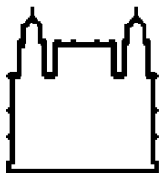


Instituto Oswaldo Cruz
Doutorado em Biologia Parasitária

**Apoptose em eritrócitos: envolvimento na patogênese
da anemia da malária**

Paulo Renato Rivas Totino

Rio de Janeiro
2012



Ministério da Saúde

Fiocruz

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

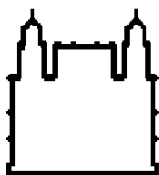
Paulo Renato Rivas Totino

**Apoptose em eritrócitos: envolvimento na patogênese da anemia da
malária**

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária
do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz

Rio de Janeiro
2012



Ministério da Saúde

Fiocruz

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Paulo Renato Rivas Totino

Apoptose em eritrócitos: envolvimento na patogênese da anemia da malária

Orientadora: Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz

Aprovada em: 01/03/2012

Membros da Banca examinadora:

Titulares

Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto - IOC (Presidente)

Dra. Maria de Nazaré Soeiro - IOC

Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda – FMT-HVD (Revisor)

Suplentes

Dra. Andrea Henriques Pons - IOC

Dra. Alda Maria da Cruz - IOC

Rio de Janeiro
Março de 2012

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, sob a orientação da Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz.

Apoio Financeiro:

Instituto Oswaldo Cruz - IOC

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - Faperj

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

**Dedico este trabalho aos meus maiores
amores: minha filha Lívia e minha esposa
Fernanda. A presença e carinho de vocês
foram fundamentais durante esse caminho
percorrido.**

Agradecimentos

Primeiramente, à Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz por sua valiosa orientação não apenas durante o desenvolvimento deste trabalho, mas ao longo dos dez anos em que estou na Fundação Oswaldo Cruz/IOC. Seu zelo, críticas e conhecimentos científicos aliados as oportunidades proporcionadas foram essenciais na minha formação acadêmica.

Ao Dr. Cláudio Ribeiro por me receber tão gentilmente no Laboratório de Pesquisas em Malária e pela difusão de *memes* (científicos ou não) que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À Dra. Dalma Banic e suas alunas Luciene Aquino e Raquel Pinna pela colaboração nas infecções experimentais, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Marcus Vinícius pela valiosa contribuição na revisão da tese e pela colaboração nos estudos com *P.vivax* conduzidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado em Manaus.

Às Dras. Kátia Torres e Eliana Brasil que muito prontamente permitiram a utilização do citômetro de fluxo para análise das amostras na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas em Manaus.

À Dra. Ana Cecília da Escola Nacional de Saúde Pública-Fiocruz pela colaboração nas dosagens de óxido nítrico.

Aos Drs. Leonardo Carvalho, José Oliveira e Lilian Riccio pelas críticas, sugestões e inúmeros esclarecimentos que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos Drs. Hugo Caire, Maria de Nazaré Soeiro, Andréa Henriques e Alda Maria da Cruz que, juntamente com Dr. Marcus Vinícius, aceitaram o convite

para participar da banca examinadora. Sei que a contribuição de vocês será fundamental!

À aluna de iniciação científica Aline Magalhães por sua ajuda na experimentação animal e no estudo conduzido em Manaus.

Aos amigos Josué e Cesare. Afinal, já são dez anos de companheirismo mútuo desde a iniciação científica.

Aos antigos e novos estudantes e amigos do Laboratório de Pesquisas em Malária: Ane, Beatriz, Bianca, Bruno, Cristiane, Daiana, Dauto, Elisa, Elsa, Evelyn, Larissa, Luanda, Natália, Raquel, Rodrigo, Stéfane, Tiago e Yuri por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Cláudia Castro, profissional competente e prestativa, sempre solucionando os problemas administrativos do laboratório e, ainda assim, disposta a ajudar.

À Dras. Mariza Morgado e Carmem Gripp e aos colegas do Laboratório de AIDS (Gisele, Tatiana, Isabel e Fernanda) pela ajuda e disponibilização de equipamentos indispensáveis para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos organizadores, professores e colegas do Seminário Laveran & Deane por todas as contribuições que fizeram ao projeto de tese.

Aos editores e revisores dos artigos publicados que compõem esta tese pelas sugestões e críticas enriquecedoras.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC-Fiocruz), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) por financiarem o desenvolvimento desse trabalho, contribuindo, assim, para minha formação profissional.

Aos pacientes da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado que voluntariamente nos cederam amostras de sangue possibilitando a realização deste trabalho.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

***“Um homem pode realizar muitas coisas
quando a mulher que ele ama o apoia, mesmo
que ela acredite que o que ele faz é tolo.”***

Steve Berry, autor de O Legado dos Templários

Índice

Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1. Situação atual da malária	1
1.2. Agentes etiológicos da malária	4
1.3. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	5
1.4. Manifestações clínicas da malária	9
1.5. População susceptível à malária grave.....	12
1.6. Anemia da malária	14
1.7. Participação dos eritrócitos não parasitados na anemia da malária	17
1.8. Apoptose	23
1.9. Apoptose eritrocitária	25
1.10. Apoptose eritrocitária: patogênese e proteção na malária	29
2. Racional e objetivos	33
3. Resultados	35
3.1. Artigo 1: Pro-apoptotic effect of antimalarial drugs do not affect mature human erythrocytes	35
3.2. Artigo 2: Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia	39
3.3. Artigo 3: Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: relationship with anaemia, parasitaemia and immune response	45
3.4. Resultados complementares: avaliação da susceptibilidade de eritrócitos não parasitados à apoptose durante a infecção humana por <i>P. vivax</i>	67

3.5. Artigo 4: Refractoriness of eryptotic red blood cells to <i>Plasmodium falciparum</i> infection: a putative host defense mechanism limiting parasitaemia	76
4. Considerações finais	82
5. Conclusões	94
6. Perspectivas	95
7. Referências bibliográficas	96
8. Anexos	121

Resumo

A anemia grave é sem dúvida uma das complicações mais comuns durante a infecção malárica e é uma das principais responsáveis pela elevada taxa de mortalidade de crianças e mulheres grávidas em regiões hiperendêmicas africanas. Embora os mecanismos que desencadeiam a anemia grave da malária ainda não tenham sido completamente elucidados, sabe-se que o aumento da destruição dos eritrócitos não parasitados tem importante contribuição na gênese dessa manifestação clínica. Frente a esse fato e tendo em vista a já descrita susceptibilidade dos eritrócitos ao processo de apoptose, que inclusive parece estar relacionado com a anemia de diversas patologias e pode ser induzida por diferentes tipos de drogas, decidimos estudar a apoptose eritrocitária e sua participação na anemia no decurso da infecção malárica. Primeiramente, avaliamos *in vitro* a capacidade da cloroquina, mefloquina, artemisinina e quinina em induzir apoptose em eritrócitos humanos. Nesta primeira investigação, observamos que os antimaláricos não tiveram efeito proapoptótico nestas células e, portanto, parecem não participar da anemia da malária através da indução de apoptose eritrocitária. Em seguida, estudando a infecção experimental de camundongos Balb/c pelo *Plasmodium yoelii* 17XL, constatamos um aumento nos níveis basais de apoptose de eritrócitos não parasitados e sugerimos que este aumento poderia estar contribuindo com a anemia neste modelo experimental de malária. Porém, quando posteriormente examinamos em paralelo os níveis de apoptose e o grau de anemia, não foi possível observar relação entre estes dois eventos, mas sim entre a carga parasitária e os níveis de apoptose detectados na fase tardia da infecção. A possível influência da parasitemia nos níveis de apoptose eritrocitária parece ter encontrado suporte quando estudamos pacientes infectados pelo *P. vivax*. De fato, nessa infecção, que cursa com baixa parasitemia, não detectamos alteração nos níveis de apoptose eritrocitária. Como a apoptose além de ter propriedades patogênicas, também está envolvida com a limitação da propagação de parasitas intracelulares, avaliamos então *in vitro* a capacidade do *P. falciparum* de infectar eritrócitos apoptóticos. Neste último estudo, verificamos que estas células apoptóticas são refratárias à infecção plasmodial e, portanto, poderiam participar no controle da parasitemia na malária.

Abstract

Severe anaemia is a common complication associated to malaria and plays an important role on mortality, particularly in children and pregnant woman living in malaria hyperendemic African regions. It is well known that together to other mechanisms leading to severe malaria anaemia, premature elimination of non-parasitized red blood cells (nRBC) contributes to the genesis of this malarial complication. Thus, considering the susceptibility of RBC to apoptosis – process that has been related to the anaemia of several pathologies and that can be induced by different drugs – we decided to study erythrocytic apoptosis and its involvement in malaria-associated anaemia. Firstly, we evaluated the *in vitro* capacity of chloroquine, quinine, artemisinin and mefloquine to induce apoptosis in human RBC. In this first study, it was observed that antimalarial drugs were not able to induce apoptosis in RBC and, therefore, it seems that these drugs do not participate in malaria anaemia through induction of erythrocytic apoptosis. Next, studying the experimental infection of *P. yoelii* 17XL in Balb/c mice, we noted increased levels of nRBC apoptosis that could be related to anaemia in this malaria model. However, when we analyzed, in parallel, apoptotic levels and anaemia degree, no relationship between these two parameters was observed, although an association between parasite load and apoptosis at the later stages of infection had been observed. The putative influence of parasitaemia on apoptotic levels seems to be supported by our studies with *P. vivax* malaria patients, since the low parasitaemia observed in this infection was not followed by an increase of erythrocytic apoptosis. Considering that besides to pathogenic properties, apoptosis also participates in the innate defense through restriction of intracellular pathogens propagation, we also investigated if *P. falciparum* parasites were able to infect apoptotic RBC. In this last study, it was possible to observe that apoptotic RBC were refractory to *in vitro* plasmodial infection and, therefore, it could act protectively by controlling malaria parasite propagation.

1. Introdução

1.1. Situação atual da malária

Apesar de ser uma enfermidade cujos primeiros relatos datam de 2700 a.C. e da descoberta de um de seus agentes etiológicos ter ocorrido há mais de 130 anos, a malária continua sendo, atualmente, a doença parasitária de maior prevalência em todo mundo (Figura 1.1) (Neghina et al., 2010; Garcia, 2010). Segundo os últimos dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010a), somente no ano de 2009 ocorreram cerca de 225 milhões de casos de malária e 780 mil mortes, dos quais, neste último caso, 85% foram de crianças com idade inferior a cinco anos de idade. Assim, estima-se que uma em cada cinco crianças (20%) que vive em áreas endêmicas africanas morra devido à malária (WHO, 2011).



Figura 1.1. Distribuição dos casos de malária no mundo segundo a Organização Mundial de Saúde. Fonte: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_2010.png.

Embora uma redução significativa no número global de casos de malária tenha ocorrido nos últimos dez anos, esta doença ainda está presente em 106 países/territórios das regiões tropicais e subtropicais do mundo, pondo em risco de infecção aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas, o que equivale a cerca da metade da população mundial (Figura 1.1) (WHO, 2010a). Dentre as áreas endêmicas distribuídas nas regiões definidas de acordo com a Organização Mundial de Saúde (Figura 1.2), somente aquelas da região subsaariana detém 78% dos casos de malária e 91% dos números de morte, enquanto que o restante dos casos está distribuído nas áreas das demais regiões, sendo o sudeste asiático a segunda maior região em número de casos e de morte, com o percentual respectivo de 15% e 6%, acompanhado pelo leste do Mediterrâneo, Pacífico oriental, Américas e Europa (Figura 1.1) (WHO, 2010a).

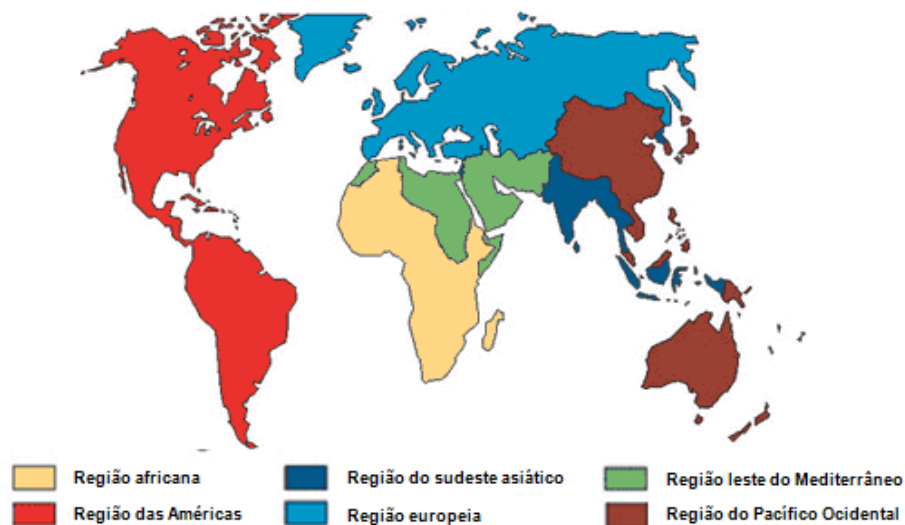


Figura 1.2. Regiões da Organização Mundial de Saúde. Fonte: <http://www.who.int/about/regions/en/index.html>.

O continente americano, onde 21 países das Américas do Sul e Central possuem áreas endêmicas de malária, contribui com menos de 1% do total de casos de malária do mundo (WHO, 2010a). Dentre estes países, somente o

Brasil concentra cerca de 60% dos casos das Américas (Ferreira & Silva-Nunes, 2010; WHO, 2010a). Embora grande parte do território brasileiro apresente condições de transmissão da malária, a grande maioria dos casos (99,8%) está concentrada na Amazônia Legal, que compreende a região norte mais os estados do Mato Grosso e Maranhão (Figura 1.3) (Oliveira-Ferreira et al., 2010; Secretaria de Vigilância em Saúde/SVS, 2011a). Nos demais estados brasileiros os casos registrados são quase que na sua totalidade importados da região amazônica ou de outros países. Segundo a SVS (2011b), foram registrados na Amazônia legal 334 mil casos no ano de 2010, sendo os estados do Pará, Amazonas e Rondônia os principais em números de casos com, respectivamente, 135.348, 74.573 e 43.589 registros.

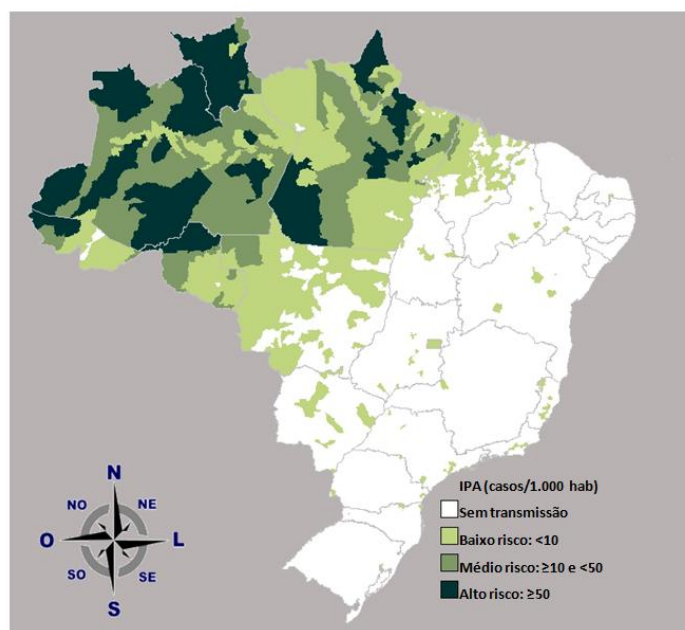


Figura 1.3. Áreas malarígenas brasileiras de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA) do ano de 2010. Fonte: SVS, dados não publicados.

1.2. Agentes etiológicos da malária

Os agentes etiológicos da malária são protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium* – táxon que integra o Filo Apicomplexa, no qual estão exclusivamente incluídos parasitas intracelulares obrigatórios caracterizados pela presença, em pelo menos um dos estágios do seu ciclo biológico, de um singular complexo apical que tem importante função na invasão à célula hospedeira (Rich & Ayala, 2003). Atualmente, estão descritas mais de 200 espécies de plasmódios que parasitam, especificamente, grupos ou espécies de répteis, aves ou mamíferos, podendo ou não causar doença nestes hospedeiros (Rich & Ayala, 2003).

Classicamente, quatro espécies são os parasitas da malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Contudo, baseado em casos humanos de malária no Sudeste Asiático causadas por um parasita tipicamente simiano, o *P. knowlesi* foi mais recentemente reconhecido como a quinta espécie plasmodial responsável pela infecção no homem (Singh et al., 2004; (Cox-Singh et al., 2008; Sabbatani et al., 2010). Entre as espécies plasmodiais, *P. falciparum* e *P. vivax* são os principais agentes da malária humana no mundo, com 95% dos casos dessa doença atribuídos a estes dois plasmódios (Garcia, 2010).

P. falciparum é o mais prevalente, sobre tudo na África, onde se concentra a grande maioria dos casos de malária do mundo. Não obstante a sua maior prevalência, esta espécie é a principal responsável pelas infecções graves e letais em indivíduos não imunes quando a doença não é imediatamente diagnosticada e o paciente não é submetido ao tratamento apropriado. Já o *P. vivax*, que é o plasmódio mais amplamente distribuído no

mundo, responde por 25-40% dos casos de malária e contribui consideravelmente para os casos de malária fora do continente Africano (Arévalo-Herrera et al., 2010; Quintero et al., 2011). As infecções causadas pelo *P. vivax* geralmente não são letais embora possam causar significativa morbidade, particularmente nos casos dos indivíduos primoinfectados ou quando associada à outra patologia.

No Brasil, são endêmicos o *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, dos quais o *P. vivax* é o mais prevalente, tendo sido responsável por 83,7% dos casos registrados de malária em 2010, seguido do *P. falciparum* com 16,3% (SVS, 2011). Já as infecções pelo *P. malariae* são de ocorrência mais rara (<1% dos casos notificados) e acredita-se que devido ao uso exclusivo do exame de gota espessa para o diagnóstico, parte das infecções tem sido erroneamente atribuída ao *P. vivax*. De fato, utilizando-se a técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) para o diagnóstico molecular do *P. malariae* em algumas áreas endêmicas brasileiras, já se pôde constatar uma subestimação da prevalência desse plasmódio quando o diagnóstico foi realizado pela gota espessa (Cavasini et al., 2000; Scopel et al., 2004).

1.3. Ciclo biológico do *Plasmodium*

A manutenção da transmissão dos parasitas da malária ao homem em áreas endêmicas é garantida primordialmente pela presença de espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* (Figura 1.4). Isso se deve ao fato dos plasmódios, parasitas heteroxenos, desenvolverem seu ciclo evolutivo alternando uma fase de vida sexuada nos vetores invertebrados, os anofelinos,

com uma fase assexuada nos hospedeiros vertebrados, neste caso, o homem (Figura 1.5) (Hafalla et al., 2011; Vaughan et al., 2008).



Figura 1.4. *Anopheles darlingi*: principal vetor da malária no Brasil. Fonte: Dr. Marcelo de Campos Pereira, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Default.htm>.

A infecção plasmodial no homem tem início quando fêmeas de anofelinos infectadas, ao fazerem seus repastos sanguíneos, inoculam na derme humana formas parasitárias infectantes denominadas esporozoítas, que haviam se acumulado em suas glândulas salivares. Após migrarem através do tecido subcutâneo, vários esporozoítas ganham a corrente sanguínea e, por essa via, alcançam o fígado, quando invadem os hepatócitos e iniciam o estágio hepático da infecção. Ao penetrar nos hepatócitos, os esporozoítas se multiplicam por esquizogonia, sofrendo várias mitoses e dando origem aos esquizontes hepáticos repletos de merozoítas. Ao final desse processo, os merozoítas são liberados na luz dos sinusóides hepáticos dentro de estruturas vesiculares denominadas merossomos, que são oriundas da membrana celular dos hepatócitos infectados. Através da corrente sanguínea, estas estruturas

alcançam os pulmões, rompendo-se e, então, liberando nos capilares desse órgão os merozoítas capazes de invadir os eritrócitos, originando assim o estágio eritrocítico da infecção.

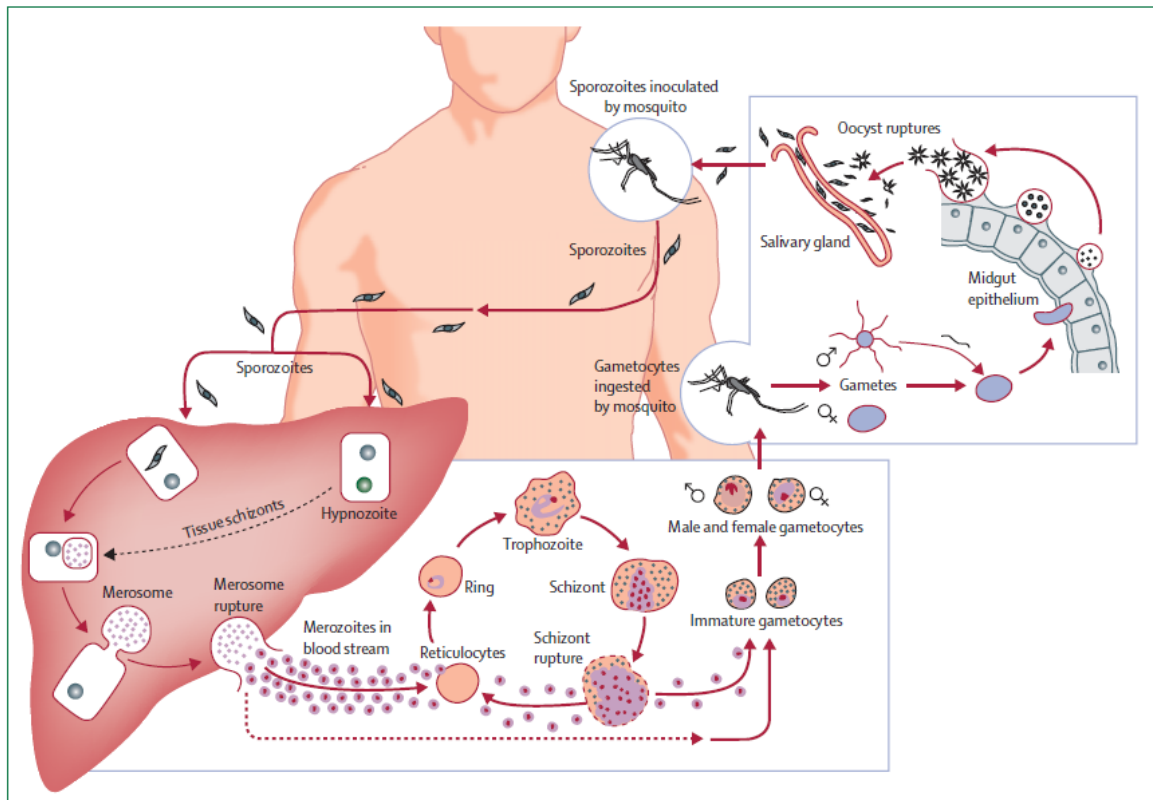


Figura 1.5. Ciclo evolutivo dos plasmódios que infectam o homem. As formas hipnozoítas são típicas das infecções pelo *P. vivax* ou pelo *P. ovale*. Fonte: Mueller et al., 2009.

No ciclo biológico do *P. vivax* e *P. ovale*, no entanto, nem todos os esporozoítas que infectam os hepatócitos entram inicialmente em processo de esquizogonia. Ao invés disso, se desenvolvem em formas hepáticas latentes chamadas hipnozoítas, capazes de permanecer por um longo período de tempo no interior dos hepatócitos e ativar, após este período, o processo esquizogônico que dará início a um novo estágio eritrocítico.

No interior dos eritrócitos, os merozoítas iniciam um novo processo de esquizogonia, passando por três estágios sanguíneos sucessivos e morfologicamente distintos: o trofozoíta jovem, o trofozoíta maduro e, por fim, o esquizonte. Como consequência do amadurecimento dos esquizontes, ocorre a lise dos eritrócitos e, então, os merozoítas sanguíneos liberados invadem novos eritrócitos, mantendo dessa forma o ciclo eritrocítico do parasita, responsável pelas manifestações clínicas da infecção.

Em um dado momento e por mecanismos desconhecidos, alguns merozoítas após a invasão dos eritrócitos ao invés de se desenvolverem em esquizontes, se diferenciam em formas eritrocíticas sexuadas – os gametócitos femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos) – que amadurecem sem sofrer divisão celular. Essas formas sexuadas ao serem ingeridas pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo darão continuidade ao ciclo evolutivo do parasita.

Ao chegarem à luz do estômago do mosquito, e com o rompimento dos eritrócitos, os gametócitos se diferenciam em gametas femininos (macrogametas) e masculinos (microgametas). Diferentemente do gametócito feminino, o masculino sofre enorme transformação, processo denominado exflagelação, na qual originam gametas masculinos flagelados. Em seguida, com a fertilização do gameta feminino pelo masculino, forma-se um zigoto alongado e móvel que constitui o único momento de diploidia do parasita – o oocineto. Esta forma migra através do epitélio do estômago do mosquito, alojando-se sobre a membrana basal e iniciando um novo processo de diferenciação que resulta no oocisto. O oocisto multiplica-se por esporogonia, sofrendo uma divisão meiótica reducional, seguida de várias divisões mitóticas

que geram milhares de esporozoítas haplóides. Uma vez completada a maturação, o oocisto se rompe liberando na hemocele do mosquito os esporozoítas, que através da hemolinfa são difundidos por todo o organismo do mosquito. Ao atingirem as glândulas salivares, os esporozoítas asseguram a transmissão do parasita para o homem e, conseqüentemente, a manutenção do ciclo parasitário.

1.4. Manifestações clínicas da malária

A duração do estágio hepático no homem corresponde ao período de incubação da malária, no qual não se observa manifestações clínicas de infecção. Esse período difere segundo a espécie plasmodial, durando em geral de 8-11 dias para o *P. falciparum*, 8-17 dias para o *P. vivax*, 18-40 dias para o *P. malariae*, 10-17 dias para o *P. ovale* e 9-12 dias para o *P. knowlesi* (Bruce-Chwatt, 1985; Mutis et al., 2005, Cox-Singh et al., 2008; Gracia, 2010).

Os sintomas e sinais clínicos da infecção, portanto, ocorrem durante o estágio eritrocítico, sendo notavelmente influenciados pelo rompimento dos eritrócitos parasitados que, por liberarem toxinas autólogas e parasitárias na corrente sanguínea, determinam o paroxismo febril da doença, caracterizado pela tríade malárica: calafrio, febre e sudorese. Por estar relacionado à lise eritrocitária ao final do processo esquizogônico do parasita, este paroxismo pode se apresentar com periodicidade que varia de acordo com o desenvolvimento intraeritrocítico de cada espécie plasmodial, ocorrendo, aproximadamente, a cada 48 horas para o *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. ovale*, 72 horas para o *P. malariae* e 24 horas para *P. knowlesi* (Bruce-Chwatt, 1985; Mutis et al., 2005, Cox-Singh et al., 2008; Gracia, 2010).

Entretanto, tal periodicidade típica da infecção malárica pode estar ausente nos estágios iniciais da doença devido ao assincronismo na maturação de uma ou mais gerações de parasitas. Nesta fase, além de febre baixa sem periodicidade, os sintomas usualmente predominantes são cefaleia, mal estar, fadiga, inquietação, sonolência, recusa alimentar, náuseas, diarreia e dores musculares (Bruce-Chwatt, 1985; Mutis et al., 2005, Garcia, 2010).

Com o avançar da infecção e sem o diagnóstico precoce e tratamento adequado, a malária pode evoluir para complicações graves e letais, principalmente em indivíduos não imunes infectados pelo *P. falciparum*, que é sem dúvida o principal responsável pelas formas graves da malária (Tripathy et al., 2007; Tjitra et al., 2008, WHO, 2010b). Com a capacidade de invadir eritrócitos de qualquer idade e produzir as maiores quantidades de merozoítas dentre os plasmódios que acometem o homem, o *P. falciparum* constantemente está associado às infecções com hiperparasitemia - um dos fatores complicadores da doença (Maguire & Baird, 2010; Garcia, 2010; Sowunmi et al., 2011). Ademais, fenômenos como o enrijecimento celular dos eritrócitos parasitados e a citoaderência das formas eritrocíticas maduras (trofozoítas e esquizontes) na microvasculatura também estão intimamente ligados a alta patogenicidade do *P. falciparum* (Miller et al., 2002).

As complicações decorrentes da infecção pelo *P. falciparum* incluem, além de hiperparasitemia, malária cerebral, hipertermia prolongada, anemia grave, hipoglicemia, insuficiência renal, disfunção hepática, acidose metabólica, edema pulmonar, choque e coagulopatias (Garcia, 2010; WHO, 2010b).

Similarmente as infecções pelo *P. falciparum*, aquelas causadas por *P. knowlesi* também podem estar associadas com hiperparasitemias e com o

desenvolvimento de formas graves e letais da malária (Cox-Singh et al., 2008; Maguire & Baird, 2010; Cox-Singh et al., 2010). A falta de predileção por uma ou outra população de eritrócitos e o ciclo esquizogônico que se repete a cada 24 horas, provavelmente são os principais influenciadores para o agravamento dos casos causados pelo *P. knowlesi* (Garcia, 2010), uma vez que o fenômeno de citoaderência de formas eritrocíticas parece não ocorrer com essa espécie plasmodial (Daneshvar et al., 2009; Cox-Singh et al., 2010). Embora a transmissão do *P. knowlesi* ao homem esteja atualmente restrita a algumas regiões do sudeste asiático onde habitam simianos hospedeiros reservatórios (*Macaca fascicularis*, *M. nemestrina*, *M. inus* e *Saimiri sciurea*), as infecções por *P. knowlesi* emergem como uma zoonose relevante para saúde pública mundial (Kantele et al., 2008; Sabbatani et al., 2010).

Já no caso das infecções causadas pelo *P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale*, é tradicionalmente conhecido que estas são benignas e não costumam levar a complicações, em parte, devido à preferência dessas espécies de infectar eritrócitos imaturos (*P. vivax* e *P. ovale*) ou senescentes (*P. malariae*), que, por suas pequenas disponibilidades, limitam o aumento das densidades parasitárias (Maguire & Baird, 2010). No entanto, casos de malária complicada associados a estas espécies têm sido identificados (Maguire & Baird, 2010), sobretudo quando o *P. vivax* era o plasmódio infectante (Tjitra et al., 2008; Sharma & Khanduri, 2009; Parakh et al., 2009; Alexandre et al., 2010; Srivastava et al., 2011; Tanwar et al., 2011). Nas infecções por *P. vivax*, assim como por *P. ovale*, recaídas da doença após um período assintomático de semanas, meses ou anos, também podem ocorrer como resultado da

maturação dos hipinozoítas latentes no fígado (Krotoski, 1989; Garcia, 2010; Maguire & Baird, 2010).

1.5. Populações susceptíveis à malária grave

Os casos graves e letais de malária acometem, majoritariamente, crianças menores de cinco anos de idade que residem em áreas africanas de alta transmissão do *P. falciparum* (Figura 1.6) (Druilhe & Pérignon, 1999; Greenwood 2005; WHO, 2010a). Em que se pesem os fatores genéticos e ambientais (López et al., 2010), a maior susceptibilidade dessas crianças se dá essencialmente pela ausência de uma imunidade clínica capaz de inibir as formas graves da doença.

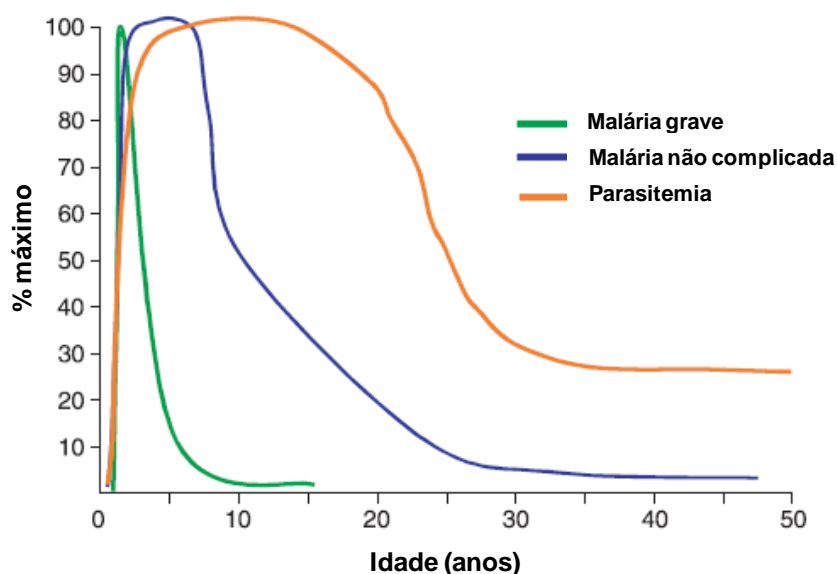


Figura 1.6. Esquema clássico da aquisição de imunidade clínica em regiões africanas hiperendêmicas de malária. Fonte: Marsh & Kinyanjui, 2006.

É classicamente conhecido que em áreas de elevada transmissão de malária a aquisição de uma imunidade protetora (premunição), capaz de manter níveis baixos de parasitemia e evitar as manifestações clínicas da

doença, ocorre de maneira lenta e dependente da exposição contínua e interrompida ao parasita, sendo necessárias múltiplas infecções e, portanto, seria um fenômeno intimamente relacionado à idade (Figura 1.6) (Druilhe & Pérignon, 1999). Entretanto, alguns trabalhos já evidenciaram que o desenvolvimento de uma imunidade clínica em crianças e adultos pode ocorrer após algumas poucas infecções (Baird, 1995; Gupta et al., 1999). Independente do número de infecções prévias necessárias para se adquirir uma imunidade protetora, as crianças mais jovens de áreas hiperendêmicas, por não terem experienciado infecções prévias, continuam representando o grupo mais vulnerável as complicações da malária. Ademais, estudos realizados por Baird (1995) com migrantes não imunes sugerem que a maturidade do sistema imunológico presente nos adultos leva ao desenvolvimento mais rápido da imunidade antimalárica do que em crianças.

Já em áreas de menor transmissão, os quadros de malária grave, embora menos frequentes, não estão estritamente associados a um determinado grupo etário (Reyburn et al., 2005; Dondorp et al., 2008). Nestas áreas a exposição limitada à malária determina uma reduzida imunidade populacional que se traduz numa susceptibilidade à doença que independe da idade do indivíduo infectado.

Dentre os grupos vulneráveis ao desenvolvimento de malária grave, também se incluem: i) migrantes e viajantes não imunes, provenientes de áreas não malarígenas ou de baixa endemicidade (Schwartz et al., 2001; Mascarello et al., 2008; Seringe et al., 2011) e; ii) indivíduos imunossuprimidos, tais como grávidas e pacientes HIV positivos, nos quais se observam uma redução na imunidade antimalárica (Schantz-Dunn & Nour, 2009; Flateau et al., 2011).

1.6. Anemia da malária

A anemia é uma das mais comuns desordens clínicas e é uma das principais responsáveis pela morte de crianças e mulheres grávidas nos países em desenvolvimento (Noor, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008), a anemia (definida por uma concentração de hemoglobina inferior aos níveis esperados por idade, sexo e condição de gravidez - Tabela 1.1) afeta globalmente 1,6 bilhões de pessoas, cerca de 25% da população mundial, sendo as maiores prevalências observadas entre crianças menores de cinco anos de idade (61,7–67,5%) e mulheres grávidas (51,9–59,6%) das regiões africanas (Figure 1.7).

Tabela 1.1. Taxas basais de hemoglobina de acordo com o sexo, a faixa etária e o estado de gravidez.

Idade e/ou gênero	Hemoglobina basal (g/dL)
Crianças (0,5-4 anos)	11,0
Crianças (5-11 anos)	11,5
Crianças (12-14 anos)	12,0
Mulheres não grávidas (≥ 15 anos)	12,0
Mulheres grávidas	11,0
Homens (≥ 15 anos)	13,0

Fonte: WHO, 2008

Diversos fatores, que podem ocorrer isoladamente ou em conjunto, são responsáveis pelos quadros de anemia. Dentre estes fatores, que incluem deficiência de ferro, doenças infecciosas e desordens genéticas da hemoglobina, a malária tem sem dúvida significativa contribuição para a anemia nas áreas malarígenas (WHO, 2008). De fato, em vários inquéritos

epidemiológicos envolvendo crianças africanas, o risco de ser acometido por uma anemia estava significativamente relacionado com a presença da infecção plasmodial (Boele van Hensbroek et al., 2010; Green et al., 2011; Muoneke et al., 2011; Magalhães & Clementes, 2011). Inclusive, em um desses estudos realizados por Muoneke e colaboradores (2011), observou-se que a malária estava implicada em até 64,3% dos casos de anemia grave (hemoglobina \leq 5g/dL) admitidos em um hospital de referência na Nigéria.

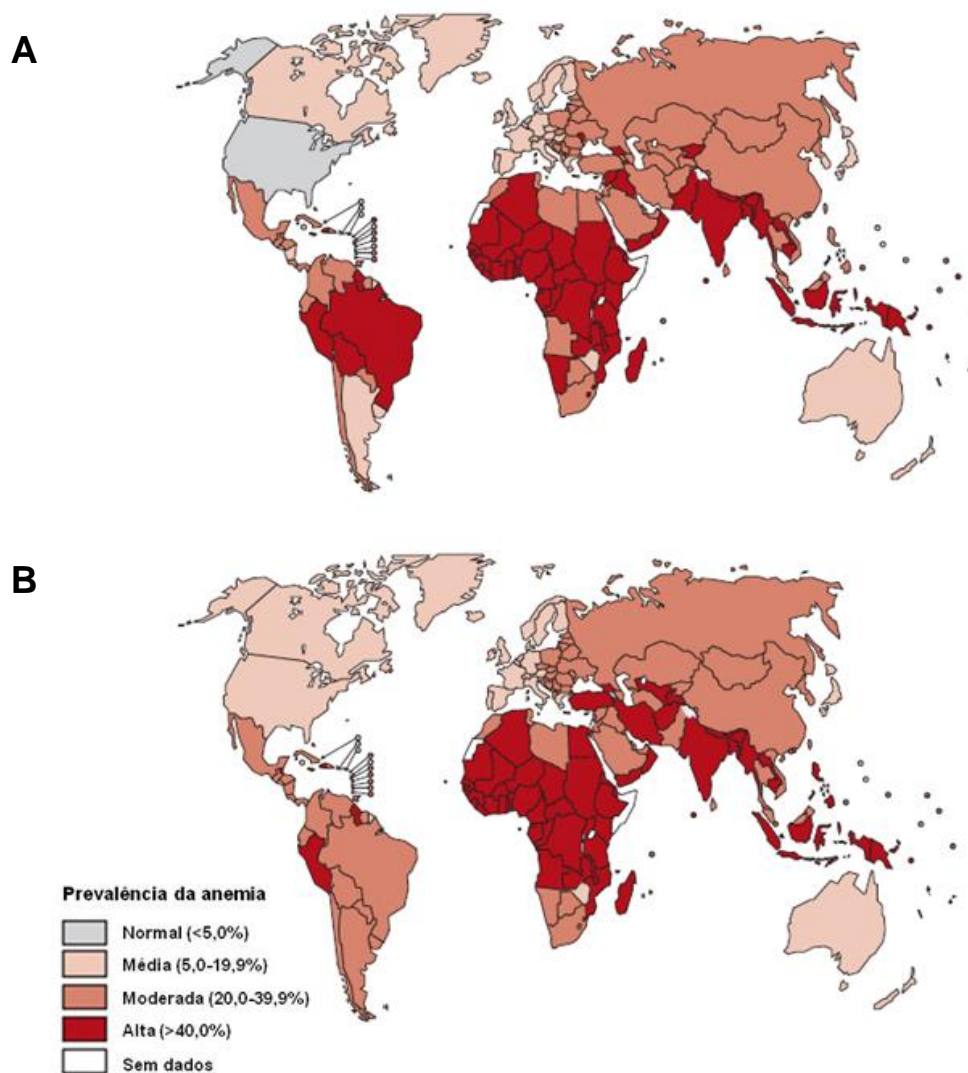


Figura 1.7. Prevalência mundial da anemia em crianças menores de cinco anos (A) e em mulheres grávidas (B) segundo a Organização Mundial de Saúde. Fonte: WHO, 2008.

Devido à maior prevalência e alta patogenicidade, o *P. falciparum* é a espécie plasmodial majoritariamente implicada nos casos de anemia grave. Entretanto, as infecções pelo *P. vivax* também podem estar associadas com esta complicação da infecção malárica (Tjitra et al., 2008; Poespoprodjo et al., 2009; Alexandre et al., 2010; Srivastava et al., 2011). De fato, o envolvimento do *P. vivax* em casos de anemia grave fica bastante evidente nos estudos realizados na Indonésia por Tjitra e colaboradores (2008), no qual esta complicação foi implicada em 87% dos casos de malária grave causados pelo *P. vivax*

Porém, convém salientar que diversos outros fatores indutores de anemia, tais como a deficiência de ferro, as parasitoses intestinais e a desnutrição, também são bastante comuns nas áreas malarígenas e, por conseguinte, tornam a gênese da anemia associada a malária um processo multifatorial (Menendez et al., 2000; Casals-Pascual & Roberts, 2006). Ademais, já foi evidenciado que algumas drogas antimaláricas rotineiramente utilizadas, tais como artesunato, artemeter e primaquina, também são capazes de alterar os parâmetros eritrocitários normais em ratos, macacos cinomolgos e humanos clinicamente sadios, podendo levar a uma anemia moderada (hemoglobina entre 5 e 8g/dL) em crianças menores que 12 anos de idade (Xie et al., 2005; Clark et al., 2008; Efferth & Kaina, 2010; Shekalaghe et al., 2010; Clark, 2011).

Frente a estes fatos, os modelos experimentais animais têm sido de grande utilidade na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da malária envolvidos no desenvolvimento da anemia (Tabela 1.2), uma vez que além de possibilitarem análises na ausência de fatores secundários à infecção malária,

permitem abordagens que por questões éticas e técnicas são limitadas nas pesquisas envolvendo seres humanos (Lamb et al., 2006; Lamikanra et al., 2007; Quintero et al., 2011).

Tabela 1.2. Modelos murinos de anemia da malária.

Espécie plasmodial/ cepa ou clone	Linhagem do camundongo	Características da infecção	Características da anemia
<i>P. chabaudi chabaudi</i>			
AS, CB, AJ, ER	C57BL/6	Não letal Sequestro de formas maduras	Anemia aguda com hemólise extravascular acompanhada de reticulocitose após pico de parasitemia
	A/J	Letal Sequestro de formas maduras	Anemia aguda de rápida progressão
<i>P. berghei</i>			
ANKA	C57BL/6 e CBA/J	Letal Síndrome cerebral Pouco sequestro de formas maduras	Anemia aguda Resposta inadequada de reticulócitos
ANKA	BALB/c e DBA/2	Letal, mas também infecção crônica induzida por drogas Sem síndrome cerebral	Anemia crônica em animais semi-imunes
<i>P. berghei</i>	Ratos	Letal	Anemia em animais esplenectomizados
<i>P. yoelii</i>			
17X	BALB/c	Não letal Sequestro de eritrócitos parasitados nos vasos cerebrais	Invade somente reticulócitos Eliminação prematura dos eritrócitos Aumento na rigidez dos eritrócitos parasitados
17XL	BALB/c	Síndrome cerebral letal com sequestro de eritrócitos parasitados nos vasos cerebrais	Invade eritrócitos de todas as idades Anemia aguda
<i>P. vinckei</i>	BALB/c	Letal	Inibição da eritropoiese

Fonte: Lamikanra et al., 2007

1.7. Participação dos eritrócitos não parasitados na anemia da malária

Considerando que a malária é causada por um parasita intracelular obrigatório que infecta e destrói eritrócitos, não deveria ser surpreendente que uma das complicações mais comuns da malária seja uma anemia. No entanto, a destruição mecânica dos eritrócitos pelo parasita e o sequestro dos eritrócitos parasitados nos capilares profundos não explicam a gravidade e a extensão da anemia na infecção (Zuckerman, 1964). É bem conhecido que pode não haver

relação entre o grau de anemia e a intensidade da parasitemia – anemia grave pode ser observada em pacientes com baixas parasitemias – e que mesmo após tratamento com drogas antimaláricas a anemia pode persistir (Abdalla et al., 1980; Phillips et al., 1986; Carvalho et al., 2003).

Em vista desses fatos, tem sido proposto que em adição a destruição dos eritrócitos parasitados, tanto o aumento da eliminação de eritrócitos não parasitados quanto a diminuição da produção dessas células devido à disfunção na eritropoiese teriam importantes contribuições para a patogênese da anemia na malária (Clark & Cowden, 2003; Chang & Stevenson, 2004; Schofield & Grau, 2005).

O envolvimento dos eritrócitos não parasitados no desenvolvimento da anemia já foi constatado em indivíduos infectados por *P. falciparum* manifestando malária grave (Looareesuwan et al., 1991). De fato, eritrócitos não parasitados autólogas marcadas com Cr⁵¹ e administradas por via intravenosa eram eliminadas de forma mais acelerada em pacientes com malária grave do que em indivíduos saudáveis ou com malária não complicada. Experimentos com camundongos BALB/c semi-imunes e ratos “Wistar” infectados com *P. berghei* ANKA – modelos nos quais às infecções maláricas apresentam baixas parasitemias e grau de anemia similar ao observado em humanos com anemia grave – também apontam para o comprometimento dos eritrócitos não parasitados (Evans et al., 2006). Nesses modelos murinos, eritrócitos biotinilados *in vivo* eram eliminados em poucos dias da circulação dos animais infectados, mesmo quando os eritrócitos eram provenientes de animais controles não infectados. Somam-se a esses trabalhos, os de Jakeman e colaboradores (1999), que através do uso de modelo matemático e dados

obtidos de pacientes com neurosífilis submetidos à terapia com *P. falciparum*, calcularam que para cada eritrócito parasitado cerca de nove eritrócitos não parasitados são destruídos.

Dois mecanismos centrais poderiam atuar na eliminação dos eritrócitos não parasitados: a hemólise intravascular e a eritrofagocitose. A hipótese de hemólise intravascular parece pouco provável já que sinais típicos como a secreção de hemoglobina na urina, não têm sido constatados tanto em modelo experimental quanto na infecção humana (Phillips et al., 1986; Goka et al., 2001; Schofield & Grau, 2005; Evans et al., 2006). Além disso, eritrócitos de pacientes com anemia grave possuem uma maior expressão do receptor CD59 cuja expressão está envolvida com a prevenção de hemólise provocada pela ativação do sistema complemento (Waitumbi et al., 2000). Portanto, é pouco provável que o processo hemolítico tenha grande importância na anemia da malária.

Em contraste, a hiperativação do sistema fagocítico parece ser o maior responsável pela eliminação dos eritrócitos não parasitados na infecção malárica. Evidências para essa proposição não se baseiam apenas na observação da fagocitose de eritrócitos não parasitados por macrófagos do baço, fígado e medula óssea durante a infecção de camundongo ou por monócitos e macrófagos na infecção humana (Weidanz & Long, 1988; Abdalla, 1988; La Raja, 2002). Em estudos realizados por Biemba e colaboradores (2000) a anemia grave na malária estava diretamente associada com o aumento da concentração plasmática de neopterina – marcador da atividade de macrófagos – e inversamente correlacionada com os níveis de IL-4. De fato, em um trabalho anterior feito por esse mesmo grupo com crianças infectadas

por *P. falciparum* com malária cerebral, já havia sido mostrado que a persistência de anemia em determinadas crianças após tratamento estava associada com a permanência da resposta imune Th1, mensurada pelos níveis de neopterinina, e com o declínio dos níveis de IL-4 – citocina de perfil Th2 (Biemba et al., 1998). Considerando que a atividade macrofágica pode permanecer após tratamento, isso poderia explicar em parte a persistência da anemia após a completa eliminação do parasita.

De fato, Evans e colaboradores (2006) mostraram a importância dos macrófagos na anemia da malária através da administração *in vivo* de lipossomos de clodronato – composto utilizado para depleção desse tipo celular. Dessa maneira, a eliminação dos macrófagos em camundongos BALB/c semi-imunes infectados com *P. berguei* ANKA foi capaz de diminuir a gravidade da anemia nestes animais quando comparada com o decurso da anemia nos animais controles infectados.

Apesar de ser evidente a importância dos macrófagos e da fagocitose na patogênese da anemia malárica e, embora já tenha sido observada uma maior susceptibilidade à fagocitose de eritrócitos de crianças maláricas com anemia grave quando comparadas com as de crianças com malária não complicada ou assintomática (Waitumbi 2000), ainda não estão bem esclarecidas as vias pelas quais os eritrócitos não parasitados são direcionados para a destruição.

Uma das hipóteses levantadas é que os eritrócitos não parasitados seriam conduzidos à fagocitose através da sensibilização por anticorpos e componentes do sistema complemento. Nesse caso a sensibilização ocorreria por anticorpos dirigidos contra antígenos do parasita adsorvidos ativa ou passivamente na superfície desses eritrócitos não parasitados (Layez et al.,

2005; Bratting et al., 2008) ou por autoanticorpos dirigidos contra antígenos da membrana dos eritrócitos expostos ou alterados físico/quimicamente por substâncias derivadas ou induzidas pelo parasita (cripto/neo-antígenos) (Daniel-Ribeiro & Zanini, 2000; Ekvall et al., 2001; Pantaleo et al., 2008). Além disso, já foi demonstrado que crianças com anemia grave por *P. falciparum* expressam menores níveis dos receptores CR1 e CD55 – ambos localizados na superfície dos eritrócitos e relacionados com a proteção dessas células contra a deposição de componentes do sistema complemento, tal como fragmentos de C3 – do que àquelas com malária não complicada ou com malária cerebral (Waitumbi et al., 2000; Stoute, 2005).

Esses acontecimentos poderiam explicar os resultados relatados por diferentes autores concernentes à positividade nos testes de *Coombs* direto apresentada por pacientes com infecção por *P. falciparum* (Abdalla, 1986; Merry et al., 1986; Goka et al., 2001). Entretanto, anticorpos e componentes do complemento parecem não serem os únicos componentes envolvidos com a eliminação dos eritrócitos, visto que nesses relatos nem sempre a correlação entre a gravidade da anemia e os níveis de IgG/componentes-do-complemento associados a superfície dos eritrócitos era constatada (Abdalla, 1986; Merry et al., 1986). Conseqüentemente, vias fagocíticas independentes de opsonização, como a mediada pela fosfatidilserina na superfície dos eritrócitos parasitados (Turrini et al., 1992), poderiam participar na eliminação dos eritrócitos não parasitados.

É bem estabelecido que durante o desenvolvimento intraeritrocítico do *P. falciparum* os eritrócitos parasitados, com o decorrer da maturação parasitária, perdem progressivamente sua propriedade de deformação. Isto ocorre,

provavelmente, devido à inserção de antígenos plasmodiais na superfície e no citoesqueleto dessas células e ao estresse oxidativo gerado pelo parasita que seria capaz de diminuir a flexibilidade da membrana celular (Dondorp et al., 2000). Por conseguinte, outra possibilidade para o desenvolvimento da anemia na malária seria a redução prematura da deformidade dos eritrócitos - que é capaz de dificultar o seu fluxo pelos sinusóides do baço, levando-as à fagocitose pelos macrófagos esplênicos (Dondorp et al., 1999; Dondorp et al., 2000; Clark & Cowden, 2003).

Realmente, estudos realizados por Dondorp e colaboradores (1999), mostraram que tanto eritrócitos parasitados quanto não parasitados de pacientes infectados por *P. falciparum* apresentam menor capacidade de se deformarem do que os eritrócitos de indivíduos não infectados. Estes autores relataram ainda, que o aumento dessa rigidez celular observada no decurso da infecção estava fortemente relacionado com a gravidade da anemia. Frente a essas observações, foi sugerido que a diminuição da deformidade dos eritrócitos não parasitados poderia ser deflagrada pela liberação de fatores solúveis produzidos pelo parasita ou por estresse oxidativo gerado por substâncias produzidas pelo hospedeiro em resposta à infecção, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio – compostos associados com a anemia grave na malária e capazes de causar danos aos eritrócitos (Dondorp et al., 2000; Griffiths et al., 2001; Clark & Cowden, 2003; Keller et al., 2004).

Mais recentemente, o efeito da malária na deformidade dos eritrócitos foi reavaliado num estudo conduzido por Handayani e colaboradores (2009), que investigaram esse fenômeno celular tanto na infecção pelo *P. falciparum* quanto pelo *P. vivax*. Neste estudo foi possível demonstrar que diferentemente

dos eritrócitos na malária *falciparum*, que mostram um perfil de rigidez celular, aquelas provenientes da infecção pelo *P. vivax*, parasitadas ou não, foram caracterizadas por uma aumentada flexibilidade e fragilidade. Embora não se saiba o motivo e as consequências dessa diferença, esse achado suporta a concepção de que a distinção biológica entre o *P. falciparum* e o *P. vivax* é acompanhada de diferentes mecanismos patogênicos que levam à anemia malárica (Anstey et al., 2009).

Em adição aos fatores parasitários e do hospedeiro, os antimaláricos também podem estar envolvidos na eliminação dos eritrócitos não parasitados durante o tratamento da malária. Essa premissa pode ser suportada pela já demonstrada capacidade da artemisinina e seus derivados (dihidroartemisinina, artemeter e artesunato) de promoverem, *in vitro*, a lise e diminuição na deformidade de eritrócitos humanos (Gu et al., 1986; Scott et al., 1989). Ademais, também tem sido constatado em estudos realizados pelo grupo de MacMillan em ratos que o tratamento *in vitro* de eritrócitos com compostos oriundos do metabolismo da primaquina induz *in vivo* uma acelerada eliminação dessas células via fagocitose (Bolchoz et al., 2001; Bowman et al., 2004 e 2005).

1.8. Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada que representa um dos principais mecanismos para a sobrevivência dos organismos multicelulares. Esse processo celular tem participação crucial no desenvolvimento embriogênico e na homeostasia tecidual, agindo no controle das populações celulares como um mecanismo de deleção celular com função

oposta à da mitose (Kerr et al., 1972; Duke et al., 1996). A apoptose também atua como um dos mecanismos de defesa do organismo através da eliminação de células envelhecidas, danificadas, cancerígenas ou infectadas (Duke et al., 1996; Dockrell, 2001).

O processo apoptótico em células de mamíferos tem sido bem caracterizado e compreende várias mudanças morfológicas e eventos bioquímicos que ocorrem desde o início de sua ativação até a completa deflagração do processo e eliminação da célula apoptótica. Dentre as mudanças morfológicas podemos destacar a diminuição do volume celular com manutenção da integridade das membranas celulares, formação de corpos apoptóticos e a condensação da cromatina. Os principais eventos bioquímicos incluem fragmentação do DNA, exposição da fosfatidilserina na superfície celular, perda do potencial transmembrana mitocondrial, clivagem de diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares e, sobretudo, a ativação de uma família específica de proteases – as caspases, que são os componentes centrais das vias bioquímicas que conduzem para a morte apoptótica (Chang & Yang, 2000; Fadeel & Orrenius, 2005). A relação entre as caspases e a apoptose é tão íntima, que se a atividade dessas proteases é bloqueada, a morte celular e/ou a deflagração dos eventos celulares associados à apoptose é inibida (Déas et al., 1998; Chautan et al., 1999).

Duas principais vias levam à ativação das caspases e, conseqüentemente, à apoptose: a via intrínseca mitocondrial e a via extrínseca mediada por receptores. Na apoptose induzida por diferentes tipos de agentes causadores de danos celulares, coletivamente denominados de “geradores de estresse celular”, tais como radiações gama e ultravioleta, drogas citotóxicas,

estresse oxidativo e ausência de estímulo por fatores de crescimento ou citocinas, a mitocôndria tem função de acionar as vias bioquímicas que levam à deflagração da apoptose através da liberação de moléculas capazes de ativar caspases (Fumarola & Guidotti, 2004). Já a via extrínseca requer o envolvimento de receptores específicos presentes na superfície celular, sendo a ativação das caspases decorrente da ligação desses receptores de morte com seus ligantes (Chang & Yang, 2000; Wang et al., 2005).

Uma vez as caspases ativadas, um importante evento para o “sucesso” do processo apoptótico - que é a eliminação da célula alvo sem que haja danos para o organismo - é a externalização da fosfatidilserina na superfície celular. Inicialmente presente na face intracelular da membrana plasmática e exteriorizada durante os estágios iniciais da apoptose, a fosfatidilserina promove o reconhecimento e a fagocitose das células apoptóticas por macrófagos e outras células em um processo mediado por receptores (Fadok & Henson, 2003), prevenindo que as células apoptóticas cheguem a um estado tardio com perda da integridade de membrana e liberação de componentes intracelulares capazes de estimular uma resposta inflamatória.

Além do seu efeito “opsonizador”, a fosfatidilserina também é capaz de estimular resposta anti-inflamatória em macrófagos após a fagocitose das células apoptóticas, estimulando a liberação de IL-10, PGE2, TGF- β e outros (Fadok & Henson, 2003).

1.9. Apoptose eritrocitária

Embora a apoptose tenha sido extensamente estudada em células nucleadas e seja caracterizada por marcantes eventos nucleares

(fragmentação do DNA e condensação da cromatina), tem sido mostrado que células anucleadas também podem ser susceptíveis a esse processo de morte celular.

A ideia de que o núcleo e as mudanças nucleares observadas durante a apoptose não são necessários para a deflagração desse processo de morte celular foi inicialmente proposta em estudos utilizando células originalmente nucleadas (Schulze-Osthoff et al., 1994; Castedo et al., 1996). Nestes estudos, a retirada experimental da estrutura nuclear não foi capaz de inibir frente a estímulos proapoptóticos os eventos citoplasmáticos morfológicos e bioquímicos típicos da apoptose.

Porém, a observação de eventos apoptóticos em células anucleadas não se restringiu aos modelos celulares experimentais. Já foi mostrado que as plaquetas, células naturalmente anucleadas, frente a diferentes estímulos *in vitro* ou *in vivo*, tais como TNF, anticorpos antiplaquetas e estradiol ou ainda no decurso da infecção malárica, deflagram processos celulares marcados pela perda do potencial mitocondrial, liberação de moléculas mitocondriais proapoptóticas, ativação de caspases, externalização de fosfatidilserina e redução do volume celular (Piquet et al., 2002; Leytin & Freedman, 2003).

Uma vez que os eritrócitos, além de anucleados, são desprovidos de outras organelas citoplasmáticas, como as mitocôndrias – organelas fortemente envolvidas com a indução da apoptose – não seria esperado que estas células fossem susceptíveis a apoptose. Entretanto, ao contrário do que se poderia supor, estas células parecem utilizar processos apoptóticos como mecanismo fisiológico de deleção celular (Bratosin et al., 2001; Lang et al., 2005).

Durante seu tempo de vida no organismo humano, em torno de 120 dias, os eritrócitos são submetidos a um constante estresse oxidativo gerado, em grande parte, pelos consecutivos ciclos de oxigenação-desoxigenação. Como os eritrócitos não são capazes de restaurar seus componentes celulares (enzimas inativadas ou proteínas do citoesqueleto e da membrana celular) devido à inabilidade da síntese de novas proteínas, estas células são equipadas com uma alta atividade de enzimas antioxidantes capazes de evitar, por um limitado período de tempo, o estresse oxidativo (Bratosin et al., 1998; Arese et al., 2005). Assim, com a diminuição e exaustão das atividades dessas enzimas, o efeito danoso do estresse oxidativo é acumulado, levando os eritrócitos ao envelhecimento e, subsequentemente, à eliminação por eritrofagocitose promovida por macrófagos. Segundo estimativas cerca de 360 bilhões de eritrócitos são fagocitados por dia, o que equivale a cinco milhões de eritrócitos por segundo (Bratosin et al., 1998). Portanto, através desse processo de fagocitose, é evitada a hemólise intravascular que liberaria componentes intracelulares (principalmente hemoglobina) capazes de levar à complicações renais ou induzir resposta inflamatória (Lang et al., 2005).

Interessantemente, nos eritrócitos senescentes eventos celulares típicos do processo apoptótico, como diminuição do volume com aumento da densidade celular, formação de vesículas de membrana e exposição da fosfatidilserina na superfície celular podem ser observados (Bratosin et al., 1998). Inclusive, a participação da fosfatidilserina na eritrofagocitose já foi relatada em estudos que mostraram uma maior susceptibilidade à fagocitose de eritrócitos envelhecidos, caracterizados pelo aumento da exteriorização desse fosfolípido, do que de eritrócitos jovens (Bratosin et al., 1998). Assim,

com base nessas mudanças celulares foi proposto que os eritrócitos são susceptíveis a apoptose e que o fenômeno de envelhecimento dessas células é decorrente da indução desse processo de morte celular (Bratosin et al., 2001).

A partir do conhecimento da susceptibilidade dos eritrócitos ao processo apoptótico – ou eriptose (*eryptosis*), tem sido mostrado que diferentes estímulos endógenos ou exógenos, incluindo anticorpos, estresse oxidativo, antígenos microbianos e fármacos, são capazes de induzir apoptose em eritrócitos jovens (Tabela 1.3) (Lang et al., 2008).

Tabela 1.3. Indutores da apoptose eritrocitária (eriptose).

Ácido retinóico	Ciglitazona	Metildopa
Alumínio	Cisplatina	Metilglioxal
Amantadina	Clorpromazina	Ouro
Amiodarona	Cobre	Paclitaxel
Anandamida	Cordicepina	Peptídeos amilóides
Anticorpos anti-A (IgG)	Curcumina	Peptidoglicanos
Arsênio	Depleção energética	Poluentes do ar
Azatioprina	Estanho	Prostaglandina E ₂
Cádmio	Estresse oxidativo	Selênio
CD95/FasL	Fator de ativação plaquetária	Trombospondina 1
Ceramida	Glicoforina C	Valinomicina
Choque osmótico	Hemolisina	Vanadato
Chumbo	Listeriolisina	Vanádio
Ciclosporina	Mercúrio	Zinco

Fonte: Lang et al., 2008.

Segundo vários trabalhos, esse efeito pró-apoptótico ocorre através de um aumento intracelular de cálcio devido à ativação de canais de cátions presentes na membrana celular dessas células, como já foi estabelecido para células nucleadas (Lang et al., 2004). Contudo, a similaridade com as vias

bioquímicas da apoptose de células nucleadas não parece estar relacionada apenas com o influxo de cálcio. A observação de uma atividade aumentada de caspases em eritrócitos apoptóticos tem implicado estas proteases com a deflagração da apoptose eritrocitária (Matarrese et al., 2005). Com efeito, tem sido demonstrado que a apoptose eritrocitária pode ser dependente da ativação de caspases, visto que o tratamento com inibidores de caspases inibe a deflagração de eventos apoptóticos neste tipo celular (Matarrese et al., 2005). Ademais, as calpaínas - outro grupo de proteases que participa das vias apoptóticas das células nucleadas (Storr et al., 2011) - também parecem exercer função central na apoptose dos eritrócitos (Bratosin et al., 2001).

Enquanto certos estímulos têm efeitos proapoptóticos, em contra partida, alguns outros como a eritropoetina e o óxido nítrico já foram identificados como sendo inibidores da apoptose eritrocitária (Lang et al., 2008). Apesar dessa constatação, as vias pelas quais a apoptose eritrocitária é inibida por estes estímulos ainda não estão estabelecidas, embora já tenha sido evidenciado que a eritropoetina e o óxido nítrico atuem, respectivamente, através da regulação da atividade dos canais de cálcio na membrana celular e da nitrosilação de proteínas, possivelmente, caspases e calpaínas (Myssina et al., 2003; Nicolay et al., 2008).

1.10. Apoptose eritrocitária: patogênese e proteção na malária

Em células nucleadas, tem sido claramente mostrado que a indução ou a supressão inapropriada da apoptose tem relevantes implicações na gênese de diferentes manifestações patológicas, tais como o câncer e doenças autoimunes, neurodegenerativas e imunodeficientes (Duke et al., 1996;

Dockrell, 2001). Realmente, trabalhos realizados por nosso grupo já demonstraram um aumento nos níveis de linfócitos T apoptóticos em indivíduos com infecção aguda por *P. falciparum* ou *P. vivax* que poderia contribuir para o estado de leucopenia e de imunossupressão documentados nestas infecções (Riccio et al., 2003).

Assim, em analogia aos nossos estudos prévios em linfócitos (Riccio et al., 2003) e aos realizados por Piquet e colaboradores (2002), no qual a apoptose plaquetária estava associada com a trombocitopenia, um aumento na indução da apoptose em eritrócitos poderia contribuir para o desenvolvimento de uma anemia.

Essa premissa tem sido suportada pela observação de um aumento nos níveis de eritrócitos apoptóticos em patologias de diversas etiologias que estão associadas com um quadro de anemia, como anemia falciforme, talassemia, sepse, insuficiência renal e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase ou ferro (Lang et al., 2008). Neste sentido, também já foi relatado que a indução *in vivo* de apoptose eritrocitária pode estar relacionada com a anemia em indivíduos contaminados por arsênio ou submetidos à terapia anticancerígena com a droga paclitaxel (Lang et al., 2006; Biswas et al., 2008).

Na malária, a apoptose eritrocitária tem sido descrita em eritrócitos parasitados *in vitro* por *P. falciparum* ou *in vivo* por *P. berghei*, sendo um fenômeno relacionado ao desenvolvimento intraeritrocítico do parasita (Maguire et al., 1991; Eda & Sherman, 2002; Alesutan et al., 2010; Bobbala et al., 2010). É fato que com o decorrer do processo esquizogônico, os plasmódios causam um estresse oxidativo no eritrócito hospedeiro que, conseqüentemente, ativa canais de cátions presentes na superfície dessas células. Uma vez ativados,

estes canais são responsáveis por um influxo de sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{++}) necessários ao desenvolvimento do parasita. Porém, ao mesmo tempo em que supre as necessidades metabólicas do plasmódio, o cálcio no meio intracelular induz a deflagração da apoptose no eritrócito que alberga o parasita (Lang et al., 2004; Föller et al., 2009).

Tendo em vista que as células apoptóticas são eliminadas por fagocitose, a apoptose dos eritrócitos parasitados poderia contribuir para o controle da parasitemia durante a infecção malárica (Lang et al., 2004; Föller et al., 2009). De fato, camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA e tratados com drogas que induzem apoptose nos eritrócitos parasitados mostram atenuação nos níveis de parasitemia e aumento na sobrevivência, quando comparados com aqueles não tratados (Koka et al., 2008; Bobbala et al., 2010; Alesutan et al., 2010). Similarmente, a aumentada susceptibilidade dos eritrócitos parasitados à apoptose em indivíduos com traço falcêmico também parece conferir certo grau de proteção a malária (Lang et al., 2009).

Por outro lado, a apoptose dos eritrócitos parasitados também tem sido implicada na patogênese da malária. Segundo estudos realizados por Eda & Sherman (2002), o sequestro das formas maduras do *P. falciparum* nos capilares sanguíneos – que é um evento associado à alta patogenicidade deste plasmódio – pode ser mediado pela interação da fosfatidilserina exteriorizada na superfície dos eritrócitos parasitados com os receptores CD36 e trombospondina expressos nas células endoteliais. Neste contexto, a apoptose eritrocitária não só evita a eliminação do parasita através da fagocitose esplênica, como também contribui para as manifestações graves da malária

que estão associadas ao fenômeno de citoaderência dos eritrócitos parasitados (Lang et al., 2004; Föllner et al., 2009).

No que diz respeito aos eritrócitos não parasitados já foi demonstrado que estas células são induzidas à apoptose frente ao crescimento *in vitro* do *P. falciparum* (Koka et al., 2007; 2008), sugerindo fortemente que antígenos e produtos metabólicos do parasita poderiam ser responsáveis pela indução desse processo. Porém, diferentemente dos eritrócitos parasitados, a eliminação dos eritrócitos apoptóticos não parasitados contribuiria para a anemia observada na infecção humana. Ademais, como observado em estudos com anemia falciforme e insuficiência renal (Bonomini et al., 2002; Setty et al., 2002), a apoptose dos eritrócitos não parasitados também poderia ser um dos fatores envolvidos nas complicações vasculares da malária. Contudo, a participação da apoptose dos eritrócitos não parasitados na patogênese da malária ainda necessita ser avaliada.

2. Racional e objetivos

É sabido que a anemia da malária é uma complicação multifatorial e que diferentes mecanismos celulares e imunológicos do hospedeiro estão implicados na gênese dessa manifestação clínica. Contudo, ainda não existe um consenso sobre a efetiva participação de cada um dos mecanismos envolvidos e, por conseguinte, outros processos fisiológicos ou fisiopatológicos poderiam participar em sinergismo aos já evidenciados. Assim, no sentido de elucidar tais mecanismos que participam no desenvolvimento da anemia na malária, em adição aos estudos na infecção humana, têm sido rotineiramente utilizado como modelo experimental a infecção de camundongos por plasmódios que infectam naturalmente roedores, tal como o *P. yoelii*.

Portanto, tendo em vista que a eliminação dos eritrócitos não parasitados pode ter significativa contribuição na patogênese da anemia da malária e com base no conhecimento da susceptibilidade dos eritrócitos à apoptose induzida por diferentes estímulos endógenos e exógenos, os objetivos principais do nosso trabalho se constituíram em:

- Verificar *in vitro* a capacidade de antimaláricos de induzir apoptose em eritrócitos sadios (artigo 1) e;
- Analisar os percentuais de eritrócito não parasitados em apoptose durante a infecção malárica experimental (*P. yoelii* 17XL) e humana (*P. vivax*) e sua relação com o grau de anemia, a carga parasitária e os níveis plasmáticos de óxido nítrico, anticorpos antieritrócitos e citocinas (artigo 2, artigo 3 e resultados complementares).

Considerando ainda que a apoptose além de ter propriedades patogênicas, também constitui um processo de proteção inata capaz de limitar a propagação de parasitas intracelulares, objetivamos também avaliar *in vitro* a capacidade do *P. falciparum* de infectar e se desenvolver em eritrócitos apoptóticos (artigo 4).

3. Resultados

3.1. Artigo 1: Pro-apoptotic effects of antimalarial drugs do not affect mature human erythrocytes.

Publicado na revista Acta Tropica 2009, volume 112: 236-238

No artigo a seguir descrevemos os resultados da avaliação *in vitro* do efeito proapoptótico dos antimaláricos cloroquina (difosfato de cloroquina), mefloquina (cloridrato de mefloquina), quinina (dicloridrato de quinina) e artemisinina em eritrócitos humanos obtidas de indivíduos saudáveis. A indução desse processo pelos antimaláricos poderia ajudar a elucidar os mecanismos envolvidos na eliminação dos eritrócitos não parasitados durante, ou mesmo após, o tratamento com estas drogas.



Short communication

Pro-apoptotic effects of antimalarial drugs do not affect mature human erythrocytes

Paulo Renato Rivas Totino, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro,
Maria de Fátima Ferreira-da-Cruz*

Laboratory of Malaria Research, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Mangunhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2009

Received in revised form 31 July 2009

Accepted 3 August 2009

Available online 8 August 2009

Keywords:

Antimalarial drug

Erythrocytes

Apoptosis

P. falciparum

ABSTRACT

Malaria is an important public health problem worldwide, representing also an obstacle for the development of the countries, mainly in the African continent. Since no effective vaccine has been developed yet, early diagnosis and prompt treatment are the main strategy to control malaria transmission. Many of the drugs used for malaria treatment have the ability to induce apoptosis in different cell types. In addition, apoptosis has also been identified in enucleated cells. The present work is aimed, therefore, to evaluate the pro-apoptotic aptness of chloroquine, quinine, artemisinin and mefloquine on mature erythrocytes by flow cytometry through the detection of cell shrinkage and phosphatidylserine exposure at the cell surface—hallmarks of apoptosis. Although we observed that known apoptosis inducer, such as ionomycin, had led to erythrocyte apoptosis, we were not able to detect any pro-apoptotic effect of the studied antimalarial drugs on these cells. We conclude that chloroquine, quinine, artemisinin and mefloquine may not be able to induce apoptosis in erythrocytes and, therefore, do not seem to contribute to malaria associated erythrocyte destruction and anemia.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Malaria remains the parasitologic disease of major prevalence in the world, representing a great problem of public health with approximately 250 million cases and 900 thousand deaths annually (WHO, 2008a). Since no effective vaccine has been reached (Carvalho et al., 2002; Genton, 2008), the main strategies to control malaria transmission are still based on the vector control and on the early diagnosis and prompt treatment (WHO, 2008b). Several drugs used for malaria treatment have the ability of provoking apoptosis *in vitro* and *in vivo* in different cell types (Meng et al., 1997; Wu et al., 2004; Zhou and Feng, 2005; Nilkaeo et al., 2006; Li et al., 2007; Zhao et al., 2007; Park et al., 2008).

Apoptosis is a physiological process of programmed cell death that represents an essential mechanism for multicellular development and survival through regulation of cell populations and elimination of damaged, infected and mutated cells (Kerr et al., 1972; Elmore, 2007). Initially, it was a scientific consensus that apoptosis could only occur in nucleated cells, but it has been shown that even enucleated cells are susceptible to apoptotic death (Leytin and Freedman, 2003; Föller et al., 2008a). In fact, cell shrinkage, phosphatidylserine (PS) exposure and activation of caspases – apoptosis hallmarks – were observed in erythrocytes under different treatments here including drug pressure (Föller et al., 2008a). It

was, therefore, suggested that cisplatin and amantadine drugs used, respectively, in cancer and Parkinson's disease therapies could contribute to anemia by inducing erythrocytes apoptosis (Mahmud et al., 2008; Föller et al., 2008b).

Considering that antimalarial drugs are able to induce apoptosis in different cell types together to the erythrocyte susceptibility to drug-induced apoptosis, this work aimed to evaluate if the most used antimalarial drugs are able to induce apoptosis in mature erythrocytes. This apoptotic event could contribute to anemia in malaria patients, since increased elimination of non-parasitized erythrocytes plays an important role in this malaria complication (Lamikanra et al., 2007).

For this purpose, we evaluated the capacity of chloroquine, quinine, artemisinin and mefloquine to induce apoptosis in normal mature erythrocytes. Venous blood was obtained from a clinical healthy individual in EDTA tube and erythrocytes were isolated by centrifugation at 350g for 10 min. Cells were washed twice in Ringer solution containing (in mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO₄, 32 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5 glucose, and 1 CaCl₂ (pH 7.4), resuspended in the same solution and, then, incubated in 0.5% hematocrit at 37 °C for 24 h in presence of the higher antimalarial drug concentrations used in our laboratory to evaluate *P. falciparum in vitro* drug resistance: 2400 ng/ml for chloroquine (Sigma) and quinine (Sigma) and 150 ng/ml for artemisinin (Sigma) and mefloquine (Sigma). In addition, we tested concentrations higher than those detected in

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 8135; fax: +55 21 3865 8145.
E-mail address: mffcruz@ioc.fiocruz.br (M.d.F. Ferreira-da-Cruz).

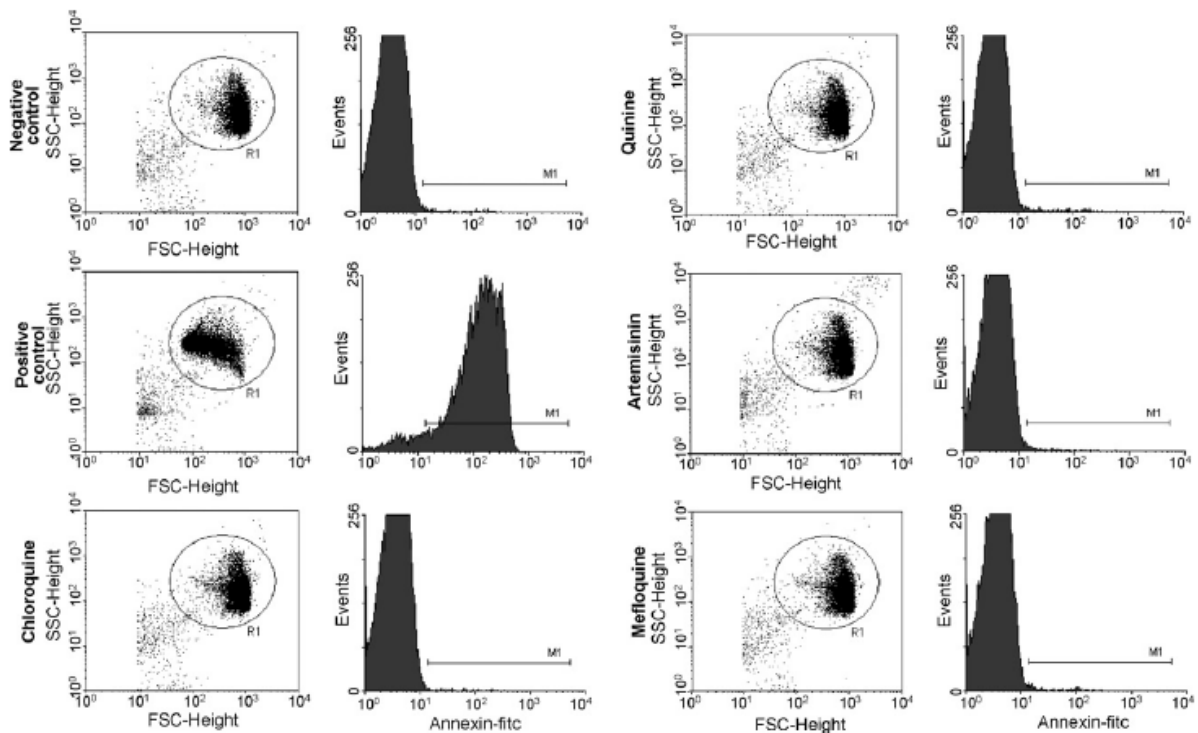


Fig. 1. Flow cytometry analysis of mature human erythrocytes treated with antimalarial drugs. Erythrocytes were cultured in presence of chloroquine, quinine, artemisinin or mefloquine by 24 h and, then, morphology (forward scatter vs. side scatter) and phosphatidylserine exposure (annexin V-FITC staining) were evaluated. Ionomycin-treated as well as non-treated erythrocytes were used as positive and negative apoptosis controls, respectively.

plasma from antimalarial drug-treated patients (Karbwan et al., 1987; Hassan Alin et al., 1996; Ashton et al., 1998; Dua et al., 2000; Bustos et al., 2002; Pukrittayakamee et al., 2003; Vieira et al., 2008; Gutman et al., 2009) such as 5000 ng/ml for chloroquine, mefloquine and artemisinin and 20,000 ng/ml for quinine. As positive apoptosis control, erythrocytes were incubated for 4 h with 1 μ M ionomycin (Sigma)—a known erythrocyte apoptosis inducer (Föller et al., 2008a).

After incubation, PS exposure on erythrocytes surface was detected using annexin V staining. Briefly, cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended at a density of 1×10^5 cells/100 μ l in annexin-binding buffer (BD Pharmingen), incubated with annexin V-FITC (5 μ l – BD Pharmingen) for 15 min at room temperature and five times diluted with annexin-binding buffer. Cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson) and forward scatter (FSC), sideward scatter (SSC) and annexin fluorescence were measured.

The results of flow cytometry presented in Fig. 1 demonstrate that, differently from ionomycin (positive control) that provoked PS exposure in up to 90% of erythrocytes, no antimalarial drug showed apoptotic effect on this cell type, independently of the concentration used in the experiments. The percentages of erythrocytes exposing PS in non-treated (negative control) and antimalarial-treated cultures were similar, presenting an average of $1.5 \pm 0.2\%$ apoptotic cells. Furthermore, cell shrinkage observed in ionomycin-treated erythrocytes was not observed when these cells were treated with chloroquine, quinine, artemisinin or mefloquine, supporting the lack of a pro-apoptotic effect of these antimalarial drugs on human erythrocytes.

Our finding apparently contrasts with previous investigations that have shown a pro-apoptotic effect of antimalarial drugs on different nucleated cell types (Meng et al., 1997; Wu et al., 2004; Zhou and Feng, 2005; Li et al., 2007; Zhao et al., 2007; Park et al.,

2008), including those that reinforced the risk of pro-apoptotic hazardous effects during malaria treatment with chloroquine, quinine, artemisinin or pyrimethamin (Nilkaeo et al., 2006). However, one should keep in mind that our experiments have been performed with red (enucleated) blood cells—a system different from the one studied so far.

The target and mechanisms of antimalarial drugs are not completely elucidated. It is known that the quinoline antimalarial drugs, such as chloroquine, quinine and mefloquine, are lysosomotropic agents acting on the endolysosomal system of the malaria parasite (Fitch, 2004) and are able to disturb endocytic pathway of both parasite and mammalian cells (Hoppe et al., 2004). It is, therefore, possible that non-parasitized erythrocytes, as cells lacking organelles, would not be targeted to quinolines and, consequently, would not be vulnerable to their pro-apoptotic effects. The same is probably true for artemisinin, whose mechanism of antiparasite and neurotoxic action is also related to intracellular organelles besides oxidative stress (Schmuck et al., 2002; Golenser et al., 2006).

In this light and also considering the susceptibility of mature erythrocytes to oxidative stress-induced apoptosis (Mandal et al., 2005; Föller et al., 2008a) but not to apoptosis induced by artemisinin, we can hypothesize that artemisinin would act more as an organelle specific drug than by directly inducing oxidative stress. In fact, the increased accumulation of artemisinin as well as chloroquine in parasitized erythrocytes, as compared to non-parasitized cells, has indeed been already reported (Fitch, 2004; Golenser et al., 2006).

Finally, we conclude that chloroquine, quinine, artemisinin and mefloquine may not be able to induce apoptosis in erythrocytes and, therefore, do not seem to be a relevant mediator of mature erythrocyte destruction, worsening the malaria associated anemia. On the other hand, it has been reported that apoptosis induced

in nucleated erythroid precursor cells could contribute to defective erythropoiesis and, then, to anemia pathogenesis (Chang & Stevenson, 2004). In this light, we could not exclude the participation of antimalarial drugs in malaria anemia since these drugs are able to induce apoptosis in nucleated cells. Further analysis of erythroid precursors susceptibility to antimalarial drug-induced apoptosis will help to clarify this point.

References

- Ashton, M., Say, D.N., Huong, N.V., Gordi, T., Hai, T.N., Huong, D.X., Niêu, N.T., Cong, L.D., 1998. Artemisinin kinetics and dynamics during oral and rectal treatment of uncomplicated malaria. *Clin. Pharmacol. Ther.* 63, 482–493.
- Bustos, D.G., Lazaro, J.E., Gay, F., Pottier, A., Laracas, C.J., Traore, B., Diqet, B., 2002. Pharmacokinetics of sequential and simultaneous treatment with the combination chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Philippines. *Trop. Med. Int. Health* 7, 584–591.
- Carvalho, L.J.M., Daniel-Ribeiro, C.T., Goto, H., 2002. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand. J. Immunol.* 56, 327–343.
- Chang, K.H., Stevenson, M.M., 2004. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int. J. Parasitol.* 34, 1501–1516.
- Dua, V.K., Gupta, N.C., Kar, P.K., Nand, J., Edwards, G., Sharma, V.P., Subbarao, S.K., 2000. Chloroquine and desethylchloroquine concentrations in blood cells and plasma from Indian patients infected with sensitive or resistant *Plasmodium falciparum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 565–570.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Fitch, C.D., 2004. Ferritin, phospholipids, and the antimalarial actions of the quinoline drugs. *Life Sci.* 74, 1957–1972.
- Föller, M., Huber, S.M., Lang, F., 2008a. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life* 60, 661–668.
- Föller, M., Geiger, C., Mahmud, H., Nicolay, J., Lang, F., 2008b. Stimulation of suicidal erythrocyte death by amantadine. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 13–18.
- Genton, B., 2008. Malaria vaccines: a toy for travelers or a tool for eradication? *Expert Rev. Vaccines* 7, 597–611.
- Golenser, J., Waknine, J.H., Krugliak, M., Hunt, N.H., Grau, G.E., 2006. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int. J. Parasitol.* 36, 1427–1441.
- Gutman, J., Green, M., Durand, S., Rojas, O.V., Ganguly, B., Quezada, W.M., Utz, G.C., Slutsker, L., Ruebush II, T.K., Bacon, D.J., 2009. Mefloquine pharmacokinetics and mefloquine-artesunate effectiveness in Peruvian patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria J.* 8, 58.
- Hassan Ali, M., Ashton, M., Kihamia, C.M., Mtey, G.J.B., Björkman, A., 1996. Multiple dose pharmacokinetics of oral artemisinin and comparison of its efficacy with that of oral artesunate in falciparum malaria patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 61–65.
- Hoppe, H.C., van Schalkwyk, D.A., Wiehart, U.I., Meredith, S.A., Egan, J., Weber, B.W., 2004. Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2370–2378.
- Karbwang, J., Looareesuwan, S., Phillips, R.E., Wattanagoon, Y., Molyneux, M.E., Nagachinta, B., Back, D.J., Warrell, D.A., 1987. Plasma and whole blood mefloquine concentrations during treatment of chloroquine-resistant falciparum malaria with the combination mefloquine-sulphadoxine-pyrimethamine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 23, 477–481.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Lamikanra, A.A., Brown, D., Potocnik, A., Casals-Pascual, C., Langhorne, J., Roberts, D.J., 2007. Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110, 18–28.
- Leytin, V., Freedman, J., 2003. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus. Apher. Sci.* 28, 285–295.
- Li, L.N., Zhang, H.D., Yuan, S.J., Tian, Z.Y., Wang, L., Sun, Z.X., 2007. Artesunate attenuates the growth of human colorectal carcinoma and inhibits hyperactive Wnt/beta-catenin pathway. *Int. J. Cancer* 121, 1360–1365.
- Mahmud, H., Föller, M., Lang, F., 2008. Suicidal erythrocyte death triggered by cisplatin. *Toxicology* 249, 40–44.
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M., Basu, J., 2005. Fas-caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 39460–39467.
- Meng, X.W., Feller, J.M., Ziegler, J.B., Pittman, S.M., Ireland, C.M., 1997. Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes following treatment in vitro with hydroxychloroquine. *Arthritis Rheum.* 40, 927–935.
- Nilkaeo, A., Bhuvanath, S., Praputbut, S., Wisessombat, S., 2006. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in JAR trophoblast by antimalarial drugs. *Biomed. Res.* 27, 131–137.
- Park, B.C., Park, S.H., Paek, S.H., Park, S.Y., Kwak, M.K., Choi, H.G., Yong, C.S., Yoo, B.K., Kim, J.A., 2008. Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. *Toxicol. Lett.* 178, 52–60.
- Pukrittayakamee, S., Wanwimolruk, S., Stepniewska, K., Jantra, A., Huyakorn, S., Looareesuwan, S., White, N.J., 2003. Quinine pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in uncomplicated falciparum malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3458–3463.
- Schmuck, G., Roehrdanz, E., Haynes, R.K., Kahl, R., 2002. Neurotoxic mode of action of artemisinin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 821–827.
- Vieira, J.L.F., Borges, L.M.G., Nascimento, M.T.S., Gomes, A.L.S., 2008. Quinine levels in patients with uncomplicated falciparum malaria in the Amazon region of Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 12, 353–354.
- World Health Organization, 2008a. World malaria report 2008. Document WHO/HTM/GMP/2008.1. WHO, Geneva.
- World Health Organization, 2008b. Global malaria control and elimination: report of a technical review. WHO, Geneva.
- Wu, G.D., Zhou, H.J., Wu, X.H., 2004. Apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by artesunate. *Vascul. Pharmacol.* 41, 205–212.
- Zhao, M., Xue, D.B., Zheng, B., Zhang, W.H., Pan, S.H., Sun, B., 2007. Induction of apoptosis by artemisinin relieving the severity of inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 13, 5612–5617.
- Zhou, Z., Feng, Y., 2005. Artesunate reduces proliferation, interferes DNA replication and cell cycle and enhances apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 25, 135–136.

Resultado 3.2. Artigo 2: Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia.

Publicado na revista Malaria Journal 2010, volume 9: 350

Como os ensaios *in vitro* não mostraram uma influência dos antimaláricos na anemia da malária através da indução de apoptose eritrocitária, seguimos o nosso estudo avaliando agora a ocorrência desse processo de morte celular durante a infecção experimental do *P. yoelii* 17XL em camundongos Balb/c, cujos resultados são apresentados no artigo a seguir.

RESEARCH

Open Access

Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia

Paulo RR Totino, Aline D Magalhães, Luciene A Silva, Dalma M Banic, Cláudio T Daniel-Ribeiro, Maria de Fátima Ferreira-da-Cruz*

Abstract

Background: Severe anaemia is a common complication of *Plasmodium falciparum* malaria in hyperendemic regions. Premature elimination of non-parasitized red blood cells (nRBC) has been considered as one mechanism involved in the genesis of severe malaria anaemia. It has been reported that apoptosis can occur in RBC and, consequently, this cell death process could contribute to anaemia. This study was performed to evaluate the susceptibility of nRBC to apoptosis in a malaria anaemia murine model.

Methods: Balb/c mice were intraperitoneally inoculated with 1×10^6 *P. yoelii* 17XL parasitized RBC (pRBC) and, then, parasitaemia and anaemia were monitored. Apoptosis in both pRBC and nRBC was assessed during early and late phases of infection by flow cytometry using Syto 16 and annexin V-PE double staining and forward scatter measurement.

Results: As expected, experimental infection of Balb/c mice with *Plasmodium yoelii* 17XL parasites was characterized by progressive increase of parasitaemia and acute anaemia, leading to death. Flow cytometry analysis showed that a number of pRBC was in the apoptotic process. It was noteworthy that the increase of nRBC apoptosis levels occurred in the late phase of infection, when anaemia degree was notably accentuated, while no significant alteration was observed in the early phase.

Conclusion: The increased levels of nRBC apoptosis herein firstly reported, in malaria infection could represent a putative mechanism worsening the severity of malarial anaemia.

Background

Malaria remains the tropical disease of major prevalence in the world, representing great problem of public health with approximately 250 million cases and 900 thousand deaths annually [1]. From all malaria human parasites, *Plasmodium falciparum* is the most prevalent and the most frequent parasite species responsible for the severe and lethal forms of the disease. Complications associated to *P. falciparum* infection include severe anaemia, which affects mainly children and pregnant women living in malaria hyperendemic regions [2,3].

The immunological processes involved in malaria anaemia cannot be implicated as the sole cause of

erythrophagocytosis during malaria [4]. It is well known that, together to mechanical rupture of parasitized red blood cells (pRBC) by the parasite and suppression of erythropoiesis, the premature phagocytosis of non-parasitized RBCs (nRBC) is also a mechanism implicated in the development of severe malaria anaemia [5,6].

Apoptosis - a physiological process of programmed cell death related to nucleated cells - can also occur in RBC as a result of intracellular influx of Ca^{2+} , which leads to cell shrinkage, membrane blebbing, phosphatidylserine exposure and protease activation [7]. Although apoptosis is an essential phenomenon for cell populations regulation it was also engaged in elimination of damaged, infected and mutated cells as well as in the genesis of many disorders [8,9]. Enhanced levels of RBC apoptosis have been observed in clinical disorders in

* Correspondence: mffcruz@loc.fiocruz.br
Laboratory of Malaria Research, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manginhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

which anaemia is a common feature, such as iron and G6PD deficiency, renal insufficiency, thalassaemia, sickle-cell disease and sepsis [7] and in malaria infection apoptosis has been associated to cerebral malaria, thrombocytopenia and lymphocytopenia [10-12]. The apoptosis of parasitized RBC does exist and it is also possible that the same phenomenon could concern normal RBC and RBC apoptosis could, therefore, contribute to the genesis of malaria anaemia. In this light, the present study was carried out to evaluate the susceptibility of nRBC to apoptosis in a murine model of malaria anaemia.

Methods

Experimental infection

The lethal experimental infection of Balb/c mice with *Plasmodium yoelii* 17XL parasites was used as a malaria anaemia model. Where indicated, non-infected, age-matched mice were used as control. All animal experimentation was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

For infection, female Balb/c mice aged 6-8 weeks, provided by the Centre for Laboratory Animals Breeding of the Fiocruz, were intraperitoneally inoculated with 1×10^6 *P. yoelii* 17XL-pRBC in 0.2 mL phosphate buffered saline (PBS). During infection, parasitaemia and anaemia degree were routinely monitored through mice tail blood samples. Parasitaemia was determined by counting the number of pRBC in a total count of 1000 RBC in thin blood smears stained by the Romanowski's method (Panótico Rápido, Laborclin*, Pinhais, PR, Brazil). Anaemia was evaluated by counting the number of RBC/mm³ of blood. Briefly, 2 µL of blood were suspended in 0.5 mL heparinized PBS, diluted 1:10 in the same buffer and, then, the number of RBC determined in a haemocytometer.

Apoptosis assay

Apoptosis was identified in the early (day 4) and late (days 6-7) phases of *P. yoelii* infection through the detection of phosphatidylserine exposure (PS) at the cell surface and cell shrinkage [7]. For this purpose, it was used Syto 16 and annexin V-PE double staining that identify pRBC and PS exposure, respectively. Briefly, RBC were isolated from mice tail heparinized blood by centrifugation at $350 \times g$ for 10 min at room temperature, washed twice with PBS and, then, incubated at 37°C for 40 min at a density of 1×10^5 cells/400 µL in PBS containing 100 nM Syto 16 (Invitrogen). After incubation, staining buffer was discarded and the RBC were stained with 5 µL annexin V (BD Pharmingen) for 15 min at room temperature in 100 µL annexin-binding buffer (BD Pharmingen) containing 100 nM Syto 16.

Finally, cells were five times diluted in annexin-binding buffer containing Syto 16 and both forward scatter and fluorescence emission were assessed using a flow cytometer (FACScalibur, Becton Dickinson)

In addition to *ex-vivo* analysis, apoptosis was also measured after incubation of RBC for 24 h at 37°C at a haematocrit of 0.5% in Ringer solution containing (in mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO₄, 32 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5 glucose, and 1 CaCl₂ (pH 7.4).

Statistical analysis

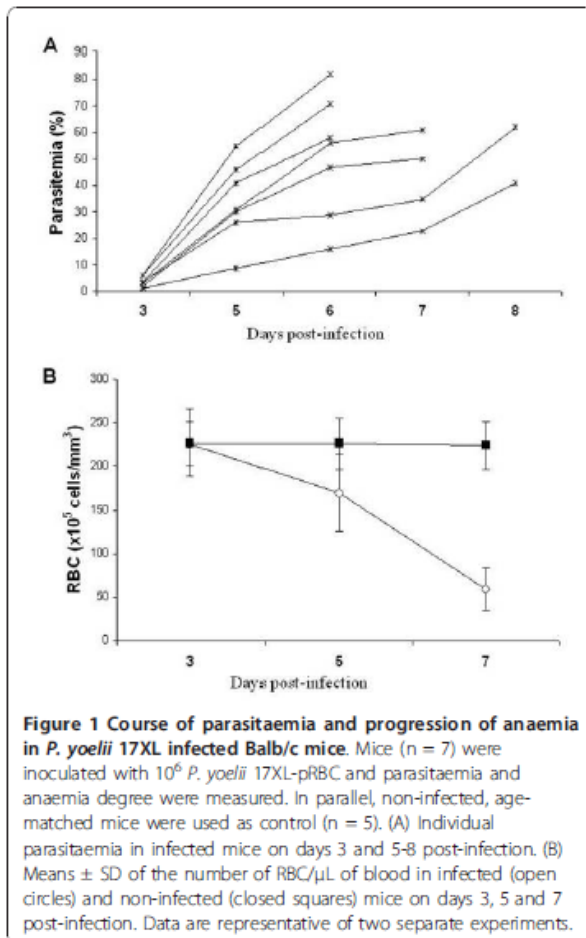
Statistical analyses were performed using t student test in GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA); a p-value < 0.05 was considered significant.

Results and discussion

Data from experimental rodent malaria infection, widely used as malaria models, have reinforced premature destruction of nRBC as a relevant process of malaria anaemia [13,14]. Thus, to investigate the involvement of nRBC apoptosis in malaria anaemia a *P. yoelii* 17XL malaria murine model was used in the present report.

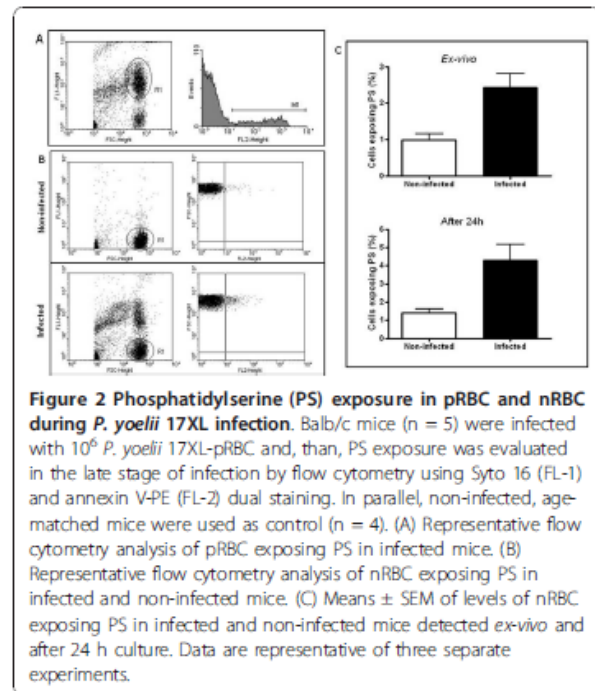
As expected, *P. yoelii* 17XL infection was marked by an accentuated anaemia degree and it was lethal to Balb/c mice [15,16]. Infected mice started to die on day 7 post-infection with parasitaemia rates of $60,7 \pm 13,3\%$ on the day preceding the death (Figure 1A). The progression of infection was accompanied by a decline in the number of peripheral RBC, leading to acute anaemia, characterized by a drop of around 73% in the number of RBC, when compared to non-infected control mice (Figure 1B).

Since pathogens have the capacity to induce apoptosis in both infected and non-infected host cells, influencing the pathogenesis of disease [8,17], it was firstly examined if the late phase of *P. yoelii* 17XL infection, when anaemia degree was accentuated, was marked by RBC apoptosis. As expected, a percentage of *P. yoelii*-pRBC exposing PS and, therefore, undergoing apoptosis (Figure 2A) was observed, as reported in *P. falciparum*- and *Plasmodium berghei*-pRBC [18,19]. However, it is noteworthy that malaria infection also significantly increased the levels of nRBC exposing PS both *ex-vivo* and after 24 h *in vitro* culture, when compared with non-infected control mice ($p < 0.05$) (Figures 2B and 2C). Pro-apoptotic potential of malaria was further reinforced by forward scatter analysis, which showed that *P. yoelii* 17XL also induced significant cell shrinkage of nRBC ($p < 0.05$) (Figure 3). Conversely, when both PS exposure and cell shrinkage were assessed during early phase of infection, it was not possible to identify significant alteration in the rates of apoptotic nRBC ($p > 0.05$) (Figure 4).



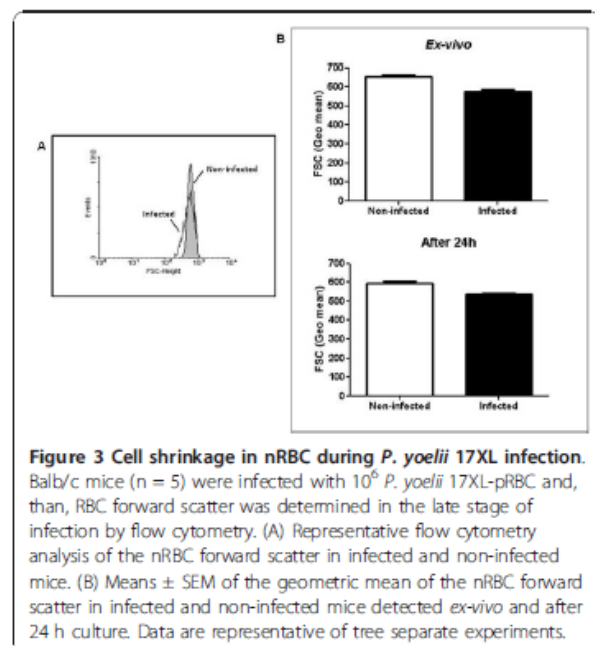
The apoptotic process in pRBC has been described as a result of intraerythrocytic plasmodia development. During schizogony, malaria parasites activate non-selective cation channel in host RBC membrane, allowing entry of Ca^{2+} and Na^+ necessary for its intracellular growth [20]. Sequentially, intracellular Ca^{2+} influx leads to activation of phospholipid scramblase and Ca^{2+} -sensitive K^+ channels responsible to PS exposure at outer membrane leaflet and cell shrinkage, respectively [21]. If one take in mind that apoptotic cells are quickly recognized and removed by phagocytes [22], apoptosis could act controlling parasite proliferation and even confer partial protection in sickle-cell trait carriers through accelerated clearance of ring-stage pRBC apoptosis [23].

However, if the augmented elimination of nRBC (for each pRBC, nine nRBC were removed) in both human and experimental malaria [13,24,25] could be due, at least in part, by erythrocytic apoptosis, PS exposure could also adversely promote elimination of nRBC, contributing also to malaria anaemia pathogenesis. This hypothesis could be supported by the report that



deficiency of PS receptor operating in phagocytosis (i.e., CD36) can confer protection against malaria anaemia in children infected with *P. falciparum* [26].

Since nRBC apoptosis was increased during only the late phase of malaria infection, one may wonder which factors could be implicated to its induction? Notably,



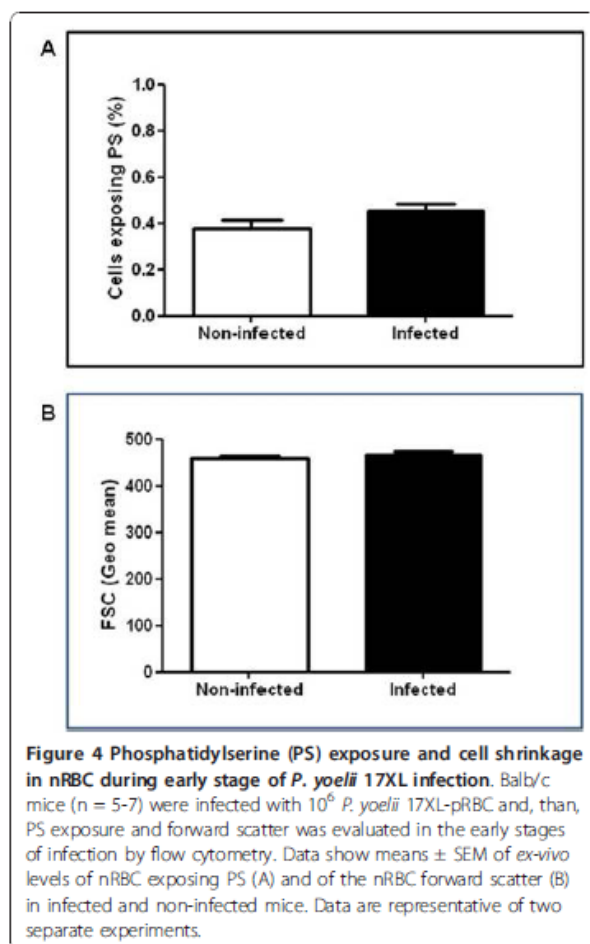


Figure 4 Phosphatidylserine (PS) exposure and cell shrinkage in nRBC during early stage of *P. yoelii* 17XL infection. Balb/c mice (n = 5-7) were infected with 10^6 *P. yoelii* 17XL-pRBC and, then, PS exposure and forward scatter was evaluated in the early stages of infection by flow cytometry. Data show means \pm SEM of *ex-vivo* levels of nRBC exposing PS (A) and of the nRBC forward scatter (B) in infected and non-infected mice. Data are representative of two separate experiments.

different types of RBC apoptosis-inducer, such as anti-RBC antibodies, oxidative stress and parasite antigens, are associated to malaria infection [7]. Indeed, anti-erythrocyte auto-antibodies and nitric oxide production are increased during plasmodia infection and they can be associated to anaemia severity [14,27,28]. Soluble factors from *P. falciparum*-pRBC are also capable of inducing apoptosis in endothelial and neuroglia cells [29] and bystander nRBC in *P. falciparum* *in vitro* culture undergo apoptotic process [30]. Moreover, defective production of erythropoietin - a RBC apoptosis inhibitor [31] - has been also associated with acute anaemia in malaria [32]. Thus, both host immune and parasite-derived factors, could be implicated to nRBC apoptosis during severe malaria anaemia state.

Finally, since *ex vivo* pRBC and nRBC are capable of exposing PS and these cells were not significantly sequestered at the present study, it is presumable that the simple presence of PS is not enough for *in vivo* endothelium adhesion, as previously suggested in *in vitro*-measured adhesiveness studies with both

pRBC and nRBC [18,33,34]. Further studies on *in vivo* adherence capacity of apoptotic RBC on endothelium are necessary to clarify the role of PS, besides *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), in cerebral and placental malaria pathogenesis. Intra-vital microscopy studies could help for clarifying these questions.

Conclusion

The present report showed for the first time that malaria infection increase the levels of nRBC apoptosis, a process that could represent a putative mechanism worsening the severity of malaria anaemia. Attempts to decipher immune and parasitic factors related to RBC apoptosis during the course of malaria infection are currently underway on rodent and human malaria.

Acknowledgements

This work was financially supported by Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj).

Authors' contributions

PRRT participated in the design of the study, carried out the animal experimentation, flow cytometry and data analysis and drafted the manuscript. ADM and LAS helped in animal experimentation and carried out parasitaemia and anaemia measurements. DMB provided characterized parasite strains and revised the manuscript. CTDR helped in the design of the study and revised the manuscript. MFFC conceived the study, coordinated its design, and finalized the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 30 July 2010 Accepted: 2 December 2010

Published: 2 December 2010

References

1. World Health Organization: *World Malaria Report*. Geneva: WHO; 2008.
2. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL: Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 2000, **16**:469-476.
3. Casals-Pascual C, Roberts DJ: Severe malarial anaemia. *Curr Mol Med* 2006, **6**:155-168.
4. Abdalla SH: Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. *Ann Trop Paediatr* 1988, **8**:250-258.
5. Chang KH, Stevenson MM: Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol* 2004, **34**:1501-1516.
6. Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ: Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 2007, **110**:18-28.
7. Föllmer M, Huber SM, Lang F: Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life* 2008, **60**:661-668.
8. Dockrell DH: Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious disease. *J Infect* 2001, **42**:227-234.
9. Fadael B, Orrenius S: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005, **258**:479-517.
10. Piquet PF, Kan CD, Vesin C: Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis* 2002, **7**:91-98.
11. Riccio EKP, Júnior IN, Riccio LRP, Alecrim MG, Corte-Real S, Morgado M, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF: Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitol Res* 2003, **90**:9-18.

12. Touré FS, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O, Bisvigou U, Moussa O, Rogier C, Pino P, Mazier D, Bissler S: Apoptosis: a potential triggering mechanism of neurological manifestation in *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunol* 2008, **30**:47-51.
13. Salmon MG, Souza JB, Butcher GA, Playfair JHL: Premature removal of uninfected erythrocytes during malarial infection of normal and immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol* 1997, **108**:471-476.
14. Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, Yasunami M, Hirayama K: Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. *Malar J* 2009, **8**:91.
15. Weiss L: Mechanisms of splenic control of murine malaria: cellular reactions of the spleen in lethal (strain 17XL) *Plasmodium yoelii* malaria in BALB/c mice, and the consequences of pre-infective splenectomy. *Am J Trop Med Hyg* 1989, **41**:144-160.
16. Wang QW, Liu Y, Liu J, Chen G, Zheng W, Wang J, Cao Y: *Plasmodium yoelii*: assessment of production and role of nitric oxide during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Exp Parasitol* 2009, **121**:268-273.
17. Labbé K, Saleh M: Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ* 2008, **15**:1339-1349.
18. Eda S, Sherman IW: Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem* 2002, **12**:373-384.
19. Koka S, Lang C, Boini KM, Bobbala D, Huber SM, Lang F: Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice. *Cell Physiol Biochem* 2008, **22**:261-268.
20. Lang F, Lang PA, Lang KS, Brand V, Tanneur V, Duranton C, Wiedler T, Huber SM: Channel-induced apoptosis of infected host cells-the case of malaria. *Pflügers Arch* 2004, **448**:319-324.
21. Bevers EM, Williamson PL: Phospholipid scramblase: An update. *FEBS Lett* 2010, **584**:2724-2730.
22. Fadok VA: Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 2001, **108**:957-962.
23. Lang PA, Kasinathan RS, Brand VB, Duranton C, Lang C, Koka S, Shumilina E, Kempe DS, Tanneur V, Akl A, Lang KS, Faller M, Kun JF, Krensmeyer PG, Wesselborg S, Laufer S, Clemens CS, Herr C, Noegel AA, Wiedler T, Gulbins E, Lang F, Huber SM: Accelerated clearance of *Plasmodium*-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2009, **24**:415-428.
24. Looareesuwan S, Davis TME, Pukrittayakamee S, Supanaranond W, Desakorn V, Silamut K, Krishna S, Boonamrung S, White NJ: Erythrocyte survival in severe *falciparum* malaria. *Acta Trop* 1991, **48**:263-270.
25. Jakeman GN, Saul A, Hogarth WL, Collins WE: Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology* 1999, **119**:127-133.
26. Chillonola J, Balthazary S, Mpina M, Mhando M, Mbugi E: CD36 deficiency protects against malarial anaemia in children by reducing *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell adherence to vascular endothelium. *Trop Med Int Health* 2009, **14**:810-816.
27. Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA: Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood* 2000, **95**:1481-1486.
28. Keller CC, Krensmeyer PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Perkins DJ: Elevated nitric oxide production in children with malaria anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcription and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infect Immun* 2004, **72**:4868-4873.
29. Wilson NO, Huang MB, Anderson W, Bond V, Powell M, Thompson WE, Armah HB, Adjei AA, Gyasi R, Tettey Y, Stiles JK: Soluble factors from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. *Mol Biochem Parasitol* 2008, **162**:172-176.
30. Pattanapanyasat K, Sratongno P, Chamma P, Chitjamnongchai S, Polsrila K, Chotivanich K: Febrile temperature but not proinflammatory cytokines promotes phosphatidylserine expression on *Plasmodium falciparum* malaria-infected red blood cells during parasite maturation. *Cytometry A* 2010, **77**:515-523.
31. Myssina S, Huber SM, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, Risler T, Wiedler T, Lang F: Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 2003, **14**:2750-2757.
32. Vedovato M, De Paoli Vitali E, Dapporto M, Salvatorelli G: Defective erythropoietin production in the anaemia of malaria. *Nephrol Dial Transplant* 1999, **14**:1043-1044.
33. Butthep P, Wanram S, Pattanapanyasat K, Vattanaviboon P, Fucharoen S, Wilairat P: Cytoadherence between endothelial cells and *P. falciparum* infected and noninfected normal and thalassemic red blood cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2006, **70**:432-442.
34. Setty BNY, Betal SG: Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. *Blood* 2008, **111**:905-914.

doi:10.1186/1475-2875-9-350

Cite this article as: Totino et al: Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. *Malaria Journal* 2010 **9**:350.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3.3. Artigo 3: Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: relationship with anaemia, parasitaemia and immune response.

Considerando o aumento nos níveis de eritrócitos não parasitados em processo de apoptose durante a infecção experimental, realizamos ensaios adicionais para avaliar se a apoptose dessas células poderia estar relacionada com a anemia observada no modelo estudado e se componentes endógenos do hospedeiro (óxido nítrico, anticorpos antieritrócitos e citocinas) ou a carga parasitária poderiam estar envolvidos na indução desse processo celular.

Como apresentado a seguir, os resultados obtidos foram utilizados para produção de um manuscrito que será submetido para publicação à revista *Parasite Immunology*.

Title: Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: relationship with anaemia, parasitaemia and immune response.

Paulo Renato Rivas Totino¹, Dalma Maria Banic², Raquel Alves Pinna², Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira³, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro¹, Maria de Fátima Ferreira-da-Cruz^{1*}

¹Laboratory of Malaria Research and , Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, Brasil.

²Laboratory of Black Flies and Oncocercosis, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, Brasil.

³Laboratory of Environmental Toxicology, Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Avenida Brasil, 4036, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, Brasil.

*Corresponding author: mffcruz@ioc.fiocruz.br

Abstract

Recently, through the study of erythrocytic apoptosis during *P. yoelii* 17XL infection, we observed a rise in the levels of parasitized red blood cells (nRBC) apoptosis that could be associated with the development of severe malaria anaemia, as premature elimination of nRBC is a relevant mechanism leading to this malaria complication. Thus, in the present study, we attempt to investigate the participation of nRBC apoptosis in malaria anaemia as well as the influence of parasite load, cytokines, nitric oxide and anti-RBC antibodies on this erythrocytic process. Apoptosis of nRBC in Balb/c mice was increased only at the late stage of *P. yoelii* 17XL infection and it was related to parasite load, but not with immune response. In spite of increased percents of nRBC apoptosis occurred when anaemia degree was accentuated, it was not associated to the reduction of peripheral RBC counts. We suggested that nRBC apoptosis in malaria can be induced in response to high parasite load and that this apoptotic process does not significantly contribute to acute anaemia observed in the malaria model studied herein. Further studies on malaria models in which acute anaemia develop under low parasite burden could help to better define the pathogenic role of nRBC apoptosis.

Introduction

Severe anaemia is a common complication associated to *Plasmodium falciparum* infection and represents an important contributor to malaria mortality, particularly of children and pregnant woman living in malaria hyperendemic regions of sub-Saharan Africa (Schantz-Dunn and Nour, 2009; Muoneke et al., 2011). The pathophysiology of severe anaemia in malaria is not yet completely understood, but it is known that, together to decreased production of red blood cells (RBC) and mechanical destruction of parasitized RBC (pRBC), premature elimination of non-parasitized RBC (nRBC) plays a central role in the genesis of this malarial complication (Chang & Stevenson, 2004; Lamikanra et al., 2007).

Recently, studying the susceptibility of RBC to apoptosis in *P. yoelii* 17XL infection, we reported increased levels of nRBC apoptosis that could be associated with anaemia development (Totino et al., 2010), since cells undergoing apoptosis are driven to degradation by phagocytosis (Fadok and Henson, 2003). Erythrophagocytosis is indeed considered a relevant process in malaria anaemia and nRBC have been identified as target of phagocytic cells in both human and experimental mice infections (Clark and Chaudhri, 1988; Abdalla, 1988). Moreover, enhanced RBC apoptosis is not an exclusive phenomenon of RBC genetic disorders (Lang et al., 2008), occurring also in anaemia-associated infections as sepsis and visceral leishmaniasis, that similarly to malaria, microbial factors and host immune response are closely linked to the pathogenesis of diseases (Kempe et al., 2007; Chowdhury et al., 2010).

A variety of inducers and inhibitors of erythrocytic apoptosis has been identified in *in vitro* studies (Lang et al., 2008). Some of those include

endogenous stimuli present in parasite infections, such as anti-RBC antibodies, oxidative stress, nitric oxide and microbial antigens, which could contribute to anaemia by modulating RBC apoptosis (Mandal et al., 2005; Attanasio et al., 2007; Nicolay et al., 2008; Kasinathan and Greenberg, 2010). Thus, to evaluate the participation of nRBC apoptosis in malaria anaemia as well as the influence of parasite load, cytokines, nitric oxide and anti-RBC antibodies in nRBC apoptosis, we studied the experimental infection of *P. yoelii* 17XL in Balb/c mice - a murine model of malaria anaemia.

Materials and methods

Experimental infection

For infection, female Balb/c mice aged 6-8 weeks, provided by the Centre for Laboratory Animals Breeding of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz - Rio de Janeiro, RJ, Brazil), were intraperitoneally inoculated with 1×10^6 *P. yoelii* 17XL-pRBC in 0.2 mL phosphate buffered saline (PBS). At days four (early stage) and seven (late stage) post infection (p.i.), blood from each animal was collected in heparinized tubes and, then, RBC and plasma were separated by centrifugation ($350 \times g$, 10 min) for evaluation of apoptosis and plasmatic levels of cytokines, nitric oxide and anti-RBC antibodies. Parasitaemia and anaemia were determined using non-heparinized whole blood samples. Blood from non-infected, age-matched mice were parallelly obtained and used as control.

All animal experimentation was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Fiocruz.

Determination of Parasitaemia

Parasitaemia was determined by counting the number of pRBC in a total count of 1000 RBC in thin blood smears stained by the Romanowski's method (Panótico Rápido, Laborclin®, Pinhais, PR, Brazil).

Determination of anaemia degree

Anaemia was evaluated by counting the number of RBC/ μL of blood. Two microliters of whole blood were suspended in 0.5 mL heparinized PBS, diluted 1:10 in the same buffer and, then, the number of RBC estimated in a haemocytometer.

Apoptosis assay

Apoptotic nRBC were identified *ex-vivo* through the detection of phosphatidylserine exposure (PS) at the cell surface by using Syto 16 and annexin V-PE double staining, as previously described (Totino et al., 2010). Briefly, RBC isolated from heparinized blood were washed twice with PBS and, then, incubated at 37°C for 40 min at a density of 1×10^5 cells/400 μL in PBS containing 100 nM Syto 16 (Invitrogen). After incubation, staining buffer was discarded and the RBC were stained with 5 μL annexin V (BD Pharmingen) for 15 min at room temperature in 100 μL annexin-binding buffer (BD Pharmingen) containing 100 nM Syto 16. Finally, cells were five times diluted in annexin-binding buffer containing Syto 16 and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson).

Measurement of nitric oxide

Nitric oxide production was evaluated by measuring total nitrite in plasma using the Griess method. Briefly, 40 μL of plasma samples were incubated overnight at 37° C in a 96-well plate with equal volumes of a cocktail containing 500 μL of NADPH (Sigma, 5mg/mL), 1000 μL of potassium phosphate buffer (0.5 M KH_2PO_4 , pH 7.5), 50 μL of nitrate reductase (Sigma, 20U/mL in potassium phosphate buffer) and 950 μL of deionized Milli-Q water. After incubation, samples were spun down for 5 min and transferred to a new plate and, then, 80 μL of Griess reagent (1:1 mixture of 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine in deionized water and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) were added. Absorbance was measured using a spectrophotometer (Spectra Max, Molecular Devices) at 540 nm and the results were expressed as μM concentration of sodium nitrate.

Measurement of cytokines

The plasmatic levels of TNF, IFN- γ , IL-5, IL-4 and IL-2 were determined by the BD Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Bioscience), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 25 μL of plasma sample were incubated for 2 h at room temperature with 25 μL of cytokine capture beads and 25 μL of PE detection reagent. After incubation, samples were washed once by centrifugation (200 x *g*, 5 min) with washer buffer, the supernatants were discarded and, then, the pelleted beads were resuspended in 300 μL of wash buffer for analysis on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). The plasmatic concentration in pg/mL of each cytokine was

determined based on a standard curve of recombinant cytokines provided in the kit.

Detection of anti-RBC antibodies

The presence of anti-RBC antibodies in the plasma was detected by flow cytometry using normal RBC obtained from a non-infected control mouse. Briefly, plasma samples were diluted five times in PBS containing 1% BSA and 0.125% RBC and incubated for 1 h at room temperature. After washing thrice with PBS-1% BSA, RBC were incubated for 1 hour at room temperature with anti-mouse polyvalent immunoglobulins (G, A, M) conjugated to FITC (Sigma) diluted 1:100 in PBS-1% BSA. Finally, RBC were washed thrice with PBS and resuspended in the same buffer and, then, bound antibodies were detected on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) of RBC.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA). Variables were checked for normal distribution by Kolmogorov-Smirnov test and, then, analyses were performed by parametric or non-parametric tests. Differences between groups were determined by parametric Student's t test or one-way analysis of variance with Tukey's post test or by non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn's post test. For correlation between apoptosis and the others variables, either parametric Pearson correlation test or non-parametric Spearman's rank correlation test were applied. Statistical tests were considered significant at p-value < 0.05.

Results

To study the involvement of RBC apoptosis in malaria anaemia, we experimentally infected Balb/c mice with a lethal strain of rodent malaria parasites (*P. yoelii* 17XL) and, then, the levels of apoptotic nRBC and anaemia degree were parallelly evaluated during the early (4 days p.i.) and late (7 days p.i.) stages of infection; using non-infected mice as control. As previously reported by our group (Totino et al., 2010), *P. yoelii* 17XL infection led to a significant increase in the levels of nRBC apoptosis that was restricted to late stage, as in the early stage no increased levels were observed when compared to control mice (Figure 1A). Accomplishing the increase of apoptosis, there was a significant decline in the number of peripheral RBC (Figure 1B). However, it was not possible to observe a significant correlation between apoptosis and anaemia degree during the late stage of infection (Figure 2).

To get some insight into the participation of parasite and immune response in nRBC apoptosis, we also evaluated, parallelly to apoptosis assay, parasitaemia and plasmatic levels of cytokines (TNF, IFN- γ , IL-5, IL-4 and IL-2), nitric oxide and anti-RBC antibodies during early and late stages of infection. As expected, parasitaemia was significantly increased at late stage when compared with early stage (Figure 1C), confirming the typical progressive replication of *P. yoelii* 17XL parasites. The proinflammatory cytokines IFN- γ and TNF were also raised during infection (Figure 1D and E), while IL-5, IL-4 and IL-2 were not significantly detected in plasma of both control and infected mice (data not shown). IFN- γ was raised in both early and late stages, showing no statistical difference between these two phases of infection (Figure 1D). Inversely, TNF concentrations, as well as the levels of anti-RBC antibodies,

were significantly increased only during the late stage (Figure 1E and F). Contrasting with the rise in the levels of parasitaemia, proinflammatory cytokines and anti-RBC antibodies, no significant statistical change was observed in concentrations of nitric oxide during infection (Figure 1G).

Considering that parasitaemia, TNF and anti-RBC antibodies were increased during the late stage of infection, we attempt to correlate these factors with nRBC apoptosis (Figure 3). While antibodies were not correlated with apoptosis (Figure 3A), parasitaemia were positively correlated (Figure 3B), suggesting a direct participation of parasite in apoptosis induction. Interesting, it was also possible to observe that the levels of TNF had a trend for a negative correlation with apoptosis (Figure 3C), contrasting with the claimed pathogenic proprieties of this cytokine in malaria.

Discussion

Augmented levels of erythrocytic apoptosis have been reported in different clinical disorders which anaemia is a common syndrome, suggesting a participation of this phenomenon in the pathogenesis of anaemia (Lang et al., 2008). Nevertheless, the contribution of this process to anaemia development has not been archived. Herein, we extended our previous studies (Totino et al., 2010) to investigate the involvement of nRBC apoptosis in malaria anaemia as well as the influence of parasitaemia, nitric oxide, cytokines and anti-RBC antibodies in the apoptotic levels. Our data confirm our previous results concerning increase in the levels of apoptotic nRBC during the late stage of *P. yoelii* 17XL infection in Balb/c mice and show that anaemia degree was not linked to the extension of apoptosis. It was also observed that nRBC apoptosis

was associated to parasite load, but did not to immune response compounds studies here.

It is known that parasite-derived factors participate in the physiopathology of many parasite infections, in part, by inducing host cell apoptosis (Bienvenu et al., 2010). In malaria, some studies have demonstrated that parasite antigens can directly stimulate apoptosis *in vitro* in brain endothelial and neuroglia cells, cardiomyocytes and erythroblast (Wennicke et al., 2008; Wilson et al., 2008; Lamikanra et al., 2009). In this sense, our results showing increased levels of nRBC apoptosis associated with high parasite loads, but not with immune response, suggest that malaria parasite antigens could also have direct apoptogenic effects on nRBC. In fact, nRBC in *P. falciparum* *in vitro* culture undergo erythrocytic apoptosis that, similarly, can be induced by *in vitro* treatment of RBC with bacterial toxins and *Schistosoma mansoni* antigens (Lang et al., 2004; Föller et al., 2007; Kasinathan and Greenberg, 2010). The already described identification of nRBC as target cells to incorporation of plasmodial molecules reinforce the role of parasite antigens in induction of erythrocytic apoptosis in malaria (Omodeo-Sale et al., 2005; Layez et al., 2005; Bratting et al., 2008).

Interestingly, the pro-apoptotic effect of malaria parasite observed at late stage of infection was not detected at the early stage, which showed low to moderate parasite load, indicating that a major impact of parasite in the induction of nRBC apoptosis occurs during hyperparasitaemia. In general, malaria infection in mice lead to high parasitaemia that, besides yours own pathogenic effect through lysis and cytoadherence of pRBC (Lamikanra et al., 2007), could contribute to malaria pathology inducing apoptosis in nRBC. In

human malaria, therefore, parasitaemia is usually lower than in mice (Garcia, 2010) and the induction of nRBC apoptosis by parasite itself possibly do not reach significant magnitude. Our preliminary studies with *P. vivax* infected patients agree with this possibility, since no alteration in the normal levels of apoptotic nRBC was identified (unpublished data).

The low levels of nitric oxide observed herein in plasma of *P. yoelii* 17XL-infected mice can additionally contribute to parasite-induced apoptosis. Nitric oxide is a biological mediator endowed with several roles and its reduced bioavailability in malaria has been associated to disease severity (Sobolewski et al., 2005; Zanini et al., 2011). Study on visceral leishmaniasis has also evidenced that depletion of nitric oxide is an important factor promoting RBC apoptosis and that administration of nitric oxide donor in infected animals prevents this erythrocytic event (Chowdhury et al., 2010). In the same way, it was already demonstrated *in vitro* that nitric oxide is a potent regulator of RBC survival and inhibitor of erythrocytic apoptosis (Nicolay et al., 2008). Thus, it is possible that besides its pro-apoptotic aptness, malaria parasites could potentiate the susceptibility of nRBC to apoptosis by limiting the availability of nitric oxide during infection.

While parasites and nitric oxide can influence RBC apoptotic process, the same seems not be true for cytokines. Proinflammatory cytokines have indeed been implicated in apoptosis of nucleated cells (Roeske-Nielsen et al., 2010), but their pro-apoptotic effects were not found when fresh or parasitized RBC were maintained in presence of TNF and/or IL-1 (Pattanapanyasat et al., 2010). Our results are also in accordance with the possible refractoriness of RBC to cytokine-induced apoptosis (Neote et al., 1994; Daniels, 2007), since IFN- γ was

raised both at stage of infection related (late stage) and non-related (early stage) to nRBC apoptosis and that the augmented levels of TNF at late stage had a trend for a negative correlation with the percentage of apoptotic RBC.

Our results also seem to indicate that anti-RBC antibodies, whose levels were increased at late stage of infection, do not participate in nRBC apoptosis induced by *P. yoelii* 17XL parasites. The ability of antibodies to stimulate erythrocytic apoptosis has been demonstrated by using antibodies against some antigens expressed on RBC surface, probably by mimicking the receptor-ligand interaction of apoptotic induction (Head et al., 2005a and 2005b; Attanasio et al., 2007). Indeed, platelet-activating factor and thrombospondin-1 can induce RBC apoptosis through receptor pathway (Head et al., 2005b, Lang et al., 2005). In this light, it is possible that the lack of association between anti-RBC antibodies and apoptosis is due to the fact that these antibodies recognize RBC surface antigens non-related to apoptosis.

Regarding the putative role of erythrocytic apoptosis in anaemia of different clinical disorders, we already hypothesized that apoptosis of nRBC could be involved in the pathogenesis of anaemia observed at the late stage of *P. yoelii* 17XL infection (Totino et al., 2010). However, in the present study the increased levels of apoptotic nRBC at this stage were not related to extension of anaemia, suggesting that nRBC apoptosis could not be significantly implicated in the anaemia of this malaria experimental model. In spite of this fact, we cannot exclude a possible pathogenic effect of nRBC apoptosis in malaria. Firstly, because erythrocytic apoptosis has been observed in pathologies not related to erythrocyte infection as well as malarial anaemia related to elimination of nRBC can occur at low parasite density (Evans et al.,

2006; Helegbe et al., 2009). Secondly, because it was already demonstrated that PS-exposing RBC have the capacity to adhere on endothelium and, consequently, could lead to vascular injury associated to RBC sequester (Bonomini et al., 2002; Setty et al., 2002; Wautier et al., 2011). Therefore, further studies on this issue will help to better define the relevance of nRBC apoptosis in malaria pathogenesis.

References

- Abdalla SH 1988. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. *Ann Trop Paediatr* 8: 250-258.
- Attanasio P, Shumilina E, Hermle T, Kiedaisch V, Lang PA, Huber SM, Wieder T, Lang F 2007. Stimulation of eryptosis by anti-A IgG antibodies. *Cell Physiol Biochem* 20: 591-600.
- Bienvendu AL, Gonzalez-Rey E, Picot S 2010. Apoptosis induced by parasitic disease. *Parasit Vectors* 3:106.
- Bonomini M, Sirolli V, Gizzi F, Di Stante S, Grilli A, Felaco M 2002. Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure. *Kidney Int* 62: 1358-1363.
- Bratting NW, Kowalsky K, Liu X, Burchard GD, Kamena F, Seeberger PH 2008. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol toxin interacts with the membrane of non-parasitized red blood cells: a putative mechanism contributing to malaria anemia. *Microbes Infect* 10: 885-891.

- Chang KH, Stevenson MM 2004. Malarial anaemia: mechanism and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Intern. J Parasitol* 34: 1501-1516.
- Chowdhury KD, Sen G, Biswas T 2010. Regulatory role of nitric oxide in the reduced survival of erythrocytes in visceral leishmaniasis. *Biochim Biophys Acta* 1800: 964-976.
- Clark IA, Chaudhri G 1988. Tumor necrosis factor may contribute to the anemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 70: 99-103.
- Daniels G 2007. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang* 93:331-340.
- Evans KJ, Hansen DS, van Rooijen N, Buckingham LA, Schofield L 2006. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* 107: 1192-1199.
- Fadok VA, Henson PM 2003. Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist – with a twist. *Curr Biol* 13: R655-R657.
- Ferreira MU, Silva-Nunes M 2010. Evidence-based public health and prospects for malaria control in Brazil. *J Infect Dev Ctries* 4: 533-545.
- Föller M, Shumilina E, Lam R, Mohamed W, Kasinathan R, Huber S, Chakraborty T, Lang F 2007. Induction of suicidal erythrocyte death by listeriolysin from *Listeria monocytogenes*. *Cell Physiol Biochem* 20:1051-1060.
- Garcia LS 2010. Malaria. *Clin Lab Med* 30: 93–129.

- Head DJ, Lee ZE, Poole P, Avent ND 2005a. Expression of phosphatidylserine (PS) on wild-type and Gerbich variant erythrocytes following glycophorin-C (GPC) ligation. *Br J Haematol* 129: 130-137.
- Head DJ, Lee ZE, Swallah MM, Avent NL 2005b. Ligation of CD47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a concomitant loss of viability *in vitro*. *Br J Haematol* 130: 788-790.
- Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, Yasunami M, Hirayama K 2009. Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. *Malar J* 8: 91.
- Kasinathan RS, Greenberg RM 2010. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens trigger erythrocyte cell death. *Cell Physiol Biochem* 26: 767-774.
- Kempe DS, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, Muresanu J, Friedrich B, Dreischer P, Wolz C, Schumacher U, Peschel A, Götz F, Döring G, Wieder T, Gulbins E, Lang F 2007. Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med* 85: 273-281.
- Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ 2007. Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110:18-28.
- Lamikanra AA, Theron M, Kooij TWA, Roberts DJ 2009. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One* 4: e8446.
- Lang et al., 2005 Lang PA, Kempe DS, Tanneur V, Eisele K, Klarl BA, Myssina S, Jendrossek V, Ishii S, Shimizu T, Waidmann M, Hessler G, Huber SM, Lang F, Wieder T. Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 118: 1233-1243.

- Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Föller M 2008. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 22:373-380.
- Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Birka C, Weinstock C, Northoff H, Wieder T, Lang F, Huber SM 2004. Effect of *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin on human erythrocytes. *Cell Microbiol* 6: 391-400.
- Layez C, Nogueira P, Combes V, Costa FT, Juhan-Vague I, da Silva LH, Gysin J 2005. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* 106: 3632-3638.
- Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J 2005. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 280: 39460-39467.
- Muoneke VU, Ibekwe RC, Nebe-Agumadu HU, Ibe BC 2011. Factors associated with mortality in under-five children with severe anemia in Ebonyi, Nigeria. *Indian Pediatr e-pub*: pii: S09747559INPE1000039.
- Neote K, Mak JY, Kolakowski LF, Schall TJ 1994. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 84: 44-52.
- Nicolay JP, Liebig G, Niemoeller OM, Koka S, Ghashghaeinia M, Wieder T, Haendeler J, Busse R, Lang F 2008. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflugers Arch* 456: 293-305.
- Omodeo-Sale F, Motti A, Dondorp A, White NJ, Taramelli D 2005. Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by *Plasmodium falciparum* haem products. *Eur J Haematol* 74: 324-332.

- Pattanapanyasat K, Sratongno P, Chikka P, Chitjamnongchai S, Polsrila K, Chotivanich K 2010. Febrile temperature but not proinflammatory cytokines promotes phosphatidylserine expression on *Plasmodium falciparum* malaria-infected red blood cells during parasite maturation. *Cytometry A* 77: 515-523.
- Roeske-Nielsen A, Dalgaard LT, Mansson JE, Buschard K 2010. The glycolipid sulfatide protects insulin-producing cells against cytokine-induced apoptosis, a possible role in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 26: 631-638.
- Schantz-Dunn J, Nour NM 2009. Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Rev Obstet Gynecol* 2: 186-192.
- Setty BNY, Kulkarni S, Stuart MJ 2002. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell–endothelial adhesion. *Blood* 99: 1564-1571.
- Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos J, Intaglietta M, van der Heyde HC 2005. Nitric oxide bioavailability in malaria. *Trends Parasitol* 21: 415-422.
- Totino PRR, Magalhães AD, Silva LA, Banic DM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF 2010. Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. *Malar J* 9: 350.
- Wautier MP, Héron E, Picot J, Colin Y, Hermine O, Wautier JL 2011. Red blood cell phosphatidylserine exposure is responsible for increased erythrocyte adhesion to endothelium in central retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost* 9: 1049-1055.
- Wennicke K, Debierre-Grockiego F, Wichmann D, Brattig NW, Pankuweit S, Maisch B, Schwarz RT, Ruppert V 2008. Glycosylphosphatidylinositol-

induced cardiac myocyte death might contribute to the fatal outcome of *Plasmodium falciparum* malaria. *Apoptosis* 13: 857-866.

Wilson NO, Huang MB, Anderson W, Bond V, Powell M, Thompson WE, Armah HB, Adjei AA, Gyasi R, Tettey Y, Stiles JK 2008. Soluble factors from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. *Mol Biochem Parasitol* 162: 172–176.

Zanini GM, Cabrales P, Barkho W, Frangos JA, Carvalho LJM 2011. Exogenous nitric oxide decrease brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in mice. *J Neuroinflammation* 8: 66.

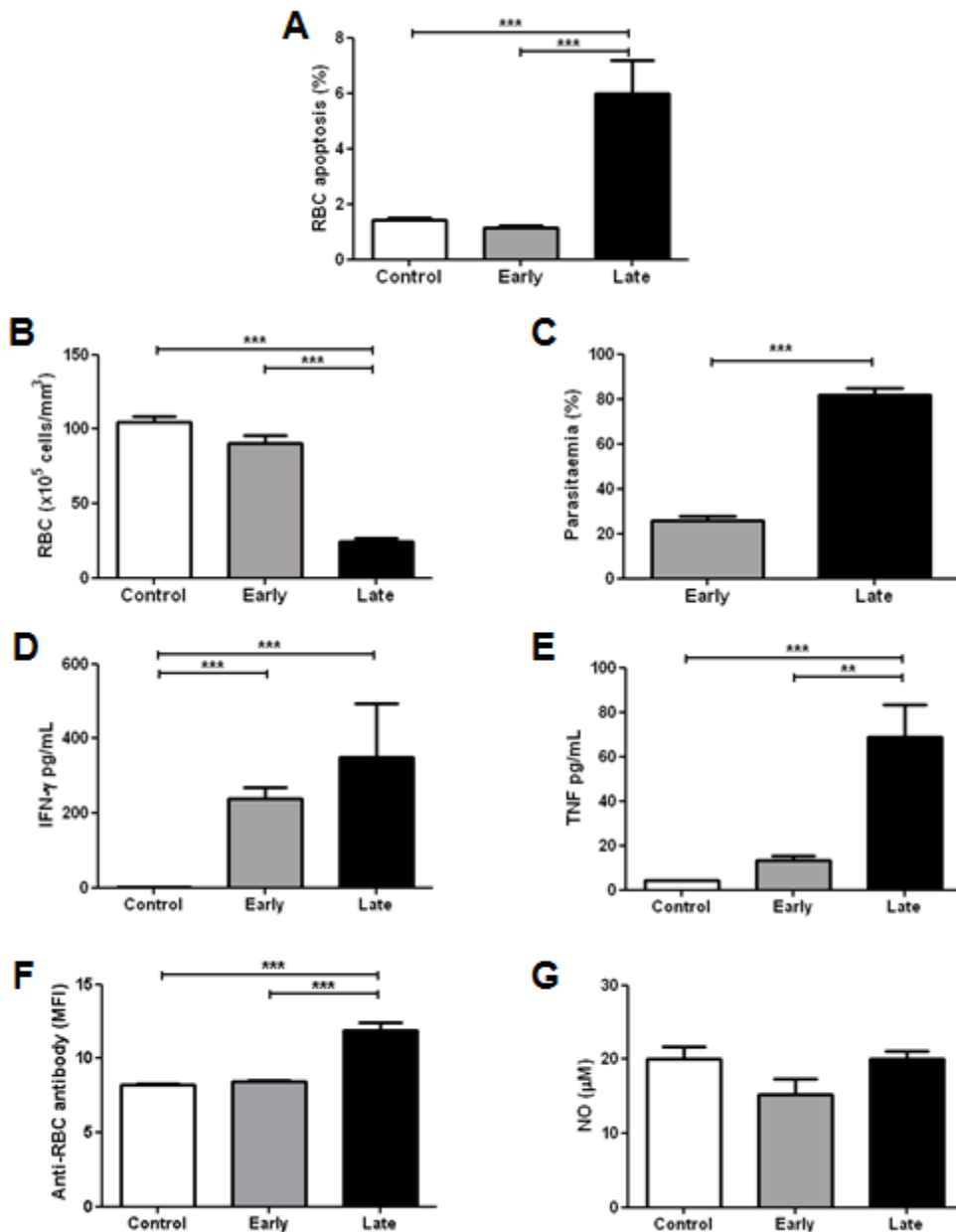


Figure 1: Profile of nRBC apoptosis, anaemia, parasitaemia, proinflammatory cytokines, anti-RBC antibodies and nitric oxide in *P. yoelii* 17XL infection. Balb/c mice ($n = 7-12$) were infected with *P. yoelii* 17XL and, then, at days 4 (early) and 7 (late) p.i. pertinent evaluations were parallely performed. Non-infected mice were used as control ($n = 13$). (A) Levels of apoptotic nRBC. (B) Number of peripheral RBC/mm³ of blood. (C) Parasitaemia. (D) IFN- γ , (E) TNF, (F) anti-RBC antibodies and (G) nitric oxide plasmatic concentrations. Data are results from three separate experiments and are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

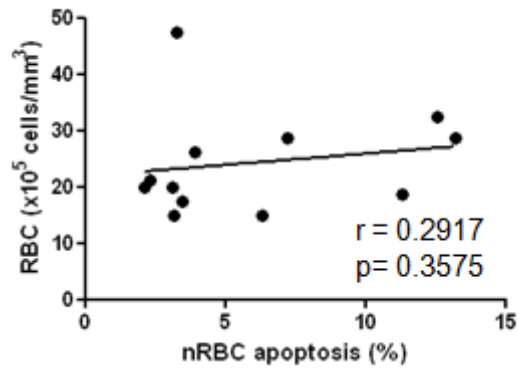


Figure 2: Relationship analysis between nRBC apoptosis and anemia degree in *P. yoelii* 17XL infection. Balb/c mice (n = 12) were infected with *P. yoelii* 17XL and, then, both the levels of apoptotic nRBC and the number of RBC/mm³ of blood were measured during the late stage of infection (day 7 p.i.). Data are results from two separate experiments.

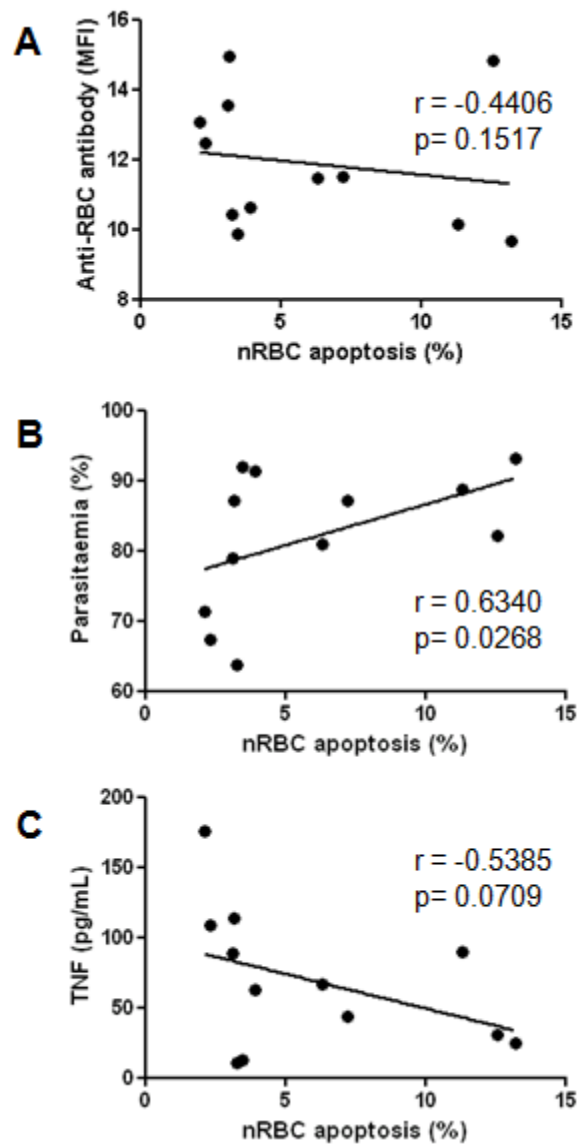


Figure 3: Relationship analysis of nRBC apoptosis with parasitaemia, anti-RBC antibodies and TNF in *P. yoelii* 17XL infection. Balb/c mice (n = 12) were infected with *P. yoelii* 17XL and, then, at late stage of infection (day 7 p.i.) the levels of apoptotic nRBC were correlated with the levels of anti-RBC antibodies (A), parasitaemia (B) and TNF (C). Data are results from two separate experiments.

3.4. Resultados complementares: avaliação da susceptibilidade de eritrócitos não parasitados à apoptose durante a infecção malárica humana por *P. vivax*

Motivados pelos resultados observados na infecção experimental pelo *P. yoelii* 17XL, que evidenciaram um aumento nos percentuais de eritrócitos não parasitados em apoptose durante a infecção, fomos então investigar se o mesmo fenômeno ocorria na malária humana. Como em nosso país os quadros de anemia grave são raros e as infecções pelo *P. falciparum* tem significativamente baixas prevalências, nos detemos nesta parte do nosso trabalho no estudo da malária *vivax*, que em geral cursa como uma infecção não complicada.

Pacientes:

O estudo da susceptibilidade dos eritrócitos não parasitados à apoptose durante a infecção malárica humana foi conduzido na cidade de Manaus-AM, em agosto de 2010, onde foram recrutados 20 pacientes com malária *vivax* atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e 10 indivíduos clinicamente saudáveis, sem história pregressa da doença, dos quais incluíam acompanhantes dos pacientes e profissionais da Fundação.

Os pacientes maláricos e os indivíduos saudáveis convidados a participar do nosso trabalho, foram informados sobre os objetivos do estudo e formalizaram a participação através da assinatura de Termo de Consentimento Pós-Informado, conforme preconizado pela resolução para pesquisa clínica em seres humanos (resolução número 196, de 10 de outubro de 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Fundação Oswaldo Cruz (Protocolo CEP: 543/09).

Após o consentimento da participação e da obtenção de dados pessoais e epidemiológicos, um volume de 5 ml de sangue de cada participante foi obtido por venipunctura em tubos vacutainer contendo EDTA para realização das análises laboratoriais. Durante o procedimento de coleta de sangue, todos os cuidados apropriados foram tomados, como o uso de seringas, agulhas, gazes e luvas descartáveis assim como álcool para assepsia local.

Foram excluídos de nosso estudo grupos especiais, tais como populações indígenas, grupos religiosos, militares, presidiários, doentes mentais, parturientes, gestantes e menores de 18 anos de idade.

Metodologias:

Exame parasitológico: O diagnóstico de malária e a carga parasitária foram determinados através do exame parasitológico em lâminas de gota espessa coradas pelo método de Walker, conforme preconizado pela SVS (2009).

Para confecção da gota espessa, uma gota de sangue obtida da ponta do dedo médio dos pacientes, através de uma lanceta estéril, foi espalhada sob lâmina de vidro em uma área de aproximadamente 1 cm². Depois de seco, o sangue foi desmembrado com solução hipotônica de azul de metileno e, então, corado por 10 minutos com uma solução de Giemsa. Após coloração, a lâmina foi examinada com objetiva de imersão (100x) para identificação da espécie plasmodial e avaliação da parasitemia (parasitas/mm³).

Como reflexo da prevalência majoritária dos casos de *P. vivax* e da escassez de casos de malária graves no nosso país, durante o período do estudo só foram inclusos pacientes com malária *vivax* sem complicações da doença.

Investigações hematológicas: A análise dos parâmetros hematológicos foi realizada nas amostras de sangue total através de um contador de células automatizado (Sysmex KX-21N). Os parâmetros avaliados foram: número de eritrócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e plaquetas (mm³), concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume globular médio (VGM - mm³), hemoglobina corpuscular média (HCM - pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM - %) e volume plaquetário médio (VPM - mm³).

Detecção das células em apoptose: Os percentuais de eritrócitos não parasitados em apoptose foram avaliados tanto *ex-vivo* quanto após 24 horas de incubação, sendo quantificados por citometria de fluxo através da dupla marcação com Syto16 e anexina V-PE, como descrito anteriormente (Totino et al., 2010). Assim, 200µl de eritrócitos, separados do sangue total por centrifugação (300 X *g* - 10 min), foram lavados duas vezes em solução de Ringer (contendo em mM: 125 de NaCl, 1 de MgSO₄, 32 de HEPES, 5 de glicose e 1 CaCl₂ - pH 7,4), ajustados nesta mesma solução para um hematócrito de 0,5% e, então, submetidos diretamente a marcação celular ou incubados por 24 horas a 37° C em placas de 96 poços de fundo chato.

Para a marcação das células apoptóticas *ex vivo* ou após incubação, os eritrócitos foram ressuspensos em uma densidade de 10⁵ células/400µl de PBS contendo 100nM de Syto 16 (Invitrogen) e, então, incubados por 40 minutos a 37° C em banho-maria. Após incubação, o PBS foi substituído por 100µl de tampão de cálcio (BD Pharmingen) contendo 100nM de Syto 16 e, à suspensão celular, foram adicionados 5µl de anexina V-PE (BD Pharmingen). Seguiu-se nova incubação por 15 minutos a temperatura ambiente e, após adição de 400µl de tampão cálcio contendo Syto 16, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson). Para determinação da positividade das marcações com Syto 16 e anexina V-PE, foram utilizados, respectivamente, eritrócitos parasitados de indivíduos infectados ou induzidos à apoptose pelo tratamento com 1µM de ionomicina (Sigma).

Teste de indução de apoptose in vitro na presença de plasma: Além de examinar os percentuais de eritrócitos apoptóticos *ex vivo* e após

incubação, também realizamos experimentos para avaliar o efeito proapoptótico dos plasmas obtidos dos pacientes maláricos e armazenados em nitrogênio líquido. Para esse fim, eritrócitos do tipo O, Rh+, obtidos de um indivíduo clinicamente sadio, foram lavadas duas vezes em solução de Ringer, ressuspensos em um hematócrito de 0,5% e incubados por 24 horas, a 37° C, em placas de 96 poços de fundo chato na presença ou ausência de 50% de plasma de indivíduos sadios ou maláricos. Após este período de incubação, as células foram marcadas com anexina V-PE, e, então, analisadas por citometria de fluxo.

A marcação procedeu da seguinte maneira: após incubação, os eritrócitos foram lavados duas vezes em solução de Ringer, ressuspensos para uma densidade de 10^5 células/100 μ l de tampão de cálcio e, então, incubados por 15 minutos a temperatura ambiente na presença de 5 μ l de anexina V-PE. Ao final da incubação, 400 μ l de tampão de cálcio foram acrescentados à suspensão celular para análise por citometria. Como controle positivo da marcação, foram utilizados eritrócitos induzidos à apoptose (1 μ M de ionomicina) e marcados com anexina V-PE.

Análise estatística: As análises estatísticas e a produção dos gráficos foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 (São Diego, Califórnia). A diferença entre os grupos estudados foi analisada através do teste *t-student*, sendo considerada significativa quando o valor de *p* foi menor que 0.05 ($p < 0.05$).

Resultados

Para avaliação da susceptibilidade dos eritrócitos não parasitados à apoptose na malária humana, estudamos amostras de sangue de 20 pacientes infectados por *P. vivax* e de 10 indivíduos controles clinicamente saudáveis.

A idade dos participantes do estudo variou entre 18 e 73 anos, não sendo observada diferença significativa na média desta variável entre o grupo dos pacientes ($44,9 \pm 16,0$ anos) e dos indivíduos controles ($37,5 \pm 17,1$ anos).

Enquanto no grupo controle a maioria dos indivíduos era do sexo feminino (70%), o dos pacientes foi formado por 50% de indivíduos de cada sexo, dos quais 75% relataram ter tido pelo menos um episódio prévio de malária, seja por *P. vivax* ou *P. falciparum*.

A carga parasitária detectada nos indivíduos infectados mostrou uma variação de 10 a 5.000 parasitas/mm³ de sangue, sendo a maioria dos pacientes (55%) diagnosticados como tendo parasitemias entre 500 e 5.000 parasitas/mm³.

Como mostra a Tabela 3.1, a análise dos parâmetros hematológicos não evidenciou nenhuma alteração significativa concernente a séria vermelha quando comparadas as médias dos valores observados nos pacientes e nos indivíduos controles. Em contrapartida, foi possível observar que o número de leucócitos, linfócitos e plaquetas estava significativamente diminuído nos indivíduos maláricos. Uma redução nos valores referentes à soma dos números de monócitos, eosinófilos e basófilos também foi notada nos pacientes maláricos, porém se mostrou pouco significativa.

Tabela 3.1.: Valores dos parâmetros hematológicos avaliados nos pacientes maláricos por *P. vivax* e nos indivíduos controles clinicamente sadios.

Parâmetros hematológicos		Pacientes (n=20)	Controles (n=10)	Valor de p
Série vermelha	Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	4,84 ± 0,52	4,88 ± 0,57	ns
	Hematócrito (%)	42,21 ± 5,07	43,21 ± 4,45	ns
	Hemoglobina (g/dL)	12,80 ± 1,66	13,10 ± 1,52	ns
	VCM (μ^3)	88,01 ± 5,94	88,85 ± 4,09	ns
	HCM (μg)	26,71 ± 2,34	26,91 ± 1,45	ns
	CHCM (%)	30,29 ± 1,12	30,29 ± 0,66	ns
Série branca	Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5,09 ± 1,78	7,56 ± 1,04	.0004
	Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	1,02 ± 0,59	2,40 ± 0,61	.0001
	Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	3,58 ± 1,91	4,37 ± 1,20	ns
	Monócitos, eosinófilos e basófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,54 ± 0,31	0,79 ± 0,28	.0464
Série plaquetária	Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	109,60 ± 42,07	303,70 ± 83,51	.0001
	VPM (μ^3)	9,62 ± 2,35	9,80 ± 0,96	ns

Os dados apresentados representam as médias ± desvios padrão dos valores hematológicos observados em cada grupo (pacientes e controles). VCM, Volume Corpuscular Médio; HCM, Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média e; VPM, Volume Plaquetário Médio.

A análise dos percentuais de eritrócitos não parasitados em apoptose *ex-vivo* ou após incubação de 24 horas não mostrou diferenças significativas entre as médias observadas nos indivíduos maláricos ou sadios ($p \geq 0,05$) (Figura 3.1). A falta de efeito proapoptótico da infecção pelo *P. vivax* também ficou evidente quando eritrócitos de um indivíduo clinicamente sadio foram incubados por 24 horas na presença do plasma dos pacientes maláricos

(Figura 3.2), uma vez que os resultados foram similares com aqueles detectados nos indivíduos controles ($p \geq 0,05$).

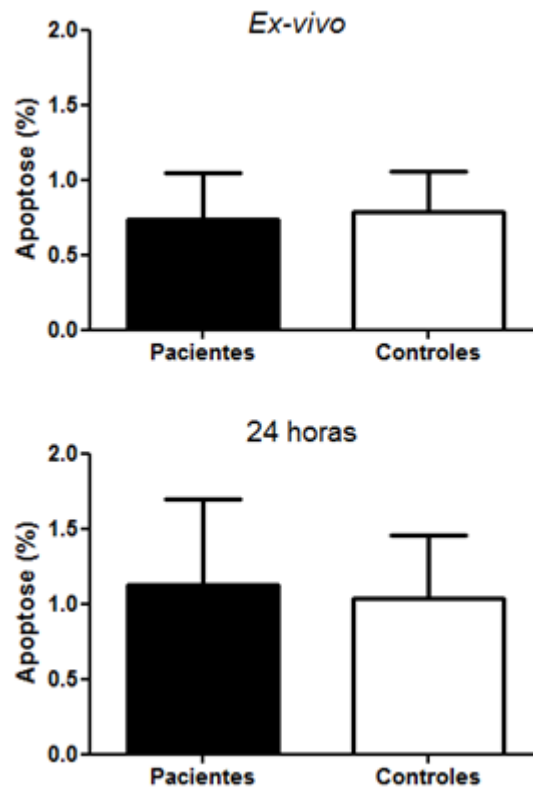


Figura 3.1. Percentuais de eritrócitos apoptóticos não parasitados detectados *ex-vivo* ou após 24 horas de incubação em amostras de sangue de pacientes com malária *vivax* ou de indivíduos controles clinicamente saudáveis. Os dados representam a média \pm desvio padrão dos valores observados em cada grupo.

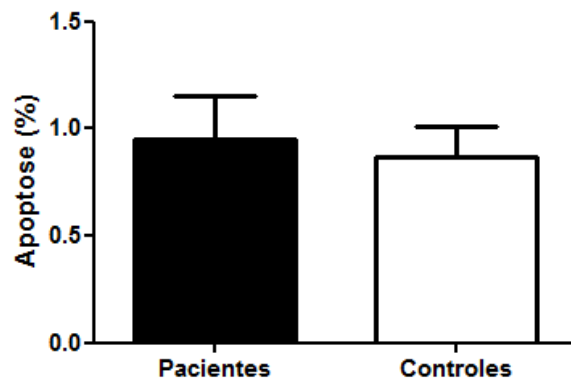


Figura 3.2. Percentuais de apoptose em eritrócitos de um indivíduo clinicamente sadio após incubação por 24 horas na presença do plasma de pacientes infectados por *P. vivax* ou de indivíduos controles não maláricos. Os dados representam a média \pm desvio padrão dos valores observados em cada grupo.

3.5. Artigo 4: Refractoriness of eryptotic red blood cells to *Plasmodium falciparum* infection: a putative host defense mechanism limiting parasitaemia.

Publicado na revista PLoS ONE 2011, volume 6: e26575

Considerando que a apoptose também está envolvida com a limitação da propagação de parasitas intracelulares, avaliamos então neste último estudo a capacidade do *P. falciparum* de infectar eritrócitos apoptóticos, uma vez que este processo poderia atuar no controle da parasitemia na infecção malárica.

Refractoriness of Eryptotic Red Blood Cells to *Plasmodium falciparum* Infection: A Putative Host Defense Mechanism Limiting Parasitaemia

Paulo Renato Rivas Totino, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, Maria de Fátima Ferreira-da-Cruz*

Laboratory of Malaria Research, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

Abstract

Recently, we have described that apoptosis-like process of red blood cells (RBC) – eryptosis – in malaria is not restricted to parasitized cells, occurring also in non-parasitized RBC (nRBC). Besides to pathogenic properties, apoptosis also participates in the innate defense through restriction of intracellular pathogens propagation. In the present study, we investigated the capacity of *P. falciparum* parasites to infect eryptotic RBC. Schizont parasitized RBC concentrated by magnetic separation were cultured with eryptotic RBC obtained by ionomycin treatment and, then, parasite growth was evaluated in Giemsa-stained thin blood smears. While parasites infected and developed normally in control non-eryptotic RBC, cultures performed with eryptotic RBC had a marked decrease in parasitaemia. It was noteworthy a great number of free merozoites in eryptotic RBC cultures, indicating that these cells were not susceptible to invasion. We suggest that although eryptosis could be involved in malaria pathogenesis, it could also act protectively by controlling parasite propagation.

Citation: Totino PRR, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MdF (2011) Refractoriness of Eryptotic Red Blood Cells to *Plasmodium falciparum* Infection: A Putative Host Defense Mechanism Limiting Parasitaemia. PLoS ONE 6(10): e26575. doi:10.1371/journal.pone.0026575

Editor: Fabio T. M. Costa, State University of Campinas, Brazil

Received: June 27, 2011; **Accepted:** September 29, 2011; **Published:** October 21, 2011

Copyright: © 2011 Totino et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mffcruz@ioc.fiocruz.br

Introduction

Apoptosis is a physiological process of programmed cell death (PCD) that plays an important role in tissue development and homeostasis as well as in the pathogenesis of different diseases [1–3]. Apoptosis has also been implicated in the innate defense against many intracellular pathogens, since infected cells undergo apoptotic process as an altruistic mechanism to prevent infection of adjacent cells and propagation of the pathogen [4]. In spite of this, pathogens have developed diverse strategies to modulate the host cell death pathways assuring, in this way, their intracellular survival and development [5].

In malaria, it has been described that intraerythrocytic development of *Plasmodium* parasites depends on the induction of a suicidal death process in host red blood cell (RBC) similar to apoptosis of nucleated cells, named eryptosis [6]. This process could additionally operate avoiding splenic clearance of parasitized-RBC (pRBC) due to the cytoadherence on microvascular endothelium via phosphatidylserine (PS) [7].

Recently, we have reported that eryptosis in malaria is not restricted to pRBC, as increased levels of non-parasitized RBC (nRBC) eryptosis were observed in *P. yoelii*-infected mice [8]. The importance of this phenomenon to malaria pathogenesis has not yet been assessed, but it is possible that nRBC eryptosis participate in anaemia pathogenesis as well as in complications associated to endothelium cytoadherence as already observed in sickle cell anaemia and sepsis [9,10]. However, this “pathogenic” effect of eryptosis could also act as a protective mechanism through restriction of parasite propagation. To address this question, we

have investigated the capacity of *P. falciparum* parasites to infect eryptotic RBC.

Materials and Methods

Parasite culture

P. falciparum parasites (knob⁺ W2 strain) were maintained in continuous *in vitro* culture according to the method described by Trager and Jensen [11]. Parasites were cultured using O⁺ human RBC in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 25 mM Hepes (Sigma), 0.2% glucose (Sigma), 23 mM sodium bicarbonate (Sigma), 40 µg/ml gentamycin (Gibco Industries) and 10% heat-inactivated AB⁺ human serum (complete medium). Cultures were maintained at 3% hematocrit at 37°C under an atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ (White Martins Praxair Inc).

Synchronization of culture was regularly performed by gelatin flotation [12]. Culture was centrifuged at 300 g for 10 min, resuspended in a mixture of 2.4 vol Voluven® (Fresenius) to 1.4 vol of culture medium and, then, incubated at 37°C for 30 min. After incubation, the supernatant containing later stages was collected, centrifuged and cultured with fresh RBC.

Concentration of parasitized RBC

Concentration of pRBC was performed by magnetic separation, as previously described [13]. Synchronized culture containing 20% of parasitaemia and predominance of schizont was washed by centrifugation at 350 g for 10 min and adjusted to 10% hematocrit in complete medium. MACS® columns (25 LD columns, Miltenyi Biotec) were placed in a suitable magnetic

support, filled with warmed (37°C) complete medium and, then, 4 mL of culture were applied onto each column. After washing with warmed culture medium, columns were removed from support and, then, schizont pRBC were recovered by adding culture medium and pushing the plunger into the columns. Finally, eluent was centrifuged at 350 g for 10 min and schizont pRBC were resuspended in complete medium. The purity of pRBC after magnetic enrichment was around 95%, as observed in Giemsa-stained thin blood smears (data not shown).

Eryptosis induction

Eryptotic RBC were obtained by treatment with ionomycin. Fresh O⁺ RBC were washed twice in Ringer solution containing (in mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO₄, 32 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5 glucose, and 1 CaCl₂ (pH 7.4), adjusted to 2% hematocrit in the same solution and, then, incubated for 4 h in presence or absence of 1 μM ionomycin (Sigma). After incubation, RBC were washed thrice and resuspended in complete medium.

Eryptosis induction was evaluated through annexin V staining and cell shrinkage measurement. RBC were resuspended at a density of 1×10⁵ cells/100 μl in annexin-binding buffer (BD Pharmingen), incubated with annexin V-PE (5 μl – BD Pharmingen) for 15 min at room temperature and five times diluted with annexin-binding buffer. RBC were analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson) and forward scatter (FSC), sideward scatter (SSC) and annexin fluorescence (FL-2) were measured.

Evaluation of parasite growth

Purified schizont pRBC were cultured in fiveuplicate in 96-well flat-bottomed plate using ionomycin-treated (eryptotic) or non-treated (non-eryptotic) RBC and complete medium. Cultures were performed at 3% hematocrit and maintained at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂. Parasite invasion and development were estimated by determining percentage of pRBC (parasitaemia) 0, 16, 36 and 60 hours after initiation of culture. Parasitaemia was calculated by light microscopy in Giemsa-stained thin blood smears after counting a minimum of 1000 RBC.

To exclude the possible influence of ionomycin pre-treatment in parasite growth, ionomycin-treated and non-treated RBC were lysed at 3% hematocrit in complete medium by freeze-thawing procedure, centrifuged at 14,000 g for 30 min at 4°C and, then, these supernatants instead of standard culture medium were used to perform asynchronous cultures, as described before. Cultures

treated or not (control) with 1 μM ionomycin were performed and parasite growth was evaluated after 18 hours of culture.

Images were obtained using a 100x/1.3 oil-immersion objective in an Axioplan 2 microscope equipped with an Axiophot 2 camera (Carl Zeiss).

Results and Discussion

It is actually known that programmed cell death is not a mechanism exclusive of nucleated cells, occurring also in enucleated cells as RBC. A variety of compounds and pathological conditions inducers of eryptosis – process characterized by Ca²⁺ influx, protease activation, membrane blebbing, cell shrinkage and PS exposure – has been described [14]. In the present study, the capacity of *P. falciparum* parasites to invade and develop into eryptotic RBC was tested using a population of eryptotic RBC obtained through treatment with ionomycin, which was able to induce eryptosis in nearly all treated RBC population (Figure 1).

As expected, *P. falciparum* parasites infected and developed normally in control non-eryptotic RBC (Figure 2), showing after 16 and 60 h of culture (periods in which parasite invasion was evaluated) a significant increase of 258,5% and 493,6% in parasitaemia, respectively, when compared with initial culture (0 h). Conversely, cultures performed with eryptotic RBC had a marked decrease of 82.3% in parasitaemia after 16 h, reaching 98.9% of reduction at 60 h (Figure 2). It was noteworthy a great number of free merozoites adhered or not to eryptotic RBC after 16 h of culture (Figure 2B), indicating that these cells were not susceptible to invasion. In addition, developing parasites in cultures maintained with eryptotic RBC were only observed in cells showing normal size (Figure 2B – 36 and 60 h), which should correspond to the RBC non-susceptible to ionomycin-induced eryptosis (Figure 1) or those remained after the procedure of pRBC concentration (see material and methods). The presence of developing parasite in ionomycin-treated RBC should indicate that ionomycin pre-treatment did not interfere with parasite viability. Indeed, lysate of ionomycin-treated RBC or, even, ionomycin alone were not able to inhibit parasite growth in culture (Figure 3).

The ability of parasites to infect and develop into apoptotic cells had not been studied so far, possibly, due to the conception that apoptotic cells are rapidly removed by phagocytes through recognition of exposed PS [15]. But, in fact, eryptotic RBC could be target of malaria parasites because these cells have the capacity to adhere on endothelial cells avoiding, therefore, splenic phagocytosis [7,9]. In the same way, *in vitro* lysis of ionomycin-

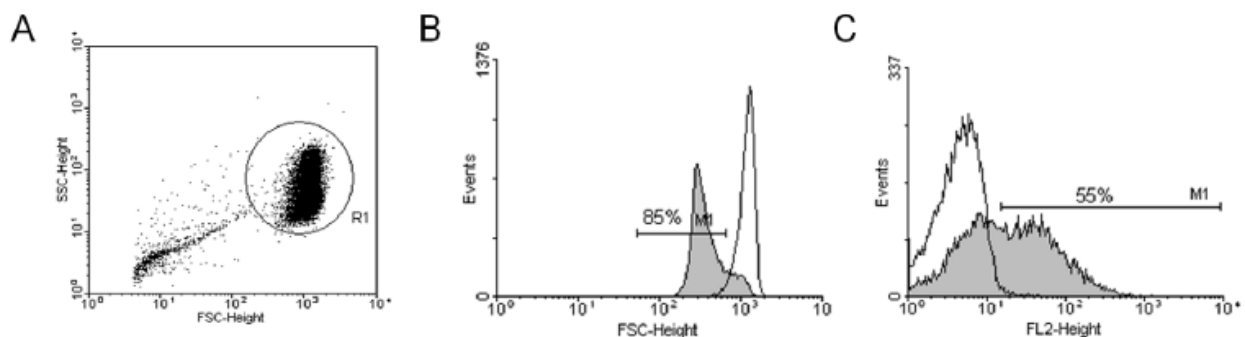


Figure 1. Induction of RBC eryptosis. RBC (A, R1) were incubated at 37°C for 4 h at 2% hematocrit in presence (gray) or absence (black line) of ionomycin (1 μM) and, then, induction of eryptosis was verified by forward scatter measurement (B) and annexin V-PE staining (C). doi:10.1371/journal.pone.0026575.g001

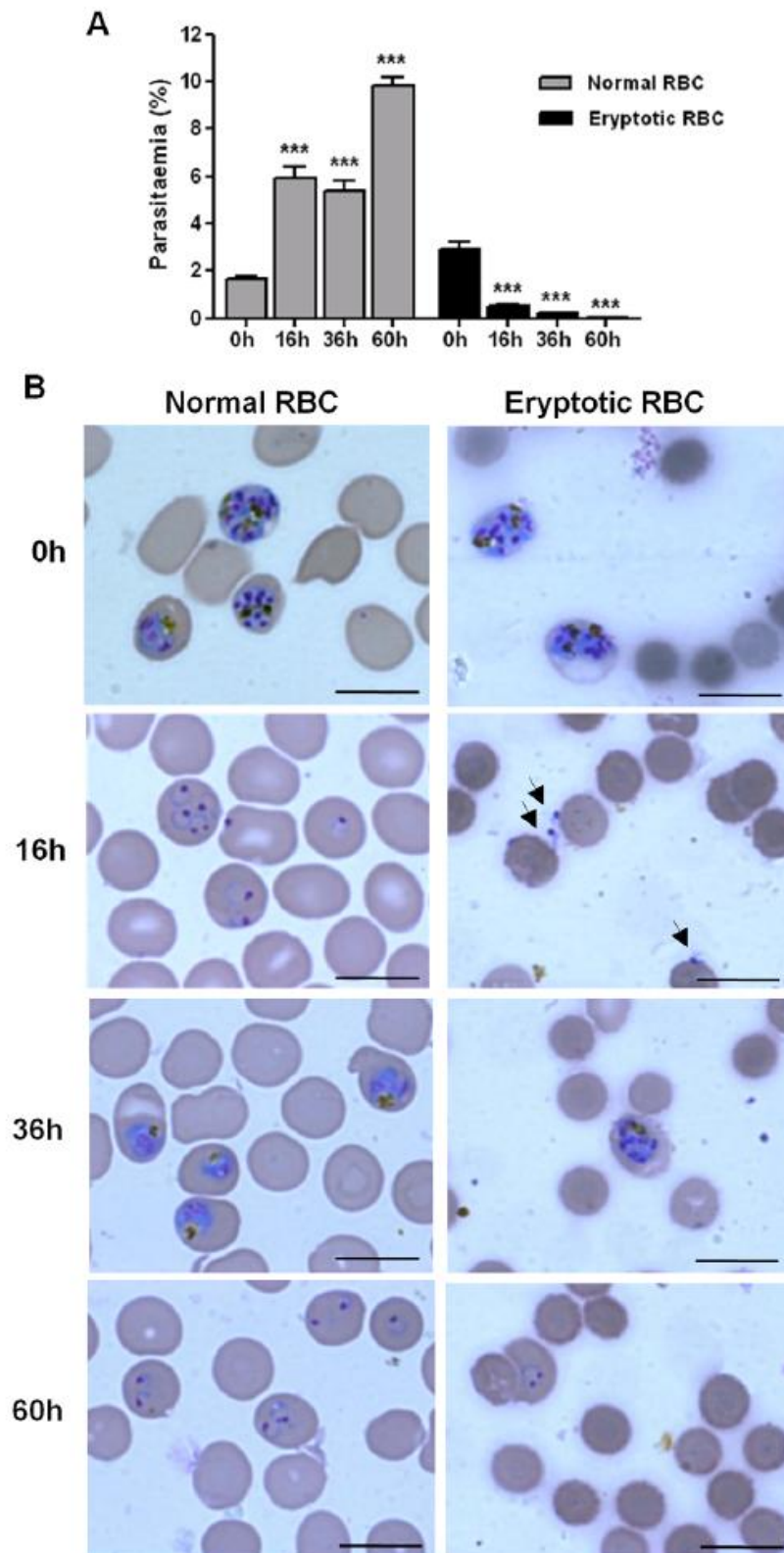


Figure 2. Resistance of eryptotic RBC to *P. falciparum* infection. Schizont pRBC concentrated by magnetic separation were cultured with control non-eryptotic RBC (normal RBC) or eryptotic RBC and, then, parasites invasion (16 and 60 h) and development (36 h) were evaluated in Giemsa-stained thin blood smears. (A) Mean \pm S.D. of parasitaemia and (B) representative photomicrographs (scale bar = 20 μ m) of the cultures performed in fiveuplicate showing:

i) eryptotic RBC are refractory to merozoite invasion (16 h); ii) eryptotic RBC are smaller than normal RBC (0–60 h) iii) parasite development in eryptotic RBC culture take place only into normal size RBC (36–60 h) and; iv) eryptotic RBC were still detected after 60 hours of culture. *** indicates significant difference ($p < 0.001$; ANOVA) from initial culture (0 h) in (A) and arrows indicate free merozoites in (B).
doi:10.1371/journal.pone.0026575.g002

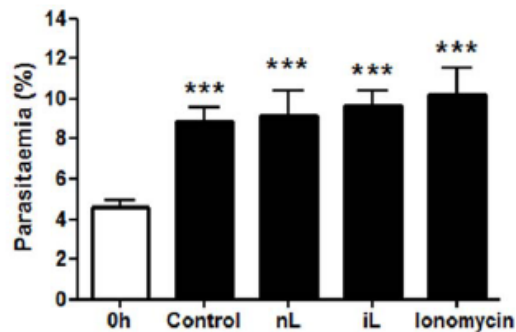


Figure 3. Effect of ionomycin in *P. falciparum* parasite growth. Asynchronous cultures (0 h) were maintained for 18 h in presence of ionomycin or lysates of non-treated (nL) or ionomycin-treated (iL) RBC and, then, parasite growth was evaluated in Giemsa-stained thin blood smears. Non-treated cultures were used as control. Data represent mean \pm S.D. of parasitaemia of the cultures performed in fiveuplicate. *** indicates significant difference ($p < 0.001$; ANOVA) from initial culture (0 h).
doi:10.1371/journal.pone.0026575.g003

treated RBC occurs after a period long enough to allow the complete intraerythrocytic development of parasite, as these cells were still detected after 60 hours of culture (Figure 2B). Thus, despite eryptotic RBC could be focus of malaria parasites, in our study, *P. falciparum* parasites were not able to infect eryptotic RBC.

Eryptosis could have opposite key roles in malaria. On one hand eryptosis contributes to complications associated to pRBC sequestration and to anaemia related to splenic phagocytosis of nRBC [6,8]. On the other hand, this process could reduce parasite levels by splenic phagocytosis of pRBC, controlling parasite growth [16]. In addition, here we disclose another possible protective mechanism of nRBC eryptosis, since these cells are not able to be infected by *P. falciparum* merozoites. This finding could also partially explain why sickle-cell anaemia patients – that usually maintain increased levels of eryptosis [17] – have low levels of parasitaemia [18]. In the same way, the decreased *in vitro* growth of *P. falciparum* in cultures treated with chlorpromazine [19] – a

potent eryptosis inducer – could be related to the herein demonstrated inability of parasites to invade eryptotic RBC, since the parasite viability is not influenced by chlorpromazine as well as the protective effect associated to phagocytosis of eryptotic pRBC cannot take place in *in vitro* conditions.

The resistance of eryptotic nRBC to parasite invasion could be attributed to cellular changes occurring during eryptosis. In fact, although the RBC components participating in parasite entry remain poorly defined, it has been shown that two cytoskeletal proteins, i.e. spectrin and actin, which are degraded in apoptosis [20,21], are involved in host cell infection [22,23]. Furthermore, a reduction in surface expression of glycoproteins – the well-identified receptors to *P. falciparum* in RBC [24] – was also detected in eryptotic RBC from thalassaemia patients [25]. It is possible, therefore, that cell surface and cytoskeleton changes underwent in eryptosis account for the loss of parasite infectiveness observed in our studies, which reinforce the idea that the invasion process of Apicomplexa parasites requires, besides parasite actin-myosin motor, the host cell components [23].

The refractoriness of eryptotic nRBC to *P. falciparum* parasites invasion was firstly herein reported making difficult to deeply discuss the balance between pathogenic and protective effects. In murine models eryptosis of nRBC was reported during anaemia-associated *P. yoelii* 17XL infection [8] or during *P. berghei* ANKA infection when the use of eryptotic inducers was able to enhance eryptosis only in pRBC [26,27].

In conclusion, we showed that eryptotic nRBC were not target to *P. falciparum* parasites infection and, although eryptosis could be involved in malaria pathogenesis, it could also acting protectively by controlling parasite propagation. Further studies are required to address the magnitude of this phenomenon during malaria infection. In addition, the investigation of eryptosis can provide useful information concerning the host cell components implicated in parasite invasion.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PRRT MFFC. Performed the experiments: PRRT. Analyzed the data: PRRT. Wrote the paper: PRRT CTDR MFFC.

References

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239–257.
- Dockrell DH (2001) Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious disease. *J infect* 42: 227–234.
- Bienvenu AL, Gonzalez-Rey E, Picot S (2010) Apoptosis induced by parasitic disease. *Parasite Vectors* 3: 106.
- Williams GT (1994) Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol* 2: 463–464.
- Garmen JC, Sinai AP (2007) Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol Microbiol* 64: 904–916.
- Lang F, Lang PA, Lang KS, Brand V, Tanneur V, et al. (2004) Channel-induced apoptosis of infected host cells - the case of malaria. *Pflügers Arch* 448: 319–324.
- Eda S, Sherman IW (2002) Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem* 12: 373–384.
- Totino PRR, Magalhães AD, Silva LA, Banic DM, Daniel-Ribeiro CT, et al. (2010) Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia. *Malar J* 9: 350.
- Setty BNY, Kulkarni S, Stuart MJ (2002) Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood* 99: 1564–1571.
- Kempe DS, Akel A, Lang PA, Hermle T, Biswas R, et al. (2007) Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J Mol Med* 85: 273–281.
- Trager W, Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673–675.
- Ljungström I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M (2004) *Methods in malaria research*, 4th edition, Virginia: MR4/ATC. 248 p.
- Ribaut C, Berry A, Chevalley S, Reybier K, Morlais I, et al. (2008) Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. *Malar J* 7: 45.
- Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, et al. (2008) Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 22: 373–380.
- Henson PM, Bratton DL, Fadok VA (2001) Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 11: R795–R805.
- Lang PA, Kasinathan RS, Brand VB, Duranton C, Lang C, et al. (2009) Accelerated clearance of *Plasmodium*-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cell Physiol Biochem* 24: 415–428.
- Wood BL, Gilson DF, Tait JF (1996) Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 88: 1873–1880.

18. Komba AN, Makani J, Sadarangani M, Ajala-Agbo T, Berkley JA, et al. (2009) Malaria as a cause of morbidity and mortality in children with homozygous sickle cell disease on the coast of Kenya. *Clin Infect Dis* 49: 216–222.
19. Koka S, Lang C, Boini KM, Bobbala D, Huber SM, et al. (2008) Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice. *Cell Physiol Biochem* 22: 261–268.
20. Brown SB, Bailey K, Savill J (1997) Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J* 323: 233–237.
21. Wang KKW, Posmanturi R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, et al. (1998) Simultaneous degradation of α I- and β I-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 273: 22490–22497.
22. Shear HL, Roth EF, Ng C, Nagel RL (1991) Resistance to malaria in ankyrin and spectrin deficient mice. *Br J Haematol* 78: 555–560.
23. Gonzalez V, Combe A, David V, Malmquist NA, Delorme V, et al. (2009) Host cell entry by Apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host Microbe* 5: 259–272.
24. Cowman AF, Crabb BS (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124: 755–766.
25. Basu S, Banerjee D, Chandra S, Chakrabarti A (2008) Loss of phospholipid membrane asymmetry and sialylated glycoconjugates from erythrocyte surface in haemoglobin E β -thalassaemia. *Br J Haematol* 141: 92–99.
26. Bobbala D, Alesutan I, Föller M, Tschan S, Huber SM, et al. (2010) Protective effect of amiodarone in malaria. *Acta Trop* 116: 39–44.
27. Alesutan I, Bobbala D, Qadri SM, Estremera A, Föller M, et al. (2010) Beneficial effect of aurothiomalate on murine malaria. *Malar J* 9: 118.

4. Considerações Finais

Sabe-se que dentre os mecanismos envolvidos na anemia malárica, a destruição precoce dos eritrócitos não parasitados exerce importante contribuição (Chang & Stevenson, 2004; Lamikanra et al., 2007). Inclusive, estudos apontam para a permanência dos processos que levam a eliminação dessas células, mesmo após a administração de drogas antimaláricas (Price et al., 2001; Carvalho et al., 2003; Obonyo et al., 2007). Esse dado, além de sugerir o envolvimento da resposta imune do hospedeiro, também parece indicar uma potencial participação dos antimaláricos no desenvolvimento da anemia da malária.

Frente a esses fatos e tendo em vista a já descrita susceptibilidade dos eritrócitos ao processo de morte celular por apoptose, que parece estar relacionada com a anemia de diversas patologias (Lang et al., 2008), decidimos estudar a apoptose eritrocitária na malária e sua participação na anemia associada a esta infecção parasitária.

No que concerne aos antimaláricos, alguns trabalhos têm mostrado que estas drogas têm propriedades proapoptóticas em diferentes tipos celulares e que isso poderia agir tanto de forma benéfica como nos tratamentos de câncer e de doenças autoimunes (Li et al., 2007; Park et al., 2008), como maléfica através da indução de apoptose em células sadias e levando ao dano celular (Mohamed, 2005; Nilkaeo et al., 2006). Assim, em nosso primeiro artigo apresentado, avaliamos *in vitro* a contribuição dos antimaláricos na anemia da malária.

Contrariamente aos achados em células nucleadas tratadas com antimaláricos (Mohamed, 2005; Nilkaeo et al., 2006; Li et al., 2007; Park et al., 2008) e aos trabalhos que demonstram a capacidade de diferentes fármacos em induzir apoptose eritrocitária (Lang et al., 2008), em nosso estudo o tratamento de eritrócitos humanos com cloroquina, mefloquina, quinina ou artemisinina não foi capaz de induzir apoptose nestas células anucleadas, sugerindo que estas drogas não exercem influência no desenvolvimento da anemia através da indução de apoptose eritrocitária.

Provavelmente, o tropismo dos antimaláricos para organelas celulares foi o fator responsável pela ausência do efeito proapoptótico destas drogas nos eritrócitos, já que essas células são desprovidas de organelas (Fitch, 2004; Golenser et al., 2006). Drogas como a cloroquina, mefloquina e quinina possuem afinidades para vacúolos ácidos e têm sido utilizadas em estudos sobre a apoptose induzida por alterações lisossomais em células neurais (Zaidi et al., 2001; Geng et al., 2010). Realmente, é descrito que o efeito parasiticida dessas drogas ocorre no vacúolo digestivo plasmodial, no qual elas se acumulam e, provavelmente, interferem com as vias de detoxificação da ferroprotoporfirina IX gerada durante o processo de digestão da hemoglobina pelo parasita (Zarchin et al., 1986; Ginsburg 1990; Roepe 2009). Ainda que não haja um consenso sobre a susceptibilidade dos plasmódios à apoptose, nossos estudos prévios corroboram com a capacidade das quinolinas (cloroquina, mefloquina e quinina) de induzir morte celular por vias lisossomais, uma vez que as formas eritrocíticas do *P. falciparum* frente ao tratamento com cloroquina deflagraram processos autofágicos, que podem culminar ou não em eventos apoptóticos (Totino et al., 2008 – artigo em anexo).

No caso da artemisinina, embora os mecanismos propostos para sua ação antimalárica sejam bastante controversos, é fortemente sugerido que as organelas celulares sejam alvos primários dessa droga (Li & Zhou, 2010; O'Neill et al., 2010). De fato, em estudos realizados por Stocks e colaboradores (2007) com eritrócitos parasitados tratados com artemisinina conjugada a um composto fluorescente (benzotiazol), observou-se que esta droga se acumula no vacúolo digestivo plasmodial, no qual parece interagir com o ferro livre, produzindo radicais livres e alterando as atividades desse vacúolo (Pilar Crespo et al., 2008). Mais recentemente, foi documentado que a artemisinina também pode associar-se com a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e interferir com a função da mitocôndria através da produção local de radicais livres (Wang et al., 2010), fortalecendo os estudos que descrevem a capacidade da artemisinina de ativar as vias apoptóticas mitocondrial em células tumorais (Mercer et al., 2011). Considerando esses achados, a ausência de um efeito proapoptótico da artemisinina em nosso trabalho com eritrócitos humanos também aponta para uma relação entre o efeito citotóxico dessa droga e as organelas celulares.

Como os precursores eritrocitários são nucleados e apresentam organelas, possivelmente são susceptíveis ao efeito proapoptótico dos antimaláricos e, por conseguinte, poderiam sofrer apoptose e, assim, participar na indução da anemia nos pacientes maláricos durante o tratamento da doença. Neste sentido, a deficiência na eritropoiese já foi identificada como o principal mecanismo responsável pela persistência da anemia em pacientes tailandeses infectados pelo *P. falciparum*, nos quais essa manifestação clínica persistiu em mais de 80% dos pacientes sob tratamento (Camacho et al.,

1998). Soma-se a esse estudo aqueles que evidenciaram uma redução nos níveis periféricos de reticulócitos frente ao tratamento com antimaláricos, ratificando a participação dessas drogas na inibição da eritropoiese (Phuong et al., 1997; Xie et al., 2005; Efferth & Kaina, 2010; Clark, 2012).

Outro ponto que devemos considerar é que mesmo que nossos resultados não tenham mostrado um efeito proapoptótico dos antimaláricos cloroquina, mefloquina, quinina e artemisinina em eritrócitos saudáveis, não podemos descartar a participação dos metabólitos dessas drogas na indução de apoptose porque nossas observações foram feitas a partir de estudos *in vitro*. Exemplificando esta possibilidade, resultados diferentes foram obtidos quando investigado o efeito hemolítico da primaquina: enquanto que *in vitro* este antimalárico não apresenta efeito hemolítico, *in vivo* foi demonstrado que seus metabólitos foram capazes de induzir uma acelerada eliminação dos eritrócitos (Bolchoz et al., 2001; Bowman et al., 2004 e 2005).

Seguindo a nossa linha de investigação mostramos que, embora a apoptose não tenha sido induzida *in vitro* pelos antimaláricos, este evento pode ser deflagrado em eritrócitos na infecção malárica experimental (artigo 2). Similarmente aos estudos de outras patologias que causam um quadro de anemia, observamos um aumento nos níveis basais de eritrócitos em apoptose no decorso da infecção do *P. yoelii* 17XL em camundongos Balb/c. Como esperado, quando analisamos a população de eritrócitos parasitados observamos que um percentual de células estava em processo de apoptose, como já constatado com outras espécies plasmodiais (*P. falciparum* e *P. berghei*) (Maguire et al., 1991; Eda & Sherman, 2002; Bobbala et al., 2010).

Embora em estudos com o *P. berghei* ANKA a indução de apoptose nos eritrócitos parasitados através de drogas possa conferir redução da parasitemia (Bobbala et al., 2010, Alesutan et al., 2010), a observação de uma rápida progressão da carga parasitária nos camundongos Balb/c infectados pelo *P. yoelii* 17XL não sugere um efeito protetor da apoptose neste modelo de malária por nós estudado. Ademais, a citoaderência dos eritrócitos parasitados em apoptose via fosfatidilserina poderia ser mais um fator contribuidor para a letalidade associada ao *P. yoelii* 17XL (Eda & Sherman, 2002).

Além da detecção da apoptose nos eritrócitos parasitados, também notamos que a infecção pelo *P. yoelii* 17XL levou à um aumento significativo nos percentuais de eritrócitos não parasitados em apoptose e sugerimos que este aumento poderia estar relacionado com a redução acentuada no número de eritrócitos periféricos observada neste modelo. Assim, para avaliarmos se a apoptose dos eritrócitos não parasitados estava de fato relacionada à anemia que acompanha a infecção pelo *P. yoelii*, realizamos novas experimentações com este plasmódio para avaliar o envolvimento da carga parasitária e de componentes da resposta imune do hospedeiro (óxido nítrico, anticorpos antieritrócitos e citocinas) na indução da apoptose nos eritrócitos não parasitados (artigo 3).

Os dados assim obtidos confirmaram nossos resultados prévios referentes à indução de apoptose na infecção experimental pelo *P. yoelii* 17XL e mostraram que a anemia observada na fase tardia dessa infecção parece não estar relacionada com a extensão da apoptose dos eritrócitos não parasitados. Por outro lado, foi possível observar que essa apoptose associava-se com a carga parasitária detectada no estágio final da infecção,

embora tal associação não tenha sido evidenciada com os componentes da resposta imune avaliados.

A observação de aumento nos níveis de apoptose eritrocitária apenas durante o estágio da infecção que foi marcado por uma alta parasitemia parece indicar que a presença do parasita em altas densidades possa ser o principal fator de indução da apoptose nos eritrócitos não parasitados. É fato que na infecção malárica antígenos parasitários podem ser adsorvidos passiva ou ativamente na superfície dos eritrócitos não parasitados e que isso ocorre de maneira dependente da concentração e/ou da parasitemia (Layez et al., 2005; Bratting et al., 2008). Assim, considerando a já descrita capacidade de toxinas microbianas e de antígenos do *Schistosoma mansoni* de induzir *in vitro* apoptose em eritrócitos sadios (Föller et al., 2007; Kasinathan & Greenberg, 2010), é possível que o processo apoptótico observado *ex-vivo* nos eritrócitos não parasitados seja reflexo da elevada adsorção de antígenos plasmodiais na superfície dessas células. Ainda que não tenhamos avaliado se os eritrócitos são alvos de antígenos parasitários na infecção pelo *P. yoelii* 17XL ou mesmo se antígenos dessa espécie plasmodial induzem apoptose eritrocitária *in vitro*, a detecção de eritrócitos não parasitados em apoptose no cultivo *in vitro* de *P. falciparum* (Koka et al., 2007 e 2008) reforça a hipótese da participação direta dos antígenos plasmodiais na indução da apoptose eritrocitária.

Nosso estudo com pacientes infectados por *P. vivax* (resultados complementares), também parece sugerir um papel da parasitemia na indução da apoptose eritrocitária. Assim como em outros trabalhos, observamos nestes pacientes uma significativa redução no número de plaquetas, leucócitos e linfócitos circulantes que, em parte, pode ser um evento relacionado com a

indução de apoptose nestas células (Piguet et al., 2002; Riccio et al., 2003; Kapoor et al., 2011). Entretanto, diferentemente dos resultados obtidos na infecção experimental pelo *P. yoelii* 17XL, não notamos alterações nos níveis basais de eritrócitos em apoptose nos pacientes maláricos, o que poderia ser um reflexo das baixas parasitemias que acompanham as infecções causadas pelo *P. vivax*. Realmente, os resultados observados na infecção pelo *P. vivax* assemelham-se aqueles observados no estágio inicial da infecção pelo *P. yoelii* 17XL, cuja moderada parasitemia não foi acompanhada da apoptose de eritrócitos não parasitados.

Contudo, é importante termos em mente que os mecanismos celulares que participam da eliminação dos eritrócitos podem variar conforme a espécie plasmodial infectante. Enquanto têm sido descrito que os eritrócitos não parasitados durante a infecção pelo *P. falciparum* deflagram um processo de enrijecimento celular que pode facilitar sua eliminação por macrófagos esplênicos (Dondorp et al., 1999; Dondorp et al., 2000), estudos realizados por Handayani e colaboradores (2009) mostraram que estas células apresentam uma maior fragilidade na infecção pelo *P. vivax* e, por conseguinte, são mais propensas à lise celular. Portanto, também é possível que a não detecção de eritrócitos em apoptose nos pacientes com malária *vivax* tenha ocorrido devido à maior susceptibilidade dessas células à lise celular do que ao processo apoptótico.

Outro fator que pode ter contribuído para a apoptose eritrocitária deflagrada na infecção pelo *P. yoelii* 17XL foi a baixa bioavaliabilidade do óxido nítrico que ocorre na malária (Sobolewski et al., 2005), evidenciada em nossos estudos pelos níveis plasmáticos de nitrito. Estudos realizados por Nicolay e

colaboradores (2008) mostraram que o óxido nítrico é um potente inibidor da apoptose eritrocitária induzida *in vitro* por diferentes tratamentos e que a depleção dessa molécula em camundongos deficientes de óxido nítrico sintetase resulta em uma acelerada eliminação dos eritrócitos. A importância do óxido nítrico na apoptose eritrocitária *in vivo* também foi evidenciada durante a leishmaniose visceral de hamsters (Chowdhury et al., 2010). Neste modelo animal, a depleção de óxido nítrico causada pela infecção foi identificada como um promotor da apoptose eritrocitária, uma vez que este processo de morte celular foi atenuado através do tratamento com doadores dessa molécula. Frente a estes achados, podemos supor que a baixa bioavaliabilidade do óxido nítrico durante a infecção malárica poderia potencializar a indução da apoptose eritrocitária mediada pelo parasita no modelo experimental por nós estudado.

Se por um lado nossos resultados implicam o aumento da carga parasitária na indução da apoptose eritrocitária, por outro parecem afastar a participação das citocinas e dos anticorpos antieritrócitos neste processo. A falta de relação entre a apoptose eritrocitária e os níveis de TNF e IFN- γ em nosso estudo não foi surpreendente, visto que o tratamento *in vitro* de eritrócitos sadios com TNF e IL-1 não foi capaz de estimular apoptose neste tipo celular (Pattanapanyasat et al., 2010). Ademais, tem sido descrito que os eritrócitos além de apresentar receptores de quimiocinas incapazes de traduzir sinais intracelulares, são desprovidos de receptores para citocinas, fatos que provavelmente os tornam refratários ao estímulo por essas moléculas imunológicas (Neote et al., 1994; Daniels, 2007).

Diferentemente, no caso dos anticorpos antieritrócitos a apoptose eritrocitária pode ser induzida *in vitro* utilizando-se anticorpos direcionados

contra a glicoforina C, o aglutinogênio A ou o CD47 presentes na superfície dos eritrócitos (Head et al., 2005a; Head et al., 2005b; Attanasio et al., 2007). Ainda sim, em nosso trabalho não observamos relação entre os níveis de anticorpos antimembrana de eritrócito e a apoptose dos eritrócitos não parasitados. Como a especificidade dos anticorpos antieritrócitos que detectamos na infecção pelo *P. yoelii* 17XL não foi avaliada, é possível que estes anticorpos fossem direcionados contra antígenos eritrocitários não relacionados com a indução de apoptose.

Além dos nossos resultados apontarem para a não participação das citocinas e dos anticorpos antieritrócitos na indução de apoptose nos eritrócitos não parasitados, também foi possível notar que este processo de morte celular não estava implicado com a anemia do modelo experimental estudado. Com base nos dados da literatura que sugerem um envolvimento da apoptose eritrocitária na patogênese da anemia, hipotetizamos inicialmente que a apoptose dos eritrócitos não parasitados poderia participar da anemia deflagrada no estágio tardio da infecção pelo *P. yoelii* (artigo 2). Entretanto, a falta de relação entre os níveis de apoptose e o grau de anemia não permitiu confirmar nossa premissa inicial (artigo 3). Ademais, a indução da apoptose não ocorreu antes, mas durante a anemia aguda, quando a atividade fagocítica provavelmente já estava saturada como resultado das altas densidades parasitária (Schwarzer et al., 1992; Bellows et al., 2011).

A anemia da infecção malárica murina é de fato um evento que normalmente está relacionado com a ruptura dos altos percentuais de eritrócitos parasitados (Lamikanra et al., 2007), o que pode ter representado um fator limitante para a avaliação da participação dos eritrócitos não

parasitados na anemia malárica. Portanto, não podemos descartar a possibilidade da apoptose eritrocitária estar envolvida na patogênese da malária humana, considerando que este processo é deflagrado em patologias em que a anemia ocorre independente da infecção de eritrócitos (Lang et al., 2008) e tendo em vista que a anemia pode ocorrer durante o episódio malárico acompanhado de baixas parasitemias (Carvalho et al., 2003; Evans et al., 2006; Helegbe et al., 2009). Assim, partimos para estudar a apoptose eritrocitária na infecção malárica por ocasião do diagnóstico e não observamos aumento nos percentuais de eritrócitos não parasitados apoptóticos nos pacientes estudados. Como a nossa casuística compreendeu exclusivamente pacientes com malária por *P. vivax* não complicada que inclusive não mostraram alterações significativas nos parâmetros eritrocitários, não foi possível uma conclusão definitiva sobre o papel da apoptose eritrocitária na anemia da malária humana.

Por outro lado, é importante termos em mente que além de mediar a eliminação dos eritrócitos por fagocitose, a apoptose eritrocitária também parece estar relacionada com a adesão destas células nos capilares sanguíneos. Apesar deste fenômeno nos eritrócitos não parasitados ainda não ter sido descrito na infecção malárica, a aderência de eritrócitos apoptóticos em células endoteliais ocorre *in vitro* (Manodori et al., 2000; Koshkaryev et al., 2010) e é considerada um dos fatores responsáveis pelas complicações vasculares na anemia falciforme e nos quadros de insuficiência renal e de oclusão da veia da retina (Bonomini et al., 2002; Setty et al., 2002; Wautier et al., 2011). Ademais, em estudos realizados por Franke-Fayard e colaboradores (2005) foi demonstrado que os eritrócitos parasitados por *P. berghei* são

notavelmente sequestrados nos pulmões e no tecido adiposo através do CD36, um conhecido receptor da fosfatidilserina exposta nas células apoptóticas (Fadok & Henson, 2003; Greenberg et al., 2006). Assim, similarmente aos eritrócitos parasitados na infecção pelo *P. berghei*, os não parasitados em apoptose poderiam ser alvos do sequestro mediado pelo CD36 e, por conseguinte, contribuiriam para as complicações da malária associadas a esse fenômeno celular.

Outra aspecto da apoptose eritrocitária que avaliamos foi sua possível propriedade protetora na malária, visto que o processo apoptótico em células nucleadas também atua como um mecanismo inato de eliminação de parasitas intracelulares (Williams, 1994; Luder et al., 2001). Como discutido anteriormente, o efeito protetor da apoptose eritrocitária tem sido demonstrado na infecção experimental pelo *P. berghei*, na qual a indução *in vivo* de apoptose em eritrócitos parasitados pelo tratamento com drogas foi associada com a eliminação dessas células por fagocitose e com a atenuação da parasitemia (Bobbala et al., 2010, Alesutan et al., 2010). Em nosso último estudo (artigo 4), entretanto, fizemos uma abordagem diferente e avaliamos *in vitro* a capacidade do *P. falciparum* de infectar e se desenvolver em eritrócitos previamente induzidos à apoptose. Assim, foi possível observar que os eritrócitos apoptóticos são refratários à infecção plasmodial, que provavelmente ocorre devido às mudanças na membrana celular deflagradas durante o processo apoptótico (Brown et al., 1997; Wang et al., 1998; Matarrese et al., 2005).

Apesar dessa observação *in vitro* e considerando a rápida progressão da carga parasitária e a indução de apoptose nos eritrócitos não parasitados apenas nos estágios finais da infecção pelo *P. yoelii* 17XL é difícil estabelecermos a real contribuição da apoptose dos eritrócitos não parasitados no controle da parasitemia na malária. No caso das hemoglobinopatias, que normalmente conferem algum grau de resistência as altas parasitemias e que também estão associadas a níveis aumentados de apoptose eritrocitária (Lang et al., 2002; Basu et al., 2008), estudos que avaliem a relação entre estes dois eventos ainda são necessários para que conclusões informativas sejam obtidas.

Considerando os nossos experimentos *in vitro*, duas principais questões sobre o papel protetor da apoptose eritrocitária na malária emergem: se o percentual de eritrócito não parasitados em apoptose induzido *in vivo* tem significativa contribuição na atenuação da parasitemia e se após uma investida de invasão em um eritrócito apoptótico, os merozoítas ainda são capazes de invadir eritrócitos não apoptóticos, o que minimizaria o efeito antiparasitário da apoptose eritrocitária.

Frente a essas considerações os nossos dados nos levaram a concluir que:

5. Conclusões

- Os antimaláricos não parecem contribuir para a anemia observada durante o tratamento da malária através da indução de morte celular eritrocitária porque não foram capazes de induzir *in vitro* apoptose em eritrócitos sadios;
- Os eritrócitos não parasitados são susceptíveis ao processo de apoptose eritrocitária durante a malária experimental de camundongos Balb/c pelo *P. yoelii* 17XL mas, aparentemente, não participam da gênese da anemia aguda deflagrada nesse modelo experimental;
- A parasitemia pode ser um fator importante de indução da apoptose eritrocitária dado que os níveis de eritrócitos não parasitados apoptóticos estavam relacionados com as altas densidades parasitárias;
- A malária *vivax* não complicada não parece cursar com a indução de apoptose eritrocitária, visto que não foram detectadas alterações nos níveis basais de eritrócitos apoptóticos e;
- Os eritrócitos em apoptose parecem exercer um papel protetor no controle da parasitemia porque essas células se mostraram refratárias à infecção *in vitro* pelo *P. falciparum*.

6. Perspectivas

Frente aos resultados apresentados nesta tese, as futuras abordagens que propomos para melhor esclarecer o papel da apoptose eritrocitária na patogênese da malária incluem basicamente:

- Analisar a capacidade dos antimaláricos, incluindo a primaquina, em induzir apoptose eritrocitária *in vivo*;
- Investigar a participação da apoptose de eritrócitos não parasitados no desenvolvimento da anemia em modelo experimental de malária murina no qual a carga parasitária cursa com baixas parasitemias;
- Avaliar os percentuais de apoptose eritrocitária na infecção pelo *P. falciparum* e durante os quadros de malária grave e sua relação com a anemia;
- Verificar a capacidade de eritrócitos apoptóticos em deflagrar fenômenos de citoaderência durante a infecção malárica murina e o envolvimento desse processo nas complicações associadas ao sequestro eritrocitário e;
- Identificar antígenos plasmodiais e componentes da resposta imune do hospedeiro que poderiam participar da indução da apoptose eritrocitária.

7. Referências bibliográficas

- Abdalla S, Weatherall DJ, Wickramasinghe SN, Hughes M 1980. The anemia of *P. falciparum* malaria. Br. J. Haematol 46: 171-183.
- Abdalla SH 1988. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. Ann. Trop. Paediatr. 8: 250-258.
- Alesutan I, Bobbala D, Qadri SM, Estremera A, Föller M, Lang F 2010. Beneficial effect of aurothiomalate on murine malaria. Malar J 9: 118.
- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda MV, Alecrim MGC 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis 16: 1611-1614.
- Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN 2009. The pathophysiology of *vivax* malaria. Trends Parasitol 25: 220-227.
- Arese P, Turrini F, Schwarzer E 2005. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. Cell Physiol Biochem 16: 133-146.
- Arévalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S 2010. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. Hum Vaccin 6: 124-32.
- Attanasio P, Shumilina E, Hermle T, Kiedaisch V, Lang PA, Huber SM, Wieder T, Lang F 2007. Stimulation of eryptosis by anti-A IgG antibodies. Cell Physiol Biochem 20: 591-600.
- Baird K 1995. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. Parasitol Today 11:105-111.

- Basque J, Martel M, Leduc R, Cantin AM 2008. Lysosomotropic drugs inhibit maturation of transforming growth factor-beta. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 606-612.
- Basu S, Banerjee D, Chandra S, Chakrabarti A 2008. Loss of phospholipid membrane asymmetry and sialylated glycoconjugates from erythrocyte surface in haemoglobin E b-thalassaemia. *Br J Haematol* 141: 92–99.
- Bellows CF, Molina RM, Brain JD 2011. Diminished organelle motion in murine Kupffer cells during the erythrocytic stage of malaria. *J R Soc Interface* 8: 711-719.
- Biemba G, Gordeuk VR, Thuma P, Weiss G 2000. Markers of inflammation in children with severe malaria anaemia. *Trop Med Int Health* 5: 256-262.
- Biemba G, Gordeuk VR, Thuma PE, Mabeza GF, Weiss G 1998. Prolonged macrophage activation and persistent anaemia in children with complicated malaria. *Trop Med Intern Health* 3: 60-65.
- Biswas D, Banerjee M, Sen G, Das JK, Banerjee A, Sau TJ, Pandit S, Giri AK, Biswas T 2008. Mechanism of erythrocyte death in human population exposed to arsenic through drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol* 230: 57-66.
- Bobbala D, Alesutan I, Föller M, Tschan S, Huber SM, Lang F 2010. Protective effect of amiodarone in malaria. *Acta Trop* 116: 39-44.
- Boele van Hensbroek M, Calis JCJ, Phiri KS, Vet R, Munthali F, Kraaijenhagen R, van den Berg H, Faragher B, Bates I, Molyneux ME 2010. Pathophysiological mechanisms of severe anaemia in Malawian children. *PLoS One* 5: e12589.

- Bolchoz LJ, Budinsky RA, McMillan DC, Jollow DJ 2001. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 509-515.
- Bonomini M, Sirolli V, Gizzi F, Di Stante S, Grilli A, Felaco M 2002. Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure. *Kidney Int* 62: 1358-1363.
- Bowman ZS, Jollow DJ, McMillan DC 2005. Primaquine-induced hemolytic anemia: role of splenic macrophages in the fate of 5-hydroxyprimaquine-treated rat erythrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 980-986
- Bowman ZS, Oatis JE Jr, Whelan JL, Jollow DJ, McMillan DC 2004. Primaquine-induced hemolytic anemia: susceptibility of normal versus glutathione-depleted rat erythrocytes to 5-hydroxyprimaquine. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 79-85.
- Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Startiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC 2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 8: 1147-1156.
- Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J 1998. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80: 173-195.

- Bratting NW, Kowalsky K, Liu X, Burchard GD, Kamena F, Seeberger PH 2008. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol toxin interacts with the membrane of non-parasitized red blood cells: a putative mechanism contributing to malaria anemia. *Microbes Infect* 10: 885-891.
- Brown SB, Bailey K, Savill J 1997. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J* 323: 233–237.
- Bruce-Chwatt LJ 1985. Clinical course of malaria. In: *Essential Malariology*, 452p il. Second Edition, Willian Heinemann Medical Books Ltd, p51-72.
- Camacho LH, Gordeuk VR, Wilairatana P, Pootrakul P, Brittenham GM, Looareesuwan S 1998. The course of anaemia after the treatment of acute, *falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 525-537.
- Carvalho LJM; Alves FA; Oliveira SG, Valle RR, Fernandes AAM, Muniz JAPC, Daniel-Ribeiro CT 2003. Severe anemia affects both splenectomized and non- splenectomized *Plasmodium falciparum*-infected *Aotus infulatus* monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 679-686.
- Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JO, Williams S, Lowe B, Nyanoti M, Williams TN, Maitland K, Molyneux M, Newton CR, Peshu N, Watt SM, Roberts DJ 2006. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 108: 2569-2577.
- Casals-Pascual C, Roberts DJ 2006. Severe malarial anaemia. *Curr Mol Med* 6:155-168.
- Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G 1996: Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157: 512-521.

- Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU 2000. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop 33: 489-492.
- Chang HY, Yang X 2000. Proteases for cell suicide: function and regulation of caspases. Microbiol. Mol Biol Rev 64: 821-846.
- Chang KH, Stevenson MM 2004. Malarial anaemia: mechanism and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. Intern. J Parasitol 34: 1501-1516.
- Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P 1999. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. Curr Biol 9: 967-970.
- Chowdhury KD, Sen G, Biswas T 2010. Regulatory role of nitric oxide in the reduced survival of erythrocytes in visceral leishmaniasis. Biochim Biophys Acta 1800: 964-976.
- Clark IA, Chaudhri G 1988. Tumor necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. Br J Haematol 70: 99-103.
- Clark IA, Cowden WB 2003. The pathophysiology of falciparum malaria. Pharmacol Ther 99: 221-260.
- Clark RL, Arima A, Makori N, Nakata Y, Bernard F, Gristwood W, Harrell A, White TE, Wier PJ 2008. Artesunate: developmental toxicity and toxicokinetics in monkeys. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 83: 418-434.

- Clark RL 2012. Effects of artemisinin on reticulocyte count and relationship to possible embryotoxicity in confirmed and unconfirmed malarial patients. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94: 61-75.
- Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 46: 165-171.
- Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, Wong KT, Adem P, Zaki SR, Singh B, Krishna S 2010. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J* 9: 10.
- Daneshvar C, Davis TME, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PCS, Singh B 2009. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clin Infect Dis* 49: 852-860.
- Daniel-Ribeiro CT, Zanini G 2000. Autoimmunity and malaria: what are they doing together? *Acta Trop* 76: 205 -221.
- Daniels G 2007. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang* 93: 331-340.
- del Pilar Crespo M, Avery TD, Hanssen E, Fox E, Robinson TV, Valente P, Taylor DK, Tilley L 2008. Artemisinin and a series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 98-109.
- Déas O, Dumont C, MacFarlane M, Rouleau M, Hebib C, Harper F, Hirsch F, Charpentier B, Cohen GM, Senik A 1998. Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 161: 3375-3383.

- Dockrell DH 2001. Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *J Infect* 42: 227-234.
- Dondorp AM, Angus BJ, Chotivanich K, Silamut K, Ruangveerayuth R, Hardeman MR, Kager PA, Vreeken J, White NJ 1999. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 60:733-737.
- Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ 2000. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today* 16: 228-232.
- Dondorp AM, Lee SJ, Faiz M A, Mishra S, Price R, Tjitra E, Than M, Htut Y, Mohanty S, Yunus EB, Rahman R, Nosten F, Anstey NM, Day NPJ, White NJ 2008. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. *Clin Infect Dis* 47: 151-157.
- Druilhe P, Pérignon JL 1999. Malaria from Africa blows hot and cold. *Nature Med* 5: 272-273.
- Duke RC, Ojcius DM, Young JDE 1996. Cell suicide in health and disease. *Scientific American* 275: 48-55.
- Eda S, Sherman IW 2002. Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol. Biochem* 12: 373-384.
- Efferth T, Kaina B 2010. Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *Crit Rev Toxicol* 40: 405-421.

- Ekvall H, Arese P, Turrini F, Ayi K, Mannu F, Premji Z, Bjorkman A 2001. Acute haemolysis in childhood falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 611-617.
- Evans KJ, Hansen DS, van Rooijen N, Buckingham LA, Schofield L 2006. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* 107: 1192-1199.
- Fadeel B, Orrenius S 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258: 479-517.
- Fadok VA, Henson PM 2003. Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist – with a twist. *Curr Biol* 13: R655-R657.
- Fanello CI, Karema C, Avellino P, Bancone G, Uwimana A, Lee SJ, d'Alessandro U, Modiano D 2008. High risk of severe anaemia after chlorproguanil-dapsone+artesunate antimalarial treatment in patients with G6PD (A-) deficiency. *PLoS One* 3: e4031.
- Fitch CD 2004. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci* 74: 1957-1972.
- Flateau C, Loup GL, Pialoux G 2011. Consequences of HIV infection on malaria and therapeutic implications: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 11: 541-556.
- Föller M, Shumilina E, Lam R, Mohamed W, Kasinathan R, Huber S, Chakraborty T, Lang F 2007. Induction of suicidal erythrocyte death by listeriolysin from *Listeria monocytogenes*. *Cell Physiol Biochem* 20:1051-1060.

- Föller M, Bobbala D, Koka S, Huber SM, Gulbins E, Lang F 2009. Suicide for survival – death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cell Physiol Biochem* 24: 133-140.
- Franke-Fayard B, Janse CJ, Cunha-Rodrigues M, Ramesar J, Büscher P, Que I, Löwik C, Voshol PJ, den Boer MAM, van Duinen SG, Febbraio M, Mota MM, Waters AP 2005. Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11468-11473.
- Fumarola C, Guidotti GG 2004. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 9: 77-82.
- Garcia LS 2010. Malaria. *Clin Lab Med* 30: 93-129.
- Geng Y, Kohli L, Klocke BJ, Roth KA 2010. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro Oncol* 12:473-481.
- Ginsburg H 1990. Antimalarial drugs: is the lysosomotropic hypothesis still valid? *Parasitol Today* 6: 334-337.
- Goka BQ, Kwarko H, Kurtzhals JAL, Gyan B, Ofori-Adjei E, Ohene SA, Hviid L, Akanmori BD, Neequaye J 2001. Complement binding to erythrocytes is associated with macrophage activation and reduced haemoglobin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 545-549.
- Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE 2006. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol* 36: 1427–1441.

- Green HK, Sousa-Figueiredo JC, Basáñez MG, Betson M, Kabatereine NB, Fenwick A, Stothard JR 2011. Anaemia in Ugandan preschool-aged children: the relative contribution of intestinal parasites and malaria. *Parasitol* 138: 1534-1545.
- Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL 2006. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* 203: 2613-2625.
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJM, Targett GAT 2005. Malaria. *Lancet* 365: 1487-1498.
- Griffiths MJ, Ndungu F, Baird KL, Muller DPR, Marsh K, Newton CRJC 2001. Oxidative stress and erythrocyte damage in Kenyan children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol* 113: 486-491.
- Gu HM, Warhurst DC, Peters W 1986. Hemolysis induced by artemisinin and its derivatives *in vitro*. *Acta Pharmacol* 7: 269-272.
- Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C 1999. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nature Med* 5: 340-343.
- Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K 2011. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev* 240: 297-316.
- Handayani S, Chiu DT, Tjitra E, Kuo JS, Lampah D, Kenangalem E, Renia L, Snounou G, Price RN, Anstey NM, Russell B 2009. High deformability of *Plasmodium vivax*-infected red blood cells under microfluidic conditions. *J Infect Dis* 199: 445-450.

- Head DJ, Lee ZE, Poole P, Avent ND 2005a. Expression of phosphatidylserine (PS) on wild-type and Gerbich variant erythrocytes following glycophorin-C (GPC) ligation. *Br J Haematol* 129: 130-137.
- Head DJ, Lee ZE, Swallah MM, Avent NL 2005b. Ligation of CD47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a concomitant loss of viability in vitro. *Br J Haematol* 130: 788-790.
- Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Yamazaki A, Kikuchi M, Yasunami M, Hirayama K 2009. Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. *Malar J* 8: 91.
- Jakeman GN, Saul A, Hogarth WL, Collins WE 1999. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitol* 119: 127-133.
- Layez C, Nogueira P, Combes V, Costa FT, Juhan-Vague I, da Silva LH, Gysin J 2005. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* 106: 3632-3638.
- Kantele A, Marti H, Felger I, Müller D, Jokiranta TS 2008. Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia. *Emerg Infect Dis* 14: 1434-1436.
- Kapoor G, Bagai U, Banyal HS 2011. *Plasmodium berghei* induces apoptotic changes in splenic and peripheral blood cells. *Trop Biomed* 28: 119-124.
- Kasinathan RS, Greenberg RM 2010. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens trigger erythrocyte cell death. *Cell Physiol Biochem* 26: 767-774.

- Keller CC, Kremsner PG, Hittner JB, Misukonis MA, Weinberg JB, Perkins DJ 2004. Elevated nitric oxide production in children with malaria anemia: hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcription and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infect Immun* 72: 4868-4873.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Koka S, Lang C, Boini KM, Bobbala D, Huber SM, Lang F 2008. Influence of chlorpromazine on eryptosis, parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice. *Cell Physiol Biochem* 22: 261-268.
- Koka S, Lang C, Niemoeller OM, Boini KM, Nicolay JP, Huber SM, Lang F 2008. Influence of NO synthase inhibitor L-NAME on parasitemia and survival of *Plasmodium berghei* infected mice. *Cell Physiol Biochem* 21: 481-488.
- Koka S, Huber SM, Boini KM, Lang C, Föllner M, Lang F 2007. Lead decreases parasitemia and enhances survival of *Plasmodium berghei*-infected mice. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 484-489.
- Koshkaryev A, Barshtein G, Yedgar S 2010. Vitamin E induces phosphatidylserine externalization and red cell adhesion to endothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 56: 109-114.
- Krotoski WA 1989. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol* 1: 1-19.
- La Raja M 2002. Erythrophagocytosis by peripheral monocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Haematologica* 87: EIM14

- Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J 2006. Insight into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* 8: 1-22.
- Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ 2007. Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110: 18-28.
- Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Foller M 2008. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 22: 373-380.
- Lang F, Lang PA, Lang KS, Brand V, Tanneur V, Duranton C, Wieder T, Huber SM 2004. Channel-induced apoptosis of infected host cells – the case of malaria. *Pflugers Arch* 448: 319-324.
- Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F 2005. Mechanisms of suicidal erythrocytes death. *Cell Physiol. Biochem.* 15: 195-202.
- Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber SM, Wieder T 2002. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 12: 365-372.
- Lang PA, Huober J, Bachmann C, Kempe DS, Sobiesiak M, Akel A, Niemoeller OM, Dreischer P, Eilese K, Klarl BA, Gulbins E, Lang F, Wieder T 2006. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem* 18: 151-164.
- Lang PA, Kasinathan RS, Brand VB, Duranton C, Lang C, Koka S, Shumilina E, Kempe DS, Tanneur V, Akel A, Lang KS, Foller M, Kun JF, Kremsner PG, Wesselborg S, Laufer S, Clemen CS, Herr C, Noegel AA, Wieder T, Gulbins E, Lang F, Huber SM 2009. Accelerated clearance of

- Plasmodium*-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cell Physiol Biochem* 24: 415-428.
- Layez C, Nogueira P, Combes V, Costa FT, Juhan-Vague I, da Silva LH, Gysin J 2005. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* 106: 3632-3638.
- Leytin V, Freedman J 2003. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus Apheresis Sci* 28: 285-295.
- Li J, Zhou B 2010. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. *Molecules* 15: 1378-1397.
- Li LN, Zhang HD, Yuan SJ, Tian ZY, Wang L, Sun ZX 2007. Artesunate attenuates the growth of human colorectal carcinoma and inhibits hyperactive Wnt/beta-catenin pathway. *Int. J. Cancer* 121: 1360-1365.
- Looareesuwan S, Davis TME, Pukrittayakamee S, Supanaranond W, Desakorn V, Silamut K, Krishna S, Boonamrung S, White NJ 1991. Erythrocyte survival in severe *falciparum* malaria. *Acta Tropica* 48: 263-270.
- López C, Saravia C, Gomez A, Hoebeke J, Patarroyo MA 2010. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene* 467: 1-12.
- Lüder CG, Gross U, Lopes MF 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* 17: 480-486.
- Magalhães RJS, Clements ACA 2011. Mapping the risk of anaemia in preschool-age children: the contribution of malnutrition, malaria, and helminth infections in West Africa. *PLoS Med* 8: e1000438.

- Maguire JD, Baird JK 2010. The 'non-falciparum' malarias: the roles of epidemiology, parasite biology, clinical syndromes, complications and diagnostic rigour in guiding therapeutic strategies. *Ann Trop Med Parasitol* 104: 283-301.
- Maguire PA, Prudhomme J, Sherman IW 1991. Alterations in erythrocyte membrane phospholipid organization due to the intracellular growth of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitol* 102: 179-186.
- Manodori AB, Barabino GA, Lubin BH, Kuypers FA 2000. Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. *Blood* 95: 1293-1300.
- Marsh K, Kinyanjui S 2006. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 28: 51-60.
- Mascarello M, Allegranzi B, Angheben A, Anselmi M, Concia E, Laganà S, Manzoli L, Marocco S, Monteiro G, Bisoffi Z 2008. Imported malaria in adults and children: epidemiological and clinical characteristics of 380 consecutive cases observed in Verona, Italy. *J Travel Med* 15: 229-236.
- Matarrese P, Straface E, Pietraforte D, Gambardella L, Vona R, Maccaglia A, Minetti M, Malorni W 2005. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J* 19: 416-418.
- Menendez C, Fleming AF, Alonso PL 2000. Malaria-related anaemia. *Parasitol Today* 16: 469-476.
- Mercer AE, Copple IM, Maggs JL, O'Neill PM, Park BK 2011. The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of

- mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials. *J Biol Chem* 286: 987-996.
- Merry AH, Looareesuwan S, Phillips RE, Chanthavanich P, Supanaranond W, Warrell DA, Weatherall DJ 1986. Evidence against immune haemolysis in falciparum malaria in Thailand. *Br J Haematol* 64: 187-194.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673-679.
- Mohamed MM 2005. Anti-malarial chloroquine stimulate p53-apoptotic pathway in rat hepatocytes. *J Egypt Soc Parasitol* 35: 19-32.
- Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* 9: 555-566.
- Muoneke VU, Ibekwe RC, Nebe-Agumadu HU, Ibe BC 2011. Factors associated with mortality in under-five children with severe anemia in Ebonyi, Nigeria. *Indian Pediatr e-pub*: pii: S09747559INPE1000039.
- Mutis MCS, Martinez-Espinosa FE, Albuquerque BC, Coura JR 2005. Malária. In: *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 2v il. Primeira Edição, Guanabara Koogan, p833-858.
- Myssina S, Huber SM, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, Risler T, Wieder T, Lang F 2003. Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 14: 2750-2757.
- Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I 2010. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. *Am J Med Sci* 340: 492-498.

- Neote K, Mak JY, Kolakowski LF, Schall TJ 1994. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 84: 44-52.
- Nicolay JP, Liebig G, Niemoeller OM, Koka S, Ghashghaeinia M, Wieder T, Haendeler J, Busse R, Lang F 2008. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. *Pflugers Arch* 456: 293-305.
- Nilkaeo A, Bhuvanath S, Praputbut S, Wisessombat S 2006. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in JAR trophoblast by antimalarial drugs. *Biomed Res* 27: 131-137.
- Noor AM 2011. The first model-based geostatistical map of anaemia. *PLoS Med* 8: e1001039.
- Obonyo CO, Taylor W, Ekvall H, Kaneko A, Ter Kuile F, Olliaro P, Bjorkman A, Oloo AJ 2007. Effect of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine on haematological recovery and anaemia, in Kenyan children with uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 101: 281-295.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9: 115.
- O'Neill MP, Barton VE, Ward SA 2010. The molecular mechanism of action of artemisinin – the debate continues. *Molecules* 15: 1705-1721.
- Parakh A, Agarwal N, Aggarwal A, Aneja A 2009. *Plasmodium vivax* malaria in children: uncommon manifestations. *Ann Trop Paediatr* 29: 253-256.
- Park BC, Park SH, Paek SH, Park SY, Kwak MK, Choi HG, Yong CS, Yoo BK, Kim JA 2008. Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death

is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. *Toxicol Lett* 178: 52-60.

Pantaleo A, Giribaldi G, Mannu F, Arese P, Turrini F 2008. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun Rev* 7: 457-62.

Pattanapanyasat K, Sratongno P, Chamma P, Chitjamnongchai S, Polsrila K, Chotivanich K 2010. Febrile temperature but not proinflammatory cytokines promotes phosphatidylserine expression on *Plasmodium falciparum* malaria-infected red blood cells during parasite maturation. *Cytometry A* 77: 515-523.

Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG 2000. Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis* 182: 988-992.

Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, Lee SH, Karbwang J, Warrell MJ, White NJ, Swasdichai C, Weatherall DJ 1986. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated *falciparum* malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *QJM Monthly J Assoc Phys* 58: 305-323.

Cao XT, Bethell DB, Pham TP, Ta TT, Tran TN, Nguyen TT, Pham TT, Nguyen TT, Day NP, White NJ 1997. Comparison of artemisinin suppositories, intramuscular artesunate and intravenous quinine for the treatment of severe childhood malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 335-342.

- Piguet PF, Kan CD, Vesin C 2002. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis* 7: 91-98.
- Pilar Crespo M, Avery TD, Hanssen E, Fox E, Robinson TV, Valente P, Taylor DK, Tilley L 2008. Artemisinin and a series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 98-109.
- Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Hasanuddin A, Warikar N, Sugiarto P, Tjitra E, Anstey NM, Price RN 2009. *Vivax* malaria: a major cause of morbidity in early infancy. *Clin Infect Dis* 48: 1704-1712.
- Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, ter Kuile F, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ 2001. Factors contributing to anemia after uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 65: 614-22.
- Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, Lacerda MVG, Valencia SH 2011. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(suppl. I): 91-104.
- Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Bruce J, Carneiro I, Olomi R, Cox J, Nkya WMMM, Lemnge M, Lemnge BM, Riley EM 2005. Association of transmission intensity and age with clinical manifestations and case fatality of severe *Plasmodium falciparum* malaria. *JAMA* 293: 1461-1470.
- Riccio EKP, Júnior IN, Pratt-Riccio LR, Alecrim MG, Corte-Real S, Morgado M, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF 2003. Malaria associated

apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitol Res* 90: 9-18.

Rich SM, Ayala FJ 2003. Progress in malaria research: the case for phylogenetics. *Adv Parasitol* 54: 255-275.

Roepe PD 2009. The molecular and physiologic basis of quinoline drug resistance in *P. falciparum* malaria. *Future Microbiol* 4: 441-455.

Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R 2010. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? *Braz J Infect Dis* 14: 299-309.

Schantz-Dunn J, Nour NM 2009. Malaria and pregnancy: a global health perspective. *Rev Obstet Gynecol* 2: 186-192.

Schulze-Osthoff K, Walczak H, Drodge W, Krammer PH 1994. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 127: 15-20.

Schwartz E, Sadetzki S, Murad H, Raveh D 2001. Age as a risk factor for severe *Plasmodium falciparum* malaria in nonimmune patients. *Clin Infect Dis* 33: 1774–1777.

Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, Giribaldi G, Ginsburg H, Arese P 1992. Impairment of macrophage function after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* 176: 1033-1041.

Schofield L, Grau GE 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nature Rev* 5: 722-735.

Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM 2004. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon

endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop* 90: 61-64.

Scott MD, Meshnick SR, Williams RA, Chiu DT, Pan HC, Lubin BH, Kuypers FA 1989. Qinghaosu-mediated oxidation in normal and abnormal erythrocytes. *J Lab Clin Med* 114: 401-406.

Secretaria de Vigilância em Saúde 2011a. Situação da malária na Amazônia com ênfase nos municípios do estado do Pará. Nota técnica nº 26 CGPNCM/DEVEP/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/26_situacao_malaria_amazonia_enfase_municipios.pdf. Acessado em 20 de novembro de 2011.

Secretaria de Vigilância em Saúde 2011b. Resumo Epidemiológico por local de notificação - Nacional, Ano 2011. Disponível em: http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/TAB99449:tab_resumo_n?Ano_n=2010. Acessado em 20 de novembro de 2011.

Seringe E, Thellier M, Fontanet A, Legros F, Bouchaud O, Ancelle T, Kendjo E, Houze S, Bras JL, Danis M, Durand R 2011. Severe imported *Plasmodium falciparum* malaria, France, 1996–2003. *Emerg Infect Dis* 17: 807-813.

Setty BNY, Kulkarni S, Stuart MJ 2002. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell–endothelial adhesion. *Blood* 99: 1564-1571

Sharma A, Khanduri U 2009. How benign is benign tertian malaria? *J Vector Borne Dis* 46: 141-144.

Shekalaghe SA, ter Braak R, Daou M, Kavishe R, van den Bijllaardt W, van den Bosch S, Koenderink JB, Luty AJ, Whitty CJ, Drakeley C, Sauerwein RW,

- Bousema T 2010. In Tanzania, hemolysis after a single dose of primaquine coadministered with an artemisinin is not restricted to glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (G6PD A-) individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1762-1768.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 363: 1017-1024.
- Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos J, Intaglietta M, van der Heyde HC 2005. Nitric oxide bioavailability in malaria. *Trends Parasitol* 21: 415-422.
- Sowunmi A, Okuboyejo TM, Gbotosho GO, Happi CT 2011. Risk factors for *Plasmodium falciparum* hyperparasitaemia in malarious children. *BMC Infect Dis* 11: 268.
- Srivastava S, Ahmad S, Shirazi N, Verma SK, Puri P. 2011. Retrospective analysis of vivax malaria patients presenting to tertiary referral centre of Uttarakhand. *Acta Trop* 117: 82-85.
- Stocks PA, Bray PG, Barton VE, Al-Helal M, Jones M, Araujo NC, Gibbons P, Ward SA, Hughes RH, Biagini GA, Davies J, Amewu R, Mercer AE, Ellis G, O'Neill PM 2007. Evidence for a common non-heme chelatable-iron-dependent activation mechanism for semisynthetic and synthetic endoperoxide antimalarial drugs. *Angew Chem Int Ed* 119: 6394–6399.
- Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG 2011. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 364-347.
- Stoute JA 2005. Complement-regulatory proteins in severe malaria: too little or too much of good thing? *Trends Parasitol* 21: 218-223.

- Tanwar GS, Khatri PC, Sengar GS, Kochar A, Kochar SK, Middha S, Tanwar G, Khatri N, Pakalapati D, Garg S, Das A, Kochar DK 2011. Clinical profiles of 13 children with *Plasmodium vivax* cerebral malaria. Ann Trop Paediatr 31: 351-356.
- Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN 2008. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. PLoS Med 5: e128.
- Totino PRR, Daniel-Ribeiro CT, Corte-Real S, Ferreira-da-Cruz MF 2008. *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. Exp Parasitol 118: 478-486.
- Tripathy R, Parida S, Das L, Mishra DP, Tripathy D, Das MC, Chen H, Maguire JH, Panigrahi P 2007. Clinical manifestations and predictors of severe malaria in Indian children. Pediatrics 120: e454.
- Turrini F, Ginsburg H, Bussolino F, Pescarmona GP, Serra MV, Arese P 1992. Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. Blood 80: 801-808.
- Van Rooijen N, Bakker J, Sanders A 1997. Transient suppression of macrophage functions by liposome-encapsulated drug. Trends Biotechnol 15: 178-185.
- Vaughan AM, Aly AS, Kappe SH 2008. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. Cell Host Microbe 4: 209-218.

- Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA 2000. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia. *Blood* 95: 1481-1486.
- Wang J, Huang L, Li J, Fan Q, Long Y, Li Y, Zhou B 2010. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. *PLoS One* 5: e9582.
- Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB, Morrow JS 1998. Simultaneous degradation of all- and bII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 273: 22490-22497.
- Wang ZB, Liu YQ, Cui YF 2005. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Intern* 29: 489-496.
- Wautier MP, Héron E, Picot J, Colin Y, Hermine O, Wautier JL 2011. Red blood cell phosphatidylserine exposure is responsible for increased erythrocyte adhesion to endothelium in central retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost* 9: 1049-1055.
- Williams GT 1994. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol* 2: 463-464.
- World Health Organization 2008. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. WHO global database on anaemia. Geneva: World Health Organization. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf. Acessado em 18 de novembro de 2011.
- World Health Organization 2010a. World Malaria Report 2010. Geneva: World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/malaria/world_

malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf. Acessado em 29 de outubro de 2011.

World Health Organization 2010b. Guidelines for the treatment of malaria, 2nd edition. Geneva. World Health Organization: Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf. Acessado em 29 de outubro de 2011.

World Health Organization 2011. Malaria. Fact sheet N°94, October 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>. Acessado em 29 de outubro de 2011.

Xie LH, Johnson TO, Weina PJ, Si Y, Haeberle A, Upadhyay R, Wong E, Li Q 2005. Risk assessment and therapeutic indices of artesunate and artelinate in *Plasmodium berghei*-infected and uninfected rats. *Int J Toxicol* 24: 251-264.

Zaidi AU, McDonough JS, Klocke BJ, Latham CB, Korsmeyer SJ, Flavell RA, Schmidt RE, Roth KA 2001. Chloroquine-induced neuronal cell death is p53 and Bcl-2 family-dependent but caspase-independent. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 937-945.

Zarchin S, Krugliak M, Ginsburg H 1986. Digestion of the host erythrocyte by malaria parasites is the primary target for quinoline-containing antimalarials. *Biochem Pharmacol* 35: 2435-2442.

Zuckerman A 1964. Autoimmunization and other types of indirect damage to host cells as factor in certain protozoan diseases. *Exp Parasitol* 15: 138-183.

8. Anexos

Apresentamos a seguir outros dois trabalhos publicados no decorrer da realização dessa tese.