

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ISABEL MATOS MEDEIROS DE MORAES

Estudo da ativação e apoptose plaquetária na infecção malárica por *Plasmodium vivax*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

RIO DE JANEIRO

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M827 Moraes, Isabel Matos Medeiros de

Estudo da ativação e apoptose plaquetária na infecção malárica por *Plasmodium vivax* / Isabel Matos Medeiros de Moraes. – Rio de Janeiro, 2016.

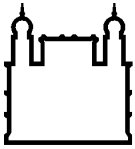
xviii, 128 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 96-122

1. Plaqueta. 2. Malária. 3. *Plasmodium vivax*. 4. Apoptose. 5. Plaquetopenia. Título.

CDD 616.9362



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: ISABEL MATOS MEDEIROS DE MORAES

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO E APOPTOSE PLAQUETÁRIA NA INFECÇÃO POR
*Plasmodium vivax***

ORIENTADOR: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto (IOC-FIOCRUZ)

Aprovada em:

EXAMINADORES:

Dra. Juliana de Meis (IOC-FIOCRUZ) – Presidente

Dr. Rodrigo Tinoco Figueiredo (UFRJ) - Membro

Dra. Elisa Cupolillo (IOC-FIOCRUZ) - Membro

Dr. Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro (IOC-FIOCRUZ)– Suplente

Dr. Fernando Augusto Bozza (INI-FIOCRUZ) – Suplente

Dr. Paulo Renato Rivas Totino (IOC-FIOCRUZ)- Revisor

Rio de Janeiro, 14 de junho de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, pela dedicação, apoio, paciência, incentivo e contribuições essenciais para o andamento deste trabalho. Obrigada pela confiança e contribuição no meu amadurecimento profissional.

À Dra. Patrícia Torres Bozza por me acolher no laboratório e por ter contribuído com ótimas idéias e discussões importantes para o meu crescimento científico.

À Dra. Adriana Vieira-de-Abreu por me acolher durante o meu período de doutorado sanduíche, pela excelente companhia, pelos ótimos conselhos e conversas e por toda ajuda experimental e intelectual. Você foi essencial para o desenvolvimento e andamento do projeto. Ao Alexandre Sales também pela hospitalidade e companhia em Salt Lake City.

Ao Dr. Guy A. Zimmerman por todas as discussões que tivemos e ajuda que recebi durante o meu doutorado e também por me receber em seu laboratório na Universidade de Utah.

Ao Dr. Andrew Weyrich por me receber em seu laboratório na Universidade de Utah e por toda ajuda que eu recebi durante o meu período de sanduíche.

A todos do Laboratório de Imunofarmacologia, pelas ajudas em diversas técnicas, união, parceria, discussões produtivas, apoio e, especialmente, por uma ótima convivência.

À Dra Juliana de Meis, ao Dr. Claudio Tadeu-Daniel Ribeiro e ao Dr. Rodrigo Tinoco Figueiredo por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Ao Dr. Paulo Renato Rivas Totino pela revisão da tese e aos Doutores Fernando Augusto Bozza e Elisa Cupolillo por aceitarem serem suplentes na minha defesa.

À toda equipe do laboratório do Dr. Guy Zimmerman e Dr. Andrew Weyrich, em especial ao Neal Tolley, Dr. Robert Campbell e Dr. Jesse Rowley por todo suporte oferecido.

À Dra Claudia Valéria por toda a ajuda no laboratório e também pela companhia durante minha estadia em Salt Lake.

Ao Msc. Edson, pelo carinho, amizade, companhia, ajuda nos experimentos e conselhos tão preciosos.

À Msc. Flora Magno e à Msc. Isaclaudia G. de Azevedo-Quintanilha por todo o apoio, conselhos, ajuda nos experimentos (e fora deles também), amizade e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao Msc André Costa Ferreira, ao Dr. Alan de Brito Carneiro, à Dra. Andrea Surrage e ao Dr. Eugenio D. Hottz pelo ótimo convívio, discussões, companhia e ajuda no dia-a-dia no laboratório.

À Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro, à Dra Adriana Vallochi, à Dra. Cecília Almeida, à Dra Adriana Ribeiro Silva, à Dra Tatiana Maron e ao Dr. Fernando A. Bozza pelas idéias, discussões, sugestões e ajuda durante todo o desenvolvimento da tese.

À Rose Branco, pela ótima companhia e por todo o apoio dado que permite ao laboratório estar sempre funcionando, sem faltar qualquer material necessário para o nosso trabalho.

À Dra. Patrícia Reis, à Dra Monica Farah e à Dra. Rachel Novaes por todo carinho e incentivo dado ao longo da dissertação.

À toda equipe da Gerência de Malária na FMT-HVD, em especial ao Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, à Msc. Anne Almeida, à Maria Raimunda da Costa, ao

Wellington Silva, Elisangela Silva e à Flavia Regina Lima por me receberem muito bem e por toda ajuda oferecida.

À Gerência de Virologia da FMT-HVD pela ajuda nos experimentos.

À Dra Stefanie Lopes e ao Dr. André Siqueira pelas discussões, ajuda no laboratório e ótima companhia.

A todo o pessoal do Biotério, à plataforma PDTIS, a equipe de limpeza e à secretaria do Pavilhão Ozório de Almeida.

As agências de fomento, CNPq, FAPERJ e CAPES por todo o suporte financeiro.

Aos pacientes e aos voluntários que participaram desse estudo, e que sem a sua participação nada teria sido feito.

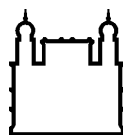
Aos meus familiares, ao Edson e aos meus amigos que me apoiaram, torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para o andamento deste trabalho.

Seja a mudança que você deseja ver no mundo (Mahatma Gandhi)

SUMÁRIO

Resumo.....	x
Abstract.....	xi
Lista de abreviaturas	xii
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Capítulo 1: INTRODUÇÃO	1
1) Malária	1
1.1 Epidemiologia	1
1.2 Agentes etiológicos, vetores e ciclo biológico.....	3
1.3 Toxinas maláricas e resposta inflamatória.....	8
1.4 Principais complicações da malária vivax.....	13
1.2) Plaquetas	14
1.2.1 Formação	14
1.2.2 Funções e estrutura	16
1.2.3 Plaquetas na inflamação e imunidade	20
1.2.4 Plaquetas na malária	22
1.2.5 Apoptose plaquetária	24
1.2.6 Plaquetas: Plaquetas: proteassoma e calpaínas.....	27
1.2.7 Racional.....	28
Capítulo 2: OBJETIVO	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
Capítulo 3: METODOLOGIA E DESENHO EXPERIMENTAL	30
3.1) Recrutamento de pacientes:	30
3.2) Detecção de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> :.....	30
3.3) Exames laboratoriais.....	33
3.4) Teste para detecção de dengue	33
3.5) Coleta do sangue e obtenção do plasma e plaquetas lavadas.....	34
3.6) Obtenção de plaquetas purificadas	35
3.7) <i>Western blotting</i>	36
3.8) Quantificação de citocinas e quimiocinas.....	37

3.9) Quantificação de hemopexina e haptoglobina no plasma.....	38
3.10) Detecção de agregados plaqueta-monócito.....	39
3.11) Citometria de fluxo.....	39
3.11.1) Análise da expressão de P-selectina.....	39
3.11.2) Análise da ativação de caspases.....	39
3.11.3) Análise da exposição de fosfatidilserina.....	40
3.12) Preparo do heme e da hemozoína	40
3.13) Experimentos <i>in vitro</i>	41
3.13.1) Estímulo de plaquetas com heme e hemozoína	41
3.13.2) Estímulo de plaquetas com heme e inibidores.....	42
3.13.3) Estímulo de plaquetas com plasmas	42
3.14) Sequenciamento e análise do transcriptoma de plaquetas.....	43
3.15) Análise estatística.....	43
Capítulo 4: RESULTADOS	44
4.1) Dados clínicos e laboratoriais.....	44
4.2) Estudo do transcriptoma de plaquetas de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> e voluntários sadios.....	45
4.3) Caracterização dos mediadores inflamatórios.....	51
4.4) Níveis de hemopexina e haptoglobina.....	56
4.5) Estudo da ativação e apoptose plaquetária nos pacientes com malária vivax..	58
4.6) Investigação da apoptose induzida por plasma de pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	65
4.7) Investigação da apoptose induzida por heme e pelo estímulo malárico hemozoína sintética em plaquetas de voluntários sadios.....	68
Capítulo 5: DISCUSSÃO	81
Capítulo 6: CONCLUSÕES	96
Capítulo 7: PERSPECTIVAS	96
Capítulo 8: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
Anexos	123



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DA ATIVAÇÃO E APOPTOSE PLAQUETÁRIA NA INFECÇÃO POR *Plasmodium vivax*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Isabel Matos Medeiros de Moraes

Introdução: O *Plasmodium vivax* é responsável por cerca de 85% das infecções por malária no Brasil. A malária vivax sempre foi considerada uma infecção benigna. No entanto, formas mais graves da doença, como anemia grave e plaquetopenia tem sido descritas. Além disso, as causas para a plaquetopenia ainda não foram totalmente esclarecidas. As plaquetas podem ativar e interagir com monócitos, principalmente pela ligação da P-selectina. O número de agregados plaqueta-monócito (PMA) é um marcador sensível para a detecção da ativação plaquetária. Plaquetas são células anucleadas que possuem uma via de apoptose funcional, e a proteína anti-apoptótica Bcl-xL, membro da família Bcl-2, é uma mediadora chave da sobrevivência de plaquetas. A apoptose de plaquetas e a sua ligação com leucócitos contribuem para a redução da contagem de plaquetas. Heme e hemozoína (Hz) são liberadas na circulação durante a infecção e contribuem para a patogênese da malária. Na presente tese, nós estudamos a ativação e apoptose plaquetária durante a infecção por *P. vivax* e investigamos a resposta de plaquetas ao heme e à Hz. **Material e métodos:** Sangue foi coletado de pacientes com malária vivax que se apresentaram à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-Manaus e também de controles. A formação de PMA, expressão de P-selectina, de caspases e de Bcl-xL foram analisadas. Plasma foi utilizado para a quantificação de mediadores inflamatórios. Plaquetas isoladas foram estudadas quanto ao seu transcriptoma. Plaquetas de voluntários sadios foram incubadas com plasma de pacientes com malária vivax e de controles sadios e analisadas para a ativação de caspase 9. Além disso, plaquetas de controles foram incubadas com heme e hemozoína sintética (sHz) e a ativação de caspases e a exposição de fosfatidilserina (PS) foram analisadas. Inibidores de calpaínas e proteassoma foram utilizados para se avaliar a

participação destes componentes na degradação de Bcl-xL. **Resultados:** Pacientes com malária vivax apresentaram uma baixa contagem de plaquetas quando comparados com sujeitos controles. No entanto, pacientes apresentaram um aumento do volume plaquetário médio-VPM quando comparados com controles. Pacientes infectados com *P. vivax* mostraram aumento no número de PMA e de P-selectina em relação aos controles. Pacientes com malária vivax apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de IL-6, IL-10, IL-1 β , IFN- γ , MCP-1, RANTES, PF4 e hemopexina quando comparados com controles. Pacientes com plaquetopenia grave possuíam níveis de haptoglobina menores quando comparados com controles ou com pacientes com contagem de plaqueta maior do que 50.000/ uL. A análise do transcriptoma revelou 215 genes que tinham aumento de expressão, de pelo menos 2x, e 189 genes que tinham diminuição de expressão, de pelo menos metade, em plaquetas de pacientes com malária vivax. Plaquetas incubadas com plasma de pacientes com malária vivax apresentaram aumento de ativação da caspase 9. Plaquetas de pacientes infectados com *P. vivax* apresentaram aumento da ativação das caspases 3 e 9, no entanto, a expressão de Bcl-xL foi a mesma entre pacientes e controles. Heme e sHz induziram a ativação das caspases 3 e 9 e também exposição de PS em plaquetas de controles. Heme induziu a degradação de Bcl-xL através da ativação de calpaínas e não do proteassoma. **Conclusão:** A ativação e apoptose plaquetária podem contribuir para a plaquetopenia observada na infecção por *P. vivax* e o heme e a hemozoína liberados durante a infecção são dois possíveis agentes causadores dessa baixa no número de plaquetas.

ABSTRACT

Introduction: *Plasmodium vivax* is responsible for about 85% of malaria infections in Brazil. Vivax malaria has always been considered a benign infection. However, severe forms of the disease, such as severe anemia and thrombocytopenia have been described. In addition, the causes for thrombocytopenia are not well elucidated. Platelets can activate and interact with monocytes, mainly through P-selectin binding. Numbers of platelet-monocyte aggregates (PMA) are a sensitive marker for the detection of platelet activation. Platelets are anucleated cells that possess a functional apoptosis pathway and the survival protein Bcl-xL, a member of the Bcl-2 family, is a key mediator of platelet survival. Platelet apoptosis and binding to leukocytes contribute for reduced circulating platelet count. Heme and hemozoin are malarial toxins that are released into the bloodstream during malaria infection. Here we studied platelet activation and apoptosis during *P. vivax* infection and investigated responses of platelets to heme and hemozoin. **Material and methods:** Blood was collected from vivax malaria patients presenting to the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado-Manaus and also from controls. PMA formation, P-selectin, caspases and Bcl-xL expression were analyzed. Plasma was used for the quantification of inflammatory mediators. Isolated platelets had their transcriptome analyzed. Platelets from healthy volunteers were incubated with plasma from vivax patients and controls subjects and analyzed for caspase 9 activation. Also, platelets from controls were incubated with heme and synthetic hemozoin (sHz) and caspase activation, and phosphatidylserine (PS) exposure were analyzed. Calpains and proteasome inhibitors were used to evaluate the role of those two components in Bcl-xL degradation. **Results:** Vivax malaria patients had a lower platelet count when compared to control subjects. However, patients had an increase in the mean platelet volume-MPV when compared to controls. *P. vivax*-infected patients had increased numbers of PMA and P-selectin when compared to controls. Vivax patients had increased levels of plasma IL-6, IL-10, IL-1 β , IFN- γ , MCP-1, RANTES, PF4 and hemopexin when compared to controls. Patients with severe thrombocytopenia had lower haptoglobin levels when compared to controls or to patients with platelet count higher than 50,000/ uL. The transcriptome analysis revealed 215 genes that had increased expression, of at least 2 fold, and 189 genes that had lower expression, of at least by half, in platelets from vivax patients. Platelets incubated with plasma from vivax patients had increased caspase 9 activation. Platelets from vivax patients showed increased activation of caspases 3 and 9, however, the expression of Bcl-xL was the same between patients and controls. Heme and sHz induced caspases 3 and 9 activation and PS exposure in platelets from controls. Heme induced degradation of Bcl-xL through the activation of calpains and not proteasome. **Conclusion:** Platelet activation and apoptosis may contribute to the thrombocytopenia observed during *P. vivax* infection and both heme and hemozoin are two possible players in this low platelet count.

Lista de abreviaturas

- ACD- Ácido citrato dextrose
- ADP- Adenosina difosfato
- AIF- do inglês, *apoptosis- inducing factor*
- APAF-1- do inglês, *apoptotic protease-activating factor-1*
- ATP- Adenosina trifosfato
- ARDS- do inglês, *acute respiratory distress syndrome* ou síndrome da angústia respiratória aguda
- ASC- do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing C-terminal caspase recruitment domain (CARD)*
- Bcl-2 – do inglês, *B-cell lymphoma 2*
- BH- do inglês, *Bcl-2 homology domain*
- BSA - do inglês, *bovine serum albumin* ou albumina de soro bovino
- CD40L- Ligante de CD40
- CGIAE- Coordenação geral de informações e análise epidemiológica
- cMpl- do inglês, *myeloproliferative leukemia protein*
- DIABLO- do inglês, *direct IAP-binding protein with low PI*
- DISC- do inglês, *death-inducing signaling complex*
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- DNA- do inglês, *deoxyribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico
- DR- do inglês *death receptor*
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ENA-78- do inglês, *epithelial neutrophil activating protein- 78*
- EPM - Erro padrão da média
- ERK- do inglês, *extracellular signal–regulated kinases*
- FADD- do inglês, *Fas-associated death domain*
- FasL- ligante de Fas
- FMT-HVD- Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
- GPI- Glicosilfosfatidilinositol
- GRO α (CXCL1)- do inglês, *growth-regulated oncogene α* ou *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*
- GTP- Guanosina trifosfato

HBVEC- do inglês, *human brain vascular endothelial cells*
HEPES- do inglês, *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid*
HIV- Vírus da imunodeficiência humana
HMGB1- do inglês, *high mobility group box 1*
HO- Heme oxigenase
5-HT- do inglês, *5 hydroxytryptamine*
HUVEC – do inglês, *human umbilical vein endothelial cells*
IAPs- proteínas inibidoras de apoptose
ICAM - do inglês, *intercellular adhesion molecule*
IFN - Interferon
Ig- Imunoglobulina
IL- Interleucina
iNOS - do inglês, *inducible nitric oxide sintase*
IP-10- do inglês, *IFN γ -inducible protein 10*
KC- do inglês, *keratinocyte chemoattractant*
MAPKs- do inglês, *mitogen-activated protein kinases*
MCP-1- do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*
MCP-3- do inglês, *monocyte chemotactic protein-3*
MIP-1 α - do inglês, *macrophage inflammatory protein 1 α*
MPTP- Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
mRNA- RNA mensageiro
NAP-2- do inglês, *neutrophil-activating peptide-2*
NET- do inglês, *neutrophil extracellular traps*
NF-kB – Fator nuclear kappa-B
NK- do inglês, *natural killer*
NALP- do inglês, *PYD domains containing protein*
NLRPs- do inglês, *NOD-like receptors containing pyrin domain*
PAF- Fator de ativação plaquetária
PAR-1- do inglês, *protease-activated receptor-1*
PCR- Reação em cadeia da polimerase
PECAM-1- do inglês, *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*
PDGF- do inglês, *platelet-derived growth factor* ou fator de crescimento derivado de plaquetas

PF4- Fator plaquetário 4
PfEMP-1- do inglês, *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* ou proteína de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum*
PGE₁- Prostaglandina E₁
PRP- Plasma rico em plaquetas
PSGL-1- do inglês, *P-selectin glycoprotein ligand 1* ou glicoproteína ligante 1 de P-selectina
RANTES- do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*
RNA- do inglês, *ribonucleic acid* ou ácido ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RPM- Rotações por minuto
sHz- Hemozoína sintética
SDS- Dodecil sulfato de sódio
SIV – do inglês, *simian immunodeficiency virus* ou vírus da imunodeficiência simia
SMAC- do inglês, *second mitochondria-derived activator of caspase*
SVS- Secretaria de vigilância em saúde
TBS- Solução salina tamponada por Tris
TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido
TF- Fator tissular
TG- Tromboglobulina
TGFβ- do inglês, *transforming growth factor β*
TLR – do inglês, *Toll like receptors*
TNF – Fator de necrose tumoral
TNF-R- Receptor de TNF
TPO- Trombopoietina
TRADD- do inglês, *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain*
TRAIL- do inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
TXA₂- Tromboxano A₂
VCAM- do inglês, *vascular cell adhesion molecule 1*
vWf- Fator de von Willebrand

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1	Número de óbitos por malária a cada 100.000 pessoas em 2013	1
Figura 1.1.2	Número de casos de malária registrados na Amazônia Brasileira entre 1960 e 2009 de acordo com as espécies de Plasmódio.....	2
Figura 1.1.3	Casos notificados de malária e participação percentual na Região Amazônica.....	3
Figura 1.2.1	Ciclo de vida do Plasmódio.....	7
Figura 4.2.1	Diagrama de Venn demonstrando o número de genes que sofreram ou não alterações na expressão em plaquetas de pacientes com malária vivax em relação aos de controles sadios.....	46
Figura 4.2.2	<i>Heat map</i> do transcriptoma plaquetário de voluntários sadios e pacientes com malária vivax.....	47
Figura 4.2.3	Análise da expressão de genes para a caspase 3, caspase 7, Fas e Bcl-2 de plaquetas isoladas de voluntários saudáveis e pacientes com malária vivax.....	49
Figura 4.2.4	Expressão de genes para P-selectina, caspase 4 e caspase 5 de plaquetas isoladas de voluntários saudáveis e pacientes com malária vivax.....	50
Figura 4.2.5	Expressão de genes para heme oxigenase-1 e biliverdina redutase de plaquetas isoladas de voluntários saudáveis e pacientes com malária vivax.....	51
Figura 4.3.1	Mediadores inflamatórios plasmáticos nos pacientes com malária vivax e nos voluntários sadios.....	53
Figura 4.3.2	Níveis de RANTES e PF4 plasmáticos nos pacientes com malária vivax e nos voluntários sadios.....	55
Figura 4.4.1	Níveis de hemopexina e haptoglobina plasmáticos nos pacientes com malária vivax e nos voluntários sadios.....	57

Figura 4.5.1	Expressão de P-selectina (CD62P) no sangue de pacientes com malária vivax e controles sadios.....	59
Figura 4.5.2	Formação de agregados plaqueta-monócito no sangue de pacientes com malária vivax e controles sadios.....	60
Figura 4.5.3:	Expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaquetas de doadores sadios e de pacientes com malária vivax.....	62
Figura 4.5.4	Efeito da infecção com <i>P. vivax</i> sobre a ativação de caspase 9 plaquetária.....	63
Figura 4.5.5	Efeito da infecção com <i>P. vivax</i> sobre a ativação das caspases 3 e 9 plaquetárias.....	64
Figura 4.6.1	Efeito do plasma de pacientes com malária vivax na ativação de caspase 9 em plaquetas de voluntários sadios.....	66
Figura 4.6.2	Efeito do plasma de pacientes com malária vivax na ativação de caspase 9 em plaquetas de voluntários sadios.....	67
Figura 4.7.1	Efeito das toxinas maláricas heme e hemozoína sintética (sHz) na expressão de caspase 9 ativada em plaquetas de doadores sadios.....	69
Figura 4.7.2	Efeito do heme e da toxina malárica hemozoína sintética (sHz) na expressão das caspases ativadas 3 e 7 em plaquetas de doadores sadios.....	70
Figura 4.7.3	Efeito do heme e da toxina malárica hemozoína sintética (sHz) na ativação de caspase 3.	72
Figura 4.7.4	Efeito do heme e da toxina malárica hemozoína sintética (sHz) na exposição de fosfatidilserina em plaquetas de doadores sadios.....	73
Figura 4.7.5:	Efeito do heme na degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaqueta de doadores sadios.....	75
Figura 4.7.6	Efeito de diferentes concentrações de heme na degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaquetas de doadores sadios.....	76
Figura 4.7.7:	Efeito do quelante de cálcio EGTA na degradação da proteína anti-	78

	apoptótica Bcl-xL induzida pelo heme, em plaquetas de doadores saudáveis.....	
Figura 4.7.8:	Efeito dos inibidores de proteassoma e de calpaína na degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL induzida pelo heme, em plaquetas de doadores saudáveis.....	80
Figura 5.1:	Mecanismos propostos de plaquetopenia na malária.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Mediadores inflamatórios, imunomodulatórios e peptídeos antimicrobianos liberados por plaquetas humanas e/ou translocadas para a membrana plasmática.....	4
Tabela 3.2.1	Reagentes utilizados para a detecção de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> por qPCR.....	31
Tabela 3.2.2	Condição de amplificação para as 3 reações de qPCR.....	32
Tabela 4.1.1	Características clínicas dos pacientes com malária causada por <i>Plasmodium vivax</i> e dos voluntários saudáveis.....	44

1) INTRODUÇÃO

1) Malária

1.1) Epidemiologia

A malária ainda é um dos principais desafios da saúde pública, sendo estimados em torno de 214 milhões de casos até o ano de 2015 em todo o mundo com cerca de 438.000 mortes (WHO, 2015). A maior parte dos casos de malária (88 %) ocorrem na região Africana, seguido pelo sudeste Asiático (10 %). O número de óbitos também é maior no continente Africano com cerca de 395.000 mortes em 2015, que representam 90% de todos os óbitos causados por malária no mundo (Figura 1.1.1).

De todos os casos de malária em 2015, somente 6% foi devido ao *P. vivax*, no entanto, fora do continente Africano, essa proporção aumenta para 51%. Em 2015 estima-se que o *P. vivax* tenha sido responsável por cerca de 13,8 milhões de casos de malária no mundo. A maior parte dos casos de malária vivax ocorre na região do Sudeste Asiático (74 %). Na região das Américas, o *P. vivax* foi responsável por 71 % dos casos de malária (WHO, 2015).

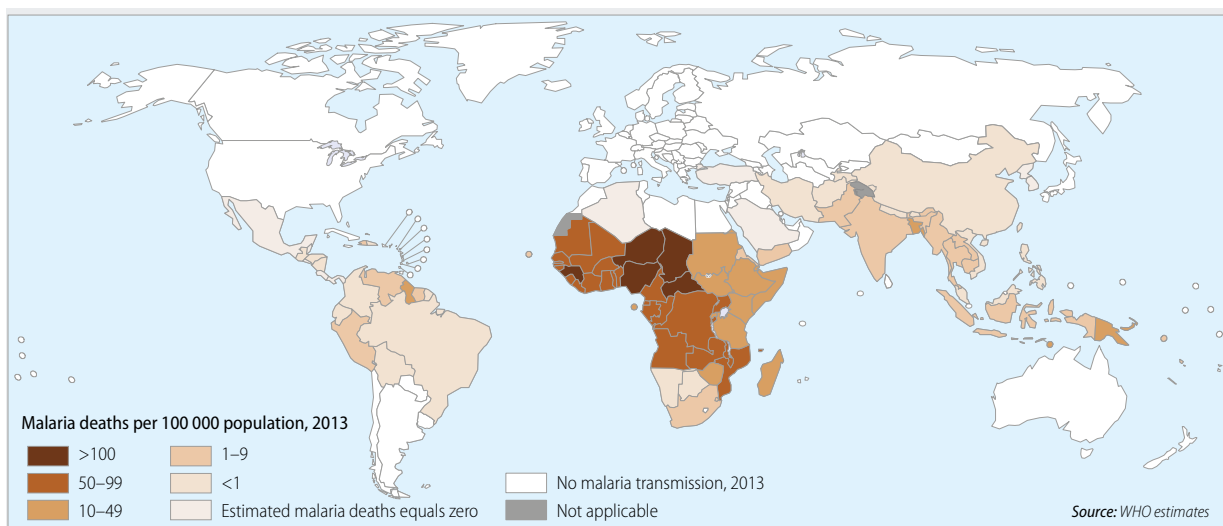


Figura 1.1.1: Número de óbitos por malária a cada 100.000 pessoas em 2013. Quanto mais escura a cor maior o número de mortes. (Fonte: WHO, 2014).

No Brasil, a maior parte dos casos de malária são causados pelo *P. vivax*, seguidos pelo *P. falciparum* (respectivamente 84% e 16% dos casos notificados em

2014) (Figura 1.1.2). A região Amazônica (estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) concentra 99 % dos casos no país. Em 2014, foram registrados 143.552 casos de malária na Região Amazônica, sendo 4.593 casos importados de países que fazem fronteira com o Brasil e 32 de outros países. O estado do Amazonas contribuiu com o maior número de casos (47%), afetando mais de 67.000 pessoas, seguido pelo Acre (22%) (Figura 1.1.3) (SVS-MS, 2015).

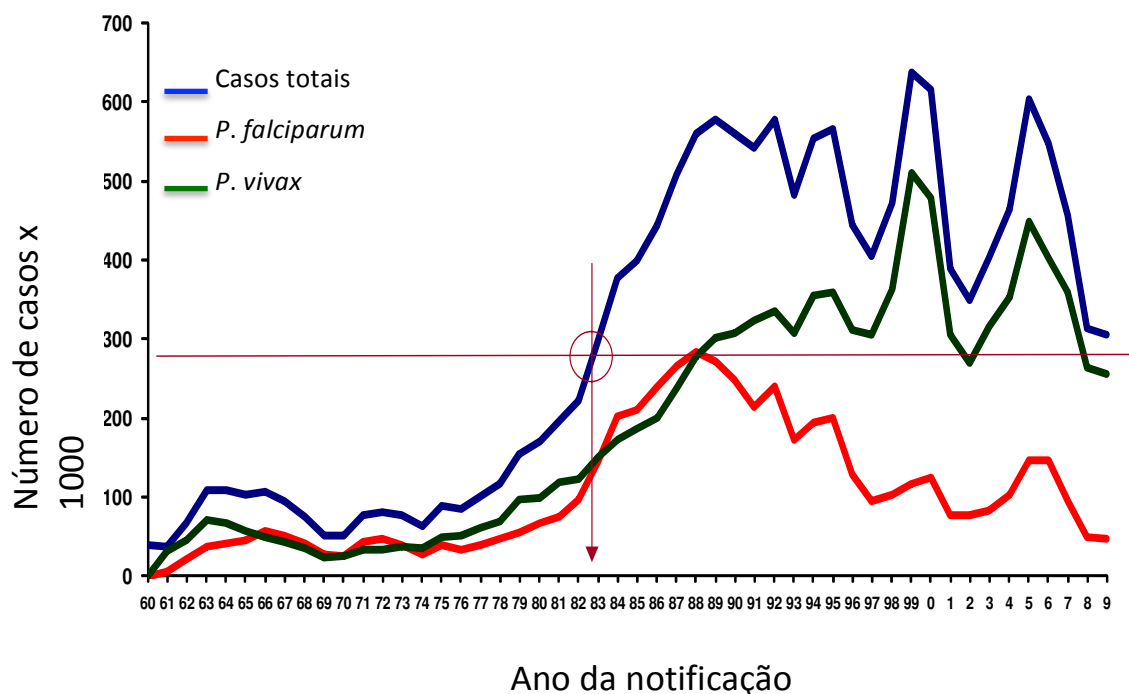
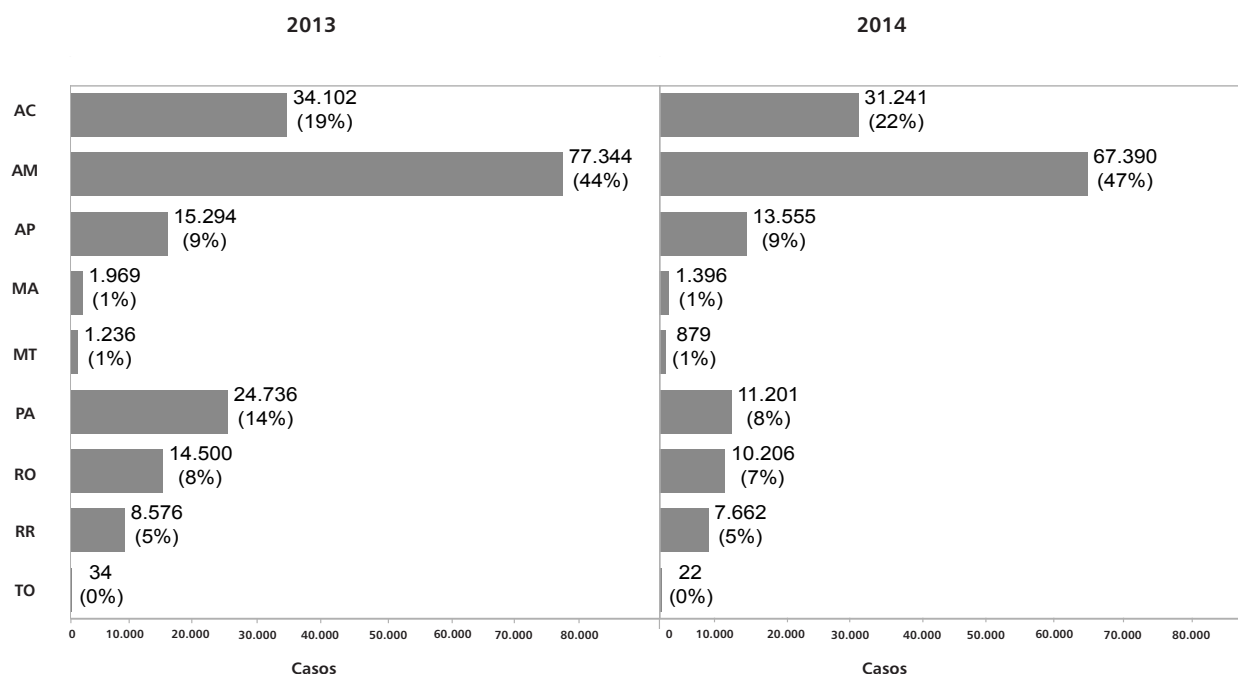


Figura 1.1.2: Número de casos de malária registrados na Amazônia Brasileira entre 1960 e 2009 de acordo com as espécies de Plasmodio. Fonte: Modificado de Oliveira-Ferreira et al, 2010.



Fonte: Sivep-Malária (atualizado em 05/08/2015). Dados sujeitos a alteração.

Figura 1.1.3: Casos notificados de malária e participação percentual por estado da Região Amazônica nos anos de 2013 e 2014. Fonte: SIVEP-Malária

Com relação as internações por malária, em 2014, foram registradas 1.650 internações na região Amazônica, sendo a maioria causada por *P. vivax* (65%), o que gera um grande custo econômico para a região. Neste mesmo ano, 23 pessoas morreram por malária na região, sendo 11 óbitos por malária vivax (SVS-MS, 2015).

1.2) Agentes etiológicos, vetores e ciclo biológico

A malária é transmitida por fêmeas do mosquito de gênero *Anopheles*, da família **Culicidae** e da ordem **Diptera**. Existem em torno de 430 espécies de *Anopheles*, no entanto, somente cerca de 40 transmitem a doença em condições naturais. O principal vetor no Brasil é o *A. darlingi*, mas outras espécies de vetores também podem ser encontradas, tais como *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. deaneorum*, *A. braziliensis*, *A. cruzii* e *A. nuneztovari*. Na África, os principais vetores são *A. gambiae* e *A. funestus*.

O *P. falciparum* é responsável pela febre terçã maligna, com acessos febris em intervalos de 36 a 48 horas. Foi descrito por Welch em 1897, é a espécie mais prevalente no mundo e no continente Africano, sendo responsável pela maior parte das mortes por malária.

O *P. vivax* é o agente da febre terçã benigna, com ciclos a cada 48 horas. Foi descrito por Grassi e Feletti em 1890. Possui uma distribuição geográfica mais ampla do que o *P. falciparum*, sendo responsável por quase metade dos casos de malária fora do continente Africano, principalmente na Ásia e América Latina. Na África, o risco de infecção pelo *P. vivax* é bem baixo, pois uma grande parte da população Africana não possui o antígeno Duffy em suas hemácias, proteína que é necessária para que o *P. vivax* invada os eritrócitos (Langui e Bordin, 2006; Rey, 2001).

O *P. ovale* possui distribuição limitada ao Continente Africano, foi descoberto em 1922 por John Stephens e é responsável por outra forma de febre terçã benigna, com ciclo de 48 horas (Rey, 2001; White, 2008).

O *P. malariae* é causador da febre quartã, que se caracteriza pela ocorrência de acessos febris a cada 72 horas. Foi descrito por Laveran em 1881. Sua distribuição é similar a do *P. falciparum*, estando presente no continente Africano, e grande parte do sudeste Asiático (Collins e Jeffery, 2007).

O *P. knowlesi*, descrito por Sinton e Mulligan em 1932, é uma espécie causadora de malária em macacos no sudeste Asiático, mas que recentemente foi descrita como capaz de infectar humanos (Singh *et al*, 2004; Singh e Daneshvar, 2013).

A malária é causada por parasitos do filo **Apicomplexa**, ordem **Coccidiida**, subordem **Haemosporidiidea**, família **Plasmodiidae** e gênero *Plasmodium*. Cinco espécies de *Plasmodium* são capazes de infectar o homem, são elas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (Rey, 2001, Singh *et al*, 2004).

- **Ciclo no hospedeiro vertebrado:**

O ciclo biológico do plasmódio ocorre em hospedeiros vertebrados e nos vetores anofelinos. No hospedeiro vertebrado (homem) podem ser distinguidas duas fases, o ciclo hepático ou pré-eritrocítico e o ciclo eritrocítico. O ciclo parasitário no hospedeiro vertebrado se inicia quando, ao picar uma pessoa, o mosquito infectado inocula na derme, juntamente com sua saliva, as formas infectantes do parasito que haviam se acumulado nas glândulas salivares do inseto, ou seja, os esporozoítas (cerca de 10 a 100). Estima-se que os esporozoítas possam levar até uma hora para penetrarem nos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. Em modelo murino de malária observou-se que cerca de 10% dos esporozoítas inoculados permanecem na derme 24 horas após a picada do mosquito. Esses esporozoítas podem se desenvolver na derme em merozoítas

infectantes e são liberados através de merossomos (estrutura vesicular), como ocorre tipicamente no fígado (Gueirard *et al*, 2010).

Os esporozoítas alcançam o fígado e invadem os hepatócitos, transformando-se em estruturas denominadas criptozoítas. Além de crescer, os criptozoítas iniciam uma fase de reprodução assexuada, conhecida como estágio pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica. Os esquizontes que se formam no fígado formam milhares de elementos filhos, os merozoítas (Figura 1.4). Os merozoítas são liberados na circulação sanguínea por meio de merossomos, que são estruturas formadas a partir da membrana plasmática do hepatócito e que podem conter milhares de merozoítas em seu interior (Sturm *et al*, 2006; Gueirard *et al*, 2010). A esquizogonia pré-eritrocítica dura 6 dias, no caso de *P. falciparum*, 8 dias no de *P. vivax*, 9 dias no de *P. ovale* e 12 a 16 dias na evolução de *P. malariae*. Muitos dos merozoítas liberados são fagocitados e destruídos pelas células de Kupffer, outros sobrevivem e invadem as hemácias dando origem ao segundo estágio de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo eritrocítico.

As recaídas observadas nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* ocorrem devido a esporozoítas que permanecem quiescentes no fígado por até meses após o primeiro ataque de malária. Nesse estado o parasito é chamado de hipnozoíta (do grego *hypnos*, sono) (Robinson *et al*, 2015; Rey, 2001).

O primeiro estágio da fase eritrocítica que ocorre dentro do eritrócito é o desenvolvimento do merozoíta em uma forma trofozoíta jovem ou anel. Em seguida, o parasito se transforma em trofozoíta maduro e depois em esquizonte. Cada esquizonte maduro dá origem à uma nova geração de merozoítas, em uma esquizogonia eritrocítica, que após a ruptura do eritrócito, são liberados na circulação para que possam invadir outros eritrócitos e continuar o ciclo eritrocítico (Figura 1.4). Nesta fase é que a parasitemia pode ser observada e as manifestações clínicas ocorrem. O ciclo hepático ocorre somente uma vez, já a fase eritrocítica pode ocorrer por vários ciclos. A liberação dos merozoítas na corrente sanguínea ao final de cada ciclo gera os acessos febris observados nos pacientes (Rey, 2001).

No sangue, o ciclo esquizogônico se repete em intervalos regulares e característicos de cada espécie de plasmódio: 36 a 48 horas para *P. falciparum*, 48 horas para *P. vivax* e *P. ovale*, 72 horas para *P. malariae* e 24 horas para *P. knowlesi*.

Alguns trofozoítas se desenvolvem ainda, em formas que não possuem mais a capacidade de divisão celular, os gametócitos, porém, ainda não se sabe o estímulo ou

mecanismo pelo qual essa diferenciação ocorre. Os gametócitos crescem no sangue dos capilares profundos e logo aparecem na circulação geral. Podem ser encontrados no sangue poucos dias depois de iniciado o ciclo eritrocítico e vivem cerca de 60 dias. Asseguram a continuidade da espécie quando são retirados da circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado pela fêmea do mosquito de gênero *Anopheles* que venha alimentar-se de sangue. Os gametócitos de *P. vivax* aparecem no sangue quase ao mesmo tempo que a parasitemia, enquanto que os de *P. falciparum* tardam ainda 12 a 15 dias e requerem mais 2 a 4 para se tornarem infectantes (Rey, 2001; Galinski *et al*, 2013) (Figura 1.2.1).

- **Ciclo no hospedeiro invertebrado**

As fêmeas dos anofelinos precisam alimentar-se de sangue para poder realizar o amadurecimento de seus ovos e para possibilitar a ovoposição. Após sugar o sangue de um indivíduo que contenha as formas sexuadas do parasito, incia-se a fase sexuada dentro de seu trato digestivo. Existem dois tipos de gametócitos: 1) gametócito feminino ou macrogametócito, que no estômago do mosquito passará a macrogameta ou gameta feminino e; 2) gametócito masculino ou microgametócito, que formará, também no estômago do mosquito, oito microgametas ou gametas masculinos. O processo de formação dos microgametas, chamado de exflagelação, é bastante rápido, durando cerca de 5 a 20 minutos. Os flagelos se mantêm bastante ativos de forma que os microgametas possam buscar um gameta feminino para fecundar e formar um zigoto diplóide. Em seguida, o zigoto começa a deslocar-se, razão pela qual é chamado de oocineto (do grego *oo*, ovo, e *kinetos*, móvel). O oocineto penetra a parede intestinal do inseto e se aloja entre o epitélio e a membrana basal, ou no próprio epitélio, e se transforma em oocisto. O oocineto se transforma em oocisto ao se envolver por uma grossa cápsula, através da qual passam facilmente os aminoácidos e outros nutrientes necessários à nutrição do parasito. Inicia-se então o processo de multiplicação esporogônica, mediante o qual se produz, no interior do oocisto, milhares de esporozoítas (5 a 10 mil esporozoítas). O oocisto maduro se rompe e libera os esporozoítas que invadem a hemolinfa do inseto e migram para as glândulas salivares onde podem ser injetados quando o mosquito se alimenta de um novo hospedeiro (Rey, 2001; Galinski *et al*, 2013) (Figura 1.2.1).

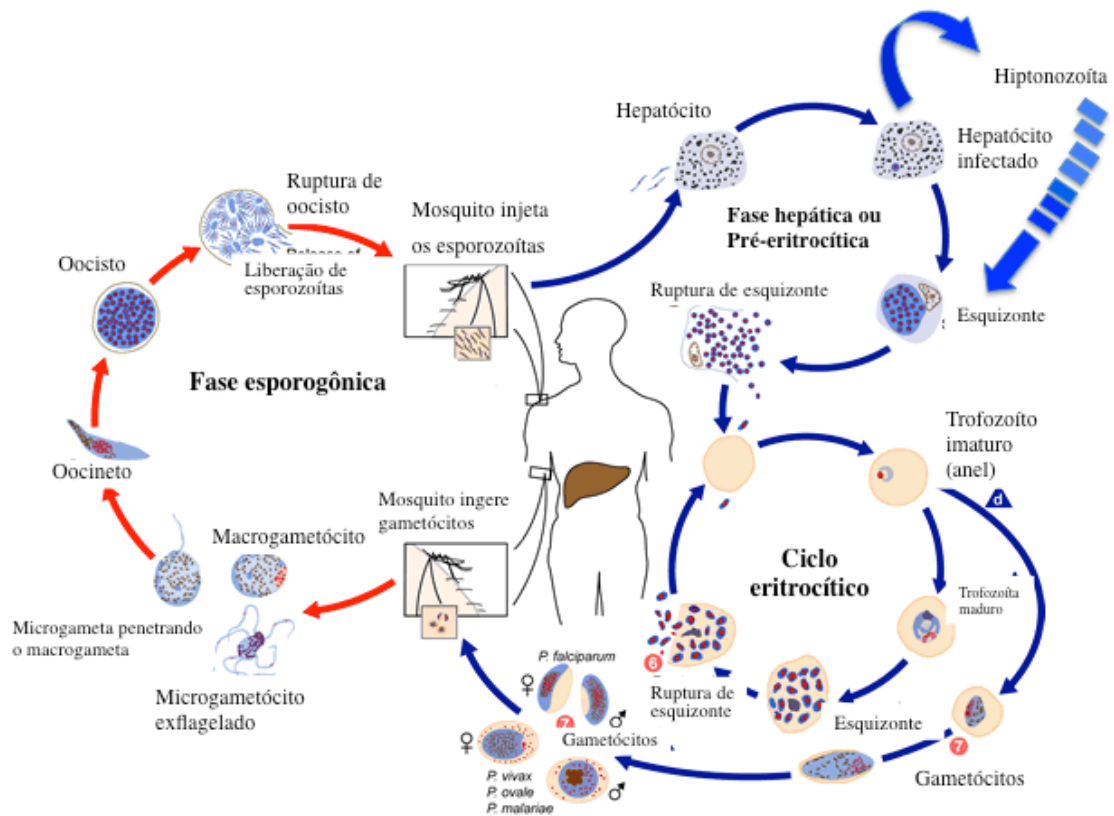


Figura 1.2.1: Ciclo de vida do Plasmodio. O parasito infecta o hospedeiro vertebrado, o homem, e fêmeas do mosquito de gênero Anopheles. Durante a alimentação, a fêmea infectada do mosquito Anopheles inocula os esporozoítas no hospedeiro humano. Esses esporozoítas alcançam o fígado e podem infectar os hepatócitos. Em seguida, os esporozoítas se transformam em criptozoítas e após sofrer uma esquizogonia eles se transformam em esquizontes hepáticos. Os esquizontes hepáticos se rompem e os merozoítas são, então, liberados na corrente sanguínea. Uma particularidade do *P. vivax* e *P. ovale* é a formação de hipozoítas, que são formas latentes responsáveis pelas recaídas da doença. Dando continuidade ao ciclo, os merozoítas liberados invadem os eritrócitos, dando início ao ciclo eritrocítico do parasito. Após essa invasão, os merozoítas passam para o estágio de anel, depois trofozoíta maduro e esquizonte, culminando com a ruptura da hemácia e a liberação de novos merozoítas na circulação. Esses merozoítas invadem novos eritrócitos dando continuidade ao ciclo eritrocítico. Alguns parasitos na forma anel se diferenciam em gametócitos, formando os gametócitos masculino e feminino. Ao serem ingurgitados pela fêmea do mosquito durante a alimentação, os gametócitos masculino e feminino se diferenciam no estômago do inseto em microgameta e macrogameta, respectivamente. O macrogameta é fecundado pelo microgameta, gerando o oocineto, que depois se

transforma em oocisto na parede do intestino do mosquito. O oocisto sofre uma multiplicação esporogônica gerando milhares de esporozítas. Após a ruptura do oocisto, esses esporozoítas são liberados e migram para as glândulas salivares do mosquito, que podem iniciar uma nova infecção no homem ao parasitar os hepatócitos.

Fonte: modificado de <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>.

1.3) Toxinas maláricas e resposta inflamatória

A inflamação sistêmica é um evento central em diversas síndromes associadas à malária, tais como a malária cerebral, febre e anemia. Desta forma, entender o mecanismo pelo qual os componentes do parasito ativam as células imunes é crucial para entender a patofisiologia da malária.

As respostas imunológicas a insultos infecciosos são iniciadas principalmente pela interação de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-associated molecular pattern* ou PAMPs) com receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos nas células do hospedeiro. Com relação ao plasmódio, existem três principais PAMPs que foram estudados em maior detalhe, são eles a hemozoína, o glicosilfosfatidilinositol (GPI) e motivos de ácido nucleico.

As âncoras GPI ligam muitas proteínas de superfície à membrana plasmática do parasito, sendo essenciais para a sobrevivência deste. As âncoras GPI de *P. falciparum* podem ser reconhecidas por diversos receptores do tipo Toll (do inglês, *Toll-like receptor* ou TLR), tais como os heterodímeros TLR2-TLR6 ou TLR1-TLR2 e também pelo TLR4 (Krishnegowda *et al*, 2005; Durai *et al*, 2013). O GPI purificado de *P. falciparum* é capaz de aumentar a expressão da óxido nítrico síntase induzível e a liberação de óxido nítrico e também de diversas citocinas em macrófagos murinos, tais como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF). (Schofield e Hackett, 1993; Tachado *et al*, 1996; Tachado *et al*, 1997). Além disso, o GPI de *Plasmodium* é capaz de aumentar a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (do inglês, *vascular cell adhesion molecule 1*) e E-selectina em células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs do inglês, *human umbilical vein endothelial cells*), levando a um aumento da adesão de *P. falciparum* e de leucócitos a essas células (Schofield *et al*, 1996).

O DNA do parasito também é um importante ativador da resposta imunológica. Os motivos CpG (citosina e guanina separadas por um fosfato) de DNA plasmodial,

quando estão nos fagolisossomos, podem ativar o TLR9. A fagocitose de hemácias parasitadas leva a ativação do TLR9, provavelmente como resultado da degradação do parasito e a presença do DNA plasmodial no fagolisossomo (Parroche *et al*, 2007; Kalantari *et al*, 2014). A hemozoína pode funcionar como um veículo de transporte de forma a internalizar DNA plasmodial para um compartimento endossomal onde possa ser detectado pelo TLR9.

Durante o desenvolvimento e proliferação nas hemácias, o parasito degrada hemoglobina principalmente como forma de obtenção de aminoácidos. A degradação da hemoglobina ocorre principalmente dentro do vacúolo digestivo do parasito e acontece em sua maior parte durante as fases trofozoíta adulto e esquizonte. Este processo é acompanhado da liberação de heme livre, que é uma molécula extremamente oxidante e tóxica tanto para as células do hospedeiro como para o parasito, podendo causar até a morte do plasmódio. De forma a se proteger, já que este não possui a enzima heme-oxigenase (HO) que catalisa a degradação do heme, o parasito detoxifica o heme através da formação de cristais de hemozoína no vacúolo digestivo (Jani D *et al*, 2008; Coronado *et al* 2014). Inclusive, o bloqueio da formação de hemozoína é umas das estratégias mais utilizadas no controle da malária. Por exemplo, um dos mecanismos de ação da cloroquina é através da ligação ao heme livre, o que impede a sua detoxificação em hemozoína (Sullivan *et al*, 1996).

Durante a infecção malárica, hemácias parasitadas contendo hemozoína são fagocitadas por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas presentes em vários órgãos. A hemozoína também pode ser liberada na circulação quando as hemácias parasitadas se rompem e são então fagocitados pelas células do sistema imunológico. Inclusive, a quantidade de hemozoína acumulada nesses fagócitos reflete a carga parasitária e coincide com os períodos de febre e de níveis elevados das citocinas piréticas IL-1 β e TNF. O acúmulo de hemozoína em células fagocíticas e em vários órgãos (como fígado, baço e cérebro) correlaciona com a gravidade da doença. Por exemplo, pacientes que morreram de malária falciparum grave tem um número maior de neutrófilos e monócitos que contêm hemozoína do que os que sobreviveram. (Nguyen *et al*, 1995; Amodu *et al*, 1998; Frita *et al*, 2012).

Inicialmente, a hemozoína era considerada somente como um metabólito gerado na detoxificação do heme que era liberado durante a digestão da hemoglobina. No entanto, diversos trabalhos tem demonstrado que tanto a hemozoína natural (nHz),

extraída do plasmódio, como a hemozoína sintética (sHz) ou β -hematina induzem respostas inflamatórias tanto em modelos *in vitro* com *in vivo*. Monócitos humanos e macrófagos murinos, quando incubados na presença de hemozoína liberam diversos mediadores tais como as citocinas IL-1 β , TNF- α , as quimiocinas MIP-1 α (do inglês, *macrophage inflammatory protein 1 α*) e MIP-1 β e também as moléculas de adesão CD11b/CD18 (Sherry *et al*, 1995; Prada *et al*, 1995; Pichyangkul *et al*, 1997; Jaramillo *et al*, 2005; Tiemi Shio *et al*, 2009).

Ainda existem controvérsias sobre o quanto a hemozoína é capaz de regular o sistema imunológico. Parroche e colaboradores (2007) descreveram que a sHz é imunologicamente inerte e que a ativação do TLR9 previamente descrita por Coban e colaboradores (2005), na verdade é devido ao DNA do plasmódio agregado ao cristal. A hemozoína natural extraída de *P. falciparum* está ligada a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que podem ser de origem do parasito ou do hospedeiro, porém, seus componentes exatos ainda não estão bem estabelecidos. Essa discrepância de resultados pode ser explicada pelos diferentes métodos de preparação do cristal de sHz e/ou também de isolamento da nHz a partir da cultura do plasmódio.

Uma citocina que está aumentada durante a infecção malárica é a IL- β (Park *et al*, 2003; Leoratti *et al*, 2012). Esta citocina é produzida na sua forma inativa e precisa sofrer maturação para se tornar ativa. O processo de maturação é controlado por inflamassomas. Os inflamassomas são complexos multimoleculares que são montados no citoplasma de células do sistema imune inato, em resposta a moléculas microbianas ou sinais de estresse. Os inflamassomas são, normalmente, compostos por um sensor, uma molécula adaptadora e uma caspase inflamatória. Após a montagem, os inflamassomas contribuem para a indução da resposta inflamatória através da indução da secreção de citocinas, como IL-1 β e IL-18 (Schroder *et al*, 2010; Guo *et al*, 2015; Zamboni *et al*, 2015). A sHz é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 (do inglês, *NOD-like receptors pyrin domain containing 3*). Camundongos deficientes para a molécula adaptadora ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing C-terminal caspase recruitment domain*) e para o NLRP3 tem redução na migração de neutrófilos induzida pelo estímulo com hemozoína (Tiemi Shio *et al*, 2009; Griffith *et al*, 2009). A sHz também é capaz de induzir a produção dos mediadores inflamatórios MCP-1 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*), KC (do inglês, *keratinocyte chemoattractant*), IL-6, IL-1 α e IL-1 β quando injetada por via

intraperitoneal em camundongos (Griffith *et al*, 2009). A injeção intravenosa de nHz em camundongos leva ao aumento da transcrição de diversos mediadores inflamatórios no pulmão, tais como quimiocinas (IP-10- do inglês, *IFN γ -inducible protein 10* e MCP-1), citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e TGF- β - do inglês, *transforming growth factor β*) e outras moléculas inflamatórias como a iNOS (do inglês, *inducible nitric oxide sintase*), heme oxigenase-1 (HO-1) e ICAM-1 (Deroost *et al*, 2013). A ativação do fator de transcrição fator nuclear kappa-B (NF- κ B), fosforilação de ERK1/2 (do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*) e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) também são observadas em cultura de macrófagos murinos após o estímulo com sHz (Jaramillo *et al*, 2005; Jaramillo *et al*, 2009).

Padrões moleculares associados ao dano (do inglês, *danger-associated molecular patterns* ou DAMPs) são componentes endógenos liberados de células mortas, danificadas ou sofrendo algum tipo de estresse que podem ativar PRRs e inflamassomas, independente se a célula está infectada ou não. A molécula de heme é reconhecida como um importante DAMP, ligante de TLR4 e com importantes atividades pró-inflamatórias (Figueiredo *et al*, 2007).

O heme (ferro protoporfirina IX) faz parte de várias proteínas, como hemoglobina e óxido nítrico sintase, além de ser importante para o transporte de elétrons, estando presente na citocromo c redutase e citocromo c oxidase. Desta forma, a molécula de heme é essencial para diversos processos biológicos (Tsukihara *et al* 1995; Xia *et al*, 1997; Park *et al*, 2006).

O endotélio vascular está continuamente sendo exposto à hemoglobina e ao heme, resultante do processo de hemólise, e esta exposição é bem tolerada pelo organismo. Desta forma, o homem adquiriu diversos mecanismos protetores que combatem os efeitos tóxicos do heme. Um desses mecanismos é a presença da proteína haptoglobina que está presente no soro, e em condições fisiológicas ou de hemólise leve a moderada, se liga à hemoglobina livre. Devido ao tamanho excessivo do complexo formado, este fica retido no espaço intravascular, impedindo a associação de hemoglobina livre com o óxido nítrico e a liberação de heme livre (Melamed-Frank *et al*, 2001). O complexo haptoglobina:hemoglobina se liga ao CD163 presente em macrófagos e hepatócitos, o que irá mediar a endocitose destes complexos e a sua degradação (Kristiansen *et al*, 2001; Philippidis *et al*, 2004).

Em condições hemolíticas, como na malária e sepse, ocorre um intenso processo de hemólise e liberação de grande quantidade de hemoglobina no espaço intravascular, o que satura as moléculas de haptoglobina, levando ao acúmulo de hemoglobina livre. A hemoglobina livre é oxidada a meta-hemoglobina (MetHb) na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), porém, a MetHb é instável e libera rapidamente heme livre (Balla *et al*, 1993). O heme livre ainda pode ser capturado pela hemopexina, que inibe as propriedades oxidativas do heme e vai mediar o transporte de heme para compartimentos intracelulares através do receptor CD91 em macrófagos (Paoli *et al*, 1999; Hvidberg *et al*, 2005). Uma vez dentro das células, o heme é catabolizado em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro (Fe) através da ação das enzimas heme-oxigenase (HO) (Tenhunen *et al*, 1968). O Fe livre é altamente oxidativo e pode promover a formação de radicais livres, que por sua vez causam o processo de peroxidação lipídica, sendo, então, uma molécula com efeitos citotóxicos. Por fim, o Fe ainda pode ser armazenado em uma forma não tóxica pela ferritina, um complexo proteico intracelular, protegendo as células do dano oxidativo do Fe livre (Arosio *et al*, 2009).

No entanto, caso a hemólise seja muito intensa, a capacidade do soro de remover/capturar o heme pode saturar, aumentando a quantidade de heme livre de maneira suficiente para causar dano tecidual em vários órgãos. Inclusive, já foi demonstrado um importante papel protetor na malária da HO-1, que é a isoforma induzível da enzima. Camundongos deficientes para HO-1 tem uma diminuição na sobrevivência em modelos de malária experimental e também em modelos de sepse (Pamplona *et al*, 2007; Seixas *et al*, 2009; Larsen *et al*, 2010).

A molécula de heme pode promover inflamação através da ativação de células endoteliais induzindo a expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, P-selectina e fator de von Willebrand (Wagener *et al*, 1997; Belcher *et al*, 2014). Heme também é capaz de promover a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal através da indução da síntese de leucotrieno B4 por macrófagos (Monteiro *et al*, 2011). Além disso, o heme é capaz de ativar macrófagos e induzir a produção de diversas citocinas, tais como TNF, KC e IL-1 β (Figueiredo *et al*, 2007; Fortes *et al*, 2012; Dutra *et al*, 2014).

A produção de IL-1 β pelo heme em macrófagos previamente estimulados com LPS se deve pela ativação do inflamassoma NLRP3. Animais nocautes para o NLRP3,

para a sua molécula adaptadora ASC ou para caspase-1 foram mais resistentes a morte decorrente da hemólise induzida por fenilhidrazina, quando comparado a camundongos *wild type* (Dutra *et al*, 2014). Heme também é capaz de ativar o TLR4, induzindo a produção de citocinas como o TNF- α e outras moléculas importantes no processo inflamatório, como a E-selectina (Figueiredo *et al*, 2007; Belcher *et al*, 2014).

Heme também é capaz de induzir morte celular programada em diversos tipos celulares, como astrócitos e células do endotélio vascular cerebral humanas (HBVEC do inglês, *human brain vascular endothelial cells*) (Laird *et al*, 2008; Liu *et al*, 2013). A indução de TNF em macrófagos pelo heme, por exemplo, é essencial para a indução nessas células de uma necrose programada, denominada necroptose (Fortes *et al* 2012). No entanto, para o nosso conhecimento, ainda não há nenhum dado na literatura que reporte o efeito do heme ou da hemozoína em plaquetas.

1.4) Principais complicações da malária vivax

A malária vivax está associada a calafrios, vômito, dor de cabeça, mal-estar, febre e dor muscular, que são sintomas não-específicos e comuns a outras malárias ou outras doenças febris. A malária vivax foi por muitos anos uma doença negligenciada e considerada benigna, principalmente quando comparada à malária falciparum. No entanto, recentemente diversos trabalhos tem demonstrado complicações graves causadas pelo *P.vivax* (Kochar *et al*, 2009; Alexandre *et al*, 2010; Lacerda *et al*, 2012).

Uma complicação bastante comum causada pelo *P.vivax* é a anemia grave, que é definida como hemoglobina <5 g/dl ou hematócrito <15% em crianças (até 12 anos) e hemoglobina <7 g/dl ou hematócrito <20% em adultos (WHO, 2014). Em um trabalho do grupo de Ric Price (2009), a anemia grave foi a manifestação mais frequente em bebês (< 3 meses) infectados tanto com *P. vivax* como *P. falciparum*, mas teve maior prevalência em crianças com *P. vivax* do que *P. falciparum*.

O *P. vivax* comumente afeta o pulmão, e muitos dos pacientes apresentam tosse (Anstey *et al*, 2002). Casos de injúria pulmonar e síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS do inglês, *acute respiratory distress syndrome*) devido a malária vivax tem sido reportados na literatura. Muitos dos casos de injúria pulmonar se desenvolvem após o início do tratamento antimalárico (Lomar *et al*, 2005; Anstey *et al*, 2007; Tan *et al*, 2008).

Outras manifestações graves da malária vivax incluem malária associada a gravidez ou malária gestacional (na qual a mãe apresenta anemia e o bebê apresenta redução do peso ao nascer) (Nosten *et al*, 1999; Poespoprodjo *et al*, 2008), icterícia (Andrade *et al* 2010), dano renal agudo e coma (Vermehren *et al*, 2005; Kochar *et al*, 2005; Kochar *et al*, 2009).

A plaquetopenia é uma complicação bastante frequente na malária causada por *P. vivax*, mas diferentemente da dengue, o paciente não apresenta sangramento (Kochar *et al*, 2010; Kwak *et al*, 2013; Sam *et al*, 2013). Não existem ainda muitos estudos que mostrem o real peso da plaquetopenia na malária. Não há um consenso em como proceder em casos de baixa de plaqueta em pacientes, ou seja, em saber em que momento é necessário internar o paciente ou fazer transfusão. Em alguns casos aonde ocorre sangramento, não se sabe se este deve-se à queda de plaquetas ou a outras complicações presentes. Por exemplo, em um estudo feito em Manaus, 20,1 % dos casos de malária que precisaram de internação possuíam plaquetopenia como causa da admissão (Lacerda *et al*, 2011). Um estudo feito com crianças infectadas com *P. falciparum* demonstrou que a plaquetopenia está relacionada com aumento de risco de morte entre os casos graves. A contagem de plaquetas é mais baixa nos casos graves do que nos casos moderados, e também em crianças que morrem quando comparada as crianças que se recuperam (Gerardin *et al*, 2002).

1.2) Plaquetas

1.2.1) Formação

As plaquetas foram descobertas em 1862, pelo patologista italiano Giulio Bizzozero, que observou a presença de plaquetas na circulação de animais vivos e também no sangue coletado (Semple *et al*, 2011).

As plaquetas são células anucleadas com um formato discóide e que variam de 1 a 3 µm de diâmetro. Após serem liberadas do citoplasma de megacariócitos, as plaquetas humanas circulam na corrente sanguínea por 8 a 10 dias (Schwartz *et al*, 2010). Desta forma, 100 bilhões de novas plaquetas são produzidas diariamente a partir de megacariócitos, de forma a manter o seu número de 150 a 400x10⁹ /l na circulação (Thon *et al*, 2012)

Os megacariócitos, células precursoras das plaquetas são as maiores (50–100

µm) e também uma das mais raras células da medula óssea, compondo 0,01 % das células nucleadas da medula óssea (Machlus e Italiano Jr, 2013). A medula é o local tradicional da trombopoiese (processo de produção de plaquetas), no entanto, evidências recentes tem demonstrado que no pulmão também possa ocorrer esse fenômeno (Weyrich e Zimmerman, 2013). Entre essas evidências, está a presença de megacariócitos nos vasos pulmonares de humanos, como foi observado em biópsias pulmonares e necropsias, e de mamíferos não humanos, como camundongos (Davis *et al*, 1997; Mandal *et al*, 2007; Bozza *et al*, 2009; Weyrich e Zimmerman, 2013). A principal teoria para explicar a presença de megacariócitos no pulmão é a de que essas células se originam na medula óssea e depois são levadas até o pulmão, pelo sangue venoso, e ficam retidas na microvasculatura pulmonar devido ao seu tamanho. No entanto, o processo de biogênese de plaquetas ainda não foi claramente demonstrado no pulmão de humanos ou animais (Levine *et al*, 1993; Zucker-Franklin *et al*, 2000; Bozza *et al*, 2009; Weyrich e Zimmerman, 2013).

A formação de plaquetas pode ser dividida em duas fases: na primeira fase ocorre a maturação dos megacariócitos e dura alguns dias e na segunda fase ocorre a formação das plaquetas pelos megacariócitos e é mais rápida, sendo completada em algumas horas.

Os megacariócitos se originam de células-tronco hematopoiéticas que residem principalmente na medula óssea, mas que também estão presentes no saco vitelino, baço e fígado fetal durante o desenvolvimento do feto. As células-tronco se diferenciam em megacariócitos principalmente pela ação do hormônio hematopoiético trombopoietina (TPO), que é produzido no fígado e nos rins, e que atua no seu repertor c-Mpl (do inglês, *myeloproliferative leukemia protein*) (Kaushansky *et al* 1994; Jelkmann, 2001; Machlus e Italiano Jr, 2013).

Durante a maturação, os megacariócitos sofrem endomitose, processo no qual as células se tornam poliplóides através de ciclos de replicação do DNA sem divisão celular, principalmente pela ação do TPO. Essas células podem chegar a ter um conteúdo de DNA de até 128n em um único núcleo polilobulado (Zimmet e Ravid, 2000). Além disso, os megacariócitos aumentam de tamanho, o seu citoplasma passa a conter grande quantidade de proteínas de citoesqueleto e de grânulos específicos de plaquetas, além de desenvolverem membranas altamente invaginadas por todo o seu citoplasma e que são contínuas com a membrana plasmática (Machlus e Italiano Jr,

2013). Essas membranas invaginadas darão origem as pró-plaquetas.

Na segunda fase da formação de plaquetas ocorre a migração dos megacariócitos para o nicho vascular. Os megacariócitos maduros estendem longas ramificações chamadas de pró-plaquetas, que são liberadas nos sinusóides vasculares da medula óssea. Cada megacariócito pode estender de 10 a 20 pró-plaquetas, cada uma começando como uma protusão que vai se alongando e afinando ao longo do tempo (Machlus e Italiano Jr, 2013). As plaquetas serão formadas nas pontas das pró-plaquetas. Ao longo do desenvolvimento das plaquetas, estas passam a receber suas organelas e grânulos essenciais para suas funções, e que são transportados a partir do megacariócito (Italiano *et al*, 1999; Richardson *et al*, 2005). Os microtúbulos presentes nas pró-plaquetas possuem um importante papel durante o processo de alojamento das pró-plaquetas, no transporte das organelas e grânulos para as pró-plaquetas, além de atuarem na própria formação das plaquetas que se dará nas pontas das pró-plaquetas (Machlus e Italiano Jr, 2013).

Recentemente foi descoberto um novo intermediário, a pré-plaqueta, que é formada durante o processo de maturação. Pré-plaquetas são partículas anucleadas e discóides, que são maiores do que as plaquetas (medem de 3 a 10 μm de diâmetro) e que tem a capacidade de se transformar em pró-plaquetas quando caem na circulação. Desta forma, o novo modelo proposto é o de que megacariócitos liberam pré-plaquetas nos sinusóides, e estas por sua vez, são espontânea e rapidamente transformadas em pró-plaquetas. As pró-plaquetas sofrem um processo rápido de fissão que resulta na formação de plaquetas maduras na circulação (Thon *et al*, 2010; Thon *et al*, 2012; Machlus e Italiano Jr, 2013).

Alternativamente, as pré-plaquetas também podem ficar retidas em capilares da medula óssea, pulmão ou baço, onde a força de cisalhamento (*shear force*) leva a formação de plaquetas a partir de pró-plaquetas. O período necessário para os megacariócitos se tornarem poliplóides, maturarem e liberarem plaquetas é em torno de 5 dias em humanos e 2-3 dias em roedores. O núcleo e o corpo celular residual são fagocitados ao final do processo de maturação do megacariócito, que gera de 100 a 1000 plaquetas (Bozza *et al*, 2009; Thon *et al*, 2010; Weyrich e Zimmerman, 2013; Machlus e Italiano Jr, 2013).

1.2.2) Funções e estrutura

As plaquetas atuam na corrente sanguínea respondendo a danos nos vasos através de mudanças no seu formato, secretando conteúdo dos seus grânulos e agregando para formar coágulos. As plaquetas são células anucleadas que exercem importantes funções hemostáticas, porém, o que se tem visto atualmente é que essas células possuem funções importantes na resposta imunológica. Essas células estão repletas de grânulos secretórios, que são críticos para que as plaquetas possam exercer as suas funções. Uma plaqueta, em média, contém 60 grânulos, que estocam diversas moléculas, inclusive moléculas que atuam na inflamação e resposta imunológica (Tabela 1.1). Após a ativação plaquetária, por exemplo, pela ligação da trombina ao seu receptor PAR-1 (do inglês, *protease-activated receptor-1*), os grânulos sofrem uma exocitose controlada e liberam o seu conteúdo para o meio extracelular, ou as moléculas que se encontram na membrana interna do grânulo, passam a ser expressas na superfície da plaqueta. Existem 3 tipos de grânulos plaquetários: os grânulos alfa, os grânulos densos e os lisossomas (Morrel *et al*, 2014). Além disso, foi descrito recentemente um possível novo tipo de grânulo, chamado de grânulo T, onde foi descrita a presença do receptor do Tipo Toll 9 (Thon *et al*, 2012). Os grânulos alfa são os grânulos mais abundantes (50 a 60/plaqueta) e maiores (variam de 200 a 500 nm de tamanho), ocupando cerca de 10% do volume plaquetário (Blair e Flaumenhaft, 2009). Uma análise proteômica do conteúdo dos grânulos alfa encontrou 284 proteínas (Maynard *et al*, 2007). Os grânulos densos são menores (cerca de 150 nm), menos numerosos (3 a 8/plaqueta) e estocam moléculas menores, como ADP, ATP, GTP, magnésio, cálcio e histamina. Os grânulos lisossomais são mais raros e estocam enzimas degradativas, como colagenase e catepsina D (Jenne *et al*, 2013)

Os grânulos alfa concentram moléculas grandes que são importantes para a hemostasia, como fibrinogênio e fator de von Willebrand (vWf). Nesses grânulos também estão presentes receptores de adesão plaquetária, como o receptor de fibrinogênio e de vWf, a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (ou glicoproteína IIb/IIIa- GPIIb/IIIa); o receptor de colágeno, glicoproteína VI (GPVI); e o complexo glicoproteico que liga ao vWf, GPIb-IX-V (ou glicoproteína Ib-IX-V) (Berger *et al*, 1996; Suzuki *et al*, 2003; Blair e Flaumenhaft, 2009). Os grânulos alfa contêm diversos fatores de coagulação, como os fatores V, XI e XIII, que são secretados durante a ativação plaquetária (Rendu *et al*, 2001; Golebiewska e Poole, 2015).

As plaquetas também secretam diversas proteínas que limitam a progressão da coagulação. Nos grânulos alfa estão estocados antitrombina, que é uma inibidora da trombina, e inibidor de C1 (inibidor do primeiro componente do sistema complemento) que atua degradando o fator XI ativado, calicreína plasmática e o fator XII ativado (Cugno *et al*, 1997; Monroe *et al*, 2002; Blair e Flaumenhaft, 2009). Os grânulos alfa também estocam a proteínase plasmina, que degrada coágulos de fibrina, e o plasminogênio, o seu precursor inativo. Essas funções aparentemente conflitantes das plaquetas na sinalização da coagulação são essenciais para manter o balanço hemostático e prevenir trombozes patológicas em condições fisiológicas (Golebiewska e Poole, 2015).

Diversas evidências vem demonstrando que plaquetas exercem papéis importantes na inflamação e na resposta imunológica (Vieira-de-Abreu *et al*, 2011). Neste contexto, os grânulos alfa contribuem para esses papéis, tanto através da liberação de diversas citocinas, como através da expressão de receptores que facilitam a adesão de plaquetas a outras células. A P-selectina (ou CD62P) é uma importante molécula de adesão que é armazenada nos grânulos alfa e que participa das interações de plaquetas com células endoteliais, monócitos, neutrófilos e linfócitos (Frenette *et al*, 1995; Diacovo *et al*, 1996; Blair e Flaumenhaft, 2009; Vieira-de-Abreu *et al*, 2011). Nos grânulos alfa também estão presentes diversas quimiocinas, tais como, IL-8, RANTES (do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), fator plaquetário 4 (PF4), NAP-2 (do inglês, *neutrophil-activating peptide-2*), CXCL5 (ou ENA-78 do inglês, *epithelial neutrophil activating protein- 78*), CXCL1 (ou GRO- α do inglês, *growth-regulated oncogene α*), MIP-1 α ou CCL3 e MCP-1. Por fim, os grânulos alfa também possuem proteínas com propriedades microbidas, como as trombocidinas 1 e 2 e a timosina-b4 (Tabela 1.1) (Tang *et al*, 2002; Weyrich e Zimmerman, 2004; Blair e Flaumenhaft, 2009; Vieira-de-Abreu *et al*, 2011).

Tabela 1.1: Mediadores inflamatórios, imunomodulatórios e peptídeos antimicrobianos liberados por plaquetas humanas e/ou translocadas para a membrana plasmática.

Fonte: adaptado de Weyrich e Zimmerman, 2004 e Vieira-de-Abreu et al, 2011.

Classe de mediador	Fator	Armazenado ou sintetizado
Lipídios inflamatórios imunomodulatórios	PAF	Sintetizado
	TXA ₂	Sintetizado
Fatores de crescimento com atividades imunológicas	PDGF	Armazenado
	TGF-β	Armazenado
Quimiocinas	NAP2 (CXCL7)	Clivagem proteolítica de precursores armazenados
	PF4 (CXCL4)	Armazenado
	GRO-α (CXCL1)	Armazenado
	ENA-78 (CXCL5)	Armazenado
	SDF-1 (CXCL12)	Armazenado
	RANTES (CCL5)	Armazenado
	MIP-1α (CCL3)	Armazenado
	MCP-3 (CCL7)	Armazenado
	Citocinas	CD40L (CD154)
IL-1β		Sintetizada
IL-1α		Armazenada
HMGB1		Armazenado
GM-CSF		Armazenado
Peptídeos antimicrobianos	Proteínas microbidas plaquetárias, tais como trombocidinas 1 e 2 e timosina-b4	Armazenados; e em alguns casos clivagem proteolítica

1.2.3) Plaquetas na inflamação e imunidade

Além de modularem a resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro, as plaquetas são capazes de participar da captura e morte de patógenos. Um exemplo seria a indução por plaquetas de redes extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*-NETs) (Clark *et al*, 2007). As NETs são redes extracelulares de cromatina descondensada, histonas e proteínas com ação antimicrobiana, que são formadas por neutrófilos que estão sofrendo um processo de morte denominado NETose (Brinkmann *et al*, 2004; Fuchs *et al*, 2007; Wartha *et al*, 2008). O exato mecanismo pelo qual plaquetas induzem NETose ainda não está muito claro, mas diversos agonistas plaquetários são capazes de promover a formação de NET, como a trombina e o LPS. Alguns mecanismos descritos foram a ativação do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em plaquetas e também a ligação de P-selectina com o PSGL-1 (do inglês, *P-selectin glycoprotein ligand 1*) em neutrófilos (Clark *et al*, 2007; Etulain *et al*, 2015).

As plaquetas podem interagir diretamente com bactérias além de serem as primeiras células e também as mais numerosas a acumularem em sítios de infecções vasculares. A interação direta de bactérias com as plaquetas pode levar à agregação plaquetária, à liberação de fatores antimicrobianos e moléculas proinflamatórias, e também à formação de agregados plaqueta-leucócito (Youssefian *et al*, 2002; Fitzgerald *et al*, 2006; Rondina *et al*, 2011; Jenne *et al*, 2013). Outra importante evidência de que as plaquetas são células importantes na resposta imunológica, é a presença de diversos receptores TLRs entre eles, o TLR2, TLR4 e TLR9 nessas células (Andonegui *et al*, 2005; Cognasse *et al*, 2005; Thon *et al*, 2012). As plaquetas também possuem diversas moléculas co-estimulatórias de células T, como o CD86 e CD40, e são capazes de apresentar antígenos para células T via MHC de classe I. Chapman e colaboradores (2012) demonstraram que plaquetas são capazes de apresentar antígenos derivados de Plasmodio para células T, induzindo a ativação dessas células *in vivo*, atuando como uma vacina e protegendo camundongos contra o desenvolvimento de malária cerebral.

Uma importante molécula expressa pelas plaquetas é a molécula co-estimulatória ligante de CD40 (CD40L). As formas solúveis do CD40L (sCD40L) plasmático se originam principalmente de plaquetas, que quando ativadas liberam o sCD40L na circulação. O CD40L plasmático pode se ligar ao CD40 expresso tanto no endotélio como em leucócitos. Henn e colaboradores (1998) observaram que o CD40L expresso em plaquetas ativadas é capaz de induzir a secreção das quimiocinas IL-8 e

MCP-1 e também a expressão de moléculas de adesão, como E-selectina e ICAM-1 em células endoteliais de cordão umbilical. Demonstrando, assim, que o CD40L plaquetário é importante na ativação endotelial, levando a geração de sinais que induzem o recrutamento e extravasamento de leucócitos para o local de injúria (Henn *et al*, 1998; Blumberg *et al*, 2009; Vieira de Abreu *et al*, 2011). Monócitos produzem IL-1 β em resposta a ligação ao CD40L e plaquetas liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Wagner *et al*, 2004; Chakrabarti *et al*, 2005).

Outra importante molécula expressa na superfície de plaquetas ativadas é a P-selectina. Através da ligação da P-selectina com o seu ligante glicoproteico (PSGL-1), as plaquetas são capazes de modular a resposta inflamatória de diversas células, tais como os monócitos. Os monócitos são as principais células produtoras de citocinas durante a malária vivax (Leoratti *et al*, 2012). Nosso grupo observou que plaquetas apoptóticas de voluntários sadios são capazes de induzir a liberação de IL-10 em monócitos de forma dependente da ligação de P-selectina e do reconhecimento de fosfatidilserina (Hottz & Medeiros-de-Moraes *et al*, 2014). Além disso, a co-cultura de plaquetas e monócitos levou a indução de um fenótipo pro-inflamatório nos monócitos (Scull *et al*, 2010; Passacuale *et al*, 2011). Também foi visto que plaquetas são capazes de induzir a translocação do fator de transcrição NF κ B em monócitos e que a ligação da P-selectina ao PSGL-1 gera a liberação de RANTES pela plaqueta, levando por sua vez à secreção de MCP-1 pelos monócitos (Weyrich *et al*, 1996, Weyrich *et al*, 1995).

A presença de agregados plaqueta-monócito, principalmente pela ligação P-selectina com o PSGL-1, tem sido observada em diversas doenças, tais como dengue, HIV e influenza A (H1N1), o que sugere um importante papel em doenças inflamatórias (Hottz e Medeiros-de-Moraes *et al*, 2014; Singh *et al*, 2012; Rondina *et al* 2012), além de ser um bom marcador para a ativação plaquetária *in vivo* (Rondina *et al*, 2012).

A expressão gênica em células nucleadas é regulada por diversas etapas. Uma etapa crítica é a remoção de íntrons não codificantes de RNAs mensageiros (mRNA) recém transcritos, por um complexo denominado spliceossomo. O spliceossomo contém ribonucleoproteínas nucleares pequenas e proteínas auxiliares que fornecem a arquitetura necessária para o correto reconhecimento e excisão do íntron (Maniatis e Reed, 2002). O *splicing* é um processo que garante que mRNAs maduros e possíveis de serem traduzidos, possam estar disponíveis para serem exportados para o citoplasma. O

spliceossomo funciona no núcleo, e até pouco tempo não havia nenhuma indicação de que o *splicing* poderia ocorrer no espaço extranuclear de células de mamíferos.

Estudos recentes demonstraram que as plaquetas, que são células anucleadas, possuem RNA pré-mensageiro e mRNA e que são capazes de realizar *splicing* e traduzir o mRNA, levando a produção de diversas moléculas como IL-1 β , fator tissular e ciclooxigenase-2 (Denis *et al*, 2005; Schwertz *et al*, 2006; Shashkin *et al*, 2008; Rondina *et al*, 2011). O fato de que componentes essenciais do spliceossomo do megacariócito são distribuídos para as plaquetas durante a trombopoiese, fornece evidências de um mecanismo de regulação da gênica que vai além do estágio de formação da pró-plaqueta.

Além de possuir mRNA e a capacidade de síntese proteica, as plaquetas apresentam um transcriptoma bem complexo, incluindo pré-mRNAs e microRNAs (Landry *et al*, 2009; Vieira-deAbreu *et al*, 2011; Plé *et al*, 2012). Esse transcriptoma é capaz de sofrer mudanças durante o desenvolvimento de doenças (Raghavachari *et al*, 2007), tal como foi observado em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (Lood *et al*, 2010).

1.2.4) Plaquetas na malária

O papel da plaqueta durante a infecção malárica ainda não está estabelecido. Evidências na literatura demonstram um papel protetor dessas células na malária. McMorran e colaboradores (2009 e 2012) demonstraram que plaquetas humanas são capazes de matar *P. falciparum* através da liberação de PF4. As plaquetas se ligam a hemácias parasitadas através do receptor CD36 expresso nas plaquetas e liberam PF4, que é capaz de matar diretamente o plasmódio, lisando o seu vacúolo digestivo. Essa ação do PF4 depende do receptor do antígeno Duffy presente nas hemácias, que se liga ao PF4. Além disso, foi observado que crianças com malária cerebral possuem níveis mais baixos de RANTES quando comparados com crianças com malária não-complicada. Níveis baixos de RANTES estão associados com mortalidade em crianças com malária cerebral. Visto que as plaquetas são importantes fontes de RANTES, a causa da queda nos níveis desta quimiocina poderia ser a plaquetopenia observada durante a infecção malárica (John *et al*, 2006).

Por outro lado, trabalhos demonstram que plaquetas podem contribuir para um quadro de malária cerebral. Plaquetas se acumulam em capilares cerebrais de crianças

que morreram de malária cerebral e co-localizam com leucócitos e pigmento malárico (Grau *et al*, 2003). Camundongos nocautes para PF4 são protegidos da malária cerebral após infecção com *P. berghei* ANKA. Os animais nocautes apresentam uma barreira hemato-encefálica íntegra, menos hemorragia cerebral e trombos microvasculares, quando comparados com camundongos selvagens, demonstrando um importante papel da quimiocina PF4 como importante mediador da malária cerebral (Srivastava *et al*, 2008).

As micropartículas plaquetárias também parecem ter um papel deletério durante a infecção malárica. Diversas células, como leucócitos e plaquetas, podem liberar pequenos fragmentos (0,1 a 1 µm) das suas membranas plasmáticas na circulação em resposta a diversos estímulos, tais como citocinas próinflamatórias (como TNF-α) ou durante processos apoptóticos. Estes fragmentos são denominados de micropartículas. As micropartículas plaquetárias são as micropartículas mais abundantes na circulação, representando cerca de 70 a 90 % de todas as micropartículas circulantes (Doeuvre *et al*, 2009; Italiano Jr *et al*, 2010).

Faille e colaboradores (2009) sugeriram que micropartículas plaquetárias participam da patogênese da malária cerebral induzida por *P. falciparum*. Eles observaram que as micropartículas plaquetárias são capazes de se ligar preferencialmente a hemácias parasitadas do que as não parasitadas. Essa ligação parece ocorrer via proteína de membrana do eritrócito 1 (PfEMP-1, proteínas de superfície celular codificadas pelo *P. falciparum*), expresso nas hemácias parasitadas que interagem com as moléculas CD36 e PECAM-1 expressas nas plaquetas. O grupo também observou que a presença de micropartículas plaquetárias aumenta a adesão de hemácias parasitadas a células endoteliais de cérebro. As micropartículas plaquetárias também parecem ter um papel importante na inflamação induzida pelo *P. vivax*. Pacientes com malária vivax apresentam aumento no número de micropartículas plaquetárias. Esse aumento foi relacionado com a presença de febre no momento da coleta de sangue e também conforme o aumento no número dos dias de sintomas. Além disso, os níveis de micropartículas plaquetárias no plasma diminuiu conforme o aumento do número de episódios prévios de malária (Campos *et al*, 2010).

A plaquetopenia, definida como contagem de plaqueta < 150,000/µL, é uma complicação comum tanto na malária vivax quanto na falciparum (Yamaguchi *et al*, 1997; Kakar *et al*, 1999; Lacerda *et al*, 2011; Bakhubaira, 2013), porém as suas causas ainda não foram totalmente elucidadas. Uma das hipóteses que tem sido propostas para

tentar explicar as causas da plaquetopenia, incluem sequestro de plaquetas no baço como resultado da ligação específica de IgG a antígenos maláricos ligados a plaquetas através da porção Fab da IgG e também a presença de auto anticorpos (Kelton *et al*, 1983; Grau *et al*, 1988; Yamaguchi *et al*, 1997; Panasiuk, 2001).

A ativação endotelial também é outra possível causa para a plaquetopenia observada na malária. Em voluntários infectados com *P. falciparum* houve um aumento nos níveis de vWF e uma correlação negativa entre os níveis de vWF e a contagem de plaquetas (Mast *et al*, 2007). O vWF é sintetizado principalmente pelas células endoteliais vasculares e atua como uma ponte para a ativação e agregação plaquetária, através da sua ligação nos receptores plaquetários (Berger *et al*, 1996; Huizinga *et al*, 2002).

Evidências na literatura indicam também que a plaquetopenia possa estar relacionada com a fagocitose de plaquetas (Jaff *et al*, 1985; Coelho *et al*, 2013). Coelho e colaboradores (2013) observaram que plaquetas oriundas de pacientes com malária vivax plaquetopênicos são mais fagocitadas, por uma linhagem monocítica, do que plaquetas oriundas de pacientes não-plaquetopênicos.

Adicionalmente, trabalhos demonstram que durante a infecção malárica a plaquetopenia possa estar relacionada com a ativação e apoptose plaquetária. Camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentaram plaquetopenia e ativação de caspases plaquetárias, no entanto, quando foram tratados com inibidor de caspases, tiveram um aumento na sobrevivência (Piguet *et al*, 2002). Nosso grupo demonstrou que na dengue, doença também caracterizada pela baixa de plaquetas, as plaquetas estão ativadas, expressando P-selectina e agregadas a monócitos (Hottz & Medeiros-de-Moraes *et al*, 2014), bem como apresentam ativação das vias de apoptose como demonstrado pela ativação de caspases, expressão de fosfatidilserina e disfunção mitocondrial (Hottz *et al*, 2013).

1.2.5) Apoptose plaquetária

Apoptose, ou morte celular programada, é um mecanismo fisiológico, que demanda energia e que regula a vida útil das células, servindo como uma forma de controlar a presença de células danificadas não-desejadas, e foi por muito tempo atribuída somente a células nucleadas. Apesar de serem células anucleadas, não

possuírem DNA, recentemente foi descrito que as plaquetas são capazes de sofrerem apoptose (Mason *et al*, 2007; Vanags *et al*, 1997).

Existem 2 vias que levam a apoptose na célula nucleada: a primeira via é a extrínseca, que é iniciada pela interação entre ligantes de morte, que pertencem a superfamília do TNF, e os sensores de superfície celular, os receptores morte, que são proteínas transmembrana da superfamília do receptor de TNF. Entre os receptores de morte estão os receptores 1 e 2 de TNF (TNFR 1 e TNFR2), Fas (também conhecido como CD95 ou Apo1), receptor de morte 3 (DR3, do inglês *death receptor*, ou Apo 3) e os receptores de morte DR4 e DR5, também chamados de receptores TRAIL 1 e 2 (do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*), respectivamente. Após ativação dos receptores pelos seus ligantes, tais como, TNF, FasL e TRAIL, os receptores se ligam, através do seus domínios de morte, as proteínas FADD (do inglês, *Fas-associated death domain*) e/ou TRADD (do inglês, *TNF- receptor-associated death domain*). Este processo leva ao recrutamento das caspases inicializadoras procaspase-8 e/ou procaspase-10, formando o complexo DISC (do inglês, *death-inducing signaling complex*) no lado citoplasmático da membrana celular. Em seguida, as caspases 8 e 10 ativadas irão, por sua vez, clivar/ativar as caspases efetoras 3, 6 e 7 que irão clivar proteínas celulares vitais e assim deslocar o processo de apoptose para a fase efetora, o ponto onde não há mais volta (Fulda *et al*, 2006; Hotchkiss *et al*, 2009; Leytin, 2012).

A segunda via de indução de apoptose é a intrínseca, que é iniciada por mudanças na integridade da mitocôndria. Essas mudanças incluem depolarização da membrana interna da mitocôndria, e liberação de proteínas apoptogênicas como citocromo c, AIF (do inglês, *apoptosis- inducing factor*) e Smac/DIABLO (Smac, do inglês, *second mitochondria-derived activator of caspases* e DIABLO, do inglês, *direct IAP-binding protein with low PI*) do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol. Essas mudanças estão sob o controle das proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl-2. As proteínas da família Bcl-2 regulam a via mitocondrial de apoptose, através da interação com a membrana externa mitocondrial, desta forma afetando a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) e a liberação dos fatores apoptogênicos. Após ser liberado da mitocôndria para o citoplasma, o citocromo c se liga à proteína adaptadora Apaf-1 (do inglês, *apoptotic protease-activating factor-1*), formando o apoptossomo, que recruta e ativa a procaspase-9, que por sua vez, ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7 (Danial e Korsmeyer, 2004; Hotchkiss *et al*, 2009; Leytin,

2012). O apoptossomo é regulado por uma proteína pertencente à família das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), a XIAP, que se liga as formas ativadas das caspases 3 e 9, impedindo a ativação das caspases mediada pelo apoptossomo. A ação inibitória da XIAP pode ser superada pela ação de Smac/DIABLO, que interagem no citosol com as IAPs causando a liberação das caspases 3 e 9 das IAPs (Martinez-Ruiz *et al*, 2008). A proteína apoptogênica AIF é capaz de promover a degradação de DNA de forma independente de caspases. Após indução de apoptose, AIF é translocada para o citosol e para o núcleo de forma a exercer sua função (Candé *et al*, 2002).

Para uma proteína ser incluída na família Bcl-2, é necessário que a proteína candidata possua ao menos um domínio conservado de homologia ao Bcl-2 (domínio BH, do inglês, *Bcl-2 homology domain*), que são regiões conservadas que ditam a estrutura e a função da proteína. A família de proteínas Bcl-2 pode ser dividida em 3 grandes subclasses, que são definidas pela homologia compartilhada dentro dos 4 domínios BH (domínios de 1 a 4) (Danial e Korsmeyer, 2004; Hotchkiss *et al*, 2009). Os membros anti-apoptóticos da família do Bcl-2 incluem as proteínas Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1 e Bcl-x_L e dividem até 4 domínios BH (Boise *et al*, 1993; Kozopas *et al*, 1993; Gibson *et al*, 1996). Existem 2 grupos de proteínas pró-apoptóticas da família do Bcl-2, que diferem na função e no número de domínios BH que elas possuem. No primeiro grupo estão as proteínas Bax e Bak, que possuem 3 domínios BH e são críticas para a permeabilização da mitocôndria e a liberação de fatores apoptogênicos, como o citocromo c e Smac/DIABLO, para o citoplasma que levam a ativação da caspase-9. No segundo grupo estão as proteínas “BH3-apeenas”, tais como Bad e Bim, que possuem somente o domínio BH3, e que se ligam e inibem as proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, liberando as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak a induzirem a perda de permeabilidade de membrana da mitocôndria e a morte celular (Zong *et al*, 2001; Danial e Korsmeyer, 2004; Adams e Cory, 2007; Hotchkiss *et al*, 2009).

Evidências demonstram que a proteína anti-apoptótica Bcl-x_L é essencial para a sobrevivência das plaquetas. Mutações no gene *Bcl-x* em camundongos levou a uma redução da meia-vida de plaquetas circulantes. A inibição farmacológica de Bcl-x_L, pelo composto mimético de BH3, o ABT-737, induziu a apoptose plaquetária e a plaquetopenia em camundongos, cachorros e humanos (Mason *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2007; Vogler *et al*, 2011). Tais efeitos se devem, por exemplo, a propriedade de Bcl-x_L e Mcl-1 de sequestrar a proteína pró-apoptótica Bak, prevenindo suas ações posteriores

(como a permeabilização da membrana mitocondrial). Em camundongos, a deleção de Bak e Bax corrige/inibe os efeitos causados pela perda de Bcl-x_L e aumenta a meia-vida plaquetária *in vivo*. (Willis *et al*, 2005; Mason *et al*, 2007).

Tanto na via intrínseca como na extrínseca, tem-se a ativação de caspases, que são proteases que irão clivar diversos tipos de substratos no citoplasma ou no núcleo, induzindo as diversas características da apoptose. Entre essas características destacam-se a condensação da cromatina, a fragmentação nuclear, e a formação de *blebs* (bolhas/proeminências na membrana plasmática). Outras características da apoptose são o encolhimento celular e nuclear, e a integridade da membrana plasmática, que é preservada até um momento mais tardio (Danial e Korsmeyer, 2004; Hotchkiss *et al*, 2009).

A via intrínseca dependente de mitocôndria já foi bem documentada em plaquetas, por outro lado, ainda não está muito claro se as plaquetas podem sofrer apoptose através da via extrínseca. A apoptose plaquetária pela via intrínseca pode ser induzida por diversos estímulos, tais como os agonistas plaquetários (trombina, ADP, epinefrina e colágeno) (Tonon *et al*, 2002; Leytin *et al*, 2006 e 2007; Lopez *et al*, 2008), ionóforos de cálcio (ionomicina e A23187) (Kraemer *et al*, 2012; Leytin *et al*, 2006; Keuren *et al*, 2005), armazenamento a longo prazo (Li *et al*, 2000; Bertino *et al*, 2003; Leytin *et al*, 2008) e alta tensão de cisalhamento (do inglês, *shear stress*) (Leytin *et al*, 2004). Diversos parâmetros de apoptose também já foram induzidos por esses estímulos, entre eles estão a depolarização do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$); formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP); liberação de citocromo c para o citosol; expressão, ativação e translocação das proteínas pró-apoptóticas Bax, Bak e Bid para a mitocôndria; exposição de fosfatidilserina; ativação de caspase-3 e caspase-9 e; encolhimento plaquetário (Leytin *et al*, 2004; Leytin *et al*, 2006; Leytin *et al*, 2008; Lopez *et al*, 2008; Gyulkhandanyan *et al*, 2012; Leytin *et al*, 2012).

1.2.6) Plaquetas: proteassoma e calpaínas

As células nucleadas removem proteínas do seu proteoma através de proteólise catalisada pelo proteassoma. A degradação de proteínas é feita de forma a eliminar proteínas antigas e com conformação errada, deformadas. A degradação de proteínas também gera aminoácidos livres que são reciclados em proteínas recém sintetizadas. O

proteassoma é um grande complexo proteico que consiste de um componente 19S regulatório e um componente 20S nuclear (Sorokin *et al*, 2009).

As plaquetas possuem mRNA e proteínas de componentes críticos do proteassoma, além de exibirem atividade de proteassoma, no entanto, a exata função do proteassoma nessas células ainda não está bem estabelecida (Ostrowska *et al*, 2003; Brophy *et al*, 2008; Nayak *et al*, 2011; Rowley *et al*, 2011; Gupta *et al*, 2014). A inibição farmacológica do proteassoma inibe a formação de proplaquetas em megacariócitos humanos e murinos (Shi *et al*, 2014) e também regula algumas funções plaquetárias (Avcu *et al*, 2008; Gupta *et al*, 2014). Por exemplo, o inibidor de proteassoma, bortezomib (utilizado no tratamento de câncer) foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP no plasma rico em plaquetas (PRP) (Avcu *et al*, 2008).

Outro sistema de degradação de proteínas que está presente em plaquetas são as calpaínas, que são proteases de cisteína dependentes de cálcio. As calpaínas existem em 2 isoformas: a calpaína-1 (μ -calpaína) e calpaína-2 (m-calpaína). As calpaínas estão presentes no citoplasma na forma de enzimas inativas e são translocadas para a membrana em resposta ao aumento do nível de cálcio intracelular (Suzuki *et al*, 2004). As calpaínas podem ser ativadas por diversos estímulos que induzem o influxo de cálcio intracelular, tais como ionóforos de cálcio e trombina (Ishii *et al*, 1992), e proteínas do citoesqueleto, como a vinculina e a *kindlin-3* são substratos de calpaínas (Serrano *et al*, 2004; Zhao *et al*, 2012). A inibição de calpaína em plaquetas levou a redução da agregação plaquetária induzida por trombina e também do espalhamento dessas células (Croce *et al*, 1999). A deleção genética de μ -calpaína em camundongos reduz a agregação plaquetária induzida por diversos estímulos, como colágeno, ADP e ionóforo de cálcio. As plaquetas dos animais mutantes também tiveram deficiência na retração de coágulo, etapa que é importante na consolidação de trombo (Azam *et al*, 2001).

1.2.7) Racional

As plaquetas foram por muitos anos vistas somente por suas ações na homeostase, porém, muitos trabalhos têm demonstrado a participação dessas células na inflamação e no curso de infecções. Diversos mediadores inflamatórios são liberados por plaquetas ativadas, o que indica uma importante atuação dessas células na resposta imunológica de diversas doenças.

O papel das plaquetas na malária ainda não está bem estabelecido, porém, a plaquetopenia é uma complicação bastante comum da doença, o que nos sugere que as plaquetas possuem um papel importante na progressão da malária. Trabalhos demonstram um papel deletério dessas células, principalmente na malária cerebral, na qual as plaquetas se acumulam na microvasculatura (Grau *et al*, 2003). Por outro lado, as plaquetas são capazes de matar o *P. falciparum* através da liberação de PF4 (McMorran *et al*, 2009 e 2012). É possível que a influência das plaquetas na fisiopatologia da malária apresente diversas facetas dependendo do tipo de plasmódio envolvido e da resposta do hospedeiro. A compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação e morte plaquetária e o seu papel na fisiopatologia da doença, bem como suas repercussões, é fundamental para a identificação de alvos farmacológicos e terapêuticos mais eficazes para o manejo clínico da doença.

2) Objetivo

2.1) Objetivo geral

Estudar a ativação e apoptose plaquetária durante a infecção malárica por *Plasmodium vivax*.

2.2) Objetivos específicos

- Estudar o transcriptoma de plaquetas de pacientes infectados com *P. vivax* e controles sadios;
- Caracterizar os mediadores inflamatórios no sangue de pacientes com malária vivax e controles sadios;
- Investigar a ativação e apoptose plaquetária nos pacientes com malária vivax;
- Investigar o efeito dos estímulos maláricos heme e hemozoína sintética em plaquetas de voluntários sadios.

3) Metodologia e desenho experimental

3.1) Recrutamento de pacientes: Os pacientes infectados com *P. vivax* foram recrutados na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Amazonas, Manaus (FTM-HVD). Após o paciente ter recebido o diagnóstico de malária vivax, confirmado por análise de gota espessa, abordamos o paciente explicando-lhe que se trata de um estudo de pesquisa com seus benefícios à sociedade, os riscos relacionados à sua participação e as medidas para minimizá-los. Em seguida, o convidamos e o apresentamos o estudo. Apresentamos e explicamos o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Caso tenha concordado em participar do estudo, o paciente assinava dois termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE), sendo que um ficava sob seu poder e outro, em poder da equipe condutora do estudo. O sangue foi coletado previamente ao começo do tratamento antimalárico. O sangue de voluntários sadios (funcionários e pesquisadores da FMT-HVD e acompanhantes de pacientes) que consentiram ao procedimento também foi coletado. O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD (CAAE: 04572612.4.0000.0005 e 47564715.9.0000.0005).

Critérios de inclusão e exclusão para os pacientes: Foram incluídos pacientes com malária vivax de ambos os sexos, com idade variando entre 18 e 65 anos. Foram excluídos pacientes infectados com dengue, pacientes infectados com outra espécie de plasmódio, pacientes que estavam sob tratamento antimalárico, gestantes e pacientes que fizeram uso de anti-inflamatório não esteroidal até 6 h antes da coleta de sangue.

Critérios de inclusão e exclusão para os voluntários sadios: Os voluntários sadios incluídos nos estudos possuíam entre 18 e 65 anos de idade, não apresentavam quadro febril ou outros sintomas e não faziam uso prévio de anti-inflamatórios não esteroidais.

3.2) Detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*: amostras de sangue total de pacientes e de voluntários sadios foram coletadas e armazenadas a -80°C para posterior extração do DNA. Para a extração de DNA total, foi utilizado o kit *FavorPrep 96-well genomic DNA extraction kit* (Favorgen Biotech Corp.) seguindo-se as orientações do fabricante.

Brevemente, o primeiro passo foi a realização da lise celular, para isso, adicionou-se 200 µL de tampão FATG2 e 20 µL de Proteinase k a cada poço da placa de 96 poços. Adicionou-se 200 µL de sangue aos poços da placa, misturando por pipetagem. A placa foi selada e incubada a 60°C por 20 minutos. O próximo passo foi a ligação do DNA à matriz de vidro da placa. Adicionou-se 200 µL de etanol 95 % à cada poço da placa contendo a amostra lisada. Colocou-se uma placa de ligação de DNA em cima de uma nova placa de 96 poços de 2 mL. Em seguida, as amostras que foram misturadas ao etanol, foram transferidas para a placa de ligação de DNA. Colocou-se as placas montadas (placa de ligação do DNA + placa 96 poços de 2mL) na centrifuga por 5 minutos a 6000 x g. O líquido dos poços foi descartado e a placa de ligação de DNA retornada para cima da placa de 96 poços. O terceiro passo foi a lavagem e, para isso, adicionou-se 300 µL de tampão W1 (incluso no kit) a cada poço da placa de ligação de DNA. Em seguida, colocou-se as placas montadas (placa de ligação do DNA + placa 96 poços de 2 mL) na centrífuga a 6000 x g, por 5 minutos. Descartou-se o líquido e adicionou-se 600 µL de tampão de lavagem (contendo etanol) a cada poço da placa de ligação de DNA. Centrifugou-se novamente as placas montadas (placa de ligação do DNA + placa de 96 poços de 2 mL) a 6000 x g, por 5 minutos. O líquido foi descartado e as placas montadas foram novamente centrifugadas por 15 minutos adicionais a 6000 x g de forma a remover o etanol residual. A última etapa foi a eluição do DNA. Colocou-se uma placa limpa de 96 poços para PCR em cima da placa de 96 poços de 2 mL e, em seguida, colocou-se a placa de ligação de DNA em cima da placa limpa de 96 poços para PCR (em cima; placa de ligação do DNA; no meio; placa de 96 poços para PCR; em baixo; placa de 96 poços de 2 mL). Adicionou-se 50-100µL de tampão de eluição na parte central da membrana da placa de ligação do DNA. Aguardou-se por 3 minutos para que o tampão de eluição fosse completamente absorvido pela membrana. Em seguida, colocou-se as placas montadas (placa de ligação do DNA + placa de PCR + placa 96 poços de 2 mL) na centrifuga por 5 minutos a 6000 x g, de forma a eluir o DNA purificado.

Após a extração do DNA, este foi utilizado para a detecção de *P. falciparum* e de *P. vivax* por PCR em tempo real (qPCR). Foram feitas reações de qPCR baseadas na detecção do gene que codifica a fração 18S do rRNA para a identificação do *Plasmodium vivax* e do *P. falciparum*, confirmando a presença de *P. vivax* nos pacientes e a ausência do parasita nos controles.

Abaixo estão apresentados os reagentes que foram utilizados para a reação de qPCR para a determinação de *P. falciparum* e *P. vivax* (Tabela 3.2.1).

Tabela 3.2.1: Reagentes utilizados para a detecção de *P. falciparum* e *P. vivax* por qPCR

Reagente	Concentração	Quantidade
Gene Ex Buffer (Thermo Fisher Scientific)	2x	6 μ l
<i>Primer forward + reverse</i>	10 μ M	1 μ l
<i>Probe</i>	10 μ M	0,5 μ l
Água DEPC	-	2,5 μ l
DNA/plasmídeos		2 μ l

Para o qPCR para *P. vivax* e para *P. falciparum*, utilizou-se os seguintes *primers* específicos para o gene que codifica a 18S rRNA:

Plasmodium vivax

Vivax-forward: GCT TTG TAA TTG GAA TGA TGG GAA T

Vivax-reverse: ATG CGC ACA AAG TCG ATA CGA AG

Plasmodium falciparum

Falciparum-forward: TAT TGC TTT TGA GAG GTT TTG TTA CTT TG

Falciparum reverse: ACC TCT GAC ATC TGA ATA CGA ATG C

Tabela 3.2.2: Condição de amplificação para as 3 reações de qPCR:

Étapa	Temperatura	Tempo (minutos)	Nº de Ciclos
1	50°C	2:00	1
2	95°C	10:00	1
3	95°C	0:15	45
	58°C	1:00	

3.3) Exames laboratoriais

Foi feita uma lâmina de gota espessa de cada paciente. As lâminas foram coradas pelo método de Walker e em seguida, analisadas por um mesmo microscopista da FMT-HVD, que contou o número de parasitos em 500 leucócitos. Em seguida, a parasitemia foi quantificada por mm³ (microlito), utilizando os valores da contagem de leucócitos de cada paciente que foram obtidos no hemograma.

Para a realização do hemograma, uma alíquota de sangue foi aplicada no analisador hematológico (Sysmex).

3.4) Teste para detecção de dengue

Foram realizadas duas metodologias para a detecção de possíveis pacientes infectados com o vírus do dengue. Parte das amostras foi utilizada para a detecção via RT-PCR (detecção do antígeno do vírus) e a outra parte via ELISA (detecção de anticorpo contra o vírus).

Para a detecção por RT-PCR, os testes foram realizados na Gerência de Virologia da FMT-HVD, em Manaus. Alíquotas de plasma foram coletadas e armazenadas a -80°C. Realizou-se a detecção do gene que codifica a proteína NS5, que é uma proteína não estrutural do vírus do Dengue e que está presente em todo o gênero dos flavivirus. Para a detecção de NS5 foi feita uma extração de RNA a partir da técnica de Trizol (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Os *primers* utilizados para detecção de NS5 foram:

- *Forward* (TCAAGGA ACTCCACACATGAGATGTACT)

- *Reverse* (GTGTCC CATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA)

A mistura para a transcriptase reversa continha 8 µL de RNA, 4 µL de tampão 5x (250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1,5 µL de *dithiothreitol* (0,1M), 1 µL do *primer reverse* (15 µM), 1 µL de dNTP, 20 U de inibidor de RNase (RNase OUT- Invitrogen), 200 U de transcriptase reversa (Superscript- Invitrogen) e água para completar 20 µl. A mistura foi incubada a 42 °C por 50 minutos e a 95 °C por 5 minutos para inativar a transcriptase reversa. Para o PCR foi feita uma mistura contendo 8 µl de cDNA, 5 µl de tampão 10x (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl do *primer forward* (15 µM), 1 µl de dNTP, 1 U de DNA polimerase (Platinum *Taq* DNA polymerase- Invitrogen) e água para completar um volume de 50 µl. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C

por 1 minuto, e 72 °C por 2 minutos, seguida de uma etapa de extensão a 72 °C por 5 minutos. Para a detecção das bandas, 10 µl do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 2 %, submetido a eletroforese, corado com brometo de etídio e visualizado com luz U.V.

Para a detecção de IgM, os plasmas foram enviados para a FIOCRUZ, onde se realizou a técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Primeiramente, incubou-se antígenos de Dengue, fornecidos no kit (Panbio), com anticorpo ligado a peroxidase, por 1 hora em temperatura ambiente. Os plasmas foram diluídos 100x antes de serem aplicados na placa fornecida pelo fabricante (Panbio). Em seguida, incubou-se os plasmas, por 1 hora à 37°C, na placa pré coberta com anticorpo anti-IgM. Também foram adicionados na placa os controles positivos e negativos, fornecidos pelo fabricante. Após ambos os períodos de incubação, a placa foi lavada 6x com tampão fornecido no kit. O próximo passo, foi a adição de 100 µL/poço do complexo antígeno-anticorpo com peroxidase à placa. Incubou-se por mais 1 hora à 37°C. A placa foi lavada 6 vezes e depois foram adicionados 100 µL de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) por poço. A placa ficou incubando por cerca de 5 minutos, em temperatura ambiente, e a reação foi interrompida com a adição de ácido fosfórico 1M (Panbio). A leitura foi feita no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Spectra Max).

3.5) Coleta do sangue e obtenção do plasma e plaquetas lavadas

Foram coletados 20 mL de sangue de cada doador usando seringas contendo ácido citrato dextrose- ACD (ácido cítrico 8 g/L, citrato de sódio 22,4 g/L, glicose 2 g/L, pH 5,1) e com agulha de 21 G. Após a coleta o sangue foi transferido para um tubo cônico de 50 ml, que foi centrifugado a 900 rpm por 20 minutos, sem freio. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi coletado e transferido para outro tubo cônico de 50 mL. Ao PRP adicionou-se prostaglandina E₁ (PGE₁, Cayman Chemical) e centrifugou-se a 1.500 rpm, 20 minutos, sem freio. Após a centrifugação o plasma foi armazenado a -80°C em diferentes alíquotas e as células foram ressuspensas em tampão PSG (pipes 5mM, NaCl 145 mM, glicose 5,5 mM, KCl 4 mM, Na₂HPO₄ 50 µM, pH 6,8) e 300 nM de PGE₁. Foi feita uma nova centrifugação de 1.500 rpm, 20 minutos, sem freio e o sobrenadante foi descartado. Novamente, adicionou-se PSG e 300 nM de PGE₁ para ressuspender as plaquetas, que foram centrifugadas a 1.500 rpm, 20 minutos, sem freio. O sobrenadante

foi descartado e as plaquetas foram ressuspensas em meio 199 (L-glutamina, HEPES e NaHCO_3) (Lonza). A contagem das plaquetas foi feita em micro hematócrito ou em analisador hematológico (Sysmex). A contagem de plaquetas utilizando o micro hematócrito é feita aplicando-se a solução de plaquetas no capilar de vidro e centrifugando no equipamento. Em seguida, o *pellet* de células é medido no cartão para leitura de microhematócrito, obtendo-se a concentração/mL de plaquetas.

3.6) Obtenção de plaquetas purificadas:

O sangue coletado foi centrifugado a 900 rpm, 20 minutos, sem freio. O PRP foi transferido para um tubo cônico de 50 ml e em seguida, adicionou-se PGE_1 . Centrifugou-se o PRP por 20 minutos a 1500 rpm, sem freio e coletou-se o plasma, que foi armazenado a -80°C . Adicionou-se solução contendo albumina humana (Sigma) a 0,5 %, EDTA 2 mM em PBS (NaCl , KCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , pH 7,4) ao *pellet* de células e também PGE_1 para evitar a ativação plaquetária durante a purificação. Após ressuspender as células, estas foram transferidas para um tubo apropriado para a purificação magnética de células (BD). Em seguida, adicionou-se os anticorpos anti-CD45 (Stemcell Technologies), de forma a eliminar os leucócitos e assim realizar uma seleção negativa de plaquetas. Deixou-se incubando por 10 minutos e, em seguida, adicionou-se as nanopartículas magnéticas (Stemcell Technologies). Os anticorpos anti-CD45 são capazes de reconhecer as partículas de dextran, que envolvem as nanopartículas magnéticas, e o antígeno CD45. Após 10 minutos de incubação, introduziu-se o tubo com as células no magneto (Stemcell Technologies) e incubou-se por mais 10 minutos. O próximo passo foi o de verter o tubo, estando acoplado no magneto, em um tubo cônico de 50 mL. Completou-se a solução de plaquetas purificadas para 25 mL com solução de PSG mais 300 nM de PGE_1 e centrifugou-se a 1500 rpm por 20 minutos, sem freio. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as plaquetas purificadas em tampão Ripa (Tris-HCl 50 mM (Sigma), NaCl 150 mM (Merck), triton (Sigma), dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma), EDTA, pastilha Complete® (Roche) contendo inibidores de protease em água Mili-Q), caso as plaquetas fossem ser usadas para *western blotting*, ou em meio 199. As plaquetas que foram ressuspensas em meio 199, foram contadas em micro hematócrito (Benfer) ou em analisador hematológico (Sysmex). As plaquetas que foram ressuspensas em tampão Ripa, foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.7.2 Procedimento para *western blotting*

As plaquetas purificadas que estavam armazenadas a -20°C foram utilizadas para posterior quantificação de proteína. Quantificaram-se as proteínas utilizando-se a técnica de BCA (*bicinchoninic acid*, Thermo Scientific). Resumidamente, as amostras foram aplicadas ($10\ \mu\text{L}/\text{poço}$) em uma placa de 96 poços de fundo em U. Em seguida, diluiu-se a curva padrão (de 2 a $0,01562\ \text{mg/mL}$), que foi construída através de diluições seriadas a partir da albumina de soro bovino (BSA) fornecida pelo fabricante. Adicionou-se o reagente de trabalho ($70\ \mu\text{L}/\text{poço}$), que foi preparado pela mistura de 50 partes do reagente A com uma parte do reagente B, fornecido pelo fabricante. Após o término da reação, o resultado foi lido em espectrofotômetro a $562\ \text{nm}$.

A partir da dosagem de proteínas, as plaquetas lisadas foram diluídas em tampão Laemmli de forma que fossem adicionados $10\ \mu\text{g}$ de proteínas totais/poço no gel. Em seguida, as proteínas foram desnaturadas através de aquecimento a 100°C por 10 minutos e depois aplicadas no gel.

Em alguns experimentos com plaquetas de voluntários sadios, as plaquetas foram lisadas diretamente em Laemmli 1x, e não em tampão Ripa. Desta forma, essas plaquetas que já se encontravam em tampão Laemmli 1x foram aquecidas a 100°C por 10 minutos. Após o procedimento de desnaturação, aplicou-se $20\ \mu\text{L}$ de cada amostra/poço no gel. O tampão Laemmli 4x consistiu de solução de Trizma Base (Sigma) $1\ \text{M}$ pH 6,8, SDS 8%, glicerol 40 % (Invitrogen), β - mercaptoetanol 20 % (Sigma), azul de bromofenol (Sigma) para colorir e água Milli-Q.

As amostras foram submetidas à eletroforese (em gel de acrilamida 12 %, $1,5\ \text{mm}$, BioRad) com a aplicação de $125\ \text{V}$ por uma hora e meia e em seguida, transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) utilizando tampão de transferência (Tris $25\ \text{mM}$ (Merck), glicina $192\ \text{mM}$ pH 8 (ICN Medicals) e 20 % de metanol (Merck) em água Milli-Q). A transferência foi realizada a $100\ \text{V}$ por 50 minutos em sistema molhado (BioRad). A solução de salina tamponada por Tris 10 x (TBS) continha Tris-HCl $50\ \text{mM}$ pH 7,4 (Merck), NaCl $150\ \text{mM}$ (Merck), em água Mili-Q; e para fazer o TBS 1x bastou-se diluir o TBS 10x em água Milli-Q. Após a transferência, a membrana foi incubada por 2 horas com solução bloqueadora de leite a 5 % em TBS/T (adição de Tween 20 a 0,05 %, Sigma).

Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS/T e incubada *overnight* com

um dos seguintes anticorpos: anticorpo policlonal anti-caspase 3 (Cell Signaling), anti-caspase 9 (Cell Signaling) e anti-Bcl-xL (BD Pharmingen). Para a diluição dos anticorpos contra as caspases 3 e 9, utilizou-se a proporção 1:1000 em leite desnatado a 5% em TBS/T e para o anti-Bcl-xL uma diluição de 1:500. Após este tempo, as membranas foram lavadas com TBS/T. As proteínas de interesse foram, então, identificadas pela incubação da membrana com anticorpos secundários conjugados a peroxidase (HRP) anti-coelho para as caspases (Vector) e anti-camundongo (Vector) para o Bcl-xL, ambos diluídos em leite a 5 % em TBS/T na concentração de 1:10.000. A detecção foi feita com o sistema de análise de “*Western Blotting Supersignal Chemiluminescence*” (Pierce) e a membrana exposta a filme de autoradiografia (GE Healthcare). Para o controle de carregamento, incubou-se a membrana por uma hora com anticorpo anti- β -actina (Abcam) diluído a 1:10.000 também em leite a 5 % em TBS/T, seguida pela incubação com anticorpo anti-camundongo (Vector) diluído em leite a 5% em TBS/T na concentração de 1:10.000.

3.8) Quantificação de citocinas e quimiocinas:

Os plasmas foram utilizados para a dosagem de diversos mediadores inflamatórios através da técnica de Luminex, utilizando kit Bio-Plex (Biorad) e seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, a curva foi preparada e os plasmas foram diluídos (10x) em tampão fornecido pelo fabricante. As *beads* magnéticas, conjugadas a anticorpos para os mediadores de interesse, foram adicionadas à placa de 96 poços (50 μ L/poço). O próximo passo foi a adição das amostras e da curva padrão (50 μ L/poço). A placa contendo as amostras e a curva foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Após 3 lavagens (100 μ L/poço), adicionou-se o anticorpo de detecção biotilado (25 μ L/poço). A placa foi incubada por 30 minutos, protegida da luz, a temperatura ambiente, com agitação. Em seguida, a placa foi novamente lavada 3 vezes (100 μ L/poço) e a solução de streptavidina conjugada à ficoeritrina (do inglês, *phycoerythrin* ou PE) foi adicionada (50 μ L/poço). Incubou-se por 10 minutos, protegido da luz, com agitação e, depois, lavou-se 3 vezes (100 μ L/poço). A última etapa consistiu em agitar a placa por 30 segundos e analisar no equipamento Multiplex (Milliplex-Millipore).

As quimiocinas RANTES e PF4 (R&D, dual set) foram quantificadas no plasma dos pacientes e controles através da técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked*

Immunosorbent Assay). Placas de fundo chato foram cobertas com o anticorpo de captura (50 μL /poço) e incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com solução de lavagem (PBS/Tween 0,05%, Sigma) e incubadas durante 1 hora com a solução de bloqueio (PBS/BSA-Sigma 1%) a temperatura ambiente. A curva padrão foi diluída em solução de bloqueio adicionada de Tween 20 (Sigma) a 0,05 %. A curva padrão e os plasmas foram aplicados nas placas (50 μL /poço), e incubados *overnight* a 4°C. No 3° dia, após a lavagem das placas com solução de lavagem, o anticorpo de detecção foi adicionado (50 μL /poço), também diluído em solução de bloqueio/Tween 20 a 0,05 %. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, adicionou-se avidina-peroxidase (diluição 1:200 a temperatura ambiente, RD). Após 30 minutos, as placas foram lavadas com solução de lavagem e, em seguida, adicionou-se a solução de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina, Sigma) e se esperou a reação acontecer. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico (Próquimios) 0,4 N (50 μL /poço) e a leitura foi feita no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Spectra Max).

3.9) Quantificação de hemopexina e haptoglobina no plasma

Os plasmas obtidos de pacientes com malária vivax e controles sadios foram utilizados para a dosagem de hemopexina e haptoglobina, através da técnica de ELISA. Em ambos os kits (Immunology Consultants Laboratory- ICL) realizou-se os mesmos procedimentos, sendo as únicas diferenças os fatores de diluição das amostras e os períodos de incubação. Inicialmente, as curvas foram preparadas utilizando padrões de haptoglobina e hemopexina humanas (200 ng/mL). Em seguida, as amostras foram diluídas utilizando diluente fornecido pelo fabricante. Os plasmas utilizados na dosagem de hemopexina foram diluídos 40.000 vezes e para a dosagem de haptoglobina 50.0000 vezes. Após as diluições, tanto os plasmas como as curvas (100 μL /poço) foram aplicadas nas placas já fornecidas no kit (cobertas com anticorpos anti-haptoglobina e anti-hemopexina). As placas foram, então, incubadas em temperatura ambiente, por 30 minutos (para a hemopexina) ou por 15 minutos (para a haptoglobina). Após as incubações, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem fornecida pelo kit e, em seguida, adicionou-se anticorpo conjugado à peroxidase (100 μL /poço). As placas foram incubadas por 30 minutos (para a hemopexina) ou por 15 minutos (para a haptoglobina) em temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se uma nova etapa de

lavagem e, logo após, adicionou-se 100 μL /poço de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). Após um período de incubação de cerca de 5-10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 0,3 M (100 μL /poço) e a leitura foi feita no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Spectra Max).

3.10) Detecção de agregados plaqueta-monócito:

Após a coleta de 20 mL de sangue, uma alíquota de 2,5 mL foi incubada com 12 mL de Facs Lysis Buffer 1x (BD) por 10 minutos em temperatura ambiente, de forma a lisar as hemácias e fixar as células. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 1500 rpm, sem freio. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em HT *buffer* (Hepes 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, MgCl_2 1 mM, NaHCO_3 12 mM, Na_2HPO_4 0,4 mM, albumina de soro bovino 0,35 %, glicose 5,5 mM, pH 7,4). As plaquetas foram marcadas com anticorpos anti-CD41 (BD Pharmingen) e os monócitos com anti-CD14 (BD Pharmingen). Após 20 minutos de incubação com os anticorpos, foram adicionados 250 μL de Facs Lysis em cada tubo e as células foram armazenadas a 4°C até o momento da leitura em um citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD). As análises foram realizadas utilizando o programa Cell Quest (BD).

3.11) Citometria de fluxo:

3.11.1) Análise da expressão de P-selectina

Para a análise da expressão de P-selectina, 20 μL de sangue foram diluídos em 180 μL de HT *buffer*. Como controle positivo, alguns tubos receberam ADP (Sigma) a uma concentração final de 1 μM por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se os anticorpos anti-CD41 (BD Pharmingen), anti-CD62P (BD Pharmingen) ou os controles de isotipo (BD Pharmingen). Incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente e em seguida, adicionou-se 250 μL de paraformaldeído 4 %, pH 7,2 (Sigma). Deixou-se incubando por 10 minutos em temperatura ambiente e depois foi feita a análise no citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD).

3.11.2) Análise da ativação de caspases

Para a detecção das caspases ativadas 9 e 3/7, plaquetas lavadas de pacientes e controles sadios foram incubadas por 1 hora a 37°C, 5 % CO_2 , com sondas específicas que detectam as caspases ativadas, FAM-DEVD-FMK, para as caspases 3 e 7, e FAM-

LEHD-FMK, para a caspase 9 (Immunochemistry). Após o período de incubação, adicionou-se 200 µL de tampão de lavagem 1x (acompanha o kit, Immunochemistry) e as plaquetas foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e se adicionou mais 200 µL de tampão de lavagem para ressuspender as células. Novamente, centrifugou-se a 6000 rpm por 5 minutos, sem freio, para em seguida, descartar o sobrenadante. As plaquetas foram ressuspensas em tampão PSG e os anticorpos foram adicionados: anti-CD41 PE (BD Pharmingen) e isotipo controle (BD Pharmingen). Alguns tubos receberam trombina (Sigma) a 1 u/mL por 15 minutos como controle positivo, antes da adição dos anticorpos. Após a adição dos anticorpos, incubou-se por 20 minutos, protegido da luz, temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 3,5 µL do fixador que acompanha o kit, incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente e depois foi feita a leitura no citômetro de fluxo (FacsCalibur, BD).

3.11.3) Análise da exposição de fosfatidilserina

Plaquetas de voluntários sadios foram incubadas com anexina V (BD Pharmingen) para a detecção da expressão de fosfatidilserina. Para isso, plaquetas lavadas foram incubadas com tampão de ligação que acompanha o kit (BD Pharmingen). Alguns tubos receberam trombina (Sigma) a 1 u/mL por 15 minutos como controle positivo, antes da adição do tampão de ligação. Em seguida, adicionou-se a anexina V (BD Pharmingen) e os anticorpos anti-CD41 PE (BD Pharmingen) ou isotipo controle (BD Pharmingen). Incubou-se por 20 minutos, temperatura ambiente. Após o período de incubação foram adicionados 300 µL de tampão de ligação e as amostras foram lidas no citômetro de fluxo (Facs Calibur, BD) em, no máximo, 1 hora.

3.12) Preparo do heme e da hemozóina

O heme foi preparado pela adição de 13,2 mg de hemina (Frontier Scientific) em 1 mL de DMSO, de forma que ficasse na concentração de 20 mM. Essa solução estoque foi mantida protegida da luz a -20°C até o momento do uso. No dia do experimento, a solução estoque foi descongelada, submetida ao ultra-som por 20 minutos e diluída 10 vezes em NaOH 0,25N. Em seguida, a solução de heme foi diluída em meio 199 para ser usada nas plaquetas em diferentes concentrações.

A hemozoína sintética (sHz) foi preparada a partir de hemina (Frontier Scientific). Foram dissolvidos 39,2 mg de hemina em 8 mL de NaOH a 0,1M. O tubo contendo a solução ficou no vortex por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 49 mmol de ácido acético e a solução foi incubada a 75°C *overnight*. No dia seguinte, centrifugou-se os tubos a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de água Milli Q. Os tubos foram colocados no vortex por 1 minuto e depois novamente centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos. O processo de descarte de sobrenadante, adição de água Milli Q e centrifugação foi repetido 4 vezes. Após a última lavagem, adicionou-se solução contendo NaHCO₃ 0,1 N e SDS 2,5%. Os tubos foram colocados no vortex por 5 minutos e depois novamente centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos. A adição de solução de NaHCO₃ (pH 9,1) e SDS, centrifugação e descarte do sobrenadante foi repetida 4 vezes. Após a última centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de água Milli Q em cada tubo para lavar os cristais. Homogeneizou-se o pellet com a pipeta e centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos, a temperatura ambiente. Repetiu-se esse processo de lavagem mais 3 vezes e na última lavagem, descartou-se o sobrenadante. Os tubos contendo a sHz foram secos dentro do fluxo laminar e, em seguida, armazenados em geladeira até o uso.

Para a quantificação da sHz, inicialmente foi preparada uma curva padrão. Para isso, adicionou-se 13,2 mg de hemina (Frontier Scientific) em 1 mL de DMSO de forma que a concentração ficasse a 20 mM e levou-se o tubo ao vortex por 30 minutos. Em seguida, a solução foi diluída em NaOH 0,1M até que se alcançasse a concentração de 1 mM, que foi utilizada como o primeiro ponto da curva. Em seguida, realizou-se uma diluição seriada em NaOH. Uma alíquota da sHz preparada foi diluída em NaOH 0,1 N e, juntamente com a curva padrão, lida em espectrofotometro a 400 nm.

3.13) Experimentos *in vitro*

3.13.1) Estímulo de plaquetas com heme e hemozoína

Plaquetas de voluntários sadios foram ajustadas para uma concentração de 1 x 10⁸/mL em meio 199 (Lonza). As plaquetas foram transferidas para tubos eppendorfs e, em seguida, foram adicionados os estímulos heme, nas concentrações de 1 µM e 10 µM, e hemozoína sintética na concentração de 20 µM. As plaquetas foram transferidas para estufa a 37°C com 5% de CO₂ e incubada por diferentes tempos.

As amostras que foram processadas para *western blotting*, após o período de

incubação, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e o *pellet* de células lisado em 100 µL de tampão Laemmli 1x. Em seguida, as amostras foram congeladas até o momento do uso.

Nas plaquetas que foram analisadas por citometria foram feitos os protocolos descritos nos itens 3.11.2 e 3.11.3, para as análises de ativação de caspases e de exposição de fosfatidilserina, respectivamente.

3.13.2) Estímulo de plaquetas com heme e inibidores

Plaquetas purificadas de voluntários sadios foram ajustadas para uma concentração de 1×10^8 /mL em meio 199 (Lonza). As plaquetas foram transferidas para tubos eppendorfs e, em seguida, foram adicionados diferentes inibidores, 15 minutos antes da adição do heme. Foram utilizados o quelante de cálcio EGTA a 5 mM, o inibidor de proteassoma Epoxomicina (Calbiochem) a 10 µM e os inibidores de calpaína MDL 28170 (Tocris Bioscience) a 50 µM e Calpeptina (Calbiochem) a 50 µM. Após a adição do heme, as plaquetas foram transferidas para estufa a 37°C com 5% de CO₂ e foram incubadas por 5 horas.

Alguns tubos receberam ionóforo de cálcio A23187 (Sigma) a 1 µM, como controle positivo, também 15 minutos antes da adição dos inibidores de calpaína ou proteassoma e, em seguida, foram incubados por 1 hora na estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Após o período de incubação, os tubos foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e o *pellet* de células foi lisado em 100 µL de tampão Laemmli 1x. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.13.3) Estimulo de plaquetas com plasmas

Plaquetas purificadas de voluntários sadios foram ajustadas para uma concentração de 1×10^8 /mL em plasma de paciente infectado com *P. vivax* ou com plasma de outro doador sadio (o plasma do doador sadio nunca era da mesma pessoa que doou as plaquetas). Em seguida, incubou-se por 90 minutos ou por 5 horas a 37°C com 5% de CO₂. Ao final da incubação, realizou-se o protocolo de marcação para a detecção de caspase 9 por citometria de fluxo (descrito no item 3.11.2).

3.14) Sequenciamento e análise do transcriptoma de plaquetas: Plaquetas isoladas de pacientes e controles sadios foram lisadas em Trizol (Invitrogen) e o RNA foi extraído seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, as amostras foram incubadas com 200 μ L de clorofórmio (Sigma) por 5 minutos a temperatura ambiente, misturadas por 2 minutos e centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos e a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado pela adição de 700 μ L de álcool isopropílico (Sigma). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos e depois centrifugadas a 14.000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol a 75 % e, em seguida, centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4°C, seco (ou seja, esperou-se a evaporação do álcool em capela) e dissolvido em água livre de RNase e depois tratado com TurboDNase (Ambion). O RNA tratado com DNase foi precipitado com etanol (3 vezes o volume) e acetato de sódio (um décimo do volume) e depois foi lavado novamente com etanol a 70 %. A integridade do RNA foi analisada utilizando-se o equipamento Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies). O mRNA de cauda poli(A) foi preparado pela Plataforma da Universidade de Utah e utilizado para criar bibliotecas para os estudos de sequenciamento. Para a criação das bibliotecas, o mRNA foi fragmentado quimicamente para, em seguida, sofrer transcrição reversa utilizando *primers* que possuem sequências aleatórias (*random primers*). A fragmentação gera bibliotecas de RNA com insertos que variam de 100 a 400 pares de base. O sequenciamento, a leitura das sequências e a análise dos dados foram feitos no Illumina, com a ajuda da Plataforma da Universidade de Utah e dos integrantes do laboratório do Dr. Guy Zimmerman e Dr. Andrew Weyrich.

3.15) Análise estatística:

Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism versão 5.0. A análise da normalidade foi feita com o teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados não paramétricos foram analisados utilizando-se o teste Mann-Whitney e os dados normais com o teste t. As correlações foram analisadas com o teste de Spearman. Foram considerados significativos valores inferiores a 0,05 ($p < 0,05$). Os dados apresentados na seção a seguir estão representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M) ou com os valores de mediana, mínimo e máximo.

A tabela com a função dos genes obtidos no RNAseq foi feita com a ajuda do

programa Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) versão 6.7.

4) Resultados

4.1) Dados clínicos e laboratoriais

Foram inclusos 82 pacientes com malária vivax no estudo e 44 controles sadios (Tabela 4.1.1). Previamente a coleta de sangue, realizou-se uma entrevista com os doadores (pacientes e controles) e mediu-se a temperatura corporal somente dos pacientes. O sangue dos pacientes foi coletado antes do início do tratamento anti-malárico e foi utilizado para a realização do hemograma. Não encontramos nenhum paciente infectado com *P. falciparum* e nem com o vírus da Dengue (Dados não mostrados).

Tabela 4.1.1: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com malária causada por *Plasmodium vivax* e dos voluntários sadios. Foi considerado estatisticamente significante diferenças com $p < 0,05$. Dados mostrados como mediana, mínimo e máximo.

Dados clínicos e laboratoriais	Controle	Vivax	p valor
	Idade (anos)	29 (24-45)	37 (18-52)
Gênero (%)	M (48%) F(52%)	M(78%) F(22%)	
Leucócitos totais ($\times 10^3/uL$)	5,6 (4,3-7,9)	4,3 (1,5-10,10)	0,0015
Neutrófilos ($\times 10^3/uL$)	2,70 (2,3-5,0)	2,80 (1,2-8,6)	0,4249
Linfócitos ($\times 10^3/uL$)	1,90 (1,4-2,5)	0,90 (0,2-3,1)	0,0005
Plaquetas ($\times 10^3/uL$)	223 (103-312,0)	72,5 (20-202)	< 0,0001
Volume médio plaquetário	8,4 (7,7-10,50)	9,4 (6,9-12,30)	0,0014
Hemácias ($\times 10^6/mL$)	4,530 (3,8-5,930)	4,325 (2,490-8,250)	0,9064
Nº de malárias	x	3,9	x
Parasitemia (mm^3)	x	3051,38	x
Hemoglobina (g/dL)	12,70 (9,9-16,6)	12,70 (7-22,4)	0,5654
Temperatura corporal (°C)	x	37 (36-40,5)	x

* M: masculino; F: feminino

Os pacientes apresentaram uma queda no número de leucócitos totais que se caracterizou por uma redução no número de linfócitos, quando comparado aos

voluntários sadios. Não houve diferença nos níveis de hemoglobina e nem de hemácias em relação aos controles sadios (Tabela 4.1.1).

Dos 82 pacientes incluídos no estudo, 71 (87 %) se encontravam plaquetopênicos, ou seja, com contagem de plaquetas abaixo de 150.000/uL. Ao verificar a presença de pacientes com plaquetopenia grave, observamos que 12 (15 %) se encontravam com contagem de plaquetas abaixo de 50.000/uL.

Observamos um aumento do volume plaquetário médio (MPV) em relação ao controles (Tabela 4.1.1). Além disso, houve uma correlação negativa (p 0,0021 e Spearman r -0,5402) entre o MPV e a contagem de plaquetas nos pacientes. Não observamos correlação entre a contagem de plaquetas e a parasitemia e também entre a contagem de plaquetas e o número de vezes que os pacientes tiveram malária (dados não mostrados).

4.2) Estudo do transcriptoma de plaquetas de pacientes infectados com *P. vivax* e voluntários sadios

Realizamos o sequenciamento do transcriptoma de plaquetas de 7 pacientes com malária vivax e de 7 controles sadios. Dos 7 pacientes que tiveram o transcriptoma analisado, um não se encontrava plaquetopênico, com número de plaquetas de 177×10^3 /uL; cinco pacientes possuíam plaquetopenia branda, com contagens de 120, 116, 79, 69 e 60 ($\times 10^3$ /uL); e um paciente se encontrava com plaquetopenia grave, com contagem de 36×10^3 /uL.

Após análise do transcriptoma, observamos 215 genes que tinham sua expressão aumentada, pelo menos 2 vezes, nos pacientes em relação aos controles; 189 genes que possuíam sua expressão diminuída, pelo menos pela metade, nos pacientes e 11.139 genes que não se alteraram entre os dois grupos (Figura 4.2.1).

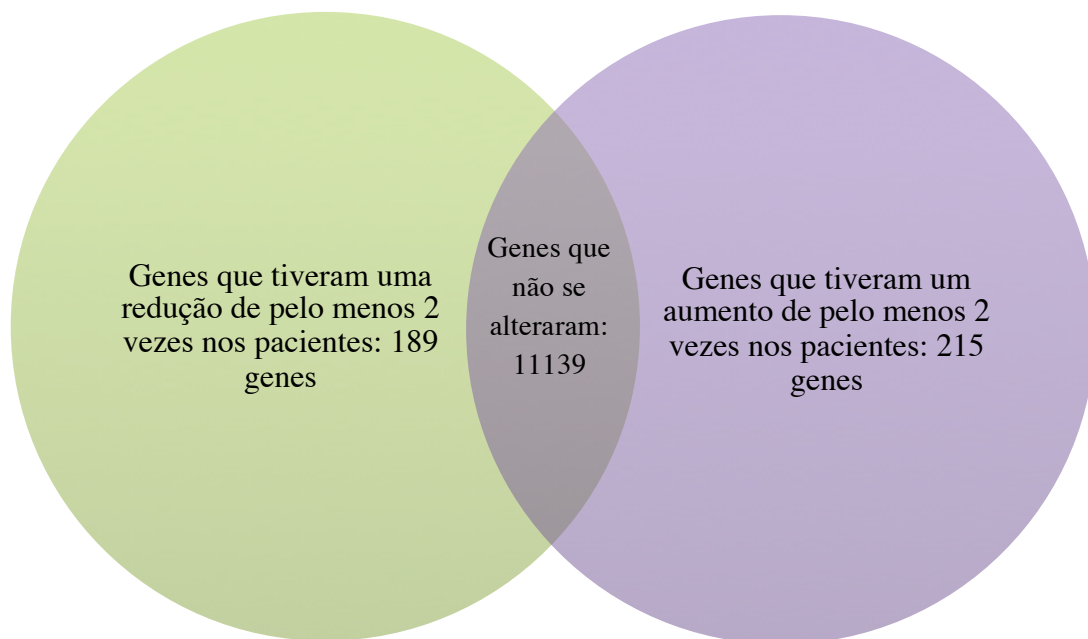
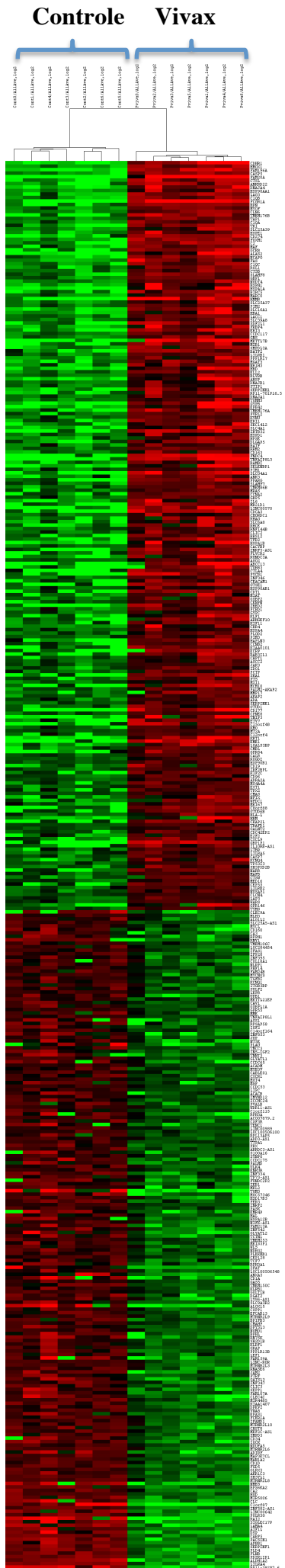


Figura 4.2.1: Diagrama de Venn demonstrando o número de genes que sofreram ou não alterações na expressão em plaquetas de pacientes com malária vivax em relação aos de controles sadios. Foram coletados 20 mL de sangue de 7 pacientes e 7 doadores sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas utilizando-se kit com anticorpo anti-CD45 para depleção de leucócitos contaminantes. O próximo passo foi a extração do RNA e a realização da técnica de RNAseq para a obtenção do transcriptoma plaquetário. No diagrama estão representados em lilás os genes que tiveram um aumento na expressão de pelo menos 2 vezes, em verde os que sofreram uma redução de pelo menos metade, e em cinza os que não tiveram alteração nos pacientes em relação aos controles.

Outra forma de expressar os dados do transcriptoma plaquetário é através do *heat map* (Figura 4.2.2). Nesta caso, representamos somente os genes que sofreram alterações nos pacientes em relação aos controles, ou seja, os 189 genes que sofreram redução e os 215 que sofreram um aumento.



215 genes com expressão aumentada nos pacientes

■ Maior expressão
■ Menor expressão

189 genes com expressão diminuída nos pacientes

Figura 4.2.2: Heat map do transcriptoma plaquetário de voluntários sadios e pacientes com malária vivax. Foram coletados 20 mL de sangue de pacientes e doadores sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas utilizando-se kit com anticorpo anti-CD45 para depleção de leucócitos contaminantes. O próximo passo foi a extração do RNA e a realização da técnica de RNAseq para a obtenção do transcriptoma plaquetário. No heat map estão representados os 215 genes que tiveram sua expressão aumentada e os 189 genes que tiveram sua expressão diminuída em plaquetas de pacientes em relação aos controles. Os sete controles sadios se encontram nas sete primeiras colunas do lado esquerdo, seguidos de sete pacientes com malária vivax.

Ao realizar uma análise preliminar dos dados, utilizando o programa DAVID, observamos a presença de 53 genes relacionados à regulação de apoptose que se encontravam diferencialmente expressos nas plaquetas de pacientes em relação as plaquetas de voluntários sadios (dados não mostrados). Dentre esses genes, destacamos três que tiveram aumento de expressão nos pacientes, que são os genes para as caspases 3 e 7 e o FAS (Figura 4.2.3). Também observamos uma diminuição de expressão do gene para a proteína Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, nas plaquetas de pacientes com malária vivax (Figura 4.2.3).

Observamos também um aumento na expressão em plaquetas de pacientes, de um importante gene relacionado a ativação plaquetaria, o da P-selectina (Figura 4.2.4). Também observamos aumento na expressão, em plaquetas de pacientes, para os genes das caspases inflamatórias 4 e 5 (Figura 4.2.4), que são caspases que possuem como principal função a regulação de processos inflamatórios e parecem não estar relacionadas com apoptose (Martinon e Tschopp, 2004).

O gene na qual houve o maior aumento de expressão nos pacientes foi o da heme-oxigenase-1 (Figura 4.2.5). Também observamos o aumento de expressão da biliverdina-redutase, enzima que faz parte do catabolismo do heme, transformando biliverdina em bilirrubina (Figura 4.2.5).

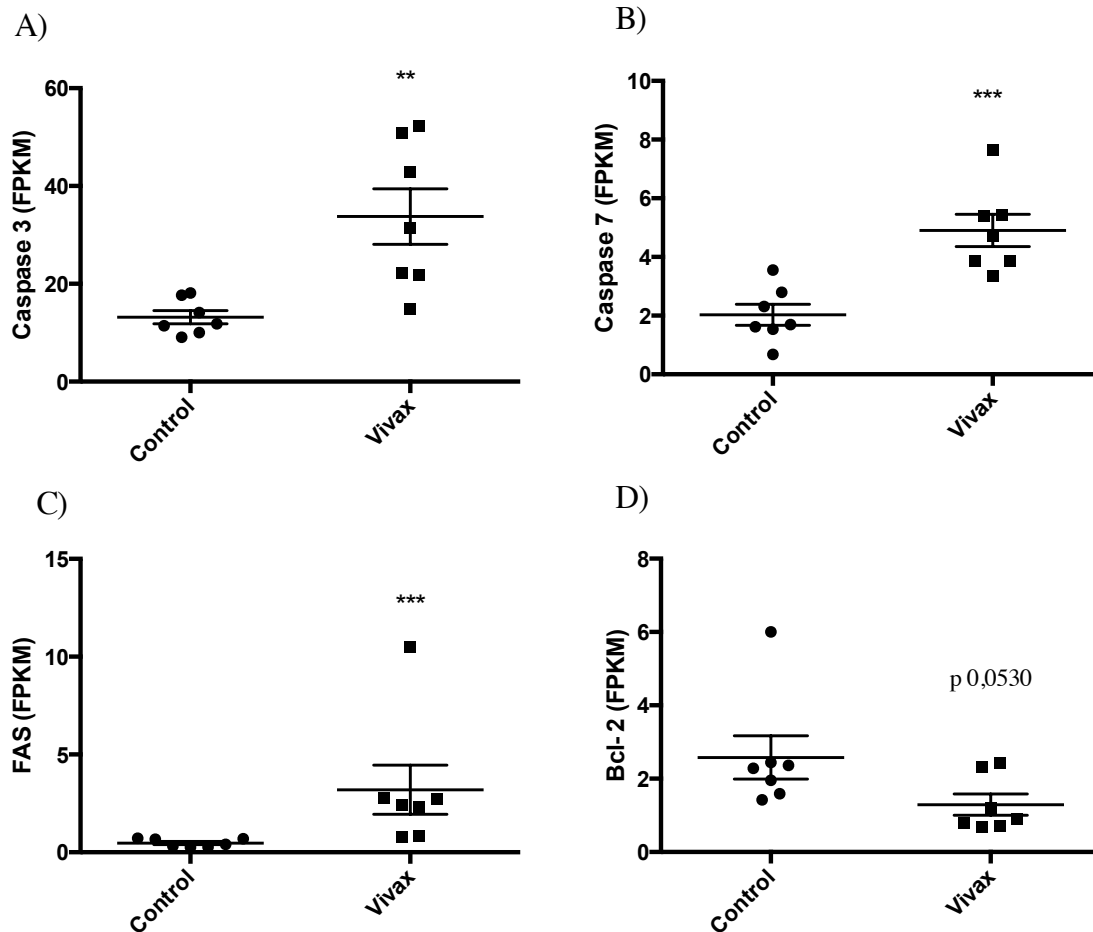


Figura 4.2.3: Análise da expressão de genes para a caspase 3, caspase 7, Fas e Bcl-2 de plaquetas isoladas de voluntários saudáveis e pacientes com malária vivax. Foram coletados 20 mL de sangue de pacientes e doadores sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas utilizando-se kit para depleção de leucócitos contaminantes usando anticorpo anti-CD45. O próximo passo foi a extração do RNA e a realização da técnica de RNAseq para a obtenção do transcriptoma plaquetário. No gráfico estão representados as leituras para os genes da caspase 3 (A), caspase 7 (B), Fas (C) e Bcl-2 (D). Os asterísticos representam a diferença entre os 2 grupos sendo (***) $p < 0,0005$ e (**) $p < 0,005$. A quantidade de mRNA foi representada em leituras por kilobase de éxons por milhões de leituras mapeadas (RPKM – do inglês, fragments per kilobase of exon model per million mapped reads) como anteriormente descrito (Rowley et al, 2011). O gene para CD45 foi usado como controle da contaminação por leucócitos.

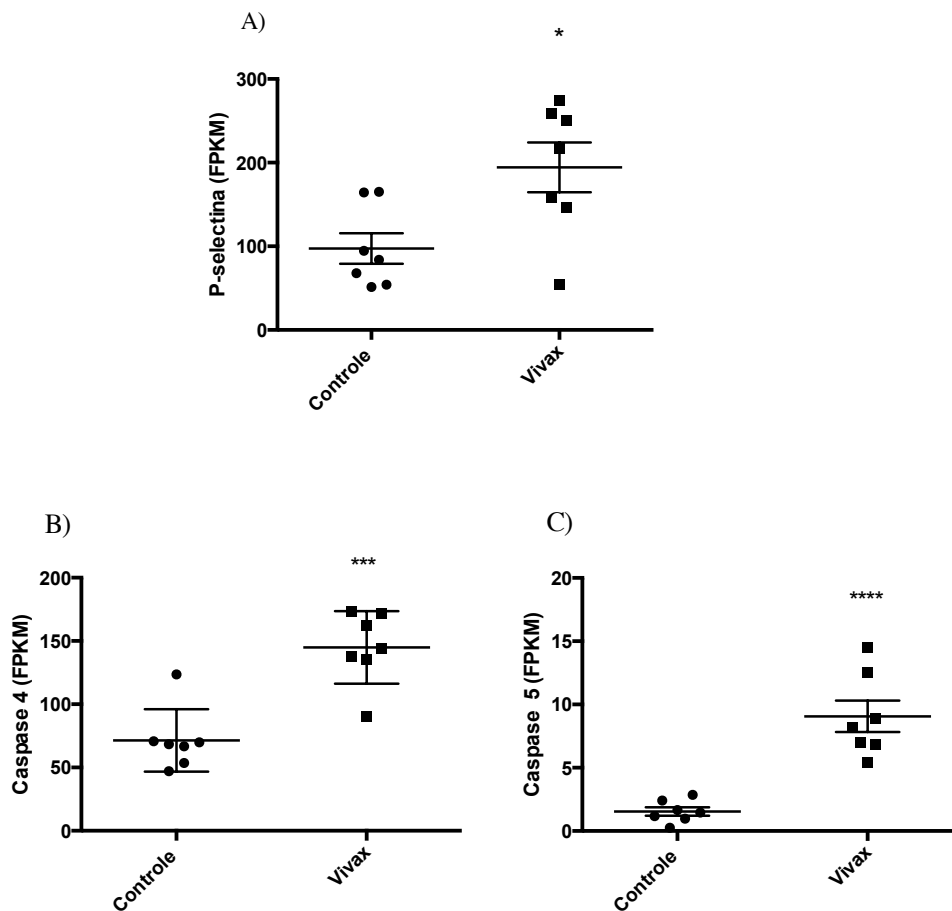


Figura 4.2.4: Expressão de genes para P-selectina, caspase 4 e caspase 5 de plaquetas isoladas de voluntários saudáveis e pacientes com malária vivax. Foram coletados 20 mL de sangue de pacientes e doadores sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas utilizando-se kit para depleção de leucócitos contaminantes usando anticorpo anti-CD45. O próximo passo foi a extração do RNA e a realização da técnica de RNAseq para a obtenção do transcriptoma plaquetário. No gráfico estão representados as leituras para os genes da P-selectina (A), caspase 4 (B) e caspase 5 (C). Os asterísticos representam a diferença entre os 2 grupos, sendo (***) $p < 0,0002$ e (****) $p < 0,0001$. A quantidade de mRNA foi representada em leituras por kilobase de éxons por milhões de leituras mapeadas (FPKM – do inglês, fragments per kilobase of exon model per million mapped reads) como anteriormente descrito (Rowley et al, 2011). O gene para CD45 foi usado como controle da contaminação por leucócitos.

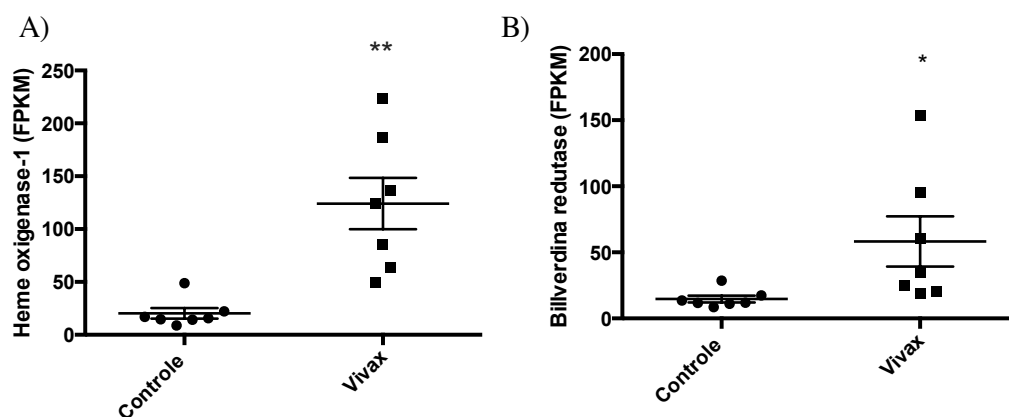


Figura 4.2.5: Expressão de genes para heme oxigenase-1 e biliverdina redutase de plaquetas isoladas de voluntários saudáveis e pacientes com malária vivax. Foram coletados 20 mL de sangue de pacientes e doadores sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas utilizando-se kit com anticorpo anti-CD45 para depleção de leucócitos contaminantes. O próximo passo foi a extração do RNA e a realização da técnica de RNAseq para a obtenção do transcriptoma plaquetário. No gráfico estão representados as leituras para os genes da heme-oxigenase-1 (A) e biliverdina redutase (B). Os asterísticos representam a diferença entre os 2 grupos, sendo (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,001$. A quantidade de mRNA foi representada em leituras por kilobase de éxons por milhões de leituras mapeadas (FPKM – do inglês *fragments per kilobase of exon model per million mapped reads*) como anteriormente descrito (Rowley *et al*, 2011). O gene para CD45 foi usado como controle da contaminação por leucócitos.

4.3) Caracterização dos mediadores inflamatórios

Citocinas liberadas durante uma resposta inflamatória aguda podem contribuir para a plaquetopenia. Trabalhos já demonstraram que pacientes com malária vivax plaquetopênicos possuem níveis elevados de diversas citocinas, como IL-1, IL-6 e IL-10, quando comparados com os não-plaquetopênicos (Park *et al*, 2003; Coelho *et al*, 2013). Desta forma, resolvemos investigar se os pacientes incluídos no estudo apresentavam alterações no padrão de produção de citocinas e quimiocinas importantes na malária. Após a coleta de sangue, o plasma foi separado por centrifugação e utilizado para a dosagem de mediadores.

Os pacientes com malária vivax apresentaram um aumento na quimiocina MCP-1 e nas citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e INF- γ quando comparados aos controles sadios. Não foi observada nenhuma diferença nos níveis de IL-12 e TNF- α em relação aos controles (Figura 4.3.1).

No entanto, não observamos correlações entre a contagem de plaquetas dos pacientes e os níveis das citocinas analisadas no Luminex. De forma similar, não observamos diferenças entre os níveis desses mediadores quando estratificamos os pacientes, entre plaquetopênicos grave (plaquetas $< 50 \times 10^3/\mu\text{L}$) e não grave (plaquetas $> 50 \times 10^3/\mu\text{L}$), e comparamos esses dois grupos (dados não mostrados).

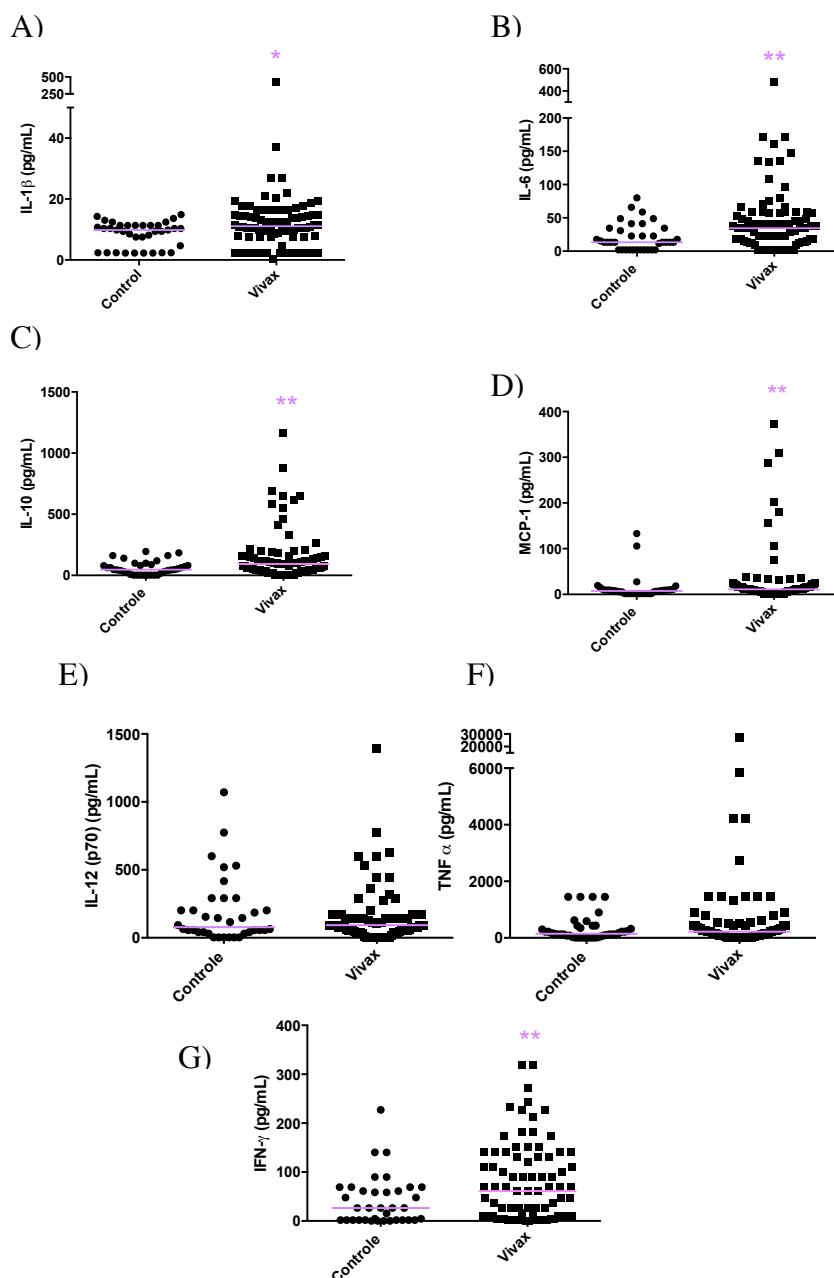


Figura 4.3.1: Mediadores inflamatórios plasmáticos nos pacientes com malária vivax e nos voluntários sadios. Foram coletados 20 mL de sangue em seringa contendo anticoagulante ACD. O sangue de pacientes foi coletado antes do início do tratamento anti-malárico e o plasma foi obtido por centrifugação e armazenado a -80°C até a sua utilização. Para a dosagem dos mediadores foi feita a técnica de Luminex. Os seguintes mediadores foram analisados: IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), MCP-1 (D), IL-12 (E), TNF- α (F) e INF- γ (G). Foi considerado estatisticamente

*significante diferenças com $p < 0,05$. A barra representa a mediana dos dados. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.*

Também foram observados aumentos significativos das quimiocinas RANTES e PF4 nos plasmas do pacientes em relação aos controles (Figura 4.3.2 A e B). Quando estratificamos os valores de RANTES entre pacientes com plaquetopenia grave (plaquetas $< 50 \times 10^3/\mu\text{L}$) e os pacientes com plaquetas $> 50 \times 10^3/\mu\text{L}$, observamos que os pacientes com plaquetopenia grave possuem níveis de RANTES menores do que os pacientes que possuem plaquetas com valores maiores do que $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Figura 4.3.2 C). Quando comparamos os valores de RANTES de controles sadios com os valores de pacientes com plaquetas acima de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$, observamos um aumento dos níveis desta quimiocina nos pacientes em relação aos controles (Figura 4.3.2 C). Houve uma correlação positiva entre os níveis de RANTES e a contagem de plaquetas nos pacientes (Figura 4.3.2 D). Realizamos a mesma estratificação entre pacientes com plaquetas acima e abaixo $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ com os valores de PF4, porém, não houve diferença entre esses dois grupos (Figura 4.3.2 E). Pacientes tanto com plaquetopenia grave como com plaquetas acima de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ tiveram níveis de PF4 acima dos valores dos controles sadios (Figura 4.3.2 E).

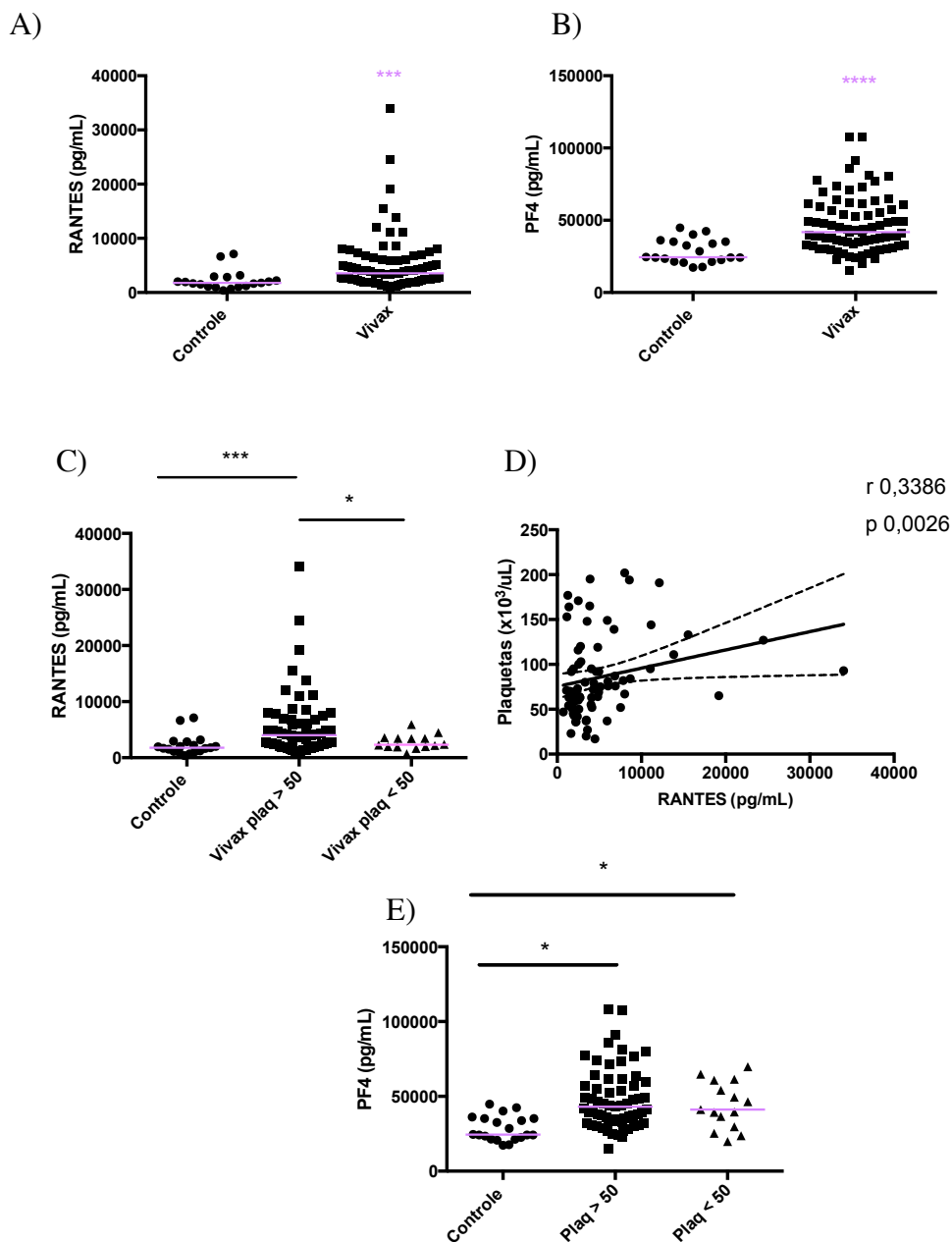


Figura 4.3.2: Níveis de RANTES e PF4 plasmáticos nos pacientes com malária vivax e nos voluntários sadios. Foram coletados 20 mL de sangue em seringa contendo anticoagulante ACD. O sangue dos pacientes foi coletado antes do início do tratamento anti-malárico. Após a coleta de sangue, o plasma foi obtido por centrifugação e armazenado a -80°C até a sua utilização. Para a dosagem de RANTES (A, C, D) e PF4 (B, E) foi feita a técnica de ELISA. Em C e E estão representados os níveis de RANTES e PF4, respectivamente, estratificados pela contagem de plaquetas nos pacientes (valores acima ou abaixo de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$). Em D está um gráfico de correlação entre os níveis de RANTES nos pacientes com malária vivax e a contagem de plaquetas. A barra representa a mediana dos dados. Os asterísticos representam a diferença entre os 2 grupos, sendo (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,0002$ e (****) $p < 0,0001$.

4.4) Níveis de hemopexina e haptoglobina

Sendo a hemopexina e a haptoglobina importantes moléculas que impedem a ação tóxica do heme durante processos de hemólise, como a malária, resolvemos investigar como estariam os níveis dessas duas proteínas nos plasmas dos pacientes com malária vivax e controles sadios. Como pode ser observado na Figura 4.4.1 A, os pacientes apresentaram níveis elevados de hemopexina em relação aos controles sadios. Porém, não observamos correlação entre os níveis de hemopexina e a contagem de plaquetas (dado não mostrado). Com relação aos níveis de haptoglobina, inicialmente não encontramos diferenças quando comparamos doadores sadios e pacientes (Figura 4.4.1 B). No entanto, ao estratificar os pacientes naqueles com plaquetas abaixo de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ (plaquetopenia grave) ou acima, observamos que os níveis de haptoglobina estavam diminuídos nos pacientes com plaquetopenia grave (Figura 4.4.1 C). Os níveis de haptoglobina também estão mais baixos nos pacientes com plaquetopenia grave em relação aos controles sadios (Figura 4.4.1 C). Há uma correlação positiva entre a contagem de plaquetas e os níveis de haptoglobina nos pacientes, ou seja, pacientes com níveis de plaquetas mais altos possuem também níveis mais elevados de haptoglobina (Figura 4.4.1 D). Não observamos correlações entre os níveis de hemopexina ou haptoglobina e a parasitemia ou os dias de sintomas (dados não mostrados).

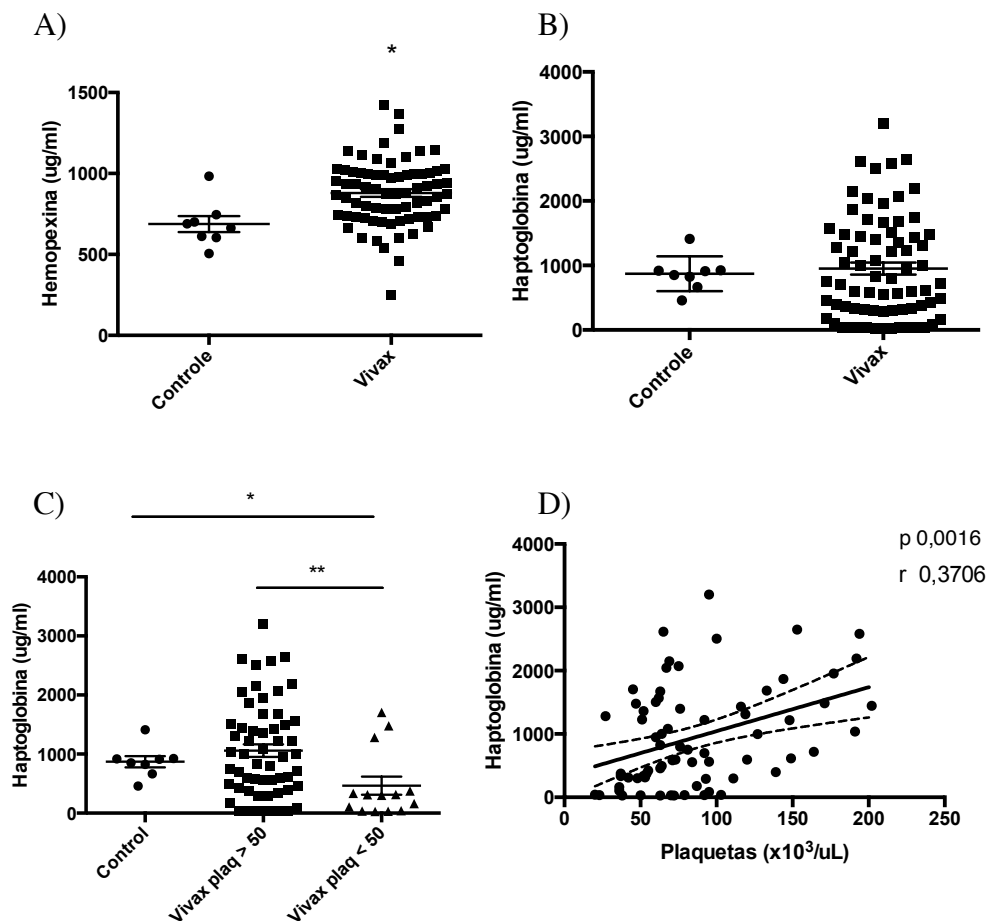


Figura 4.4.1: Níveis de hemopexina e haptoglobina plasmáticos nos pacientes com malária vivax e nos voluntários sadios. Foram coletados 20 mL de sangue de 8 controles sadios e 72 pacientes em seringa contendo anticoagulante ACD. O sangue dos pacientes foi coletado antes do início do tratamento anti-malárico. Após a coleta de sangue, o plasma foi obtido por centrifugação e armazenado a -80°C até a sua utilização. Para a dosagem de hemopexina (A) e haptoglobina (B) foi feita a técnica de ELISA. Em C estão representados os níveis de haptoglobina nos pacientes estratificados pela contagem de plaquetas nos pacientes (acima ou abaixo de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$). Em D está representada a correlação entre os níveis de haptoglobina nos pacientes com malária vivax e a contagem de plaquetas. A barra representa a média \pm E.P.M. Os asterísticos representam a diferença entre os 2 grupos, sendo (*) $p < 0,05$ e (**) $p 0,0053$.

4.5) Estudo da ativação e apoptose plaquetária nos pacientes com malária vivax

A ativação plaquetária pode contribuir com a queda de plaquetas (Pate *et al*, 2013), desta forma, resolvemos investigar se as plaquetas dos pacientes infectados com *P. vivax* se encontravam ativadas. Para isso, utilizamos dois importantes marcadores de ativação plaquetária, a expressão de P-selectina ou CD62P e também a formação de agregados plaqueta-monócito.

Nossos resultados mostram que os pacientes com malária vivax possuem um aumento da expressão de P-selectina nas plaquetas (Figura 4.5.1) e também um maior número de agregados plaqueta-monócito (Figura 4.5.2) quando comparados aos controles sadios.

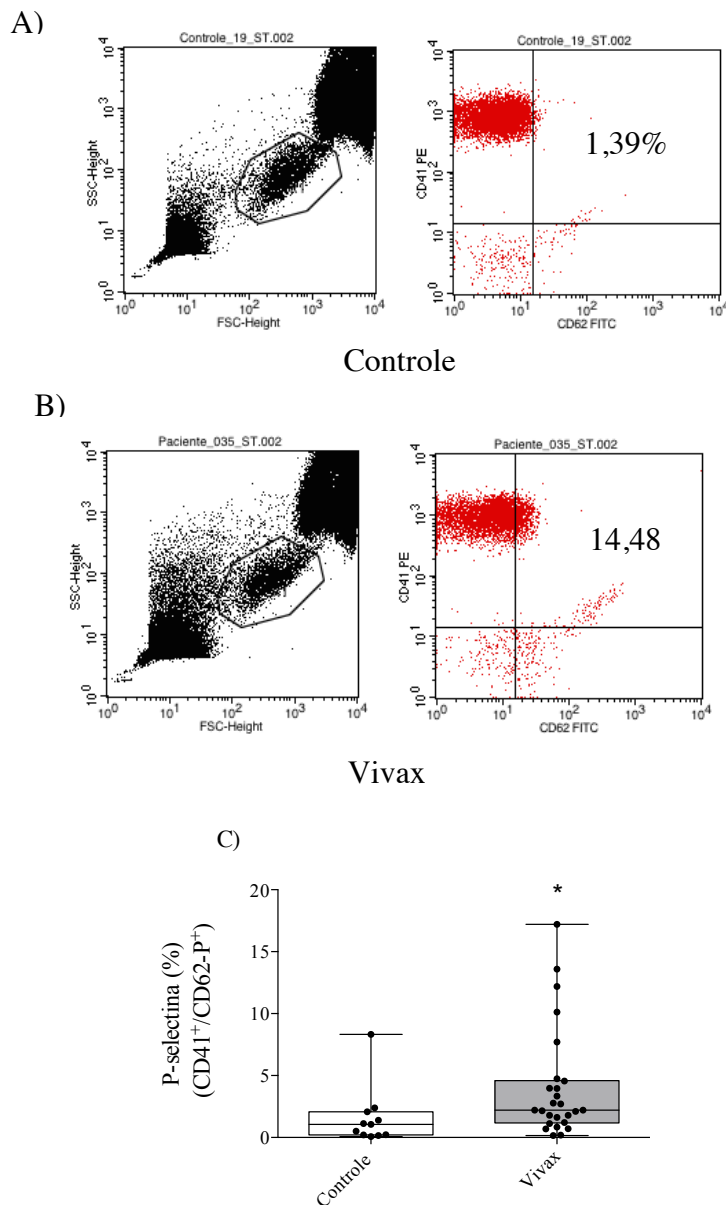


Figura 4.5.1: Expressão de P-selectina (CD62P) no sangue de pacientes com malária vivax e controles sadios. Foram recolhidos 20 mL de sangue de pacientes com malária vivax e voluntários sadios. Sangue total de 26 pacientes e 11 doadores sadios foi diluído em tampão, marcado com anticorpos anti-CD41 e anti-CD62P (P-selectina), e em seguida, foi fixado e analisado no citômetro de fluxo (A, B e C). Em A e B estão dot plots representativos da análise da expressão de P-selectina em plaquetas de controles e pacientes, respectivamente. Em C está representado o percentual de plaquetas expressando P-selectina. Gráfico com as medianas, mínimo e máximo. O asterístico (*) representa a diferença entre os 2 grupos, com $p < 0,05$.

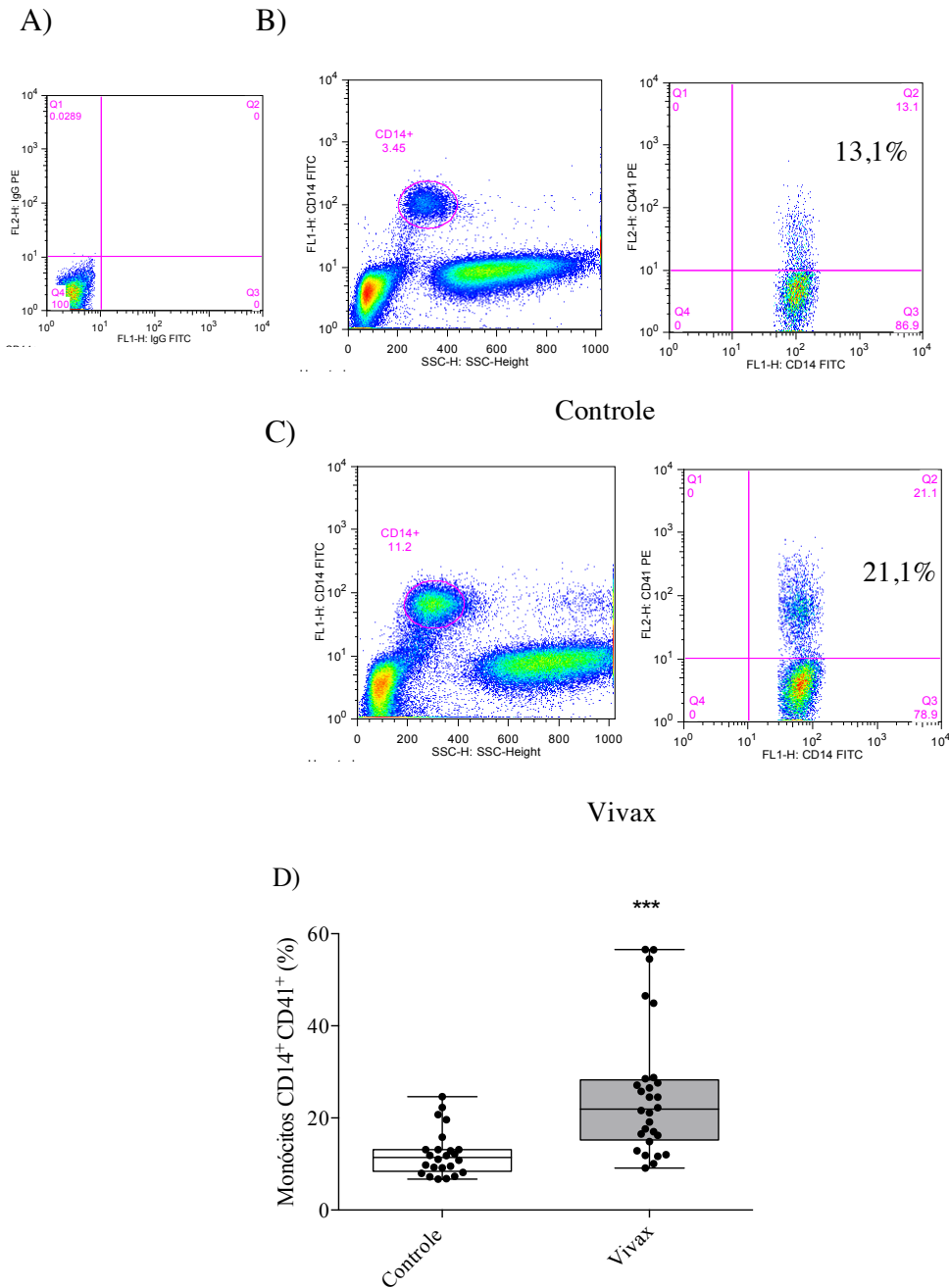


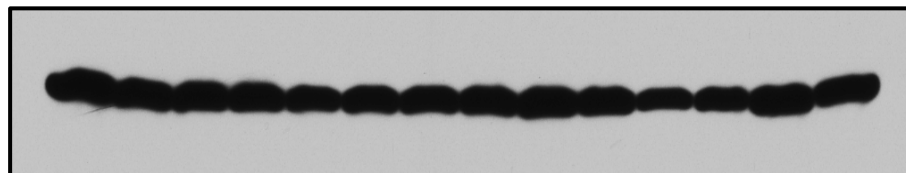
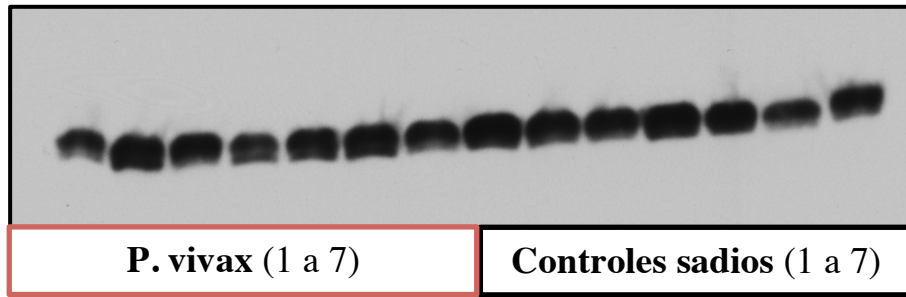
Figura 4.5.2: Formação de agregados plaqueta-monócito no sangue de pacientes com malária vivax e controles sadios. Foram recolhidos 20 mL de sangue de pacientes com malária vivax e voluntários sadios. Para a detecção de agregados plaqueta-monócito, sangue total lisado e fixado de 24 controles e 28 pacientes recebeu os anticorpos anti-CD41 (marcador de plaqueta) e anti-CD14 (marcador de monócito). A análise foi feita no citômetro de fluxo (A, B, C e D). Em A está um dot plot representativo de um paciente com os controles de isotipo (IgG PE e IgG FITC). Em B e C estão dot plots representativos da análise da expressão de plaquetas agregadas a monócitos em pacientes e controles. Em D está representado o percentual de agregados

*plaqueta-monócito. Gráfico com as medianas, mínimo e máximo. O asterístico (***) representa a diferença entre os 2 grupos, com $p < 0,0001$.*

A apoptose plaquetária é um dos fatores responsáveis pela plaquetopenia observada em diversas doenças, tais como a dengue (Hottz *et al*, 2013). De forma a tentar compreender as causas da plaquetopenia observada nos pacientes infectados com *P. vivax*, resolvemos verificar se as plaquetas dos pacientes se encontravam com sinais de apoptose.

Inicialmente, analisamos a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaquetas de pacientes infectados com *P. vivax* e de controles sadios. Os pacientes e controles incluídos para a análise da expressão de Bcl-xL foram os mesmos que tiveram o transcriptoma analisado, ou seja, um paciente não se encontrava plaquetopênico, com número de plaquetas de $177 \times 10^3/\mu\text{L}$; cinco pacientes possuíam plaquetopenia branda, com contagens de 120, 116, 79, 69 e 60 ($\times 10^3/\mu\text{L}$); e um paciente se encontrava com plaquetopenia grave, com contagem de $36 \times 10^3/\mu\text{L}$. A proteína Bcl-xL está presente nas plaquetas tanto de controles sadios como de pacientes com malária vivax, e de maneira surpreendente, não observamos diferença na expressão de Bcl-xL entre pacientes e controles (Figura 4.5.3).

Bcl-xL



β -actina

Figura 4.5.3: Expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaquetas de doadores sadios e de pacientes com malária vivax. Foram recolhidos 20 mL de sangue de 7 voluntários sadios e de 7 pacientes infectados com P. vivax. Em seguida, as plaquetas foram purificadas usando o sistema de depleção de leucócitos com anticorpo anti-CD45. A detecção de Bcl-xL foi feita através da técnica de western blott. O controle de carregamento consistiu na detecção de β -actina.

O próximo passo foi a análise da ativação de caspases nas plaquetas obtidas de pacientes e doadores sadios. Em um primeiro momento, foi feita uma marcação para caspase 9 ativada utilizando citometria de fluxo. As plaquetas dos pacientes com malária vivax apresentaram um aumento da ativação da caspase 9 quando comparados com controles sadios (Figura 4.5.4).

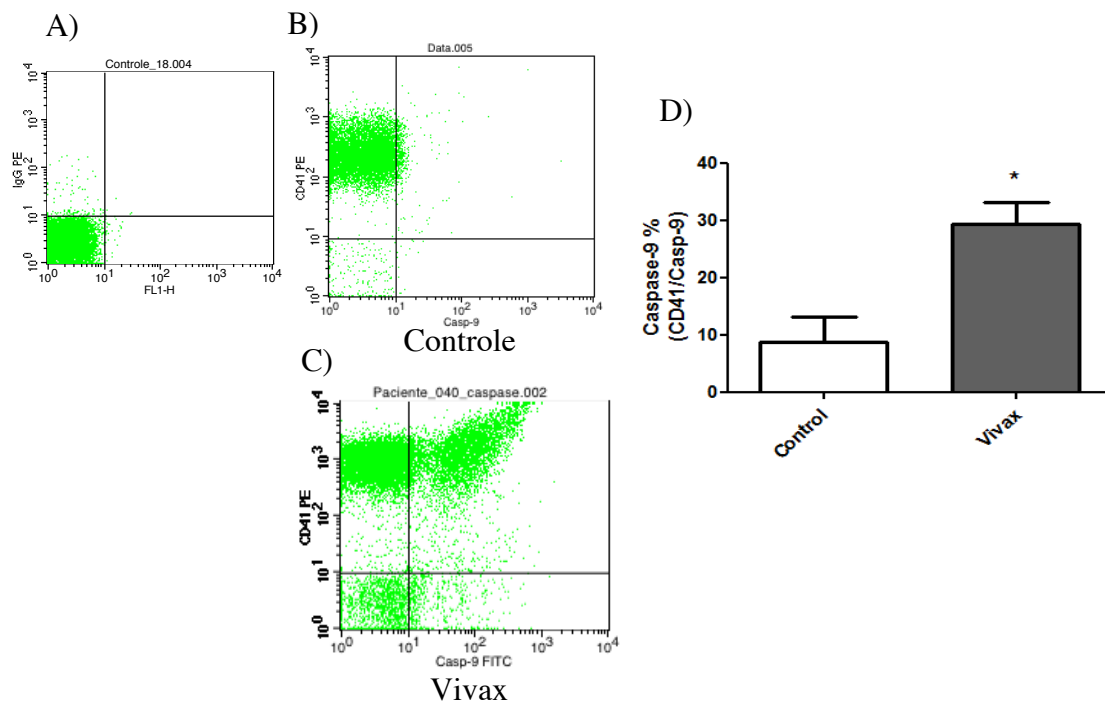
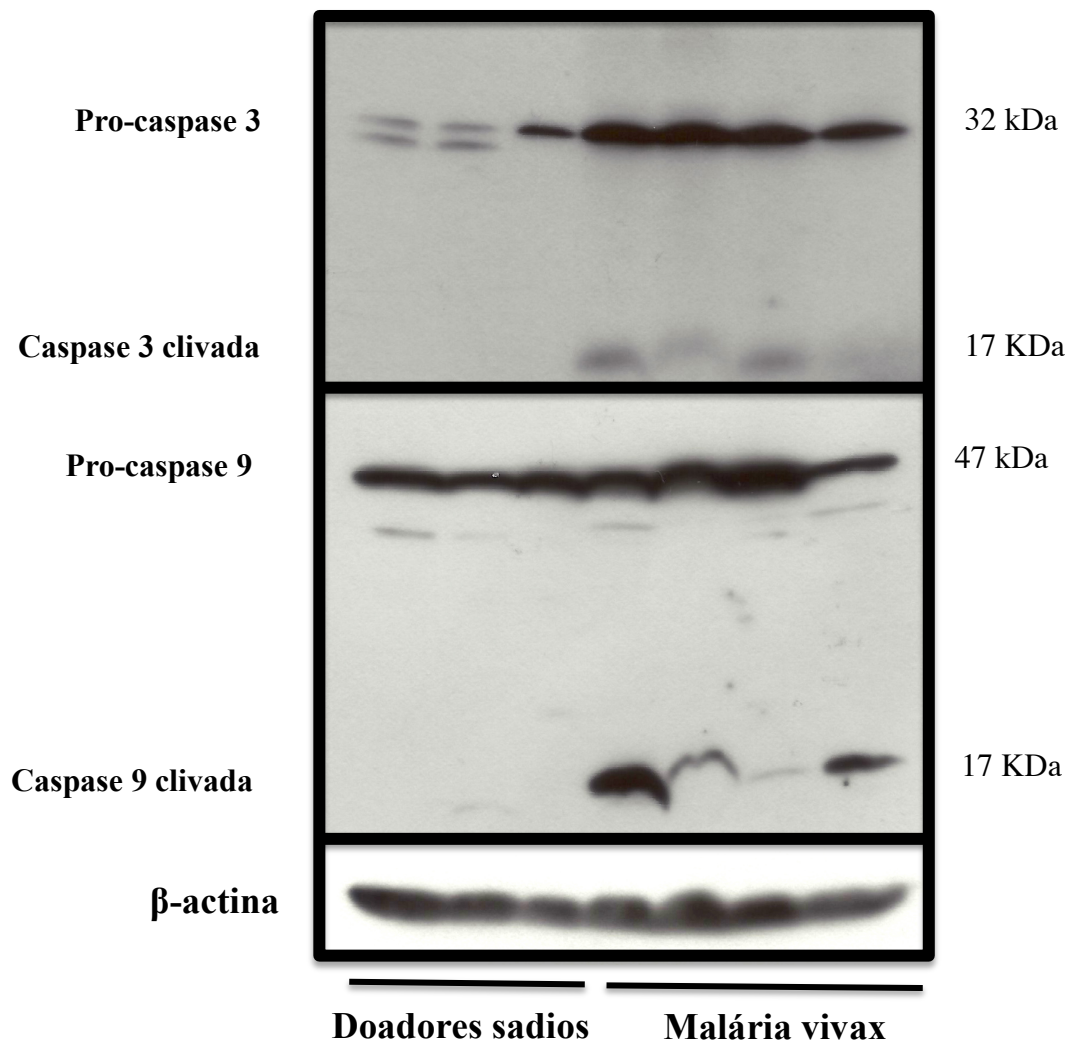


Figura 4.5.4: Efeito da infecção com *P. vivax* sobre a ativação de caspase 9 plaquetária. Foram recolhidos 20 mL de sangue de pacientes com malária vivax e voluntários sadios. Após a obtenção de plaquetas lavadas por processo de centrifugação, estas foram incubadas por 1 hora com sonda que detecta a caspase-9 ativada (FAM-LEHD-FMK). Em seguida, incubou-se com anti-CD41 e após fixação, as plaquetas foram analisadas no citômetro de fluxo. Em A está dot plot representado o controle de isotipo. Em B e C estão dot plots representativos da análise da ativação de caspase 9 em plaquetas de controles e pacientes. D) Percentual de plaquetas com caspase 9 ativada em 6 pacientes e 5 controles sadios. Dados representados como média \pm E.P.M. O asterístico (*) representa a diferença entre os 2 grupos, com $p < 0,05$.

Realizamos a detecção da ativação das caspases 3 e 9 em plaquetas através da técnica de *western blott*. Neste caso, também observamos que as plaquetas de quatro pacientes com malária vivax apresentavam a forma ativada das caspases, que é a forma clivada. Já os três doadores sadios não apresentaram a forma clivada das proteínas, ou seja, não tinham as caspases 3 e 9 ativadas (Figura 4.5.5).



*Figura 4.5.5: Efeito da infecção com *P. vivax* sobre a ativação das caspases 3 e 9 plaquetárias. Foram recolhidos 20 mL de sangue de 4 pacientes com malária vivax e 3 voluntários sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas usando o sistema de depleção de leucócitos com anti-CD45 e depois armazenadas em tampão Ripa até o momento do uso. A expressão das caspases 3 e 9, tanto na sua forma inativa (pro-caspase), como na sua forma ativada (clivada), foi determinada por western blott. O controle de carregamento consistiu na detecção de β -actina.*

4.6) Investigação da apoptose induzida por plasma de pacientes infectados com *P. vivax*

Após verificar que os pacientes se encontravam plaquetopênicos e que suas plaquetas estavam com sinais de ativação e apoptose, resolvemos investigar quais mecanismos estariam por trás desses eventos. Para isso, incubamos plaquetas de voluntários sadios com plasmas de pacientes infectados com *P. vivax* ou com plasmas de outros controles sadios (plasmas heterólogos) e verificamos a ativação de caspase 9, utilizando plaquetas tratadas com trombina como controle de indução de apoptose. Como pode ser observado nas Figura 4.6.1 e 4.6.2, plasmas de pacientes com *P. vivax* foram capazes de induzir a ativação de caspase 9 em plaquetas de controles no tempo de 90 minutos, o que não aconteceu com plaquetas que foram incubadas com plasmas de voluntários sadios. No tempo de 5 horas, observamos o mesmo fenômeno, ou seja, a ativação de caspase 9 em plaquetas que receberam plasmas de pacientes infectados com *P. vivax*, o que não foi observado com plaquetas que receberam plasmas de controles sadios (Figuras 4.6.1 e 4.6.2).

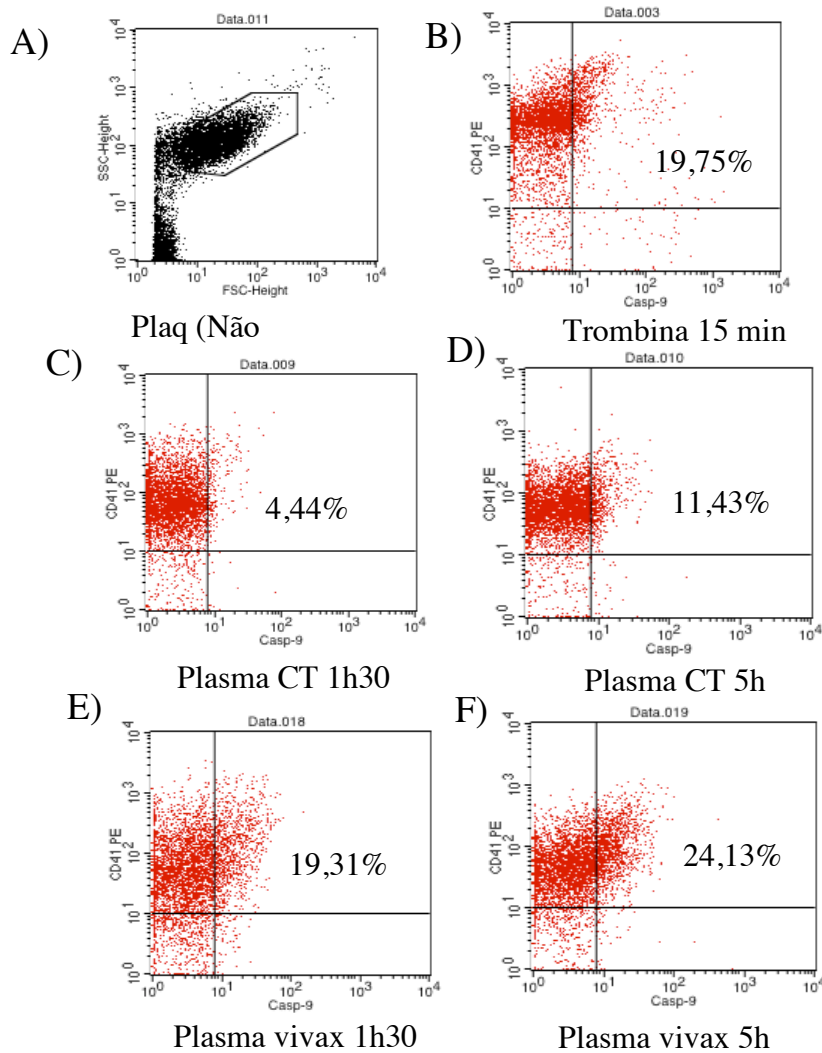


Figura 4.6.1: Efeito do plasma de pacientes com malária vivax na ativação de caspase 9 em plaquetas de voluntários saudáveis. Foram coletados 20 mL de sangue de doadores saudáveis. Em seguida, as plaquetas foram purificadas utilizando-se kit com anticorpo anti-CD45 para depleção de leucócitos contaminantes. As plaquetas purificadas foram incubadas com plasmas de outros doadores saudáveis ou com plasmas de pacientes infectados com *P. vivax*. Em seguida, as plaquetas foram incubadas em estufa a 37° por 90 minutos ou 5 horas e depois foram marcadas com sonda que detecta caspase 9 ativada (FAM-LEHD-FMK) e com anti-CD41. As análises foram feitas no citômetro de fluxo. Como controle positivo, incubou-se plaquetas de voluntários saudáveis com trombina 1 U/mL por 15 minutos. Como controle negativo, plaquetas foram incubadas por 5 horas em meio de cultura a 37°C. De A-F estão dot plots representativos da análise da ativação de caspase 9 em plaquetas que foram incubadas com trombina (B), plasmas de doadores saudáveis (C e E) ou plasmas de pacientes (D e F).

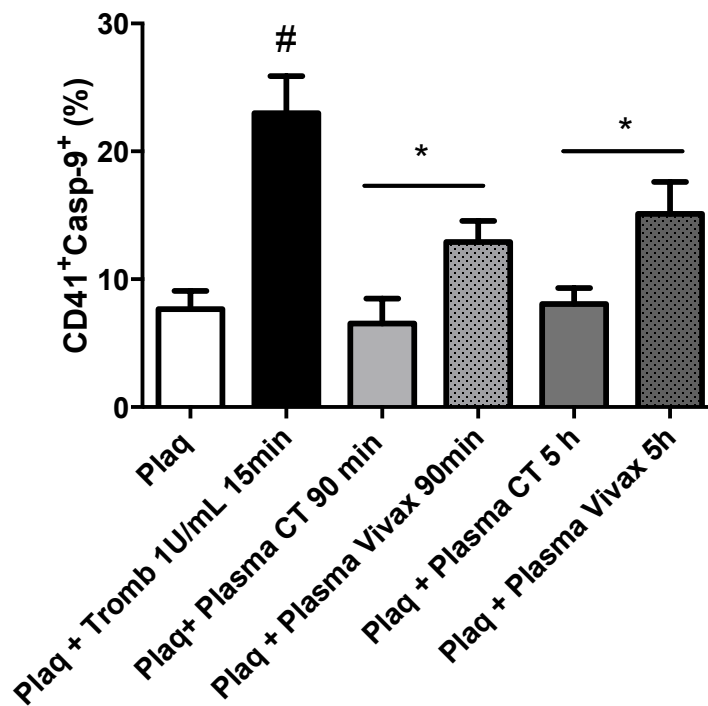


Figura 4.6.2: Efeito do plasma de pacientes com malária vivax na ativação de caspase 9 em plaquetas de voluntários sadios. Foram coletados 20 mL de sangue de doadores sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas utilizando-se kit com anticorpo anti-CD45 para depleção de leucócitos contaminantes. As plaquetas purificadas foram incubadas com plasmas de outros doadores sadios ou com plasmas de pacientes infectados com *P. vivax*. Em seguida, as plaquetas foram incubadas em estufa a 37° por 90 minutos ou 5 horas e depois foram marcadas com sonda que detecta caspase 9 ativada (FAM-LEHD-FMK) e com anti-CD41. As análises foram feitas no citômetro de fluxo. Como controle positivo, incubou-se plaquetas de voluntários sadios com trombina 1 U/mL por 15 minutos. Como controle negativo, plaquetas foram incubadas por 5 horas em meio de cultura a 37°C. No gráfico são apresentados as médias \pm E.P.M do percentual de plaquetas positivas para caspase 9. O asterístico (*) representa a diferença em relação a plaquetas incubadas com plasma de controles (CT) sadios com $p < 0,05$ e o símbolo (#) representa a diferença com $p < 0,05$ em relação ao grupo “plaq” (somente plaquetas em meio de cultura).

4.7) Investigação da apoptose induzida por heme e pelo estímulo malárico hemozoína sintética em plaquetas de voluntários sadios

Heme e hemozoína são duas toxinas maláricas importantes na patogênese da malária (Seixas *et al*, 2009; Griffith *et al*, 2009; Frita *et al*, 2012). Dados não publicados do nosso grupo demonstram que heme e hemozoína são capazes de levar à ativação plaquetária, com aumento da expressão de P-selectina, formação de agregados plaqueta-monócito e de liberação das quimiocinas RANTES e PF4 (Vieira-de-Abreu, manuscrito em preparação). Além disso, observamos que pacientes com malária vivax com plaquetopenia grave apresentavam níveis reduzidos de haptoglobina, uma importante proteína que atua na redução da liberação de heme livre durante a malária. Desta forma, levantamos a hipótese de que as toxinas maláricas presentes no plasmas de pacientes poderiam ser as responsáveis pela indução da ativação de caspase 9 que observamos quando incubamos os plasmas de pacientes com as plaquetas de controles sadios.

Plaquetas de voluntários sadios foram incubadas por 5 horas com os estímulos maláricos heme e hemozoína sintética (sHz) e analisadas para a expressão das caspases ativadas 9 e 3/7 por citometria de fluxo. Heme nas duas concentrações testadas (1 e 10 μM) e sHz na concentração de 20 μM foram capazes de levar a ativação tanto da caspase 9 (Figura 4.7.1) como das caspases 3/7 (Figura 4.7.2).

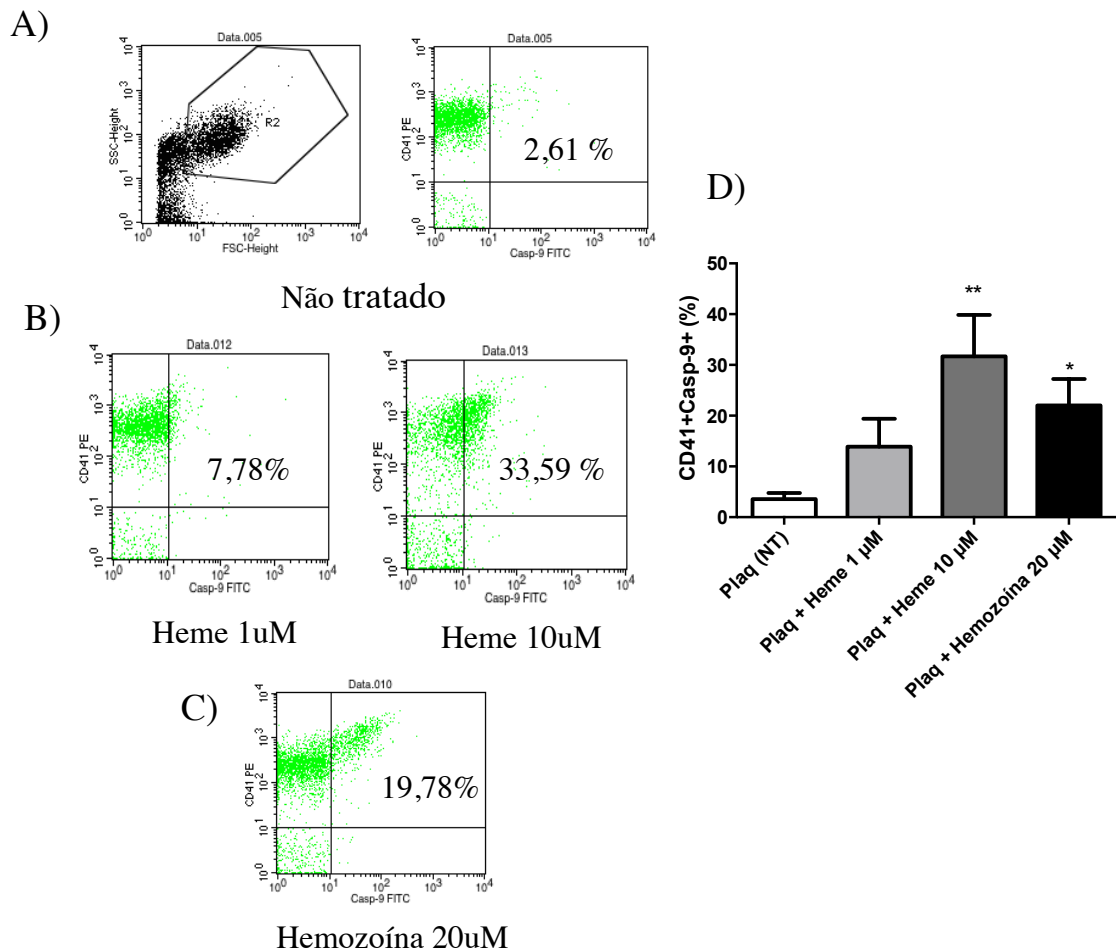


Figura 4.7.1: Efeito das toxinas maláricas heme e hemozoína sintética (sHz) na expressão de caspase 9 ativada em plaquetas de doadores saudáveis. Foram coletados 20 mL de sangue de 7 doadores saudáveis para a obtenção de plaquetas, que foram incubadas com heme (1 e 10 µM) ou sHz (20 µM) por 5 horas em estufa a 37°C. Após o período de incubação, as plaquetas foram marcadas com sonda que detecta caspase 9 (FAM-LEHD-FMK) ativada e também com anti-CD41. As análises foram feitas no citômetro de fluxo. Como controle positivo, incubou-se plaquetas de voluntários saudáveis com ionóforo de cálcio A23187 1 µM por 1 hora. Como controle negativo, plaquetas foram incubadas por 5 horas em estufa a 37°C somente na presença de meio de cultura. De A-C estão dot plots representativos da análise da ativação de caspase 9 em plaquetas de controles que foram incubadas com heme (B) ou sHz (C). No gráfico (D) são apresentados as médias ± E.P.M do percentual de plaquetas positivas para caspase 9. Dados representados como média ± E.P.M. Os asterísticos representam a diferença em relação ao grupo controle não tratado (NT), sendo (*) $p < 0,05$; e (**) $p < 0,01$.

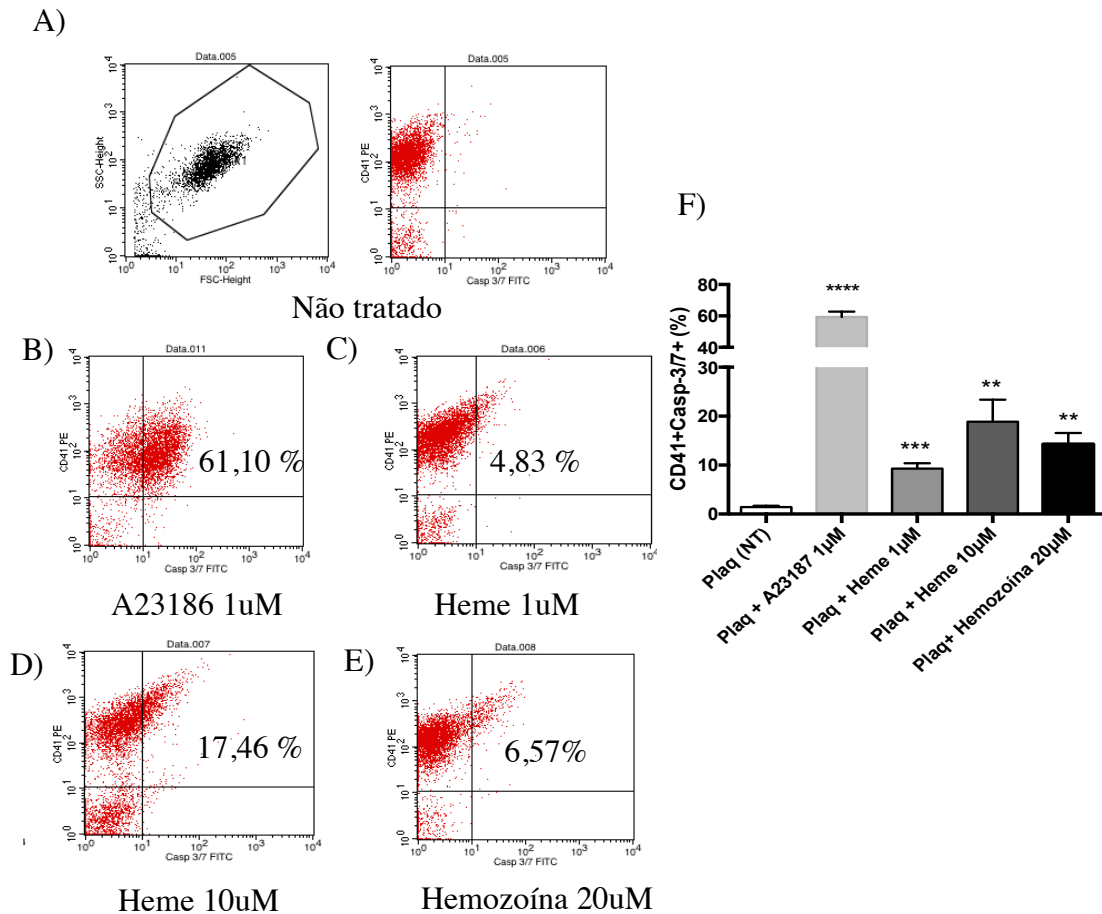


Figura 4.7.2: Efeito do heme e da toxina malárica hemozoína sintética (sHz) na expressão das caspases ativadas 3 e 7 em plaquetas de doadores saudáveis. Foram coletados 20 mL de sangue de 4 doadores saudáveis para a obtenção de plaquetas, que foram incubadas com heme (1 e 10 μM) ou sHz (20 μM) por 5 horas em estufa a 37°C. Após o período de incubação, as plaquetas foram marcadas com sonda (FAM-DEVD-FMK) que detecta as caspases 3 e 7 ativadas e também com anti-CD41. As análises foram feitas no citômetro de fluxo. Como controle positivo, incubou-se plaquetas de voluntários saudáveis com ionóforo de cálcio A23187 1 μM por 1 hora. Como controle negativo, plaquetas foram incubadas por 5 horas em estufa a 37°C somente na presença de meio de cultura. De A-E estão dot plots representativos da análise da ativação das caspases 3/7 em plaquetas de controles, sendo que em A estão as plaquetas não estimuladas, em B as que receberam A23187, em C e D as que foram incubadas com heme e em E as que receberam sHz. No gráfico (F) são apresentados as médias \pm E.P.M do percentual de plaquetas positivas para as caspases 3/7. Os asterísticos representam a diferença em relação ao grupo controle não tratado (NT), sendo (**) $p < 0,01$; (***) p igual a 0,0004 e; (****) $p < 0,0001$.

Realizamos o *western blott* para caspase 3 de plaquetas incubadas com os estímulos maláricos heme e sHz por 5 horas. Como pode ser observado na Figura 4.7.3, plaquetas estimuladas com heme a 10 μ M e sHz a 20 μ M tiveram a clivagem total da caspase 3, apresentando a forma clivada de 17 KDa. De maneira interessante, não foi vista a banda de 17 KDa com o controle positivo A23187, somente um aumento da forma clivada intermediária, quando comparado com plaquetas sem estímulo (não-tratadas ou NT). As colunas de plaquetas puras (NT) e de plaquetas com heme a 1 μ M estão com o mesmo perfil, onde não observamos a presença da forma de 17 KDa e nem de um aumento da forma clivada intermediária (Figura 4.7.3).

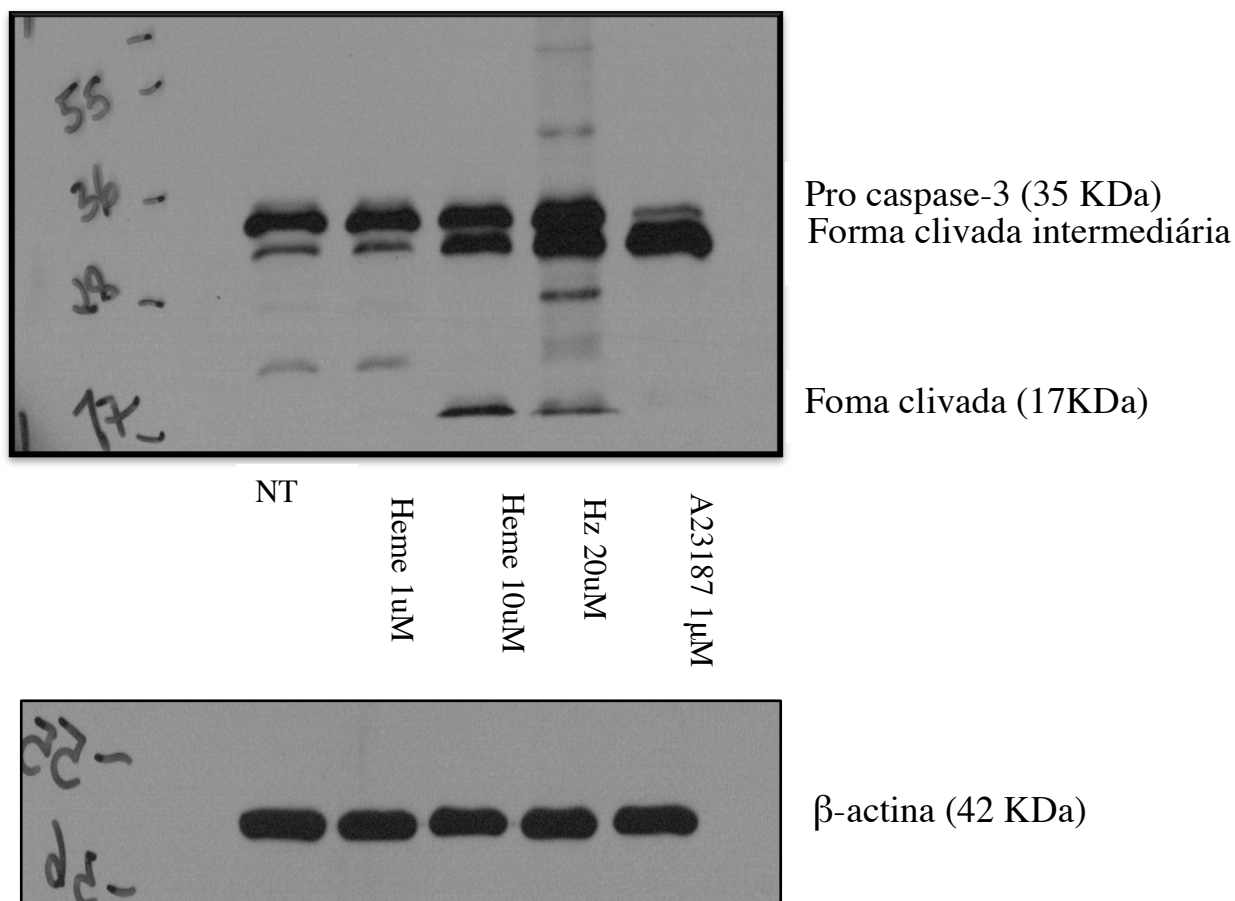


Figura 4.7.3: Efeito do heme e da toxina malárica hemozoína sintética (sHz) na ativação de caspase 3. Foram recolhidos 20 mL de sangue de voluntários sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas, usando o sistema de depleção de leucócitos com anticorpo anti-CD45, e depois incubadas com heme (1 e 10 µM) ou sHz (20 µM) por 5 horas. Foi detectada a expressão de caspase 3, tanto na sua forma inativa não clivada (pro-caspase) como na sua forma ativada (clivada) por western blott nas plaquetas lisadas. Como controle positivo, incubou-se plaquetas de voluntários sadios com ionóforo de cálcio A23187 1 µM por 5 horas. O controle de carregamento consistiu na detecção de β-actina. Resultado representativo de 2 doadores diferentes.

Além da ativação de caspases, a exposição de fosfatidilserina na membrana também é uma característica do processo de apoptose em plaquetas (Leytin *et al*, 2006). A incubação por 5 horas com heme a 10 µM e sHz a 20 µM levaram ao aumento da exposição de fosfatidilserina em plaquetas de doadores sadios, o que foi visto através da

marcação com anexina V. O estímulo com heme a 1 μM não foi capaz de levar ao aumento da marcação de anexina V nas plaquetas de voluntários sadios (Figura 4.7.4).

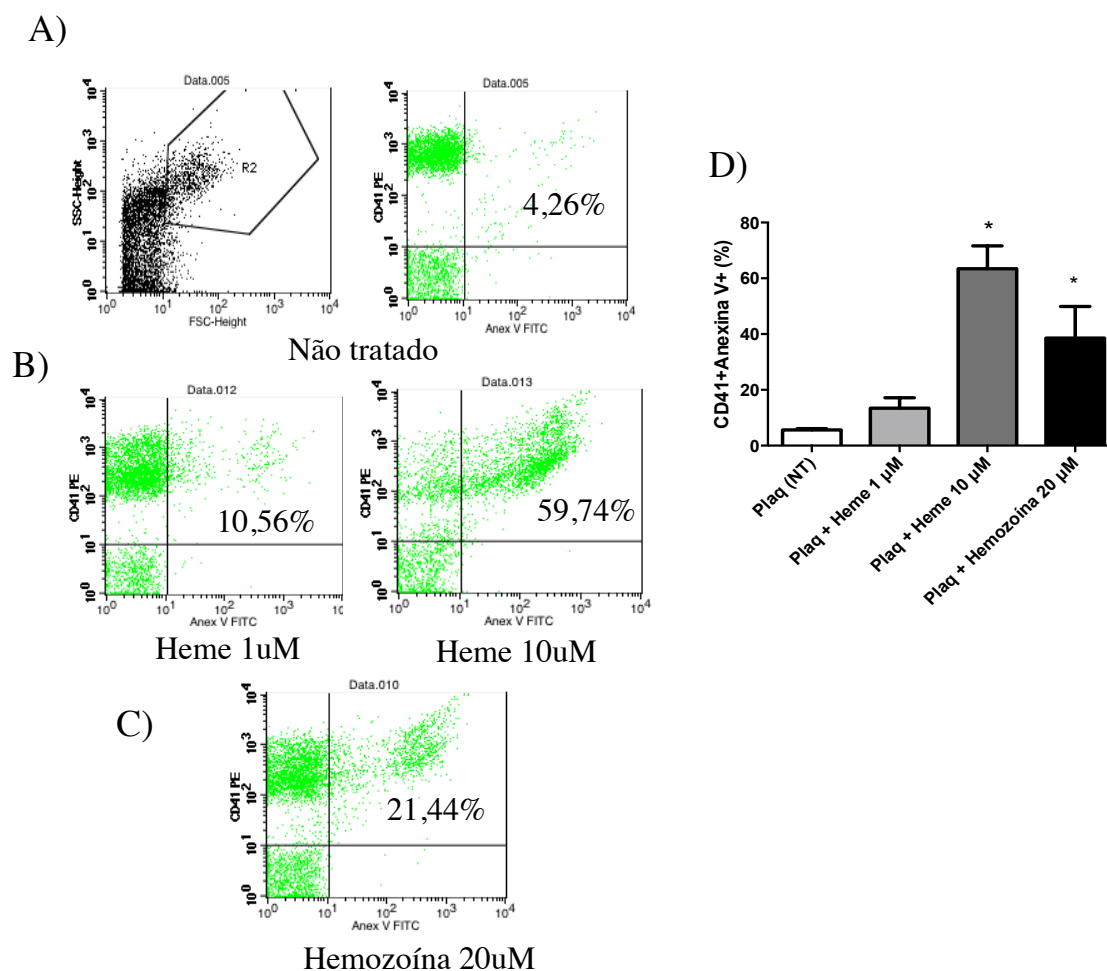


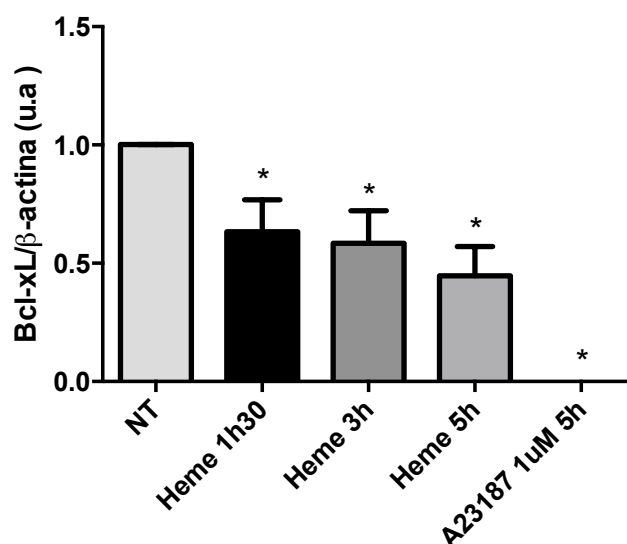
Figura 4.7.4: Efeito do heme e da toxina malárica hemozoína sintética (sHz) na exposição de fosfatidilserina em plaquetas de doadores sadios. Foram coletados 20 mL de sangue de doadores sadios para a obtenção de plaquetas, que foram incubadas com heme (1 e 10 μM) ou sHz (20 μM) por 5 horas em estufa a 37°C. Em seguida, as plaquetas foram incubadas com anexina V e marcadas com anti-CD41. As análises foram feitas no citômetro de fluxo. De A-C estão dot plots representativos da análise da expressão de anexina V em plaquetas que foram incubadas com heme (B) ou sHz (C). No gráfico (D) são apresentados as médias \pm E.P.M do percentual de plaquetas positivas para anexina V. O asterístico (*) representa a diferença em relação ao grupo controle não tratado (NT) com $p < 0,05$ ($n=3/\text{grupo}$).

Como também ocorre em célula nucleadas, as plaquetas possuem as proteínas da família Bcl-2, que são reguladoras essenciais da apoptose de via intrínseca ou mitocondrial. Fazem parte da família Bcl-2 as proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak) e as anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xL) (Mason *et al*, 2007). Assim, resolvemos investigar se heme e sHz eram capazes de induzir a degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL.

Inicialmente observamos que sHz a 20 μM não foi capaz de induzir a degradação de Bcl-xL em 5 horas de incubação (dados não mostrados). No entanto, heme a 10 μM foi capaz de induzir a degradação de Bcl-xL em plaquetas de doadores sadios nos diferentes tempos de incubação (1 h 30, 3 horas e 5 horas), sendo o tempo de 5 horas onde observamos o maior grau de degradação (Figura 4.7.5).

Em seguida, analisamos se essa degradação induzida pelo heme era concentração-dependente. Para isso, realizamos uma curva de concentração, utilizando heme a 1 μM , 10 μM e 50 μM para estimular as plaquetas de doadores sadios por 5 horas. Como podemos observar na Figura 4.7.6, heme leva à degradação de Bcl-xL de forma concentração-dependente. A concentração de 1 μM parece não exercer efeito na degradação de Bcl-xL. A concentração de 10 μM reduz pela metade a quantidade de proteína quando comparado com plaquetas não estimuladas. Por fim, a concentração de heme a 50 μM levou ao desaparecimento completo da proteína, similar ao controle positivo A23187, apesar de haver uma redução no controle de carregamento (β -actina) (Figura 4.7.6).

A)



B)

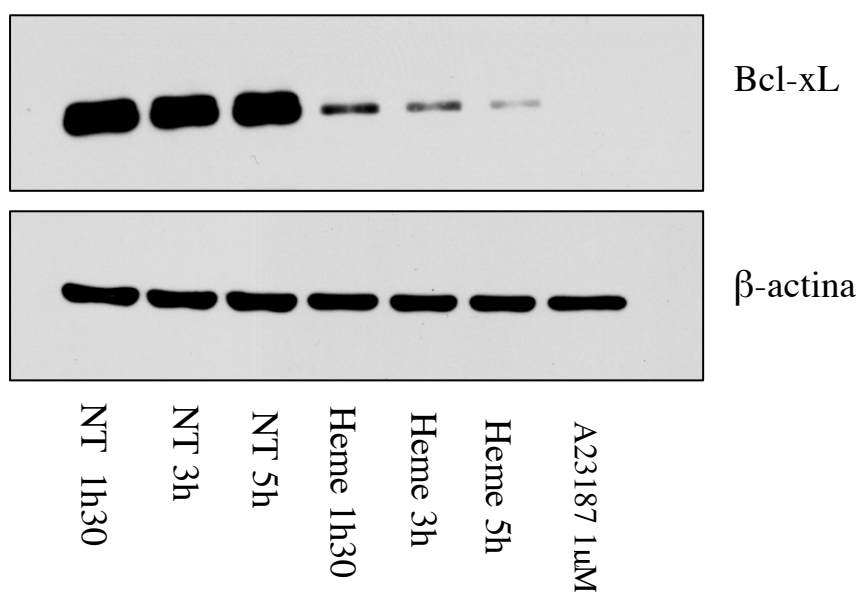


Figura 4.7.5: Efeito do heme na degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaqueta de doadores sadios. Foram recolhidos 20 mL de sangue de voluntários sadios. Em seguida, as plaquetas foram purificadas, usando o sistema de depleção de leucócitos com anticorpo anti-CD45, e depois incubadas com heme (10 μ M) por 1h30, 3 horas ou 5 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Foi detectada a expressão de Bcl-xL por western blott nas plaquetas lisadas. O controle de carregamento consistiu na detecção de β -actina. Em A tem-se as médias \pm E.P.M (n= 6/grupo) das densitometrias e em B um filme representativo. O asterístico (*) representa a diferença em relação ao grupo controle não tratado (NT) com $p < 0,05$.

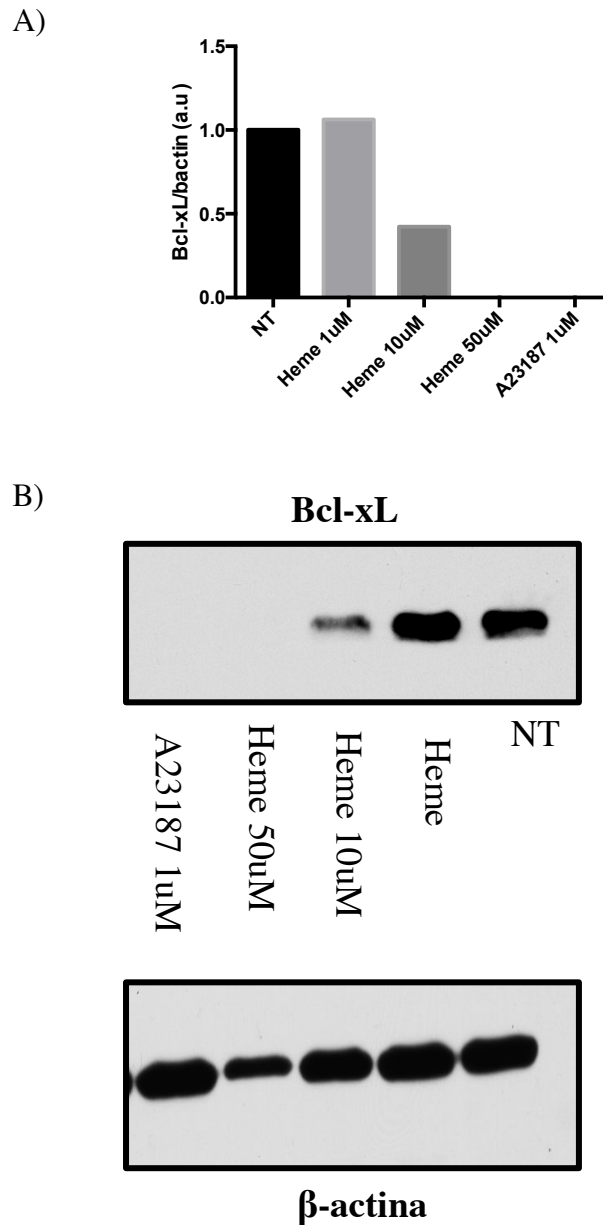


Figura 4.7.6: Efeito de diferentes concentrações de heme na degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL em plaquetas de doadores sadios. Foram recolhidos 20 mL de sangue de voluntário sadio. Em seguida, as plaquetas foram purificadas usando o sistema de depleção de leucócitos com anticorpo anti-CD45. As plaquetas foram, então, incubadas com heme a 1 µM, 10 µM ou 50 µM por 5 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Foi detectada a expressão de Bcl-xL por western blott nas plaquetas lisadas. Como controle positivo, incubou-se plaquetas de voluntários sadios com ionóforo de cálcio A23187, 1 µM, por 5 horas. Em A tem-se a densitometria (n= 1/grupo) e em B um filme representativo. O controle de carregamento consistiu na detecção de β-actina.

Sabe-se que as plaquetas possuem sistemas de degradação de proteínas, como as calpaínas e o proteassoma (Kraemer *et al*, 2013). Desta forma, resolvemos investigar se a degradação de Bcl-xL induzida pelo heme estaria ocorrendo por alguma dessas duas vias. Dados não publicados do grupo (Vieira-de-Abreu, manuscrito em preparação) mostram que heme é capaz de induzir o influxo de cálcio intracelular em plaquetas de controles saudáveis. Visto que as calpaínas são proteases dependentes de cálcio, resolvemos analisar se o quelante de cálcio EGTA seria capaz de impedir a degradação do Bcl-xL induzida pelo heme.

Como pode ser observado na Figura 4.7.7, heme e o controle positivo A23187 induziram a degradação de Bcl-xL em plaquetas de controles saudáveis após 5 horas de incubação. Por outro lado, a adição do quelante de cálcio EGTA inibiu a degradação do Bcl-xL induzida pelo ionóforo de cálcio A23187, possivelmente através da inibição da ativação de calpaínas. Com o heme, observamos o mesmo fenômeno, ou seja, a adição do quelante de cálcio impediu a degradação do Bcl-xL induzida pelo heme. O quelante de cálcio sozinho não teve nenhum efeito na degradação do Bcl-xL em plaquetas de voluntários saudáveis (Figura 4.7.7).

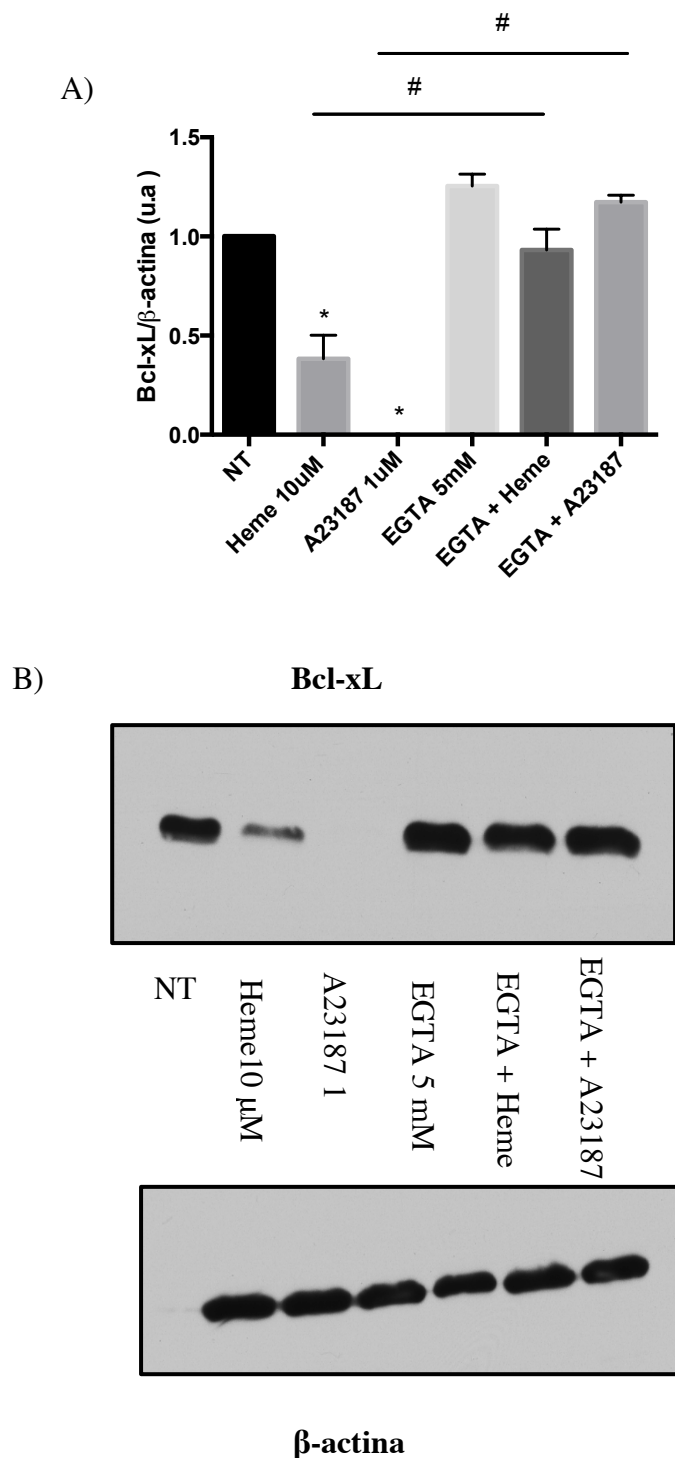


Figura 4.7.7: Efeito do quelante de cálcio EGTA na degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL induzida pelo heme, em plaquetas de doadores saudáveis. Foram recolhidos 20 mL de sangue de voluntários saudáveis. Em seguida, as plaquetas foram purificadas usando o sistema de depleção de leucócitos com anticorpo anti-CD45. O EGTA 5 mM foi adicionado 15 minutos antes da adição de heme 10 μM ou A23187 1 μM. Após a adição dos estímulos, as plaquetas ficaram incubando por 5 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Foi detectada a expressão de Bcl-xL por western blott

nas plaquetas lisadas. O controle de carregamento consistiu na detecção de β -actina. Em A tem-se as médias \pm E.P.M das densitometrias e em B um filme representativo ($n=3$ /grupo). O asterístico (*) representa a diferença em relação ao grupo controle não tratado (NT) com $p < 0,05$.

Após a confirmação de que o EGTA impedia a degradação do Bcl-xL induzida pelo heme, resolvemos confirmar que essa degradação ocorria pela ação de calpaínas, utilizando inibidores específicos. As plaquetas foram pré-incubadas com os inibidores de calpaínas (calpeptina e MDL 28170) e com o inibidor de proteassoma (epoxomicina-EPO), por 15 minutos antes da adição de heme ou do ionóforo de cálcio A23187. Em seguida, detectamos a expressão de Bcl-xL nas plaquetas através de *western blott*. Como esperado, o A23187 induziu a degradação de Bcl-xL e ambos os inibidores de calpaínas impediram essa degradação. Já o inibidor de proteassoma não foi capaz de inibir a degradação do Bcl-xL induzida pelo ionóforo de cálcio (Figura 4.7.8).

A adição de heme foi capaz de induzir a degradação do Bcl-xL em plaquetas de doadores saudáveis, como pode ser observado na Figura 4.7.8. A adição do inibidor de proteassoma não impediu a degradação do Bcl-xL, mostrando que essa via não está envolvida neste processo. Por outro lado, quando utilizamos os inibidores de calpaínas, a degradação do Bcl-xL não ocorre, confirmando que a degradação do Bcl-xL induzida pelo heme é dependente da ativação de calpaínas (Figura 4.7.8).

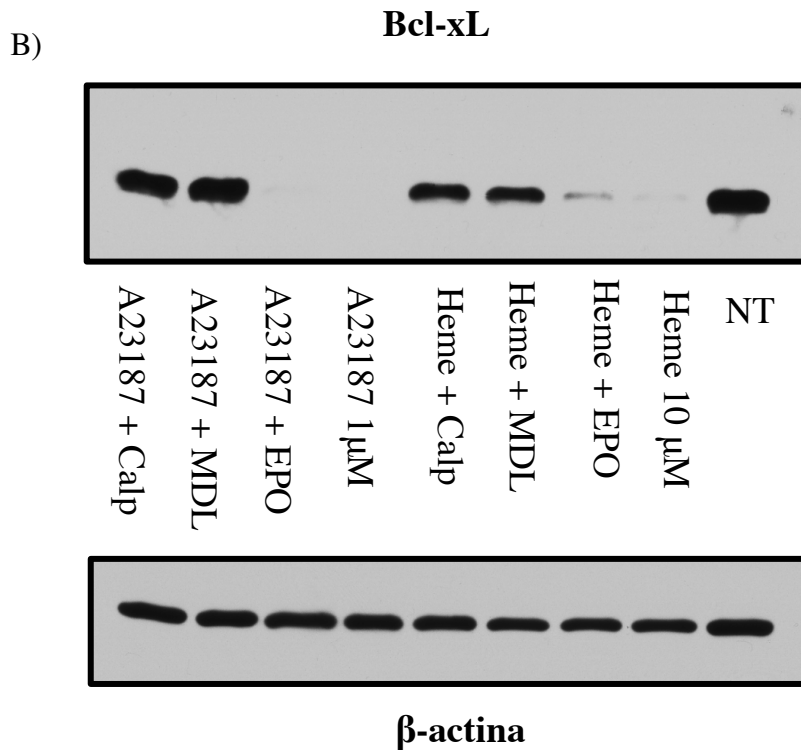
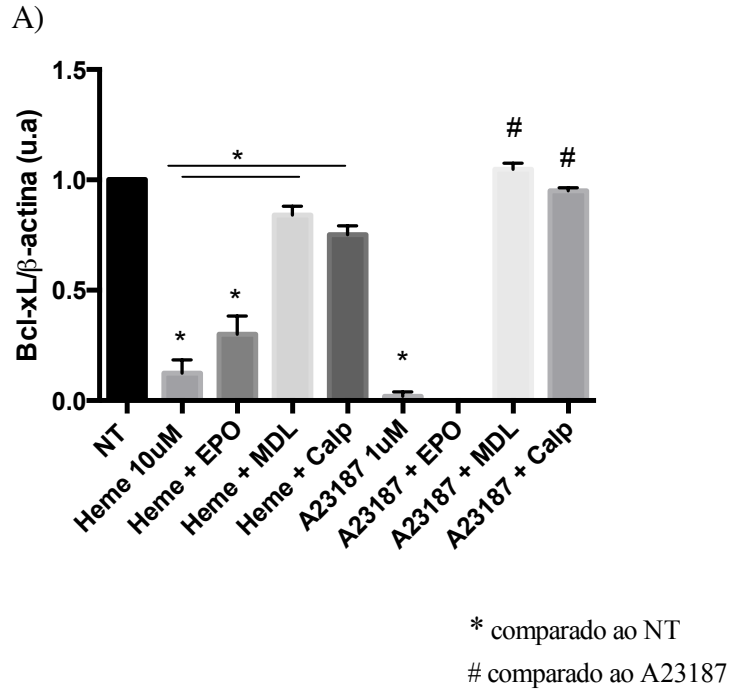


Figura 4.7.8: Efeito dos inibidores de proteassoma e de calpaína na degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL induzida pelo heme, em plaquetas de doadores saudáveis. Foram recolhidos 20 mL de sangue de voluntários saudáveis. Em seguida, as plaquetas foram purificadas usando o sistema de depleção de leucócitos com anticorpo anti-CD45. Os inibidores foram adicionados 15 minutos antes da adição de heme 10 μM ou A23187 1 μM. Após a adição dos estímulos, as plaquetas ficaram

incubando por 5 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Foi detectada a expressão de Bcl-xL por western blott nas plaquetas lisadas. Inibidores de calpaína: calpeptina a 50 µM e MDL 28170 a 50 µM. Inibidor de proteassoma: epoxomicina a 10 µM. O controle de carregamento consistiu na detecção de β-actina. Em A tem-se as médias ± E.P.M das densitometrias e em B um filme representativo (n= 4/grupo). O asterístico (*) representa a diferença em relação ao grupo controle não tratado (NT) com p < 0,05 e (#) em relação ao A23187.

5) Discussão

A malária vivax foi por muitos anos considerada uma doença benigna. No entanto, a descrição de formas graves da doença vem surgindo na literatura, tais como anemia grave, ARDS e coma (Price *et al*, 2007; Anstey *et al*, 2009; Poespoprodjo *et al*, 2009). No Brasil, a região da Amazônia Legal é a mais afetada pela doença, que por sua vez gera um grande problema econômico e social na região (Tauil, 2011). Somente no ano de 2014 foram registrados 1650 casos de internação por malária no país (SVS-MS, 2015). Estima-se que o custo global da malária vivax varie entre 1,4 e 4 bilhões de dólares por ano (Price *et al*, 2007).

A malária vivax é uma doença difícil de ser estudada, pois ao contrário do *P. falciparum*, ainda não existe um cultivo contínuo *in vitro* de *P. vivax*. Isso ocorre, pois o *P. vivax* infecta somente reticulócitos, ao contrário do *P. falciparum*, que infecta preferencialmente hemácias maduras (Borlon *et al*, 2012). Assim, para se estudar a malária vivax muitas vezes é necessário se utilizar uma abordagem clínica, com o uso de pacientes.

Uma alteração comum na malária vivax e que nós também observamos em nosso estudo foi a queda de linfócitos. A apoptose e o sequestro de células T podem ser causas da linfopenia observada na malária (Hviid *et al*, 1996; Hviid *et al*, 1997; Toure-Balde *et al*, 1996 Kemp *et al*, 2002). Outra complicação bastante comum na malária vivax é a plaquetopenia (Makkar *et al*, 2002; Lacerda *et al*, 2011; Lacerda *et al*, 2012; Kwak *et al*, 2013), o que corrobora nosso estudo onde observamos que quase 90 % dos pacientes possuía contagem de plaquetas abaixo de 150.000/µL. Além de termos observado a queda do número de plaquetas, observamos também um aumento do volume plaquetário médio (VPM) nos pacientes com malária vivax. O aumento do tamanho da plaqueta (VMP) está associado com aumento da agregação plaquetária,

aumento da expressão de moléculas de adesão e também aumento do risco de doenças cardiovasculares (Karpatkin *et al*, 1969; Chu *et al*, 2010; Slavka *et al*, 2011). Assim, o aumento do VMP pode ser um indicativo de que as plaquetas estão mais ativadas nos pacientes em relação aos controles sadios.

Os principais sintomas da malária vivax são calafrios, vômito, dor de cabeça, febre e dor no corpo, ou seja, sintomas inespecíficos e difíceis de serem distinguidos de outras doenças febris, como dengue, ou de outras malárias (Kwak *et al*, 2013). A dengue é uma doença que apresenta alteração na contagem de plaquetas. Assim, é importante que, em nossos estudos, seja descartada a infecção pelo vírus da dengue. Não observamos nenhum caso de dengue entre os pacientes incluídos no estudo.

Em nossos estudos, observamos o aumento de diversas citocinas e quimiocinas nos pacientes infectados com *P. vivax*. Nosso grupo observou que plaquetas apoptóticas induzem a produção de IL-10 nos monócitos de forma dependente de P-selectina (Hottz & Medeiros-de-Moraes *et al*, 2014). Já se sabe que monócitos CD14^{high} CD16⁺ são os subtipos que mais produzem IL-10 (Skrzeczynska-Moncznik *et al*, 2008) e que plaquetas quando interagem com monócitos levam a formação desse fenótipo CD14^{high}CD16⁺ (Passacuale *et al*, 2011). Park e colaboradores (2003) demonstraram que pacientes com malária vivax plaquetopênicos possuem níveis elevados de IL-10 em relação aos não-plaquetopênicos. Além disso, altos níveis de IL-10 estão relacionados com casos graves de malária vivax (Raza *et al*, 2013). Em nossos resultados observamos que plaquetas de indivíduos sadios que foram incubadas com plasmas de pacientes infectados com *P. vivax*, com heme ou com o estímulo malárico hemozoína, demonstraram sinais de apoptose, como a ativação de caspases e exposição de fosfatidiserina (no caso de heme e sHz). Além disso, observamos que plaquetas de pacientes apresentaram ativação de caspases, um marcador de apoptose, bem como expressavam mais P-selectina e estavam mais agregadas a monócitos. Assim, uma possível fonte para o aumento de IL-10 observado em nosso estudo seria a sinalização via P-selectina de plaquetas apoptóticas em monócitos.

Na malária vivax ocorrem alterações na produção de diversas citocinas, que são importantes no controle da parasitemia e subsequente eliminação da infecção. Porém, o excesso desses mediadores, tais como RANTES, TNF e IFN- γ , podem levar à uma resposta inflamatória exacerbada, causando um aumento da gravidade da malária em indivíduos infectados. Desta forma, o desfecho da infecção parece depender de um

balanço entre os mediadores inflamatórios produzidos (Day *et al*, 1999; Andrade *et al*, 2010). Por exemplo, níveis elevados de TNF- α , IL-1 α e IL-6 já foram associados com quadros de malária grave, principalmente malária cerebral (Kern *et al*, 1989; Kwiatkowski *et al*, 1990). Crianças que morreram devido à malária cerebral possuíam níveis mais altos de TNF- α do que as sobreviventes (Kwiatkowski *et al*, 1990). Níveis elevados da citocina imunomodulatória IL-10 também já foram descritos em pacientes com malária falciparum grave e malária cerebral (Peyron *et al*, 1994).

Citocinas proinflamatórias causam efeitos sistêmicos deletérios durante a malária. O TNF- α e a IL-1 β são importantes pirógenos endógenos (Dinarello *et al*, 1986). Ambas citocinas também podem ativar o endotélio, levando ao aumento da expressão de moléculas de adesão, como a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*). As quimiocinas RANTES e MCP-1 são importantes moléculas quimioatraentes de monócitos (Ugucioni *et al*, 1995; Gerszten *et al*, 1999) e contribuem para o acúmulo de leucócitos em diversos órgãos, como no cérebro.

As plaquetas também podem contribuir para a adesão de leucócitos e hemácias no endotélio (Grau *et al*, 2003; Sun *et al*, 2003). Por exemplo, a liberação de IL-1 pelas plaquetas ativadas pode levar ao aumento da expressão de ICAM-1 e IL-6 por células endoteliais (Hawrylowicz *et al*, 1991). As plaquetas podem fazer pontes entre o endotélio e leucócitos: as plaquetas podem se ligar ao endotélio através da ligação CD40 (expresso nas plaquetas) e o seu ligante o CD40L (expresso nas células endoteliais) (Piguet *et al*, 2001). Em seguida, através da ligação P-selectina e PSGL-1, as plaquetas podem mediar a ligação com leucócitos. Por fim, as plaquetas podem contribuir para o sequestro de hemácias parasitadas e não parasitadas, através da ligação do CD36 (expresso nas plaquetas) e as proteínas de membrana do eritrócito 1 de *P. falciparum* (do inglês, *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 - PfEMP1*) (Wassmer *et al*, 2004). O fenômeno de citoadesão não é exclusivo de *P. falciparum* pois, já foi observado que hemácias parasitadas de *P. vivax* também são capazes de aderir a células endoteliais cerebrais e pulmonares e também a criocortes de placenta (Carvalho *et al*, 2010).

Observamos também o aumento de IL-6, IL-1 β , IFN- γ e da quimiocina MCP-1 nos plasmas dos pacientes infectados. Esses resultados estão de acordo com diversos trabalhos publicados que demonstram um aumento na produção de diversos mediadores

inflamatórios em pacientes com malária vivax (Andrade *et al*, 2010; Leoratti *et al*, 2012; Ribeiro *et al*, 2016).

Citocinas como IL-1 β , IL-6 e MCP-1 podem estar sendo produzidas por monócitos. A P-selectina não induz somente a agregação ao monócito, pois além de adesão, essa ligação P-selectina/PSGL-1 induz mudanças funcionais nos monócitos. Esses monócitos passam a ter uma maior capacidade de adesão ao endotélio, a ter um perfil proinflamatório, que é o perfil CD14^{high}CD16⁺, com aumento da expressão de COX-2 e da produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio (Weyrich *et al*, 1995; Dixon *et al*, 2006; Passacuale *et al*, 2011; Suzuki *et al*, 2013).

A adição de plaquetas ativadas a monócitos, leva a ativação de um importante fator de transcrição, o NF- κ B (Weyich *et al*, 1995). A sinalização via P-selectina nos monócitos leva a secreção de MCP-1 e TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-10 e IL-1 β (Weyich *et al*, 1995; Weyrich *et al*, 1996; Suzuki *et al*, 2013). Uma das causas do aumento de MCP-1, IL-6, IL-10 e IL-1 β observados nos pacientes seria a interação de plaquetas e monócitos através da P-selectina, visto que observamos um aumento desses agregados e da expressão de P-selectina nos pacientes.

Monócitos e macrófagos também podem ser ativados e contribuir para o aumento das citocinas através da interação com a molécula de heme. Macrófagos murinos e humanos liberam TNF- α em resposta ao heme, que é reconhecido pelo TLR4 (Figueiredo *et al*, 2007; Fortes *et al*, 2012). Macrófagos murinos produzem IL-1 β após incubação com heme, devido à ativação inflamassoma NLRP3 (Li *et al*, 2014).

O pigmento malárico, hemozoína, liberado na circulação após a ruptura dos eritrócitos devido à esquizogonia, é fagocitado por monócitos e macrófagos. Diversos efeitos da fagocitose da hemozoína, tanto natural quanto sintética (sHz), já foram descobertos nessas células, tais como a ativação do NF- κ B e de MAPKs, como ERK e p38, e a liberação de citocinas (Jaramillo *et al*, 2003; Jaramillo *et al*, 2005; Polimeni *et al*, 2012). Macrófagos murinos que são incubados com sHz tem aumento da expressão de mRNA para diversas quimiocinas, como MCP-1 e MIP-1 α e MIP-1 β (Jaramillo *et al*, 2005). Já a injeção de sHz em camundongos leva ao aumento da migração de leucócitos e de diversas citocinas, como IL-6 e IL-1 β e MCP-1 (Jaramillo *et al*, 2004).

As plaquetas são importantes reservatórios da quimiocina RANTES e são capazes de liberá-la quando estão ativadas (Kameyoshi *et al*, 1992). As plaquetas dos pacientes incluídos no estudo se encontravam ativadas, pois expressavam P-selectina e

agregaram aos monócitos, logo, o aumento de RANTES observado poderia ter sido causado pelo aumento da ativação dessas células. Por outro lado, observamos que pacientes com plaquetopenia grave (plaquetas < 50.000/ μ L) possuíam níveis de RANTES menores do que os pacientes com plaquetas acima de < 50.000/ μ L, e ainda observamos uma correlação positiva entre os níveis de RANTES e a contagem de plaquetas. Estes dados são mais um indicativo de que o aumento de RANTES observado era proveniente das plaquetas, visto que pacientes com menor número de plaquetas possuíam níveis reduzidos de RANTES. Um estudo com crianças infectadas com *P. falciparum* demonstra que níveis reduzidos de RANTES estão associados com mortalidade entre crianças com malária cerebral. Neste trabalho, também foi observada uma forte correlação positiva entre a contagem de plaquetas e os níveis de RANTES (John *et al*, 2006).

Em um trabalho de Machlus e colaboradores (2016), foi observado que o RANTES liberado por plaquetas ativadas é capaz de induzir a produção de plaquetas pelos megacariócitos. Em nosso estudo, observamos aumento do MPV nos pacientes, o que é um indicativo de síntese de novas plaquetas, e um aumento nos níveis plasmáticos de RANTES. Além disso, pacientes com plaquetopenia grave apresentaram menores níveis de RANTES em relação aos não-grave. É possível que nos pacientes com plaquetopenia grave, o menor nível de RANTES leve a um menor estímulo de produção de plaquetas pelo megacariócito, contribuindo para o aumento plaquetopenia.

A quimiocina mais abundante nas plaquetas é o PF4 que fica armazenado nos grânulos α plaquetários. Pacientes com *P. falciparum* possuem níveis elevados de PF4 (Essien *et al*, 1983), o que corrobora nossos resultados, onde também observamos um aumento de PF4 nos pacientes infectados com *P. vivax*. O PF4 é uma quimiocina com importantes funções na malária. As plaquetas são capazes de matar o plasmódio através da liberação desta quimiocina (McMorran *et al*, 2012). Por outro lado, o PF4 contribui para a formação do quadro de malária cerebral, visto que camundongos nocautes para PF4 possuem um aumento da sobrevivência após infecção com *P. berghei* (Srivastava *et al*, 2008). Pacientes com dengue, doença também caracterizada pela ativação plaquetária, possuem níveis elevados de PF4 (Srichaikul *et al*, 1989; Conroy *et al*, 2014). O aumento de PF4 observado em nossos resultados é mais um indicador da ativação plaquetária presente nos pacientes com *P. vivax*.

Apesar de não possuírem DNA genômico, as plaquetas possuem um transcriptoma complexo, com diversos tipos de RNA, entre eles, mRNAs e microRNAs (Denis *et al*, 2005; Landry *et al*, 2009; Rowley *et al* 2011, Plé *et al*, 2012). Na presente tese, realizamos o estudo do transcriptoma de plaquetas de pacientes com malária vivax e sujeitos sadios e observamos uma padrão de expressão bastante diferente entre ambos os grupos. Corroborando nossos dados, já foi observado que o transcriptoma plaquetário sofre alterações em algumas doenças, como é o caso de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, infarto agudo do miocárdio e com doença falciforme (Raghavachari *et al*, 2007; Lood *et al*, 2010; Eicher *et al*, 2015). Além disso, ao analisarmos as funções nas quais os genes que se encontravam diferentemente expressos entre os dois grupos se encaixavam, observamos que muitos destes genes participavam de processos de morte celular. Esse resultado é mais um indicativo de que a apoptose plaquetária deve ter um importante papel na plaquetopenia observada nos pacientes infectados com *P. vivax*.

O gene em que observamos um maior aumento de expressão nos pacientes foi o da heme-oxigenase-1 (HO-1), uma enzima que atua na degradação do heme e possui um importante papel na malária (Seixa *et al*, 2009). A expressão de HO em plaquetas humanas, para o meu conhecimento, ainda não foi demonstrada. Encontramos somente um trabalho que detectou HO-1 e HO-2 em plaquetas de ratos e camundongos (Zhuang *et al*, 2005). Mais estudos serão necessários para determinar o padrão de expressão de ambas as isoformas da HO em plaquetas humanas e qual a função desta enzima tanto na malária como em outras doenças hemolíticas.

Outros dois genes encontrados na análise do transcriptoma e que observamos grande aumento nos pacientes infectados com *P. vivax* foram os das caspases inflamatórias 4 e 5. Ambas as caspases são capazes de ativar o inflamassoma NLRP3 por uma via não-canônica, ou seja, que requer somente uma etapa para ativar o inflamassoma. A ativação do inflamassoma NLRP3 requer dois sinais: um estímulo inicial, como o LPS, que leva a ativação do fator de transcrição NF-kB, o que leva ao aumento da transcrição de NLRP3 e de pró-IL-1 β , e um segundo sinal que induz a montagem do complexo inflamassoma através do recrutamento da pro-caspase-1 e da molécula adaptadora ASC. Somente após esses 2 eventos é que ocorre a clivagem de caspase-1 e a maturação da pró-IL-1 β . Na via não-canônica não há necessidade de um segundo sinal para ocorrer a liberação de IL-1 β , as caspases 4 e 5 podem levar a montagem e ativação do inflamassoma NLRP3 após um sinal inicial (Kajiwara *et al*,

2014; Casson *et al*, 2015; Viganò *et al*, 2015). Em nossos resultados, observamos os níveis de diversas citocinas aumentadas nos plasmas pacientes, entre elas a IL-1 β . Na dengue, doença também caracterizada por ativação e morte plaquetária, é observada a presença e ativação do inflamassoma NLRP3 em plaquetas (Hottz *et al*, 2013). Não existem dados na literatura a respeito das caspases inflamatórias em plaquetas, porém, é possível supor que na malária haja aumento das proteínas e/ou da ativação de inflamassomas, o que poderia contribuir para o aumento de IL-1 β observado nos pacientes.

O estudo do transcriptoma também será importante para definir melhor como plaquetas podem contribuir para a patogênese da malária, além de detectar possíveis marcadores de gravidade. Inclusive, já temos a intenção de realizar o transcriptoma de plaquetas de pacientes com *P. falciparum* de forma a comparar a expressão de genes entre os dois plasmódios.

Visto que a malária é uma doença onde ocorre a lise de hemácias, resolvemos investigar como estariam os níveis de duas importantes proteínas que atuam prevenindo os efeitos do heme livre, a hemopexina e haptoglobina. Em nossos resultados, observamos um aumento de hemopexina nos pacientes com malária vivax. Hemopexina é uma proteína de fase aguda, que são proteínas que tem a sua concentração plasmática aumentada (proteínas positivas, como a hemopexina) ou diminuída (proteínas negativas) em, pelo menos, 25 % durante processos inflamatórios (Gabay *et al*, 1999). A hemopexina é uma proteína positiva de fase aguda, sendo produzida pelos hepatócitos em resposta a diversos estímulos, tais como as citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α . Os pacientes com malária vivax apresentaram um aumento tanto de IL-6 como de IL-1 β , o que poderia explicar o aumento de hemopexina observado nos pacientes infectados com *P. vivax*.

Outro marcador de hemólise que utilizamos, além da hemopexina, foi a dosagem de haptoglobina no plasma dos pacientes e controles. Inicialmente, ao compararmos os níveis de haptoglobina entre doadores saudáveis e sujeitos infectados com *P. vivax*, não observamos diferença estatística entre os dois grupos. No trabalho de Cunnington e colaboradores (2012), também não foi observada diferença estatística nos níveis de haptoglobina entre controles e pacientes infectados com *P. falciparum*. Os autores observaram uma distribuição bimodal dos níveis de haptoglobina, o que corrobora os nossos dados onde também encontramos esse mesmo padrão de distribuição. Essa

distribuição bimodal pode ser explicada pelo fato de que os níveis de haptoglobina reduzem durante a malária, devido a hemólise (Gyan *et al*, 2002; O'Donnell *et al*, 2009), em alguns pacientes, mas também podem aumentar, devido a indução da produção como parte de uma resposta de fase aguda, em outros pacientes (Gabay *et al*, 1999). A haptoglobina, como a hemopexina, é uma proteína de fase aguda, logo há um aumento da produção desta em resposta a mediadores inflamatórios, como a citocina IL-6. Por outro lado, durante processos de hemólise os níveis de haptoglobina decaem pois esta proteína se liga a hemoglobina liberada, formando um complexo hemoglobina-haptoglobina, que é removido da circulação. Esse complexo é internalizado por células que expressam a integrina Mac-1 (CD11b/CD18), tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células *natural killer* (El Ghmati *et al*, 1996).

A malária vivax é uma doença hemolítica, porém, o grau de hemólise é menor do que pacientes sépticos ou com anemia hemolítica. Em um estudo feito com crianças infectadas com *P. falciparum*, somente 22% estavam anêmicas, porém os níveis de heme plasmáticos eram muito maiores no dia 0 (dia de chegada ao hospital) do que 28 dias após a ida ao hospital (Cunnington *et al*, 2012). Em nossos estudos não observamos diferenças nos níveis de hemoglobina entre os pacientes com malária vivax e controles. Ao contrário da haptoglobina, os níveis de hemopexina nos pacientes infectados com *P. vivax* estavam relativamente bem distribuídos, ou seja, não observamos o padrão bimodal de distribuição que ocorreu com a haptoglobina. Isso nos sugere que, nos pacientes incluídos no estudos, o processo de hemólise que ocorreu não liberou quantidade suficiente de heme livre a ponto de reduzir/depletar os níveis plasmáticos de hemopexina. Pretendemos realizar a quantificação de heme nos plasmas dos pacientes incluídos no nosso estudo de forma a caracterizar melhor o processo de hemólise nesses pacientes incluídos no estudo.

Em nossos resultados, observamos que os níveis de haptoglobina se encontram reduzidos nos pacientes com plaquetopenia grave e que os níveis de haptoglobina estão correlacionados positivamente com a contagem de plaquetas. Visto que o heme é uma molécula com diversos efeitos tóxicos, é possível que uma das causas para a queda do número de plaquetas seja o aumento de heme livre atuando sobre as plaquetas, induzindo ativação e morte destas células. Corroborando essa hipótese, Larsen e colaboradores (2010) observaram que o heme sensibiliza hepatócitos a sofrerem morte

celular causada por adição de TNF ou peróxido de hidrogênio e que a adição de anti-oxidantes previne esse efeito.

As causas para a plaquetopenia na malária ainda não estão totalmente elucidadas. Diversos mecanismos tem sido sugeridos para tentar explicar a queda na contagem de plaquetas, tais como a redução na produção de plaquetas ou aumento da destruição mediada por anticorpos, estresse oxidativo, apoptose e fagocitose, bem como ativação endotelial. (Grau et al, 1988; Piguet *et al*, 2002; Mast *et al*, 2007; Araujo *et al*, 2008; Metcalf Pate *et al*, 2011; Coelho *et al*, 2013).

A ativação plaquetária também pode levar a redução da contagem de plaquetas, isso porque as plaquetas ativadas são sequestradas em interações com células inflamatórias, como monócitos e neutrófilos, e com o endotélio (Peters *et al*, 1997; Mast *et al*, 2007; Metcalf Pate *et al*, 2011; Rondina *et al*, 2015).

Doenças que tem como característica a queda do número de plaquetas, tais como a dengue e HIV, possuem a ativação plaquetária como um importante fator que contribui para a plaquetopenia (Hottz *et al*, 2013; Metcalf Pate *et al*, 2013). Em nossos estudos, observamos um aumento da expressão de P-selectina e de agregados plaqueta-monócito nos pacientes com malária vivax quando comparados com os controles sadios, demonstrando que as plaquetas estão ativadas durante a infecção, o que poderia contribuir para a plaquetopenia observada nos pacientes.

Trabalhos demonstraram diversos marcadores de ativação plaquetária, como o aumento da expressão de P-selectina, a formação de agregados plaqueta-monócito e a liberação de mediadores solúveis como RANTES e IL-1 β em pacientes com HIV, dengue e em modelo símios com SIV (Pate *et al*, 2013; Hottz *et al*, 2013; Hottz *et al* 2014, Holme *et al*, 1998). A formação de agregados plaqueta-monócito é um marcador sensível para a determinação da ativação plaquetária *in vivo*, e é principalmente mediada via P-selectina, que é translocada para a superfície da plaqueta ativada (Michelson *et al*, 2001). Após a formação desses agregados, há um aumento da liberação de citocinas (Weyrich et al, 1996), contribuindo para uma resposta inflamatória sistêmica inapropriada e exacerbada. O aumento da P-selectina e a formação de agregados plaqueta-monócito poderiam contribuir para a patogênese da malária através das interações com leucócitos e endotélio e também da liberação de mediadores imunomodulatórios liberados a partir destas interações. Por exemplo, o aumento de agregados plaqueta-monócito em pacientes idosos sépticos estão associados

com maior risco de morte. Além disso, os níveis plasmáticos de IL-6 e IL-8 eram significativamente maiores nos pacientes que morreram quando comparados aos que sobreviveram (Rondina *et al*, 2015).

Outra possível causa para a plaquetopenia observada na malária seria a apoptose de plaquetas. Na presente tese, demonstramos que as plaquetas dos pacientes infectados com *P. vivax* possuíam sinais de apoptose, i.e., a ativação das caspases 9 e 3. Corroborando nossos dados, pacientes infectados com o vírus do Dengue e plaquetopênicos apresentam ativação e apoptose plaquetária (Hottz *et al*, 2013), e em um modelo de malária experimental, a plaquetopenia estava relacionada com ativação de caspases plaquetárias (Piguet *et al*, 2002).

Já se sabe que micropartículas (fragmentos entre 0.1-1 micrometros) oriundas de eritrócitos de pacientes com doença falciforme, são capazes de carrear heme e que essas micropartículas podem aderir a células endoteliais e transferir o heme para essas células, causando estresse oxidativo e apoptose (Camus *et al*, 2015). Sendo a malária uma doença hemolítica, é possível que haja geração de micropartículas carreadoras de heme, que possam aderir não somente as células endoteliais como possivelmente as plaquetas e transferir heme, levando à apoptose plaquetária.

Coelho (2013) e colaboradores observaram que a plaquetopenia na malária vivax está relacionada com a fagocitose de plaquetas. Em pacientes com dengue, há um aumento de plaquetas apoptóticas e também correlações positivas entre a ativação de caspase 3 ou exposição de fosfatidilserina e a fagocitose de plaquetas (Alonzo *et al*, 2012). Neste mesmo trabalho, o uso de uma proteína que mascara a fosfatidilserina em células apoptóticas (Asano *et al*, 2004), levou a redução da fagocitose de plaquetas de pacientes por células THP-1 diferenciadas em macrófagos (Alonzo *et al*, 2012). É possível que na malária vivax esteja ocorrendo o mesmo fenômeno, ou seja, as plaquetas apoptóticas poderiam sinalizar para serem fagocitadas, via reconhecimento de fosfatidilserina, o que levaria ao aumento da fagocitose observado nos pacientes e a plaquetopenia.

Além da expressão das caspases clivadas 3 e 9, durante a análise do transcriptoma, observamos o aumento do RNA para as caspases 3, 7 e FAS. Ainda não há evidências na literatura que demonstrem se as plaquetas são capazes ou não de sintetizar essas proteínas a partir do RNA. Porém, de forma bastante interessante, os pacientes com malária vivax apresentaram um aumento da expressão de pro-caspase 3,

visto através do *western blott*. Algumas hipóteses podem ser feitas para explicar esse aumento de pro-caspase 3. A primeira seria que a pro-caspase 3 estaria sendo transferida para as plaquetas no momento da sua formação a partir de megacariócitos. Proteínas com diversas funções, tais como moléculas de adesão e citocinas, são sintetizadas e organizadas em grânulos, membranas e outros locais, de forma que as plaquetas sejam carregadas com estes componentes antes de serem liberadas na circulação sanguínea. Inclusive, já foram identificadas mais 300 proteínas que são liberadas por plaquetas humanas após a ativação por trombina (Coppinger *et al*, 2004).

Outra hipótese para o aumento de caspase 3 observado nos pacientes, é a que as plaquetas estariam internalizando proteínas do meio externo, nesse caso caspase 3, a partir de vesículas liberadas por outros tipos celulares (Youssefian *et al*, 2002; Del Conde *et al*, 2005; Boing *et al*, 2013).

Por fim, uma terceira hipótese seria que plaquetas sintetizariam caspase 3 a partir do mRNA. Até o momento ainda não existem trabalhos que demonstrem a tradução de mRNA para a síntese de caspase 3 por plaquetas. No entanto, trabalhos tem demonstrado que as plaquetas são capazes de realizar a tradução de diversas proteínas, como IL-1 β , fator tissular, COX-2, integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (ou GPIIb/IIIa) entre outras, em resposta a diversos estímulos, como trombina, bactérias como *E. coli* e *S. aureus* e também LPS (Thon *et al*, 2007; Shashkin *et al*, 2008; Rondina *et al*, 2011; Vieira-de-Abreu *et al*, 2011). Já existem algumas evidências indicando que o padrão de expressão de mRNA nas plaquetas não é uma cópia exata do padrão de expressão nos megacariócitos e que a transferência de mRNA do megacariócito para as plaquetas é um evento controlado (Cecchetti *et al*, 2011). As plaquetas também são capazes de transferir RNA funcional para monócitos, o que levanta a hipótese de que plaquetas também possam ser recipientes de transferência de mRNA de outras células (Risitano *et al*, 2012). É possível que durante a infecção malárica haja um aumento do mRNA para a caspase 3, proveniente dos megacariócitos ou de outras células, e ainda, que haja um aumento da síntese desta proteína.

A via intrínscica de apoptose em plaquetas ainda precisa ser melhor estudada; ainda não está muito claro se essa via ocorre nas nessas células. A proteína Fas e o seu respectivo mRNA ainda não foram detectados em plaquetas frescas/recém colhidas ou armazenadas (4 a 11 dias) (Leytin *et al*, 2003; Leytin *et al*, 2012). Já o FasL tem a sua expressão detectada em plaquetas não-ativadas e após a ativação com ADP ou

trombina, havendo nesse último caso um aumento significativo da sua expressão na superfície dessas células (Ahmad *et al*, 2001).

A ativação de caspase 9 em plaquetas que foram incubadas com plasma de pacientes com malária vivax nos fez levantar a questão de que as toxinas maláricas heme e hemozoína teriam uma participação na plaquetopenia observada nos pacientes. As concentrações de heme e hemozoína sintética (sHz) utilizadas para estimular as plaquetas são compatíveis com valores quantificados no plasma de pacientes e camundongos infectados por plasmódio (Jaramillo *et al*, 2005; Seixas *et al*, 2009) e também, no caso do heme, de camundongos sépticos (Larsen *et al*, 2010).

Observamos que plaquetas incubadas com sHz se apresentaram apoptóticas, com a ativação das caspases 3/7 e 9, e a exposição de fosfatidilserina, observadas por citometria, e com clivagem da caspase 3, detectada por *western blotting*. A indução de apoptose por Hz é observada em precursores eritróides, que é caracterizada pela redução do potencial de membrana da mitocôndria e ativação das caspases 3, 8 e 9 (Lamikanra *et al*, 2009). Astrócitos que são incubados com Hz também sofrem apoptose (Martiney *et al*, 2007).

Quando incubamos plaquetas de voluntários sadios com heme a 10 μM , observamos os mesmos eventos descritos no parágrafo acima para a sHz. O heme a 1 μM não foi capaz de induzir a exposição de fosfatidilserina e a ativação de caspase 9 após 5 horas de incubação, no entanto, na presente tese não foram avaliados tempos de incubação mais longos para confirmar este dado. Heme é conhecidamente uma molécula com efeitos tóxicos, e causa morte em diversos tipos celulares (Seixas *et al*, 2009; Larsen *et al*, 2010; Fortes *et al*, 2012). Em uma cultura de hepatócitos, a incubação de heme a 5 μM por 1 hora não é capaz de induzir morte. Porém, a combinação de heme e TNF na cultura causa estresse oxidativo o que leva à apoptose dessas células, observado pela condensação de cromatina, encolhimento do núcleo e ativação de caspase 3 (Seixas *et al*, 2009). Em pacientes com malária vivax, a plaquetopenia está relacionada com estresse oxidativo. Pacientes plaquetopênicos apresentam níveis elevados de malondialdeído no plasma, um marcador de peroxidação lipídica causado por estresse oxidativo, quando comparados com pacientes não plaquetopênicos (Araujo *et al*, 2008). Sendo o heme uma importante molécula pró-oxidante, a liberação de heme livre durante a infecção pelo plasmódio pode induzir a formação de estresse oxidativo nas plaquetas e a sua consequente morte.

A proteína anti-apóptótica Bcl-xL, faz parte da família de proteínas Bcl-2 e é uma importante reguladora da apoptose dependente de mitocôndria. A presença desta proteína já foi descrita em plaquetas por diversos autores (Li *et al*, 2000; Zhang *et al*, 2007; Qiao *et al*, 2016). Ao analisar a expressão de Bcl-xL em plaquetas de pacientes com malária vivax e controles sadios, de forma surpreendente, não observamos diferenças significativas na sua expressão quando comparamos controles e pacientes. Visto o importante papel que o Bcl-xL exerce no controle da meia-vida plaquetária, uma possível explicação para o fenômeno observado é o fato de que as plaquetas que estão com o Bcl-xL em baixas concentrações são removidas da circulação e assim, ao coletarmos o sangue do pacientes para a purificação das plaquetas, estamos extraindo somente as plaquetas com expressão normal de Bcl-xL.

A adição de sHz em plaquetas não foi capaz de induzir a degradação do Bcl-xL. Para o nosso conhecimento, não existem trabalhos que demonstrem o efeito da Hz na expressão desta proteína. Corroborando nosso resultado, agonistas clássicos plaquetários como a trombina e o PAF (do inglês, *platelet-activating factor*) também não são capazes de induzir a degradação de Bcl-xL (Kraemer *et al*, 2012). Inclusive, altas concentrações de trombina (1 U/mL), que induzem a apoptose plaquetária, também não foram capazes de levar a degradação de proteínas da família Bcl-2, como a própria Bcl-xL (Lopez *et al*, 2007; Leytin *et al*, 2006; Kraemer *et al*, 2012).

Por outro lado, a incubação de plaquetas de doadores sadios com heme, em diferentes tempos e concentrações, levou à degradação do Bcl-xL. O Bcl-xL é uma das principais moléculas que regula a meia-vida plaquetária *in vivo*. Em um importante trabalho de Mason e colaboradores (2007), foi visto que camundongos com mutações no gene *Bcl-x* são plaquetopênicos. Os autores propõem que a quantidade de Bcl-xL delimita a meia-vida da plaqueta. Como o Bcl-xL é degradado ao longo do tempo, chega um ponto em que a proteína pró-apoptótica Bak é liberada e a apoptose plaquetária é induzida. Desta forma, degradação do Bcl-xL induzida pelo heme pode ser um importante mecanismo de indução de apoptose plaquetária durante a malária.

O aumento do nível de Ca^{2+} intracelular, seja através do influxo por canais de membrana plasmáticos ou liberação pelo retículo endoplasmático, pode induzir apoptose (Scorrano *et al*, 2003; Mattson *et al*, 2003; Orrenius *et al*, 2003). A adição de ionóforos de cálcio, tal como o A23187, leva a ativação de calpaínas, que são proteases intracelulares dependentes de cálcio. Além disso, a proteína Bcl-xL é um substrato para

calpaínas *in vitro* (Gil-Parrado *et al*, 2002). Assim, após termos observado que heme levou a degradação de Bcl-xL em plaquetas, resolvemos investigar se essa degradação não estaria ocorrendo pela ativação de calpaínas. Inicialmente utilizamos um quelante de cálcio previamente à adição dos estímulos e pudemos observar que a adição de EGTA impediu a degradação induzida pelo heme e pelo inóforo de cálcio A23187. As calpaínas possuem importantes papéis na apoptose: além de clivarem a proteína BclxL, as calpaínas também são capazes de clivar as pro-caspases 7 e 12 para as suas formas ativas (Nakagawa *et al*, 2000; Gafni *et al*, 2009). Calpeptina, um inibidor de calpaínas, previne diversos eventos apoptóticos em plaquetas estimuladas com ionóforo de cálcio, tais como processamento de caspases 3 e 9, encolhimento celular e liberação de micropartículas (Fox *et al*, 1991; Vanags *et al*, 1997; Wolf *et al*, 1999). O aumento da clivagem das caspases 9, 3/7 observado após o estímulo com heme também pode ter ocorrido devido a ativação de calpaínas. Já a diferença que observamos entre heme e sHz com relação a degradação do Bcl-xL pode ser explicada pelo fato do heme induzir nas plaquetas um maior fluxo de cálcio do que a sHz. Experimentos para detectar o fluxo de cálcio em plaquetas estimuladas com heme e sHz irão contribuir para o esclarecimento desta questão.

Para confirmar que a degradação do Bcl-xL ocorre via ativação de calpaínas e não de proteassoma, utilizamos inibidores específicos de ambos e observamos que apenas os inibidores de calpaínas foram capazes de inibir a degradação do Bcl-xL. Em um trabalho de Kraemer e colaboradores (2012) a degradação de Bcl-xL em plaquetas foi induzida por uma cepa patogênica de *E. coli*. Neste caso, a degradação do Bcl-xL também é dependente da ativação de calpaínas e independente da ativação de proteassoma. De forma interessante, heme parece exercer efeitos contrários de acordo com o tipo celular analisado. Em neutrófilos humanos, heme é capaz de retardar a apoptose destas células, aumentando a síntese de Bcl-xL e a degradação de Bad (Arruda *et al*, 2004). Pudemos então, concluir que a degradação de Bcl-xL por calpaínas ativadas pelo heme pode ser um importante fator que contribui para a plaquetopenia observada em pacientes com malária.

Durante a infecção pelo *P. vivax* tem-se a liberação de heme e hemozoína na circulação e essas duas toxinas podem causar a ativação plaquetaria, com o aumento de expressão de P-selectina, liberação das quimicinas RANTES e PF4, o que leva a adesão de plaquetas ao endotélio e a outras células, como monócitos. Heme e hemozoina

podem ainda causar a apoptose plaquetária durante a infecção, visto através da exposição de fosfatidilserina e ativação de caspases. Heme, possivelmente pela indução de influxo de cálcio, é capaz de induzir a degradação de uma importante proteína anti-apoptótica, a Bcl-xL, através da ativação de calpaínas. Em suma, nossos dados mostraram que durante a malária vivax há ativação e apoptose plaquetária e que ambos os fenômenos devem contribuir para a plaquetopenia observada na malária causada pelo *P. vivax* (Figura 5.1).

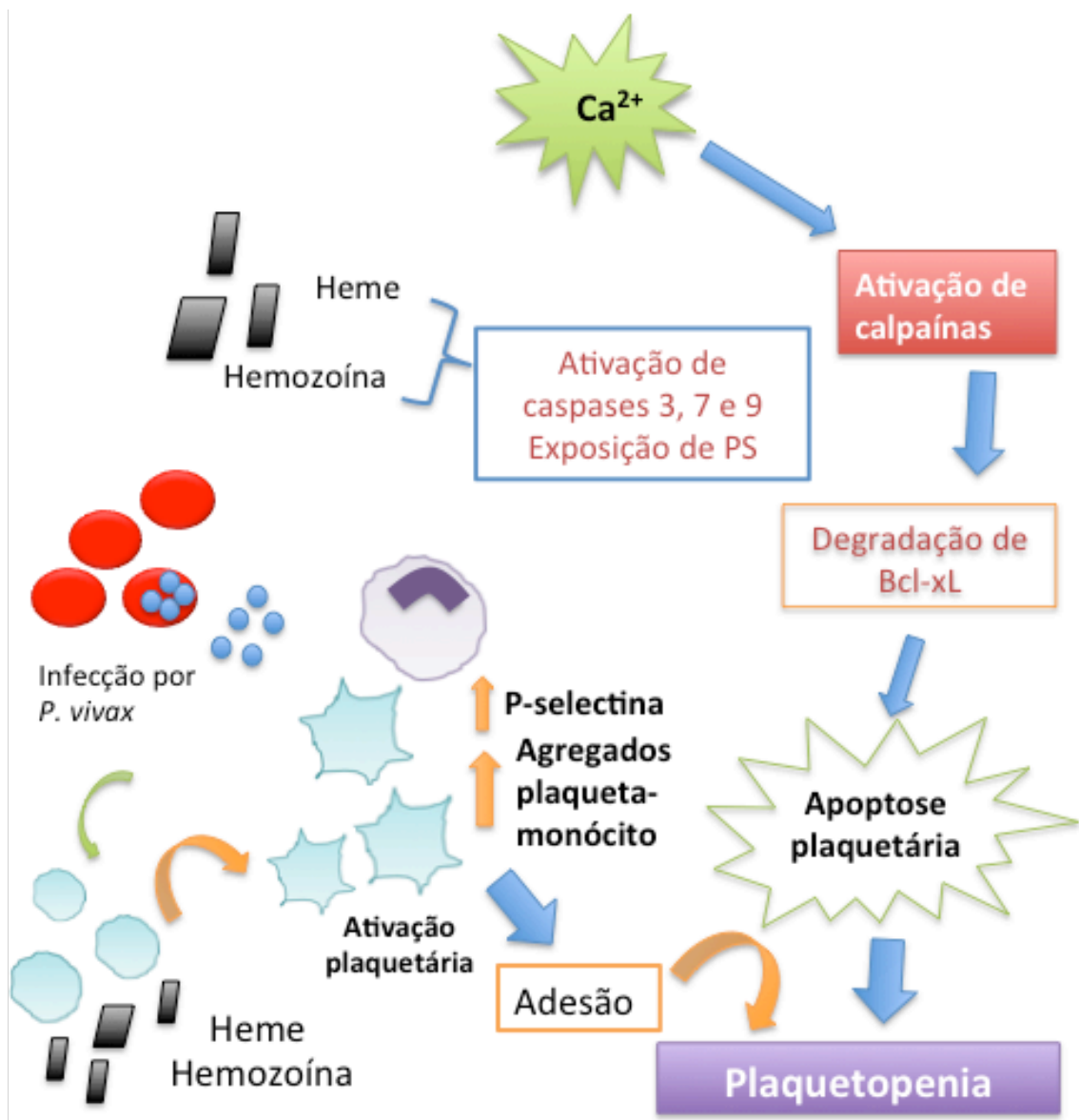


Figura 5.1: Mecanismos propostos de plaquetopenia na malária.

6) Conclusões:

A plaquetopenia é uma complicação frequente na malária vivax e a apoptose e a ativação plaquetária contribuem para esse processo. Heme e hemozoína são duas moléculas que estão presentes durante a infecção e que induzem a apoptose plaquetária, sendo possíveis causadores da plaquetopenia observada nos pacientes. O mecanismo de indução de apoptose plaquetária induzida pelo heme envolve degradação de Bcl-xL e a ativação de calpaínas.

7) Perspectivas

- Dosagem de heme nos plasmas de pacientes com malária vivax e doadores sadios;
- Avaliação de outros marcadores de apoptose em plaquetas isoladas de pacientes e controles e também em plaquetas incubadas com heme e sHz;
- Avaliação da expressão de marcadores de apoptose de plaquetas de pacientes antes e após o tratamento antimalárico;
- Avaliação do influxo de cálcio de plaquetas de sujeitos sadios incubadas com heme;
- Avaliação do efeito da adição de ligantes de heme, como a haptoglobina, em plaquetas que serão incubadas com plasma de pacientes para verificar se haverá ou não a reversão do processo de apoptose;
- Realização do transcriptoma de plaquetas de pacientes infectados com *P. falciparum*.

8) Referências bibliográficas

Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* **2007**; 19: 488–96.

Ahmad R, Menezes J, Knafo L, Ahmad A. Activated human platelets express Fas-L and induce apoptosis in Fas-positive tumor cells. *J. Leukoc. Biol.* **2001**; 69: 123–128.

Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda MV, Alecrim MGC. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases* **2010**; 16(10): 1611-1614.

Alonzo MTG, Lacuesta TLV, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LAC, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary Dengue virus infections. *The Journal of Infectious Diseases* **2012**; 205: 1321–9.

Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Gbadegesin RA. Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1998**; 92: 54–56.

Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* **2005**; 106:2417–2423.

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, Barral-Netto M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal* **2010**, 9:13.

Anstey NM, Jacups SP, Cain T, Pearson T, Ziesing PJ, Fisher DA, Currie BJ, Marks PJ, Maguire GP. Pulmonary manifestations of uncomplicated falciparum and vivax malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. *J. Infect. Dis.* **2002**; 185: 1326–1334.

Anstey NM, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, Maguire GP. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J. Infect. Dis.* **2007**; 195: 589–596.

Araujo CF, Lacerda MVG, Abdalla DSP, Lima ES. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**; 103(6): 517-521.

Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**; 1790: 589–599.

Arruda MA, Rossi AG, Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graça-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF- κ B. *J. Immunol.* **2004**; 173: 2023-2030.

Asano K, Miwa M, Miwa K, Hanayama R, Nagase H, Nagata S, Tanaka M. Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice. *J. Exp. Med.* **2004**; 200: 459–467.

Avcu F, Ural AU, Cetin T, Nevruz O. Effects of bortezomib on platelet aggregation and ATP release in human platelets, in vitro. *Thromb. Res.* **2008**; 121: 567–

571.

Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, Kamath L, Kuliopulos A, Chishti AH. Disruption of the mouse μ -calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol. Cell. Biol.* **2001**; 21(6): 2213–2220.

Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1993**; 90: 9285–9289.

Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash, AI, Smith A, Nath KA, Hebbel RP, Vercellotti GM. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* **2014**; 123: 377–390.

Berger G, Masse JM, Cramer EM. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood* **1996**; 87:1385–95.

Bertino AM, Qi XQ, Li J, Xia Y, Kuter DJ. Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37°C. *Transfusion* **2003**; 43: 857–866.

Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews* **2009**; 23:177–189.

Blumberg N, Spinelli SL, Francis CW, Taubman MB, Phipps RP. The platelet as an immune cell—CD40 ligand and transfusion immunomodulation. *Immunol. Res.* **2009**; 45:251–260.

Boing AN, Stap J, Hau CM, Afink GB, Ris-Stalpers C, Reits EA, Sturk A, van Noorden CJ, Nieuwland R. Active caspase-3 is removed from cells by release of caspase-3-enriched vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**; 1833(8):1844-52.

Boise, LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka, LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **1993**; 74: 597–608.

Bozza FA, Shah AM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Amicus or adversary platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2009**; 40:123–134.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**; 303:1532–153570.

Brophy TM, Raab M, Daxecker H, Culligan KG, Lehmann I, Chubb AJ, Treumann A, Moran N. RN181, a novel ubiquitin E3 ligase that interacts with the KVGFFKR motif of platelet integrin alpha(IIb)beta3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**; 369: 1088-1093.

Campos FMF, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho ALS, Paula SCO, Fontes CJ, Brito CF, Carvalho LH. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal* **2010**, 9:327.

Camus SM, Moares JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, Loufrani L, Grimaud L, Lambry JC, Charue D, Kiger L, Renard JM, Larroque C, Le Clésiau H, Tedgui A, Bruneval P, Barja-Fidalgo C, Alexandrou A, Tharaux PL, Boulanger CM, Blanc-Brude OP. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood* **2015**; 125(24): 3805–3814.

Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **2002**; 84(2-3): 215-22.

Carvalho BO, Lopes SCP, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, Mamoni R, Leite JA, Rodrigues MM, Soares IS, Oliveira TR, Wunderlich G, Lacerda MVG, del Portillo HA, Araújo MOG, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Renia L, Costa FTM. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *The Journal of Infectious Diseases* **2010**; 202(4): 638–647.

Casson CN, Yu J, Reyes VM, Taschuk FO, Yadav A, Copenhaver AM, Nguyen HT, Collman RG, Shin S. Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative. *PNAS* **2015**; 112(21): 6688–6693.

Cecchetti L, Tolley ND, Michetti N, Bury L, Weyrich AS, Gresele P. Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events. *Blood* **2011**; 118(7): 1903-1911.

Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**; 25:2428-2434.

Chapman LM, Aggrey AA, Field DJ, Srivastava K, Ture S, Yui K, Topham DJ, Baldwin III WM, Morrell CN. Platelets present antigen in the context of MHC class I. *J. Immunol.* **2012** 15; 189(2): 916–923.

Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL, Eikelboom JW, Konkle B, Mohler ER, Reilly MP, Berger JS. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.* **2010**; 8: 148–156.

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, DeVinney R, Doig CJ, Green FHY, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* **2007**; 13:463–469.

Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *JEM* **2005**; 201(1): 19–25.

Coelho HCC, Lopes SCP, Pimentel JPD, Nogueira PA, Costa FTM, Siqueira AM, Melo GC, Monteiro WM, Malheiro A, Lacerda MVG. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. *PLoS ONE* **2013**; 8(5): e63410.

Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* **2005**; 83:196–198.

Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clinical Microbiology Reviews* **2007**; 20(4): 579–592.

Conroy AL, Gélvez M, Hawkes M, Rajwans N, Liles WC, Villar-Centeno LA, Kain KC. Host biomarkers distinguish dengue from leptospirosis in Colombia: a case–control study. *BMC Infectious Diseases* **2014**, 14:35.

Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* **2004**, 103(6): 2096-2104.

Coronado LM, Nadovich CT, Spadafora C. Malarial hemozoin: From target to tool. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**; 1840(6): 2032-41.

Croce K, Flaumenhaft R, Rivers M, Furie B, Furie BC, Herman IM, Potter D. Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274(51): 36321–36327.

Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A. Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood*

1997; 89(9): 3213-3218.

Cunnington AJ, Njie M, Correa S, Takem EN, Riley EM, Walther M. Prolonged neutrophil dysfunction following *Plasmodium falciparum* malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction. *J. Immunol.* **2012**; 189(11): 5336–5346.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* **2004**, 116: 205–219.

Davis RE, Stenberg PE, Levin J, Beckstead JH. Localization of megakaryocytes in normal mice and following administration of platelet antiserum, 5-fluorouracil, or radiostrontium: evidence for the site of platelet production. *Exp. Hematol.* **1997**; 25:638–48.

Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TTH, Mai NTH, Phu NH, Sinh DX, White NJ, Ho M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti-inflammatory cytokines in severe malaria. *J. Infect. Dis.* **1999**; 180:1288–97.

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **2005**; 106: 1604–1611.

Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* **2005**; 122: 379–391.

Deroost K, Tyberghein A, Lays N, Noppen S, Schwarzer E, Vanstreels E, Komuta M, Prato M, Lin JW, Pamplona A, Janse CJ, Arese P, Roskams T, Daelemans D, Opdenakker G, Van den Steen PE. Hemozoin induces lung inflammation and correlates with malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2013**; 48(5): 589–600.

Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science* **1996**; 273:252–5.

Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J. Exp. Med.* **1986**; 163: 1433–1450.

Dixon DA, Tolley ND, Bemis-Standoli K, Martinez ML, Weyrich AS, Morrow JD, Prescott SM, Zimmerman GA. Expression of COX-2 in platelet-monocyte

interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J. Clin. Invest.* **2006**; 116: 2727–2738.

Doeuvre L, Plawinski L, Toti F, Anglés-Cano E. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J Neurochem.* **2009**; 110(2): 457-68.

Durai P, Govindaraj, RG, Choi S. Structure and dynamic behavior of Toll-like receptor 2 subfamily triggered by malarial glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* **2013**; 280: 6196–6212.

Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, Zamboni DS, Bozza MT. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2014**; 111(39): E4110-8.

Eicher JD, Wakabayashi, Vitseva O, Esa N, Yang Y, Zhu J, Freedman JE, McManus DD, Johnson AD. Characterization of the platelet transcriptome by RNA sequencing in patients with acute myocardial infarction. *Platelets* **2015**; 1-10.

El Ghmati SM, Van Hoeyveld EM, Van Strijp JG, Ceuppens JL, Stevens EA. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J. Immunol.* **1996**; 156: 2542–52.

Essien EM, Ebhota MI. Platelet secretory activities in acute malaria (*Plasmodium falciparum*) infection. *Acta. Haematol.* **1983**; 70: 183–188.

Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* **2015**; 126(2): 242-246.

Faille D, Combes V, Mitchell AJ, Fontaine A, Juhan-Vague I, Alessi MC, Chimini G, Fusaï T, Grau GE. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB Journal* **2009**; 23, 3449–3458.

Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, Oliveira MF, Oliveira PL, Graça-Souza AV, Bozza MT. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **2007**; 282, 20221–20229.

Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* **2006**; 4:445–457.

Fortes GB, Alves LS, Oliveira R, Dutra FF, Rodrigues D, Fernandez PL, Souto-Padron T, De Rosa MJ, Kelliher M, Golenbock D, Chan FKM, Bozza MT. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production *Blood* **2012**; 119(10): 2368-75.

Fox JEB, Austin CD, Reynolds CC, Steffen PK. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from membrane of aggregating platelets. *J. Biol. Chem.* **1991**; 266: 13289–95.

Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**; 92:7450–4.

Frita R, Carapau D, Mota MM, Hänscheid T. *In vivo* hemozoin kinetics after clearance of *Plasmodium berghei* infection in mice. *Malaria Research and Treatment* **2012**; Article ID 373086, 9 pages doi: 10.1155/2012/373086.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **2007**; 176:231–24171.

Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **2006**; 25: 4798–4811.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine* **1999**, 448-454.

Gafni J, Cong X, Chen SF, Gibson BW, Ellerby LM. Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J. Biol. Chem.* **2009**; 284(37): 25441–25449.

Galinski MR, Meyer EVS, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: Modern strategies to study a persistent parasite's life cycle. *Advances in Parasitology* **2013**; 81: 1–20.

Gerardin P, Rogier C, Ka AS, Jouvencel P, Brousse V, Imbert P. Prognostic value of thrombocytopenia in African children with falciparum malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2002**; 66: 686–691.

Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshidak M, Ding HA, Gimbrone Jr MA, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* **1999**, 398: 718-723.

Gibson L, Holmgren SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM, Cory S. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* **1996**; 13: 665–675.

Gil-Parrado S, Fernandez-Montalva A, Assfalg-Machleidt I, Popp O, Bestvater F, Holloschi A, Knoch TA, Auerswald EA, Welsh K, Reed JC, Fritz H, Fuentes-Prior P, Spiess E, Salvesen GS, Machleidt W. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis: A

probable role for Bcl-2 family members. *The Journal of Biological Chemistry* **2002**; 277(30): 27217–27226.

Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews* **2015**; 29:153–162.

Grau GE, Piguet PF, Gretener D, Vesin C, Lambert PH. Immunopathology of thrombocytopenia in experimental malaria. *Immunology* **1988**; 65:501.

Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, Cataldo C, Taylor TE, Molyneux ME. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *The Journal of Infectious Diseases* **2003**; 187: 461–6.

Griffith JW, Sun T, McIntosh MT, Bucala R. Pure hemozoin is inflammatory *in vivo* and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. *The Journal of Immunology* **2009**; 183: 5208–5220.

Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke–Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *PNAS* **2010**; 107(43): 18640–18645.

Guo H, Callaway JB, Ting JPY. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine* **2015**; 21(7) 677:687.

Gupta N, Li W, Willard B, Silverstein RL, McIntyre TM. Proteasome proteolysis supports stimulated platelet function and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**; 34(1): 160–168.

Gyan B, Kurtzhals JA, Akanmori BD, Ofori M, Goka BQ, Hviid L, Behr C. Elevated levels of nitric oxide and low levels of haptoglobin are associated with severe malarial anaemia in African children. *Acta Trop.* **2002**; 83: 133–40.

Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* **2012**; 33:397–411.

Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J. Exp. Med.* **1991**; 174: 785–790.

Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **1998**; 391: 591–4.

Holme PA, Müller F, Solum NO, Brosstad F, Land SSF, AUKRUST P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human

immunodeficiency virus type 1 infection. *Faseb J.* **1998**; 12(1): 79–89.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *New Engl. J. Med.* **2009**; 361:1570–83.

Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza PT, Boza FA. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2013**; 11(5): 951–962.

Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, Bozza MT, Da Poian AT, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* **2013**; 122(20): 3405-3414.

Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, de Assis EF, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, Weyrich AS, Zimmerman GA, Bozza FA, Bozza PT. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol.* **2014**; 15;193(4):1864-72.

Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, Groot PG, Sixma JJ, Gros P. Structures of glycoprotein Ib α and its complex with von Willebrand Factor A1 domain. *Science* **2002**, 297(5584): 1176-1179.

Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Hojrup P, Moller HJ, Moestrup SK. Identification of the receptor scavenging hemopexin–heme complexes. *Blood* **2005**; 106: 2572–2579.

Ishii H, Suzuki Y, Kuboki M, Morikawa M, Inque M, Kazama M. Activation of calpain I in thrombin-stimulated platelets is regulated by the initial elevation of the cytosolic Ca²⁺ concentration. *Biochem. J.* **1992**; 284: 755-760.

Italiano Jr JE, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.* **1999**; 147:1299–1312.

Italiano Jr JE, Mairuhu ATA, Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **2010**; 17(6): 578–584.

Jaff MS, McKenna D, McCann SR. Platelet phagocytosis: a probable mechanism of thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum* infection. *J. Clin. Pathol.* **1985**; 38: 1318–1319.

Jani D, Nagarkatti R, Beatty W, Angel R, Slebodnick C, Andersen J, Kumar S, Rathore D. HDP—A novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathog.* **2008**; 4(4): e1000053. doi:10.1371/journal.ppat.1000053.

Jaramillo M, Gowda DC, Radzioch D, Olivier M. Hemozoin increases IFN-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation through extracellular signal-regulated kinase- and NF-kappa B-dependent pathways. *J. Immunol.* **2003**; 171(8): 4243- 4253.

Jaramillo M, Plante I, Ouellet N, Vandal K, Tessier PA, Olivier M. Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. *J. Immunol.* **2004**; 172: 3101.

Jaramillo M, Godbout M, Olivier M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of Immunology* **2005**, 174: 475–484.

Jaramillo M, Bellemare M-J, Martel C, Shio MT, Contreras AP, Godbout M, Roger M, Gaudreault E, Gosselin J, Bohle DS, Olivier M. Synthetic *Plasmodium*-like hemozoin activates the immune response: a morphology - function study. *PLoS ONE* **2009**; 4(9): e6957. doi:10.1371/journal.pone.0006957.

Jelkmann W. The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **2001**; 13:791-801.

Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int. Jnl. Lab. Hem.* **2013**; 35: 254–261.

John CC, Opika-Opoka R, Byarugaba J, Idro R, Boivin MJ. Low Levels of RANTES are associated with mortality in children with cerebral malaria. *The Journal of Infectious Diseases* **2006**; 194:837–45.

Kajiwara Y, Schiff T, Voloudakis G, Sosa MAG, Elder G, Bozdagi O, Buxbaum JD. A critical role for human caspase-4 in endotoxin sensitivity. *J. Immunol.* **2014**; 193: 335–343.

Kalantari P, DeOliveira RB, Chan J, Corbett Y, Rathinam V, Stutz A, Latz E, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Fitzgerald KA. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Plasmodium*-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Reports* **2014**; 6: 196–210.

Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. Cytokine

RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J. Exp. Med.* **1992**; 176: 587–592.

Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets. II. Functional evidence suggestive of young and old platelets. *J. Clin. Invest.* **1969**; 48: 1083–1087.

Kaushansky K. The mpl ligand: molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development. *Stem Cells* **1994**; 12(Suppl. 1): 91–96.

Kelton JG, Keystone J, Moore J, Denomme G, Tozman E, Glynn M, Neame PB, Gauldie J, Jensen J. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. *J. Clin. Invest.* **1983**; 71: 832–836.

Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Med.* **1989**; 87: 139–43.

Keuren JF, Wienders SJ, Ulrichs H, Hackeng T, Heemskerk JW, Deckmyn H, Bevers EM, Lindhout T. Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**; 25: 1499–505.

Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerging Infectious Diseases* **2005**; 11(1): 132-134.

Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, Kochar A, Khatri MP, Gupta V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: A report on serial cases from Bikaner in Northwestern India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**; 80(2): 194–198.

Kochar DK, Das A, Kochar A, Middha S, Acharya J, Tanwar GS, Gupta A, Pakalapati D, Garg S, Saxena V, Subudhi AK, Boopathi PA, Sirohi P, Kochar SK. Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). *Platelets* **2010**; 21: 623-627.

Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. *MCLI*, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to *BCL2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**; 90: 3516–3520.

Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Franks ZG, Vieira-de-Abreu A, Grundler K, Kile BT, Dhakal BK, Rondina MT, Kahr WHA, Mulvey MA, Blaylock RC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Bacteria differentially induce degradation of Bcl-x_L, a survival protein, by human platelets. *Blood* **2012**; 120(25): 5014-5020.

Kraemer BF; Weyrich AS; Lindemann S. Protein degradation systems in

platelets. *Thromb. Haemost.* **2013**; 110: 920–924

Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J. Biol. Chem.* **2005**; 280: 8606–8616.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **2001**; 409: 198–201.

Kwak YG, Le HK, Kim M, Um TH, Cho CR. Clinical characteristics of vivax malaria and analysis of recurred patients. *Infect. Chemother.* **2013**; 45(1): 69-75.

Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **1990**; 336: 1201–4.

Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares?. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2011**; 106(Suppl. I):52-63.

Lacerda MVG, Mourão MPG, Alexandre MAA, Siqueira AM, Magalhães BML, Martinez-Espinosa FE, Santana Filho FS, Brasil P, Ventura AMRS, Tada MS, Couto VSCD, Silva AR, Silva RSU, Alecrim MGC. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria Journal* **2012**, 11:12.

Laird MD, Wakade C, Alleyne CH Jr, Dhandapani KM. Hemin-induced necroptosis involves glutathione depletion in mouse astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**; 45, 1103–1114.

Lamikanra AA, Theron M, Kooij TWA, Roberts DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS ONE* **2009**; 4(12): e8446.

Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nature Structural & Molecular Biology* **2009**; 16: 961 – 966.

Langhi DM Jr, Bordin JO. Duffy blood group and malaria. *Hematology* **2006**; 11(5): 389-98.

Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, Tokaji L, Bozza FA, Japiassú AM, Bonaparte D, Cavalcante MM, Chora A, Ferreira A, Marguti I, Cardoso S, Sepúlveda N, Smith A, Soares MP. A Central Role for Free Heme in the Pathogenesis of Severe Sepsis. *Sci. Transl. Med.* **2010**; 2(51): 51ra71.

Leoratti FM, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PAC, Gravina HD, Tada MS, Pereira DB, Golenbock DT, Antonelli LRV, Gazzinelli RT. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**; 6(6):e1710.

Levine RF, Eldor A, Shoff PK, Kirwin S, Tenza D, Cramer EM. Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur. J. Haematol.* **1993**; 51:233–46.

Leytin V, Freedman J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus. Apher. Sci.* **2003**; 28:285–95.

Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Mis L, Lyubimov EV, Garvey B, Freedman J. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**; 320(2): 303–31021.

Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *J. Thromb. Haemost.* **2006**; 4: 2656–63.

Leytin V, Allen DJ, Lyubimov E, Freedman J. Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation. *Br. J. Haematol.* **2007**; 136: 762–4.

Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. *Br. J. Haematol.* **2008**; 142(3): 494–497.

Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Reviews* **2012**; 26:51–63.

Li J, Xia Y, Bertino AM, Coburn JP, Kuter DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion* **2000**; 40(11): 1320–1329.

Li Q, Fu W, Yao J, Ji Z, Wang Y, Zhou Z, Yan J, Li W. Heme induces IL-1 β secretion through activating NLRP3 in kidney inflammation. *Cell Biochem. Biophys.* **2014**; 69(3): 495-502.

Liu M, Wilson NO, Hibbert JM, Stiles JK. STAT3 regulates MMP3 in heme-induced endothelial cell apoptosis. *PLoS ONE* **2013**; 8:e71366.

Loiola CCP, Mangabeira da Silva CJ, Tauil PL. Controle da malária no Brasil:

1965 a 2001. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health **2002**; 11(4): 235-243.

Lomar AV, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, Matos GJ, Boulos M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: Case report and literature review. The Brazilian Journal of Infectious Diseases **2005**; 9(5): 425-430.

Lood C, Amisten S, Gullstrand B, Jonsen A, Allhorn M, Truedsson L, Sturfelt G, Erlinge D, Bengtsson AA. Platelet transcriptional profile and protein expression in patients with systemic lupus erythematosus: up-regulation of the type I interferon system is strongly associated with vascular disease. Blood **2010**; 16(11): 1951-1957.

Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Thrombin induces activation and translocation of Bid, Bax and Bak to the mitochondria in human platelets. J. Thromb. Haemost. **2008**; 6: 1780-8.

Machlus KR, Italiano Jr JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. J. Cell Biol. **2013**; 201(6): 785-796.

Machlus KR, Johnson KE, Kulenthirarajan R, Forward JA, Tippy MD, Soussou TS, El-Husayni SH, Wu SK, Wang S, Watnick RS, Italiano Jr JE, Battinelli EM. CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation. Blood **2016**; 127(7): 921-6.

Makkar RPS, Mukhopadhyay S, Monga A, Gupta AK. Plasmodium vivax malaria presenting with severe thrombocytopenia. The Brazilian Journal of Infectious Diseases **2002**; 6(5): 263-265.

Mandal RV, Mark EJ, Kradin RL. Megakaryocytes and platelet homeostasis in diffuse alveolar damage. Exp. Mol. Pathol. **2007**; 83:327-31.

Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. Nature **2002**; 416: 499-506.

Martiney JA, Harkins C, Eliseo JWB, Eugenin A. Cellular neuropathologic effects of hemozoin, a toxin produced by *Plasmodium falciparum*, the causative agent of human malaria. The Journal of Immunology **2007**; 178, B121.

Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajed JPR, Melendez-Zajgla J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **2008**, 27:48.

Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. Cell **2004**; 117: 561-574.

Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly

PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DCS, Kile BT. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* **2007**; 128: 1173–1186.

Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology* **2003**; 5(12): 1041-1043.

Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost.* **2007**; 5(9):1945-1955.

McMorran BJ, Marshall VM, Graaf C, Drysdale KE, Shabbar M, Smyth GK, Corbin JE, Alexander WS, Foote SJ. Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* **2009**; 323(5915): 797-800.

McMorran BJ, Wieczorski L, Drysdale KE, Chan JA, Huang HM, Smith C, Mitiku C, Beeson JG, Burgio G, Foote SJ. Platelet factor 4 and duffy antigen required for platelet killing of plasmodium falciparum. *Science* **2012**; 338 (6112): 1348-1351.

Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy NS, Ricklis RM, Levy AP. Structure–function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* **2001**; 98: 3693–3698.

Metcalf Pate KA, Mankowski JL. HIV and SIV associated thrombocytopenia: an expanding role for platelets in the pathogenesis of HIV. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* **2011**; 8(1-2): e25–e32.

Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* **2001**; 104: 1533–1537.

Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and Thrombin Generation. *Vasc Biol.* **2002**; 22:1381-1389.

Monteiro AP, Pinheiro CS, Luna-Gomes T, Alves LR, Maya-Monteiro CM, Porto BN, Barja-Fidalgo C, Benjamim CF, Peters-Golden M, Bandeira-Melo C, Bozza MT, Canetti C. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. *J. Immunol.* **2011**; 186: 6562–6567.

Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* **2014**; 123(18): 2759-2767.

Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M. Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic

diseases. *Blood* **1968**; 32(5): 811-5.

Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* **2000**; 150(4): 887–894.

Nayak MK, Kumar K, Dash D. Regulation of proteasome activity in activated human platelets. *Cell Calcium* **2011**; 49: 226–232.

Nguyen PH, Day N, Pram TD, Ferguson DJ, White NJ. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1995**; 89: 200–204.

Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, Hkirijaroen L, Looareesuwan S, White NJ. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet* **1999**; 354: 546–549.

O'Donnell A, Fowkes FJI, Allen SJ, Imrie H, Alpers MP, Weatherall DJ, Day KP. The acute phase response in children with mild and severe malaria in Papua New Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2009**, 103, 679–686.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal* **2010**, 9:115.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2003**; 4(7): 552-65.

Ostrowska H, Ostrowska JK, Worowski K, Radziwon P. Human platelet 20S proteasome: Inhibition of its chymotrypsin-like activity and identification of the proteasome activator PA28. A preliminary report. *Platelets* **2003**; 14: 151–157.

Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphanyo S, Chora A, Rodrigues CD, Gregoire IP, Cunha-Rodrigues M, Portugal S, Soares MP, Mota MM. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature Medicine* **2007**; 13(6): 703-710.

Panasiuk A. Autoimmune thrombocytopenia in recurrent polietiological malaria (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*). *Wiad Parazytol.* **2001**; 47(1): 85-9.

Paoli M, Anderson BF, Baker HM, Morgan WT, Smith A, Baker EN. Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. *Nat. Struct. Biol.* **1999**; 6: 926–931.

Park JW, Park SH, Yeom JS, Huh AJ, Cho YK, Ahn JY, Minutos GS, Song GY, Kim YA, Ahn SY, Woo SY, Lee BE, Ha EH, Han HS, Yoo K, Seoh JY. Serum

cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without thrombocytopenia. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **2003**, 97(4): 339–344.

Park SY, Yokoyama T, Shibayama N, Shiro Y, Tame JR. 1.25 A resolution crystal structures of human haemoglobin in the oxy, deoxy and carbonmonoxy forms. *J. Mol. Biol.* **2006**; 360: 690–701.

Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, Halmen KA, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Golenbock DT. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *PNAS* **2007**; 104(6): 1919–1924.

Passacuale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigall V, Ferro A. monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One* **2011**; 6(10): e25595.

Pate KAM, Lyons CE, Dorsey JL, Shirk EN, Queen SE, Adams RJ, Gama L, Morrell CN, Mankowski JL. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation contribute to decreased platelet count during acute simian immunodeficiency virus infection in pig-tailed macaques. *The Journal of Infectious Diseases* **2013**; 208: 874–83.

Peters MJ, Heyderman RS, Hatch DJ, Klein NJ. Investigation of platelet–neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **1997**; 209: 125–135.

Peyron F, Burdin N, Ringwald P, Vuillez JP, Rousset F, Banchereau J. High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clin. Exp. Immunol.* **1994**; 95: 300–3.

Pichyangkul S, Saengkrai P, Yongvanitchit K, Heppner DG, Kyle DE, Webster HK. Regulation of leukocyte adhesion molecules CD11b/CD18 and leukocyte adhesion molecule-1 on phagocytic cells activated by malaria pigment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1997**; 57: 383–388.

Piguet PF, Kan CD, Vesin C, Rochat A, Donati Y, Constance Barazzone. Role of CD40-CD40L in mouse severe malaria. *Am. J. Pathol.* **2001**, 159: 733–742.

Piguet 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.

Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res.* **2004**; 94: 119–126.

Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS ONE* **2012**; 7(12): e50746.

Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Warikar N, Seal A, McGready R, Sugiarto P, Tjitra E, Anstey NM, Price RN. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections are endemic. *Clin. Infect. Dis.* **2008**; 46(9): 1374–1381.

Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Hasanuddin A, Warikar N, Sugiarto P, Tjitra E, Anstey NM, Price RN. Vivax malaria: A major cause of morbidity in early infancy. *Clinical Infectious Diseases* **2009**; 48:1704–12.

Polimeni M, Valente E, Aldieri E, Khadjavi A, Giribaldi G, Prato M. Haemozoin induces early cytokine-mediated lysozyme release from human monocytes through p38 MAPK- and NF-kappaB- dependent mechanisms. *PLoS One* **2012**; 7(6): 39497.

Prada J, Malinowski J, Muller S, Bienzle U, Kremsner PG. Hemozoin differentially modulates the production of interleukin 6 and tumor necrosis factor in murine malaria. *Eur. Cytokine Netw.* **1995**; 6: 109–112.

Qiao J, Liu Y, Li D, Wu Y, Li X, Yao Y, Niu M, Fu C, Li H, Ma P, Li Z, Xu K, Zeng L. Imbalanced expression of Bcl-xL and Bax in platelets treated with plasma from immune thrombocytopeni. *Immunol. Res.* **2016**; 64: 604–609.

Raghavachari N, Xu X, Harris A, Villagra J, Logun C, Barb J, Solomon MA, Suffredini AF, Danner RL, Kato G, Munson PJ, Morris Jr SM, Gladwin MT. Amplified expression profiling of platelet transcriptome reveals changes in arginine metabolic pathways in patients with sickle cell disease. *Circulation* **2007**; 115(12): 1551–1562.

Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* **2001**; 12:261–73.

Rey L. Parasitologia, Terceira edição. Ed. Guanabara Kookan, **2001**.

Ribeiro BP, Cassiano GC, Souza RM, Cysne DN, Grisotto MAG, Santos APSA, Marinho CRF, Machado RLD, Nascimento FRF. Polymorphisms in *Plasmodium vivax*

circumsporozoite protein (CSP) influence parasite burden and cytokine balance in a pre-Amazon endemic area from Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**; 10(3): e0004479.

Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano Jr JE. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* **2005**; 106:4066–4075.

Risitano A, Beaulieu LM, Vitseva O, Freedman JE. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood* **2012**; 119: 6288–6299.

Robinson LJ, Wampfler R, Betuela I, Karl S, White MT, Li Wai Suen CSN, Hofmann NE, Kinboro B, Waltmann A, Brewster J, Lorry L, Tarongka N, Samol L, Silkey M, Bassat Q, Siba PM, Schofield L, Felger I, Mueller I. Strategies for understanding and reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* hypnozoite reservoir in Papua New Guinean children: A randomised placebo-controlled trial and mathematical model. *PLoS Med.* **2015**; 12(10): e1001891. doi:10.1371/journal.pmed.1001891.

Rondina MT, Schwertz H, Harris ES, Kraemer BF, Campbell RA, Mackman N, Grissom CK, Weyrich AS, Zimmerman G. The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human platelets. *J Thromb Haemost* **2011**; 9:748–758.

Rondina MT, Brewster B; Grissom CK, Zimmerman GA, Kastendieck DH, Harris ES, Weyrich AS. In vivo platelet activation in critically ill patients with primary 2009 Influenza A (H1N1). *Chest* **2012**; 141(6): 1490–1495.

Rondina MT, Grissom CK, Men S, Harris ES, Schwertz H, Zimmerman GA, Weyrich AS. Whole blood flow cytometry measurements of in vivo platelet activation in critically-ill patients are influenced by variability in blood sampling techniques. *Thrombosis Research* **2012**; 129: 729–735.

Rondina MT, Carlisle M, Fraughton T, Brown SM, Miller III RR, Harris ES, Weyrich AS, Zimmerman GA, Supiano MA, Grissom CK. Platelet–monocyte aggregate formation and mortality risk in older patients with severe sepsis and septic shock. *Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2015**; 70(2):225–231.

Rowley JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* **2011**; 118: e101-111.

Sam S-S, Omar SFS, Teoh B-T, Abd-Jamil J, AbuBakar S. Review of dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: A retrospective study. *PLoS Negl*

Trop Dis 2013; 7(5): e2194.

Sampaio VS, Siqueira AM, Alecrim MGC, Mourão MPG, Marchesini MP, Albuquerque BC, Nascimento J, Figueira EAG, Alecrim WD, Monteiro WM, Lacerda MVG. Malaria in the state of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2015**; 48(Suppl I): 4-11.

Sherry BA, Alava G, Tracey KJ, Martiney J, Cerami A, Slater AF. Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) *in vitro*, and altered thermoregulation *in vivo*. *J. Inflamm.* **1995**; 45: 85–96.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* **2010**; 140:821–832.

Schwartz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *JEM* **2006**; 203(11): 2433–2440.

Schwartz H, Koster S, Kahr WHA, Michetti N, Kraemer BF, Weitz DA, Blaylock RC, Kraiss LW, Greinacher A, Zimmerman GA, Weyrich AS. Anucleate platelets generate progeny. *Blood* **2010**; 115(18): 3801-3809.

Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, Larsen R, Rebelo S, Penido C, Smith NR, Coutinho A, Soares MP. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *PNAS* **2009**; 106 (37): 15837–15842.

Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology* **2011**; 11: 264-274.

Serrano K, Devine DV. Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation: 95 kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* **2004**; 58(4): 242–252.

Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp. Med.* **1993**; 177: 145–153.

Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, Tachado SD. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* upregulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via

tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J. Immuno.* **1996**; 156, 1886–1896.

Scull CM, Hays WD, Fischer TH. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *Journal of Inflammation* **2010**; 7:53.

Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J. Immunol.* **2008**; 181: 3495–3502.

Shi DS, Smith MCP, Campbell RA, Zimmerman PW, Franks ZB, Kraemer BF, Machlus KR, Ling J, Kamba P, Schwertz H, Rowley JW, Miles RR, Liu ZJ, Sola-Visner M, Italiano Jr. JE, Christensen H, Kahr WHA, Li DY, Weyrich AS. Proteasome function is required for platelet production. *J. Clin. Invest.* **2014**; 124(9): 3757–3766.

Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet* **2004**; 363(9414): 1017-1024.

Singh MV, Davidson DC, Kiebala M, Maggirwar SB. Detection of circulating platelet–monocyte complexes in persons infected with human immunodeficiency virus type-1. *Journal of Virological Methods* **2012**; 181:170–176.

Singh B, Daneshvar C. Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical Microbiology Reviews* **2013**; 26(2): 165–184.

Slavka G, Perkmann T, Haslacher H, Greisenegger S, Marsik C, Wagner OF, Endler G. Mean platelet volume may represent a predictive parameter for overall vascular mortality and ischemic heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**; 31: 1215–1218.

Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome system of protein degradation and processing biochemistry **2009**, (74)13: 1411-1442.

Srichaikul T, Nimmannitya S, Sripaisarn T, Kamolsilpa M, Pulgate C. Platelet function during the acute phase of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **1989**; 20(1): 19-25.

Srivastava K, Cockburn IA, Swaim AM, Thompson LE, Tripathi A, Fletcher CA, Shirk EM, Sun H, Kowalska MA, Talbot KF, Sullivan D, Zavala F, Morrel CN. Platelet factor 4 mediates inflammation in cerebral malaria. *Cell Host Microbe* **2008**; 4(2): 179–187.

Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, Russell DG, Goldberg DE. On the molecular

mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1996**; 93: 11865–11870.

Sun, G, Chang WL, Li J, Berney SM, Kimpel D, van der Heyde HC. Inhibition of platelet adherence to brain microvasculature protects against severe *Plasmodium berghei* malaria. *Infect. Immun.* **2003**, 71: 6553–6561.

Suzuki H, Murasaki K, Kodama K, Takayama H. Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation. *Br J Haematol* **2003**; 121:904–12.

Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* **2004**; 53 (Suppl. 1): S12–S18.

Suzuki J, Hamada E, Shodai T, Kamoshida G, Kudo S, Itoh S, Koike J, Nagata K, Irimur T, Tsuji T. Cytokine secretion from human monocytes potentiated by P-selectin-mediated cell adhesion. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2013**; 160: 152–160.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **2006**; 313 (5791): 1287-1290.

SVS-Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil. *Boletim Epidemiológico* **2015**; Volume 46(25).

Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwraz RT, Schofield L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* **1996**; 156: 1897-1907.

Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Schofield L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: Activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**; 94: 4022–4027.

Tan LK, Yacoub S, Scott S, Bhagani S, Jacobs M. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infect. Dis.* **2008**; 8: 449–454.

Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infection and Immunity* **2002**, 70(12): 6524–6533.

Tauil P, Deane L, Sabroza P, Ribeiro C. A malária no Brasil. *Cad. Saúde Pública* **1985**; 1(1): 71-111.

Tauil PL. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2011**; 106(Suppl. I): 105-106.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1968**; 61: 748–755.

Thon JN, Devine DV. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets. *Transfusion* **2007**; 47: 2260–2270.

Thon JN, Montalvo A, Patel-Hett S, Devine MT, Richardson JL, Ehrlicher A, Larson MK, Hoffmeister K, Hartwig JH, Italiano Jr JE. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol.* **2010**; 191:861–874.

Thon JN, Macleod H, Begonja AJ, Zhu J, Lee KC, Mogilner A, Hartwig JH, Italiano Jr JE. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nature Commun.* **2012**; 3:852.

Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H, Devine MT, Fuchs TA, Weyrich AS, Semple JW, Flaumenhaft R, Italiano Jr JE. T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol.* **2012**; 198(4): 561-574.

Tiemi Shio M, Eisenbarth SC, Savaria M, Vinet AF, Bellemare M-J, Harder KW, Sutterwala FS, Bohle DS, Descoteaux A, Flavell RA, Olivier M. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog* **2009**; 5(8): e1000559. doi: 10.1371/journal.ppat.1000559.

Tonon G, Luo X, Greco NJ, Chen W, Shi Y, Jamieson GA. Weak platelet agonists and U46619 induce apoptosis-like events in platelets, in the absence of phosphatidylserine exposure. *Thromb. Res.* **2002**; 107:345–50.

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **1995**; 269: 1069–1074.

Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β on human monocytes, *European Journal of Immunology* **1995**, 25(1): 64–68.

Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein

levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *British Journal of Haematol.* **1997**; 99:824–31.

Vermehren R, Cardoso AD, Bulbol WS, Franco M, Coelho K, Lorenzi F, Nunes V, Gonçalves J. Relato de um caso de insuficiência renal aguda em malária causada por *Plasmodium vivax*. *J Bras Nefrol* **2005**, 27: 93-96.

Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Coagulation and Inflammation* **2011**; 34:1.

Vigano E, Diamond CE, Spreafico R, Balachander A, Sobota RM, Mortellaro A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nature Communications* **2015**; 6: 8761.

Vogler M, Hamali HA, Sun XM, Bampton ETW, Dinsdale D, Snowden RT, Dyer MJS, Goodall AH, Cohen GM. BCL2/BCL-X_L inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. *Blood*, **2011**; 117(26): 7145-7154.

Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1997**; 216: 456–463.

Wagner AH, Guldenzoph B, Lienenluke B, Hecker M. CD154/CD40-Mediated Expression of CD154 in endothelial cells: consequences for endothelial cell–monocyte interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**; 24:715-720.

Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: a novel cell death pathway. *Science Signaling* **2008**; 1:pe25.

Wassmer SC, Lepolard C, Traore B, Pouvelle B, Gysin J, Grau GE. Platelets reorient *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **2004**; 189: 180–9.

Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* **1996**; 97(6): 1525–1534.

Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J. Clin. Invest.* **1995**; 95(5): 2297-303.

Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* **2004**; 25:489–495.

Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets in lung biology. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**; 75:569–91.

White NJ. *Plasmodium knowlesi*: The fifth human malaria parasite. *Clinical Infectious Diseases* **2008**; 46:172–173.

WHO - World Health Organization **2015**. World Malaria Report 2015 homepage na internet. Disponível em:

<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/>

WHO. *Tropical Medicine and International Health* **2014**; 19 (Suppl. 1), 7–131.

Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Pro-apoptotic Bak is sequestered by Mc1-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3- only proteins. *Genes Dev.* **2005**; 19: 1294–1305.

Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesan GS, Green DR. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis- like events during platelet activation. *Blood* **1999**; 94: 1683–92.

Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J. Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **1997**; 277: 60–66.

Yamaguchi S, Kubota T, Yamagishi T, Okamoto K, Izumi T, Takada M, Kanou S, Suzuki M, Tsuchiya J, Naruse T. Severe thrombocytopenia suggesting immunological mechanisms in two cases of vivax malaria. *American Journal of Hematology* **1997**; 56: 183–186.

Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* **2002**; 99:4021–4029.

Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunological Reviews* **2015**; 265:156–171.

Zetterström R. Nobel Prizes for discovering the cause of malaria and the means of bringing the disease under control: hopes and disappointments. *Acta Pædiatrica* **2007**; 96, 1546–1550.

Zhang H, Nimmer PM, Tahir SK, Chen J, Fryer RM, Hahn KR, Iciek LA,

Morgan SJ, Nasarre MC, Nelson R, Preusser LC, Reinhart GA, Smith ML, Rosenberg SH, Elmore SW, Tse C. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death and Differentiation* **2007**; 14: 943–951.

Zhao Y, Malinin NL, Meller J, Ma Y, West XZ, Bledzka K, Qin J, Podrez EA, Byzova TV. Regulation of cell adhesion and migration by Kindlin-3 cleavage by calpain. *J Biol Chem.* **2012**; 287(47): 40012–40020.

Zhuang H, Littleton-Kearney MT, Doré S. Characterization of heme oxygenase in adult rodent platelets. *Current Neurovascular Research* **2005**; 2: 163-168.

Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp. Hematol.* **2000**; 28:3–16.

Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & Development* **2001**; 15:1481–1486.

Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultra- structural evidence for an old concept. *Am. J. Pathol.* **2000**; 157:69–74.

9) Anexos

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estudo da ativação plaquetária na malária vivax

Área Temática:

Pesquisador: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda

Versão: 2

Instituição: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

CAAE: 04572612.4.0000.0005

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 58921

Data da Relatoria: 20/07/2012

Apresentação do Projeto:

Diversas evidências indicam que as plaquetas possuem um importante papel na malária: Srivastava observou que camundongos nocautes para o fator plaquetário 4 são protegidos da malária cerebral (MC); McMorran demonstrou que plaquetas humanas purificadas foram capazes de matar parasitas de *P. falciparum* e que camundongos com nº reduzido de plaquetas circulantes foram mais susceptíveis a morte pela infecção com *P. chabaudi*. Este projeto tem como objetivo estudar a ativação plaquetária e a interação plaqueta-monócito em pacientes com malária por *P. vivax* trombocitopênicos e não-trombocitopênicos. Para isso, o sangue será recolhido de pacientes com *P. vivax* trombocitopênicos e não-trombocitopênicos, que darão entrada na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Tanto as plaquetas como os monócitos serão isolados, para ensaios de interação plaqueta-monócito. Será feita a dosagem de citocinas e outros mediadores do plasma dos pacientes, do lisado celular e do sobrenadante da cultura, por ELISA. O sangue recolhido será também usado para análise de CD41, CD14 e CD62P no citômetro de fluxo. O RNA das plaquetas dos pacientes e dos doadores sadios será extraído, para a posterior análise por qPCR.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar os mecanismos de ativação plaquetária e interação plaqueta-monócito associados à resposta inflamatória, induzidos direta ou indiretamente pela infecção a partir de um modelo de interação plaqueta-monócito.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos baixos, inclui apenas retirada de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação plaquetária é fundamental para a identificação de alvos farmacológicos e terapêuticos mais eficazes e este projeto poderá contribuir no estabelecimento do vínculo entre a geração da malária vivax, a resposta inflamatória, e a ativação plaquetária, uma vez que se procura explorar os efeitos da infecção sobre a interação plaqueta-monócito e identificar os mecanismos relacionados à trombocitopenia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos estão apresentados de acordo com as diretrizes éticas.

Recomendações:

O protocolo está instruído e recomenda-se ser levado à discussão e votação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas anteriormente.

Pendência 1: O termo utilizado no modelo do TCLE "nenhum risco ao sujeito da pesquisa" não é aplicável, pois toda pesquisa com seres humanos oferece risco (caput do inciso V da Resolução CNS nº 196/96). Sugere-se trocar o termo "nenhum risco" por risco muito baixo associado a punção venosa no texto de avaliação de riscos e benefícios.

Resposta: O pesquisador, na nova versão do modelo do TCLE inferiu que o estudo apresenta risco muito baixo.

Análise: Pendência atendida.

Pendência 2. Ainda nesse mesmo modelo do TCLE, sugere-se garantir ao sujeito da pesquisa, indenizações por danos eventualmente causados em decorrência de sua participação na pesquisa, para atender a Resolução CNS nº 196/96, itens V.5, V.6 e V.7.

Resposta: Foi respondido no novo modelo de TCLE que os sujeitos da pesquisa terão assegurados os direitos de indenização previstos nos itens acima mencionados.

Análise: Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Com a decisão de APROVAÇÃO fica o pesquisador autorizado a dar início à coleta de dados da pesquisa, como também de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, nos prazos regulamentares, conforme estabelecido na Resolução CNS nº 196/96.

Na data de emissão desse parecer estavam pendentes os pareceres de algumas co-participantes. As mesmas deverão ser apresentadas antes do início do projeto.

MANAUS, 20 de Julho de 2012

Assinado por:

Francisco Nailson Santos Pinto

Tabela 9.1: Genes aumentados em plaquetas de pacientes com malária vivax em relação aos voluntários sadios. Dados apresentados como FPKM (FPKM – do inglês, fragments per kilobase of exon model per million mapped reads).

Símbolo	Nome do gene	Média de RPKM controles	Média RPKM vivax
HMOX1	“heme-oxygenase 1”	20,230	124,132
CASP5	caspase 5	1,540	9,061
MYOF	“myoferlin”	1,652	6,839
PIM2	“Pim-2 proto-oncogene, serine/threonine kinase”	4,507	15,392
GBP1	“guanylate binding protein 1, interferon-inducible”	6,836	24,660
TAP1	“transporter 1, ATP-binding cassette”	5,556	24,343
CTSB	“cathepsin B”	5,773	24,101
KYNU	“kynureninase”	3,034	9,292
CALR	“calreticulin”	10,302	25,286
ANXA5	“annexin A5”	49,952	110,890
JAK3	“Janus kinase 3”	3,584	8,924
CASP4	caspase 4	71,452	144,957
HSP90B1	“heat shock protein 90 kDa beta”	8,216	20,501
PIM1	“pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase”	7,336	21,816
SLC39A8	“solute carrier family 39 (zinc transporter)”	1,268	5,428
MS4A7	“membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7”	6,048	13,238
GNS	“glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase”	2,089	8,649
SLC25A37	“solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter)”	6,356	28,644
BLVRB	“biliverdin reductase B”	14,681	58,272
CASP7	caspase 7	2,027	4,903
NLRC4	“NLR family, CARD domain containing 4”	1,993	4,195
CLCN4	“chloride channel, voltage-sensitive 4”	2,578	6,065
CMAS	“cytidine monophosphate N-acetylneuraminic	9,066	24,034

	acid synthetase”		
HSPA4	“heat shock 70 kDa protein 4”	6,458	17,841
ARL2	“ADP-ribosylation factor-like 2”	23,010	51,971
SERPINE1	“serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1”	6,607	19,735
CASP3	caspase 3	13,177	33,760

Tabela 9.2: Genes aumentados em plaquetas de pacientes com malária vivax em relação aos voluntários sadios. Dados apresentados como FPKM (FPKM – do inglês, fragments per kilobase of exon model per million mapped reads).

Símbolo	Nome do gene	Média de RPKM	Média RPKM
		controles	vivax
RP11-392P7.6	“pre-mRNA processing factor 31”	16,088	1,279
SERPINF1	“serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1”	3,870	0,902
FLNB	“filamin B”	1,329	0,315
APBB1	“amyloid beta precursor protein binding family B member 1”	2,658	0,573
CABP5	“calcium binding protein 5”	368,268	91,099
PDZK1IP1	“PDZK1 interacting protein 1”	1438,451	321,618
MAN1A2	“mannosidase alpha class 1A member 2”	2,371	0,894
PLD4	“phospholipase D family member 4”	2,182	0,491
HGD	“homogentisate 1,2-dioxygenase”	430,247	146,469
ALDH1A2	“aldehyde dehydrogenase 1 family member A2”	1,530	0,236
AIF1L	“allograft inflammatory factor 1 like”	1,912	0,456
SH2D1B	“SH2 domain containing 1B”	6,849	2,590

MEF2C-AS1	“MEF2C antisense RNA 1”	16,772	6,704
CTNNAL1	“catenin alpha like 1”	81,551	47,478
CHST8	“carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 8”	9,838	3,206
EPAS1	“endothelial PAS domain protein 1”	4,307	1,350
LEF1	“lymphoid enhancer binding factor 1”	4,382	1,567
LEPR	“leptin receptor”	62,133	31,543
WDR11-AS1	“WDR11 antisense RNA 1”	91,333	43,253