells? And if yes, are they immune cells? *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. FEB, p. 1–8, 2015.

GAZZINELLI, Ricardo T. *et al.* Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 11, p. 744–757, 2014.

GHOSH, Kanjaksha; SHETTY, Shrimati. Blood coagulation in falciparum malaria - A review. *Parasitology Research*, v. 102, n. 4, p. 571–576, 2008.

GRAU, Georges E. *et al.* Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 187, n. 3, p. 461–466, 2003.

GRIFFITH, Jason W. *et al.* Pure Hemozoin Is Inflammatory In Vivo and Activates the NALP3 Inflammasome via Release of Uric Acid. *The Journal of Immunology*, v. 183,

n. 8, p. 5208–5220, 2009.

GUEIRARD, Pascale *et al.* Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 43, p. 18640–18645, 2010.

GUPTA, Nilaksh *et al.* Proteasome proteolysis supports stimulated platelet function and thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 34, n. 1, p. 160–168, 2014.

GYULKHANDANYAN, Armen V. *et al.* Markers of platelet apoptosis: Methodology and applications. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 33, n. 4, p. 397–411, 2012.

HALDAR, Kasturi; MOHANDAS, Narla. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. 2009.

HOJO-SOUZA, Natália S. *et al.* CD4+ T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. *Malaria Journal*, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2015.

HOTTZ, E. D. *et al.* Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 11, n. 5, p. 951–962, 2013.

HOTTZ, Eugenio D. *et al.* Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 4, p. 1864–1872, 2014.

HOTTZ, Eugenio D.; BOZZA, Fernando A.; BOZZA, Patrícia T. Platelets in immune response to virus and immunopathology of viral infections. *Frontiers in Medicine*, v. 5, n. APR, 2018.

HOTTZ, Eugenio D *et al.* Platelets mediate increased endothelium permeability in

dengue through NLRP3-in fl ammasome activation. v. 122, n. 20, p. 3405–3415, 2016.

JARAMILLO, Maritza *et al.* Synthetic Plasmodium-like hemozoin activates the immune response: A morphology - Function study. *PLoS ONE*, v. 4, n. 9, 2009.

JARAMILLO, Maritza; GODBOUT, Marianne; OLIVIER, Martin. Hemozoin Induces Macrophage Chemokine Expression through Oxidative Stress-Dependent and -Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 1, p. 475–484, 2005.

JENNE, Craig N.; KUBES, Paul. Platelets in inflammation and infection. *Platelets*, v. 26, n. 4, p. 286–292, 2015.

JOHN, Chandy C. *et al.* Low levels of RANTES are associated with mortality in children with cerebral malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 194, n. 6, p. 837–845, 2006.

JOSEFSSON, Emma C; VAINCHENKER, William; JAMES, Chloe. Regulation of Platelet Production and Life Span: Role of Bcl-xL and Potential Implications for Human Platelet Diseases. 2020.

KALANTARI, Parisa *et al.* Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during Malaria. *Cell Reports*, v. 6, n. 1, p. 196–210, 2014.

KHO, Steven *et al.* Platelets kill circulating parasites of all major Plasmodium species in human malaria. *Blood*, v. 132, n. 12, p. 1332–1344, 2018.

KILE, Benjamin T. The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. *British Journal of Haematology*, v. 165, n. 2, p. 217–226, 2014.

KOCHAR, Dhanpat Kumar *et al.* Thrombocytopenia in Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and mixed infection malaria: A study from Bikaner (Northwestern

India). *Platelets*, v. 21, n. 8, p. 623–627, 2010.

KOUPENOVA, Milka *et al.* Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. *Circulation Research*, v. 122, n. 2, p. 337–351, 2018.

KRAEMER, Bjoern F. *et al.* Novel anti-bacterial activities of β -defensin 1 in human platelets: Suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 11, 2011.

KRAEMER, Bjoern F; WEYRICH, Andrew S; LINDEMANN, Stephan. Protein degradation systems in platelets. p. 920–924, 2013.

KRISHNEGOWDA, Gowdahalli *et al.* Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: Cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 9, p. 8606–8616, 2005.

LACERDA, Marcus V.G. *et al.* Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *plasmodium vivax* malaria: To what extent does this parasite kill? *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, n. 8, p. 67–74, 2012.

LACERDA, Marcus Vinícius Guimarães *et al.* Thrombocytopenia in malaria: Who cares? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. SUPPL. 1, p. 52–63, 2011.

LAIRD, Melissa D. *et al.* Hemin-induced necroptosis involves glutathione depletion in mouse astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, n. 8, p. 1103–1114, 2008.

LAMIKANRA, Abigail A. *et al.* Distinct mechanisms of inadequate erythropoiesis induced by tumor necrosis factor alpha or malarial pigment. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.

LARSEN, Rasmus *et al.* A central role for free heme in the pathogenesis of severe

sepsis. *Science Translational Medicine*, v. 2, n. 51, 2010.

LEYTIN, Valery. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Reviews*, v. 26, n. 2, p. 51–63, 2012.

LIU, Mingli *et al.* STAT3 Regulates MMP3 in Heme-Induced Endothelial Cell Apoptosis. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. 1–12, 2013.

LIU, Mingli; HASSANA, Salifu; STILES, Jonathan K. Heme-mediated apoptosis and fusion damage in BeWo trophoblast cells. *Scientific Reports*, v. 6, n. May, p. 1–12, 2016.

MACHLUS, Kellie R.; ITALIANO, Joseph E. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *Journal of Cell Biology*, v. 201, n. 6, p. 785–796, 2013.

MANNE, Bhanu Kanth *et al.* Platelet Gene Expression and Function in COVID-19 Patients Platelet Gene Expression and Function in COVID-19 Patients University of Utah Molecular Medicine Program , Salt Lake City , Utah , 84112 Bioinformatics Shared Resource , Huntsman Cancer Institute. *Blood*, 2021.

MASON, Kylie D. *et al.* Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span. *Cell*, v. 128, n. 6, p. 1173–1186, 2007.

MCMORRAN, Brendan J. *et al.* Platelet factor 4 and duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science*, v. 338, n. 6112, p. 1348–1351, 2012.

MCMORRAN, Brendan J *et al.* Survival to Infection. *Platelets*, v. 323, n. February, p. 797–800, 2009.

MÉNARD, Robert *et al.* Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 10, p. 701–712, 2013.

MILNER, Danny A. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017.

MORRELL, Craig N. *et al.* Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*, v. 123, n. 18, p. 2759–2767, 2014.

NAING, Cho; WHITTAKER, Maxine A. Severe thrombocytopaenia in patients with vivax malaria compared to falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2018.

NAYAK, Manasa K.; KULKARNI, Paresh P.; DASH, Debabrata. Regulatory role of proteasome in determination of platelet life span. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 10, p. 6826–6834, 2013.

NEU, Carolin T; GUTSCHNER, Tony. Post-Transcriptional Expression Control in Platelet Biogenesis and Function. v. 110, 2020.

NOSTEN, F. *et al.* Effects of Plasmodium vivax malaria in pregnancy. *Lancet*, v. 354, n. 9178, p. 546–549, 1999.

OLIVEIRA-FERREIRA, Joseli *et al.* Malaria in Brazil: An overview. *Malaria Journal*, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2010.

ONO, Yasuko; SAIDO, Takaomi C; SORIMACHI, Hiroyuki. Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nature Publishing Group*, 2016.

PANKOUI MFONKEU, Joël Bertrand *et al.* Elevated Cell-Specific Microparticles Are a Biological Marker for Cerebral Dysfunctions in Human Severe Malaria. *PLoS ONE*, v. 5, n. 10, 2010.

PARROCHE, Peggy *et al.* 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 of the United States of America*, v. 104, n. 6, p. 1919–1924, 2007.

PHU, Nguyen Hoan *et al.* Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, n. 2, p. 200–204, 1995.

PUTRI, Indri Hapsari *et al.* Thrombocytopenia and Platelet Dysfunction in Acute Tropical Infectious Diseases. v. 1, n. 212, 2018.

REAL, Fernando *et al.* Platelets from HIV-infected individuals on antiretroviral drug therapy with poor CD4+ T cell recovery can harbor replication-competent HIV despite viral suppression. *Science Translational Medicine*, v. 12, n. 535, p. 1–12, 2020.

RIVERA-CORREA, J. *et al.* Plasmodium DNA-mediated TLR9 activation of T-bet+ B cells contributes to autoimmune anaemia during malaria. *Nature Communication*, v. 8, n.1282, p. 1-11, 2017.

SATCHIKO, Natália *et al.* On the cytokine / chemokine network during Plasmodium vivax malaria: new insights to understand the disease. *Malaria Journal*, p. 1–10, 2017.

SCORZA, Tatiana *et al.* Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. *Parasite Immunology*, v. 21, n. 11, p. 545–554, 1999.

SHI, Dallas S. *et al.* Proteasome function is required for platelet production. *Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 9, p. 3757–3766, 2014.

SHIMIZU, Toru *et al.* Heme: Emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chemical Society Reviews*, v. 48, n. 24, p. 5624–5657, 2019.

SINGH, Balbir; DANESHVAR, Cyrus. Human infections and detection of plasmodium knowlesi. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 2, p. 165–184, 2013.

SMITH, Ann; MCCULLOH, Russell J. Hemopexin and haptoglobin: Allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders. *Frontiers in Physiology*, v. 6, n. JUN, 2015.

SRIVASTAVA, Kalyan *et al.* Platelet Factor 4 Mediates Inflammation in Experimental Cerebral Malaria. *Cell Host and Microbe*, v. 4, n. 2, p. 179–187, 2008.

STRÜSSMANN, Tim *et al.* Platelets are a previously unrecognised source of MIF. p. 1004–1013, 2013.

STURM, Angelika *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.

SULLIVAN, David J. *et al.* On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 21, p. 11865–11870, 1996.

SUTHERS, Amy N.; SARANTOPOULOS, Stefanie. TLR7/TLR9- and B cell receptor-signaling crosstalk: Promotion of potentially dangerous B Cells. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. JUL, p. 1–8, 2017.

SUZUKI, Koichi *et al.* Structure, Activation, and Biology of Calpain. *Diabetes*, v. 53, n. SUPPL. 1, 2004.

TOTINO, Paulo Renato; LOPES, Stefanie Costa. Insights into the cytoadherence phenomenon of *Plasmodium vivax*: The putative role of phosphatidylserine. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. SEP, p. 1–6, 2017.

VIEIRA-DE-ABREU, Adriana *et al.* Platelets: Versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Seminars in Immunopathology*, v. 34, n. 1, p. 5–30, 2012.

VISHALAKSHI, Gopalapura J. Bisphenol AF elevates procoagulant platelets by inducing necroptosis via RIPK1-inflammasome axis. *Toxicology*, v 454, 2021

WHITE, Nicholas J. Anaemia and malaria 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. *Malaria Journal*, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2018.

WHITE, Nicholas J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. *Malaria Journal*, v. 10, n. October, 2011.

WHITE, Nicholas J. *et al.* Lethal Malaria: Marchiafava and Bignami Were Right. *Journal of Infectious Diseases*, v. 208, n. 2, p. 192–198, 2013.

WHITE, Nicholas J. *et al.* Malaria. *The Lancet*, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WHO, World Health Organization. *World Malaria Report: 20 years of global progress and challenges*. [S.l.: s.n.], 2020. v. WHO/HTM/GM.

WORD HEALTH ORGANIZATION. World maria report, 2020.

WILLIAMS, T. N. *et al.* Plasmodium vivax: A cause of malnutrition in young children. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, v. 90, n. 12, p. 751–757, 1997.

YANG, Junxian *et al.* Insights Into Immunothrombosis: The Interplay Among Neutrophil Extracellular Trap , von Willebrand Factor , and ADAMTS13. v. 11, n. December, p. 1–16, 2020.

ZHANG, Rou *et al.* Rheopathologic Consequence of Plasmodium vivax Rosette Formation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 8, p. 1–10, 2016.

ZHOU, Rongbin; YAZDI, Amir S; MENU, Philippe. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. p. 2–7, 2011.