

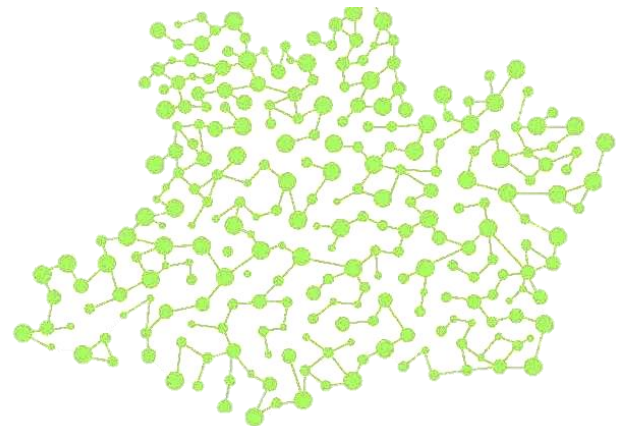


**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**MODIFICAÇÕES CELULARES E TRANSCRICIONAIS NA MEDULA ÓSSEA
RELACIONADAS AO DESENVOLVIMENTO DE ANEMIA EM PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX**

MARCELO AUGUSTO MOTA BRITO



**MANAUS
2020**

MARCELO AUGUSTO MOTA BRITO

**MODIFICAÇÕES CELULARES E TRANSCRICIONAIS NA MEDULA ÓSSEA
RELACIONADAS AO DESENVOLVIMENTO DE ANEMIA EM PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador: **Prof. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda**

Co-orientador: **Prof. Hernando A. del Portillo Obando**

**MANAUS
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

0001

Brito, Marcelo Augusto Mota

Modificações celulares e transcricionais na medula óssea humana relacionadas ao desenvolvimento de anemia em pacientes com malária vivax. / Marcelo Augusto Mota Brito – Universidade do Estado do Amazonas, 2020.

139 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Amazonas – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius G. de Lacerda

Co-orientador: Prof. Dr. Hernando A. del Portillo

1. Malária 2. *Plasmodium vivax* 3. Medula óssea Eritropoiese 4. Transcriptoma.

FOLHA DE JULGAMENTO**MODIFICAÇÕES CELULARES E TRANSCRICIONAIS NA MEDULA ÓSSEA
RELACIONADAS AO DESENVOLVIMENTO DE ANEMIA EM PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX****MARCELO AUGUSTO MOTA BRITO**

“Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

Membro

Membro

Dedico este trabalho aos cientistas que resistem e buscam dia após dia remédios para as dores do mundo, em tempos em que a ciência é um dos pilares de esperança de dias melhores, apesar dos ataques provindos de defensores do obscurantismo e da pós-verdade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e proteção, ainda que eu não seja merecedor;

Aos meus pais, Rozemary Mota e Alessandro Brito, por sempre acreditarem e torcerem pelo meu sucesso e pelos sacrifícios que fizeram para prover minha formação pessoal e profissional;

À minha esposa Anne Almeida, pelo companheirismo em todas as horas, fossem elas alegres, tristes ou reflexivas; e pela compreensão em dias atribulados;

Aos meus filhos, Gustavo e Miguel, as razões dos meus sorrisos mais sinceros;

Aos meus irmãos, Maurício e Alexandre, simplesmente por serem quem são e por me darem a oportunidade de participar de suas vidas;

Aos meus avôs e avós, pelo exemplo de dignidade e sabedoria;

Ao meu orientador, Marcus Lacerda, pela confiança prestada, tempo dedicado à minha formação e pelas correções necessárias;

Ao meu co-orientador, Hernando del Portillo, pelo entusiasmo durante a realização do projeto de pesquisa e pelo apoio dado durante o período de doutorado sanduíche;

Ao professor Wuelton Monteiro, pelo apoio e exemplo;

À equipe do “projeto Medula”: Bàrbara Baro, Katrien Deroost e Erick Frota, sem os quais eu não teria conseguido superar os obstáculos que surgiram no nosso dia-a-dia de trabalho e pela parceria e amizade;

Aos colegas do grupo de pesquisa PVREX, por terem aberto as portas de sua casa para que eu pudesse executar meus experimentos de laboratório e por terem me tratado como um dos seus;

Ao Institut d' Investigació Germans Trias i Pujol, pessoalmente aos seus pesquisadores e colaboradores, por oferecer da infraestrutura laboratorial e técnica para realização dos experimentos em biologia molecular;

Aos bioinformatas Tainá Raiol e Lauro Sumoy pelo refinamento dos dados de transcriptômica e pela construção das figuras dos artigos científicos publicados;

Aos médicos Izabella Safe e Rodrigo Leitão pela realização das coletas acuradas de material biológico;

Ao colega Allyson Figueiredo pelo auxílio nas aquisições celulares de citometria de fluxo e dosagens de citocinas;

Ao professor Erich de Paula e ao seu aluno Bidossessi Wilfried pelo apoio na leitura biológica dos dados de transcriptômica;

A todos os participantes de pesquisa envolvidos pela doação de seu tempo e de seu sangue, por altruísmo e por prazer em contribuir;

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, à Universidade do Estado do Amazonas e à Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, pela oportunidade oferecida;

Aos colegas, professores e colaboradores do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema e da Gerência de Malária;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma nos meus 27 anos de “formação escolar” e acadêmica.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Esse projeto foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), através do financiamento do projeto intitulado "Malária grave por *Plasmodium vivax*: bases fisiopatológicas e identificação de marcadores moleculares", contemplado pelo edital 071/2013 e pela concessão de bolsa durante o período de desenvolvimento do doutorado , incluindo a bolsa do doutorado sanduíche na cidade de Barcelona – Espanha.

Este projeto recebeu financiamento da FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas) através do projeto intitulado "Avaliação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de anemia em malária por *Plasmodium vivax*, em uma unidade terciária da Amazônia Ocidental Brasileira" (edital PRONEM 009/2011). As despesas de de publicação foram pagas por recursos do Edital Pró-Estado/FAPEAM e PAPAC/FAPEAM.

“A arte de interrogar não é tão fácil como se pensa. É mais uma arte de mestres do que de discípulos; é preciso ter aprendido muitas coisas para saber perguntar o que não se sabe”.

*Jean-Jacques Rousseau
(Discurso sobre as Ciências e as Artes)*

RESUMO

Apesar da baixa parasitemia na malária por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), os pacientes podem evoluir para condições clínicas graves, levando a hospitalizações e mortes. A complicação mais frequente é a anemia grave, que afeta principalmente crianças pequenas. No interior da medula óssea ocorre disertropoiese, levando à redução da celularidade e eritropoiese ineficiente. Além disso, a presença de hemozoína (pigmento da malária) prejudica a proliferação e maturação das linhagens hematopoiéticas. Avaliamos as alterações ocorridas na medula óssea humana durante episódios sintomáticos da malária vivax e investigamos se as alterações estão relacionadas a mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento de anemia. 15 participantes adultos com diagnóstico positivo de malária vivax por gota espessa foram incluídos. Cinco eram anêmicos. As amostras (sangue periférico e aspirado de medula óssea da crista ilíaca) foram coletadas no dia do diagnóstico (D0) da malária e 42 dias após (D42). As células eritroides foram purificadas através de colunas MACS, utilizando-se microesferas marcadas com CD71. A parasitemia foi estimada por microscopia óptica. Entre 10^6 e 10^7 células da suspensão CD71⁺ purificada foram utilizadas para extração de RNA e subsequente análise da expressão dos transcritos. Para validar a expressão de genes específicos, foi realizada RT-qPCR de genes relacionados à eritropoiese (*GATA-1*, *ALAS-1*, *NFE-1*, *TAL-1*). A resposta inflamatória foi quantificada medindo citocinas e quimiocinas. Não houve diferença na parasitemia entre medula óssea e sangue periférico. Não houve predominância de formas parasitárias na medula óssea. A microscopia óptica mostrou maior contagem de células diseritropoiéticas durante o D0. Os sinais mais observados de disertropoiese foram binucleação, presença de núcleos irregulares, corpos de Howel-Jolly e cromatina megaloblástica. Não foi observada invasão parasitária nas células nucleadas. Um total de 274 genes mostrou uma diferença significativa na expressão em D0 em comparação com D42. Genes importantes na fase terminal do desenvolvimento eritropoiético mostraram expressão diminuída durante a infecção, confirmada por RT-PCR. As vias relacionadas à resposta imune (ativação do complemento, TNF- α , IFN- γ), apoptose, exocitose e ativação de proto-oncogenes se mostraram sobreexpressas durante a infecção. Níveis de citocinas pró-inflamatórias foram semelhantes entre a medula óssea e o sangue periférico. Este achado corrobora com dados de transcriptômica que mostram ativação de genes que expressam receptores celulares para citocinas e outros genes relacionados à resposta imune na doença aguda (D0). A análise exploratória de RNA's pequenos mostrou alterações de expressão que podem prejudicar a eritropoiese durante infecção, como por exemplo o aumento de mir-150, geralmente diminuído na eritropoiese terminal. Estes dados em conjunto compõem o primeiro estudo que demonstra alterações do transcriptoma eritropoiético humano em medula óssea infectada por *P. vivax* através de "deep sequencing analysis". Mais estudos devem ser realizados para preencher as lacunas da participação deste nicho tecidual na patogênese da malária em humanos.

Palavras Chaves: Malária; *Plasmodium vivax*; Medula óssea; Eritropoiese; Transcriptoma.

ABSTRACT

Despite the low parasitemia in *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) malaria, patients can evolve to severe clinical conditions, leading to hospitalizations and deaths. The most frequent complication is severe anemia, which mainly affects younger children. Inside the bone marrow occurs diserythropoiesis, which affects erythropoietic precursors, leading to a decrease of cellularity and ineffective erythropoiesis. Also, the presence of hemozoin (malarial pigment) impairs the proliferation and maturation of hematopoietic lineages. The purpose of this study was to evaluate changes that occurred in the human bone marrow during symptomatic episodes of vivax malaria and to investigate whether these changes are related to molecular mechanisms associated with the development of anemia. We included 15 adult participants who had a positive diagnosis for vivax malaria by thick drop smear, among these, five anemic patients. 20 ml of peripheral blood and 4 ml of bone marrow aspirate from iliac crest were obtained. Samples were collected on day of diagnosis (D0) of malaria and 42 days after (D42). Erythroid cells were purified by MACS using CD71 labeled microbeads. Parasitemia was estimated by optical microscopy. 10^6 to 10^7 cells of the purified CD71+ suspension was stored in trizole until RNA extraction and subsequent analysis of transcript expression. To validate the expression of specific genes, RT-qPCR of genes related to erythropoiesis (*GATA-1*, *ALAS-1*, *NFE-1*, *TAL-1*) was performed. The inflammatory response to malaria was quantified by measuring cytokines and chemokines levels. There was no difference in parasitemia between bone marrow and peripheral blood. There was no predominance of parasitic forms in the bone marrow compared to peripheral blood. Optical microscopy showed a higher count of dyserythropoietic cells during D0 compared to D42. The most observed signals of diserythropoiesis were binucleation, presence of irregular nuclei, Howel-jolly bodies, and megaloblastic chromatin. No parasite invasion was observed in nucleated cells. A total of 274 genes showed a significant difference in expression at D0 compared to D42. Important genes in the terminal phase of erythropoietic development showed decreased expression during infection, confirmed by RT-PCR. Pathways related to the immune response (complement activation, TNF- α , IFN- γ), apoptosis, exocytosis, and activation of proto-oncogenes are up-regulated. In conclusion, we characterize morphological and transcriptional changes in erythropoietic precursors during active infection. Levels of proinflammatory cytokines were similar between bone marrow and peripheral blood. This finding corroborates with transcriptomics data that show activation of genes that express cellular receptors for cytokines and other genes related to immune response in acute disease (D0). Exploratory analysis of small RNAs demonstrated changes in expression that can impair erythropoiesis during infection, such as the increase in mir-150, which is generally decreased in terminal erythropoiesis. These data together make up the first study that demonstrates changes in human erythropoietic transcriptome in bone marrow infected by *P. vivax* through “deep sequencing analysis”. Further studies are needed to fill the gaps in the participation of this tissue niche in the pathogenesis of malaria in humans.

Keywords: Malaria; *Plasmodium vivax*; Bone marrow; Erythropoiesis; Transcriptome

RESUMO LEIGO

A malária é uma doença comum na Amazônia e que causa febre, calafrios e dores no corpo. É causada pelo *Plasmodium*, sendo duas as principais espécies importantes: *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*. A malária causada pelo *vivax* é menos complicada, mas anemia grave pode ocorrer, principalmente em crianças pequenas e mulheres grávidas. Quando a malária não é tratada, a anemia pode se agravar, levando à internação hospitalar e, em casos mais graves, à morte. A anemia ocorre, pois o parasito da malária se multiplica dentro das células vermelhadas do sangue e as destrói. Hoje sabemos que além de destruir as células no sangue, o parasito da malária também pode atingir a medula óssea, que é o órgão responsável pela produção das células do sangue. A malária causa a inflamação dentro desse órgão e o modifica, prejudicando a produção de novas células e facilitando o aparecimento da anemia. Essa pesquisa buscou quais as alterações ocorrem dentro da medula óssea de pacientes com malária *vivax* que indicam o aparecimento de anemia. Para isso, coletamos sangue da medula e sangue da veia do braço de pacientes e realizamos um estudo do material genético, ou seja, nos genes desses pacientes. Observamos que há mudanças na medula óssea do paciente com malária que podem estar relacionadas com o desenvolvimento da anemia. Concluimos então que o parasito da malária *vivax* modifica a medula óssea e isso pode causar anemia.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO	Pag.
Figura 1. Casos de malária confirmados por 1000 habitantes nas Américas.....	2
Figura 2. Modelo proposto do desenvolvimento do <i>P. vivax</i> na medula óssea.....	10
Figura 3. Desenvolvimento de células-tronco nas diferentes linhagens hematopoiéticas.....	16
Figura 4. Visão geral do gene GATA-1 e sua localização.....	18
Figura 5. Regulação da eritropoiese em múltiplos níveis.....	19
 PRODUTO DE TESE 1	
Figura 1. <i>Plasmodium vivax</i> parasites in bone marrow (BM), dyserythropoiesis, and inefficient erythropoiesis during active <i>P. vivax</i> infections.....	30
Figura 2. Principal component analysis, heat map, and gene set enrichment analysis (GSEA).....	33
Figura 3. Transcriptional validation and correlation of hemozoin with inefficient erythropoiesis.....	34
Figura 4. Immune-related genes and cytokine profile.....	35
Figura S1. RNA-seq pipeline for differential gene expression analysis.....	39
Figura S2. Close up views of the enrichment map.....	40
 PRODUTO DE TESE 2	
Figura 1. Comparison of <i>P. vivax</i> load and life stages in bone marrow aspirate and peripheral blood on admission.....	53
Figura 2. Small RNA profile of bone marrow CD71+ erythroid precursor cells on admission and at convalescence.....	56
Figura S1. Multiple ring-infected cells and signs of dyserythropoiesis.....	59
Figura S2. Bioinformatics pipeline and analyses tools.....	60

LISTA DE TABELAS

PRODUTO DE TESE 1	Pag.
Supplementary Table S1.1. Amplification conditions.....	40
Supplementary Table S1.2. Primers and probes used for malaria molecular diagnosis.....	40
Supplementary Table S1.3. Quantitative results for <i>P. vivax</i> and <i>P. falciparum</i> infection.....	41
Supplementary Table S2. Hematological and clinica data from patients at D0 and D42.....	42
Supplementary Table S3. TOP 20 GSEA GO terms enriched at 42 days and at 0 days to the counterpart preranked by normalized enrichment score (NES) ($p_{adj} < 0.05$).....	43
PRODUTO DE TESE 2	
Supplementary Table S1. Haematological and biochemical parameters from peripheral blood on admission and at convalescence.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

$\Delta\Delta$CT	Delta-Delta Cycle Threshold
μL	Microlitro
ADP	Adenosina difosfato
ALAS-1	5'-Aminolevulinato Sintase 1
ARID3A	Domínio de interação 3A rico em AT
Bcl-2	Regulador de apoptose Bcl-2
BM	Medula óssea
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBA	Cytometric Bead Array
CD169	Sialoadenosina
CD6	Cluster de diferenciação 6
CD71	Receptor de transferrina
CXCL12	Ligante 12 da quimiocina CXC
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPO	Eritropoietina
EPO-R	Receptor de eritropoietina
FAPEAM	Fundação de Amparo À Pesquisa do Amazonas
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
FOG-1	Fator Friend of GATA -1
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GATA-1	Fator de transcrição eritróide
Hb	Hemoglobina
HSP	Heat shock protein
IC	Intervalo de confiança
IFN-γ	Interferon gama
IGTP	Institut German Trials i Pujol
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4

IL-6	Interleucina-6
JAK-2	Janus quinase 2
Kg	Quilograma
Km	Quilômetro
LDB-1	Domínio de ligação LIM-1
LepR	Receptor de Leptina
LMO2	Gene codificante de proteína de domínio LIM
Mg	Miligrama
mm³	Milímetro cúbico
MO	medula óssea
MPP	Progenitores multipotentes
MSC	Células hematopoiéticas pluripotentes mesenquimais
Myb	Proto-oncogene Myb
Myc	Proto-oncogene Myc
NFE	Fator nuclear eritróide
NGS	Next Generation Step
PAigG	Imunoglobulina G associada à plaqueta
PB	Sangue periférico
PDW	Amplitude de distribuição de plaquetas
PU-1	Fator de transcrição do gene SP11
Qpcr	PCR quantitativo em tempo real
RBC	Eritrócito
RNA	Ácido ribonucleico
SCF	Fator de célula-tronco
SCL	Fator de diferenciação eritróide
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
STAT-5	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5
TAL-1	Fator de diferenciação eritróide
TAP	Tempo de protrombina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	T helper 1

Th2	T helper 2
TLR	Receptor Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
<i>TRAIL</i>	Ligante indutor de apoptose ligado a TNF
VCAM	Molécula de adesão vascular 1
VPM	Volume plaquetário médio
WHO	Organização mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Situação epidemiológica da malária por <i>Plasmodium vivax</i> na Amazônia Brasileira.....	1
1.2. Evidências clínicas de doença grave associada à malária por <i>Plasmodium vivax</i>	3
1.3. As teorias biológicas da recaída, o parasitismo persistente e o desenvolvimento de anemia.....	
1.4. Alterações medulares e eritropoiéticas relacionadas à malária.....	9
1.5. Controle transcricional da hematopoiese.....	15
1.6. Controle transcricional eritropoiético.....	17
1.7. Relevância.....	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Geral.....	21
2.2. Específicos.....	21
3. PRODUTOS DA TESE.....	22
3.1. Morphological and Transcriptional Changes in Human Bone Marrow During Natural <i>Plasmodium vivax</i> Malaria Infections.....	22
3.2. <i>Plasmodium vivax</i> gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile.....	50
3.3. Bone Marrow Investigation in Infectious Diseases: Practicalities and Ethical Aspects.....	62
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS.....	70
5. CONCLUSÃO.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
7. ANEXOS E APÊNDICES.....	81
7.1. Lista de Publicações.....	81
7.2. Aprovação ética.....	84
7.3. Termo de consentimento Livre e esclarecido.....	93
7.4. Procedimento Operacional Padrão 01.....	95
7.5. Procedimento Operacional Padrão 02.....	100
7.6. Procedimento Operacional Padrão 03.....	105
7.7. Procedimento Operacional Padrão 04.....	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Situação epidemiológica da malária por *Plasmodium vivax* na Amazônia Brasileira

A malária é uma doença aguda, endêmica em grande parcela das regiões tropicais do globo. No ano de 2018, o número de casos estimados foi de 228 milhões (IC: 206-258 milhões) (1), com declínio constante e lento em comparação com os anos anteriores, contudo, distante do ideal almejado para o início deste século. Cerca de 93% dos casos de malária em 2018 foram originários da África Subsaariana, com acentuado predomínio da infecção por *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). Tem-se a participação maior de número de casos na região Mediterrânea, Sudeste Asiático e região das Américas, sendo esta última, a que apresenta maiores proporções de casos de malária causados por *Plasmodium vivax*.

O Brasil representa cerca de um terço dos casos de malária na Américas. A transmissão ativa ocorre, em grande parte, na região Amazônica, com prevalência da malária por *P. vivax* (Figura 1). Em outras regiões do Brasil, há ocorrência de casos importados da Amazônia Brasileira ou de países endêmicos, com exceção de surtos isolados no Sudeste Brasileiro com componente zoonótico (2).

A Amazônia Legal Brasileira é uma região de 5,217,423 km² e compreende nove estados políticos do Brasil. Apesar do ecossistema característico, a transmissão de malária sofre variações regionais, ou ainda microrregionais, associadas a particularidades sociodemográficas e de caráter político. Há redução absoluta no número anual de casos nesta região, no entanto, aumento proporcional dos casos de malária por *P. vivax* em comparação aos casos por *P. falciparum* (3).

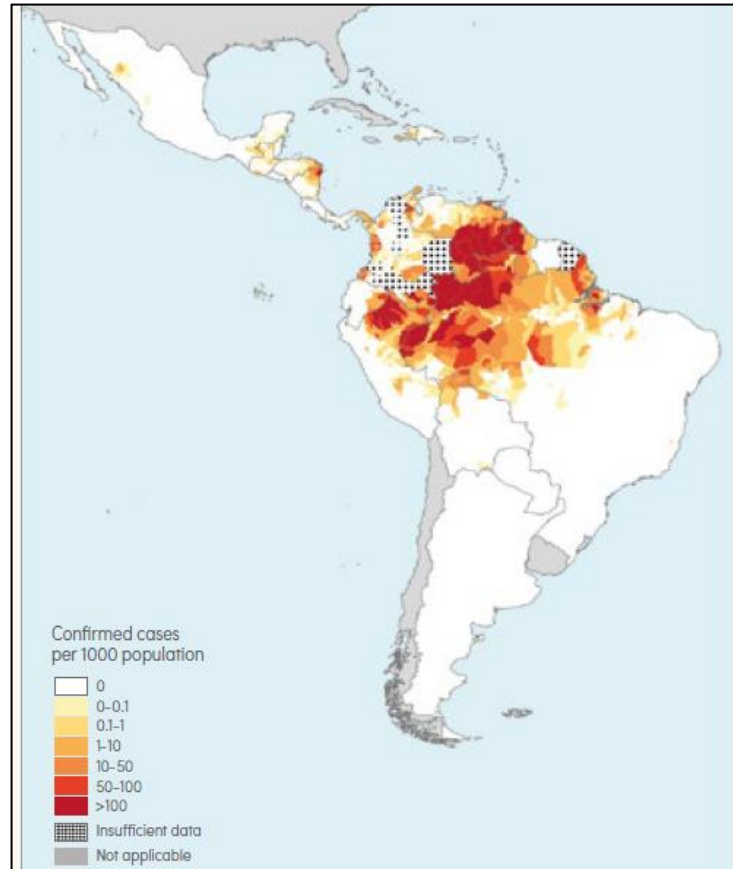


Figura 1. Casos de malária confirmados por 1000 habitantes nas Américas (Fonte: World Malaria Report, 2019).

Historicamente, o Brasil enfrentou um processo de controle de malária bastante rígido na década de 1960, o que ajudou na redução severa do número de casos de malária por *P. falciparum*, limitando sua transmissão ativa à Amazônia e trazendo à tona a maior incidência de casos de *P. vivax* (4), que resiste a medidas de controle da malária devido às suas características biológicas, a notar: latência de hipnozoítos no parênquima hepático, ciclo sexuado precoce e alta carga de pacientes assintomáticos, facilitando condições de transmissão ativa (5).

Apesar dos esforços para controle da malária, o financiamento público para o manejo e controle apresenta constante queda, devido principalmente a instabilidade política e falta de investimento em medidas públicas sanitárias. A queda brusca no número de casos e hospitalizações tem sido vista por especialistas como um dos principais motivos do desinteresse no investimento em programas de eliminação (6).

A malária por *P. vivax* causa uma parcela menor de hospitalizações quando comparada à malária por *P. falciparum*, variando entre 0,7 e 0,9% dos casos (6). A hospitalização é dependente das variações relacionadas a velocidade de diagnóstico. Erroneamente considerada benigna, a malária que aflige grande parte dos habitantes da Amazônia pode evoluir para casos graves, com necessidade de hospitalização em centros terciários de saúde ou ainda evoluir para óbito. Anemia grave, insuficiência respiratória e, não raramente, anemia hemolítica induzida por primaquina em indivíduos deficientes de G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase), uma enzimopatia que acomete cerca de 4,5% da população local (7) são as causas mais comuns de hospitalizações.

O número de mortes por malária na Amazônia Brasileira se encontra em declínio, sendo reportadas apenas 39 mortes em 2015, com mortalidade em torno de 0,017%, 100 vezes mais baixa quando comparada à mortalidade por malária na região extra-Amazônica (1,8%) (8). Esta diferença se dá pela alta capilaridade do diagnóstico de malária na região Amazônica e pela demora do diagnóstico e início do tratamento na região extra-Amazônica.

No estado do Amazonas, maior estado em extensão territorial e principal contribuinte de novos casos de malária na região Amazônica, há redução da incidência de malária por *P. falciparum* nos últimos anos e conseqüente menor número de mortes e casos clínicos graves. Medidas de controle vetorial, o diagnóstico precoce e a introdução do Coartem® (Arteméter + Lumefantrina) no tratamento da malária por *P. falciparum* na região metropolitana de Manaus e arredores, contribuíram para este cenário. Em Manaus, estudos realizados em população habitante de zonas periurbanas, estimam carga de 50% dos indivíduos com infecção assintomática, com presença marcante de gametocitemia periférica (9). Não está clara a contribuição de infecções assintomáticas no desenvolvimento de comorbidades.

1.2. Evidências clínicas de doença grave associada à malária por *Plasmodium vivax*

Devido aos baixos índices de letalidade, a malária vivax foi considerada por muito tempo uma doença benigna. Entretanto, diversos relatos clínicos demonstraram

que, ainda que apresente parasitemia periférica mais baixa, consegue assemelhar-se às complicações antes associadas apenas à malária falciparum (10–15). Anemia, plaquetopenia, icterícia e síndrome respiratória aguda são complicações frequentes da malária vivax (16,17). Além disso, *P. vivax* apresenta ciclo biológico mais complexo com diferenciação em formas latentes (hipnozoíto) causadoras de recaídas, o que torna difícil o completo entendimento da patogênese. Os mecanismos associados à ativação de hipnozoítos e se a ocorrência de novos episódios pode contribuir para o aumento de incidência de casos complicados não estão claros.

a) Anemia

A anemia é a complicação mais frequente da malária vivax e atinge principalmente crianças jovens em áreas tropicais, onde a frequência de recaídas é maior. Ross et al. (18) observaram em uma coorte de crianças jovens em Papua Nova Guiné que a frequência de recaídas é cerca de 4 recaídas em um período de 16 meses, e isso impacta diretamente na queda de parâmetros hematológicos. O risco de desenvolvimento de malária grave, em áreas endêmicas, é cerca de 3,4 vezes maior entre crianças jovens com malária vivax em comparação a crianças da mesma faixa etária infectadas por *P. falciparum* (19), sendo a gravidade relacionada as recaídas que impactam nos parâmetros hematológicos.

P. vivax é a espécie com maior capacidade de desenvolver sintomas e complicações quando se leva em consideração a biomassa parasitária (20). Isto se deve às características biológicas peculiaridades da espécie como: (i) diferenciação em formas parasitárias teciduais latentes causadoras de recaídas, os hipnozoítos e (ii) capacidade de causar infecções repetidas, assintomáticas e submicroscópicas, perpetuando a transmissão da doença em áreas endêmicas e causando prejuízos hematológicos de caráter crônico no hospedeiro, fenômeno ainda pouco esclarecido devido à dificuldade de se diagnosticar infecções subpatentes, dado o baixo acesso a técnicas de biologia molecular em áreas endêmicas, tornando a literatura sobre o tema escassa e restrita à busca ativa realizada em pesquisas científicas de caráter transversal, sendo a população testada bastante limitada (revisado por Mueller (21)).

Mulheres grávidas com malária vivax devem ser monitoradas com atenção, (22). O risco de parto prematuro está aumentado, assim como o desenvolvimento da anemia concomitantemente, bem como ocorre em pacientes com malária falciparum. Mulheres primíparas com malária vivax apresentaram maior risco de concepção de crianças com baixo peso (23,24). O custo financeiro relacionado ao acompanhamento médico destas mulheres, portanto, é maior quando comparado a mulheres não infectadas (23,25).

O desenvolvimento de anemia malárica em coinfeções com helmintíases também é importante, apesar de pouco estudado. Burdan et al. (26) avaliaram uma coorte de crianças com menos de 5 anos de idade e verificaram que a presença de helmintíase *per se* é um fator de risco para o desenvolvimento de anemia e mesmo em infecções maláricas assintomáticas, o risco de anemia e anemia grave podem dobrar ou mesmo triplicar. A infecção assintomática de malária é um fator de risco para anemia em crianças com helmintíase, contudo esses dados podem ser subestimados nos mais diferentes cenários endêmicos, dada a dificuldade de diagnóstico molecular de malária nessas áreas. Melo et al. (27), de forma contrária, não encontraram risco de desenvolvimento de anemia ao acompanhar uma coorte de crianças em idade escolar (5 a 14 anos de idade) na Amazônia Brasileira e evidenciaram um possível efeito protetor/modulador dos parasitos intestinais sobre a infecção malárica, cujos mecanismos ainda não elucidados, embora se hipotetize a participação direta de resposta imunológica do tipo Th2 (28).

b) Plaquetopenia

A plaquetopenia é uma complicação frequente, mas pouco associada à mortalidade e aumento do risco de hemorragia na malária. Uma metáanálise com 56 estudos e 29,664 participantes, estimou o aparecimento da plaquetopenia em 10,1%, incluindo casos de plaquetopenia grave ($<50,000/\text{mm}^3$) e muito grave ($<20,000$), sem diferença de risco de desenvolvimento de plaquetopenia entre malária vivax e falciparum, embora na malária vivax a chance de agravamento seja maior (12).

Os mecanismos de desenvolvimento de plaquetopenia estão relacionados ao consumo de plaquetas em nível periférico, sequestro de plaquetas pelo baço e ao

processo de coagulação intravascular disseminada (29). Os sinais de alteração são quanti e qualitativos, sendo os mais comuns: as alterações morfologia das plaquetas, o aumento do volume plaquetário médio (VPM) e a alteração da distribuição de volume plaquetário (PDW) (30). Tempo de protrombina (TAP), tempo de ativação da tromboplastina, mensuração de níveis plasmáticos de alguns fatores da cascata de coagulação como o V, VII e VIII (31) e dosagem de dímero-D (32) são parâmetros que devem ser levados em consideração na avaliação clínica de pacientes com malária e plaquetopenia .

Não há ainda evidências de alteração morfológica na medula óssea ou mesmo de invasão de megacariócitos por *Plasmodium* spp. (33,34), apesar da detecção de plaquetas infectadas, o que se sugere um fenômeno ocorrido em nível periférico (35). Lacerda et al. (36) e Maina et al. (37) verificaram relação negativa entre o VPM e a contagem total de plaquetas, sugerindo um mecanismo compensatório de liberação de megaplaquetas que pode ser fator determinante para a baixa frequência de sangramento grave em indivíduos infectados com *P. vivax* e plaquetopenia.

A ativação de auto-anticorpos (PAIgG), a formação de imunocomplexos devido a deposição de antígenos de *Plasmodium* spp. na superfície plaquetária, aumento de estresse oxidativo e agregação plaquetária mediada por ADP (Adenosina difosfato) são sugerido como mecanismos que afetam a homeostase plaquetária durante e infecção (38).

c) Complicações respiratórias

As complicações respiratórias são frequentes em casos graves de malária vivax, sendo maior em crianças hospitalizadas (2,1%). Essas complicações podem levar a óbito e geralmente estão associada a síndrome respiratória aguda grave (SRAG), cujos mecanismos patogênicos não são inteiramente compreendidos, embora, haja evidências da participação direta da tempestade inflamatória que ocorre independente da parasitemia e citoaderência endotelial (fenômeno não muito claro). Em revisão sistemática, Val et al. (39), relataram 0,1% de prevalência de síndrome respiratória ao avaliarem 450.115 pacientes, aumento de prevalência de SRAG em casos graves (8,3%) e mortalidade de 16,3% em pacientes com SRAG. Aumento da

frequência respiratória e cardíaca, plaquetopenia e anemia concomitantes foram outras complicações evidenciadas.

Descrições realizadas a partir de autópsias de pacientes com malária vivax grave, caracterizam o quadro inflamatório caótico provocado pelo protozoário no pulmão. Autópsias realizadas em pacientes com morte atribuída ao *P. vivax* mostram a afetação multiórgãos, além de evidenciar a presença proeminente de infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear no pulmão (40,41).

1.3. As teorias biológicas da recaída, o parasitismo persistente e o desenvolvimento de anemia

P. vivax tem a capacidade de manter o parasitismo humano para além do episódio malárico. Isto é justificado pela presença de uma forma latente, denominada hipnozoíto que permanece no tecido hepático adormecido e por alguma razão biológica (ainda pouco clara) pode reiniciar o ciclo esquizogônico e um novo episódio de malária, sintomático ou não (42)(43).

Previamente à teoria dos hipnozoítos, a origem das recaídas (ativação de hipnozoítos) era dada pela presença de parasitos no sistema retículo-endotelial ou à ocorrência intermitentes ciclos esquizogônicos hepáticos (44). A diferenciação em hipnozoítos parte do princípio de que os esporozoítos, ao serem inoculados através picada da fêmea de anofelino, são transportados pela corrente sanguínea para o tecido hepático, onde podem se diferenciar em dois estágios: os esquizontes teciduais ou hipnozoítos, comum na infecção por *P. vivax* (45). Os hipnozoítos são formas parasitárias unicelulares que podem permanecer adormecidos no tecido hepático por um período de tempo que pode variar de 8 a 10 meses (46–50).

Características de resposta imunológica do hospedeiro, tempo de ativação dependente de características intrínsecas das cepas de plasmódio e o tratamento antimalárico utilizado são determinantes para ativação do hipnozoíto. A utilização de 8-aminoquinoleínas, como a primaquina, por exemplo, diminuem a biomassa de hipnozoítos e conseqüentemente reduzem as chances de recaída e risco de desenvolvimento de anemia a curto prazo (42 dias) (51).

Cerca de 80% dos episódios de malária subsequentes a uma primeira infecção ocorrem devido à reativação de hipnozoítos (52), mas há uma grande dificuldade de confirmação das reativações devido a ausência de marcadores genéticos ou sorológicos que possam diferenciá-las de episódios recrudescentes (53). As reinfecções se tornam menos distinguíveis em cenários de alta transmissibilidade onde o padrão de recaída das cepas circulantes é curto.

A alta variabilidade genética de cepas de *P. vivax* expõe o hospedeiro, a hipnozoítos que podem “despertar” em diferentes tempos e a fatores de susceptibilidade a ativação e constitui um obstáculo importantes na predição de recaídas. Koepfli et al. (54) relatam que há alta variabilidade genética entre hipnozoítos, o que é comum em áreas de média a alta transmissão, devido as altas taxas de inoculação e do contato do mosquito vetor com clones diferentes do parasito ao picar indivíduos com infecção patente.

A recaída de malária vivax é a recorrência que tem origem na ativação de hipnozoítos. Já a recrudescência, tem como origem o retorno da parasitemia assexuada, ou seja, é originada da recirculação de merozoítos. Diferenciar episódios de recaídas, recrudescências e reinfecções é de extrema importância para o direcionamento da tomada de decisão relativa a medidas de controle e à transição do estágio epidemiológico de controle para a eliminação da transmissão ativa. Uma alternativa à falta de marcadores específicos das formas latentes, tem sido associar através de modelos matemáticos a positividade de microssatélites (marcadores de recrudescência) ou marcadores sorológicos à periodicidade de novos episódios, informações genotípicas das cepas locais circulantes, ao tratamento local estabelecido por diretrizes de saúde e mapeamento de transmissão ativa da doença (55).

1.4. Alterações medulares e eritropoiéticas relacionadas à malária

Os mecanismos patogênicos que levam ao desenvolvimento de anemia na malária vivax apesar de conhecidos, são pouco claros. Os principais são: i) a ocorrência de recaídas; ii) a maior quantidade de células não infectadas destruídas

durante infecção e iii) a ocorrência de diseritropoiese e eritropoiese ineficiente na medula óssea promovidas pela presença do parasito e seus metabólitos (56).

Em infecções por *P. falciparum*, estudos demonstram que a supressão da eritropoiese está relacionada: a produção deficientes de eritropoietina, altos níveis de hemozoína circulante e altos títulos de mediadores pró-inflamatórios (p.e. TNF, óxido nítrico) (57–61). A perda ou redução da habilidade de produzir novos eritrócitos leva à falha em substituir eritrócitos durante a infecção malárica e durante o tratamento com antimalárico. O dano parenquimal medular, a eritropoiese inefetiva e a taxa de proliferação eritropoiética deficiente em pacientes com malária aguda por *P. falciparum* demonstram que a supressão medular é uma das principais causas da anemia neste tipo de malária (62–64).

Ainda há escassez de estudos que expliquem o impacto da infecção malárica na medula óssea (MO) humana e pouco se sabe sobre os aspectos biológicos relacionados ao amadurecimento de formas específicas do parasito, como gametócitos na MO ou mesmo se há algum processo biológico relacionado ao amadurecimento de formas parasitárias do *P. vivax* que ocorra estritamente na medula óssea, embora haja algumas hipóteses sobre o tema (Figura 2) (65). A primeira descrição de alterações da MO relacionada a infecção por *Plasmodium* spp. foi realizada em 1894 por Machiafava (66).

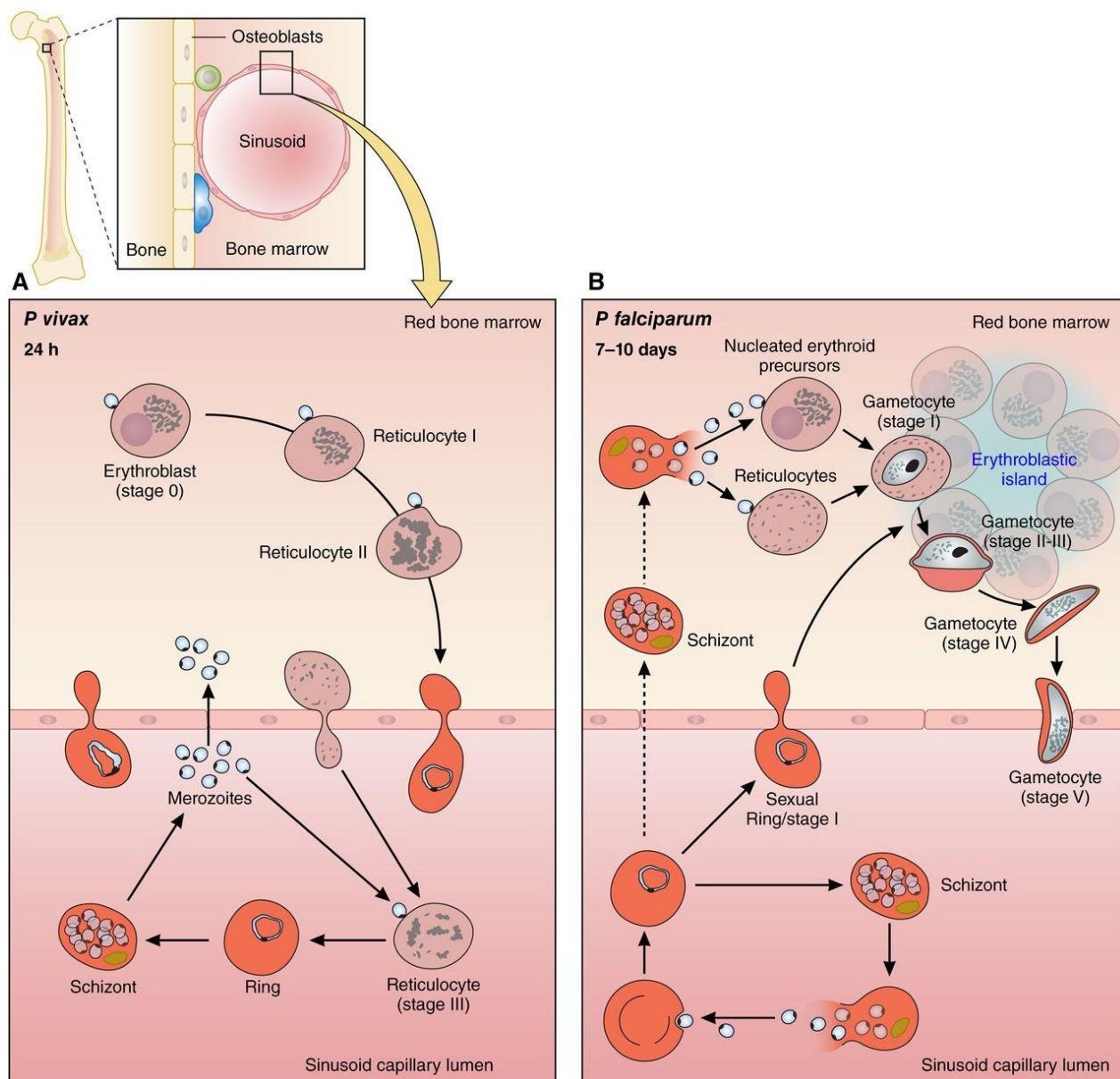


Figura 2: Modelo proposto do desenvolvimento do *P. vivax* na medula óssea (Fonte: Mayor e Alano, 2015): A) *P. vivax* infecta reticulócitos em estágio III que saem por diapedese para o lúmen capilar sinusoidal. Alternativamente, merozoítos de *P. vivax* ou eritrócitos infectados por *P. vivax* podem entrar no compartimento da medula óssea vermelha, levando à invasão de reticulócitos CD71⁺; B) Presença de gametócitos imaturos de *P. falciparum* no espaço extravascular da medula óssea pode ser explicada por eritrócitos infectados por gametócitos de estágio I ou estágios de anel entrando no estroma da medula óssea através do revestimento endotelial. Alternativamente, esquizontes assexuados, que se desenvolvem no compartimento extravascular, podem produzir merozoítos sexualmente comprometidos que invadem os precursores eritroides (65).

Ainda na metade do século 20, alguns relatos de punções de medula de osso esterno realizadas como forma alternativa de diagnóstico da malária, apontaram o enriquecimento de parasitos na MO e presença de anormalidades celulares

(alterações nucleares nos eritroblastos, por exemplo) indicativas de diseritropoiese. Aitken e Glasg (67) realizaram punções de esterno em 10 pacientes com parasitemia periférica detectável para as espécies *P. vivax* e *P. falciparum*. Estes autores encontraram maior predominância de formas jovens nas punções positivas para *P. falciparum* e maior variabilidade de maturação nos casos positivos de *P. vivax*, com presença de trofozoítos, gametócitos e esquizontes em baixa parasitemia quando comparados à *P. falciparum*, contudo essa diferença pode estar associada a análise microscópica limitada. Além disto, foi evidenciada a presença de parasitos na medula esternal na ausência de parasitemia periférica, o que pode indicar a utilização da MO como nicho como reservatório.

Rumball e Parsons-Smith (68), apresentaram o achado de formas sexuadas e assexuadas em medula esternal em dez casos de pacientes com malária, dentre os quais casos clássicos de “malária terçã benigna persistente”. Wickramasinghe et al. (69) após análise da medula óssea de pacientes febris com diagnóstico confirmado de malária vivax (n=9), encontraram sinais claros de diseritropoiese como células multinucleadas, núcleos dismórficos, presença de corpúsculos de Howell-Jolly e de pontes citoplasmáticas entre eritroblastos em avaliação por microscopia eletrônica de transmissão. A série de pacientes mostra por microscopia eletrônica de transmissão variações celulares em pacientes com hemoglobina normal ou anemia leve. Ausência de reticulocitose foi indicativo de eritropoiese ineficiente. Diferenças na contagem em células brancas foram evidenciadas, dando indício de alterações em outras linhagens hematopoiéticas.

Em pacientes com malária falciparum, a eritropoiese ineficiente é caracterizada pela redução quantitativa da relação entre eritroblastos basofílicos e policromáticos, (64). Isto é evidenciado por Wickramasinghe et al. (57) e Dormer (64). Esses autores, também evidenciaram aspectos celulares, a exemplo de cariorrexe, núcleos dismórficos e aparência megaloblástica (69) na malária vivax. Wickramasinghe et al. (57) hipotetizam que o prejuízo no desenvolvimento eritropoiético a médio e longo prazo, ou ainda em episódios sucessivos, pode ser responsável pelo desenvolvimento, manutenção e piora do quadro de anemia.

Os mecanismos que levam à diseritropoiese e à eritropoiese ineficiente não estão completamente explicados, principalmente para *P. vivax*. Estudos em humanos, modelos animais e ensaios *in vitro*, contudo, suportam que há prejuízo da atividade medular devido à presença do parasito ou de seus metabólitos, bem como a ativação de resposta inflamatória no tecido medular.

O desenvolvimento *in vitro* sincrônico de reticulócitos e eritrócitos a partir de células-tronco hematopoiéticas constitui metodologia importante para medir o impacto do *P. vivax* na hematopoiese. Através desta metodologia, foi possível identificar que células infectadas por *P. vivax* e seus lisados induzem supressão do desenvolvimento eritróide através do atraso no ciclo biológico natural e prejuízo da proliferação destas células (70–72). Estudos *in vivo* utilizando cepas de *Plasmodium yoelii*, plasmódio do modelo murino de malária que se assemelha biologicamente ao *P. vivax*, mostrou que células infectadas suspensas em meio de cultivo induzem a secreção de fator de necrose tumoral (TNF) (73). Em ensaios utilizando *Plasmodium chabaudi*, foi observada redução de 50% na proliferação de colônias formadoras na medula óssea de ratos infectados (74,75). Dados clínicos indicam que prejuízos eritropoiéticos ocorrem na medula óssea humana mesmo na ausência de anemia ou de baixos níveis circulantes de eritropoietina, sendo que a influência da malária no desenvolvimento eritróide pode variar entre diferentes faixas etárias (62,63,76–78).

Não está clara a participação da eritropoietina no desenvolvimento da anemia durante a malária falciparum, mas há evidências de que altos níveis do hormônio estão relacionados a malária cerebral (77,79,80). A eritropoietina é o hormônio responsável pela potencialização da proliferação e diferenciação de células eritróides. Produzida pelos rins em resposta à hipóxia, se liga ao receptor de eritropoietina (EPO-R) em células hematopoiéticas (81,82), levando às vias de ativação de transcrição da Janus-kinase (JAK-2) e STAT5.

Leowattana et al. (77) acompanhando uma coorte de 87 pacientes com malária falciparum até o dia 28 e demonstrou maiores níveis deste hormônio e reticulocitose em indivíduos anêmicos. Níveis menores de eritropoietina foram verificados em indivíduos infectados, contudo, sem aumento significativamente em resposta a infecção ao longo do tempo. Esse resultado é corroborado por el Hassan (83).

Segundo esse autor, a cloroquina utilizada no tratamento da malária causa prejuízo na produção do hormônio. Em população infantil, distintamente, Burchard et al. (84) não encontrou relação entre a queda dos níveis de eritropoietina e a anemia malárica. Os níveis do hormônio mostraram tendência em aumentar em resposta à doença na tentativa de suprimir os efeitos patológicos do parasito.

Outro mecanismo importante de prejuízo na ação da eritropoietina é o surgimento de autoanticorpos anti-EPO. Este evento é bem descrito no desenvolvimento de anemia em pacientes com HIV e lúpus eritematoso sistêmico (85,86), mas na malária é pouco claro. Addai-Mensah et al. (87) relatam o baixo título plasmático ou ausência desses anticorpos em crianças com malária falciparum e anemia, tendo estes baixa influência na ação de eritropoietina. Helegbe et al. (88), estudando malária murina causada pelo *Plasmodium berghei* encontrou relação entre maiores níveis de anti-EPO e queda de hemoglobina, sem, contudo, redução nos níveis de eritropoietina.

A hemozoína, é um produto de degradação da hemoglobina formado no vacúolo digestivo de formas intraeritrocitárias de *Plasmodium* spp. Além disto, é um fator importante na patogênese da malária, que pode suprimir a eritropoiese *in vitro* na ausência de TNF (89,90), embora *in vivo* possa agir sinergicamente e acelerar o desenvolvimento da eritropoiese (61). Culturas *in vitro* de eritroblastos expostos à hemozoína exibiram modificação de seus ciclos celulares e redução da expressão do fator GATA-1 (91), um dos principais fatores de transcrição eritropoiéticos. Perfis proteômicos de pacientes anêmicos e não-anêmicos com malária vivax sinalizam alterações em vias metabólicas importantes no desenvolvimento eritropoiético e sobrevivência celular, incluindo vias de regulação do estresse oxidativo, a regulação e manutenção do citoesqueleto e de ativação de cascata do complemento (72).

O efeito pró-inflamatório da hemozoína se dá pela presença do grupamento heme e indução de dano oxidativo. Casals-Pascal et al. (60) demonstraram que há efeitos supressores do desenvolvimento eritróide tanto *in vivo* quanto *ex vivo* e que estes estão relacionados ao desenvolvimento de anemia em crianças com malária. Aguilar et al. (92) descrevem em uma coorte de crianças de Moçambique a presença de diferentes níveis de agregados de hemozoína em aspirado medular diretamente

relacionados ao aparecimento de células diseritropoiéticas, anemia e a parasitemia por *P. falciparum*. A presença de hemozoína em cultura celular de eritroblastos demonstrou maior velocidade de senescência, caracterizada pela remoção mais rápida do receptor de transferrina (CD71) e pela presença de fosfatidilserina de superfície (93). Mecanismos apoptóticos relacionados à ativação das caspases 8 e 9 também mostraram ativação, mesmo na ausência de citocinas pró-inflamatórias (89).

Baixos níveis de heat shock protein (HSp) 70 (proteína de choque térmico) e de glicina foram mecanismos associados ao aumento de hemozoína intracelular em indivíduos com anemia grave e infectados com *P. falciparum* (94). Esta proteína regula a transcrição do fator Nf- κ B, associado a efeitos pró-inflamatórios. Receptores do tipo TLR estão associados à ativação do fator Nf- κ B e atuam na indução de resposta inflamatória(95), polimorfismos nos genes que codificam esses receptores já foram associados à desfechos clínicos graves em pacientes com *P. vivax*, como relatado por Costa et al. (96) ao explorar polimorfismos de TLR4, TLR6 e TLR9.

A resposta inflamatória na malária vivax é conhecidamente mais exacerbada em comparação à malária falciparum. A resposta imune inata à malária é orquestrada pela alta produção de proteínas pró-inflamatórias para restringir o desenvolvimento do parasito e anti-inflamatórias, para que se evite dano ao hospedeiro. Como efeito colateral, a liberação de algumas citocinas pode, por exemplo, inibir a eritropoiese. TNF, IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias, inibem a eritropoiese interferindo na expressão de fatores transcricionais que controlam a eritropoiese e interferem na produção de eritropoietina (61,76,77,97,98). O IFN- γ é uma molécula fundamental na diferenciação celular hematopoiética, atuando principalmente sobre as colônias formadoras e sobre os depósitos de ferro (99,100). Os ligantes de TNF (TRAIL) diminuem a quantidade de colônias de maturação eritropoieticas, reduzindo o número de eritroblastos. Aparentemente, não induzem respostas negativas em outras linhagens hematopoiéticas (101,102).

Em contraste, IL-10, uma citocina anti-inflamatória, aparentemente protege células eritropoiéticas, regulando a expressão de receptores de TNF. Esta citocina regula a liberação de TNF e IFN-gama, regulando assim a resposta do tipo Th1 e diminuindo a resposta inflamatória à doença (103). Mendonça et al. (104) descrevem

alta concentração desta citocina em indivíduos com infecção assintomática quando comparados com pacientes sintomáticos ou que desenvolveram alguma complicação/doença grave, reforçando o seu papel protetor. Costa et al. (105) relataram aumento importante de IL-6 e IL-10 em indivíduos com alta parasitemia de *P. vivax* na Amazônia Brasileira.

Outro componente imunológico importante supressor de eritropoiese é o óxido nítrico, apresentando maiores níveis periféricos em indivíduos com anemia malárica (106). TNF e óxido nítrico, suprimem a eritropoiese *in vitro*, sendo relacionados com o desenvolvimento de anemia (61).

Seguindo a linha contrária, agentes estimulantes de proliferação e maturação eritropoiética como a ciclooxigenase-2 e a prostaglandina E2, responsáveis diretas pela definição do volume eritrocitário e produção de hemoglobina, apresentam-se com níveis periféricos diminuídos em pacientes com malária (107–109).

Independente de sua importância em restringir a parasitemia de *Plasmodium* spp. e do controle de resposta exacerbada à infecção, as citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição relacionados às respostas imunes inata e adaptativa tem função primordial no controle da hematopoiese e alterações em seus níveis de regulação podem estar relacionados ao desenvolvimento de anemia malárica, como hipotetizamos neste ensaio.

1.5. Controle transcricional da hematopoiese

A hematopoiese é um processo fisiológico extremamente complexo e crítico para a manutenção dos componentes sanguíneos. Uma única célula-tronco pluripotente hematopoiética, localizada na medula óssea vermelha, pode dar origem a numerosos tipos celulares. Células pluripotentes dão origem a, no mínimo, oito linhagens celulares, que perdem as características dos seus progenitores ao longo do tempo e se diferenciam por fim em um tipo celular específico. Diversas citocinas e fatores de transcrição específicos estão associados a pontos-chaves da regulação, diferenciação, proliferação e renovação de células pluripotentes e no balanço quantitativo de progenitores (Figura 3).

O estudo do nicho hematopoiético central, a MO, traz uma série de desafios, dentre eles a dificuldade de diferenciar grupos celulares espalhados pelo microambiente medular vascularizado (110). Primordialmente, as células-tronco hematopoiéticas (HSC) sofrem a ação do fator solúvel de células-tronco (SCF) e da quimiocina CXCL12 (ligante 12 de quimiocina CXC), liberados por células reticulares próximas e diferenciam-se em células hematopoiéticas pluripotentes mesenquimais (MSC) (revisado por (111)). A partir de então, diversos fatores solúveis são responsáveis pela diferenciação de precursor, o que dará origem às linhagens celulares específicas, dentre elas a eritrócítica, a megacariocítica e a granulocítica.

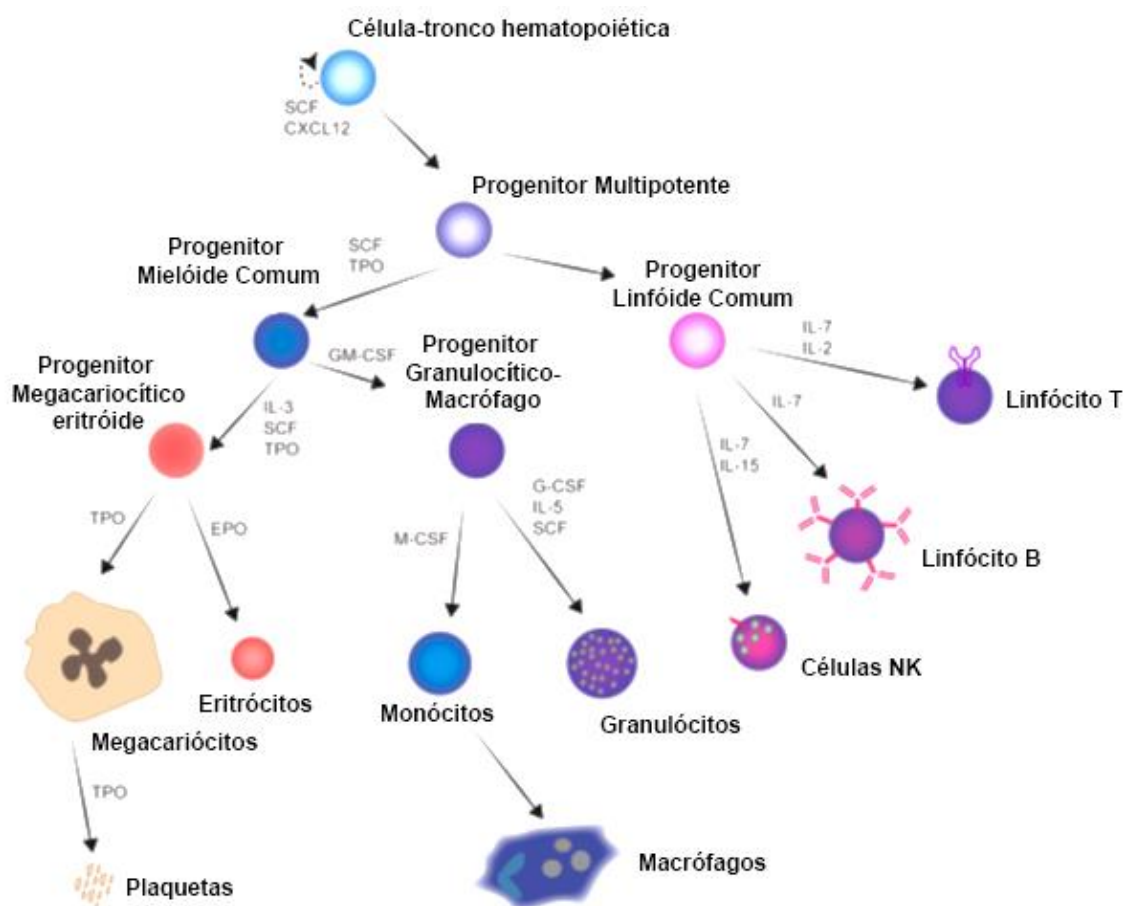


Figura 3: Desenvolvimento de células-tronco nas diferentes linhagens hematopoiéticas. Fonte: Adaptado de Gomes et al. (111).

Por sua vez, a linhagem eritropoiética se diferencia a partir do estímulo de células mesenquimais Lepr+ (receptor de Leptina). Os progenitores multipotentes (MPP) consomem eritropoietina e mantém sua capacidade de diferenciação

específica (112), respondendo aos estímulos da β -integrina e do SFC ainda no período eritropoiético inicial. Nos estágios finais, os precursores eritropoiéticos amadurecem ancorados a macrófagos centrais, organizando-se em uma estrutura conhecida como “ilha hematopoiética”. Estes macrófagos expressam o EPOR (receptor de eritropoietina), VCAM1 e CD169 (113).

Muitos fatores de transcrição são conhecidos por sua importância no desenvolvimento de linhagens hematopoiéticas específicas e a alteração desses fatores controlam etapas chave da maturação celular (114). As técnicas de genômica utilizadas atualmente, denominadas “deep sequencing approaches”, combinadas a análises de bioinformática sofisticada, têm sido fundamentais no avanço de estudos para elucidação das interações envolvidas entre fatores de transcrição gênica e identificação de marcadores-alvo de genes específicos em escala mais ampla.

Noveshtern et al. (115) estudaram o perfil de expressão de 211 amostras humanas contendo cerca de 38 populações hematopoiéticas distintas, incluindo linfócitos maduros, monócitos, granulócitos, células eritróides e megacariócitos. O estudo resultou em um complexo mapa de transcrição da hematopoiese, apresentando módulos de genes altamente co-expressos, sendo alguns linhagem-específicos, mas, em geral, altamente interativos e com níveis de expressão diferentes dentre as várias linhagens celulares. Tendo em vista o impacto que doenças infecciosas podem ocasionar no processo hematopoiético, se torna fundamental o desenvolvimento de estudos que possam relacionar a expressão de marcadores transcricionais à presença de patógenos e ao desenvolvimento de comorbidades.

1.6. Controle Transcricional eritropoiético

O gene *GATA-1*, localizado no cromossomo X (Figura 4), codifica o principal agente regulador da maturação eritropoiética. Os eritrócitos são liberados em altas quantidades diariamente na circulação periférica provindos de uma série de divisões altamente controladas em nível molecular. Manter a homeostase da eritropoiese significa manter a homeostase de *GATA-1*, alterações provocadas por processos patológicos, como por exemplo em processos patogênicos causados por organismos infecciosos, podem desencadear anemia.

A eritropoiese é composta por diversas fases de diferenciação que vem desde às HSC's à chegada ao nível de eritrócito maduro, cujas alterações se resumem na redução de tamanho celular, reorganização da membrana plasmática, produção de hemoglobina e perda do núcleo celular. Cada estágio de desenvolvimento é controlado por uma complexa rede de fatores de transcrição (114).

Os fatores de transcrição que reconhecem *GATA-1* se ligam a um domínio específico de DNA (A/T)GATA(A/G), através de duas regiões zinc-finger do tipo Cys-4 altamente conservada em fungos, plantas invertebrados e vertebrados (principalmente em mamíferos) (116–118). Em mamíferos, *GATA-1*, *GATA-2* e *GATA-3* tem papéis cruciais, mas não exclusivos, na hematopoiese, enquanto *GATA-4*, *GATA-5* e *GATA-6* na diferenciação de tecidos derivados do endoderma (tecido cardíaco, gastrointestinal, endócrino e gonadal) (119,120). *GATA-2* tem função principal nos estágios primários da eritropoiese, sendo importante na sobrevivência e manutenção de HSC's (121). Em determinado momento do desenvolvimento eritrocitário, há uma sobreposição de *GATA-1* sobre *GATA-2*, seguido da redução de influência do *GATA2* e predomínio de *GATA-1* nas fases finais da maturação do pró-eritroblasto (122–124).

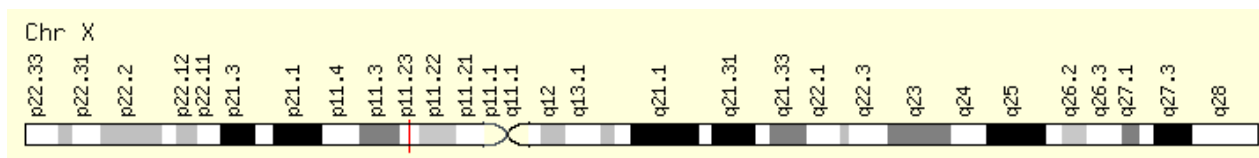


Figura 4: Visão geral do gene *GATA-1* e sua localização (Fonte: Disponível em Genecards.org (125)).

O fator *GATA-1* controla transcricionalmente processos importantes no desenvolvimento eritropoiético como perda de organelas, autofagia e perda de exossomas. Sua expressão controla positivamente a expressão de fatores de transcrição que controlam o ciclo celular eritropoiético como *GFI1b*, *CD6* e *p21*, além de genes importantes para a sobrevivência celular como o *Bcl-2* (Figura 5) (114). Dentre o rol de transcritos influenciados negativamente pelo *GATA-1*, se encontram alguns que prejudicam a evolução eritropoiética específica, como por exemplo *GATA-*

2, Myb, Myc e PU-1. *GATA-1* também regula positivamente alguns microRNA's associados à eritropoiese como miR27a/24 e miR144/451.

As principais interações de *GATA-1* estudadas são com o fator *FOG-1* (Friend of GATA fator – 1), que auxilia na ativação do programa de diferenciação eritropoiético e reprime diferenciação de outras linhagens hematopoiéticas (126), e com o complexo pentamérico *SCL/TAL-1/E2A/LDB-1/LMO-2*, responsável por modular diversos estágios do desenvolvimento eritropoiético através de ligação direta a genes alvos (127). Skorokhod et al. (91) analisaram a influência da hemozoína no desenvolvimento de anemia malárica e descrevem o aumento de expressão de *p53*, um potente inibidor da expressão de *GATA-1*, que pode ter inibido a proliferação celular.

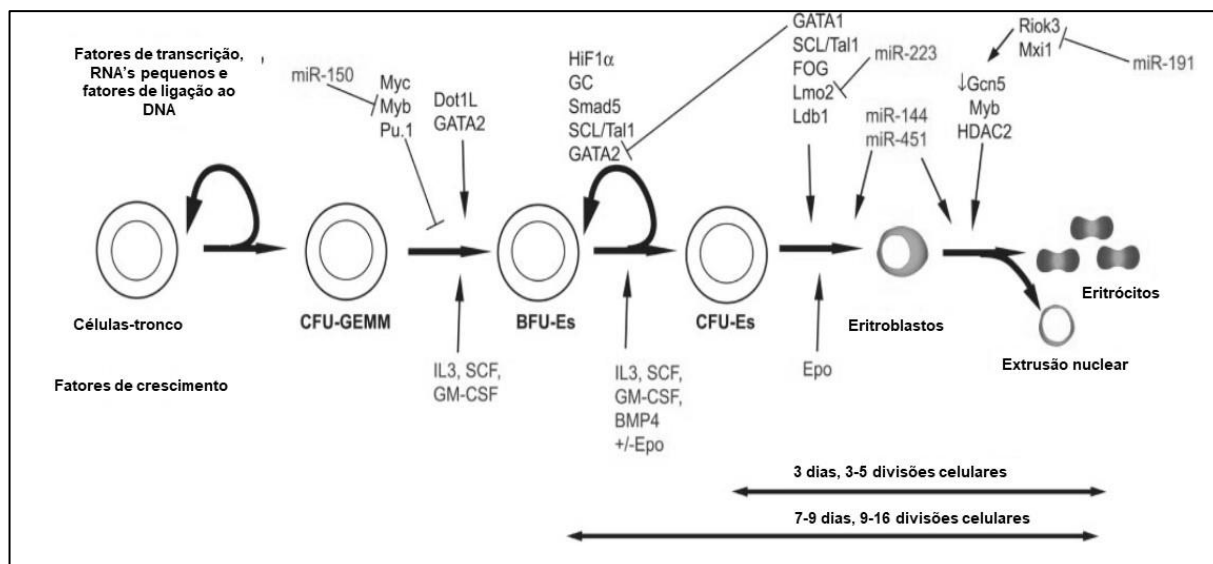


Figura 5: Regulação da eritropoiese em múltiplos níveis (Fonte: Adaptado de Hattangadi (114).

1.7. RELEVÂNCIA

Nas últimas décadas diversos estudos epidemiológicos, relatos e séries de casos, e revisões bibliográficas têm relacionado a malária vivax às manifestações clínicas graves e morbidades que dão destaque a este tipo de malária humana como importante problema de saúde pública em regiões endêmicas. Existem mecanismos em potencial que tentam explicar a anemia relacionada à malária por *P. vivax*, no

entanto, poucos deles satisfatoriamente elucidados. Neste estudo, através da análise de MO de pacientes infectados e em fase aguda, foram investigadas alterações na morfologia celular eritróide que possam indicar o desenvolvimento de anemia. O perfil de expressão gênica foi analisado através do sequenciamento global do RNA do parasito e do hospedeiro, com o intuito de explorar, a nível molecular, marcadores relacionados ao desenvolvimento de anemia em indivíduos com malária vivax.

Os estudos já realizados com MO de sujeitos infectados propõem algumas hipóteses de patogênese para a anemia malárica. No entanto, em nenhum deles foram utilizadas técnicas NGS (Next Generation Step) para analisar profundamente as modificações na expressão gênica de marcadores transcricionais em linhagens específicas de células da MO humana e que possam apresentar indícios moleculares do desenvolvimento de anemia nestes indivíduos com malária vivax.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

2.1.1. Investigar as alterações celulares e transcricionais provocadas pela infecção por *P. vivax* na medula óssea humana.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Observar evidências de sequestro de formas parasitárias de *P. vivax* na medula óssea humana;

2.2.2. Verificar alterações de expressão gênica na linhagem eritróide da medula óssea de pacientes com anemia associada à malária vivax;

2.2.3. Quantificar a resposta inflamatória à malária vivax na medula óssea.

3. PRODUTOS DA TESE

3.1. Morphological and Transcriptional Changes in Human Bone Marrow During Natural *Plasmodium vivax* Malaria Infections (Journal of Infectious Disease, published 18th June,2020).

DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa177>

Marcelo A. M. Brito^{1,2,a}, Bàrbara Baro^{1,3,a}, Tainá C. Raiol⁴, Alberto Ayllon Hermida³, Izabella P. Safe¹, Katrien Deroost^{1,b}, Erick F. G. Figueiredo^{1,2}, Allyson G. Costa^{1,2}, Maria del P. Armengol⁵, Lauro Sumoy⁵, Anne C. G. Almeida^{1,2}, Bidossessi W. Hounkpe⁶, Erich V. De Paula^{6,7}, Cármen Fernandez-Becerra^{3,5}, Wuelton M. Monteiro^{1,2}, Hernando A. del Portillo^{3,5,8} and Marcus V. G. Lacerda^{1,2,9}.

¹Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil; ²Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil;

³ISGlobal, Hospital Clinic–Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain;

⁴Fiocruz Brasília, Oswaldo Cruz Foundation, Brasília, Brazil;

⁵Institut d'Investigacio en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁶University of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil;

⁷Hematology and Hemotherapy Foundation from Amazonas State, Manaus, Amazonas, Brazil;

⁸Institutio Catalana de Recerca i Estudis Avancats, Barcelona, Spain;

⁹Instituto Leonidas & Maria Deane, Fiocruz, Manaus, Amazonas, Brazil.

Background: The presence of *Plasmodium vivax* malaria parasites in the human bone marrow (BM) is still controversial. However, recent data from a clinical case and experimental infections in splenectomized nonhuman primates unequivocally demonstrated the presence of parasites in this tissue.

Methods: In the current study, we analyzed BM aspirates of 7 patients during the acute attack and 42 days after drug treatment. RNA extracted from CD71+ cell suspensions was used for sequencing and transcriptomic analysis.

Results: We demonstrated the presence of parasites in all patients during acute infections. To provide further insights, we purified CD71+ BM cells and demonstrated dyserythropoiesis and inefficient erythropoiesis in all patients. In addition, RNA sequencing from 3 patients showed that genes related to erythroid maturation were down-regulated during acute infections, whereas immune response genes were up-regulated.

Conclusions: This study thus shows that during *P. vivax* infections, parasites are always present in the BM and that such infections induced dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis. Moreover, infections induce transcriptional changes associated with such altered erythropoietic response, thus highlighting the importance of this hidden niche during natural infections.

Keywords. *Plasmodium vivax*; bone marrow aspirates; natural infections; ineffective erythropoiesis; RNA sequencing.

SIGNIFICANCE STATEMENT

Analysis of bone marrow aspirates from 7 patients with *Plasmodium vivax* malaria revealed parasites and erythropoietic defects in all of them. Global transcription identified genes related to such defects, highlighting the importance of this hidden niche during infections.

Plasmodium vivax is the most widely distributed human malaria parasite and is responsible for 7 million yearly clinical cases, including many causing severe disease or death [1]. Studies of the human bone marrow (BM) during *P. vivax* malaria infections are scarce, even though the presence of parasites in this tissue was first acknowledged in 1894 [2]. Moreover, sternal puncture evaluation as an alternative method for malaria diagnosis revealed parasite enrichment in the BM compared with peripheral blood [3]. Nuclear abnormalities in erythroblasts, a common feature of dyserythropoiesis, were first observed in vivax malaria [4]. In contrast, an electron microscopic study of the human BM during *P. vivax* attacks in anemic children revealed BM dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in the absence of parasites [5]. Unequivocal evidence for the presence of parasites in the BM using molecular markers, as well as observations on BM dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis, however, were recently reported in a clinical case [6]. In addition, experimental *P. vivax* infections in

splenectomized monkeys also revealed that the BM is a niche for parasites during active infections [7].

The mechanisms leading to dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis during malaria are not fully understood, especially for *P. vivax*. However, findings from studies in human patients, animal models, and in vitro studies all seem to support the idea that an inadequate erythropoietic response is due to the presence of parasites or their products during infections as well as host immune responses [8]. Synchronous in vitro differentiation of reticulocytes and erythrocytes from hematopoietic stem cells [9] offered the possibility of studying vivax infections in vitro during erythropoiesis. Using such methods, intact and lysed *P. vivax*-infected cells were shown to suppress erythroid development by promoting cell cycle arrest [10, 11]. Moreover, in vivo studies using *Plasmodium yoelii*, a murine malaria species that shares some biological features with *P. vivax*, showed that infected cells as well as parasite-conditioned media have been shown to induce secretion of tumor necrosis factor (TNF) in mouse macrophages [12], which in turn have been shown to suppress erythropoiesis in vitro through TNF release [13]. Clinical data indicate that erythropoietic defects are associated with the presence of the parasites in the BM, independent of anemic status or levels of circulating erythropoietin [5, 14].

The proinflammatory cytokines TNF and interferon (IFN) γ have also been shown to inhibit erythropoiesis [15, 16] by interfering in the expression of transcriptional factors controlling erythropoiesis and by with the production of erythropoietin [8]. In contrast, interleukin 10, an anti-inflammatory cytokine, has been suggested to protect surrounding cells from erythropoietic defects by regulating the expression of surface and soluble TNF receptor [17]. Of interest, hemozoin (a by-product of hemoglobina digestion produced by malaria parasites) can suppress erythropoiesis in vitro in the absence of TNF, although addition of TNF synergized with hemozoin to inhibit erythropoiesis [18]. This was confirmed in vivo for *Plasmodium falciparum* infections in children [19]. In vitro cultures of erythroblasts exposed to hemozoin have shown changes in cell cycle regulation, as well as down-regulation of Globin Transcription Factor 1 (GATA- 1), a master transcription factor of erythropoiesis [20]. Finally, serum proteome profiles of nonanemic and anemic patients infected with *P. vivax* showed changes in several

physiological pathways, including oxidative stress, cytoskeletal regulation, lipid metabolism, and complement cascades [21].

The data reviewed above clearly indicate that, during malária acute attacks, parasites and products in the BM could affect normal erythropoiesis. Noticeably, most of the data have been studied in *P. falciparum* and have not yet been directly investigated

in *P. vivax*. In the current study, to provide insights into alterations of the human BM during natural infections, we evaluated morphological as well as transcriptional changes in BM aspirates obtained from patients with *P. vivax* malaria during acute attacks and 42 days after drug treatment.

METHODS

Ethical Statements

The protocol was reviewed and approved by the Ethics Review Board of the Fundacao de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (PB_1.065.022/2015), where adult patients presenting with positive diagnoses of vivax malaria (microscopy) were enrolled after providing signed informed consent. All participants were treated according to recommendations for the treatment of uncomplicated *P. vivax* malaria from the Brazilian Ministry of Health, which included chloroquine for 3 days (600 mg/d on day 1, and 450 mg on days 2 and 3), followed by primaquine for 7 days (30 mg/d). BM punctures were performed, with use of appropriate needles, aseptic conditions, and local anesthesia, by an expert physician.

Sample Collection and Hematological Characterization

At days 0 (diagnosis visit) and 42 (convalescence visit), 4 mL of BM aspirates from iliac crest was obtained. Hematological parameters were measured using a Sysmex KX-28N hematology analyzer. The percentage of BM blood in the aspirate (BM purity) was calculated as follows: $[1 - (\text{total nonnucleated cells BM} / \text{total non nucleated cells PB}) \times (\text{total nucleated cells PB} / \text{total nucleated cells BM})]$, where PB represents peripheral blood [22].

CD71 Purification of Aspirates

CD71+ cells were enriched as described elsewhere [6]. After plasma removal, blood cells were washed twice with ice-cold incomplete Roswell Park Memorial Institute (iRPMI) 1640 medium, resuspended at 30% hematocrit and filtered through a 50- μ m cell strainer. Cell suspensions were brought to 50% hematocrit and incubated with CD71 microbeads for 15 minutes at 4°C (Miltenyi Biotech). Magnetic isolation was done with LS (Miltenyi Biotech, USA) columns. Cell suspensions were loaded into a prewet column and allowed to flow. Of the recovered CD71+ pellet, 2 μ L was used for a smear, 2 μ L was used for staining with anti-CD71 and antiglycophorin A (Miltenyi Biotech), to confirm purification, and the rest was resuspended in Trizol reagent and kept at -80°C until RNA extraction. Thin smears containing CD71+ cells were stained with rapid panoptic stain to quantify erythroid cells and leukocyte contaminants with light microscopy.

Quantitative and Qualitative Analysis with Light Microscopy

Panoptic-stained thin smears containing CD71+ cells were used for dyserythropoiesis counts. The erythroid precursors were classified as basophilic, polychromatic, or orthochromatic erythroblasts. A total of 1,000 red cell precursors were counted by 3 different viewers. Reticulocytes were counted in brilliant cresyl blue–stained thin smears.

Parasite Count

Malaria parasitemia was estimated using Giemsa-stained thin blood smears. A total of 10,000 enucleated red blood cells were counted, and the parasitemia was calculated as the percentage of infected red blood cell. Whole BM and whole peripheral blood were used for these counts. *P. vivax* mono-infection on admission and absence of parasites at convalescence were confirmed by means of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) [23].

Total RNA Isolation

CD71+ cells were resuspended in 200 μ L of Trizol reagent and kept at -80°C until RNA extraction. After thawing, the cell suspensions were vigorously homogenized by mixing with 200 μ L of chloroform and incubated at room temperature for 15 minutes. The resultant mix was cold centrifuged (at 4°C and $12,000g$ for 15 minutes). The supernatant was mixed with isopropanol and incubated overnight. Ethanol 75% was used for RNA precipitation, and the resultant pellet was suspended in diethyl pyrocarbonate-treated water and kept at -80°C until RNA sequencing. Aliquots were used for integrity analysis and concentration measurement with the High Sensitivity RNA ScreenTape system (Agilent Technologies). RNA quality control was performed by the translational genomics core facility at El Instituto de Investigacion Germans Trias y Pujol (IGTP).

Messenger RNA Sequencing Library Construction, Sequencing, and Bioinformatic Analysis

CD71+ fractions were used for transcriptomic studies. Material from 3 patients (patients 1, 3, and 15) had enough RNA quality (RNA integrity number >7) in both days 0 and 42, to generate RNA sequencing libraries using the TruSeq stranded Messenger RNA kit (Illumina). Next-generation sequencing library preparation and Illumina sequencing were performed by the Genomics Unit of the Center for Genomic Regulation. Samples showed excellent sequence quality scores (score >30 ; approximately 250 million reads sequenced in a single lane). The quality of raw data was checked using FastQC software, version 0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The reads were mapped to the human genome (Ensembl GRCh38.p10) using Bowtie 2 [24] software, version 2.3.5.1, and Samtools [25] and HTSeq-count [26] software, version 0.11.0 were used to count aligned reads. Clustering and differential expression analysis were performed using the DESeq2 software package, version 1.29. Statistical cutoffs for significant differences in gene expression were set for adjusted P values ($<.05$) and absolute fold change (>1.2). To identify human genes affected by *P. vivax*, we compared the resulting data from samples obtained from 3 patients during acute malaria infection to samples obtained during convalescence from the same 3 patients.

Functional Enrichment Analysis

Gene set enrichment analysis (GSEA) in preranked mode was performed using the GSEA tool [27] and the fast GSEA implementation of the preranked GSEA algorithm implemented in the fgsea package in R software [28]. Analyses were performed using preranked paired sample individual and average log₂ fold change or the signed minus log-adjusted *P* value as the metric. To visualize GSEA results, we used Enrichment Map [29]. Gene ontology terms found to be enriched using the significant differentially expressed genes were visualized with the ClueGO Cytoscape plug-in [30].

Reverse-Transcription qPCR Assays to Validate Gene Expression

A set of genes related to erythropoiesis and with different patterns of expression during infection was selected to confirm expression by means of reverse-transcription qPCR. Five aliquots of messenger RNA from different patients were used to measure transcripts for genes *GATA1*, *ALAS1*, *ALAS2*, *ARID3A*, *NFE*, and *TAL1*, using as calibrator the *GAPDH* gene (*Homo sapiens* constitutively expressed gene). The qPCR assays were performed using triplicates for each sample and repeated twice for quality control. Day 42 samples were used to determine a threshold for transcript expression.

Cytometry Bead Array

Chemokines, anaphylatoxins, and cytokines in the peripheral blood and BM were measured by means of Cytometric Bead Array (BD Biosciences). Human chemokine, anaphylatoxin and T-helper (Th) 1/Th2/Th17 cytokine kits (BD Biosciences) were used, following the manufacturer's guidelines and protocols. A FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) was used for sample acquisition, and FCAP-Array software (version 3; Soft Flow) was used to calculate the levels of each molecule's levels (in picograms per milliliter pg/mL and as the mean fluorescence intensity).

RESULTS

Presence of *P. vivax* parasites in the Human BM During Acute Vivax Malaria

We confirmed *P. vivax* mono-infection for all patients by means of qPCR (Supplementary Table 1). Examination of peripheral blood thin smears during acute infections revealed a wide range of *P. vivax* parasitemia (parasite count, 299–12 792/ μ L) among the 7 patients included in this study. Noticeably, we observed *P. vivax* parasites in BM aspirates from all patients, and quantification of BM parasitemia in Giemsa-stained smears revealed overall similar parasitemia in BM and peripheral blood (Figure 1A). At microscopy, no nucleated cell was seen to be infected by *P. vivax*. We next attempted to characterize *P. vivax* stage distribution in BM aspirates compared with peripheral blood and did not observe any statistically significant difference in parasite stage distribution (Figure 1B).

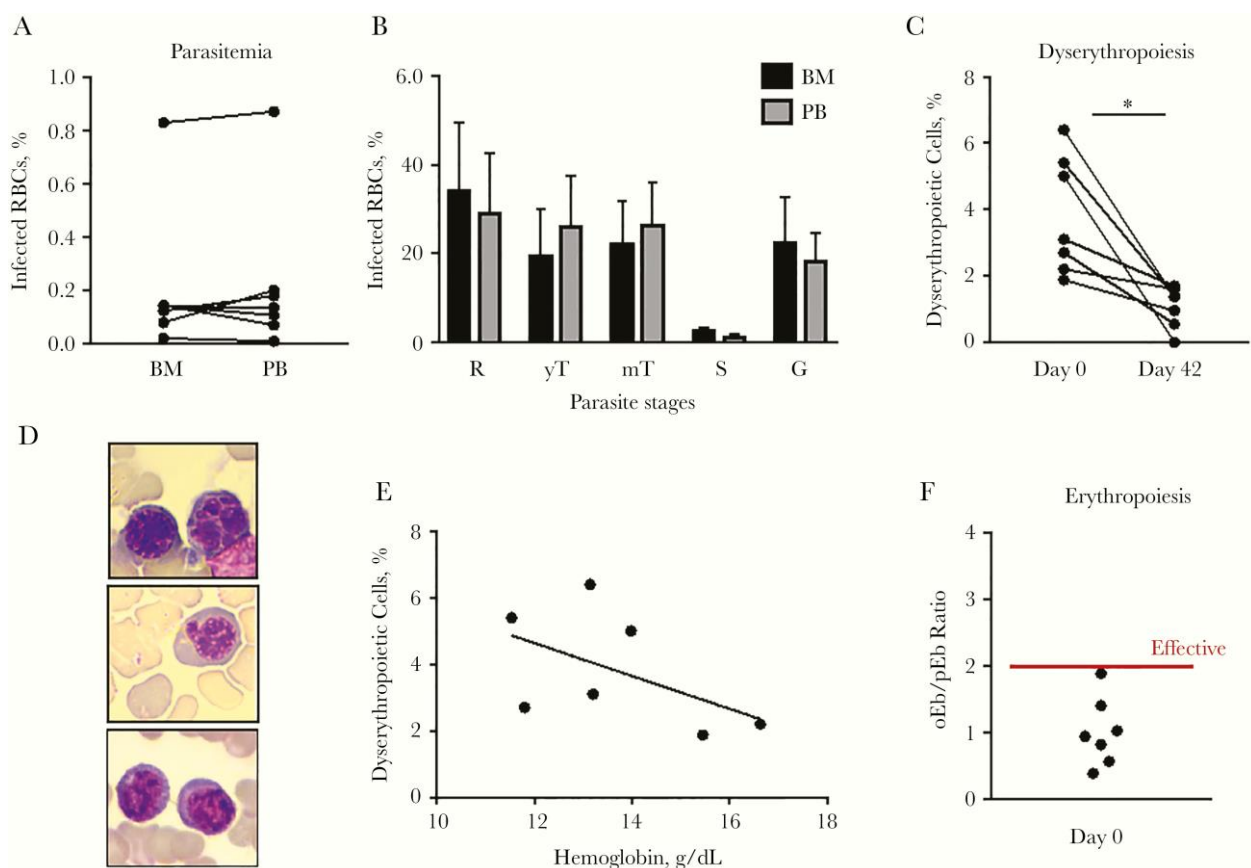


Figure 1. *Plasmodium vivax* parasites in bone marrow (BM), dyserythropoiesis, and inefficient erythropoiesis during active *P. vivax* infections. A, Parasitemia in BM aspirates and peripheral blood (PB) on admission (day 0). Percentage of infected red blood cells (RBCs; $n = 10\,000$ enucleated RBCs); values represent means ($n = 3$). B, Parasite stage distribution in BM and PB on admission ($n = 200$ infected RBCs)

Abbreviations: G, gametocytes; mT, mature trophozoites; R, rings; S, schizonts; yT, young trophozoites. C, Dyserythropoiesis in BM aspirates on admission (day 0) compared with convalescence (day 42), shown as percentage of dyserythropoietic cells ($n = 1000$ erythroid cells); values represent means ($n = 3$). $*P < .05$ (paired Student t test). D, Representative images of dyserythropoietic cells. Rapid panoptic–stained BM CD71+ fraction smears showing erythroblast presenting a dysplastic nucleus (top), erythroblast presenting a budding nucleus (middle), and cytoplasmic bridge between erythroblasts (bottom). E, Comparison of dyserythropoiesis (percentage of dyserythropoietic erythroblasts) and hemoglobin levels on admission. F, Ineffective erythropoiesis in BM aspirates on admission (day 0). Polychromatic and orthochromatic erythroblasts were quantified ($n = 200$ erythroblasts). The ratio of orthochromatic to polychromatic erythroblasts (oEb/pEb ratio) was used as a proxy of inefficient erythropoiesis. Red line indicates effective erythropoiesis (oEb/pEb ratio approximately 2); ratios < 2 indicate a defective maturation of polychromatic into orthochromatic erythroblasts (ineffective erythropoiesis).

Dyserythropoiesis and Ineffective Erythropoiesis as Common Features in

P. vivax–Infected Patients

[Supplementary Table 2](#) summarizes essential hematological and clinical data on admission (day 0) and during convalescence (day 42) for all patients studied. Absence of parasites at day 42 was confirmed by means light microscopy (not shown) and qPCR ([Supplementary Table 1](#)). Five patients presented normal levels of hemoglobin at admission, and 2 were mildly anemic (patients 9 and 13), with a significant change in hemoglobin levels (decrease $>20\%$) during infection, which levels returning to normal by day 42. We used CD71-coated microbeads to purify erythroid cells from each BM aspirate. CD71 enrichment was very efficient, presenting a median yield of 88.7% (interquartile range, 73.4%–95.7%). White blood cell contamination was estimated using light microscopy (median, 2.6%; interquartile range, 1.2%–7.7%). All erythroblast stages were found after purification, and they closely mimicked the original composition of the BM aspirate (not shown). Because proportions of polychromatic and orthochromatic erythroblasts were faithfully maintained on purification, we used the CD71+ fraction to quantify dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis. Interestingly, we observed dyserythropoiesis in all patients recruited, which significantly decreased after recovery from the infection ([Figure 1C](#)). Dyserythropoietic cells included erythroblasts presenting dysplastic or irregularly shaped nuclei, budding or multiple nuclei and cytoplasmic bridge between erythroblasts ([Figure 1D](#)). Nuclear abnormalities were the most common observation and were predominantly seen in polychromatic erythroblasts, as described elsewhere [5]. Dyserythropoiesis in patients

with *P. vivax* malaria has been reported to be most marked with higher levels of anemia, although no statistical correlation was found. Similarly, we also observed a trend toward a higher dyserythropoiesis with lower hemoglobin levels, although it was not statistically significant ($P = .23$) (Figure 1E). Hemoglobin levels and dyserythropoiesis were not related to levels of parasitemia. This is in accordance with the finding that *P. vivax* can cause anemia even at low levels of parasitemia [31].

To assess ineffective erythropoiesis during *P. vivax* acute infection, we quantified the different erythroblast maturation stages in the BM. During healthy (effective) erythropoiesis, the proportions of proerythroblasts and basophilic, polychromatic, and orthochromatic erythroblasts are 1:2:4:8, because there is a cell duplication for each step of maturation [32]. Because orthochromatic and polychromatic erythroblasts are the most abundant cells in the BM, we used the ratio of orthochromatic to polychromatic erythroblasts to quantify ineffective erythropoiesis (Figure 1F). In normal conditions, this ratio is about 2 (effective). The ratio was <2 in all *P. vivax*-infected patients, suggesting that ineffective erythropoiesis is common during active *P. vivax* infection.

Surprisingly, we did not observe any relationship between levels of dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis. On the other hand, ineffective erythropoiesis was not related to parasitemia, as we observed for dyserythropoiesis. According to the stage of development of erythropoietic lineage, 66% of polychromatic and 34% of orthochromatic erythroblasts were dyserythropoietic. Proerythroblasts and basophilic erythroblasts with dyserythropoiesis signals were not found. In conclusion, although dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis were reported in the BM of anemic children [5] and of an anemic adult from a clinical case report [6], we found these phenomena to be a hallmark of all *P. vivax* infections in the BM, as they are also present in nonanemic patients.

Use of CD71 Purification of BM Aspirates in Specific Transcriptomic Studies of Erythropoiesis in Patients

CD71+ fractions were used for transcriptomic studies. Material from 3 patients [1, 5, 13] had enough RNA quality on both days 0 and day 42 to generate RNA libraries.

A pipeline for bioinformatics analysis of the data is shown in [Supplementary Figure 1](#). To identify genes related to clinical conditions, the resulting data from these 3 patients during acute malaria were compared with data from the same patients during convalescence. The overall alignment rate into the reference human genome ranged from 86.71% to 99.15%, with a mean of 26 064 genes mapped, of which 52.5% corresponded to protein coding genes. Differential expression analysis comparing samples from days 0 and 42 revealed a total of 274 genes with significantly different expression (adjusted $P < .05$) during acute vivax malaria compared with convalescence, most of them up-regulated. All data are freely available through the Gene Expression Omnibus NIH database repository (GSE136046). Principal component analysis showed differential clustering of samples from days 0 and 42, indicating a distinct composition and/or expression profile for *P. vivax* active infection compared with convalescence ([Figure 2A](#)). Indeed, heat maps showed differential expression profiles for each patient during active infections and after drug treatment ([Figure 2B](#)). Noticeably, GSEA showed heme synthesis and chromatin silencing terms significantly enriched at day 42 and immune response terms enriched at day 0 ([Figure 2C](#), [Supplementary Figure 2](#), and [Supplementary Table 3](#)).

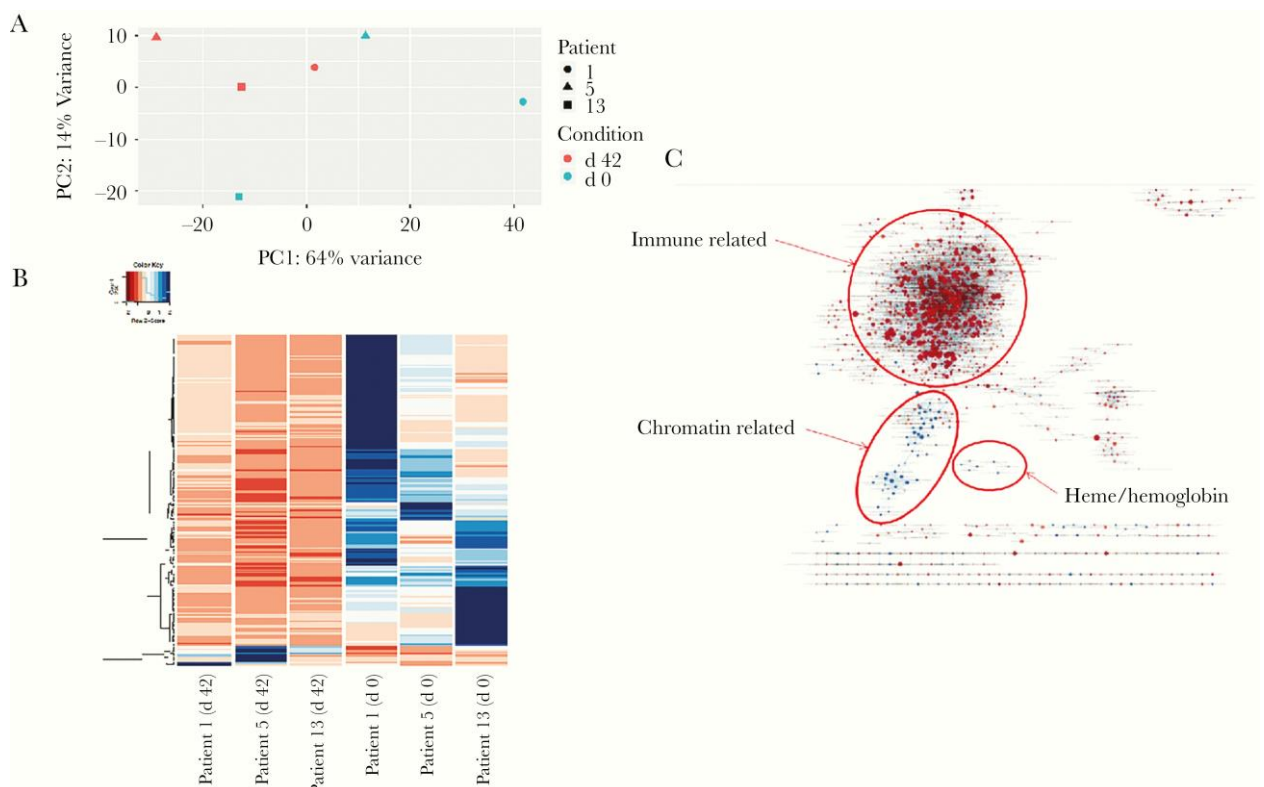


Figure 2. Principal component analysis, heat map, and gene set enrichment analysis (GSEA). *A*, Principal component analysis based on global normalized RNA sequencing gene counts by sample and condition. The day 42 sample group is in red, and the day 0 sample group in blue; patients 1, 5, and 13 are represented with a circle, a triangle, and a square, respectively. Abbreviations: PC1, principal component 1; PC2, principal component 2. *B*, Heat map of gene expression based on normalized mapped read counts of statistically significant (adjusted $P < .05$) differentially expressed genes, considering all samples (columns). *C*, Gene ontology enrichment map showing a network of gene ontology terms (C5 MaSigDB collection) corresponding to gene sets found significant at a false discovery rate of < 0.25 on performing preranked GSEA using the signed minus log-adjusted P value as metric (signed meaning that the direction of change is kept). Red: up-regulated at 0 days, down at 42; blue: down-regulated at 0 day, up at 42.

Gene Expression Validation

We used reverse-transcription qPCR to validate the expression. Of the aforementioned genes on days 0 and 42 for the 3 individual patients. **Figure 3A** shows the down-regulation of genes related to erythropoiesis (*ALAS1*, *ALAS2*, *NFE*, *TAL1*, *ARID3A*, and *GATA1*). **Figure 3B** shows a trend in negative correlation between parasitemia and the expression of such genes.

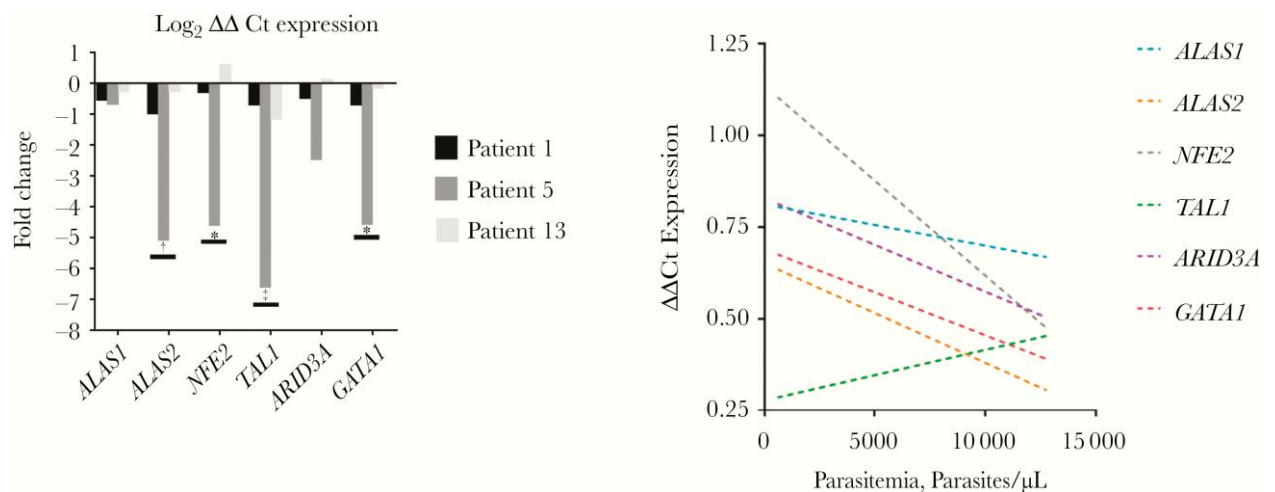


Figure 3. Transcriptional validation and correlation of hemozoin with inefficient erythropoiesis. *A*, Relative expression of erythropoietic genes in patients (patients 1, 5, and 13). Threshold level 0 was determined based on transcriptional levels at day 42. Logarithmic fold change scale is shown on the y-axis. Statistical significance was calculated using 2-way analysis of variance, with differences considered significant at $P \leq .05$. * $P < .05$; † $P < .03$; ‡ $P < .001$. *B*, Correlation between parasitemia and expression levels assessed with quantitative polymerase chain reaction (Delta-Delta Cycle Threshold [$\Delta\Delta Ct$]). For all genes, except *TAL-1*, low expression was correlated with high parasitemia.

expression. B, Clustering of up-regulated inflammatory genes based on gene ontology clustering (ClueGO tool). Only high-expression transcripts with significant differences (adjusted $P < .05$) were used. C, Comparison of cytokine levels between bone marrow (BM) aspirate and peripheral blood (PB), in both visits, measured by means of Cytometric Bead Array ($n = 7$). Absolute values were used for plotting and to calculate mean values for each group. Abbreviations: IL-6, interleukin 6; IL-10, interleukin 10; IL-17A, interleukin 17A; TNF, tumor necrosis factor.

DISCUSSION

In our study, 3 of the 7 patients showed 2–3-fold parasite enrichment in the BM. Thus, although parasitemia in the BM and peripheral blood are often similar, parasite enrichment in the BM can occur, as reported elsewhere [6]. To complicate matters, there is also the possibility that during aspiration, adhered cells were not analyzed. BM biopsies would solve the technical issue, but that is a more invasive and painful procedure. In fact, cases of vivax malaria where parasites have been exclusively found in this tissue have been described [35]. However, similarly to what has been described in a clinical case [6], we observed a trend toward enrichment of rings, schizonts, and gametocytes. However, owing to common low parasitemias hampering reliable differential counting, generating antibodies or identifying molecular markers specific for each parasite stage is required for confident quantification of *P. vivax* stages. No nucleated cell in BM was seen to be infected by *P. vivax*. That has been reported elsewhere in 1 patient with severe anemia [36].

One interesting group of genes that was found significantly to be down-regulated in the BM during active infection, the erythroid maturation genes, including *GATA1*, the major transcription factor driving erythropoiesis [37], as well as *NFE*, *TAL1*, and *ARID3A*, nuclear factors involved in erythroid maturation [38]. In addition, 2 enzymes involved in heme biosynthesis that are induced during erythropoiesis, ALAS-1 and ALAS-2, were also found among this group of down-regulated genes. All genes were indeed down-regulated during infections, with the exception of NFE in patient 13. Interestingly, fold changes >4 were observed for GATA-1, NFE, TAL-1, and ALAS-2 in patient 5, who was nonanemic and the patient presenting the most marked dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis.

Decreased expression of the enzymes ALAS-1 and ALAS-2 could be a result of the ineffective erythropoiesis observed during active infections or could be due to enrichment of polychromatic respect to orthochromatic erythroblasts in these samples. In contrast, GATA-1 has been found to be constantly and similarly expressed during erythroblast differentiation [37, 38]. Thus, different erythroblast composition due to ineffective erythropoiesis is less likely to explain substantial changes in the expression of GATA-1, suggesting that GATA-1 downregulation is directly caused by *P. vivax*, in our sample. However, GATA-1 modulation has also been described for other anemic conditions, such as that caused by 3' -Azido-3' -deoxythymidine and sickle cell anemia [39, 40].

In erythroblast cultures, it has been found that hemozoin induces down-regulation of GATA-1, resulting in erythropoiesis defects [20]. Thus, we explored the relationship between parasitemia in the BM aspirates of these patients and expression levels. GATA-1, NFE, ALAS-1, and ALAS-2 seemed to be more down-regulated in those samples with higher parasitemia, although this correlation was weak (Figure 3B).

Overall, taking into account the results of published in vitro studies and our transcriptomic study, it is legitimate to speculate that *P. vivax* and, likely, hemozoin produced by parasites, induces GATA-1 down-regulation in the erythroid lineage, resulting in ineffective erythropoiesis in the BM. Finally, GATA-1 is also a master regulator of megakaryopoiesis and platelet production, and thrombocytopenia is also present in most active *P. vivax* infections [41]. Another cluster of significantly differentially expressed genes was related to the immune response. These genes were up-regulated during active *P. vivax* infection compared with convalescence (Figure 4A). Functional enrichment and network analyses confirmed such results (Figure 4B). The erythroblastic island, where erythropoiesis occurs, presents a specific immune microenvironment regulating erythroblast differentiation around a central macrophage; CD71⁺ cells are immunomodulatory and are capable of producing cytokines and chemokines [42]. TNF, as well its receptors TNF receptor superfamily 1A, 10A, and 10B, were found up -regulated during active *P. vivax* infection. TNF inhibits erythropoiesis through several proposed mechanisms, including blockage of GATA-1 transcriptional activity. Several genes induced by TNF, as well as IFN- γ , were also

found to be up-regulated during active *P. vivax* infection and are pathways related to erythropoiesis inhibition and apoptosis.

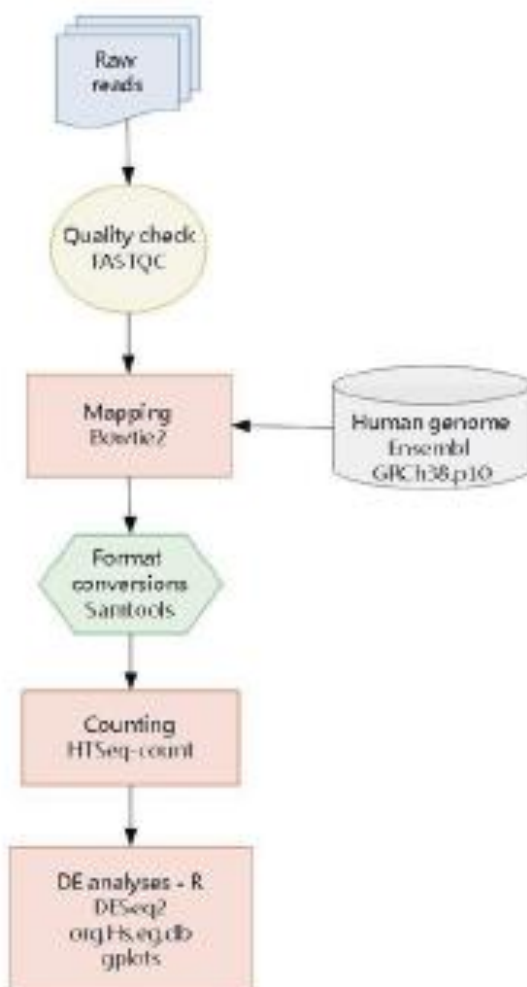
Complement activation could thus lead to phagocytosis of these cells, contributing to ineffective erythropoiesis. Moreover, annexin A2 and A5, which serve as ligands for C1q on apoptotic cells [43], were also found to be up-regulated during infection. Overall, these results suggest that the inflammatory microenvironment regulating erythroblast development could be profoundly disturbed by the inflammatory response to active *P. vivax* infection, leading to apoptosis and phagocytosis of erythroblasts.

In summary, during active vivax malaria infections, parasites are always found in the BM and induce dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis, independent of patients' anemic status. Such defects are related to transcriptional changes affecting immune-related genes as well as erythropoietic-related genes, which were seemingly orchestrated by GATA-1 downregulation. The question thus remains why *P. vivax* has chosen CD71+ reticulocytes, mostly found in the BM, as a host cell while actively inducing erythropoietic defects during infection. Our group has postulated that *P. vivax* infections also induce spleen remodeling facilitating adherence of infected reticulocytes to the spleen [44], and this postulation has received support from 2 clinical cases of spleen rupture [45, 46]. Thus, in addition to the BM, the spleen seems another niche rich in reticulocytes where the parasites can multiply. In fact, formation of hematopoietic niches and extramedullary erythropoiesis in the spleen is prevalent in benign clinical hematological disorders [47], and in other infections innate immune activation initiates extramedullary hematopoiesis [48]. Further investigations on the BM as a new parasite niche, and its link to anemia and splenomegaly are warranted. Studies in asymptomatic population infected with this parasite are also relevant and must be pursued, to elucidate the consequences of chronic infection and what happens in niches such as BM.

Data presented herein should be considered as pioneering but preliminary analysis of erythropoiesis in a few patients with *P. vivax* malaria, in whom BM aspirates were made possible. The major question that still persists is the specificity of such findings to *P. vivax* infection or to a more general inflammatory systemic disease.

Supplementary materials

Figura S1. RNA-seq pipeline for differential gene expression analysis including quality check of RNA-seq libraries and mapping into Homo sapiens genome Ensembl GRCh38p10.



Supplementary Table 1. qPCR analysis of *P. vivax* and *P. falciparum* in bone marrow aspirates at D0 and D42.

Supplementary Table S1.1. Amplification conditions.

Assay	Stage	Step	Temperature	Time
Qmal (<i>18S rRNA gene</i>), <i>P. falciparum</i> specific (<i>18S rRNA gene</i>), <i>P. vivax</i> specific (<i>18S rRNA gene</i>)	Holding	Pre-Incubation	50°C	2 minutes
	Holding	Activation of Taq polymerase	95°C	10 minutes
	Cycling (45x)	Denature	95°C	15 seconds
		Anneal/Extend	58°C	1 minute

Supplementary Table S1.2. Primers and probes used for malaria molecular diagnosis.

Assay	Primers/Probes	PCR Efficiency	Assay detection limit
Qmal (<i>18S rRNA gene</i>)	Fw-TTA GAT TGC TTC CTT CAG TRC CTT ATG	90.6%	1 copy/uL
	Rev-GT TGA GTC AAA TTA AGC CGC AA		
	Probe: FAM – TCA ATT CTT TTA ACT TTC TCG CTT GCG CGA – BHQ1		
<i>P. falciparum</i> -specific (<i>18S rRNA gene</i>)	Fw-TAT TGC TTT TGA GAG GTT TTG TTA CTT TG	90.5%	3 copies/uL
	Rev-TATTCCATGCTGTAGTATTCAAACACAA		
	Probe: FAM – ACG GGT AGT CAT GAT TGA GTT – MGB – NFQ		

ID	Target	Ct	Quantity	Target	Ct	Quantity
P1_D0	VIVAX	24,3	115,386.0	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P1_D42	VIVAX	>45 cycles	Undetermined	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined

Table S1.3. Quantitative results for *P. vivax* and *P. falciparum* infection.

P4_D0	VIVAX	41.7	3,730.9	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P4_D42	VIVAX	>45 cycles	Undetermined	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P5_D0	VIVAX	28.0	3,014.4	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P5_D42	VIVAX	>45 cycles	Undetermined	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P6_D0	VIVAX	27.5	3,798.6	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P6_D42	VIVAX	>45 cycles	Undetermined	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P7_D0	VIVAX	30.67	532.5	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P7_D42	VIVAX	>45 cycles	Undetermined	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P9_D0	VIVAX	27.2	4,491.4	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P9_D42	VIVAX	>45 cycles	Undetermined	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P13_D0	VIVAX	27.8	3,206.6	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined
P13_D42	VIVAX	>45 cycles	Undetermined	FALCIPARUM	>45 cycles	Undetermined

Table S2. Hematological and clinica data from patients at D0 and D42.

ID	Age	Gender	Parasitemia (Pv/uL)	BM aspirate purity (%)	Hemoglobin level (mg/dL)		Reticulocytes count (%)		Leukocytes (cells/mm3)		Platelets (cells/mm3)		HIV	Helminths	Protozoan
					D0	D42	D0	D42	D0	D42	D0	D42			
P1	48	M	12792,2	81	13,98	15,86	0,7	1,3	8300	99000	74000	293000	negative	negative	<i>G. lamblia</i>
P4	23	M	1204	85	13,2	13,83	0,9	0,7	5600	4520	59000	223000	negative	negative	negative
P5	46	M	6688,5	69	16,63	16,29	0,8	1	3900	6780	66000	88000	negative	negative	negative
P6	36	M	6545	83	15,45	15,4	1,2	NA	7770	7000	216000	323000	negative	<i>A. lumbricoides</i>	<i>E. nana</i>
P7	57	F	299	82	13,14	12,4	1,77	1,08	2300	5700	167000	241000	negative	negative	negative
P9	51	M	4425	92	11,8	13,98	1,06	1,8	5900	4800	112000	202000	negative	negative	negative
P13	52	M	603,75	45	11,53	14,2	2,8	2	1150	6430	64000	243000	negative	negative	negative

Table S3. TOP 20 GSEA GO terms enriched at 42 days and at 0 days to the counterpart preranked by normalized enrichment score (NES) ($p_{adj} < 0.05$).

D0					D42				
pathway	pval	padj	ES	NES	pathway	pval	padj	ES	NES
GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA	0,001	0,015	-0,767	-2,601	GO_CHROMATIN_SILENCING	0,008	0,047	0,633	2,81
GO_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA	0,001	0,015	-0,75	-2,574	GO_NUCLEAR_NUCLEOSOME	0,005	0,033	0,754	2,787
GO_CYTOKINE_ACTIVITY	0,001	0,015	-0,758	-2,561	GO_DNA_REPLICATION_DEPENDENT_NUCLEOSOME_ORGANIZATION	0,004	0,03	0,749	2,641
GO_LEUKOCYTE_CHEMOTAXIS	0,001	0,015	-0,77	-2,551	GO_CHROMATIN_SILENCING_AT_RDNA	0,004	0,031	0,72	2,593
GO_INFLAMMATORY_RESPONSE	0,001	0,015	-0,698	-2,551	GO_GAS_TRANSPORT	0,003	0,026	0,835	2,567
GO_INTERFERON_GAMMA_MEDIATED_SIGNALING_PATHWAY	0,001	0,015	-0,775	-2,54	GO_DNA_REPLICATION_INDEPENDENT_NUCLEOSOME_ORGANIZATION	0,006	0,04	0,616	2,557
GO_MYELOID_LEUKOCYTE_MIGRATION	0,001	0,015	-0,756	-2,466	GO_HEMOGLOBIN_COMPLEX	0,003	0,025	0,889	2,506
GO_RESPONSE_TO_TYPE_I_INTERFERON	0,001	0,015	-0,764	-2,464	GO_OXYGEN_TRANSPORT	0,003	0,025	0,88	2,482
GO_CELL_CHEMOTAXIS	0,001	0,015	-0,718	-2,458	GO_CENTROMERE_COMPLEX_ASSEMBLY	0,007	0,04	0,612	2,469
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOKINE_SECRETION	0,001	0,015	-0,739	-2,436	GO_HISTONE_EXCHANGE	0,006	0,04	0,597	2,45
GO_DEFENSE_RESPONSE_TO_BACTERIUM	0,001	0,015	-0,7	-2,426	GO_LYSINE_ACETYLATED_HISTONE_BINDING	0,003	0,026	0,796	2,401
GO_RESPONSE_TO_MOLECULE_OF_BACTERIAL_ORIGIN	0,001	0,015	-0,67	-2,426	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_GENE_EXPRESSION_EPIGENETIC	0,008	0,047	0,523	2,342
GO GRANULOCYTE MIGRATION	0,001	0,015	-0,766	-2,418	GO_ATP_DEPENDENT_CHROMATIN_REMODELING	0,008	0,047	0,529	2,335
GO INNATE IMMUNE RESPONSE	0,001	0,015	-0,652	-2,411	GO_TELOMERE_CAPPING	0,004	0,03	0,658	2,281
GO_RESPONSE_TO_BACTERIUM	0,001	0,015	-0,655	-2,407	GO_NON_RECOMBINATIONAL_REPAIR	0,008	0,047	0,51	2,264
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_INFLAMMATORY_RESPONSE	0,001	0,015	-0,732	-2,401	GO_CONDENSED_NUCLEAR_CHROMOSOME	0,008	0,047	0,505	2,244
GO_MYELOID_LEUKOCYTE_ACTIVATION	0,001	0,015	-0,716	-2,399	GO_CHROMOSOME_CONDENSATION	0,004	0,03	0,636	2,235
GO PEPTIDE ANTIGEN BINDING	0,001	0,015	-0,854	-2,385	GO_NUCLEAR_HETEROCHROMATIN	0,005	0,033	0,594	2,195
GO_REGULATION_OF_CYTOKINE_SECRETION	0,001	0,015	-0,69	-2,368	GO_PEPTIDYL_LYSINE_METHYLATION	0,008	0,046	0,488	2,156
GO_IMMUNE_RESPONSE	0,001	0,015	-0,635	-2,366	GO_HISTONE_H3_K4_METHYLATION	0,004	0,03	0,597	2,145

Acknowledgments.

We thank all patients and healthy donors that participated in these studies. We thank the El Instituto de Investigacion Germans Trias y Pujol (IGTP) Cytometry Unit for fluorescence-activated cell sorting services, IGTP Translational Genomics Unit for RNA quality control services, and IGTP High Content Genomics and Bioinformatics (and Susanna Ausso) for their contribution to RNA sequencing data quality control, differential gene expression, and functional genomic analyses. We thank the Center for Genomic Regulation's Genomics Unit for next-generation sequencing services. ISGlobal and IGTP are members of the CERCA Programme, Generalitat de Catalunya.

Author contributions. Conception and coordination of study: H. A. d. P. and M. V. G. L.

Performance of experiments: M. A. M. B., B. B., A. A. H., K. D., E. F. G. F., A. G. C., A. C. G. A., B. W. H., E. V. D. P., and C. F. B. Data analysis: M. A. M. B., B. B., A. A. H., K. D., M. d. P. A., E. V. D. P., C. F. B., WM, H. A. d. P., and M. V. G. L. Bioinformatic analysis: T. C. R. and L. S. Obtaining of bone marrow aspirates: I. P. S. and M. V. G. L. Drafting of manuscript: M. A. M. B., B. B., K. D., T. C. R., and H. A. d. P. All authors read and approved the content of the manuscript.

Financial support. This work was supported by Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior (grant 71/2013 and Science Without Borders fellowships to M. A. M. B. and K. D.); Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (grant PRONEM 009/2011, ProAM-Estado fellowship to B. B., and funding for M. V. G. L.'s laboratory); the São Paulo Research Foundation (B. W. H. and E. V. D. P.); CNPq (fellowships to W. M. M., E. V. D. P., and M. V. G. L. and funding for M. V. G. L.'s laboratory); the Brazilian Ministry of Health (funding for M. V. G. L.'s laboratory); and the Ministerio Espanol de Economia y Competitividad (grant SAF2016-80655-R to the laboratory of C. F. B. and H. A. d. P.).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. World Health Organization. World malaria report 2018. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2018.
2. Marchiafava E, Bignami A. On Summer-Autumn Malarial Fevers [Translated by J. Harry Thomson], Chap. 7, Vol. CL. London: The New Sydenham Society, 1894; 92–119.
3. Aitken GJ. Sternal puncture in the diagnosis of malaria. *Lancet* 1943; 242:466–8.
4. Knuttgen HJ. Knochenmark befunde dei malaria tertiana. *Z Tropenmed Parasitol.* 1949; 1:178–94.
5. Wickramasinghe SN, Looareesuwan S, Nagachinta B, White NJ. Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. *Br J Haematol* 1989; 72:91–9.
6. Baro B, Deroost K, Raiol T, et al. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11:e0005365.
7. Obaldia N, Meibalan E, Sa JM, et al. Bone marrow is a major parasite reservoir in *Plasmodium vivax* infection. *MBio* 2018; 9:e00625-18.
8. Pathak VA, Ghosh K. Erythropoiesis in malaria infections and factors modifying the erythropoietic response. *Anemia* 2016; 2016:9310905.
9. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23:69–74.
10. Panichakul T, Payuhakrit W, Panburana P, Wongborisuth C, Hongeng S, Udomsangpetch R. Suppression of erythroid development in vitro by *Plasmodium vivax*. *Malar J* 2012; 11:173.
11. Panichakul T, Ponnikorn S, Roytrakul S, et al. *Plasmodium vivax* inhibits erythroid cell growth through altered phosphorylation of the cytoskeletal protein ezrin. *Malar J* 2015; 14:138.
12. Bate CA, Taverne J, Playfair JH. Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology* 1988; 64:227–31.

13. Weiss L, Johnson J, Weidanz W. Mechanisms of splenic control of murine malaria: tissue culture studies of the erythropoietic interplay of spleen, bone marrow, and blood in lethal (strain 17XL) *Plasmodium yoelii* malaria in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41:135–43.
14. Verhoef H, West CE, Kraaijenhagen R, et al. Malarial anemia leads to adequately increased erythropoiesis in asymptomatic Kenyan children. *Blood* 2002; 100:3489–94.
15. Dufour C, Corcione A, Svahn J, et al. TNF-alpha and IFNgamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood* 2003; 102:2053–9.
16. Miller KL, Schooley JC, Smith KL, Kullgren B, Mahlmann LJ, Silverman PH. Inhibition of erythropoiesis by a soluble factor in murine malaria. *Exp Hematol* 1989; 17:379–85.
17. Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, et al. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 1998; 351:1768–72.
18. Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JO, et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood* 2006; 108:2569–77.
19. Aguilar R, Moraleda C, Achtman AH, et al. Severity of anaemia is associated with bone marrow haemozoin in children exposed to *Plasmodium falciparum*. *Br J Haematol* 2014; 164:877–87.
20. Skorokhod OA, Caione L, Marrocco T, et al. Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. *Blood* 2010; 116:4328–37.
21. Ray S, Patel SK, Venkatesh A, et al. Clinicopathological analysis and multipronged quantitative proteomics reveal oxidative stress and cytoskeletal proteins as possible markers for severe vivax malaria. *Sci Rep* 2016; 6:24557.
22. Holdrinet RS, von Egmond J, Wessels JM, Haanen C. A method for quantification of peripheral blood admixture in bone marrow aspirates. *Exp Hematol* 1980; 8:103–7.
23. Melo GC, Monteiro WM, Siqueira AM, et al. Expression levels of *pvcr1-o* and *pvmdr-1* are associated with chloroquine resistance and severe *Plasmodium vivax* malária in patients of the Brazilian Amazon. *PLoS One* 2014; 9:e105922.
24. Langmead CJ, McClung CR, Donald BR. A maximum entropy algorithm for rhythmic analysis of genome-wide expression patterns. *Proc IEEE Comput Soc Bioinform Conf* 2002; 1:237–45.

25. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; 25:2078–9.
26. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015; 31:166–9.
27. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:15545–50.
28. Sergushichev AA, Loboda AA, Jha AK, et al. GAM: a webservice for integrated transcriptional and metabolic network analysis. *Nucleic Acids Res* 2016; 44:W194–200.
29. Merico D, Isserlin R, Stueker O, Emili A, Bader GD. Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PLoS One* 2010; 5:e13984.
30. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 2009; 25:1091–3.
31. Castro-Gomes T, Mourao LC, Melo GC, Monteiro WM, Lacerda MV, Braga EM. Potential immune mechanisms associated with anemia in *Plasmodium vivax* malaria: a puzzling question. *Infect Immun* 2014; 82:3990–4000.
32. Hu J, Liu J, Xue F, et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood* 2013; 121:3246–53.
33. Fernandes AA, Carvalho LJ, Zanini GM, et al. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:650–8.
34. Hojo-Souza NS, Pereira DB, de Souza FS, et al. On the cytokine/ chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. *Malar J* 2017; 16:42.
35. Lacerda MVG de, Hipolito JR, Passos LN da M. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41:522–3.
36. Ru YX, Mao BY, Zhang FK, et al. Invasion of erythroblasts by *Plasmodium vivax*: A new mechanism contributing to malarial anemia. *Ultrastruct Pathol* 2009; 33:236–42.

37. Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, et al. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood* 2004; 104:3136–47.
38. Kerenyi MA, Orkin SH. Networking erythropoiesis. *J Exp Med* 2010; 207:2537–41.
39. Spiga MG, Weidner DA, Trentesaux C, LeBoeuf RD, Sommadossi JP. Inhibition of β -globin gene expression by 3'-azido-3'-deoxythymidine in human erythroid progenitor cells. *Antiviral Res* 1999; 44:167–77.
40. Bacon ER, Dalyot N, Filon D, Schreiber L, Rachmilewitz EA, Oppenheim A. Hemoglobin switching in humans is accompanied by changes in the ratio of the transcription factors, GATA-1 and SP1. *Mol Med* 1995; 1:297–305.
41. Lacerda MVG, Mourao MPG, Coelho HC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2011; 106:52–63.
42. Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 2008; 112:470–8.
43. Martin M, Leffler J, Blom AM. Annexin A2 and A5 serve as new ligands for C1q on apoptotic cells. *J Biol Chem* 2012; 287:33733–44.
44. Fernandez-Becerra C, Yamamoto MM, Vencio RZ, Lacerda M, Rosanas-Urgell A, del Portillo HA. *Plasmodium vivax* and the importance of the subtelomeric multigene vir superfamily. *Trends Parasitol* 2009; 25:44–51.
45. Elizalde-Torrent A, Val F, Azevedo ICC, et al. Sudden spleen rupture in a *Plasmodium vivax*-infected patient undergoing malaria treatment. *Malar J* 2018; 17:79.
46. Machado Siqueira A, Lopes Magalhaes BM, Cardoso Melo G, et al. Spleen rupture in a case of untreated *Plasmodium vivax* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1934.
47. Miwa Y, Hayashi T, Suzuki S, et al. Up-regulated expression. of CXCL12 in human spleens with extramedullary haematopoiesis. *Pathology* 2013; 45:408–16.
48. Jackson A, Nanton MR, O'Donnell H, Akue AD, McSorley SJ. Innate immune activation during *Salmonella* infection initiates extramedullary erythropoiesis and splenomegaly. *J Immunol* 2010; 185:6198–204.

3.2. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile

DOI: 10.1371/journal.pntd.0005365

Barbara Baro^{1a}, Katrien Deroost^{1b}, Taina Raiol², Marcelo Brito^{1,3}, Anne C. G. Almeida^{1,3}, Armando de Menezes-Neto^{4c}, Erick F. G. Figueiredo¹, Aline Alencar^{1,3}, Rodrigo Leitão⁵, Fernando Val^{1,2}, Wuelton Monteiro^{1,2}, Anna Oliveira⁶, Maria del Pilar Armengol⁶, Carmen Fernandez-Becerra^{4,6}, Marcus V. Lacerda^{1,2*}, Hernando A. del Portillo^{4,6,7*}

¹Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil,

²Fundação Oswaldo Cruz - Instituto LeoÁnidas e Maria Deane (FIOCRUZ-Amazonas), Manaus, Amazonas, Brazil;

³Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brazil;

⁴ISGlobal, Barcelona Ctr. Int. Health Res. (CRESIB), Hospital Clinic - Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain;

⁵Fundação Hospitalar de Hematologia e Hematoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Amazonas, Brazil;

⁶Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain,

⁷ICREA, Barcelona, Spain.

INTRODUCTION

Plasmodium vivax is the most widely distributed human malaria parasite and responsible for large amounts of disease and burden [1]. The presence of *P. vivax* in the bone marrow was first noticed in the late 19th century [2], and examinations of sternal bone marrow aspirates were performed as an accessory to examinations of peripheral blood in malaria, including *P. vivax* [3]. Since then, little progress has been made in studying *P. vivax* infections in this tissue. One report explored accumulation of dyserythropoietic cells in anaemic infected patients [4]. In addition, two case studies reported *P. vivax* infections after autologous bone marrow transplantation [5][6], and a third one documented an accidental *P. vivax* infection due to bone marrow transplantation between a malaria-infected donor and a malaria-free receptor [7]. In Brazil, one patient with persistent thrombocytopenia and an enlarged spleen was

diagnosed with chronic *P. vivax* malaria after the finding of schizonts in the bone marrow aspirate [8]. In all these reports and case studies, however, parasite loads and life stages found in the bone marrow were not investigated, and no molecular tools were available to rule out mixed infections or to characterize specific parasite stages.

Description of case

To gain insight into *P. vivax* infections in the bone marrow, we performed a morphological and molecular study of bone marrow aspirates taken from a 46-year-old man who was diagnosed with *P. vivax* (13,280 parasites/ μ L) at the tertiary hospital of Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil. Bone marrow aspirate (4 mL) and peripheral blood (15 mL) were collected before treatment was administered following the national guidelines (1,500 mg of chloroquine over 3 days, 30 mg of primaquine per day for 7 days). At convalescence, 42 days after treatment, bone marrow aspirate and peripheral blood samples were obtained for comparison from this same individual. Parasitaemia at day 42 was negative on microscopy and quantitative polymerase chain reaction. Relevant haematological and biochemical parameters are described in [S1 Table](#).

Ethics statement

This patient was enrolled in a larger study designed to understand determinants of anaemia in acute *P. vivax* infection. The study was approved by the Institutional Reviewing Board of the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil and the National Committee of Ethics in Science and Technology (CONEP Process No.: 25.001.011.792/2009-15). The patient was fully informed on the aims of the study and signed an informed consent agreement after understanding the risks of the procedure. The patient also consented to his case being published.

Presence of *P. vivax* parasites in the bone marrow during active infection

To avoid confounding, we first excluded coinfection with *P. falciparum* by standard qPCR of 18S rDNA [9]. Next, we determined parasitaemia in peripheral blood and bone marrow by counting 15,000 enucleated red blood cells (RBCs) (i.e., reticulocytes and erythrocytes) in Giemsa-stained thin blood smears. The enucleated RBC content was similar between bone marrow ($4.08 \times 10^6/\mu\text{L}$) and peripheral blood ($4.6 \times 10^6/\mu\text{L}$) samples as determined by hemocytometry, and no invasion was observed in nucleated erythroid precursor cells. Three different people independently counted 5,000 RBCs each. Parasitaemia was $<1\%$ and similar in bone marrow and peripheral blood (Fig 1A); yet, clear differences in parasite stage distribution in each compartment were observed.

To investigate the proportion of the different stages in more detail, stage differentiation was performed by counting 800 infected RBCs. Rings ($p < 0.0001$) and gametocytes ($p < 0.01$) were significantly more abundant in the bone marrow aspirate as compared to peripheral blood (given these compartments had similar parasitaemia), whereas young trophozoites were predominantly present in peripheral blood ($p < 0.0001$) (Fig 1B). Representative images of these stages in the bone marrow and peripheral blood are shown in Fig 1C. It is worth mentioning that multiple-infected cells containing up to five parasites were also observed in peripheral blood and bone marrow (S1A and S1B Fig). The enrichment of ring stages in the bone marrow aspirate is in agreement with studies of reticulocyte-prone malaria parasites, including *P. vivax*, demonstrating preferential invasion of parasites in reticulocytes expressing high levels of Cluster of Differentiation that are mostly found in the bone marrow [10][11].

As gametocytes of *P. vivax* can be morphologically confused as schizonts, the gametocyte fraction in each compartment was further quantified by RT-qPCR using primers amplifying the gametocyte specific transcript *pvs25* [12]. To normalize for parasite content, *pvs25* transcript levels were quantified relative to the levels of the housekeeping gene coding for aldolase, expressed similarly throughout all asexual blood stages [13]. Bone marrow quantification was expressed as fold change function of peripheral blood quantification. As shown in Fig 1D, *pvs25* D0 transcripts were enriched in bone marrow as compared to peripheral blood, showing higher accumulation of transmission stages in this milieu. *Pvs25* RT-qPCR quantification on

D42 was not reliable (Ct values >35, unspecific amplification) and thus was considered negative.

In *P. falciparum*, early studies have shown enrichment of immature gametocytes in the bone marrow of infected children [14], and this observation has been confirmed by molecular tools [15][16]. Of interest, gametocytes' immature forms were enriched in the bone marrow, whereas the mature gametocyte's stage V was commonly found in peripheral blood. The results from our studies show that *P. vivax* gametocyte stage-infected cells are also enriched in the bone marrow as compared to peripheral blood during the acute infection of this patient.

Presently, however, there are no reliable morphological or molecular markers to distinguish between maturation stages of *P. vivax* gametocytes. Regardless, it is largely assumed that *P. vivax* gametocytes in the peripheral blood parallel the beginning of malaria-associated symptoms, leading to an evolutionary benefit of this species regarding early vector transmission before treatment.

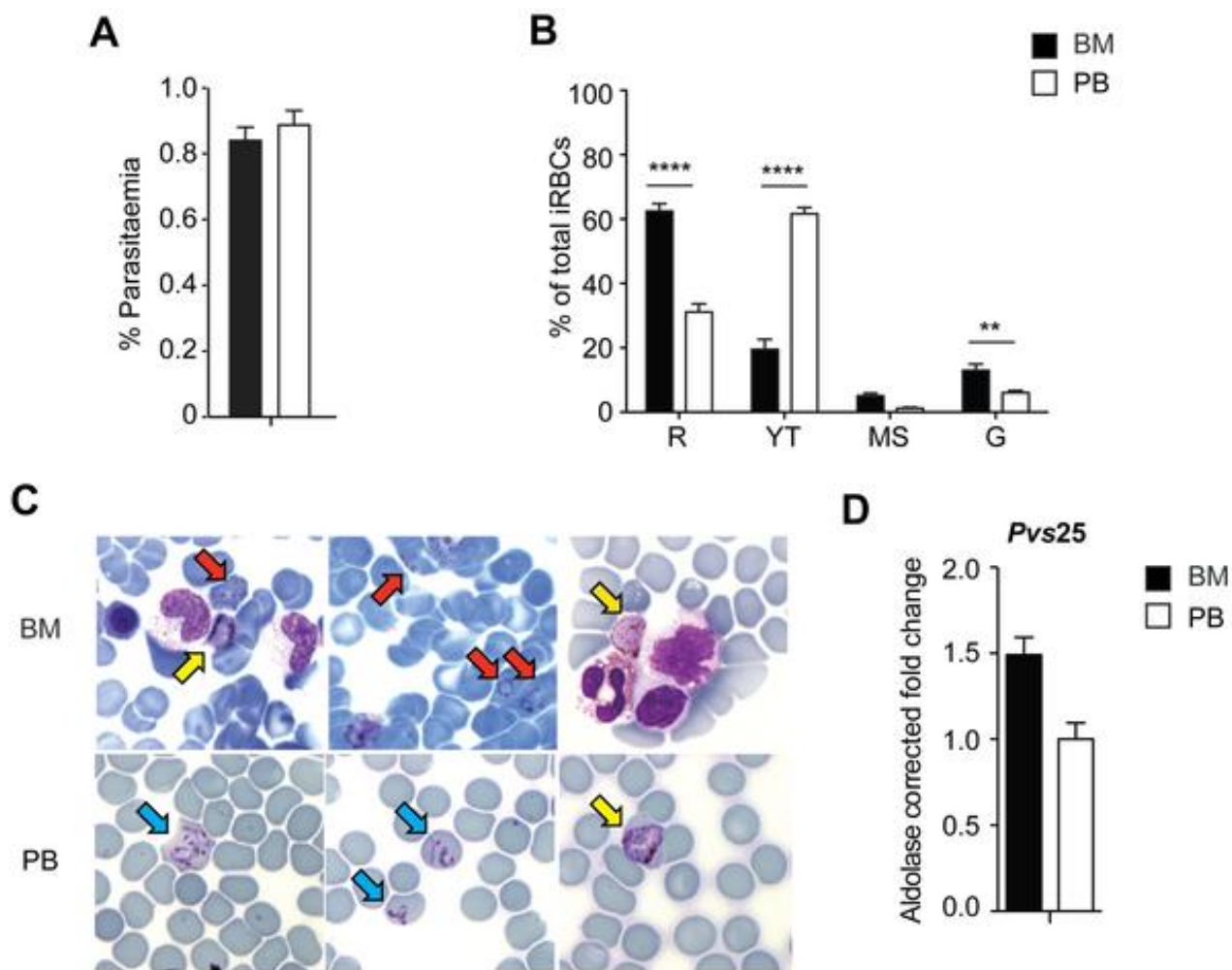


Fig 1. Comparison of *P. vivax* load and life stages in bone marrow aspirate and peripheral blood on admission. **A.** Parasitaemia in bone marrow aspirate and peripheral blood at the day of admission. **B.** Parasite stage distribution in bone marrow and peripheral blood. $n = 800$ iRBCs. R = rings, YT = young trophozoites, MS = mature trophozoites and schizonts, G = gametocytes. **C.** Representative Giemsa-stained images of *P. vivax* in the bone marrow (BM, upper row) illustrating rings (red arrows) and gametocytes (yellow arrows) and in peripheral blood (PB, lower row) illustrating young trophozoites (blue arrows) and gametocytes (yellow arrow). Arrows indicate infected cells. **D.** Relative RT-qPCR quantification of *pvs25* transcripts in bone marrow and peripheral blood samples obtained at admission. *pvs25* transcript levels were normalized by amplifying aldolase; bone marrow quantification was expressed as fold change function of peripheral blood quantification. Calculated bone marrow aspirate purity was 80%. $BM \text{ purity} = [1 - (\text{erythrocyte-BM}/\text{erythrocytes-PB}) \times (\text{leukocytes-PB}/\text{leukocytes-BM})] \times 100$. Statistical tests were performed with GraphPad Prism software. Paired t-tests were used to compare differences between two groups, whereas two-way ANOVA with Sidak test for correction for multiple comparisons was used in case of more than two groups. Data in graphs are shown as mean \pm standard error of the mean. $p < 0.05$ was regarded as statistically different. **: $p < 0.01$ and ****: $p < 0.0001$.

Considering this rationale, it was not generally assumed that *P. vivax* gametocytes could accumulate in the bone marrow. Our data thus suggest that the

bone marrow could also be a reservoir for gametocytes during *P. vivax* infections. Whether it can be a niche for gametocyte production and/or maturation and whether gametocytes can actually sequester in the bone marrow will be very interesting to investigate in future experiments.

Erythrocyte precursors changes during the active infection

Morphological analysis of bone marrow aspirates from human patients presenting anaemia has shown that infection with *P. vivax* induces dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis [4]. Before drug treatment, an increase in dyserythropietic cells (5%) was observed by microscopic examination of the bone marrow aspirate during infection. Cell changes included the presence of erythroblasts with binucleated or budding nuclei and cytoplasmic bridges between erythroblasts (S1D Fig). Furthermore, erythroblast differentiation stages were counted to examine whether inefficient erythropoiesis was present (n = 1,000 erythroblasts). Proerythroblasts, basophilic erythroblasts, polychromatic erythroblasts, and orthochromatic erythroblasts were 7.1%, 14.8%, 38.5%, and 39.6%, respectively, and did not follow the expected 1:2:4:8 ratio, indicating a problem at the level of polychromatic and orthochromatic erythroblasts. These results thus suggest inefficient erythropoiesis during an active infection, as has been reported previously for *P. vivax* [4]. Noticeably, the haemoglobin (Hb) level of this patient at the day of admission was 13.98 g/dL as opposed to 15.86 g/dL at convalescence 42 days later. Of note, after drug treatment, Hb levels dropped to 12.04 g/dL.

Thus, even though this patient was not clinically anaemic at the time of recruitment, it is clear that during infection he had a drop of his normal Hb level, potentially explaining the dyserythropoiesis we observed.

Infection in the bone marrow is associated with transcriptional changes

Increasing evidence on the role of micro (mi)RNAs in controlling erythropoiesis is now available [17][18]. In order to address whether bone marrow transcriptional changes related to erythropoiesis during infection were present in this patient, the

expression. profiles of small RNAs during the acute attack and at convalescence were determined. To avoid confounding we first purified erythroid precursor cells from the bone marrow aspirates through affinity chromatography with magnetic CD71-labelled beads. We obtained a cell suspension containing more than 90% erythroid cells, including all erythrocyte precursors from proerythroblasts to reticulocytes, as observed by flow cytometry analysis and microscopy. Mature erythroblasts and reticulocytes were the most abundant cell populations ([Fig 2A and 2B](#)). Following purification, RNA was extracted and small RNAs were sequenced using the MiSeq platform. The complete bioinformatics pipeline and tools for analyses are shown in [S2 Fig](#).

In summary, out of the 2,191,943 clipped reads from day 0 and 2,988,148 clipped reads from day 42, 721,739 (32.93%) and 1,090,129 (36.48%) could be uniquely mapped to the human reference genome, respectively. Relative gene expression was calculated by dividing the read count for each gene, considering all non-coding (nc)RNA genes with at least three reads mapped within their location, by the raw read count ratio of D0 to D42 libraries. Interestingly, a very distinct profile of small RNAs was observed under infection compared to convalescence: miRNAs and miscellaneous (misc)RNAs were induced during infection, while small nuclear (sn)RNAs and small nucleolar (sno)RNAs were halted ([Fig 2C](#)). Analysis of miRNAs related to erythropoiesis revealed a distinct series of differentially expressed miRNAs during *P. vivax* infection in this patient ([Fig 2D](#)). Mir-221/222, mir-24, and mir-191, which are normally downregulated during erythroid maturation, were decreased during *P. vivax* infection

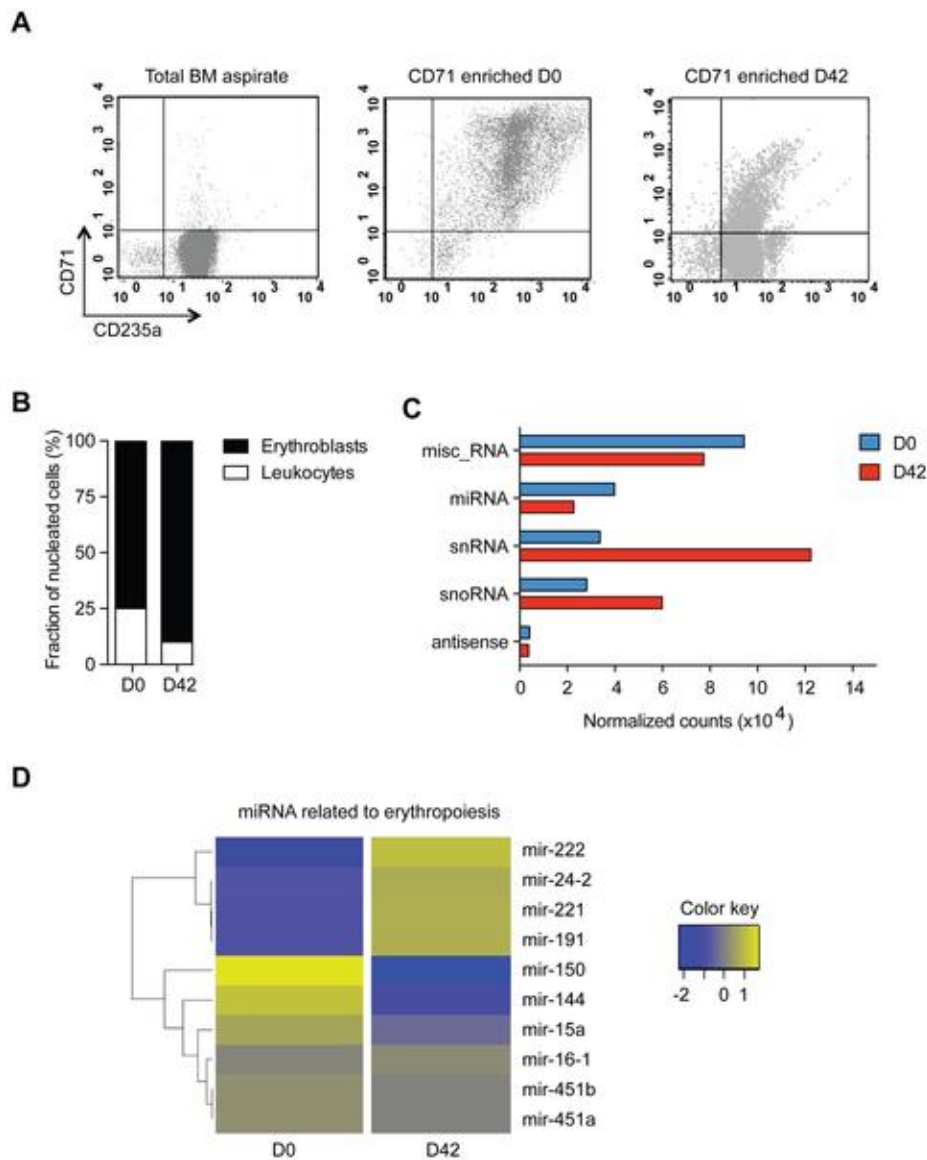


Fig 2. Small RNA profile of bone marrow CD71+ erythroid precursor cells on admission and at convalescence. **A.** Flow cytometry plots demonstrating the enrichment of erythroid cells as stained with CD235a/Glycophorin A-FITC and CD71-PE showing the initial bone marrow sample at D0 and the CD71+ enriched fraction after purification of CD71-coated beads for D0 and D42 samples. **B.** Fraction of leukocyte contamination in the CD71-enriched fraction for D0 and D42 as determined by counting $n = 500$ nucleated cells compared to convalescence.

In contrast, mir-144, which is upregulated during erythropoiesis, was found to be increased. Mir-150, which drives megakaryocyte formation while inhibiting erythropoiesis, was found to be increased as well during infection. Hence, our results indicate an altered miRNA profile regarding bone marrow erythropoiesis during the acute *P. vivax* infection in this patient.

Conclusion

Human studies of *P. vivax* in the bone marrow are scarce, even though its presence in this tissue was first noticed more than a century ago. Here, we describe a morphological and molecular study of bone marrow aspirates from a *P. vivax* patient with an unusually high parasitemia.

Samples were taken on the day of admission, before drug treatment (13,280 parasites/ μ L), and 42 days after drug treatment, after clearance of parasitemia. On admission, parasitemia was similar in peripheral blood and bone marrow; yet, ring- and schizont-infected cells, as well as gametocytes, were significantly more abundant in the bone marrow. Morphological analysis revealed signs of inefficient erythropoiesis and dyserythropoiesis. In addition, transcriptional analysis of RNA extracted from marrow CD71+ cells revealed significant changes in miRNA and small RNA profiles on admission and convalescence. All together, these data show the presence of *P. vivax* in the marrow of this patient, providing the first quantification of parasite stages found in this tissue and demonstrating that its presence influences transcriptional changes of miRNAs involved in erythropoiesis.

Key learning points

- *Plasmodium vivax* parasites can be found in the bone marrow during an active infection.
- As with *P. falciparum*, the bone marrow could be a niche for gametocyte production and maturation and/or a reservoir in *P. vivax* infections.
- Molecular tools for specific quantification of different gametocyte stages are needed to address whether gametocyte-immature forms of *P. vivax* are enriched in the bone marrow similar to *P. falciparum*.
- The presence of *P. vivax* in the bone marrow of this patient was associated with transcriptional changes of miRNAs involved in erythropoiesis.

Supporting information

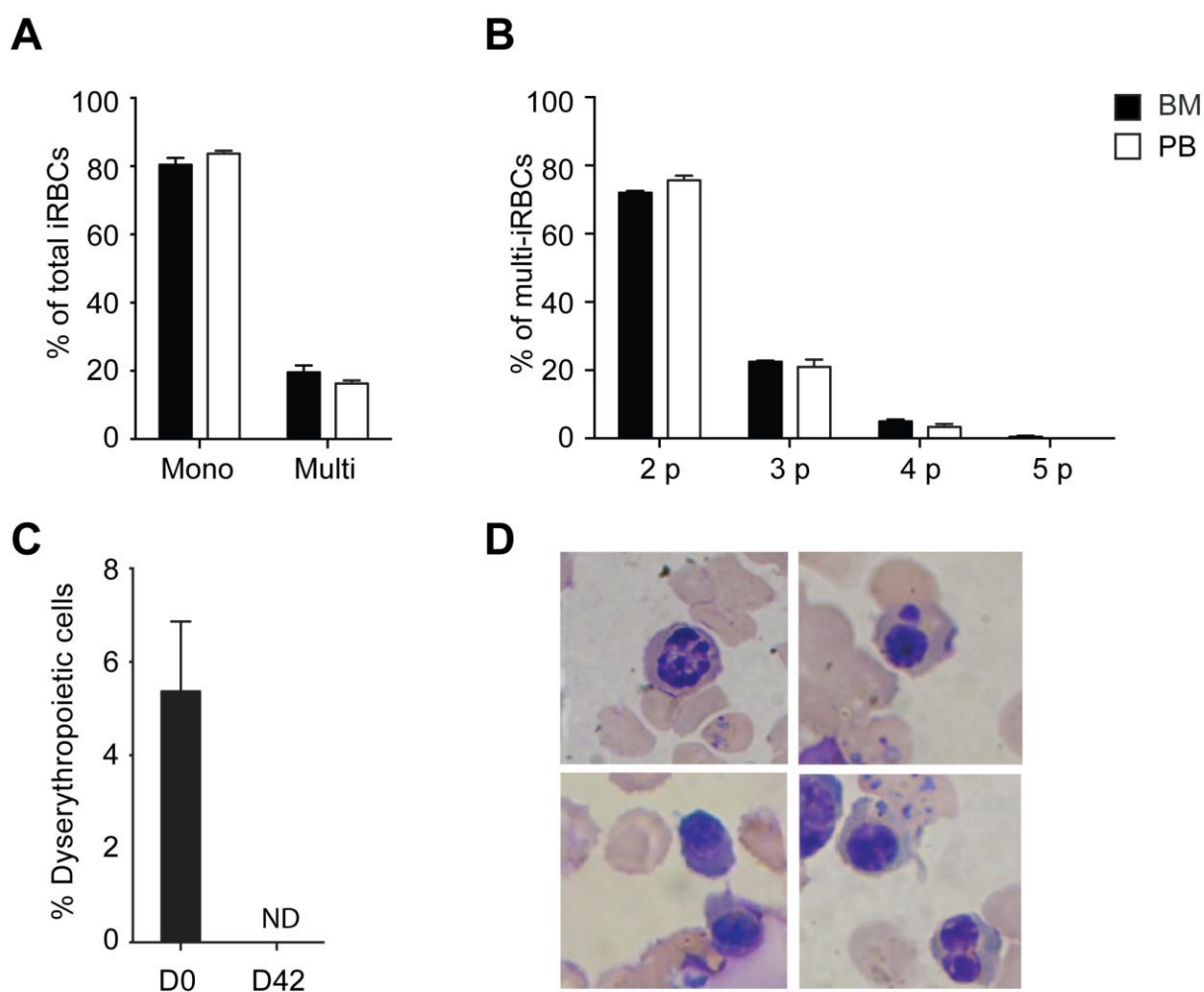
Supplementary Table S1. Haematological and biochemical parameters from peripheral blood on admission and at convalescence.

Table S1. Hematological and biochemical parameters from peripheral blood on admission and convalescence.

Parameter	D0	D42
Hematocrit (%)	41,32	46,87
Hemoglobin (g/dL)	13,98	15,86
Leukocytes (/mm ³)	8300	9900
Platelets (/mm ³)	74000	293000
Reticulocytes (%)	0,7	1,3
Creatinine (mg/dl)	1,3	0,9
Bilirubin (mg/dl)	1,67	0,5
LDH (IU/L)	975	340
Alkaline phosphatase (IU/L)	553	222
TGO (IU/L)	65	60
TGP (IU/L)	42	38
Urea (mg/dl)	55	20
C-reactive protein (mg/L)	<6,5	<6,5
HIV	Negative	Negative

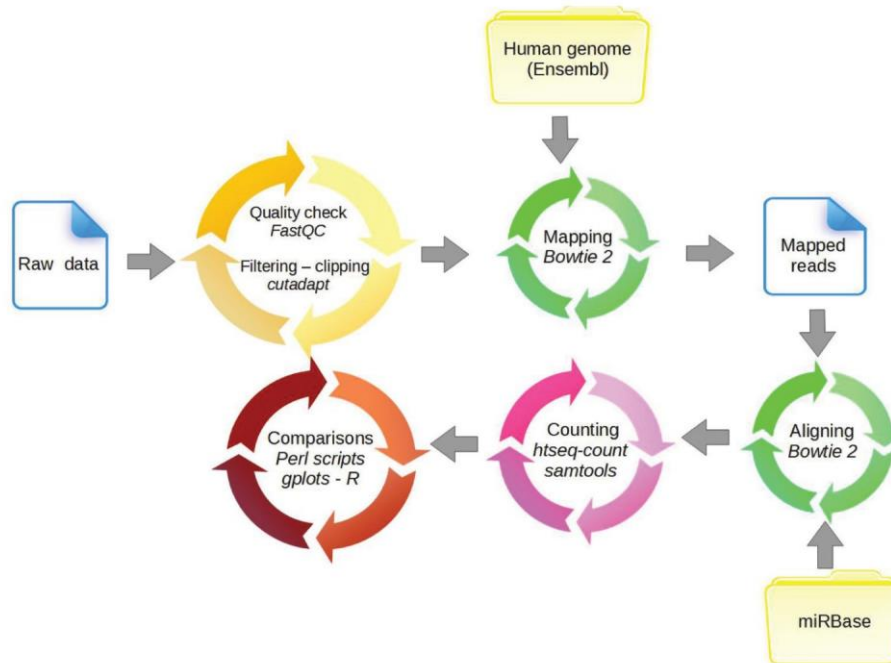
S1 Fig. Multiple ring-infected cells and signs of dyserythropoiesis. A. Percentages of single vs multiple ring-infected cells in the bone marrow and peripheral blood. **B.** Numbers of rings in individual infected cells in bone marrow and peripheral

blood. Only infected cells containing multiple ring stages were used for confident counting ($n = 500$ iRBCs), although multiinvasion was observed in all parasite stages. **C.** Percentage of dyserythropoietic cells found in bone marrow aspirates on admission and at convalescence. $n = 200$ erythroblasts. ND = not detected. **D.** Representative images of dysplastic nuclei (upper left), a cytoplasmic bridge between erythroblasts (lower left), and erythroblasts presenting binucleated or budding nuclei (upper and lower right) (Giemsa-stained slides).



S2 Fig. Bioinformatics pipeline and analyses tools. Read quality control was accessed by FastQC, and adaptor removal was performed using Cutadapt v1.4.2. Reads of length between 15 and 75 nucleotides were mapped to the human reference

genome GRCh37.75 downloaded from the Ensembl database. HTSeq-count v0.6.0 was used to count and compare aligned reads to annotated human genes. Mapped reads were aligned to the precursor and mature datasets from MirBase v21.0 using Bowtie 2 v2.2.4. Samtools v0.1.18 and in-house Perl scripts were used to count aligned reads and to normalize gene expressions by library size.



References

1. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL et al. (2009) Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* 9: 555±566. [https:// doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X) PMID: 19695492
2. Marchiafava E, Bignami A. (1894) On summer-autumnal fever. The New Sydenham Society, London.
3. Aitken GJ. (1943) Sternal picture in the diagnosis of malaria. *Lancet* 2: 466±468.
4. Wickramasinghe SN, Looareesuwan S, Nagachinta B, White NJ. (1989) Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. *Br J Haematol* 72: 91±99. PMID: 2660903
5. Raina V, Sharma A, Gujral S, Kumar R. (1998) *Plasmodium vivax* causing pancytopenia after allogeneic blood stem cell transplantation in CML. *Bone Marrow Transplant* 22: 205±206. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701299> PMID: 9707032

6. Salutarì P, Sica S, Chiusolo P, Micciulli G, Plaisant P, Nacci A, et al. (1996) Plasmodium vivax malaria after autologous bone marrow transplantation: an unusual complication. Bone Marrow Transplant 18: 805±806. PMID: [8899200](#)
7. O'Donnell J, Goldman JM, Wagner K, Ehinger G, Martin N, Leahy M, et al. (1998) Donor-derived Plasmodium vivax infection following volunteer unrelated bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 21: 313±314. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701073> PMID: [9489659](#)
8. Lacerda MV, Hipolito JR, Passos LN. (2008) Chronic Plasmodium vivax infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. Rev Soc Bras Med Trop 41: 522±523. PMID: [19009202](#)
9. Snounou G. (2002) Genotyping of Plasmodium spp. Nested PCR. Methods Mol Med 72: 103±116. <https://doi.org/10.1385/1-59259-271-6:103> PMID: [12125106](#)
10. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KS, Suwanarusk R, Claser C, et al. (2015) Plasmodium vivax: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. Blood 125: 1314±1324. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-596015> PMID: [25414440](#)
11. Martin-Jaular L, Elizalde-Torrent A, Thomson-Luque R, Ferrer M, Segovia JC, Herreros-Aviles E, et al. (2013) Reticulocyte-prone malaria parasites predominantly invade CD71hi immature cells: implications for the development of an in vitro culture for Plasmodium vivax. Malar J 12: 434. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-434> PMID: [24289105](#)
12. Beurskens M, Mens P, Schallig H, Syafruddin D, Asih PB, Hermsen R, et al. (2009) Quantitative determination of Plasmodium vivax gametocytes by real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification in clinical samples. Am J Trop Med Hyg 81: 366±369. PMID: [19635900](#)
13. Pava Z, Handayuni I, Wirjanata G, To S, Trianty L, et al. (2015) Expression of Plasmodium vivax crt-o is related to parasite stage but not ex vivo chloroquine susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 60:361±367. <https://doi.org/10.1128/AAC.02207-15> PMID: [26525783](#)
14. Abdulsalam AH, Sabeeh N, Bain BJ. (2010) Immature Plasmodium falciparum gametocytes in bone marrow. Br J Haematol 85: 943.
15. Aguilar R, Magallon-Tejada A, Achtman AH, Moraleta C, Joice R, Cistero P, et al. (2014) Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. Blood 123: 959±966. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-520767> PMID: [24335496](#)
16. Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, Dankwa S, Egan E, Morahan B, et al. (2014) Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. Sci Transl Med 6: 244re245.

17. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. (2011) From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* 118: 6258±6268. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-356006> PMID: 21998215

18. Lawrie CH. (2010) microRNA expression in erythropoiesis and erythroid disorders. *Br J Haematol* 150: 144±151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07978.x> PMID: 19912217

3.3. Produto de tese 3: Bone Marrow Investigation in Infectious Diseases: Practicalities and Ethical Aspects.

Draft

Marcelo Brito^{1,2}, Djane Clarys Baia-da-Silva^{1,2}, Kim Machado^{1,2}, , Erich de Paula^{3,4},
Nelson Fraiji³, Wuelton Monteiro^{1,2}, Marcus Lacerda^{1,2,4,5}

1. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil
2. Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil
3. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil
4. Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brazil
5. Instituto Leônidas & Maria Deane, Fiocruz, Manaus, Brazil

Corresponding author:
Marcus Vinícius Guimarães Lacerda MD, PhD
E-mail: marcuslacerda.br@gmail.com
Phone/fax: + 55 92 99114 7633

Bone marrow is the human organ responsible for the production and maturing of all the lines of the blood cells, a biological process known as hematopoiesis. The maturing of these cells from pluripotent cells is a highly controlled process and occurs internally in the medullar microenvironment. Imbalances in hematopoiesis can have serious consequences for human health, as happens in medullar neoplasia. In some infectious parasitic diseases, such as visceral leishmaniasis and malaria, the pathological effect and the inflammatory effect triggered in this organ, despite being known, are poorly explored.

The importance of understanding the infectious parasitic diseases pathological mechanisms that result from medullar alterations is clear, however, scientific studies focused on this are very often blocked or made difficult through the belief that access to biological medullary samples offer a great risk to research subjects, though, many other more invasive procedures are not even discussed as much as the medullary assessment, despite the relatively low risk of complications in this approach.

Biopsies are generally complex and invasive procedures that require careful risk-benefit analysis. When it comes to the research field, risks are usually less acceptable. The biopsy of the liver, for instance, continues to be the gold standard for evaluating liver fibrosis, although principally owing to potential complications, including death (15, 16). In the same way, a common perception among doctors is that there is a significant

death rate associated to the biopsy of the spleen related to hemorrhage, and also pneumothorax or pleural effusion (17, 18). Distinctly, biopsy sampling and bone marrow aspiration, are invasive procedures not commonly associated to serious complications. Pain and hemorrhage are rare occurrences when the procedure is carefully carried out by a specially trained physician and under ideal biosecurity conditions in a well-structured health center.

For research purposes, the choice for location medullary biopsy with the smallest number of complications resulting from the procedure always prevails. The preferred collection site for aspiration and medullary biopsy is the posterior portion of the iliac crest. The procedures are differentiated by the removal of a bone fragment, approximately 2 cm², during the biopsy and by the type of needle used. Sternal bone can also be used as a collection site under strict circumstances, such as in patients who have undergone recent radiotherapy in the pelvic region. However, it requires more medical expertise due the risk of cardiac tamponade. Tibia can be used for collection in children. In children, tibia can be used for collection more securely.

Despite invasive, these methods of has low morbidity and mortality. In a survey conducted in 60 UK hospitals that performed a spinal cord diagnosis described the occurrence of 4 adverse events in a total of 19,332 procedures (1). The same authors described 22 adverse events from a total of 39,264 procedures performed in different hospitals. Hemorrhage, needle-related incidents and infections was the most frequent adverse event. In cases six individuals with bleeding, blood transfusion was required, and one patient died after transfusion. The adverse event risk has no association with the degree of professional experience who performed the puncture. Another study

involving 137 individuals who underwent 423 puncture procedures showed that the procedure is safe, although 38% of the punctures had complications, although most of them were considered mild and no need interventions (2).

Although the greatest demand for procedures is for the diagnosis and follow-up of myelodysplasias and myeloproliferative syndromes, the collection of spinal biological samples is relevant for monitoring and understanding the infectious diseases pathological. Viral and parasitic diseases modify the normal functioning of the bone marrow, causing mainly dyshematopoiesis, reflected in hematological alterations.

In human immunodeficiency virus (HIV) infections, for example, the hematological abnormalities are among the main complications and virus invasion in mesenchymal progenitor cells is implicated as the main cause of these pathogenic manifestations. The presence of dysgranulopoiesis and dyserythropoiesis with relative progression with the increase of viral load was showed. In the hepatitis-associated aplastic anemia, pancytopenia, it takes around two months to manifest itself after acute hepatitis and has a lethality of 85% if not diagnosed early (6). The collection of aspirate/spinal biopsy is not necessary for the diagnosis due to the drastic fall of the cellular counts in the peripheral blood, however the mechanism of interaction between virus and bone marrow is unknown.

In visceral leishmaniasis the analysis of spinal aspirate and biopsy is interesting for clinical research. The internalization of *Leishmania* spp. by macrophages in the bone marrow trigger inflammatory reaction that can lead to complications such as tissue necrosis, fibrosis, granulomatosis and increased vascularity. The bone marrow is

hypercellular and the findings are closely linked to parasitemia (11-13). The dyserythropoiesis during a vivax malaria episode and also differences in the expression of micro RNAs in marrow progenitor cells may be directly related to the development of anemia (9). In addition, bone marrow is important for maturation and sequestration of gametocytes, parasitic forms responsible for the continuity of transmission, in the core content, which hampers strategies for the control and elimination of this tropical endemic (10). Other pathogens such as *Babesia* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* and *Loa loa* have also been identified parasitizing the spinal cord tissue and require further investigation for association with clinical findings (5, 14).

To investigate mechanisms of pathogenesis processes has major relevance for the elucidation of the spinal cord tissue damage by parasites and to explain how the pathogens interact with the bone marrow and how this is reflected in the periphery and in the disease manifestation (3). These aspects are little explored and known, mainly due to the ethical aspects involved in the collection of bone marrow.

For scientific demand, the collection of spinal biological needs consent. This process is able to guide the research participant about the study's objectives and any other aspects of the project, including, but not limited to, potential risks and expected benefits, expected number of queries / returns and the specific procedures for collecting the necessary biological materials. The Informed Consent Form formalizes this agreement and, prior to the collection of the medullary material, the professional who will perform the procedure must guarantee comfort to the participant, through correct execution of the technique, use of appropriate materials, analgesia, sedation and other measures is needed.

Thus, given the free and clarified concentration and the low risk related to bone marrow collection, studies are required to elucidate the mechanisms of various diseases, providing subsidies for relevant advances in scientific knowledge and in potential forms of intervention in the progression of the disease, or even in the discovery of diagnostic markers that can have a positive impact on the control or elimination of health problems.

REFERENCES

1. Bain BJ. Bone marrow biopsy morbidity and mortality. *British journal of haematology*. 2003;121(6):949-51.
2. Burkle CM, Harrison BA, Koenig LF, Decker PA, Warner DO, Gastineau DA. Morbidity and mortality of deep sedation in outpatient bone marrow biopsy. *American journal of hematology*. 2004;77(3):250-6.
3. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC, International Council for Standardization In H. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *International journal of laboratory hematology*. 2008;30(5):349-64.
4. Dhurve SA, Dhurve AS. Bone Marrow Abnormalities in HIV Disease. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2013;5(1):e2013033.
5. Perng GC. Role of Bone Marrow in Pathogenesis of Viral Infections. *Journal of bone marrow research*. 2012;1.
6. Rauff B, Idrees M, Shah SA, Butt S, Butt AM, Ali L, et al. Hepatitis associated aplastic anemia: a review. *Virology journal*. 2011;8:87.

7. Lamikanra AA, Theron M, Kooij TW, Roberts DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PloS one*. 2009;4(12):e8446.
8. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology*. 2000;13(2):277-99.
9. Baro B, Deroost K, Raiol T, Brito M, Almeida AC, de Menezes-Neto A, et al. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(4):e0005365.
10. Aguilar R, Magallon-Tejada A, Achtman AH, Moraleda C, Joice R, Cistero P, et al. Molecular evidence for the localization of *Plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow. *Blood*. 2014;123(7):959-66.
11. Daneshbod Y, Dehghani SJ, Daneshbod K. Bone marrow aspiration findings in kala-azar. *Acta cytologica*. 2010;54(1):12-24.
12. Daneshbod Y, Dehghani SJ, Nikzad M, Daneshbod K. Visceral leishmaniasis in a case of acute lymphoblastic leukemia at both remission and relapse, diagnosed by bone marrow aspiration. *Acta cytologica*. 2010;54(5):743-6.
13. Hellal M, Kundu S. Visceral leishmaniasis involving the bone marrow. *Blood*. 2013;122(5):627.
14. Miller CE, Bain BJ. The Utility of Blood and Bone Marrow Films and Trepine Biopsy Sections in the Diagnosis of Parasitic Infections. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2015;7(1):e2015039.
15. Thampanitchawong P, Piratvisuth T. Liver biopsy: complications and risk factors. *World Journal of Gastroenterology*. 1999;5(4):301-304. doi:10.3748/wjg.v5.i4.301.

16. [Biswas S](#), [Gogna A](#), [Patel P](#). A Fatal Case of Intra-Abdominal Hemorrhage Following Diagnostic Blind Percutaneous Liver Biopsy in a Patient With Peliosis Hepatis. *Gastroenterology Res*. 2017 Oct; 10(5): 318–321.
17. Couto I, Victoria M, Veloso VG, Rodrigues L, Grinsztejn B, et al. (2017) Prevalence and predictors for compensated Advanced Chronic Liver Disease (c-ACLD) in patients with chronic Hepatitis Delta Virus (HDV) infection. PLOS ONE 12(3): e0174453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174453>
18. Wang H-W, Peng C-Y, Lai H-C, et al. New noninvasive index for predicting liver fibrosis in Asian patients with chronic viral hepatitis. *Scientific Reports*. 2017;7:3259. doi:10.1038/s41598-017-03589-w.
19. Patel N, Dawe G, Tung K. Ultrasound-guided percutaneous splenic biopsy using an 18-G core biopsy needle: our experience with 52 cases. *The British Journal of Radiology*. 2015;88(1055):20150400. doi:10.1259/bjr.20150400.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Inicialmente, foi estimada para este estudo a inclusão de 14 participantes, sendo estes divididos em 2 grupos: anêmicos (homens com Hb<13 mg/dL; mulheres com Hb<12 mg/dL) e não-anêmicos. Dada a baixa frequência da anemia grave, não foi possível a divisão dos grupos e os indivíduos foram analisados individualmente quanto ao seu grau de anemia. Contudo, à análise de transcriptoma e as análises de bioinformática escolhidas para a apresentação dos resultados não levaram em consideração o estado anêmico. Ainda assim, mostramos fortes evidências de diseritropoiese e de mecanismos preditores de anemia.

Outra limitação importante foi a não inclusão de crianças na coorte. Inicialmente, a inclusão de indivíduos com idade entre 5 e 14 anos foi cogitada e enviada ao Comitê de Ética em Pesquisa institucional para avaliação, no entanto, a prática foi descontinuada por decisão da equipe de pesquisa, dada a necessidade do uso de sedativos inalatórios em alguns casos, desbalanceamento do risco-benefício da pesquisa; e da necessidade de amostra de medula óssea com quantidade precisa e de qualidade, o que em crianças seria difícil.

Fragmento de osso ilíaco não foi obtido, não possibilitando a análise histológica da medula óssea. Embora esta análise trouxesse benefícios quanto a melhor caracterização do comportamento do parasito no nicho medular, não é a amostra ideal para extração de RNA de alta qualidade para análise do transcriptoma.

Em alguns casos, a porcentagem de pureza de amostras medulares do dia de acompanhamento (D42) foi diferente da encontrada na amostra de diagnóstico (D0), o que pode levar à falsa impressão de incomparabilidade. Contudo, o grau de pureza da amostra medular foi considerado como fator de correção para a determinação quando se comparou parasitemia medular com parasitemia periférica. O grau de diseritropoiese e a contagem de reticulócitos foram realizadas em amostras pós-purificação com microbeads CD71. A pureza da amostra purificada variou de 88 a 95%, quando levadas em consideração todas as amostras, nos diferentes tempos de coleta. Ressalta-se que todos os cuidados foram tomados durante o procedimento de coleta para otimização do material colhido.

O estudo trouxe evidências de mecanismos moleculares potencialmente associados ao desenvolvimento de anemia em paciente com malária *vivax*. Poucos estudos prévios mostraram alterações de vias metabólicas eritropoiéticas *in vivo* em humanos, nenhum quando se consideram apenas estudos realizados aspirado de medula óssea humana infectada. As alterações moleculares evidenciadas, destacando as diretamente relacionadas à eritropoiese, abrem horizonte para a pesquisa de marcadores séricos preditores de anemia.

O estudo gerou um banco de dados contendo análise diferencial de mais de 20,000 do genoma humano mapeados. Para os produtos de pesquisa, foi dada ênfase para os transcritos pertencentes ao cânone genético ligado à eritropoiese e imunológico, no entanto, faz-se necessária a busca aprofundada por mecanismos acessórios pouco explorados e que podem também influenciar no desenvolvimento da linhagem eritropoiética, como por exemplo os mecanismos de coagulação e senescência.

5. CONCLUSÃO

- a) Adicionamos à literatura novas evidências de eventos que ocorrem na medula óssea em pacientes com malária vivax que associados à patogênese de anemia;
- b) Não foi encontrada diferença significativa nos níveis parasitários na medula e sangue periférico ou evidência de tropismo de alguma forma evolutiva do parasita pelo tecido medular. Houve maior tendência de acúmulo de esquizontes e gametócitos na medula óssea, contudo não é claro se há predileção por este nicho para a maturação.
- c) Houve diseritropoiese durante infecção aguda e desaceleração da liberação de reticulócitos para a periferia sanguínea e normalização destes eventos na convalescença (D42);
- d) Foram observadas leituras mais baixas de transcritos chave para o desenvolvimento da linhagem eritróide relacionados à fase final de desenvolvimento. Menores níveis destes transcritos foram associados ao aumento de parasitemia periférica;
- e) Há prejuízo de eritropoiese humana durante malária vivax aguda, sinalizado por alterações celulares (quantitativas e qualitativas) e confirmado em nível transcricional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO Malaria report 2019. Malaria report 2019. 2019.
2. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Heal*. 2017;
3. Sampaio VS, Siqueira AM, Alecrim M das GC, Mourão MPG, Marchesini PB, Albuquerque BC, et al. Malaria in the state of Amazonas: A typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;
4. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: An overview. *Malaria Journal*. 2010.
5. Lover AA, Kevin Baird J, Gosling R, Price RN. Malaria elimination: Time to target all species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018.
6. Siqueira AM, Mesones-Lapouble O, Marchesini P, Sampaio VDS, Brasil P, Tauil PL, et al. *Plasmodium vivax* landscape in Brazil: Scenario and challenges. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;
7. Santana MS, de Lacerda MVG, Barbosa MDGV, Duarte Alecrim W, Costa Alecrim MDG. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in an endemic area for malaria in Manaus: A cross-sectional survey in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2009;
8. de Pina-Costa A, Brasil P, di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF e. S, et al. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;
9. Almeida ACG, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*. 2018;
10. Gupta BK, Gupta A, Nehra HR, Balotia HR, Meena SL, Kumar S. Clinical Profile and Prognostic Indicators in Adults Hospitalized with Severe Malaria Caused by Different *Plasmodium* Species. *Infect Dis (Auckl)*. 2015;8:45–50.
11. Tatura SNN, Wowor EC, Mandei JM, Wilar R, Warouw SM, Rompis J, et al. Case Report: Severe *Plasmodium vivax* Malaria Mimicking Sepsis in a Neonate. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Mar;98(3):656–9.
12. Naing C, Whittaker MA. Severe thrombocytopaenia in patients with vivax malaria compared to falciparum malaria: A systematic review and meta-analysis. Vol. 7, *Infectious Diseases of Poverty*. BioMed Central Ltd.; 2018.
13. Picot S, Bienvenu A-L. [*Plasmodium vivax* infection: not so benign]. *Med Sci (Paris)* [Internet]. [cited 2020 Jun 3];25(6–7):622–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602360>
14. Totino PRR, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz M de F. Evidencing the Role of Erythrocytic Apoptosis in Malarial Anemia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:176.
15. Douglas NM, Pontororing GJ, Lampah DA, Yeo TW, Kenangalem E, Poespoprodjo JR, et al. Mortality attributable to *Plasmodium vivax* malaria: a clinical audit from Papua, Indonesia. *BMC Med*. 2014 Nov;12:217.
16. Langford S, Douglas NM, Lampah DA, Simpson JA, Kenangalem E, Sugiarto P,

- et al. Plasmodium malariae Infection Associated with a High Burden of Anemia: A Hospital-Based Surveillance Study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Dec;9(12):e0004195.
17. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Europe PMC Funders Group Vivax malaria : neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;
 18. Ross A, Koepfli C, Schoepflin S, Timinao L, Siba P, Smith T, et al. The Incidence and Differential Seasonal Patterns of Plasmodium vivax Primary Infections and Relapses in a Cohort of Children in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 May 4;10(5).
 19. Kenangalem E, Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Simpson JA, Tjitra E, et al. Plasmodium vivax infection: a major determinant of severe anaemia in infancy. *Malar J*. 2016 Jun;15:321.
 20. McQueen PG, McKenzie FE. Age-structured red blood cell susceptibility and the dynamics of malaria infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;
 21. Adams JH, Mueller I. The biology of plasmodium vivax. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;
 22. Moore KA, Simpson JA, Wiladphaingern J, Min AM, Pimanpanarak M, Paw MK, et al. Influence of the number and timing of malaria episodes during pregnancy on prematurity and small-for-gestational-age in an area of low transmission. *BMC Med*. 2017 Jun 21;15(1).
 23. Bôtto-Menezes C, Dos Santos MCS, Simplício JL, De Medeiros JM, Gomes KCB, De Carvalho Costa IC, et al. Plasmodium vivax malaria in pregnant women in the Brazilian Amazon and the risk factors associated with prematurity and low birth weight: A descriptive study. *PLoS One*. 2015 Dec 1;10(12).
 24. Dombrowski JG, de Souza RM, Silva NRM, Barateiro A, Epiphanyo S, Gonçalves LA, et al. Malaria during pregnancy and newborn outcome in an unstable transmission area in Brazil: A population-based record linkage study. *PLoS One*. 2018 Jun 1;13(6).
 25. Bardají A, Martínez-Espinosa FE, Arévalo-Herrera M, Padilla N, Kochar S, Ome-Kaius M, et al. Burden and impact of Plasmodium vivax in pregnancy: A multi-centre prospective observational study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jun 12;11(6).
 26. Burdam FH, Hakimi M, Thio F, Kenangalem E, Indrawanti R, Noviyanti R, et al. Asymptomatic vivax and falciparum parasitaemia with helminth co-infection: Major risk factors for anaemia in early life. *PLoS One*. 2016 Aug 1;11(8).
 27. Melo GC, Reyes-Lecca RC, Vitor-Silva S, Monteiro WM, Martins M, Benzecry SG, et al. Concurrent helminthic infection protects schoolchildren with Plasmodium vivax from anemia. *PLoS One*. 2010;5(6).
 28. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related anaemia. *Parasitology Today*. 2000.
 29. Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl:52–63.
 30. Martínez-Salazar EL, Tobón-Castaño A. Platelet profile is associated with clinical complications in patients with vivax and falciparum malaria in Colombia. *Rev Soc Bras Med Trop [Internet]*. 2014 [cited 2020 May 31];47(3):341–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075486>
 31. Dennis LH, Eichelberger JW, Inman MM, Conrad ME. Depletion of coagulation factors in drug-resistant Plasmodium falciparum malaria. *Blood*. 1967;
 32. Marques HO, Alexandre MAA, Oliveira VM, Marreira L, Lacerda MVG, Alecrim MGC, Morelli VM LD 2005. Hemostatic changes in patients with malaria. In: XX

- Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Sydney, Australia; 2005. p. 1452.
33. Naveira JB, Lopes PF. [Bone marrow examination in malaria]. *Rev Bras Med.* 1971 May;28(5):195–6.
 34. Beale PJ, Cormack JD, Oldrey TB. Thrombocytopenia in malaria with immunoglobulin (IgM) changes. *Br Med J.* 1972 Feb;1(5796):345–9.
 35. Fajardo LF. Malarial Parasites Within Human Platelets. *JAMA J Am Med Assoc.* 1974;
 36. MVG L. Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. Universidade de Brasília; 2007.
 37. Maina RN, Walsh D, Gaddy C, Hongo G, Waitumbi J, Otieno L, et al. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malar J.* 2010;
 38. Kelton JG, Keystone J, Moore J, Denomme G, Tozman E, Glynn M, et al. Immune-mediated thrombocytopenia of malaria. *J Clin Invest.* 1983;
 39. Val F, Machado K, Barbosa L, Salinas JL, Siqueira AM, Alecrim MGC, et al. Respiratory complications of *plasmodium vivax* malaria: Systematic review and meta-analysis. Vol. 97, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2017. p. 733–43.
 40. Valecha N, Pinto RGW, Turner GDH, Kumar A, Rodrigues S, Dubhashi NG, et al. Case report: Histopathology of fatal respiratory distress caused by *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Nov;81(5):758–62.
 41. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of *Plasmodium Vivax* Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? - PubMed [Internet]. [cited 2020 Jun 5]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22772803/?from_term=vivax+autopsy&from_sort=date&from_pos=7
 42. Markus MB. New Evidence for Hypnozoite-Independent *Plasmodium vivax* Malarial Recurrences. *Trends Parasitol.* 2018 Dec;34(12):1015–6.
 43. Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1982;
 44. Corradetti A. Relapses and delayed primary attacks in malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1982.
 45. Bray RS, Garnham PCC. The Life-Cycle of Primate Malaria Parasites. *Br Med Bull.* 1982;
 46. Manson PT. Experimental malaria: Recurrence after nine months. *Br Med J.* 1901;
 47. Yorke W. Further observations on malaria made during treatment of general paralysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1926;
 48. Boyd MF, Kitchen SF. Renewed Clinical Activity in Naturally Induced *Vivax* Malaria *. *Am J Trop Med Hyg.* 1944;
 49. Battle KE, Karhunen MS, Bhatt S, Gething PW, Howes RE, Golding N, et al. Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malar J.* 2014;
 50. Whorton CM, Yount E, Jones R, Craige B, Alving AS, Pullman TN, et al. The Chesson Strain of *Plasmodium Vivax* Malaria: III. Clinical Aspects. *J Infect Dis.* 1947;
 51. Commons RJ, Simpson JA, Thriemer K, Chu CS, Douglas NM, Abreha T, et al. The haematological consequences of *Plasmodium vivax* malaria after chloroquine treatment with and without primaquine: a WorldWide Antimalarial

- Resistance Network systematic review and individual patient data meta-analysis. Margarete S M Gomes [Internet]. [cited 2020 Jun 12];18:24. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1386-6>
52. Robinson LJ, Wampfler R, Betuela I, Karl S, White MT, Li Wai Suen CSN, et al. 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;
 53. White MT, Karl S, Koepfli C, Longley RJ, Hofmann NE, Wampfler R, et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: Re-infections, recrudescences and relapses. *Malar J.* 2018 Apr 17;17(1).
 54. Koepfli C, Mueller I. *Malaria Epidemiology at the Clone Level.* Vol. 33, *Trends in Parasitology.* Elsevier Ltd; 2017. p. 974–85.
 55. Taylor AR, Watson JA, Chu CS, Puaprasert K, Duanguppama J, Day NPJ, et al. Resolving the cause of recurrent *Plasmodium vivax* malaria probabilistically. *Nat Commun.* 2019;
 56. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2012 Apr;11:135.
 57. Wickramasinghe SN, Abdalla S, Weatherall DJ. Cell cycle distribution of erythroblasts in *P. falciparum* malaria. *Scand J Haematol.* 1982 Jul;29(1):83–8.
 58. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000 Jun;13(2):277–99.
 59. Aguilar R, Moraleda C, Achtman AH, Mayor A, Quintó L, Cisteró P, et al. Severity of anaemia is associated with bone marrow haemozoin in children exposed to *Plasmodium falciparum*. *Br J Haematol.* 2014 Mar;164(6):877–87.
 60. Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JOP, Williams S, Lowe B, Nyanoti M, et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood.* 2006 Oct;108(8):2569–77.
 61. Awandare GA, Kempaiah P, Ochiel DO, Piazza P, Keller CC, Perkins DJ. Mechanisms of erythropoiesis inhibition by malarial pigment and malaria-induced proinflammatory mediators in an in vitro model. *Am J Hematol.* 2011 Feb;86(2):155–62.
 62. Helleberg M, Goka BQ, Akanmori BD, Obeng-Adjei G, Rodrigues O, Kurtzhals JAL. Bone marrow suppression and severe anaemia associated with persistent *Plasmodium falciparum* infection in African children with microscopically undetectable parasitaemia. *Malar J.* 2005 Dec;4:56.
 63. Abdalla SH, Wickramasinghe SN. A study of erythroid progenitor cells in the bone marrow of Gambian children with *falciparum* malaria. *Clin Lab Haematol.* 1988;10(1):33–40.
 64. Dörmer P, Dietrich M, Kern P, Horstmann RD. Ineffective erythropoiesis in acute human *P. falciparum* malaria. *Blut.* 1983 May;46(5):279–88.
 65. Mayor A, Alano P. Bone marrow reticulocytes: A *Plasmodium vivax* affair? *Blood.* 2015.
 66. Baro B, Deroost K, Raiol T, Brito M, Almeida ACG, de Menezes-Neto A, et al. *Plasmodium vivax* gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Apr;11(4):e0005365.
 67. Aitken GJ. Sternal Puncture in Diagnosis of Malaria. *J Nerv Ment Dis.* 1944;
 68. Rumball CA, Parsons-Smith BG, Nancekievill L. STERNAL PUNCTURE IN THE DIAGNOSIS OF MALARIA. *Lancet.* 1943;

69. Wickramasinghe SN, Looareesuwan S, Nagachinta B, White NJ. Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. *Br J Haematol*. 1989 May;72(1):91–9.
70. Panichakul T, Payuhakrit W, Panburana P, Wongborisuth C, Hongeng S, Udomsangpetch R. Suppression of erythroid development in vitro by *Plasmodium vivax*. *Malar J*. 2012 May;11:173.
71. Panichakul T, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Cui L, Udomsangpetch R. Production of erythropoietic cells in vitro for continuous culture of *Plasmodium vivax*. *Int J Parasitol*. 2007 Dec;37(14):1551–7.
72. Panichakul T, Ponnikorn S, Roytrakul S, Paemane A, Kittisenachai S, Hongeng S, et al. *Plasmodium vivax* inhibits erythroid cell growth through altered phosphorylation of the cytoskeletal protein ezrin. *Malar J*. 2015 Mar;14:138.
73. Bordmann G, Favre N, Rudin W. Malaria toxins: effects on murine spleen and bone marrow cell proliferation and cytokine production in vitro. *Parasitology*. 1997 Nov;115 (Pt 5):475–83.
74. Yap GS, Stevenson MM. *Plasmodium chabaudi* AS: erythropoietic responses during infection in resistant and susceptible mice. *Exp Parasitol*. 1992 Nov;75(3):340–52.
75. Silverman PH, Schooley JC, Mahlmann LJ. Murine malaria decreases hemopoietic stem cells. *Blood*. 1987 Feb;69(2):408–13.
76. Ageely HM, Dawoud HA, Heiba AA. Anemia, interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and erythropoietin levels in children with acute, complicated and uncomplicated malignant malaria in Jazan, Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol*. 2008 Aug;38(2):359–70.
77. Leowattana W, Krudsood S, Tangpukdee N, Brittenham G, Looareesuwan S. Defective erythropoietin production and reticulocyte response in acute *Plasmodium falciparum* malaria-associated anemia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* [Internet]. 2008 Jul [cited 2020 Jun 26];39(4):581–8. Available from: /pmc/articles/PMC3114418/?report=abstract
78. Jootar S, Chaisiripoomkere W, Pholvicha P, Leelasiri A, Prayoonwiwat W, Mongkonsvitragoon W, et al. Suppression of erythroid progenitor cells during malarial infection in Thai adults caused by serum inhibitor. *Clin Lab Haematol*. 1993;15(2):87–92.
79. Kurtzhals JA, Rodrigues O, Addae M, Commey JO, Nkrumah FK, Hviid L. Reversible suppression of bone marrow response to erythropoietin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol*. 1997 Apr;97(1):169–74.
80. Casals-Pascual C, Idro R, Picot S, Roberts DJ, Newton CRJC. Can erythropoietin be used to prevent brain damage in cerebral malaria? *Trends Parasitol*. 2009 Jan;25(1):30–6.
81. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;
82. Youssoufian H, Lodish HF. Transcriptional inhibition of the murine erythropoietin receptor gene by an upstream repetitive element. *Mol Cell Biol*. 1993;
83. El Hassan AMA, Saeed AM, Fandrey J, Jelkmann W. Decreased erythropoietin response in *Plasmodium falciparum* malaria-associated anaemia. *Eur J Haematol*. 1997;
84. Burchard GD, Radloff P, Philipps J, Nkeyi M, Knobloch J, Kremsner PG. Increased erythropoietin production in children with severe malarial anemia. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;

85. Tsiakalos A, Kordossis T, Ziakas PD, Kontos AN, Kyriaki D, Sipsas N V. Circulating antibodies to endogenous erythropoietin and risk for HIV-1-related anemia. *J Infect.* 2010;
86. Tzioufas AG, Kokori SI, Petrovas CI, Moutsopoulos HM. Autoantibodies to human recombinant erythropoietin in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;
87. Addai-Mensah O, Gyamfi D, Amponsah FA, Annani-Akollor ME, Danquah KO, Boateng L, et al. Antierythropoietin Antibody Production Is Not Associated with Malaria and Malaria-Related Anaemia in Humans. *Sci World J.* 2019;
88. Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, Shuaibu MN, Kikuchi M, Cherif MS, et al. Anti-erythropoietin antibody levels and its association with anaemia in different strains of semi-immune mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA. *Malar J.* 2013;
89. Lamikanra AA, Theron M, Kooij TWA, Roberts DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One.* 2009 Dec;4(12):e8446.
90. Sun J, Wang S-W, Jin C-L, Zeng X-L, Piao X-Y, Bai L, et al. Can hemozoin alone cause host anaemia? *Parasitol Res.* 2016 Dec;115(12):4611–6.
91. Skorokhod OA, Caione L, Marrocco T, Migliardi G, Barrera V, Arese P, et al. Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. *Blood.* 2010 Nov;116(20):4328–37.
92. Aguilar R, Moraleda C, Achtman AH, Mayor A, Quintó L, Cisteró P, et al. Severity of anaemia is associated with bone marrow haemozoin in children exposed to *Plasmodium falciparum*. *Br J Haematol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2020 Jun 27];164(6):877–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24386973/>
93. Lamikanra AA, Theron M, Kooij TWA, Roberts DJ. Hemozoin (Malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One* [Internet]. 2009 [cited 2020 Jun 27];4(12):1–12. Available from: </pmc/articles/PMC2793514/?report=abstract>
94. Kempaiah P, Dokladny K, Karim Z, Raballah E, Ong'echa JM, Moseley PL, et al. Reduced Hsp70 and glutamine in pediatric severe malaria anemia: Role of hemozoin in suppressing Hsp70 and NF- κ B activation. *Mol Med* [Internet]. 2016 [cited 2020 Jun 27];22:570–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27579474/>
95. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity.* 2011.
96. Costa AG, Ramasawmy R, Val FFA, Ibiapina HNS, Oliveira AC, Tarragô AM, et al. Polymorphisms in TLRs influence circulating cytokines production in *Plasmodium vivax* malaria: TLR polymorphisms influence cytokine productions in malaria-vivax. *Cytokine.* 2018 Oct 1;110:374–80.
97. Miller KL, Silverman PH, Kullgren B, Mahlmann LJ. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infect Immun.* 1989 May;57(5):1542–6.
98. Clark IA, Chaudhri G. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol.* 1988 Sep;70(1):99–103.
99. De Bruin AM, Voermans C, Nolte MA. Impact of interferon- γ on hematopoiesis. *Blood.* 2014.
100. Lin FC, Karwan M, Saleh B, Hodge DL, Chan T, Boelte KC, et al. IFN- γ causes aplastic anemia by altering hematopoietic stem/progenitor cell composition and disrupting lineage differentiation. *Blood.* 2014;

101. Zamai L, Secchiero P, Pierpaoli S, Bassini A, Papa S, Alnemri ES, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*. 2000;
102. Secchiero P, Melloni E, Heikinheimo M, Mannisto S, Di Pietro R, Iacone A, et al. TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood* [Internet]. 2004 Jan 15 [cited 2020 Jun 28];103(2):517–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12969966>
103. Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol*. 2011;
104. Mendonça VR, Queiroz AT, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* [Internet]. 2013 [cited 2020 Jun 28];12(1):69. Available from: [/pmc/articles/PMC3598348/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3598348/?report=abstract)
105. Guimarães Da Costa A, Do Valle Antonelli LR, Augusto Carvalho Costa P, Paulo Diniz Pimentel J, Garcia NP, Monteiro Tarragô A, et al. The robust and modulated biomarker network elicited by the *plasmodium vivax* infection is mainly mediated by the il-6/il-10 axis and is associated with the parasite load. *J Immunol Res*. 2014;
106. Awandare GA, Hittner JB, Kremsner PG, Ochiel DO, Keller CC, Weinberg JB, et al. Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and blood mononuclear cell MIF transcripts in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Immunol*. 2006;
107. Andrade BB, Araújo-Santos T, Luz NF, Khouri R, Bozza MT, Camargo LMA, et al. Heme Impairs Prostaglandin E₂ and TGF- β Production by Human Mononuclear Cells via Cu/Zn Superoxide Dismutase: Insight into the Pathogenesis of Severe Malaria. *J Immunol*. 2010;
108. Anyona SB, Kempaiah P, Raballah E, Davenport GC, Were T, Konah SN, et al. Reduced systemic bicyclo-prostaglandin-E₂ and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia. *Am J Hematol*. 2012;
109. Anyona SB, Kempaiah P, Davenport GC, Vulule JM, Hittner JB, Ong'echa JM, et al. Suppressed circulating bicyclo-PGE₂ levels and leukocyte COX-2 transcripts in children co-infected with *P. falciparum* malaria and HIV-1 or bacteremia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;
110. Wei Q, Frenette PS. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity*. 2018.
111. Gomes AC, Saraiva M, Gomes MS. The bone marrow hematopoietic niche and its adaptation to infection. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2020.
112. Grover A, Mancini E, Moore S, Mead AJ, Atkinson D, Rasmussen KD, et al. Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate. *J Exp Med*. 2014;
113. Li W, Wang Y, Zhao H, Zhang H, Xu Y, Wang S, et al. Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages. *Blood*. 2019 Aug 1;134(5):480–91.
114. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: Regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood*. 2011.

115. Novershtern N, Subramanian A, Lawton LN, Mak RH, Haining WN, McConkey ME, et al. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell*. 2011;
116. Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol*. 1993;
117. Patient RK, McGhee JD. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Current Opinion in Genetics and Development*. 2002.
118. Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev*. 1988;
119. Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *International Journal of Hematology*. 2014.
120. Gutiérrez L, Caballero N, Fernández-Calleja L, Karkoulia E, Strouboulis J. Regulation of GATA1 levels in erythropoiesis. *IUBMB Life*. 2020.
121. Vicente C, Conchillo A, García-Sánchez MA, Odero MD. The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. Vol. 82, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier; 2012. p. 1–17.
122. Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation [Internet]. Vol. 100, *International Journal of Hematology*. Springer Tokyo; 2014 [cited 2020 Jun 30]. p. 417–24. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12185-014-1568-0>
123. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005;
124. Romano O, Petiti L, Felix T, Meneghini V, Portafax M, Antoniani C, et al. GATA Factor-Mediated Gene Regulation in Human Erythropoiesis. *iScience*. 2020;
125. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr Protoc Bioinforma*. 2016;
126. Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJR, et al. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J*. 2005;
127. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Foraler A, Rabbitts TH. The erythroid, lim-only protein LMO2 forms a dnabinding complex with tali, E2A and GATA-1. *Exp Hematol*. 1996;

7. ANEXOS E APÊNDICES

7.1. LISTA DE PUBLICAÇÕES (2015-2020)

1. MARCELO A M BRITO, BÀRBARA BARO, TAINÁ C RAIOL, ALBERTO AYLLON-HERMIDA, IZABELLA P SAFE, KATRIEN DEROOST, ERICK F G FIGUEIREDO, ALLYSON G COSTA, MARIA DEL P ARMENGOL, LAURO SUMOY, ANNE C G ALMEIDA, BIDOSSESSI W HOUNKPE, ERICH V DE PAULA, CÀRMEN FERNANDEZ-BECERRA, WUELTON M MONTEIRO, HERNANDO A DEL PORTILLO, MARCUS V G LACERDA, Morphological and Transcriptional Changes in Human Bone Marrow During Natural *Plasmodium vivax* Malaria Infections, *The Journal of Infectious Diseases*, , jiaa177, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa177>.

2. TODA, HARUKA DIAZ-VARELA, MIRIAM SEGUI-BARBER, JOAN ROOBSONG, WANLAPA BARO, BARBARA GARCIA-SILVA, SUSANA GALIANO, ALICIA GUALDRÓN-LÓPEZ, MELISA ALMEIDA, ANNE C. G. BRITO, MARCELO A. M. DE MELO, GISELY CARDOSO APARICI-HERRAIZ, IRIS CASTRO-CAVADÍA, CARLOS MONTEIRO, WUELTON MARCELO BORRÀS, EVA SABIDÓ, EDUARD ALMEIDA, IGOR C. CHOJNACKI, JAKUB MARTINEZ-PICADO, JAVIER CALVO, MARIA ARMENGOL, PILAR CARMONA-FONSECA, JAIME YASNOT, MARIA FERNANDA LAUZURICA, RICARDO MARCILLA, ANTONIO , et al. ; Plasma-derived extracellular vesicles from *Plasmodium vivax* patients signal spleen fibroblasts via NF-κB facilitating parasite cytoadherence. *Nature Communications*, v. 11, p. 2761, 2020.

3. BORBA, M. G. S. VAL, F. F. A. SAMPAIO, V. S. ALEXANDRE, M. A. A. MELO, G. C. BRITO, M. A. M. MOURAO, M. P. G. BRITO-SOUSA, J. D. SILVA, D. C. B. GUERRA, M. V. F. HAJJAR, L. A. PINTO, R. C. BALIEIRO, A. A. S. PACHECO, A. G. F. SANTOS JR, J. D. O. NAVECA, F. G. XAVIER, M. S. SIQUEIRA, A. M. SCHWARZBOLD, A. CRODA, J. NOGUEIRA, M. L. ROMERO, G. A. S. BASSAT, Q. FONTES, C. J. ALBUQUERQUE, B. C. , et al. ; Effect of High vs Low Doses of Chloroquine Diphosphate as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, v. 3, p. e208857, 2020.

4. ALMEIDA, ANNE C. G. ; PUÇA, MARIA C. B. ; FIGUEIREDO, ERICK F. G. ; BARBOSA, LAILA R. ; SALAZAR, YANKA E. A. R. ; SILVA, EMANUELLE L. ; BRITO, MARCELO A. M. ; SIQUEIRA, ANDRÉ M. ; VIEIRA, JOSÉ L. F. ; LACERDA, MARCUS V. G. ; MONTEIRO, WUELTON M. ; MELO, GISELY C. . Influence of CYP2C8 , CYP3A4 and CYP3A5 host genotypes on early recurrence of *Plasmodium vivax*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, v. 2125, p. 19, 2020.

5. PFEFFER, DANIEL A. LEY, BENEDIKT HOWES, ROSALIND E. ADU, PATRICK ALAM, MOHAMMAD SHAFIUL BANSIL, POOJA BOUM, YAP BRITO, MARCELO CHAROENKWAN, PIMLAK CLEMENTS, ARCHIE CUI, LIWANG DENG, ZESHUAI EGESIE, OCHAKA JULIE ESPINO, FE ESPERANZA VON FRICKEN, MICHAEL E. HAMID, MUZAMIL MAHDI ABDEL HE, YONGSHU HENRIQUES, GISELA KHAN, WASIF ALI KHIM, NIMOL KIM, SAORIN LACERDA, MARCUS LON, CHANTHAP MEKURIA, ASRAT HAILU MENARD, DIDIER , et al. ; Quantification of

glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by spectrophotometry: A systematic review and meta-analysis. PLOS MEDICINE, v. 17, p. e1003084, 2020.

6. LACERDA, MARCUS V.G. LLANOS-CUENTAS, ALEJANDRO KRUDSOOD, SRIVICHA LON, CHANTHAP SAUNDERS, DAVID L. MOHAMMED, REZIKA YILMA, DANIEL BATISTA PEREIRA, DHELIO ESPINO, FE E.J. MIA, REGINALDO Z. CHUQUIYAURI, RAUL VAL, FERNANDO CASAPÍA, MARTÍN MONTEIRO, WUELTON M. BRITO, MARCELO A.M. COSTA, MÔNICA R.F. BUATHONG, NILLAWAN NOEDL, HARALD DIRO, ERMIA GETIE, SISAY WUBIE, KALEHIWOT M. ABDISSA, ALEMSEGED ZEYNUDIN, AHMED ABEBE, CHERINET TADA, MAURO S. , et al. ; Single-Dose Tafenoquine to Prevent Relapse of Plasmodium vivax Malaria. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, v. 380, p. 215-228, 2019.

7. LLANOS-CUENTAS, ALEJANDRO LACERDA, MARCUS V.G. HIEN, TRAN T. VÉLEZ, IVÁN D. NAMAİK-LARP, CHAYADOL CHU, CINDY S. VILLEGAS, MARIA F. VAL, FERNANDO MONTEIRO, WUELTON M. BRITO, MARCELO A.M. COSTA, MÔNICA R.F. CHUQUIYAURI, RAUL CASAPÍA, MARTÍN NGUYEN, CHAU H. ARUACHAN, SANDRA PAPWIJITSIL, RATCHADAPORN NOSTEN, FRANÇOIS H. BANCONE, GERMANA ANGUS, BRIAN DUPARC, STEPHAN CRAIG, GRAHAM ROUSELL, VICTORIA M. JONES, SIÓN W. HARDAKER, ELIZABETH CLOVER, DONNA D. , et al. ; Tafenoquine versus Primaquine to Prevent Relapse of Plasmodium vivax Malaria. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, v. 380, p. 229-241, 2019.7.

8. ALMEIDA, ANNE C. G. ; KUEHN, ANDREA ; CASTRO, ARTHUR J. M. ; VITOR-SILVA, SHEILA ; FIGUEIREDO, ERICK F. G. ; BRASIL, LARISSA W. ; BRITO, MARCELO A. M. ; SAMPAIO, VANDERSON S. ; BASSAT, QUIQUE ; FELGER, INGRID ; TADEI, WANDERLI P. ; MONTEIRO, WUELTON M. ; MUELLER, IVO ; LACERDA, MARCUS V. G. . High proportions of asymptomatic and submicroscopic Plasmodium vivax infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. Parasites & Vectors, v. 11, p. 194, 2018.

9. BARO, BARBARA ; DEROOST, KATRIEN ; RAIOL, TAINÁ ; BRITO, MARCELO ; ALMEIDA, ANNE C. G. ; DE MENEZES-NETO, ARMANDO ; FIGUEIREDO, ERICK F. G. ; ALENCAR, ALINE ; LEITÃO, RODRIGO ; VAL, FERNANDO ; MONTEIRO, WUELTON ; OLIVEIRA, ANNA ; ARMENGOL, MARIA DEL PILAR ; FERNÁNDEZ-BECERRA, CARMEN ; LACERDA, MARCUS V. ; DEL PORTILLO, HERNANDO A. . Plasmodium vivax gametocytes in the bone marrow of an acute malaria patient and changes in the erythroid miRNA profile. PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES (ONLINE), v. 11, p. e0005365, 2017.

10. MONTEIRO, WUELTON MARCELO ; BRITO, MARCELO AUGUSTO MOTA ; LACERDA, MARCUS VINÍCIUS GUIMARÃES . Accuracy of CareStart®- G6PD rapid diagnostic test: variation in results from different commercial versions. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 50, p. 282-283, 2017.

11. PEIXOTO, H. M. ; BRITO, M. A. M. ; ROMERO, GUSTAVO A. S. ; MONTEIRO, W. M. ; LACERDA, M. V. G. ; DE OLIVEIRA, MARIA REGINA F . Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e uso de primaquina: estimativa de custos de profissionais por macrocusteio e microcusteio. REVISTA DE SAÚDE PÚBLICA (ONLINE), v. 51, p. 90, 2017.

12. PEIXOTO, HENRY M.; BRITO, MARCELO A.; ROMERO, GUSTAVO A. S.; MONTEIRO, WUELTON M. ; DE LACERDA, MARCUS V. G. ; DE OLIVEIRA, MARIA R. F. . Cost-effectiveness analysis of rapid diagnostic tests for G6PD deficiency in patients with Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon. Malaria Journal (Online), v. 15, p. 82, 2016.
13. BRITO, MARCELO AUGUSTO MOTA; PEIXOTO, HENRY MAIA; ALMEIDA, ANNE CRISTINE GOMES DE; OLIVEIRA, MARIA REGINA FERNANDES DE; ROMERO, GUSTAVO ADOLFO SIERRA ; MOURA-NETO, JOSÉ PEREIRA ; SINGH, NAKUL ; MONTEIRO, WUELTON MARCELO ; LACERDA, MARCUS VINÍCIUS GUIMARÃES DE . Validation of the rapid test Carestart(tm) G6PD among malaria vivax-infected subjects in the Brazilian Amazon. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Revista, v. 49, p. 446-455, 2016.
14. PEIXOTO, HENRY MAIA; BRITO, MARCELO AUGUSTO MOTA; ROMERO, GUSTAVO ADOLFO SIERRA ; MONTEIRO, WUELTON MARCELO ; DE LACERDA, MARCUS VINÍCIUS GUIMARÃES ; DE OLIVEIRA, MARIA REGINA FERNANDES . Rapid diagnostic test for G6PD deficiency in Plasmodium vivax infected men: a budget impact analysis based in Brazilian Amazon. TM & IH. TROPICAL MEDICINE AND INTERNATIONAL HEALTH (PRINT), v. 22, p. 21-31, 2016.
15. PEIXOTO, HENRY M ; BRITO, MARCELO AM ; ROMERO, GUSTAVO AS ; MONTEIRO, WUELTON M ; DE LACERDA, MARCUS VG ; DE OLIVEIRA, MARIA REGINA F . G6PD deficiency in male individuals infected by Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: a cost study. Malaria Journal (Online), v. 14, p. 25889063, 2015.'

7.2. Aprovação Ética

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE ANEMIA EM MALÁRIA POR PLASMODIUM VIVAX, EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA DA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA

Pesquisador: Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 23270313.1.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.065.022

Data da Relatório: 15/05/2015

Apresentação do Projeto:

A anemia grave durante a infecção por *Plasmodium vivax* tem sido apontada como a complicação mais frequente entre crianças das áreas endêmicas para esta espécie. Em Manaus, uma unidade terciária de atenção à saúde (Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado) atende cerca de 600 crianças entre 0 e 14 anos com malária vivax por ano. Durante 24 meses, uma amostra de 315 crianças será estudada, caracterizando-se parâmetros hematológicos, nutricionais, microbiológicos, genéticos do hospedeiro e imunológicos, estimando-se fatores de risco independentes que estejam associados à anemia grave (ou seja, hemoglobina $\leq 5 \text{ g/dL}$). A caracterização clínica e dos principais fatores de risco pode contribuir para o melhor manejo clínico desses pacientes e a caracterização da imunidade humoral e celular permitirá o desenho de estudos com novas drogas e novas vacinas para áreas endêmicas para *P. vivax*. Com o entendimento dos marcadores moleculares que estão associados ao surgimento de anemia grave em pacientes com malária vivax, é possível dar um melhor nível de assistência a esses pacientes, que atualmente são

tratados de forma empírica, com hemotransfusão, suplementação com ferro e não-investigação de outras comorbidades genéticas ou infecciosas, para os quais não existe qualquer nível de evidência na literatura.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (02)2127-3872 Fax: (02)2127-3872 E-mail: cep@fimt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.065.022

Dessa forma, melhora-se a assistência médica ao paciente infectado, proporcionando maiores chances do mesmo ter outras doenças diagnosticadas de forma oportuna. Trata-se do primeiro estudo sobre a caracterização de possíveis biomarcadores moleculares envolvidos na patogênese da anemia grave pelo *P. vivax*. Os estudos realizados anteriormente se restringem principalmente a alterações séricas, que permitiram poucas conclusões sobre a fisiopatogenia deste importante quadro clínico. Assim, modelos de estudos moleculares permitirão a geração de evidências mais confiáveis e levarão ao aumento da experiência do grupo de pesquisa neste tipo de metodologia.

Trata-se de EMENDA referente ao protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado " AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE ANEMIA EM MALÁRIA POR PLASMODIUM VIVAX, EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA DA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA", cujo pesquisador responsável é o Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda. O estudo será observacional.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar a anemia causada pela malária vivax em uma área de moderada endemicidade para malária, entre crianças de 0 a 14 anos, na Amazônia Ocidental Brasileira.

Objetivo Secundário:

1. Estimar a frequência de anemia grave entre crianças com malária vivax; 2. Estimar os fatores de risco independentes para anemia grave por *P. vivax*; 3. Caracterizar o perfil imunológico humoral e celular de pacientes com anemia grave por *P. vivax*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os volumes de sangue coletados, mesmo nos estudos de coorte, não representam risco para a saúde dos indivíduos, inclusive para as crianças de 1-12 anos. Mesmo que remota, há um pequeno risco de infecção associada com a punção venosa. Contudo, muitos estudos envolvendo estes procedimentos vêm sendo conduzidos pelos integrantes deste grupo e, de acordo com nossa experiência, estes eventos adversos relacionados ao estudo ocorrem em baixíssima frequência. Após a remoção da agulha, o sangramento localizado será eficientemente estancado com uma

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3872 Fax: (92)2127-3872 E-mail: cep@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.095.002

pequena bandagem (do tipo band-aid). Os participantes poderão sentir alguma dor como resultado da inserção da agulha. Se a agulha atravessar o vaso, há um risco de sangramento local que pode resultar num pequeno (1 cm) hematoma.

Benefícios:

Com o entendimento dos fatores que estão associados à anemia grave em pacientes com malária vivax, é possível dar um melhor nível de assistência a esses pacientes, que atualmente são tratados de forma empírica, com hemotransfusão, suplementação com ferro e não-investigação de outras comorbidades genéticas ou infecciosas, para os quais não existe qualquer nível de evidência na literatura. Dessa forma, melhora-se a assistência médica à criança infectada, proporcionando maiores chances da mesma ter outras doenças diagnosticadas de forma oportuna. Compreender a imunidade celular que está associada a esse fenômeno hematológico pode favorecer desenhos de estudos com novas drogas e novas vacinas, tendo a anemia como um dos possíveis desfechos a serem analisados, já que essa é a complicação mais frequente entre crianças com malária vivax em todo o mundo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta é relevante e dentro do contexto, é plenamente factível, portanto, estando o protocolo de reapresentação do projeto devidamente instruído, está apto para análise.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo da reapresentação do projeto traz a documentação seguinte: 1. Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) mais detalhado, indicando as modificações/readequações. 1.a. TALE versão final. 2. Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) simplificado, indicando as modificações/readequações. 2.a. TALE versão final. 3. Projeto de pesquisa modificado/readequado. 4. Projeto da Plataforma Brasil (PB) versão atual. 5. Carta resposta. Atendendo as solicitações/readequações sobre novas pendências, foram incluídas versões atualizadas dos documentos seguintes: TALE, TCLE para pais e/ou responsáveis e TCLE para participantes da pesquisa adultos.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIAS/SOLICITAÇÕES visando atender ao que dispõe a Resolução no. 466/2012, CNS/MS e

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.065.002

suas complementares.

PENDÊNCIA 1. Não foi informado se ocorrerá alteração do número da amostra. Solicita-se esclarecimento.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: O número da amostras para o análise da medula óssea foi esclarecido no projeto. Este foi adicionado à Plataforma Brasil (PB). Será requerido um n=5 para cada grupo de paciente: crianças com anemia grave e não grave; e adultos sem anemia, e com anemia grave e não grave. Amostras serão coletadas no momento da inclusão, idealmente antes da administração do tratamento e ao dia 42 post -tratamento, como controle interno do estudo transcricional. Essas informações foram adicionadas no projeto PB, como também no TCLE e TALE.

ANÁLISE: No projeto PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_466712_E1.pdf, não se identificou a informação sobre a inclusão de adultos na pesquisa, e ainda não se identificou o documento Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme mencionado. Vale ressaltar que o TCLE é aplicado a participantes da pesquisa adultos e que as informações referidas nesse documento dever ser mencionadas no projeto detalhado e no projeto gerado na PB. Diante disso, solicita-se incluir no projeto PB, a informação sobre a participação de adultos na pesquisa, assim como, informar a amostra total envolvendo crianças e adultos. Além disso apresentar o TCLE adequado para os adultos, conforme a Resolução no. 466/2012, CNS/MS. **PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.**

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Nesta nova versão, incluímos a informação sobre inclusão de adultos, na PB e projeto detalhado. Além disso, incluímos o TCLE para adultos. O número original apresentado, de 315 amostras, já inclui crianças e adultos. Esta pendência foi esclarecida no protocolo.

ANÁLISE: Foi verificado que o pesquisador atendeu conforme solicitação. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

PENDÊNCIA 2. Quanto a inclusão de adultos no estudo, não fica claro como será a seleção desses participantes da pesquisa. Diante disso, solicita-se esclarecimento sobre critério de inclusão dos participantes adultos.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.065.022

RESPOSTA DO PESQUISADOR: A seleção dos pacientes adultos será 15 pacientes adultos, sendo 5 pacientes adultos com *P. vivax* sem anemia (Hb>13g/dl) e 5 com anemia não grave (Hb<13 g/dl) atendidos na FMT-HVD. Essas informações foram adicionadas no projeto na PB e no TALE.

ANÁLISE: A informação mencionada foi identificada no projeto detalhado, Item Estudos transcricionais, pág.5, porém a informação não consta no projeto gerado na PB. Quanto ao TALE, é um documento aplicado a participantes da pesquisa crianças e adolescentes. Sendo assim, solicita-se a inclusão da informação no projeto PB e a inclusão do TCLE no protocolo. **PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.**

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Nesta nova versão, incluímos a informação sobre a metodologia dos estudos transcricionais na PB. Além disso, neste novo protocolo, temos um TALE, um TCLE para adultos e um TCLE para os responsáveis pelos menores.

ANÁLISE: Verificou-se que o pesquisador atendeu conforme o que foi solicitado. Sendo assim, **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

PENDÊNCIA 3. No TCLE, na página 2, parágrafo 1, foi mencionado: "... e da medula óssea (no máximo de 2 mL) para fazer exames mais detalhados de anemia. Para crianças menores de dois anos coletaremos de 5-10 ml de sangue da veia no máximo. Diante disso, solicita-se mencionar a quantificação do material biológico (2 mL e 5-10 ml) por meio de tamanho de colher, para melhor entendimento por parte do participante da pesquisa e/ou do seu responsável.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: O esclarecimento do volume coletado mediante tamanho de colher foi adicionado no TCLE e TALE.

ANÁLISE: **PENDÊNCIA ATENDIDA**, porém a informação foi readequada/informada em dois documentos identificados como **TERMO DE ASSENTIMENTO.**

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Nesta nova versão, temos um TALE, um TCLE para adultos e um TCLE para os responsáveis pelos menores.

ANÁLISE: Foi verificado três documentos distintos conforme mencionado pelo pesquisador, o que

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 26	CEP: 69.040-000
Bairro: D. Pedro I	
UF: AM	Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3672	Fax: (92)2127-3672
	E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.065.022

complementa a resposta do pesquisador anterior, referente a pendência 3.

PENDÊNCIA 4. No TCLE, foi informado "Para o exame de medula óssea coletaremos 2 mL de sangue da medula óssea (tutano) fazendo uma punção com agulha fina no esterno ou crista ilíaca com anestesia local. Solicita-se mencionar a informação em linguagem mais simples e se possível mostrar em figura, para melhor entendimento do participante da pesquisa e/ou seu responsável.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: O esclarecimento da punção de medula óssea foi adicionado no TCLE. Adicionamos um sinônimo simples para crista ilíaca (osso do quadril) e para o esterno (osso do peito), como também uma figura referente ao procedimento de coleta da medula óssea da crista ilíaca para melhor entendimento.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA, mas as informações foram apresentadas em dois documentos identificados como TALE.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Nesta nova versão, temos um TALE, um TCLE para adultos e um TCLE para os responsáveis pelos menores.

ANÁLISE: Verificou-se a informação conforme mencionada pelo pesquisador, o que complementa o que foi solicitado na pendência 4.

PENDÊNCIA 5. No TALE, página 1, no parágrafo 4, foi mencionado "Para o exame de medula óssea coletaremos 2 mL de sangue da medula óssea (tutano) fazendo uma punção com agulha fina no esterno ou crista ilíaca com anestesia local. Sendo assim, solicita-se que a informação apresentada em linguagem mais simples e ainda, mostrar em figura, para melhor compreensão do participante da pesquisa.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: o esclarecimento da punção de medula óssea foi adicionado no TALE. Adicionado um sinônimo simples para crista ilíaca (osso do quadril) e para o esterno (osso do peito), como também uma figura referente ao procedimento de coleta da medula óssea da crista ilíaca para melhor entendimento.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Nesta nova versão, incluímos todas as alterações efetuadas na PE.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3872 Fax: (92)2127-3872 E-mail: cep@fml.am.gov.br
CEP: 69.040-000

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.065.002

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA, conforme solicitação.

PENDÊNCIA 6. Não foi incluída nova versão do projeto na Plataforma Brasil (PB) com as modificações realizadas. Solicita-se a inclusão do projeto na PB com as informações alteradas e mencionadas.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: a nova versão do projeto foi incluída na Plataforma Brasil. Vejam o documento com a nova versão do projeto e o documento com as modificações feitas sinaladas.

ANÁLISE: Não se identificou no projeto PB, as informações referentes à EMENDA. **PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.**

1. NOVAS PENDÊNCIAS RELACIONADAS AO TCLE:

PENDÊNCIA 1.a) o documento a ser apresentado aos pais e/ou responsáveis pelos participantes da pesquisa crianças, recebe o título "TERMO DE ASSENTIMENTO". Solicita-se readequação para " Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme disposto na Resolução no. 466/2012, CNS/MS.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Nesta nova versão, temos um TALE, um TCLE para adultos e um TCLE para os responsáveis pelos menores.

ANÁLISE: Verificou-se a inclusão do TCLE referente aos pais e/ou responsáveis. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

PENDÊNCIA 2.b) No mesmo documento, pág. 1, foi mencionada a informação seguinte " A qualquer momento você pode desistir da participação no estudo e retirar o seu consentimento". E na pág. 2, Item Testes, foi informado o seguinte " Para isso, seu sangue será guardado com um código ...". Solicita-se readequação para " A qualquer momento você pode desistir da participação de seu filho no estudo e retirar o seu consentimento", e "Para isso, o sangue do seu filho será guardado com um código ...".

RESPOSTA: Nesta nova versão, estas alterações foram efetuadas.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3872 Fax: (92)2127-3872 E-mail: cep@fnt.am.gov.br
CEP: 69.040-000

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.065.022

Destacamos que nesta versão do protocolo, percebemos a necessidade da alteração do volume de sangue a ser coletado da medula óssea, mudando de 2 (equivalente a uma colher de café) para um máximo de 4 mL (equivalente a uma colher de sobremesa). Na rotina diagnóstica que usa amostras de sangue de medula óssea, o volume coletado é de 4 mL. Dessa forma, esta mudança não implica novos ou um aumento de riscos ao participante e permitirá cumprir com maior acurácia a metodologia proposta. Também adicionamos a frase 'Não serão feitas coletas em crianças que estejam agitadas para evitar riscos no procedimento, ao TCLE a ser assinado pelos responsáveis pelos menores, para minimizar riscos a esta população. A correção foi feita no protocolo, TCLEs e TALE.

ANÁLISE: Observou-se que as solicitações foram atendidas pelo pesquisador. Diante disso, **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

Diante exposto, e considerando-se que o pesquisador atendeu todas as solicitações, sugere-se que a Emenda ao protocolo seja **APROVADA.**

S.M.J. É o parecer.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A presente Emenda está **APROVADA** e os Interessados ficam Informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
 Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)2127-3872 Fax: (92)2127-3872 E-mail: cep@fmi.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.065.022

MANAUS, 15 de Maio de 2015

Assinado por:
Mariaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fnt.am.gov.br

7.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO



Avaliação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de anemia em malária por *Plasmodium vivax*, em uma unidade terciária da Amazônia ocidental brasileira

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa chamada “**Avaliação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de anemia em malária por Plasmodium vivax, em uma unidade terciária da Amazônia ocidental brasileira**”, porque você está doente de malária. O Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda é a pessoa responsável pelo estudo.

Nesta pesquisa estamos buscando entender melhor o mecanismo da anemia na malária e desta forma melhorar o seu tratamento. Com esse objetivo, estamos convidando a participar a pacientes doentes de malária e pacientes doentes de malária com anemia (hemoglobina menor de 13 g/dL). Se você aceitar participar, faremos seu acompanhamento médico e coletaremos sangue para malária e anemia. Para os exames de anemia, coletaremos amostras de 20 ml da veia - aproximadamente uma colher grande de sopa - e de 4 mL no máximo de sangue da medula óssea (tutano) – aproximadamente uma colher de sobremesa; você também fará exames de fezes e urina. Após o início do tratamento, você será acompanhado através de visitas programadas para os dias 5, 28 e 42 para verificar se você melhorou da malária e da anemia.

Em nenhum momento você será identificado, mesmo quando os resultados do estudo forem divulgados. Você não gastará nem ganhará dinheiro por participar na pesquisa.

Você poderá sentir alguma dor por causa da picada no dedo ou pela coleta de amostra de sangue na veia do braço. Mas qualquer dor deve durar apenas alguns instantes. Existe um risco muito pequeno de infecção onde o sangue for coletado, mas qualquer infecção será monitorada e tratada pela equipe médica. A amostra de sangue colhida é muito pequena e não representa nenhum risco à sua saúde. Para o exame de medula óssea coletaremos 4 mL de sangue da medula óssea (tutano) fazendo uma punção com agulha fina no esterno ou crista ilíaca (osso do quadril) com anestesia local. Você pode sentir alguma dor por causa da picada da anestesia e algum desconforto no momento da retirada do sangue, mas deve durar apenas alguns instantes.



Punção da crista ilíaca ou osso do quadril

Você sempre poderá participar da coleta de sangue de veia e não aceitar participar da coleta

de sangue de medula óssea.

Para a obtenção de resultados concluintes, vamos a coletar sangue da veia do braço e sangue da medula óssea 42 dias depois do início do tratamento. Essa segunda coleta é imprescindível para validar os novos conhecimentos obtidos. O médico responsável do estudo contatará você para lembrar a data da segunda coleta.

Como benefícios, você estará contribuindo para o conhecimento da anemia na malária e ajudando a melhorar a saúde dos pacientes com malária.

Nós gostaríamos de sua permissão para guardar o restante da amostra de sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Isto pode exigir o armazenamento mais prolongado de seu sangue em laboratórios da FMT-HVD. Para isso, seu sangue será guardado com um código e não deverá identificar seu nome. O restante do material que não for utilizado no estudo será descartado de acordo com as regras para não poluir o meio ambiente nem contaminar as pessoas.

Mesmo que o seu responsável permita a sua participação na pesquisa, você não é obrigado a participar da mesma se não quiser. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores para que eles possam tirar sua dúvida.

Você poderá também fazer contato com o Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, responsável pelo projeto, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 9114 7633 (qualquer dia e horário).

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado também poderá prestar esclarecimentos ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 2127 3572 (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas).

Este Termo de assentimento (TA) foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Eu entendi o que me foi explicado e aceito participar da pesquisa.

(Assinatura do participante da pesquisa)

Manaus, _____ de _____ de _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o assentimento deste indivíduo para a participação no estudo.

(Assinatura do Pesquisador)

Manaus, _____ de _____ de _____

7.4. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – 01

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão 01	
Título	Recepção e Identificação de amostras biológicas de aspirado de medula óssea e sangue periférico (Projeto ANBM)		
Língua do Documento	PT		
Elaborado por: Marcelo Brito Bàrbara Baro	Revisado por: Gisely Melo	Aprovado por: Marcus V G Lacerda	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas

1. OBJETIVO

O objetivo deste POP é o processamento, identificação e armazenamento adequados para as amostras de aspirado de medula óssea e sangue periférico pertencentes ao projeto ANBM e projetos futuros.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Gerência de Malária; Laboratório Multidisciplinar; Centros colaboradores.

3. DEFINIÇÕES

Medula óssea: Tecido mole que preenche as cavidades dos ossos. A medula óssea apresenta-se de dois tipos, amarela e vermelha. A medula amarela é encontrada em cavidades grandes de ossos grandes e consiste em sua grande maioria de células adiposas e umas poucas células sanguíneas primitivas. A medula vermelha é um tecido hematopoiético e é o sítio de produção de eritrócitos e leucócitos granulares. A medula óssea é constituída de uma rede, em forma de treliça, de tecido conjuntivo, contendo fibras ramificadas e preenchida por células medulares.

Sangue periférico: Líquido corporal que circula no sistema vascular (VASOS SANGUÍNEOS). O sangue total compreende o PLASMA e as CÉLULAS SANGUÍNEAS.

4. RESPONSABILIDADES

4.1. É de responsabilidade do médico do estudo, a coleta adequada, segura e acurada de material medular da crista ilíaca do participante de pesquisa;

4.2. É de responsabilidade do técnico de patologia do estudo, a coleta de sangue periférico adequada e segura de veia periférica do participante de pesquisa;

4.3. É de responsabilidade dos pesquisadores do estudo, o processamento, armazenamento e identificação adequada das amostras biológicas obtidas para o estudo, bem como sua adequada destruição/descarte após finalização da pesquisa.

5. POP'S RELACIONADOS

NA.

6. PROCEDIMENTOS

6.1. Primeira etiquetagem:

6.1.1. Serão recebidos 4mL de aspirado de medula óssea e 4-10mL de PB de cada paciente incluído no estudo;

6.1.2. Rotule o ID do paciente com o seguinte código: ANBM_01 (onde 01 é o número do paciente);

6.1.3. Rotular se for a primeira amostra (dia 0, etiqueta 0) ou a amostra após o tratamento (dia 42, etiqueta 42): ANBM_01.0 ou ANBM_01.42;

6.1.4. Rotular o aspirado de BM (rótulo 0) e o PB (rótulo 1): ANBM_01.0.0 e ANBM_01.0.1 (para BM e PB do paciente 01 no dia 0);

6.1.5. Depois de estabelecer esses rótulos, continuar armazenando as seguintes alíquotas conforme descrito abaixo.

6.2. Alíquotas e identificação

6.2.1. De ambas as amostras serão armazenadas:

- 1 alíquota de 200µL para hemograma e, com a quantidade de sangue restante, fazer esfregaços sanguíneos (usando 2,5µL aprox para cada):

- Lâminas para coloração Azul de cresil brilhante (BCB), BCB / Giemsa, Panotico e Azul da Prússia e, tanto quanto possível, fixadas ou não com MetOH;

- 1 alíquota de 200 µL para determinação de Hz. Armazenar a -20 ° C. Rotular como A;

- 2 alíquotas de 50 µL para controle de monoinfecção por *P. vivax* (qPCR). Centrifugar e descartar o plasma. Armazenar em RNA Protect (1: 5) (200µL RNA proteja) a -80°C. Rotular como B1, B2;

- 2 alíquotas de 50 µL para quantificação de gametócitos (pvs25 RT-qPCR); Centrifugar e descartar o plasma. Armazenar em RNA protegido (1: 5) (200µL) a -80°C. Rotular como C1, C2;

- 2 alíquotas de 50 µL para análise de microssatélites de *P. vivax*. Armazenar em RNA Protect (1: 5) (250µL RNA Protect) a -80°C. Rotular como D1, D2;

- 2 alíquotas de 50 µL para estudo de genes de resistência a drogas. Armazenar em RNA Protect (1: 5) (250µL RNA Protect) a -80°C. Rotular como E1, E2;

- 2 alíquotas de 100 µL para metabolômica: separar 200 µL, centrifugar e armazenar o sedimento celular (F1) e o plasma (F2) separadamente. Armazenar imediatamente a -80°C (recomendações do UM Metabolomics BRCF).

Para o volume restante de medula óssea, após centrifugação a 400g 10min:

- Armazenar o plasma em 4 alíquotas a -80°C. Rotular como P1 (50 µL), P2 (50 µL), P3 (250 µL) e P4 (todo o restante do plasma).

- Ressuspender o sedimento de células com meio iRPMI comercial (ou tampão salino) para obter 50% de hematócrito e prosseguir para a purificação das células CD71 + (isolamento SOP_CD71).

Após esse procedimento, você poderá armazenar alíquotas extras provenientes da medula óssea:

- 2 alíquotas de 10^7 células em Trizol (1:10 ou 1000 µL para evitar descongelamento) a -80°C para RNAseq e microRNA (etiqueta R1, R2).

- 1 alíquota de 10^6 células para EM a 4°C.

- 1 alíquota de 10^6 células para IFA a 4°C.

- várias alíquotas para análise FACS (etiqueta L) para análise no dia seguinte.

7. REFERÊNCIAS

7.1. General sample collection recommendations for Metabolomics studies (UM Metabolomics BRCF):

7.2. http://medicine.umich.edu/medschool/sites/medicine.umich.edu/medschool/files/res_meta_SamplePreparationGuidelines_v131111.pdf

8. LISTA DE ANEXOS

NA.

9. ANEXOS

NA.

7.5. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - 02

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão 01	
Título	Isolamento de células CD71+ provenientes de aspirado medular através de separação magnética com microbeads (Projeto ANBM)		
Língua do Documento	PT		
Elaborado por: Marcelo Brito Bàrbara Baro	Revisado por: Gisely Melo	Aprovado por: Marcus V G Lacerda	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas

1. OBJETIVO

O objetivo deste POP é o isolamento de células progenitoras eritróides de medula óssea humana com alto grau de pureza para análises futuras de material genético.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Gerência de Malária; Laboratório Multidisciplinar; Centros colaboradores.

3. DEFINIÇÕES

Medula óssea: Tecido mole que preenche as cavidades dos ossos. A medula óssea apresenta-se de dois tipos, amarela e vermelha. A medula amarela é

encontrada em cavidades grandes de ossos grandes e consiste em sua grande maioria de células adiposas e umas poucas células sanguíneas primitivas. A medula vermelha é um tecido hematopoiético e é o sítio de produção de eritrócitos e leucócitos granulares. A medula óssea é constituída de uma rede, em forma de treliça, de tecido conjuntivo, contendo fibras ramificadas e preenchida por células medulares.

Sangue periférico: Líquido corporal que circula no sistema vascular (VASOS SANGUÍNEOS). O sangue total compreende o PLASMA e as CÉLULAS SANGUÍNEAS.

4. RESPONSABILIDADES

4.1. É de responsabilidade do médico do estudo, a coleta adequada, segura e acurada de material medular da crista ílíaca do participante de pesquisa;

4.2. É de responsabilidade do técnico de patologia do estudo, a coleta de sangue periférico adequada e segura de veia periférica do participante de pesquisa;

4.3. É de responsabilidade dos pesquisadores do estudo, o processamento, armazenamento e identificação adequada das amostras biológicas obtidas para o estudo, bem como sua adequada destruição/descarte após finalização da pesquisa.

5. POP'S RELACIONADOS

NA.

6. PROCEDIMENTOS

6.1. Recepção de amostra

Antes de iniciar, verifique se você executou a recepção correta da amostra segundo POP anterior e armazenou todas as alíquotas corretamente.

6.2. Dos 3,2 mL de sangue BM (já centrifugados e plasma armazenado):

- Ressuspender as células com meio iRPMI/Salina 0,9% para obter 50% de hematócrito;
- Separar uma alíquota de 12 μ L para FACS (amostra inteira). Separe em 6 alíquotas de 2 μ L, rotuladas como BL0, BL1, BL2, BL3, BL4 e BL5;
- Filtrar a amostra de medula com um filtro de células de 40 μ m. Usar o meio iRPMI/Salina 0,9% para coletar as gotas restantes de sangue BM do tubo inicial.
- Lavar as gorduras/coágulos com o meio iRPMI antes de descartar o filtro de células, pois estas suspensões contêm muitas células.
- Centrifugar a 400g 10min, descartar o sobrenadante e ressuspender em 50% de hematócrito.

6.3. Marcação magnética

- Trabalhe rápido, mantenha as células frias (4°C) e use soluções pré-resfriadas. Isso impedirá o capeamento de anticorpos na superfície celular e a marcação celular não específica.
- Adicionar 50 μ L de MicroBeads CD71 para cada 1 ml de suspensão a 50%;
- Misturar bem e incube por 15 minutos a 4°C (trabalhar com temperaturas mais altas e/ou tempos de incubação mais longos leva a uma marcação celular não específica). Misturar a cada 5min.
- Lavar as células adicionando 7mL de iRPMI/Salina 0,9% e centrifugar a 400g 10min. Aspirar completamente o sobrenadante.
- Ressuspender no meio iRPMI/Salina 0,9% até 30% de hematócrito, pois o sangue BM é uma amostra mais densa e as colunas podem entupir (por exemplo, 300 μ L de sedimento celular, 5 mL de iRPMI/Salina 0,9%);
- Proceda à separação magnética.

6.4. Separação magnética com colunas LS

- Colocar a coluna no campo magnético de um separador MACS adequado;
- Preparar a coluna rinçando previamente com 3 ml de meio iRPMI/Salina 0,9%);
- Aplicar suspensão de célula na coluna (é importante obter uma suspensão de célula única antes da separação magnética, os aglomerados podem entupir a coluna);
- Coletar o fluxo e lavar a coluna com 3 ml de meio iRPMI. Execute esta etapa de lavagem 3 vezes (adicione um novo tampão (iRPMI/Salina 0,9% apenas quando o reservatório da coluna estiver vazio).
- Remover a coluna do separador e colocar em um tubo de coleta adequado;
- Colocar 5 ml de meio iRPMI/Salina 0,9% na coluna;
- Lavar imediatamente as células marcadas magneticamente, empurrando firmemente o êmbolo para dentro da coluna. (Para aumentar a pureza da fração magneticamente marcada, você pode passar as células por uma nova coluna preparada na hora);
- Centrifugar 400g 10min em ambas as frações: CD71+ e fração FT (filtrado);
- Descartar o sobrenadante e ressuspender em 50% de hematócrito.
- Contar o número de células da fração de células CD71 +;
- Aliquotar 2 alíquotas de $2-5 \times 10^7$ células e armazenadas em Trizol (1:10) a -80°C para extração de RNA (etiqueta R1 e R2);
- 1 alíquota de 10^6 células, ressuspender as células no fixador 2,5% de Glutaraldeído 0,1M Cacodilato de sódio e armazenar a 4°C (etiqueta M);

- 1-2 alíquota de 10^6 células, ressuspender as células no fixador PBS 1% de formaldeído, 30 minutos a 4°C. Lavar 3 vezes e guardar a 4°C;

- 5 alíquotas de 10^6 células, rotuladas como BL6, BL7, BL8, BL9 e BL10 para análise de FACS.

7. REFERÊNCIAS

Guia do fabricante; Disponível em:

<http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001200/IM0001286.ashx>

8. LISTA DE ANEXOS

NA.

9. ANEXOS

NA.

7.6. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - 03

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão 01	
Título	Análise por citometria de fluxo (FACS) de amostras do projeto ANBM		
Língua do Documento	PT		
Elaborado por: Marcelo Brito Bàrbara Baro	Revisado por: Gisely Melo	Aprovado por: Marcus V G Lacerda	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas

1. OBJETIVO

O objetivo deste POP é descrever os procedimentos para a contagem celular por citometria de fluxo nas amostras do projeto ANBM

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Gerência de Malária; Laboratório Multidisciplinar; Centros colaboradores.

3. DEFINIÇÕES

Medula óssea: Tecido mole que preenche as cavidades dos ossos. A medula óssea apresenta-se de dois tipos, amarela e vermelha. A medula amarela é encontrada em cavidades grandes de ossos grandes e consiste em sua grande maioria de células adiposas e umas poucas células sanguíneas primitivas. A medula

vermelha é um tecido hematopoiético e é o sítio de produção de eritrócitos e leucócitos granulares. A medula óssea é constituída de uma rede em forma de treliça, de tecido conjuntivo, contendo fibras ramificadas e preenchida por células medulares.

Sangue periférico: Líquido corporal que circula no sistema vascular (VASOS SANGUÍNEOS). O sangue total compreende o PLASMA e as CÉLULAS SANGUÍNEAS.

4. RESPONSABILIDADES

4.1. É de responsabilidade do médico do estudo, a coleta adequada, segura e acurada de material medular da crista íliaca do participante de pesquisa;

4.2. É de responsabilidade do técnico de patologia do estudo, a coleta de sangue periférico adequada e segura de veia periférica do participante de pesquisa;

4.3. É de responsabilidade dos pesquisadores do estudo, o processamento, armazenamento e identificação adequada das amostras biológicas obtidas para o estudo, bem como sua adequada destruição/descarte após finalização da pesquisa.

5. POP'S RELACIONADOS

NA.

6. PROCEDIMENTOS

6.1. Recepção de amostra

Antes de iniciar, verifique se você executou a recepção correta da amostra segundo POP anterior e armazenou todas as alíquotas corretamente.

6.2. Alíquotas para FACS

- Para o sangue periférico, 6 alíquotas de 5 µL:

a) PL0 = controle negativo (sem rótulo)

b) PL1 = CD71-PE + CD235a-APC

c) PL2 = anti-plasmódio

d) PL3 = anti-plasmódio secundário

e) PL4 = anti-plasmódio + anti-plasmódio secundário

f) PL5 = CD71-PE + CD235a-APC + anti-plasma + segundo anti-plasma

- Para as alíquotas de medula óssea:

a) BL0 = sangue total, controle negativo (sem marcação)

b) BL1 = sangue total, CD71-PE + CD235a-APC

c) BL2 = sangue total, anti-plasmódio

d) BL3 = sangue total, anti-plasmódio secundário

e) BL4 = sangue total, anti-plasmódio + anti-plasmódio secundário

f) BL5 = sangue total, CD71-PE + CD235a-APC + anti-plasmódio + segundo anti-plasmódio

g) BL6 = fração CD71, CD71-PE + CD235a-APC

h) BL7 = fração CD71, anti-plasmódio

i) BL8 = fração CD71, anti-plasmódio secundário

j) BL9 = fração CD71, anti-plasmódio + anti-plasmódio secundário

k) BL10 = fração CD71, CD71-PE + CD235a-APC + anti-plasmódio + seg. Anti-plasma

6.3. Marcação com anticorpos específicos:

- Primeiro, executar a marcação de CD71 (CD71-PE) e GlyA (CD235a-APC);

- Utilizar $1-5 \times 10^6$ células por amostra;

-LP2: 1/25 Ab LP2 em iRPMI/Salina 0,9% - use 8 μ L de diluição por tubo - 15 a 20 minutos na geladeira (8°C)

- 1 x lavagem em 500 μ L de RPMI/Salina 0,9%

- Cocktail 1: CD71-PE / CD235a-FITC / EPOR-APC: 1/20 em RPMI/Salina 0,9% - 10 μ L / tubo - 15 min na geladeira (8 ° C)

• Cocktail 2: CD71-PE / CD235a-APC: 1/20 CD71 e 1/100 CD235a-APC em RPMI/Salina 0,9% - 10 μ L / tubo - 15 min em geladeira (8 ° C);

-1 x lavagem em 500 μ L de RPMI

-Ressuspender em 200 μ L de PBS

7. REFERÊNCIAS

Guia

do

Fabricante:

<http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001200/IM0001286.ashx>

8. LISTA DE ANEXOS

NA.

9. ANEXO

NA.

7.7. PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - 04

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão 01	
Título	Extração de RNA de amostras biológicas armazenadas em Trizol® (Invitrogen) (Projeto ANBM)		
Língua do Documento	PT		
Elaborado por: Marcelo Brito Bàrbara Baro Carmen Becerra	Revisado por: Gisely Melo	Aprovado por: Marcus V G Lacerda	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas

1. OBJETIVO

O objetivo deste POP é a extração adequada de RNA de alta qualidade para sequenciamento em amostras de aspirado de medula óssea e sangue periférico pertencentes ao projeto ANBM e projetos futuros.

2, CAMPO DE APLICAÇÃO

Gerência de Malária; Laboratório Multidisciplinar; Centros colaboradores.

3. DEFINIÇÕES

Medula óssea: Tecido mole que preenche as cavidades dos ossos. A medula óssea apresenta-se de dois tipos, amarela e vermelha. A medula amarela é encontrada em cavidades grandes de ossos grandes e consiste em sua grande maioria de células adiposas e umas poucas células sanguíneas primitivas. A medula vermelha é um tecido hematopoiético e é o sítio de produção de eritrócitos e leucócitos granulares. A medula óssea é constituída de uma rede, em forma de treliça, de tecido conjuntivo, contendo fibras ramificadas e preenchida por células medulares.

Sangue periférico: Líquido corporal que circula no sistema vascular (VASOS SANGUÍNEOS). O sangue total compreende o PLASMA e as CÉLULAS SANGUÍNEAS.

RNA: Polinucleotídeo que consiste essencialmente em cadeias contendo unidades repetidas de uma estrutura de fosfato e ribose às quais as bases nitrogenadas encontram-se unidas. O RNA é único entre as macromoléculas biológicas pelo fato de codificar informação genética, servir como um componente celular estrutural abundante e também possuir atividade catalítica.

TRIZOL: Solução química usada na extração de DNA, RNA e proteínas das células. A solução foi usada inicialmente e publicada por Piotr Chomczyński e Sacchi, N. em 1987. TRIZOL é a marca do tiocianato de guanidínio.

4. RESPONSABILIDADES

4.1. É de responsabilidade do médico do estudo, a coleta adequada, segura e acurada de material medular da crista ilíaca do participante de pesquisa;

4.2. É de responsabilidade do técnico de patologia do estudo, a coleta de sangue periférico adequada e segura de veia periférica do participante de pesquisa;

4.3. É de responsabilidade dos pesquisadores do estudo, o processamento, armazenamento e identificação adequada das amostras biológicas obtidas para o estudo, bem como sua adequada destruição/descarte após finalização da pesquisa.

5. POP'S RELACIONADOS

NA.

6. PROCEDIMENTOS

6.1. Ressuspenda o sedimento da sua amostra (parasitas, células ...) em 1ml de TRIZOL (alternativamente, ressuspenda em 250 µl de meio (RPMI, DMEM.... + 750 µl de TRIZOL-LS) e incube por 5 minutos em temperatura ambiente. Como alternativa, a amostra ressuspensa em Trizol pode ser mantida a -80°C ou -20°C por tempo indeterminado até o uso;

6.2. Adicione 200 µl de clorofórmio P.A. e homogeneize vigorosamente por 15s e incube por 5-15 min em temperatura ambiente;

6.3. Centrifugue a 12.000g por 15 min a 4 ° C;

6.4. Transfira o sobrenadante para um novo tubo com 500 µl de isopropanol P.A. e incube por 10 minutos em temperatura ambiente;

6.5. Centrifugue a 12.000g por 10 min a 4°C;

6.6. Descarte o sobrenadante e lave com 1 ml de etanol a 75% (7500g por 5 min a 4°C);

6.7. Ressuspenda o sedimento no volume desejado de H₂O DEPC ou Formamida e deixe em um bloco térmico a 65°C por 3-5 minutos, depois agite no vórtex por 2 minutos e ressuspenda por inversão;

6.8. Quantifique em GenQuant ou Nanodrop 1ul de Amostra + 5ul de H₂O DEPC;

6.9. Analise a qualidade do RNA no gel de agarose;

6.10. Deixe todo o material (Cuba, base e pente) em SDS 1% por 1 h, lave com H₂O RNase livre (H₂O MilliQ alternativamente estéril também pode ser usado, (pois é necessário um grande volume) e seque com etanol a 70%;

6.11. Prepare um gel de Agarose 0,5X TBE 1% (todas as soluções e reagentes sem RNase);

6.12. Coloque em cada poço aproximadamente 10% do volume final da sua amostra diluída 1: 1 com o Load Buffer 2X específico para RNA (Fermentas). A amostra, uma vez diluída, deve ser aquecida a 70 ° C por 10 min, rapidamente resfriada em gelo e, depois de girar, aplicar todo o volume no gel.

7. REFERÊNCIAS

7.1. Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15,532-537

7.2. Guia do Fabricante –INVITROGEN(disponível em:

https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf)

8. LISTA DE ANEXOS

NA.

9. ANEXOS

NA.