



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



**ASPECTOS REOLÓGICOS DE ERITRÓCITOS INFECTADOS POR
*Plasmodium vivax***

DAYANNE KAMYLLA ALVES DA SILVA BARROS

MANAUS

2021

DAYANNE KAMYLLA ALVES DA SILVA BARROS

**ASPECTOS REOLÓGICOS DE ERITRÓCITOS INFECTADOS POR
*Plasmodium vivax***

Dissertação 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 título de *Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientadora: **Prof^a Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes**

Co-orientadora: **Dra. Rosa Amélia Gonçalves Santana**

MANAUS

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

B277aa Barros, Dayanne Kamylla Alves da Silva
Aspectos reológicos dos eritrócitos infectados por *Plasmodium vivax*
Manaus : [s.n], 2021. 85 f.: color.; 29 cm.

Dissertação- PGSS- Doenças Tropicais e Infecciosas (Mestrado)
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientadora: Stefanie Costa Pinto Lopes

Coorientadora: Rosa Amélia Gonçalves Santana

1. Malária. 2. *Plasmodium vivax*. 3. Baço. 4. Deformabilidade.

I. Lopes, Stefanie Costa Pinto (Orient.). II. Santana, Rosa Amélia Gonçalves (Coorient.).

II. Universidade do Estado do Amazonas.

III. Aspectos reológicos de eritrócitos infectados por *Plasmodium vivax*

FOLHA DE JULGAMENTO

**ASPECTOS REOLÓGICOS DE ERITRÓCITOS INFECTADOS
POR *Plasmodium vivax***

DAYANNE KAMYLLA ALVES DA SILVA BARROS

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre 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:

Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes

Presidente

Dra. Letusa Albrecht

Membro

Dr. Marcelo Augusto Mota Brito

Membro

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha mãe Nilva Alves da Silva e à minha avó Raimunda Barros.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Stefanie Lopes pelo apoio e paciência. Obrigada por tudo que você acrescentou na minha vida desde a iniciação científica até o mestrado.

À minha coorientadora Dra. Rosa Santana pelo apoio e aprendizado na mosquitolândia.

À minha família que sempre apoiou e incentivou minhas realizações Profissionais, em especial a minha mãe Nilva Alves da Silva.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas em parceria com a Universidade do Estado do Amazonas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pela bolsa de estudo.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado e o Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu amigo Luiz Oliveira por sempre me motivar na minha vida profissional.

Aos meus amigos Bruno Luz, Zianimar Silva, Macejane Ferreira e Luis Salazar que estavam sempre à disposição, dando força e ânimo nos momentos tensos.

Aos colegas de laboratório: Glenda Ramos, Camila Fabbri e Alexandre Trindade pelo apoio e aprendizado.

Aos colegas da pós graduação, Erick Frota, Lucas Barbosa, Rêgila Melo, Amanda Carvalho, Francý's Sayara, Ademir Bentes e Eunice Brandão. Obrigada pelos momentos de descontração.

À todos que compartilharam de mais uma etapa da minha vida profissional e que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização dessa pesquisa.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Meus agradecimentos:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM),
pela concessão de bolsa de pesquisa durante o período de execução deste
Mestrado;

À Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD)
pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoário do gênero *Plasmodium*, tendo como principais espécies responsáveis por essa infecção em humanos, o *Plasmodium falciparum* e o *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), que afetam 228 milhões de pessoas com mais de 400.000 mortes a cada ano. Durante a replicação do parasito no sangue do hospedeiro, o baço é um dos principais órgãos que participa do estabelecimento da resposta imune e eliminação dos parasitos. Em resposta à infecção do parasito, o baço sofre uma série de alterações morfológicas, sendo a mais aparente, o seu aumento, referido como esplenomegalia. Uma das funções fisiológicas do baço é justamente eliminar eritrócitos senescentes e/ou alterados e parte deste reconhecimento se dá pelo aumento de rigidez destas células. Existem diferentes metodologias para avaliar a deformabilidade destas células e em *P.vivax* alguns estudos demonstram que as células infectadas parecem manter o padrão de deformabilidade, enquanto outros sugerem que há perda deste padrão. Este estudo avaliou a deformabilidade de células infectadas contendo diferentes estágios de maturação do parasito. Para isto, foram coletadas trinta amostras de sangue de pacientes diagnosticados com malária vivax atendidos na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado. Destas amostras, em dezesseis foi possível realizar o ensaio de deformabilidade. A avaliação da deformabilidade dos eritrócitos foi realizada através da filtração por microesferas de metal de diferentes tamanhos que mimetizam o processo de filtração do sangue ocorrido no baço. Esta avaliação foi realizada antes e após cultivo do parasita *ex vivo* visando investigar a deformabilidade de diferentes estágios do parasita. E para isso foi analisada a parasitemia e distribuição dos estágios dos parasitos por microscopia e citometria de fluxo nos diferentes tempos (antes e pós cultivo) passando pelas microsfera de metal. Ainda foi avaliada a taxa de hemólise do material antes e após a passagem pelas microsfera de metal em 6 isolados para determinar se havia ruptura das células durante este processo através da leitura de absorbância (560nm) do sobrenadante em espectrofotômetro de placa. Observou-se uma redução na parasitemia das amostras após as filtrações pelas beads, tanto antes (T1) quanto após o amadurecimento (T2) (Teste de Wilcoxon, $P=0,003$ e $P=0,0010$, respectivamente). Todas as células contendo estágios maduros e gametócitos mostraram menor deformabilidade. Não houve hemólise significativa das amostras pela passagem nas beads, não interferindo na avaliação da deformabilidade dos eritrócitos infectados. Nossos dados sugerem que os eritrócitos infectados pelo *P.vivax* perdem a deformabilidade, e esta perda é mais evidente nos esquizontes, e nos gametócitos. Esta perda de deformabilidade deve ter consequências na filtração realizada pelo baço e mais estudos devem ser realizados para elucidar esta característica.

PALAVRA-CHAVE: Malária; *Plasmodium vivax*; Baço; Deformabilidade

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* spp, and the main species responsible for this infection are *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*, which affect 228 million people with more than 400,000 deaths each year. During the replication of the parasite in the host's blood, the spleen is one of the main organs that participate in the establishment of the immune response and elimination of the parasites. In response to parasite infection, the spleen undergoes a series of morphological changes, the most apparent being its enlargement, referred to as splenomegaly. One of the functions of the spleen is precisely to eliminate senescent and/or altered erythrocytes and part of this recognition is due to the increased rigidity of these cells. There are different methodologies to assess the deformability of these cells and in the *P. vivax* *specie* some studies show that infected cells seem to maintain the deformability pattern, while others suggest there is a loss of deformability. This study aims to evaluate the deformability of cells infected by different erythrocytic stages of *P. vivax*. For this purpose, thirty blood samples were collected from patients diagnosed with malaria vivax treated at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Of these samples, it was only possible to carry out the deformability test in sixteen. The evaluation of the deformability of the erythrocytes was carried out through filtration by metal microspheres of different sizes that mimic the blood filtration process exerted by the spleen. This evaluation was performed before and after *ex vivo* parasite cultivation in order to investigate the deformability of different stages of the parasite. For this, the parasitemia and distribution of the parasite stages were analyzed by microscopy and flow cytometry at different time points and before and after passing through the beads. The rate of hemolysis of the material before and after passage through the beads in six isolates was also evaluated to determine if there was cell disruption during this process by reading the absorbance (560nm) of the supernatant in a plate spectrophotometer. A reduction in the parasitemia of the samples was observed after filtration through the beads, both before (T1) and after maturation (T2) (Wilcoxon test, $P=0.003$ and $P=0.0010$, respectively). All stages of the parasite had loss of deformability, being retained by the metal microsphere, however there is greater retention of the schizont and gametocyte stages. There was no significant hemolysis of the samples by passage through the beads, not interfering with the evaluation of the deformability of infected erythrocytes. Our data suggest that erythrocytes infected by *P. vivax* lose deformability, and this loss is more evident in schizonts, and gametocytes. This loss of deformability must have consequences on the filtration performed by the spleen and more studies are necessary to elucidate this characteristic.

KEYWORDS: *Plasmodium vivax*; Spleen; Deformability

RESUMO LEIGO

O estado do Amazonas possui o maior número de casos de malária no Brasil. O principal tipo de malária no país é a malária vivax responsável por 86% dos casos. Essa doença tem como sintomas febre, calafrios, tremores, sudorese e dor de cabeça e é transmitida por um mosquito que quando vai se alimentar de uma pessoa doente pode transmitir para outra pessoa saudável através da picada. Ainda não é bem esclarecida a sua biologia e nem patogenia devido a dificuldade de cultivo desse parasito. A malária falciparum é frequentemente associada a gravidade. Porém, estudos têm demonstrado que a malária vivax pode também causar gravidade. Quando o parasito cai na corrente sanguínea, se desenvolve em diferentes estágios que acaba modificando as hemácias levando a perda da sua habilidade de se deformar dentro dos vasos sanguíneos, tornando-a mais dura, o que pode levar a uma maior dificuldade de passar pela circulação sanguínea do baço ficando ali retida e isso pode levar ao aumento deste órgão. Este estudo teve como objetivo avaliara capacidade das hemácias infectadas de pacientes com malária vivax de se deformar para passar pela circulação no baço. Para isso, foram coletadas amostras de trinta pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-FMT-HVD. Destas, dezesseis foram analisadas com sucesso e os resultados mostraram que as células vermelhas infectadas pelo parasito ficam mais duras e dessa forma devem provavelmente ficar retidas na circulação no baço podendo levar ao aumento do baço e uma possível retirada desse órgão. Mais estudos devem ser realizados para entender a consequência desse acúmulo no baço.

PALAVRA-CHAVE: Malária; *Plasmodium vivax*; Baço; Deformabilidade

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Casos de malária notificados na região Amazônica.Dados de 2018-2020.....	3
Figure 2: Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i>	6
Figura 3. Métodos para investigar a deformabilidade de eritrócitos infectados durante malária.....	10

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Antes da filtração
DF	Depois da filtração
CVC	Complexos Caveola-Vesícula
CSP	Proteína do circunsporozoíto
GiES	Eritrócitos infectados por gametócitos
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
KAHRP	Proteína rica em histidina associada a knob
IPCCB	Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema
MESA	Antígeno de superfície eritrocitária infectado por parasita maduro
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
Pv-iEs	Eritrócitos infectados por <i>P.vivax</i>
Pf-iEs	Eritrócitos infectados por <i>P.falciparum</i>
PfEMP1	Proteína 1 da membrana do eritrócito <i>Plasmodium falciparum</i>
PHIST	<i>Plasmodium</i> helicoidal intercalado subtelomérico
RhopH	Proteínas de alto peso molecular
TRAP	Proteína relacionada à trombospondina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária e Aspectos epidemiológicos	1
1.2 Ciclo Biológico do parasito	2
1.3 Fisiologia do baço	5
1.4 Métodos para avaliar a deformabilidade dos eritrócitos infectados	7
1.4.1 Aspiração por micropipeta	7
1.4.2 Ectacitometria	7
1.4.3 Microfiltração	8
1.4.5. Dispositivos microfluídicos	8
1.5 Deformabilidade dos eritrócitos infectados pelo <i>Plasmodium</i> spp.	10
1.6 Relevância do Estudo	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	18
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	45
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. ANEXOS E APÊNDICES	51

INTRODUÇÃO

1.1 Malária e Aspectos epidemiológicos

Malária é uma das principais doenças parasitárias que afetam principalmente os países tropicais e subtropicais do mundo. É causada por protozoários do gênero *Plasmodium* sendo que existem 7 espécies que já foram detectadas em infecções humanas: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P.knowlesi*, *P. simium* e *P. cynomolgi*. As infecções causadas por *P. falciparum* e *P. vivax* representam um grande desafio para a saúde pública mundial (1).

O *P. falciparum*, a espécie mais letal, tem maior prevalência no continente africano. Dentre as espécies causadoras de malária humana, *P. vivax* é a que apresenta maior distribuição geográfica. Sua transmissão é vetorial, através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* durante o seu repasto sanguíneo. Existem mais de 400 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles*, no entanto, apenas 40 são vetores de importância médica. Nas Américas, as espécies de anofelinos predominantes são: *Anopheles albimanus*, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles freeborni*, *Anopheles marajoara*, *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles pseudopunctipennis* e *Anopheles quadrimaculatus*. Sendo o *Anopheles darlingi* o principal vetor no Brasil (2).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 229 milhões de novos casos da doença foram notificados no mundo apenas em 2019, além da ocorrência de mais de 409 mil óbitos. Na Região das Américas, nesse mesmo ano ocorreram 889.000 casos e 551 óbitos, dos quais quase 72,3% desses casos foram causados por *P. vivax*. O Brasil, Colômbia e Venezuela respondem por 86% de todos os casos nesta região (1).

Em 2019 o Brasil notificou 157.454 casos de malária, uma redução de 19,1% em relação a 2018, quando foram registrados 194.572 casos da doença no País. A região Amazônica é considerada a área endêmica do país para malária com 99% dos casos autóctones, ou seja, naturais da região, sendo a maioria causado por *P.vivax* (5). A região Amazônica brasileira compreende os Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, sendo que o Amazonas é o estado com maior número de casos de malária (Figura 1).

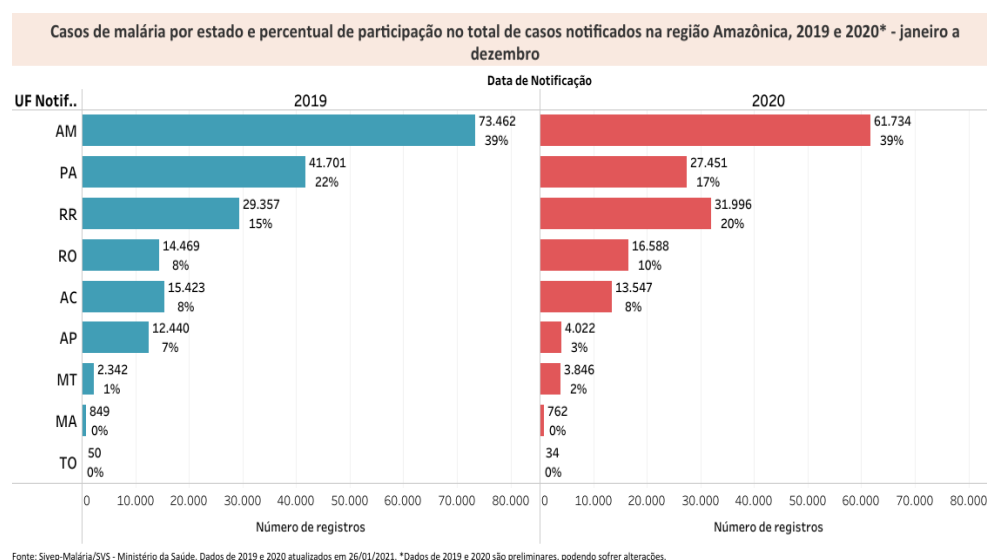


Figura 1: Casos de malária notificados por Estado na Região Amazônica. O gráfico mostra que o Estado do Amazonas apresenta a maioria dos casos notificados de malária. **Fonte:** Sivep-Malária/SVS-Ministério da Saúde. Dados de 2019 e 2020 atualizados em 26/01/2021.

A letalidade por malária na região Amazônica é baixa, enquanto no restante do país pode ser 100 vezes maior. O óbito nestas áreas ocorre, na maior parte, em pessoas que vêm infectadas de outros países ou de estados fora da região Amazônica e não recebem o diagnóstico e tratamento oportunos e adequados devido à dificuldade na suspeição de uma doença relativamente rara nestas áreas e desinformação dos viajantes a respeito dos seus riscos (5).

1.2 Ciclo Biológico do parasito

O ciclo do *Plasmodium* acontece em duas etapas, sendo a fase assexuada no homem (hospedeiro intermediário) e a fase sexuada na fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* (hospedeiro definitivo) (Figura4). As

infecções por malária humana começam quando o mosquito infectado faz o seu repasto sanguíneo, liberando esporozoítos na pele onde podem estes permanecer por horas antes de chegarem à corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos então atravessam as células endoteliais sinusoidais do fígado ou células de Kupffer para infectar os hepatócitos (6,7). A invasão dos esporozoítos aos hepatócitos é atribuída a duas proteínas principais que são a proteína do circunsporozoíto (CSP) e a proteína relacionada à trombospondina (TRAP) que reconhecem não apenas proteoglicanos nos hepatócitos, mas também nas células de Kupffer e células estreladas permitindo a invasão do parasito (6).

O processo da duração da esquizogonia pré-eritrocítica pode permanecer por 9 a 16 dias dependendo da espécie de *Plasmodium* e milhares de merozoítos são produzidos ao final do processo dentro do vacúolo parasitóforo. Entretanto, na fase hepática, *P. vivax* e *P. ovale* podem desenvolver uma forma latente chamada hipnozoíto, que pode causar infecções após semanas, meses ou até mesmo anos inativas (8). Após o amadurecimento do parasito nos hepatócitos, ocorre a liberação em vesículas contendo parasitos (merossomos) através da invaginação deste nos vasos sanguíneos e então os merossomos são liberados lentamente e invadem a sua célula alvo (9).

O ciclo eritrocítico inicia-se com a invasão dos merozoítos nos eritrócitos. A extremidade apical do merozoíto contém organelas e estruturas, incluindo micronemas e roptrias, que facilitam a sua invasão após o contato com os eritrócitos. Essa remodelação da célula hospedeira fornece ao parasito um nicho no qual pode obter nutrientes necessários para o desenvolvimento e divisão, bem como fornece um meio de escapar do sistema imunológico do hospedeiro (10).

Dentro dos eritrócitos, os parasitos se diferenciam em trofozoítos jovem (formato de anel) depois trofozoítos maduros e finalmente replicam dentro da célula do hospedeiro no estágio de esquizontes. Essa divisão assexuada que

ocorre dentro dos eritrócitos leva de 24 a 72 horas, dependendo da espécie, gerando novos merozoítos que serão novamente liberados na corrente sanguínea e infectando outros eritrócitos. No caso do *P. vivax* a invasão ocorre exclusivamente nos reticulócitos. Os eritrócitos infectados quando rompidos liberam subprodutos do metabolismo do parasito, como a hemozoína (pigmento malárico) formada quando o parasito digere a hemoglobina (11).

Durante os ciclos de esquizogonia na corrente sanguínea, uma proporção de parasitos passa por um processo inicial de diferenciação denominado gametocitogênese que culmina na produção de gametócitos masculinos e femininos, distintos entre si e das formas assexuadas pela morfologia peculiar, sendo estas as únicas formas capazes de se desenvolver nos mosquitos (11).

O ciclo no mosquito vetor (hospedeiro definitivo) começa quando a fêmea do *Anopheles* faz o repasto sanguíneo e ingere esses gametócitos. Seguindo sua ingestão após a picada, os gametócitos passam por ativação no intestino do inseto, com divisão nuclear do gametócito masculino, gerando até 8 microgametas flagelados, e portanto móveis, e cada um destes pode fertilizar um macrogameta feminino, estacionário. A fusão ocorre dando origem ao zigoto, caracteristicamente diploide. O zigoto sofre meiose e em cerca de 24 horas se diferencia assumindo mobilidade e sendo então denominado de oocineto, que penetra a parede do intestino do mosquito onde se encista e se transformará em oocisto (11).

Dentro dos oocistos, os esporozoítos se desenvolvem ao longo de 8 a 15 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium*. Os oocistos maduros liberam os esporozoítos na hemolinfa. Dentro da hemolinfa, os esporozoítos são transportados por toda a cavidade corporal, mas parecem interagir especificamente e entrar nas glândulas salivares, cruzando a lâmina basal que circunda esse órgão e passando pelas células acinares produtoras de saliva. Os esporozoítos se acumulam nas cavidades salivares, de onde também podem se mover para os estreitos dutos salivares que se conectam a

proboscide e com a picada do mosquito, esses esporozoítos serão inoculados novamente no hospedeiro vertebrado, perpetuando o ciclo do parasito (12,13).

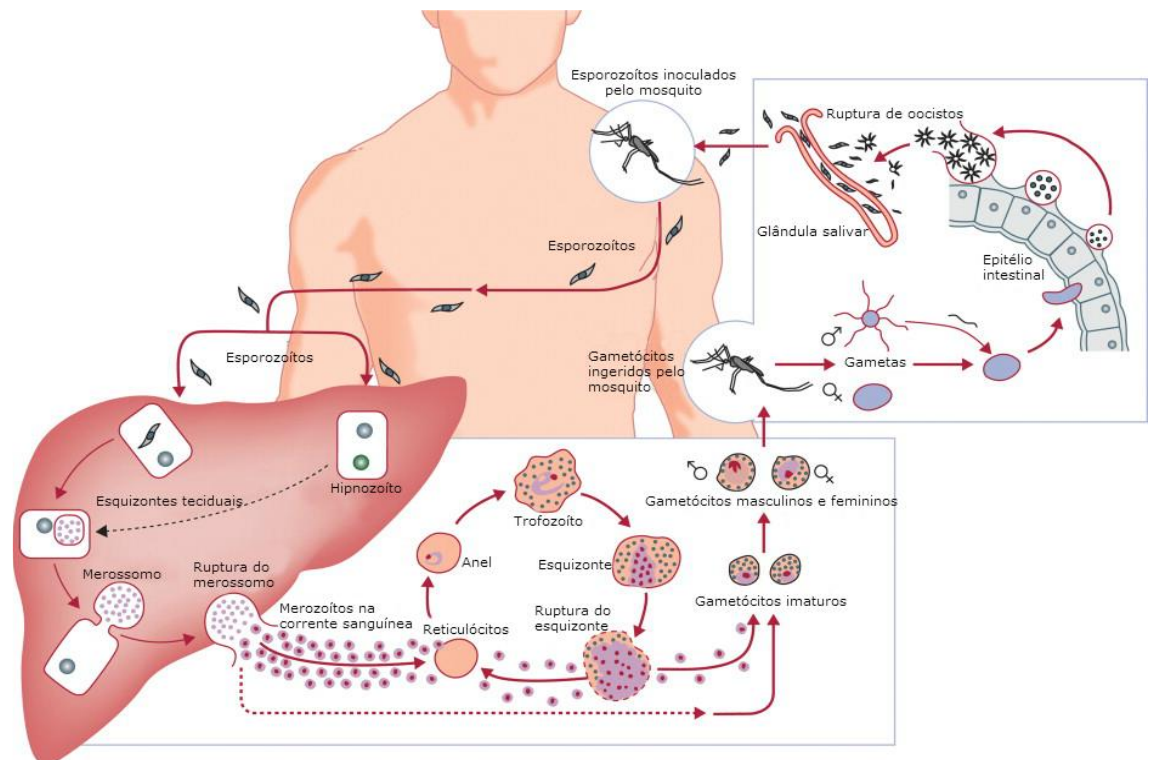


Figura 2: Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*. Adaptado de Mueller et al., 2009. Uma vez que os esporozoítos são inoculados na pele pelas fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, eles atingem a corrente sanguínea e entram nos hepatócitos, iniciando o estágio exoeritrocítico. Dentro do fígado, o *P. vivax* pode se diferenciar em esquizontes de tecido, que após milhares de replicações mitóticas em hepatócitos individuais liberam merozoítos na corrente sanguínea, ou se diferenciar para um estágio dormente denominado hipnozoíto que, após ativação após meses ou anos, causa sintomas clínicos recaída. Durante os estágios eritrocíticos, os merozoítos de *P. vivax* invadem exclusivamente reticulócitos. Além disso, alguns parasitas do *P. vivax* podem se diferenciar em gametócitos, ao serem absorvidos pela alimentação sanguínea pelas fêmeas dos mosquitos *Anopheles* iniciam o ciclo sexual, que inclui a liberação dos gametas masculino e feminino, fertilização e formação de um oocineto móvel que atravessa o epitélio do intestino médio. A diferenciação em uma nova forma replicativa conhecida como oocisto, liberação de esporozoítos, migração e invasão das glândulas salivares.

1.3 Fisiologia do baço

O baço desempenha um papel fundamental nas respostas imune inata e adaptativa, na eliminação seletiva de glóbulos vermelhos (eritrócitos)

envelhecidos ou anormais e na remoção de patógenos presentes no sangue. Também é fundamental para a fisiopatologia de várias doenças frequentes e potencialmente graves, como distúrbios hereditários da membrana dos glóbulos vermelhos, anemias hemolíticas e malária (14,15).

Em relação à microcirculação esplênica, 5% do sangue que circula no coração passa pelo baço, dessa forma um volume de cerca de 25 mL por minuto passa por este órgão. Portanto, um eritrócito atravessa o baço, em média, a cada 20 minutos. Da artéria esplênica, os eritrócitos fluem para a artéria central de tamanho médio e, em seguida, entram em microcirculações paralelas, rápidas ou lentas. Na microcirculação rápida, os eritrócitos transitam da zona perifolicular para o lúmen do seio venoso por meio de desvios diretos e são expostos a desafios mecânicos não marcadamente diferentes dos que operam nos capilares (16).

A velocidade dos eritrócitos é aproximadamente vinte vezes maior na microcirculação rápida do que na lenta. Na microcirculação aberta lenta, os eritrócitos navegam nos cordões da polpa vermelha antes de retornar aos leitos vasculares, comprimindo entre as células endoteliais na parede dos seios da face (17). O cruzamento de fendas interendoteliais esplênicas é o desafio mais rigoroso na deformabilidade de hemácias no corpo e pode resultar na retenção de hemácias menos deformáveis ou na remoção de corpos intraeritrocíticos (ou seja, corrosão) (16).

Ao contrário dos capilares em forma de canal, os leitos microcirculatórios labirínticos nos cordões são desprovidos de endotélio, daí o nome de microcirculação aberta. Esta microcirculação lenta e aberta é responsável por 10% a 20% do fluxo de hemácias do baço. O controle de qualidade da deformabilidade de hemácias ocorre, portanto, em média, a cada 100-200 minutos, consistente com a depuração de meia-vida de 60 minutos de hemácias fortemente aquecidas observada em indivíduos saudáveis (17).

A deformabilidade dos eritrócitos depende de três parâmetros: (i) a elasticidade da membrana que é principalmente dependente dos componentes do citoesqueleto (remodelação do citoesqueleto), (ii) a viscosidade citoplasmática que depende do íon intracelular e da concentração / estado de hemoglobina, e (iii) a redução progressiva na razão entre a superfície e o volume impulsionada pela perda de membrana. O equilíbrio entre esses três parâmetros pode ser alterado durante a malária (18).

1.4 Métodos para avaliar a deformabilidade dos eritrócitos infectados

1.4.1 Aspiração por micropipeta

As propriedades mecânicas dos eritrócitos podem ser estudadas por meio de aspiração por micropipeta, inicialmente descrita como um “elastímetro celular”, no qual a superfície da célula é aspirada para a boca de uma pipeta de vidro (Figura 3A). O comprimento da célula é quantificado com uma precisão de $\pm 25\text{nm}$ (19).

A aspiração por micropipeta requer treinamento e é um método de célula única exigente. Eritrócitos infectados por *P. falciparum* em estágio de anéis e estágios maduros requerem 1,5 e 4-6 vezes mais pressão do que eritrócito normal para entrar em pipetas de $3\mu\text{m}$ de largura, respectivamente (20). Ensaios de aspiração de micropipeta mostraram que as proteínas do parasita KAHRP e PfEMP3 contribuem para a rigidificação da membrana do eritrócito infectado maduro (21).

1.4.2 Ectacitometria

Este método forneceu a primeira demonstração de uma deformabilidade reduzida de eritrócito infectado que pode induzir sua retenção no baço. A ectacitometria usa um Analisador Ótico Rotacional de Células Vermelhas Assistido por Laser para medir o padrão de difração de eritrócito cisalhado ressuspenso em um meio viscoso a 37°C para determinar seu índice de alongamento (EI). Ele mede rapidamente a deformabilidade média de uma população de eritrócito (Figura 3B).

A ectacitometria tem sido amplamente utilizada para avaliar a deformabilidade de hemácias em condições patológicas, tanto em distúrbios hereditários de hemácias quanto na malária (22).

1.4.3 Microfiltração

A microfiltração foi projetada para simular a retenção mecânica de eritrócitos conforme eles cruzam fendas interendoteliais no baço humano. Microesferas de metal calibradas com 5–25 μm de diâmetro, dão forma a uma matriz que avalia a deformabilidade de eritrócitos infectados misturado com os eritrócitos normais (Fig. 3C). As proporções a montante (antes da passagem) e a jusante (após a passagem) dos eritrócitos infectados (ou seja, parasitemia quantificada em esfregaços corados com Giemsa ou por citometria de fluxo) permitem o cálculo de uma taxa de retenção (23)

Neste sistema baseado em microesferas, as taxas de retenção aumentadas correspondem à deformabilidade desses eritrócitos infectados diminuída (23).

1.4.5. Dispositivos microfluídicos

Dispositivos microfluídicos acoplados à microscopia são ferramentas poderosas para explorar como eritrócitos se comportam em capilares ou fendas esplênicas, em fisiologia e doença, incluindo a malária. Observação usando dispositivos microfluídicos foram combinados com simulações *in silico* para prever a deformabilidade dos eritrócitos (Figura 3D).

As taxas de retenção dos eritrócitos ou tempo de trânsito deles através do dispositivo são as principais leituras, os espaços circulatórios dentro dos chips podem ser projetados para imitar capilares ou fendas esplênicas com

tamanhos homogêneos ou para entrar em canais / fendas com largura decrescente (24). Enquanto os eritrócitos não infectados cruzam facilmente fendas de 2 μm de largura, o esquizonte de *P. falciparum* são geralmente bloqueado em constrições de 2–5 μm (25).

A microfluídica mostrou o forte contraste entre o eritrócito infectado do *P. falciparum* rígido e o eritrócito infectado do *P. vivax* deformável em seu respectivo estágio maduro, o que pode explicar por que uma proporção de *P. vivax* circulante escape da depuração esplênica (26).

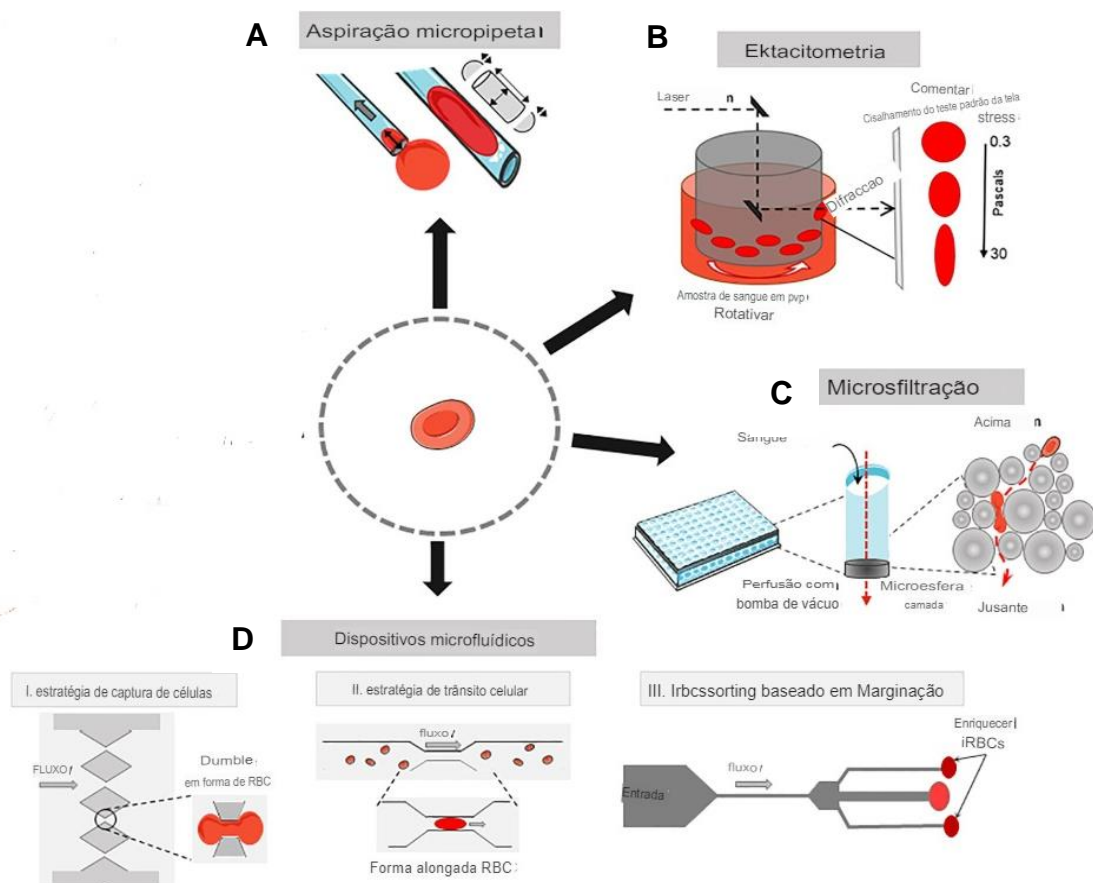


Figura 3. Métodos para investigar a deformabilidade de eritrócitos infectados durante a malária (27). (A) Aspiração de micropipeta: A superfície de um único eritrócito é aspirada para a boca de uma pipeta de vidro enquanto as pressões de sucção são aplicadas. Quando o eritrócito é parcialmente aspirado, o comprimento da língua informa sobre a deformabilidade da membrana na área local correspondente. Quando todo o eritrócito é aspirado, o volume e a superfície podem ser calculados considerando o eritrócito como dois hemisférios separados por um cilindro. (B) Ektacitometria: o padrão de difração de um feixe de laser através de uma

população de eritrócito diluída em meio viscoso (PVP) e submetida a um fluxo de cisalhamento de 0,3 a 30 Pa, fornece o índice de alongamento do eritrócito infectado. (C) Microfiltração: Avalia a capacidade do eritrócito de se espremer através de fendas estreitas entre as microesferas metálicas sob fluxo, imitando a filtração esplênica. A fração retida é calculada a partir das concentrações a montante e a jusante da população de interesse. (D) Microfluídica: O controle do fluxo de fluido é feito por meio de microbombas / microválvulas, então o comportamento de um único eritrócito é rastreado por vídeo microscopia em um biochip de polidimetilsiloxano (um polímero orgânico à base de silício, PDMS) projetado especificamente.

1.5 Deformabilidade dos eritrócitos infectados pelo *Plasmodium* spp.

Durante o amadurecimento e esquizogonia de *Plasmodium* spp. Dentro das hemácias diversas alterações na célula infectada são observadas, havendo remodelação de citoesqueleto, transporte para ou da membrana celular de proteínas do hospedeiro e do parasita. Tudo isto pode levar a mudanças no padrão de deformabilidade destas células infectadas podendo culminar com sua remoção ao passar pela filtração no baço ou conferir algum mecanismo de escape e sobrevivência do parasita (28).

No processo de invasão do *P. falciparum* à célula do hospedeiro com o intuito de se replicar e perpetuar a espécie, durante o ciclo intraeritrocítico de 48 horas ocorrem modificações da membrana eritrocitária e no citoesqueleto, levando-a uma deformação substancial dos eritrócitos antes discoides, que se tornam mais esféricos. Para evitar a depuração esplênica, o parasita realiza o sequestro no revestimento endotelial dos capilares no tecido profundo. Para que a citoadesão ocorra, o parasita produz proteínas adesivas que são transportadas para a membrana da célula hospedeira e são ancoradas em complexos ao citoesqueleto do eritrócito infectado (29).

Na fase final do ciclo intraeritrocítico a liberação dos merozoítos fazem com que o citoesqueleto e a membrana do eritrócito infectado sejam destruídos. Cada estágio tem seus próprios requisitos; por meio da remodelação da célula hospedeira, o parasita atende a esses requisitos, e as

proteínas exportadas do parasita desempenham um papel fundamental nesses processos (29).

Estágio de Anel

A primeira metade do ciclo de desenvolvimento intraeritrocítico é conhecida como estágio do anel. Poucos minutos após a invasão, o parasita começa a exportar proteínas para a célula hospedeira, um processo contínuo até o final do ciclo de desenvolvimento de 48 horas. Uma das primeiras proteínas exportadas é o antígeno de superfície de eritrócito infectado com anel de proteína *Plasmodium* helicoidal intercalado subtelmérico (PHIST), que é descarregado dos grânulos densos no vacúolo parasitóforo e, em seguida, exportado para a célula hospedeira (10).

Os membros da família de proteínas de alto peso molecular (RhopH) desempenham um papel duplo. Eles são liberados das roptrias durante a invasão e, então, são encontrados ao longo do ciclo intraeritrocítico na periferia do eritrócito infectado, desempenhando um papel na captação de nutrientes. O citoesqueleto do hospedeiro múltiplo e as proteínas do parasita exportadas foram identificados como potenciais parceiros de interação, sugerindo que as proteínas RhopH podem estar envolvidas na remodelação da célula hospedeira. As modificações do citoesqueleto observadas nessa fase de invasão são reversíveis e não destrutivas (30,31).

Transição do estágio do anel para o trofozoíto

A transição do estágio do anel para o trofozoíto ocorre por volta de 16 a 24 h após a invasão e é marcada por múltiplas mudanças no eritrócito infectado. Durante essa fase a proteína de antígeno de superfície eritrocitária infectado por parasita maduro (MESA) está envolvida na reestruturação do citoesqueleto do eritrócito infectado. A MESA compete com a proteína hospedeira p55 pela ligação à banda 4.1, uma proteína envolvida na estabilização da rede espectrina-actina, fornecendo uma possível explicação

para a geração de extremidades de espectrina livres que são então usadas para ancorar botões ao citoesqueleto (32).

Formação dos Knobs

Knobs são saliências na superfície do eritrócito infectado formadas por uma camada densa de elétrons embaixo da membrana do eritrócito infectado, consistindo em um complexo de proteínas dominado pela proteína rica em histidina associada a knob (KAHRP) e uma estrutura espiral subjacente. Knobs foram relatados em associação com junções citoesqueléticas, embora nem todas as junções mostras sem a presença de knobs, além de ser essencial para a formação dos Knobs, e para a ligação de espectrina, actina, e banda de 4.1 (33).

A função mais importante dos Knobs é ancorar a proteína 1 da membrana do eritrócito *Plasmodium falciparum* (PfEMP1), que se acumula na superfície do eritrócito infectado por volta de 16 a 20 horas após a infecção. O PfEMP1 medeia a citoadesão ao revestimento endotelial dos capilares e o sequestro de eritrócitos infectados está ligado à malária grave, tornando o PfEMP1 o principal fator de virulência do *P. falciparum* (34,35).

Outras proteínas exportadas localizam-se perto dos Knobs e podem fazer ligações cruzadas ou ancorá-los ao citoesqueleto e desempenhar um papel na integridade estrutural e na forma dos Knobs. As proteínas PHIST têm sido implicadas como ligantes entre as proteínas do citoesqueleto e as proteínas do parasita exportadas (36).

Estágio de trofozoíto

Durante o estágio do trofozoíto, poucas mudanças importantes na célula hospedeira parecem ocorrer. Devido à maior parte da remodelação do citoesqueleto ter ocorrido durante a transição do anel para o trofozoíto, algumas dessas mudanças continuam gradualmente ao longo do estágio do trofozoíto e provavelmente até a saída. Os primeiros Knobs aparecem por volta

de 20h, e seus números aumentam linearmente enquanto seu tamanho diminui até 36h, o que marca o fim do estágio de trofozoíto (37,38).

Estágio de Esquizonte

Durante o estágio de esquizontes, células-filhas são produzidas, que subsequentemente reinfestarão novas células hospedeiras. Uma série de replicações do genoma e divisões nucleares ocorrem, e merozoítos individuais são formados por segmentação. A síntese de proteínas durante esta fase é focada em proteínas de merozoítos e proteínas que são necessárias para a invasão (39). Proteínas associadas a complexos juncionais, como aducina e tropomiosina, também são perdidas do citoesqueleto, indicando que ocorre alguma remodelação ou desmontagem. Isso é acompanhado por um aumento no tamanho da malha de espectrina e o aparecimento temporal de orifícios no citoesqueleto. A destruição final e completa do citoesqueleto antes da saída é um processo rápido e bem orquestrado (40,41).

Estágio de Gametócito

As mudanças morfológicas nos gametócitos parecem ser causadas principalmente por mudanças no próprio citoesqueleto do parasita e em seu complexo de membrana interna contribuindo principalmente para mudanças na rigidez celular durante o desenvolvimento sexual (42).

O citoesqueleto de eritrócitos infectados por gametócitos (GIEs) é direcionado durante o desenvolvimento sexual, com remodelação de actina ocorrendo quando gametócitos em estágio III e V. O número de junções de actina é reduzido em 18% no estágio III em comparação com o estágio I, o tamanho da malha de espectrina aumenta consideravelmente até o estágio III e a mobilidade lateral da banda 3 é reduzida, tudo levando à deformabilidade diminuída dos GIEs, o grau de deformabilidade reduzida é semelhante ao dos trofozoítos (42). Foi demonstrado que o resíduo de serina S₃₂₄ da proteína STEVOR (SubTEIomeric Variable Open Reading frame), que se liga ao

citoesqueleto da célula hospedeira e está presente apenas em *P. falciparum*, é fosforilada durante os estágios I a IV (43).

Durante o desenvolvimento dos gametócitos do estágio I ao IV, as alterações morfológicas são acompanhadas por um aumento constante da rigidez, levando ao sequestro na medula óssea e no baço (44). O processo de sequestro de gametócitos até o final do estágio IV é praticamente desconhecido, mas PfEMP1 é observado em níveis muito baixos no estágio I, e os GIEs não têm knobs na superfície. Portanto, é provável que a família de proteínas STEVOR possa desempenhar um papel essencial no sequestro de gametócitos de *P. falciparum* (45).

Para circular, os GIEs devem se tornar flexíveis novamente, e as etapas de remodelação anteriores até o estágio III parecem ser revertidas no estágio V. No estágio V, a largura da rede de espectrina diminui, a deformabilidade aumenta repentinamente e a mobilidade lateral da banda 3 e o número de junções de actina aumentam novamente para níveis comparáveis aos de hemácias não infectadas (42). Consequentemente, as modificações nos gametócitos parecem ser geralmente reversíveis. Mesmo o resíduo S₃₂₄ previamente fosforilado de STEVOR torna-se desfosforilado e se dissocia da membrana GIE (43).

Nos estágios de trofozoíto e esquizontes, a forma da célula hospedeira muda e se sequestra para o revestimento capilar endotelial. Há um aumento na fosforilação, mas em contraste com a fosforilação durante a invasão, não há dissociação parcial e enfraquecimento do citoesqueleto, mas facilita as interações proteína-proteína que contribuem para o aumento da rigidez. Além disso, os produtos metabólicos do parasita exercem estresse oxidativo que também contribui para a rigidificação do citoesqueleto dos eritrócitos infectados (46).

Durante a invasão do *Plasmodium vivax* nos reticulócitos CD71⁺ ocorre uma remodelação dessa célula. Dentro de 6 horas após a invasão os

reticulócitos imaturos CD71 + rígidos são transformado em CD71 deformáveis (47).

Dentro de 8 horas após a invasão surge na superfície do eritrócito infectados as cavéolas de origem parasitária. Essas cavéolas, descritas pela primeira vez na década de 1970 em eritrócitos infectados de *P. vivax*, geralmente estão associadas a numerosas vesículas, e a estrutura combinada é conhecida como complexos cavéola-vesícula (CVCs). Acredita-se que os CVCs estejam envolvidos na endocitose de macromoléculas vitais para o desenvolvimento de *P. vivax* (48).

Em *P. falciparum*, durante o estágio de anel (ou seja, nas primeiras 16–24 h), os eritrócitos infectados sofrem até 9,6% de perda de área de superfície. Mais de 50% das células infectadas por parasitos no estágio de anel são retidas após a transfusão *ex vivo* através de baços humanos (17,23). Esses processos de retenção e acúmulo decorrem da função fisiológica do baço humano de controlar a deformabilidade dos glóbulos vermelhos (20).

Quanto às propriedades reológicas dos eritrócitos infectados, a maturação intraeritrocítica do *P. vivax* tem efeito oposto ao do *P. falciparum*. Eritrócitos infectados por *P. vivax* (Pv-iEs) se tornam mais deformáveis, enquanto eritrócitos infectados por *P. falciparum* (Pf-iEs) se tornam mais rígidos. Este aumento da rigidez em Pf-iEs pode aumentar seu tempo de trânsito através de vasos de pequeno diâmetro da microcirculação, facilitando à citoaderência e evitando a depuração esplênica. O aumento da deformabilidade dos Pv-iEs provavelmente explica por que essas células não ficam presas nos sinusóides do baço e, portanto, são capazes de circular (49).

Esta diferença entre as duas principais espécies de *Plasmodium* humanas possivelmente está relacionada às células as quais estes protozoários invadem (50). Enquanto *P. falciparum* invade hemácias maduras (normócitos), e possivelmente hemácias já próximas à senescência, as quais naturalmente tem a deformabilidade reduzida; *P. vivax* invade reticulócitos, que devido ao material reticular em seu citoplasma, ainda são menos deformáveis

que os normócitos. No entanto, a invasão por este parasita leva ao rápido amadurecimento do reticulócito a eritrócito que passa a ter um fenótipo mais deformável (47).

Entretanto Kho et al (2021) recentemente demonstraram que o baço sustenta uma biomassa muito grande de parasitos de *P. vivax* assexuados não fagocitados, concomitantemente com o aumento da disponibilidade de reticulócitos CD71⁺ imaturos, ambos co-localizados em ambientes esplênicos onde eventos de invasão-reinvasão formariam um ciclo de vida endoesplênico críptico. Ainda os autores sugerem que *P. vivax* pode ter evoluído vários mecanismos para maximizar sua sobrevivência e replicação no baço (51).

1.6 Relevância do Estudo

Diante do exposto, percebe-se que apesar de algum conhecimento sobre a reologia de eritrócitos infectados por *P. vivax*, ainda há lacunas no conhecimento deste processo e investigá-lo pode ajudar a elucidar mecanismos que levam a sobrevivência e permanência do parasita no hospedeiro. Desta maneira, fica evidente que mais estudos sistemáticos sobre a biologia eritrocítica de *P. vivax* são necessários.

Como contextualizado na revisão de Russell e Cooke (2016), melhorar a compreensão dos mecanismos que estão subjacentes às mudanças das hemácias infectadas por *P. vivax* pode contribuir para gerar informações que levem ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra parasitos assexuados e sexuados, resultando em drogas que possam bloquear a transmissão e retardar o desenvolvimento de resistência do parasita aos futuros medicamentos antimaláricos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os aspectos reológicos dos eritrócitos infectados pelo *Plasmodium vivax*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a deformabilidade de eritrócitos infectados por de *P. vivax*;
- Avaliar a taxa de hemólise dos eritrócitos infectados por *P.vivax*;
- Associar o grau de retenção com o estágio parasitário;

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

3.1 Artigo a ser submetido ao Malaria Journal:

Aspectos reológicos de eritrócitos infectados por *Plasmodium vivax*

Nome dos autores

Dayanne Kamylla Alves da Silva Barros^{1, 2}, Deepali Ravel², Camila Fabbri^{3,5}, Luis Carlos Salazar-Alvarez⁴, Yury Oliveira Chaves^{3,5}, Rosa Amélia Gonçalves Santana³, Matthias Marti², Fábio Trindade Maranhão Costa⁴, Stefanie Costa Pinto Lopes^{1, 3, 5}

Afiliações dos autores

¹ Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil

² Harvard Medical School, Harvard TH Chan School of Public Health

³Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil

⁴Instituto de Biologia - Laboratório de Doenças Tropicais (LDT), Universidade Estadual de Campinas

⁵Instituto de Pesquisa Leônidas & Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, Brazil

Autor correspondente: Stefanie Costa Pinto Lopes

Resumo

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoário do gênero *Plasmodium*, tendo como principais espécies responsáveis por essa infecção em humanos, o *Plasmodium falciparum* e o *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), que afetam 228 milhões de pessoas com mais de 400.000 mortes a cada ano. Durante a replicação do parasito no sangue do hospedeiro, o baço é um dos principais órgãos que participa do estabelecimento da resposta imune e eliminação dos parasitos. Em resposta à infecção do parasito, o baço sofre uma série de alterações morfológicas, sendo a mais aparente o seu aumento, referido como esplenomegalia. Uma das funções fisiológicas do baço é justamente eliminar eritrócitos senescentes e/ou alterados e parte deste reconhecimento se dá pelo aumento de rigidez destas células. Existem diferentes metodologias para avaliar a deformabilidade destas células e em *P. vivax* alguns estudos demonstram que as células infectadas parecem manter o padrão de deformabilidade, enquanto outros sugerem que há perda deste padrão. Este estudo avaliou a deformabilidade de células infectadas contendo diferentes estágios de maturação do parasito. Para isto, foram coletadas trinta amostras de sangue de pacientes diagnosticados com malária vivax atendidos na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado. Destas amostras, em dezesseis foi possível realizar o ensaio de deformabilidade. A avaliação da deformabilidade dos eritrócitos foi realizada através da filtração por microesferas de metal de diferentes tamanhos que mimetizam o processo de filtração do sangue ocorrido no baço. Esta avaliação foi realizada antes e após cultivo do parasita *ex vivo* visando investigar a deformabilidade de diferentes estágios do parasita. E para isso foi analisada a parasitemia e distribuição dos estágios dos parasitos por microscopia e citometria de fluxo nos diferentes tempos (antes e pós cultivo) passando pelas microesfera de metal. Ainda foi avaliada a taxa de hemólise do material antes e após a passagem pelas microesfera de metal em 6 isolados para determinar se havia ruptura das células durante este processo através da leitura de absorbância (560nm) do sobrenadante em espectrofotômetro de placa. Observou-se uma redução na parasitemia das amostras após as filtrações pelas beads, tanto antes (T1) quanto após o amadurecimento (T2) (Teste de Wilcoxon, $P=0,003$ e $P=0,0010$, respectivamente). Todas as células contendo estágios maduros e gametócitos mostraram menor deformabilidade. Não houve hemólise significativa das amostras pela passagem nas beads, não interferindo na avaliação da deformabilidade dos eritrócitos infectados. Nossos dados sugerem que os eritrócitos infectados pelo *P. vivax* perdem a deformabilidade, e esta perda é mais evidente nos esquizontes, e nos gametócitos. Esta perda de deformabilidade deve ter consequências na filtração realizada pelo baço e mais estudos devem ser realizados para elucidar esta característica.

PALAVRA-CHAVE: Malária; *Plasmodium vivax*; Baço; Deformabilidade

Background

A malária é uma doença infecciosa, causada pelo *Plasmodium*, tendo como principais espécies responsáveis por essa infecção, o *Plasmodium falciparum* e *P.vivax*. A doença afeta 228 milhões de pessoas com mais de 400.000 mortes a cada ano (1). Apesar de vários estudos, a malária vivax permanece menos compreendido devido os seus aspectos biológicos e patogênicos apresentando um maior desafio para a eliminação do que o *P. falciparum* que é mais prevalente no continente Africano sendo mais relacionado a gravidade e complicações (2).

O *Plasmodium* pode atingir vários órgãos durante o seu desenvolvimento biológico, entre eles está o baço que desempenha um papel fundamental nas respostas imune inata e adaptativa, na eliminação seletiva dos eritrócitos envelhecidos ou anormais e na remoção de patógenos presentes no sangue (3,4).

Durante a invasão do *P. falciparum* a sua célula hospedeira para se replicar e ser transmitida, e todas as alterações durante o ciclo intraeritrocítico de 48 horas ocorrem modificações da membrana eritrocitária e no citoesqueleto, levando a uma deformação substancial dos eritrócitos antes discóides, que se tornam mais esféricos, consequentemente esses eritrócitos infectados não podem mais passar pelo baço. Para evitar a depuração esplênica, o parasita se acumula no revestimento endotelial dos capilares no tecido profundo. Essa citoadesão requer que o parasita insira antígenos na membrana da célula hospedeira e os ancore em complexos de knob ao citoesqueleto do eritrócito infectado (5).

Quanto as propriedades de deformabilidade dos eritrócitos infectados, a maturação intraeritrocítica do *P. vivax* tem efeito oposto ao do *P. falciparum*. Pv-iEs (eritrócitos infectados por *P. vivax*) se tornam mais deformáveis, enquanto Pf-iEs (eritrócitos

infectados por *P. falciparum*) se tornam mais rígidos, o aumento da rigidez de Pf-iEs pode aumentar seu tempo de trânsito através de vasos de pequeno diâmetro da microcirculação, facilitando a citoaderência e evitando a depuração esplênica. O aumento da deformabilidade dos Pv-iEs provavelmente explica por que essas células não ficam presas nos sinusoides do baço e, portanto, são capazes de circular (6).

Esta diferença entre as duas principais espécies de *Plasmodium* que causam infecção em humanos possivelmente está relacionada às células as quais invadem. Enquanto *P. falciparum* invade normócitos, e possivelmente células já próximas a senescência, estas naturalmente têm a deformabilidade reduzida e a infecção pelo parasita mantém este padrão. Entretanto, o *P. vivax* invade os reticulócitos que são menos deformáveis que os normócitos, no entanto a invasão por este parasito leva ao rápido amadurecimento do reticulócito a eritrócito que passa a ter um fenótipo mais deformável (7).

Entretanto KHO et al (2021) recentemente demonstraram que o baço sustenta uma biomassa muito grande de parasitos de *P. vivax* assexuados não fagocitados, concomitante com o aumento da disponibilidade de reticulócitos CD71⁺ imaturos, ambos co-localizados em ambientes esplênicos onde eventos de invasão-reinvasão formariam um ciclo de vida endosplênico críptico. Ainda sugere que *P. vivax* pode ter evoluído vários mecanismos para maximizar sua sobrevivência e replicação no baço (8).

Neste sentido, apesar de haver estudos mostrando a deformabilidade de *P. vivax*, estes ainda são escassos e avaliados somente por metodologias de dispositivos microfluídicos. Estas evidências de que o parasita possa ter um ciclo críptico no baço nos levaram a avaliar se a perda da deformabilidade de Pv-iE ao longo de sua maturação pode estar envolvida na retenção deste órgão contribuindo para o acúmulo através do ensaio de microfiltração.

Matérias e Métodos

Recrutamentos de pacientes e coleta de amostra

A inclusão de pacientes foi realizada na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brasil. Os critérios de inclusão foram: adultos maiores de 18 anos, ambos os sexos, pacientes diagnosticados com malária vivax na ausência de tratamento prévio nos últimos 30 dias com parasitemias maiores que 1.000 parasitas/ul. Os pacientes que aceitaram participar do estudo fizeram a leitura e concordância do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Posteriormente foi preenchido um questionário e foram coletados no tubo de heparina cerca de 20 mL de sangue por punção venosa. Após o preenchimento do questionário e coleta de sangue, o paciente recebeu atendimento médico e tratamento antimalárico apropriado dando seguimento à rotina ambulatorial da FMT-HVD. O sangue coletado foi levado para o laboratório do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) para o seguimento dos experimentos.

Processamentos de amostra e purificação de *P. vivax*

O sangue foi centrifugado a 400 g por 5 minutos para a separação do plasma. O pellet de eritrócitos formado foi lavado 2 vezes com o meio RPMI-1640 e ressuspendido no final para então ser passado em coluna de celulose (seringa de 10 ml com 0,5 cm³ de lã de vidro e 5 cm³ de celulose da Sigma/Aldrich©) para a depleção dos leucócitos (9). As células obtidas foram lavadas duas vezes em meio RPMI-1640 para eliminar os resíduos de celulose. Em seguida, 5 mL dessa suspensão foi transferida para tubo plástico cônico de 15 mL. Com auxílio de uma pipeta, 5 mL de uma solução de Percoll® na

concentração de 45% (GE Healthcare, USA) foram gentilmente depositados abaixo da suspensão de eritrócitos com o objetivo de purificar os eritrócitos infectados. O tubo foi centrifugado a 1.500g por 15 minutos, em baixa aceleração e sem freio para formação de gradiente. Após a centrifugação, os eritrócitos sadios foram depositados no fundo do tubo, enquanto as formas maduras (trofozoítos e esquizontes) foram encontradas na interface. Os eritrócitos infectados foram retirados da interface e três lavagens em meio RPMI-1640 foram realizadas para a completa remoção da solução de Percoll® (10). Após a última lavagem os eritrócitos infectados foram ressuspensos em meio RPMI-1640. O número de células totais obtidas depois da purificação foi determinado por contagem com auxílio da Câmara de Neubauer e a parasitemia determinada por meio de esfregaços corados com Panótico Rápido (Laborclin). Parte dos Pv-iEs foram utilizados logo após o enriquecimento por Percoll® para o ensaio de deformabilidade (descrito a seguir) e a outra parte foi mantida em cultivo (37°C, atmosfera de 5% de O₂) para o seu amadurecimento, em meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) contendo D-glicose e 20% de plasma humano AB+ inativado, por cerca de 24h. Posteriormente, foi realizado o ensaio de deformabilidade (10).

Avaliação da deformabilidade de eritrócitos infectados por *P. vivax*

Para verificar a deformabilidade dos eritrócitos infectados por *P. vivax* foram utilizadas microesferas de metal calibradas com duas distribuições de tamanho diferentes (medindo de 5 a 15 µm de diâmetro e 15 a 25 µm de diâmetro), na utilização de um único lote com o objetivo de simular a passagem destas células pelo baço. Tanto a forma e o tamanho das partículas foram controlados pelo fabricante para garantir que mais de 90% dos grânulos estão no intervalo de tamanho especificado. Foi misturada 200mg de microesferas secas de cada tipo e, em seguida suspenso em 1 ml do meio

RPMI-1640 contendo 5% Albumax GIBCO[®]. Um total de 600µL desta suspensão de microesferas foi adicionada e invertida numa ponteira com filtro de 1000µL (Neptune, BarrierTips) com isso levou-se a formação de uma camada grossa de 5 mm de espessura sobre a pipeta com filtro. Um total de 1000 µL de suspensão de hemácias parasitadas a 2% de hematócrito e cerca de 3% de parasitemia (foram perfundidas através da camada de microsfera numa taxa de fluxo de 1ml/min, usando uma bomba infusora (Harvard Apparatus). Posteriormente a camada de microesferas foi lavada com 7 ml do meio RPMI-1640 contendo 5% de Albumax. A amostra inicial foi recuperada antes da passagem pela camada de grânulos e no final de todo o processo (filtração e lavagem) ocorreu a separação da amostra pós filtração por duas sucessivas etapas de lavagens. A parasitemia da amostra antes e pós filtração foi determinada por esfregaços sanguíneos. Para isto, foi realizada a contagem do número de parasitas em 5.000 células totais, assim como a contagem diferencial dos estágios (anel, trofozoíto, esquizontes e gametócitos) em cerca de 100 parasitos antes e após a filtração (11).

Cultivo do *Plasmodium falciparum*

Com o objetivo de utilizar a espécie como controle interno para o ensaio de deformabilidade, a cepa 3D7 de *P. falciparum* foi descongelada e mantida em cultivo (meio RPMI-1640 contendo 10% de plasma humano A+ inativado) a 37°C em atmosfera hipóxica (atmosfera de 5% de O₂), conforme descrito na literatura (12). Após o parasito atingir parasitemia de 4%, sendo 70% dos parasitas em estágio de anel, a cultura estava apta para ser realizado o ensaio de deformabilidade. Esse ensaio foi avaliado em diferentes tempos (antes do cultivo e pós cultivo) conforme o amadurecimento do parasita (anel, trofozoíto e esquizonte), sendo realizado o ensaio em duplicata, nas mesmas condições do ensaio em *P. vivax* descrito no item acima.

Teste de Hemólise

Para avaliar se a passagem pelas beads metálicas poderia levar à hemólise das células e interferir na análise da deformabilidade, realizou-se a avaliação da hemólise através da determinação de heme livre por espectrofotometria conforme descrito na literatura (13). Esta avaliação foi realizada nas amostras antes e após a passagem pelas microesferas de metal nos dois tempos (antes e após amadurecimento) tanto nas amostras de *P.vivax* e *P.falciparum*. Para este ensaio, o material das diferentes condições foi centrifugado a 1500 rpm por 5 min e 100ul de sobrenadante das amostras foi adicionado a poços da placa de 96 poços. Como controle negativo 100ul de meio RPMI-1640 +5% de Albumax foi adicionado a placa. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A densidade óptica (DO) do sobrenadante das amostras foi determinada em espectrofotômetro de placa (GloMax Explorer) no comprimento de onda de 560nm. Com base nas absorbâncias foi utilizado o seguinte cálculo para verificar a percentagem de hemólise em relação ao controle: $100 \times (\text{DO das amostras} - \text{DO médio do controle negativo})$.

Citometria de fluxo

Com o intuito de otimizar e semi-automatizar a avaliação da deformabilidade, utilizamos a citometria de fluxo para avaliar a parasitemia das amostras antes e pós filtração. Foram utilizados os corantes de ácido nucléico SYBR Green I (SG, Invitrogen-Molecular Probes), solução estoque $10.000 \times$ concentrado em DMSO e Dihidroetídeo (DHE, Sigma-Aldrich). O DHE foi diluído conforme instruções do fabricante (5mg/ml). Foram avaliadas as concentrações de 1x de SYBR GREEN e DHE nas concentrações de 2,5µg/ml, em duplicata para cada condição. A marcação dos parasitas foi realizada de acordo com protocolo descrito anteriormente (14). Para isto as amostras antes de passar pelas beads metálicas e após a passagem foram centrifugadas a

400 g por 5 min e 10ul do pellet de células foi adicionado no tubo de ensaio. A este foi adicionado 10µl da solução contendo os corantes (SYBR Green e DHE), seguido de incubação por 20 minutos a 37° C. Após esse intervalo foi adicionado 200ul de PBS1x gelado para paralisar a reação para então ser realizada a leitura da amostra em citômetro BD FACSCantoI™. Após a aquisição da amostra pelo equipamento, os dados brutos foram obtidos no software FlowJo versão 10.

Quantificação de parasitas por citometria de fluxo

As amostras foram analisadas usando um laser duplo (azul: 488 nm, 50 mW de estado sólido; vermelho: 640 nm, diodo 30 mW) equipado para análise em tubo de ensaio de alto rendimento (BD FACSCanto II™). O laser azul foi utilizado para a detecção de ambos os corantes (SG em FL1: 530 ± 15 nm; DHE em FL2: 585 ± 20 nm). As células foram selecionadas de acordo com seu perfil Tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A). Para aquisição de dados, 50.000 eventos totais foram analisados por replicada.

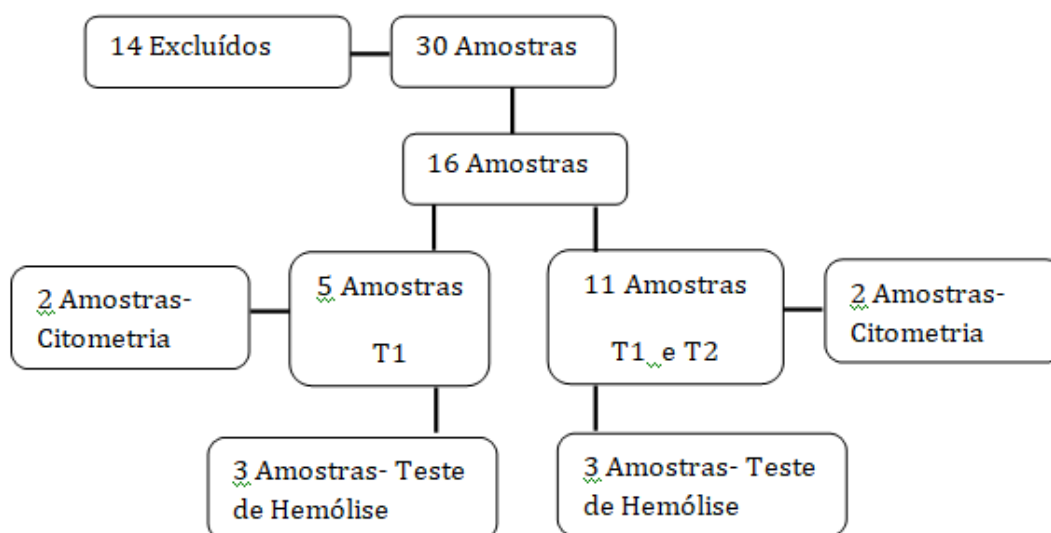
Análise de dados

Para analisar os dados e a produção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.2. A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre os grupos foram realizadas análises pareadas com teste t de Student ou Wilcoxon. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P \leq 0,05$ para todos os testes. A taxa de retenção foi calculada da seguinte forma: $100 * (1 - (DF/AF))$.

Resultados

Fluxograma dos isolados de *P. vivax* coletados

Foram coletadas 30 amostras de pacientes com malária causada pelo *P. vivax* atendidos na FMT-HVD. Em 14 amostras houve problemas na purificação que levaram a obtenção de quantidades insuficientes para proceder o ensaio. Dessa forma, a filtração mecânica simulando a circulação esplênica com o uso das microesferas de metal (ensaio de deformabilidade) foi realizada em 16 amostras. O fluxograma abaixo descreve os ensaios que foram realizados com as amostras.



Fluxograma dos isolados de *P. vivax*. Ensaio realizado antes do amadurecimento *ex vivo* (T1). Ensaio realizado após o amadurecimento *ex vivo* (T2).

Isolados de *Plasmodium vivax* ficam retidos após a filtração independentemente do estágio

O ensaio de deformabilidade foi realizado em 16 amostras logo após a purificação do parasito (T1). Destas apenas em 11 amostras foi possível realizar o ensaio após o

amadurecimento *ex vivo* do parasito (T2). A taxa de retenção da parasitemia das amostras antes e após a filtração nos dois tempos está descrita na Tabela 1. Como podemos verificar na média e desvio padrão que a maioria dos isolados testados houve a redução da parasitemia após a filtração, ou seja, os parasitas ficaram retidos nas microesferas de metal não passando pela microfiltração em ambos os tempos ($46,4 \pm 39,2$; $64,1 \pm 16,5$ respectivamente). Em alguns isolados (2 e 7) houve aumento da parasitemia após a filtração, o que se deve a maior retenção de eritrócitos não infectados, isso apenas no T1 não sendo observado no T2.

Tabela 1. Parasitemia dos estágios parasitários antes e após a filtração.

	T1			T2		
	Parasitemia (%)		Taxa de retenção	Parasitemia (%)		Taxa de retenção
	AF	DF		AF	DF	
1	1,27	0,77	39,4	0,59	0,32	45,3
2	3,50	4,33	-23,7	1,85	0,49	73,6
3	1,41	1,42	-0,7	1,53	1,06	30,9
4	2,89	1,41	51,2	2,00	0,45	77,4
5	2,42	1,43	40,9	NA	NA	NA
6	2,60	1,52	41,5	NA	NA	NA
7	1,64	2,34	-42,7	3,51	1,72	50,9
8	4,10	0,40	90,2	1,49	0,26	82,4
9	1,42	1,11	21,8	0,84	0,28	66,6
10	1,90	0,75	60,5	1,86	0,34	81,7
11	2,24	0,39	82,6	0,53	0,09	83,0
12	0,41	0,11	73,2	NA	NA	NA

13	3,60	0,11	96,9	0,82	0,35	57,3
14	2,76	0,73	73,6	NA	NA	NA
15	0,60	0,27	55,0	NA	NA	NA
16	2,42	0,42	82,6	1,41	0,62	56,0
Média			46,4			64,1
DP			39,2			16,5

*NA: Não Aplicável; F: antes da filtração; DF: depois da filtração.

A taxa de retenção dos estágios antes do cultivo ex vivo (T1) e após o cultivo (T2) está descrita na Figura 1. Essa retenção da distribuição dos estágios de anel, trofozoíto, esquizontes e gametócitos, está apresentada com a média e desvio padrão no T1 (13± 140; 34,7 ± 60,1 ; 33,9 ± 251 ; 56,2 ± 28,3) e T2 (10,2 ± 116 ; 66,9 ± 24,3; 78,2 ± 12,7 ; 82,6 ± 11,2) respectivamente. Após a filtração todos os estágios ficaram retidos, sendo a maior percentagem de trofozoíto, esquizontes e gametócitos em ambos os tempos. Após a filtração tanto no T1 quanto no T2 o estágio de anel foi o que reteve menos, o que nos mostra que esse estágio passou com mais facilidade pela microfiltração.

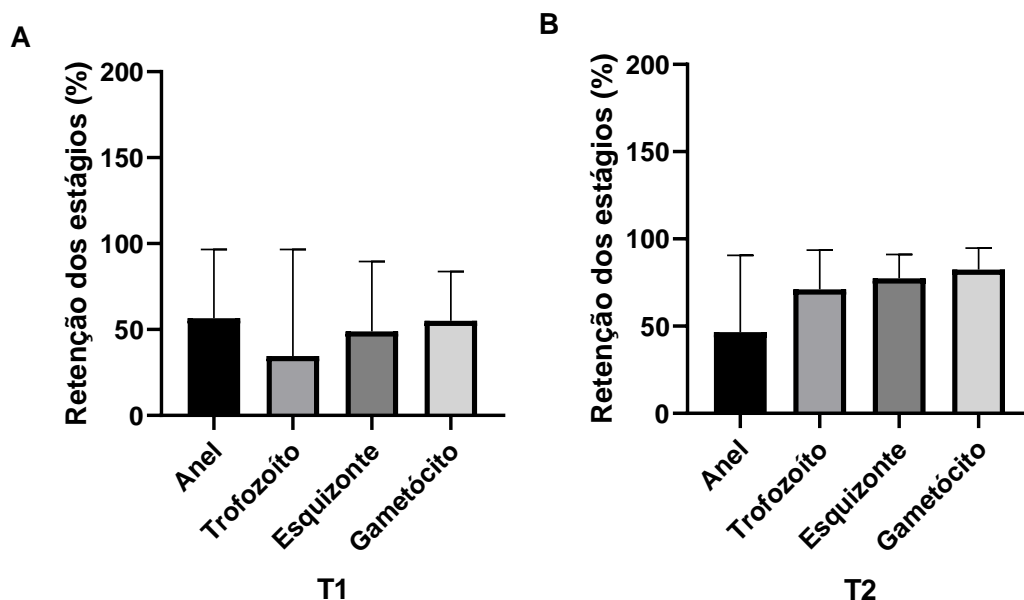


Figura 1: Porcentagem da distribuição dos estágios após as filtrações. Na figura 1A todos os estágios ficaram retidos. Na figura 1B após o cultivo ex vivo houve maior taxa de retenção dos estágios de trofozoito, esquizonte e gametócitos. A taxa de retenção foi calculada da seguinte forma: $100 \cdot (1 - (DF/AF))$. AF: antes da filtração e DF: depois da filtração.

Na Figura 2A está apresentada a média e desvio padrão da parasitemia dos isolados antes e após a filtração e podemos observar que houve uma redução da parasitemia após a filtração pelas microesferas de meta l($2,20 \pm 1,02$ e $1,12 \pm 1,03$, respectivamente; teste de Wilcoxon, $p = 0,003$). Já a distribuição de estágios no T1, podemos verificar que há um predomínio de trofozoítos antes e após a filtração (média de 40,03 e 43,82%). Além, de uma pequena proporção de esquizontes (média de 10,6 %) e gametócitos (média de 9,9 %) que reduzem ainda mais (média de 8,01 e 9,11%, respectivamente) após a passagem pelo filtro; ou seja, estes estágios parecem ter sido preferencialmente retidos. Em contrapartida a frequência de anel é aumentada após a filtração (8,61 e 13,56, respectivamente AF e DF); revelando que este estágio parece passar livremente após a filtração pelas microesferas de metal.

Na Figura 2B pode ser visualizado o comportamento dos isolados que foram amadurecidos em cultivo ex vivo no ensaio de deformabilidade. Observa-se que houve também uma redução da parasitemia após a filtração pelas microesferas de metal ($1,49 \pm 0,06$ e $0,54 \pm 0,05$, respectivamente; teste de Wilcoxon, $p = 0,0010$). Diferente do T1, o estágio predominante antes da filtração foram os esquizontes (28,35%) que tiveram sua frequência fortemente reduzida após a filtração (13,90 %). Enquanto trofozoítos e anel tiveram sua frequência aumentada (de 19,50 para 20,74 e de 4,53 para 7,68 respectivamente) após a filtração, revelando que estes estágios passam livremente pelo filtro mesmo após o cultivo, similar aos dados do T1. Enquanto gametócitos tiveram sua frequência novamente reduzida após a filtração (de 10,36 para 6,14) sendo também parcialmente retidos no filtro que simula a circulação esplênica.

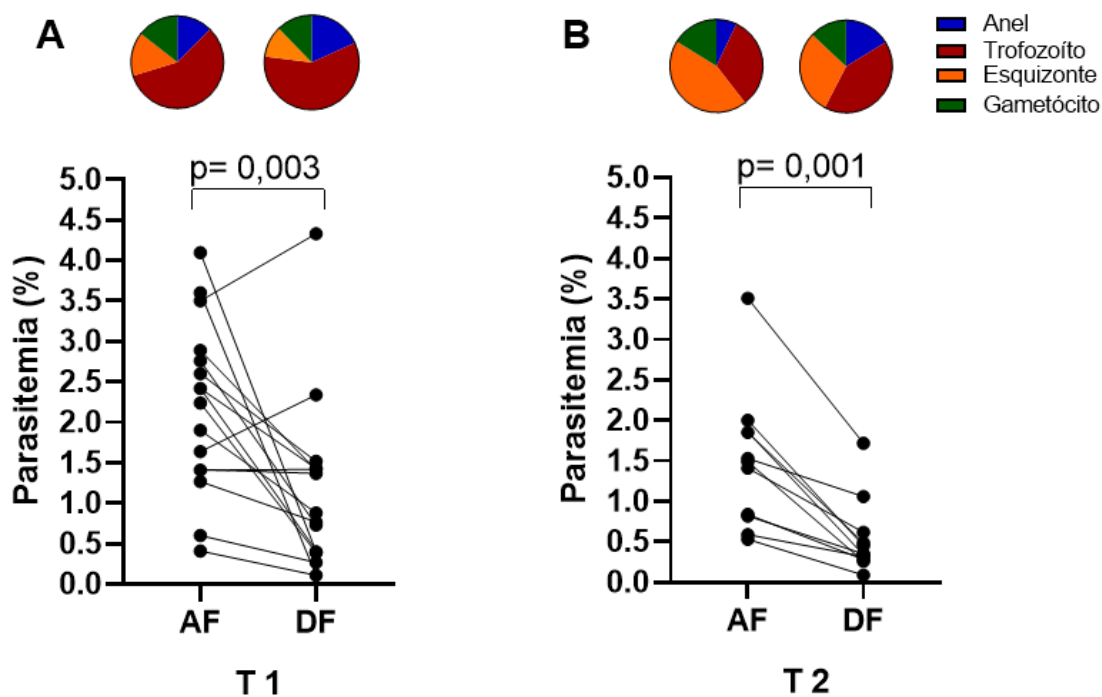


Figura 2. Deformabilidade de *Plasmodium vivax* através de filtração por microesferas de metal simulando circulação esplênica. Para avaliar a deformabilidade foi avaliada a parasitemia de 16 isolados de *P. vivax* antes e após a passagem por filtro construído por

microesferas de metal simulando ambiente esplênico em dois tempos, antes (A) e após (B) amadurecimento ex vivo. A parasitemia foi determinada em 5.000 células e a distribuição de estágios em pelo menos 100 parasitas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. AF: antes a filtração; DF: após a filtração.

A passagem pelas microesferas de metal não leva à hemólise das amostras de *P. vivax*

A hemólise das amostras foi avaliada em seis isolados. Na Figura 2 pode-se observar que não houve diferença na percentagem de hemólise antes e após a filtração nos dois tempos avaliados (antes e após a cultura ex vivo). A densidade óptica das amostras foi avaliada no comprimento de onda 560nm. Portanto, a redução na parasitemia após a filtração não deve estar relacionada à hemólise diferencial das células infectadas.

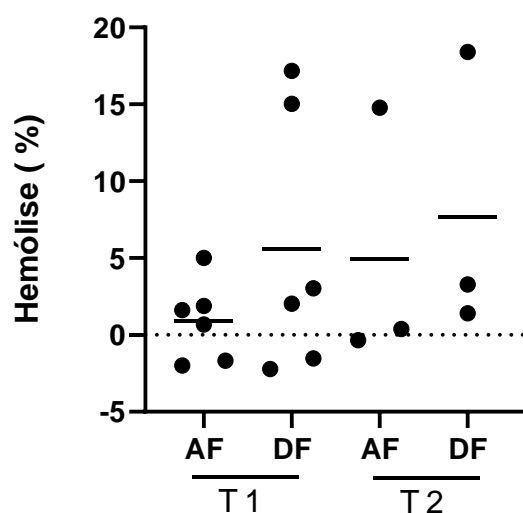


Figura 3. Hemólise das amostras de *P. vivax* levadas ao ensaio de deformabilidade. A avaliação da hemólise foi realizada através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 560nm em todas as condições do ensaio de deformabilidade. Dados de seis amostras de *P. vivax* avaliados em duplicata em todas as condições. AF: antes da filtração; DF: depois da filtração; T1: antes do cultivo ex vivo; T2: após cultivo ex vivo.

A citometria de fluxo pode ser uma ferramenta para determinar a taxa de retenção pela microfiltração

Visando semi-automatizar a determinação da parasitemia de *P. vivax* utilizamos a marcação com os corantes de DNA, SYBR Green e DHE, seguida da aquisição de células e avaliação dos parâmetros de tamanho, complexidade e fluorescência em citômetro de fluxo. Para determinação da população de parasitas nas diferentes condições.

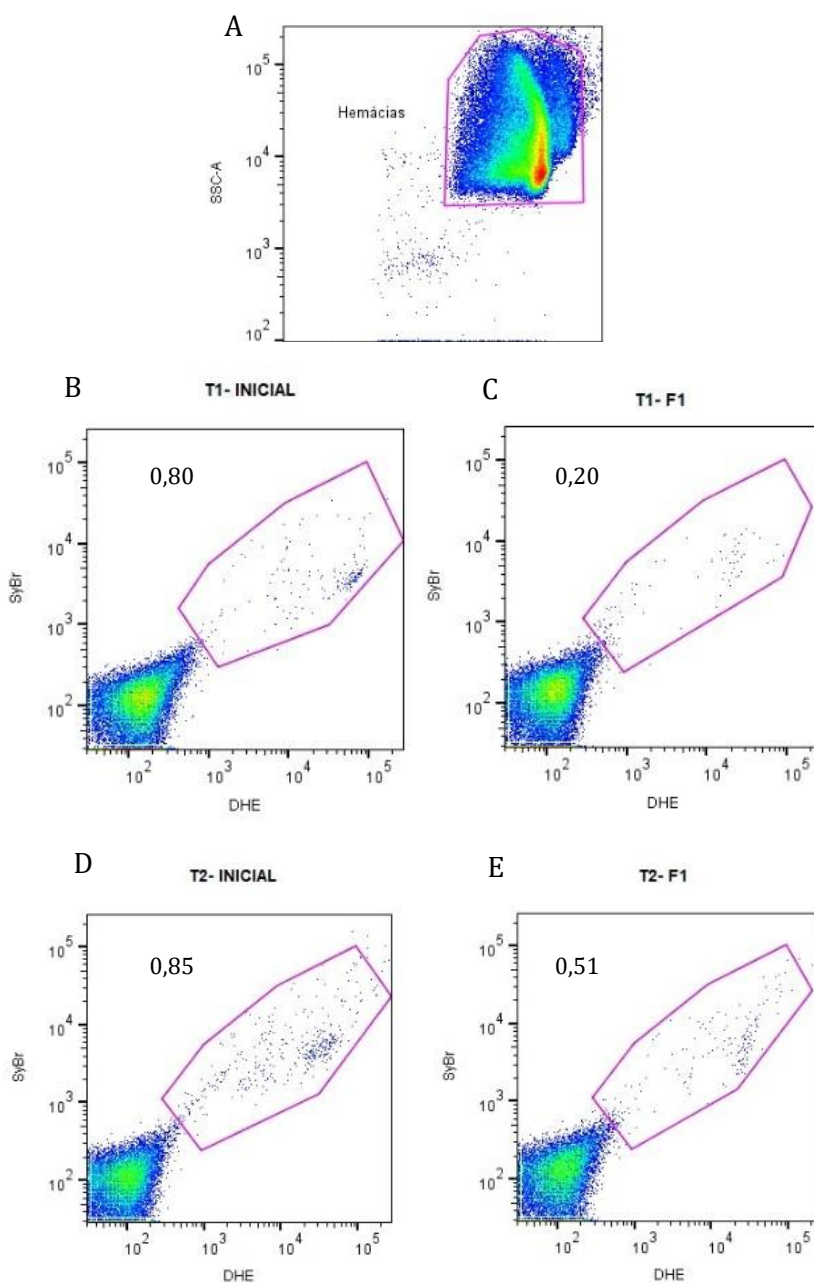


Figura 4: Parasitemia do isolado 07 pela citometria. A citometria mostrou que após as filtrações a parasitemia diminuía independente do estágio do parasito. A: gate de hemácias; B: gate da amostra antes da filtração no T1; C: gate da amostra depois da filtração T1; D: gate da amostra antes da filtração no T2; E: gate da amostra antes da filtração no T2. T1: antes do cultivo ex vivo; T2: após cultivo ex vivo.

Na Figura 5A e 5B está apresentada a média e desvio padrão da parasitemia dos 4 isolados que foi possível fazer a comparação da microscopia óptica com a citometria antes do cultivo ex vivo (T1) e podemos observar que houve uma redução da parasitemia após a filtração pelas microesferas de metal ($77,6 \pm 15,9$ e $82,9 \pm 8,5$, respectivamente). Na Figura 5C e 5D mostra a média e o desvio padrão da parasitemia dos 2 isolados que foi possível fazer a comparação da microscopia óptica com a citometria após o cultivo ex vivo (T2) e podemos observar que houve uma redução da parasitemia após a filtração pelas microesferas de metal ($70 \pm 0,13$; $71,17 \pm 0,29$, respectivamente). Apesar dessa redução da parasitemia em todos os isolados, há uma divergência quando comparado a parasitemia do esfregaço com a citometria.

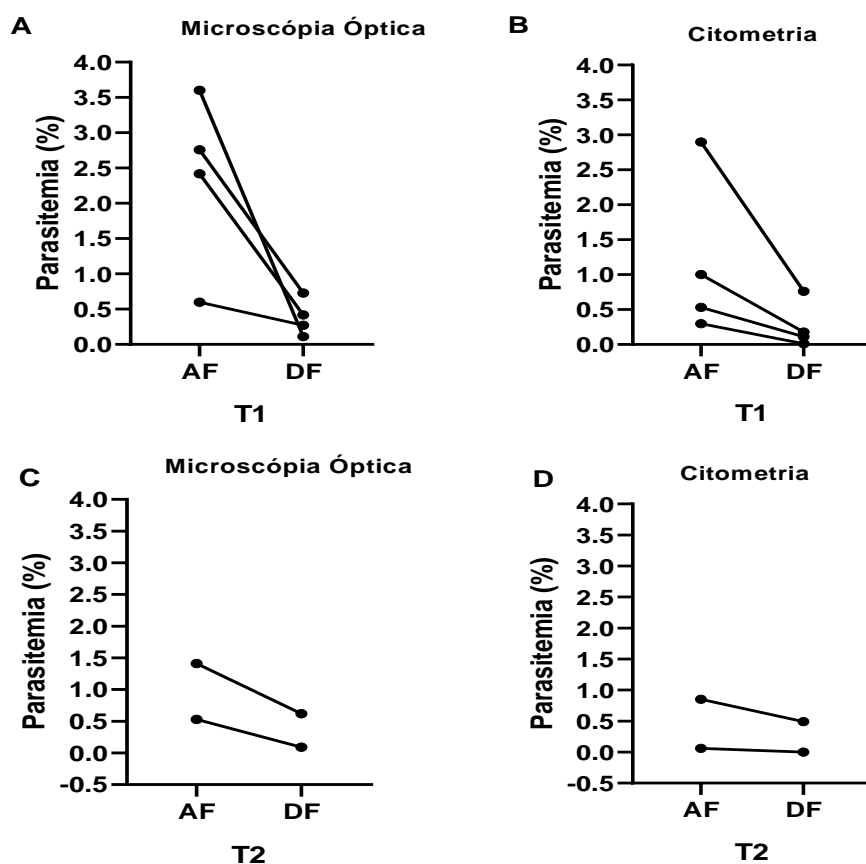


Figura 5: Taxa da parasitemia dos isolados (%) comparando a análise feita por microscopia óptica e a citometria em diferentes tempos. A parasitemia por microscopia óptica foi determinada em 5.000 células e a parasitemia avaliada por citometria foi de 50.000 eventos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. AF: antes da filtração; DF: após a filtração. T1: antes do cultivo e T2: pós cultivo.

O sistema de microfiltração simulando a circulação esplênica foi montado corretamente e pode ser utilizado para avaliação de deformabilidade de *P. vivax*

Como o sistema de microfiltração é um sistema com montagem manual e não manufaturado, avaliamos a reprodutibilidade de nossa montagem utilizando amostras de *P. falciparum*, visto que há dados na literatura para comparação (10), como um controle de qualidade. Como podemos observar na Figura Suplementar 1 e na Tabela

Suplementar 1 a redução na parasitemia após a filtração acentua-se conforme a maturação do parasita, sendo maior quando havia maior frequência de esquizontes.

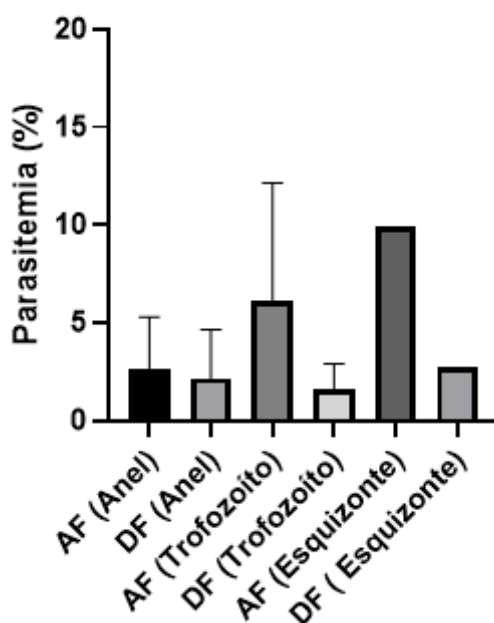


Figura 1 Suplementar. Deformabilidade do *Plasmodium falciparum* através de filtração por microesferas de metal simulando circulação esplênica. Parasitemia de *P. falciparum* 3d7 determinada por microscopia durante seu amadurecimento in vitro em 48h quando havia predominância dos diferentes estágios parasitários antes e após a microfiltração. Este ensaio foi realizado duas vezes independentemente em duplicata. AF: antes da filtração; DF: depois da filtração.

Tabela 1 Suplementar: Parasitemia de *P. falciparum* 3d7 durante seu amadurecimento in vitro em 48h antes e após a microfiltração.

Isolado	AF	DF	AF (Trofozoíto)	DF (Trofozoíto)	AF (Esquizonte)	DF (Esquizonte)
Pf 3D7	0,77%	0,43%	1,88%	0,76%	-----	-----
Pf 3D7	4,53%	3,93%	10,4%	2,56%	9,95%	2,75%

Discussão

O baço desempenha um papel fundamental no monitoramento da população de hemácias circulantes, removendo eritrócitos senescentes e material estranho circulante, como bactérias ou detritos celulares. A estrutura do baço é complexa com duas circulações sanguíneas sobrepostas: um desvio de fluxo rápido e uma circulação de abertura lenta na qual o sangue é filtrado através de estreitas fendas interendoteliais. Essa filtração lenta permite que os elementos do sangue sejam avaliados quanto ao revestimento e à deformabilidade (15,16).

Fisiologicamente os eritrócitos normais são altamente deformáveis devido à sua alta proporção entre área de superfície e volume, sua viscosidade citoplasmática moderada e à elasticidade de seu esqueleto de membrana. Quando o parasita da malária invade os eritrócitos ocorre uma mudança dramática na deformabilidade celular e na elasticidade da membrana desses eritrócitos, devido à forma e ao volume do próprio parasita e à exportação de proteínas do parasita que interagem com as proteínas do esqueleto da membrana do hospedeiro, essas mudanças são mais perceptivas em formas maduras do parasito (17).

O *P. vivax* tem tropismo específico para os reticulócitos CD71 + rígidos geralmente encontrados na medula óssea devido ter mais receptores de transferrinas, entretanto é possível encontrar reticulócitos no sangue periférico (18). No prazo de seis horas após a invasão, o *P. vivax* remodela a membrana do eritrócito infectado e o citoesqueleto, tornando-o tão deformável quanto um normócito não infectado (18). As conclusões destes autores corroboram com nosso estudo, que mostrou que após a filtração pelas

beads a porcentagem de anel do *P. vivax* aumenta em ambos os tempos, ou seja, os eritrócitos infectados nesse estágio são mais deformáveis. Porém, a taxa de retenção era maior no T1, provavelmente isso esteja relacionado com o seu tempo de invasão aos reticulócitos, pois os reticulócitos não são deformáveis e que após a invasão e modificação que o parasito causa na célula faz com que perda essa rigidez e fique mais deformável. Em contraste, os estágios de esquizonte e gametócitos de *P.vivax* apresentaram perda da sua deformabilidade após a filtração pela beads, ficando preferencialmente retidos e diferente de estudos anteriores, que mostraram que esses estágios são capazes de deformar e passar através de microcapilares e fendas sinusoidais de 2µm como também que o *P. vivax* aumenta esta deformabilidade da célula hospedeira para evitar a depuração esplênica (19,20).

Outro estudo corroborou com os nossos achados sobre a perda da deformabilidade dos esquizontes (21). A hipótese é que o mecanismo esteja relacionado com a mudança que ocorre cerca de uma hora antes da ruptura dos esquizontes, causando a desregulação osmótica a medida que libera os merozoítos. Além disso, o estudo afirmou que as rosetas também são responsáveis por essa rigidez em *P. vivax* (21). Apesar de não poder descartar que os parasitas retidos estivessem em formação de rosetas, isso possivelmente ocorreu em pequena proporção uma vez que o Albumax utilizado no meio de filtração não permite a formação extensiva de rosetas diferente de plasma, em especial de indivíduos com malária aguda (22).

Outros estudos têm mostrado que os estágios de esquizonte e gametócitos têm a capacidade de aderir às células endoteliais e isso faz com que uma parte escape do *clearance* esplênico e continue o seu ciclo biológico (23,24). Em *P.falciparum* os gametócitos jovens são mais rígidos e, portanto não passam pela microfiltração pelas beads, no entanto assim que amadurecem aumentam a sua deformabilidade, o que

corresponde à sua presença na circulação (25). Em nosso estudo parte dos gametócitos ficaram retidos nas microesferas de metal, e outra parte apresentando uma maior deformabilidade não foi retido. Mais estudos com mais isolados são necessários para comprovar que o *P. vivax* possui um mecanismo semelhante ao *P. falciparum*, porém os resultados aqui apresentando apontam semelhança na retenção dos gametócitos quando comparando esta espécie.

Em estudos anteriores foi observada uma redução na capacidade dos estágios maduros de eritrócitos infectados com *P. falciparum* de passar pela microfiltração através das microesferas de metal que simulava a filtração esplênica (26). Dessa forma, validamos o ensaio utilizando como teste controle a cepa 3d7 de *P. falciparum*. Os dados encontrados neste artigo confirmaram que os eritrócitos infectados por *P. falciparum* perdem a sua deformabilidade à medida que amadurecem. Esse parasita torna-se rígidos devido a uma variedade de proteínas como RESA, KHARP, MESA, PfEMP3 e STEVOR interagindo com o citoesqueleto dos eritrócitos infectados e a membrana. (27). Para evitar a depuração esplênica, o *P. falciparum* realiza sequestro das hemácias infectadas e as leva para os dos capilares no tecido profundo. Essa citoadesão requer que o parasita insira antígenos na membrana da célula hospedeira e os ancore em complexos de botão ao citoesqueleto dos eritrócitos infectados (28).

Nosso estudo mostrou que não houve hemólise durante o processo de retenção. Porém, estudos têm demonstrado que eritrócitos infectados têm a estabilidade osmótica alterada e parecem lisa mais fácil seja passando pela filtração do baço ou na liberação dos merozoítos (21).

Recentemente Khoet *al* (2021) demonstraram que o baço sustenta uma biomassa muito grande de parasitos de *P.vivax* assexuados não fagocitados, concomitantemente com o aumento da disponibilidade de reticulócitos CD71⁺ imaturos, ambos co-localizados em

ambientes esplênicos onde eventos de invasão-reinvasão formariam um ciclo de vida endoesplênico críptico. Ainda os autores sugerem que *P. vivax* pode ter evoluído vários mecanismos para maximizar sua sobrevivência e replicação no baço (8). Dessa forma, os resultados aqui apresentados sobre a retenção do *P. vivax* pode estar relacionado com a adaptação do parasito e a perda da deformabilidade destas hemácias parasitadas pode estar relacionadas a mecanismos de sobrevivência. Outro estudo mostrou que existem genes responsáveis pela citoadesão desse parasito no baço, confirmando ainda mais essa sua adaptação biológica (29).

Conclusão

Os eritrócitos infectados por *P.vivax* ficam retidos no sistema de microfiltração com microesferas de metal que simula a circulação esplênica, ou seja, estes apresentam perda de sua deformabilidade, e esta perda é mais evidente nos eritrócitos infectados pelos estágios assexuados maduros, esquizontes, e nos estágios sexuados do parasita, os gametócitos. Esta perda de deformabilidade deve ter consequências na filtração realizada pelo baço e mais estudos devem ser realizados para elucidar esta característica.

Lista de abreviações

AF	Antes da filtração
DF	Depois da filtração
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
IPCCB	Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema
Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
Pv-iEs	Eritrócitos infectados por <i>P.vivax</i>
Pf-iEs	Eritrócitos infectados por <i>P.falciparum</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declarações Ética, aprovação e consentimento para participar

O Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD, Manaus, Brasil, aprovou este estudo registrado sob número CAAE-54234216.1.0000.0005.

Consentimento para publicação

Não aplicável

Disponibilidade de dados e materiais

Os conjuntos de dados do estudo atual estão disponíveis mediante solicitação ao autor correspondente.

Interesses competitivos

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

Financiamento

O projeto foi apoiado financeiramente pela Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) para o desenvolvimento da pesquisa.

Referências

1. WHO. World malaria report 2020- WHO. 2020
2. Price RN, Commons RJ, Batalha KE, Thriemer K, Mendis K. *Plasmodium vivax* na Era da Shrinking *P. Mapa falciparum*. Trends Parasitol. 2020; 36 (6): 560–70. pmid: 32407682.
3. Stuart MJ, Nagel RL. Seminar Sickle-cell disease. October. 2004;
4. David PH, Hommelt M, Miller LH, Udeinya IJ, Oliginot LD. Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: Spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes (monkey/endothelium/surface antigen/cell binding). Med Sci. 1983;80(August):5075–9.
5. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. Trends Parasitol. 2005;21(2):75–80.
6. Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, Silamut K, Sattabongkot J, White NJ, et al. The Deformability of Red Blood Cells Parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. J Infect Dis. 2004;189(2).
7. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KSW, Suwanarusk R, Claser C, et al. *Plasmodium vivax* : restricted tropism and rapid remodeling of. Blood. 2015;125(8):1314–25.
8. Kho S, Qotrunnada L, Leonardo L, Andries B, Wardani PAI, Fricot A, et al. Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study. PLOS Med [Internet]. 2021 May 26;18(5):e1003632. Available from:<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003632>
9. Sriprawat K, Kaewpongsri S, Suwanarusk R, Leimanis ML, Lek-Uthai U, Phyto AP, et al. Effective and cheap removal of leukocytes and platelets from *plasmodium vivax* infected blood. Malar J. 2009;8(1):1–7.
10. Methods in Malaria Research – Sixth Edition. Edited by Kirsten Moll, Akira Kaneko, Arthur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR Glasgow, UK, 2013.
11. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. Blood. 2011;117(8):1–3.
12. CHEN et al. Competition between *Plasmodium falciparum* strains in clinical infections during in vitro culture adaptation. Infection, Genetics and Evolution, v. 24, p. 105– 110, 2014.

13. Sarkar S, Siddiqui AA, Saha SJ, De R, Mazumder S, Banerjee C, et al. Antimalarial activity of small-molecule benzothiazole hydrazones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4217–28.
14. Russell B, Malleret B, Suwanarusk R, et al. Citometria de fluxo baseada em campo para caracterização ex vivo da sensibilidade antimalárica de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (10): 5170-5174. doi: 10.1128 / AAC.00682-13
15. Ho M, White NJ, Looareesuwan S, Wattanagoon Y, Lee SH, Walport MJ, Bunnag D, Harinasuta T. Splenic Fc receptor function in host defense and anemia in acute *Plasmodium falciparum* malaria. *J InfectDis*. 1990 Mar;161(3):555-61. doi: 10.1093/infdis/161.3.555. PMID: 2179426.
16. CROSBY WH. Normal functions of the spleen relative to red blood cells: a review. *Blood*. 1959 Apr;14(4):399-408. PMID: 13638340.
17. Lavazec C. Molecular mechanisms of deformability of *Plasmodium*-infected erythrocytes. Vol. 40, *Current Opinion in Microbiology*. 2017.
18. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KS, Suwanarusk R, Claser C, Cho JS, Koh EG, Chu CS, Pukritta yakamee S, Ng ML, Ginhoux F, Ng LG, Lim CT, Nosten F, Snounou G, Rénia L, Russell B. *Plasmodium vivax*: restricted tropism na drapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Blood*. 2015 Feb 19;125(8):1314-24. doi: 10.1182/blood-2014-08-596015. Epub 2014 Nov 20. PMID: 25414440; PMCID: PMC4401350.
19. Handayani S, Chiu DT, Tjitra E, Kuo JS, Lampah D, Kenangalem E, Renia L, Snounou G, Price RN, Anstey NM, Russell B. High deformability of *Plasmodium vivax*-infected red blood cells under microfluidic conditions. *J InfectDis*. 2009 Feb 1;199(3):445-50. doi: 10.1086/596048. PMID: 19090777; PMCID: PMC4337984.
20. Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, Silamut K, Sattabongkot J, White NJ, Udomsangpetch R. The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *J InfectDis*. 2004 Jan 15;189(2):190-4. doi: 10.1086/380468. Epub 2004 Jan 5. PMID: 14722882.
21. Zhang R, Lee WC, Lau YL, et al. Consequência reopatólógica da formação da roseta de *Plasmodium vivax*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10 (8): e0004912. Publicado em 10 de agosto de 2016. doi: 10.1371 / journal. pntd.0004912.
22. Albrecht, L., Lopes, SCP, da Silva, ABIE *et al*. A integridade das rosetas protege

- o *Plasmodium vivax* de ser fagocitado. *Sci Rep* **10**, 16706 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73713-w>
23. LOPES, P. C. S. et al. Paucity of *Plasmodium vivax* mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. Brief Report, p. 1403- 1407, Jan 2014. DOI: 10.1093/infdis/jiu018.
 24. Salazar Alvarez LC, Vera Lizcano O, da Silva Barros DKA, Baia-da-Silva DC, Monteiro WM, Pimenta PFP, de Lacerda MVG, Costa FTM, Lopes SCP. *Plasmodium vivax* Gametocytes Adherence to Bone Marrow Endothelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Jun 24; 11:614985. doi: 10.3389/fcimb.2021.614985. PMID: 34249772; PMCID: PMC8265044.
 25. Dearnley, MK, Chu, TT, Zhang, Y., Looker, O., Huang, C., Klonis, N., Yeoman, JA, Kenny, S., Arora, M., Osborne, JM, Chandramohanadas, R., Zhang, S., Dixon, MW, & Tilley, L. (2016). A remodelação reversível da célula hospedeira sustenta as mudanças de deformabilidade nos estágios sexuais do sangue do parasita da malária. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*, 4800-4805.
 26. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood.* 2011;117(8):1–3.
 27. Sanyal S, Egée S, Bouyer G, Perrot S, Safeukui I, Bischoff E, Buffet P, Deitsch KW, Mercereau-Puijalon O, David PH, Templeton TJ, Lavazec C. *Plasmodium falciparum* STEVOR protein impact erythrocyte mechanical properties. *Blood.* 2012 Jan 12;119 (2):e1-8. doi: 10.1182/blood-2011-08-370734. E pub 2011 Nov 21. PMID: 22106347; PMCID: PMC3257022.
 28. Watermeyer JM, Hale VL, Hackett F, Clare DK, Cutts EE, Vakonakis I, Fleck RA, Blackman MJ, Saibil HR. A spiral scaffold underlies cytoadherent knobs in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Blood.* 2016 Jan 21;127(3):343-51. doi: 10.1182/blood-2015-10-674002. E pub 2015 Dec 4. PMID: 26637786; PMCID: PMC4797390.
 29. Fernandez-Becerra C, Bernabeu M, Castellanos A, et al. Genes dependentes do baço do *Plasmodium vivax* codificam antígenos associados à citoadesão e proteção clínica. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020; 117 (23): 13056-13065.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

- As contaminações e quantidade insuficiente após o processo da amostra, foram uma das limitações que tivemos para a redução do total de amostras analisadas;
- Houve problemas no amadurecimento do parasita;
- A falta de sincronia das amostras dificulta a análise da deformabilidade de cada estágio;

Como perspectiva deste trabalho destacou a necessidade de aumentar o número de isolados nos ensaios de deformabilidade, com maior automatização da análise por citometria de fluxo e a avaliação de amostras mais sincronizadas para ampliar o número de tempos de maturação dos parasitas.

5. CONCLUSÃO

Ao fim deste trabalho foi possível concluir que:

- Os eritrócitos infectados por *P.vivax* ficam retidos no sistema de microfiltração com microesferas metálicas que simulam a circulação esplênica, ou seja, estes apresentam perda de sua deformabilidade;
- Esta perda é mais evidente nos eritrócitos infectados pelos estágios assexuados maduros, esquizontes, e nos estágios sexuados do parasita, os gametócitos;
- Não houve hemólise pós filtração das amostras analisadas;
- Esta perda de deformabilidade pode desencadear consequências na filtração realizada pelo baço podendo levar a um quadro clínico de esplenomegalia, sendo assim, mais estudos devem ser realizados para elucidar esta característica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. World malaria report 2020- WHO. 2020.
2. Harbach RE. The Phylogeny and Classification of Anopheles. *Anopheles mosquitoes - New insights into Malar vectors*. 2013;(June):2–55.
3. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. Erratum: The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: Occurrence data, distribution maps and bionomic précis (*Parasit Vectors* (2010) 3 (72)). *Parasites and Vectors*. 2011;4(1):1–26.
4. WHO. World malaria report 2020 20 years of global progress and challenges. 2020.
5. Boletim. 2020;
6. Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: The Plasmodium liver stage. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(11):849–56.
7. Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med*. 2013;210(5):905–15.
8. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2009;9(9):555–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
9. Sturm A, Amino R, Van De Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* (80-). 2006;313(5791):1287–90.
10. Boddey JA, Cowman AF. Plasmodium nesting: Remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:243–69.
11. Tuteja R. Malaria - An overview. *FEBS J*. 2007;274(18):4670–9.
12. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006;12(2):220–4.
13. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends Parasitol* [Internet]. 2015;31(8):357–62. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.04.010>
14. Stuart MJ, Nagel RL. Seminar Sickle-cell disease. October. 2004;
 15. David PH, Hommelt M, Miller LH, Udeinya IJ, Oliginot LD. Parasite sequestration in Plasmodium falciparum malaria: Spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes (monkey/endothelium/surface antigen/cell binding). *Med Sci.* 1983;80(August):5075–9.
 16. Schmidt EE, Macdonald IC, Groom AC. Circulatory pathways in the sinusal spleen of the dog, studied by scanning electron microscopy of microcorrosion casts. *J Morphol.* 1983;178(2):111–23.
 17. Safeukui I, Correias JM, Brousse V, Hirt D, Deplaine G, Mulé S, et al. Retention of Plasmodium falciparum ring-infected erythrocytes in the slow, open microcirculation of the human spleen. *Blood.* 2008;112(6):2520–8.
 18. Lavazec C. Molecular mechanisms of deformability of Plasmodium-infected erythrocytes. Vol. 40, *Current Opinion in Microbiology.* 2017.
 19. Hochmuth RM. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech.* 2000;33(1):15–22.
 20. Brien EO. Abnormalities in the Caused. 1989;74(2).
 21. Glenister FK, Coppel RL, Cowman AF, Mohandas N, Cooke BM. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood.* 2002;99(3):1060–3.
 22. Da Costa L, Suner L, Galimand J, Bonnel A, Pascreau T, Couque N, et al. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells, Mol Dis [Internet].* 2016;56(1):9–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcnd.2015.09.001>
 23. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood.* 2011;117(8):1–3.
 24. Gambhire P, Atwell S, Iss C, Bedu F, Ozerov I, Badens C, et al. High Aspect Ratio Sub-Micrometer Channels Using Wet Etching: Application to the Dynamics of Red Blood Cell Transiting through Biomimetic Splenic

- Slits. *Small*. 2017;13(32):1–11.
25. Herricks T, Antia M, Rathod PK. Deformability limits of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Cell Microbiol*. 2009;11(9):1340–53.
 26. Handayani S, Chiu DT, Tjitra E, Kuo JS, Lampah D, Kenangalem E, et al. High deformability of *Plasmodium vivax*-infected red blood cells under microfluidic conditions. *J Infect Dis*. 2009;199(3).
 27. Depond M, Henry B, Buffet P, Ndour PA. Methods to Investigate the Deformability of RBC During Malaria. Vol. 10, *Frontiers in Physiology*. 2020.
 28. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol*. 2005;21(2):75–80.
 29. Warncke JD, Beck H. crossm Host Cytoskeleton Remodeling throughout the Blood Stages. 2019;(September):1–21.
 30. Sherling ES, Knuepfer E, Brzostowski JA, Miller LH, Blackman MJ, Van Ooij C. The *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RhopH3 plays essential roles in host cell invasion and nutrient uptake. *Elife*. 2017;6:1–23.
 31. Counihan NA, Chisholm SA, Bullen HE, Srivastava A, Sanders PR, Jonsdottir TK, et al. *Plasmodium falciparum* parasites deploy RhopH2 into the host erythrocyte to obtain nutrients, grow and replicate. *Elife*. 2017;6:1–31.
 32. Waller KL, Nunomura W, An X, Cooke BM, Mohandas N, Coppel RL. Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum* binds to the 30-kDa domain of protein 4.1 in malaria-infected red blood cells. *Blood*. 2003;102(5):1911–4.
 33. Rug M, Prescott SW, Fernandez KM, Cooke BM, Cowman AF. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood*. 2006;108(1):370–8.
 34. Wahlgren M, Goel S, Akhouri RR. Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(8):479–91.
 35. Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JEV, Avril M, et al. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C

- receptor. *Nature* [Internet]. 2013;498(7455):502–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12216>
36. Oberli A, Zurbrügg L, Rusch S, Brand F, Butler ME, Day JL, et al. Plasmodium falciparum Plasmodium helical interspersed subtelomeric proteins contribute to cytoadherence and anchor P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 to the host cell cytoskeleton. *Cell Microbiol.* 2016;18(10):1415–28.
 37. Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH. A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol Today.* 2000;16(10):427–33.
 38. Quadt KA, Barfod L, Andersen D, Bruun J, Gyan B, Hassenkam T, et al. The Density of Knobs on Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes Depends on Developmental Age and Varies among Isolates. *PLoS One.* 2012;7(9):1–8.
 39. Bozdech Z, Llinás M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol.* 2003;1(1):85–100.
 40. Millholland MG, Chandramohanadas R, Pizzarro A, Wehr A, Shi H, Darling C, et al. The malaria parasite progressively dismantles the host erythrocyte cytoskeleton for efficient egress. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(12):1–12.
 41. Nunez-Iglesias J, Blanch AJ, Looker O, Dixon MW, Tilley L. A new Python library to analyse skeleton images confirms malaria parasite remodelling of the red blood cell membrane skeleton. *PeerJ.* 2018;2018(2):1–10.
 42. Dearnley M, Chu T, Zhang Y, Looker O, Huang C, Klonis N, et al. Reversible host cell remodeling underpins deformability changes in malaria parasite sexual blood stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(17).
 43. Naissant B, Dupuy F, Duffier Y, Lorthiois A, Duez J, Scholz J, et al. Plasmodium falciparum STEVOR phosphorylation regulates host erythrocyte deformability enabling malaria parasite transmission. *Blood.* 2016;127(24).
 44. Tibúrcio M, Sauerwein R, Lavazec C, Alano P. Erythrocyte remodeling by

- Plasmodium falciparum* gametocytes in the human host interplay. Vol. 31, Trends in Parasitology. Elsevier Ltd; 2015. p. 270–8.
45. Tibúrcio M, Silvestrini F, Bertuccini L, Sander AF, Turner L, Lavstsen T, et al. Early gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cell Microbiol.* 2013;15(4):647–59.
 46. Dondorp AM, Kager PA, Vreeken J, White NJ. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitol Today.* 2000;16(6):228–32.
 47. Malleret B, Li A, Zhang R, Tan KSW, Suwanarusk R, Claser C, et al. *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of. *Blood.* 2015;125(8):1314–25.
 48. Barnwell JW, Ingravallo P, Galinski MR, Matsumoto Y, Aikawa M. *Plasmodium vivax*: Malarial proteins associated with the membrane-bound caveola-vesicle complexes and cytoplasmic cleft structures of infected erythrocytes. *Exp Parasitol.* 1990;70(1):85–99.
 49. Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, Silamut K, Sattabongkot J, White NJ, et al. The Deformability of Red Blood Cells Parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *J Infect Dis.* 2004;189(2).
 50. Huang X, Huang S, Ong LC, Lim JC-S, Hurst RJM, Mushunje AT, et al. Differential Spleen Remodeling Associated with Different Levels of Parasite Virulence Controls Disease Outcome in Malaria Parasite Infections. *mSphere.* 2016;1(1).
 51. Kho S, Qotrunnada L, Leonardo L, Andries B, Wardani PAI, Fricot A, et al. Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study. *PLOS Med* [Internet]. 2021 May 26;18(5):e1003632. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003632>

7. ANEXOS E APÊNDICES

7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Patogênese e Infectividade de *Plasmodium vivax*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD) está fazendo um estudo com o objetivo de estudar a biologia do *Plasmodium vivax*, ou seja, o causador da doença que você tem no momento. Para isso, é preciso que seja feita a retirada de amostra de sangue do paciente para realizar alguns testes e ensaios funcionais com este sangue, a fim de se estudar a patogênese da doença.

Para nos ajudar a entender esse problema, precisamos realizar estes testes com sangue de pacientes com malária vivax (homem ou mulher, maiores de 18 anos). Por isso pedimos que você participe deste estudo. Abaixo tem o ciclo da malária, pra você entender melhor como ocorre a doença:



Ciclo da Malária

Este estudo sobre malária será feito com pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Hospital Tropical). Você não vai precisar fazer nada de especial para participar do projeto. Como sempre acontece na rotina do hospital, você vai fazer o exame para a malária e se ele for positivo, você irá receber o tratamento gratuito de malária, seguindo o protocolo do Ministério da Saúde. Se você tiver malária vivax e aceitar participar desse projeto, precisaremos apenas colher uma amostra de 20 mL de sangue da veia do braço, como está representado na imagem a seguir:



Coleta de Sangue

Todo o procedimento de coleta será feito por uma pessoa da nossa equipe treinada para isso e com experiência, utilizando material descartável e com total higiene.

Após a coleta de sangue, poderá ocorrer dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente poderá ocorrer desmaio ou infecções no local da punção. Todos os



cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. Mas, caso você se sinta mal durante a coleta, os pesquisadores responsáveis pelo estudo irão encaminhar você para um médico especializado deste mesmo hospital para lhe examinar e oferecer tratamento, se necessário.

Para evitar toda e qualquer situação de perda do sigilo e privacidade do sujeito da pesquisa, todas as amostras serão coletas e identificadas com códigos e o nome do paciente nunca será divulgado.

É importante lembrar que a quantidade de sangue a ser coletada não representa qualquer risco para a saúde. A participação nesse estudo não oferece riscos futuros à sua saúde e você não receberá nenhum dinheiro por participar nele. A qualquer momento você pode desistir de participar, sem qualquer prejuízo para o seu tratamento contra a doença.

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de um estudo sobre a biologia de *Plasmodium vivax* e sua patogenicidade. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Mas, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a futuramente desenhar novas drogas e vacinas para o tratamento dos pacientes e prevenção de novos casos de malária vivax.

O restante do sangue que não for utilizado no estudo será jogado fora de maneira correta para não poluir o meio ambiente e nem contaminar as pessoas.

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. Heltor 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. Heltor Vieira Dourado também poderá tirar dúvidas 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, CEP: 69040-000) ou pelo telefone (92) 2127 3572 (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas). Este TCLE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Eu,, entendi tudo sobre o estudo "Patogênese e Infectividade de *Plasmodium vivax*"

Data: ____ / ____ / ____

Endereço:

.....

Telefone: (....)

Polegar direito:



Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário:

..... Data: ____ / ____ / ____

7.2 Procedimento Operacional Padrão (POP)

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão 02	
Título	Procedimento operacional padrão para o descongelamento e congelamento do <i>Plasmodium spp.</i>		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por: Dayanne Barros	Revisado por: Camila Fabbri	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas
Camila Fabbri	2	Alterações no procedimento, adição de referências, mudança para o novo modelo de POP

1. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a ser seguido no processo de descongelamento e congelamento do *Plasmodium spp.* conduzido no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todos os profissionais que realizarão a atividade de descongelamento e congelamento do *Plasmodium spp.* no IPCCB.

3. DEFINIÇÕES

Congelamento de *Plasmodium spp.*: procedimento utilizado para preservar culturas de *P. falciparum*, geralmente no estágio inicial do ciclo do parasito - trofozoítos jovens – afim de possibilitar experimentos futuros com o protozoário em cultivo. Utiliza-se uma solução de glicerol para proteger os parasitos dos cristais de gelo.

Descongelamento de *Plasmodium spp.*: procedimento utilizado para descongelar o parasito com a adição de soluções de NaCl em concentrações diferentes.

4. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

5. POP'S RELACIONADOS

POP – Meios de cultura

POP – Coluna de celulose

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Preparação de Glicerolite

- a) 113,25 ml de Glicerol (Sigma, cat n° G5516).
- b) 7,8 g de Sódio Lactato líquido (Sigma, cat n°L4263).
- c) 0,093g de Cloreto de Potássio (KCl) (J.T.Baker, cat n° 3040-01)
- d) Completar com 250 ml de água MilliQ.
- e) Ajustar o pH para 7,2 com Solução de Bicarbonato de Sódio 10% (peso/volume).
- f) Filtrar a 22 μ M dentro da cabine de fluxo laminar.

6.2 Preparação de NaCl a 12%

- a) Pesar 12g de NaCl
- b) Diluir em 100 mL de água destilada ou mili-Q
- c) Filtrar a 22 μ M dentro da cabine de fluxo laminar.

6.3 Preparação de NaCl a 1,6%

- d) Pesar 1,6g de NaCl
- e) Diluir em 100 mL de água destilada ou mili-Q
- f) Filtrar a 22 μ M dentro da cabine de fluxo laminar.

6.4 Descongelamento do *Plasmodium* spp.:

- a) Pegar no nitrogênio um microtubo com amostra do parasito e descongelar em temperatura ambiente;
- b) Após o descongelamento, add lentamente 1/5 do volume do pellet de solução NaCl 12% no microtubo e homogenizar;
- c) Transferir para o falcon de 15ml a amostra e add lentamente 10x o volume do pellet de NaCl 1,6% e homogeneizar;

- d) Levar para a centrifugar em 1500rpm por 5min;
- e) Após a centrifugação, lavar 1x com meio RPMI pH 7,2 (meio de lavagem) e centrifugar mais 1x;
- f) Após lavagem colocar em cultura acrescentando hemácias sadias (100-200 μ L) (no caso da espécie de *P. falciparum*);
- g) Add no falcon 5mL do meio RPMI completo para (checar pop meios de cultura), deixando o Hct 4% (no caso da espécie de *P. falciparum*). Transferir para a garrafa 25cm³, colocar gás e leva para a estufa;
- h) Para as demais espécies, prosseguir com o protocolo específico.

Exemplos das quantidades utilizadas de NaCl12%, 1,6% e Hct4%

100 μ L de pellet X 1/5 = 20 μ L de NaCl 12%

100 μ L de pellet X 10 = 1000 μ L de NaCl 1,6%

4% é 4mL de sangue-----100ml de meio

0,2mL de sangue-----X

X= 5 mL de meio RPMI completo

Obs: Esse 0,2ml de sangue foram os 100 μ L do pellet + 100 μ L sangue adicionado no tubo falcon.

6.5 Congelamento do *Plasmodium* spp.

- a) Cultura em ring (Parasitemia maior que 5%) para *P. falciparum*. Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos;
- b) Para *P. vivax* primeiramente realizar a coluna de celulose (verificar POP coluna de celulose), realizar a lavagem e reservar o pellet;
- c) Contar o volume de pellet de hemácias, independente da espécie;
- d) Adicionar lentamente com auxílio do vórtex (ou homogeneizando manualmente) 1.67x do volume de pellet de hemácias de Glicerolite* (exemplo: 400 μ L de pellet, adicionar 668 μ L de Glicerolite);
- e) Colocar em criotubos para nitrogênio e marcar no tubo o volume do pellet de hemácias, a parasitemia, espécie e a data de congelamento;
- f) Armazenar no -80°C por 24 h (utilizando o Mr. Frosty) e depois transferir para o botijão de Nitrogênio.

7. REFERÊNCIAS

Methods in Malaria Research – fourth edition

Doolan, Denise L. (2002). Malaria Methods and Protocols Volume 72 || In Vitro Culture of Plasmodium Parasites. doi:10.1385/1-59259-271-6:477

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão 02	
Título	Procedimento operacional padrão para confecção da coluna de celulose e filtração da amostra de <i>P. vivax</i>		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por: Macejane Ferreira de Souza	Revisado por: Camila Fabbri	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aprovação:

Nome	Versão	Alterações realizadas
Camila Fabbri	2	Alterações no procedimento, adição de referências, mudança para o novo modelo de POP

8. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de confecção de coluna de celulose filtração da amostra de *P. vivax*, conduzido no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

9. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todos os profissionais que realizarão a confecção da coluna de celulose no IPCCB.

10. DEFINIÇÕES

Coluna de celulose: aparato confeccionado com o objetivo de filtrar as amostras de pacientes de *P. vivax* para remover os leucócitos. É confeccionado com a utilização de seringas de 10 mL, lã de vidro ou papel de filtro, acoplados em um tubo Falcon de 15 mL.

11. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

12. POP'S RELACIONADOS

POP – Meios de cultura

13. PROCEDIMENTOS

13.1 Materiais necessários:

- a) Seringa de 10 ml;
- b) Tubo Falcon de 15 ml;
- c) Fita adesiva;
- d) Lã de vidro ou papel de filtro cortado em quadro de 0,5 cm x 0,5 cm;
- e) Celulose Sigma;
- f) Pipeta de Pasteur;
- g) Suporte para tubos falcon;
- h) Meio de cultura RPMI 1x

13.2 Confecção da coluna:

- a) Colocar o tubo falcon em um suporte e retirar a tampa;
- b) Retirar a seringa da embalagem e remover o êmbolo;
- c) Conecta a seringa, com o orifício maior virado para cima ao tubo falcon utilizando uma fita adesiva;
- d) Colocar uma pequena quantidade de lã de vidro e cobrir superficialmente o orifício menor da seringa, com ajuda de uma pinça ou pipeta ou colocar o fragmento de papel filtro cortado com o auxílio da pinça ou pipeta;
- e) Caso seja utilizado o papel de filtro, rinsar com RPMI 1x para fixá-lo, antes de prosseguir;

- f) Colocar a celulose na seringa até atingir a marca de 2 ou 3 mL;
- g) Ligar o UV da câmara de fluxo e aguardar a descontaminação da coluna por 15 minutos.

13.3 Filtragem da amostra:

- a) Realizar a coleta de sangue de acordo com o POP – coleta de sangue. Armazenar o tubo a 36°C até o processamento da amostra;
- b) Centrifugar o sangue em 2000 RPM por 5 min a 36°C;
- c) Retirar o plasma e estocar (caso necessário);
- d) Lavar o pellet de sangue com RPMI 1x três vezes;
- e) Durante a última lavagem do pellet, também adicionar RPMI na coluna de celulose (duas pipetas);
- f) Aguardar sair todo o meio da celulose;
- g) Após a última lavagem, homogeneizar o pellet com em torno de 1,5 mL de meio RPMI 1x e colocar com cuidado sobre a celulose no início. Posteriormente, pode-se colocar com mais agilidade o restante da solução de contendo pellet + RPMI;
- h) Retirar o meio que gotejou antes de gotejar sangue;
- i) Quando passar todo o sangue, colocar meio RPMI até a boca da seringa;
- j) Após a passagem, centrifugar. (1500 RPM, 5 minutos);
- k) Lavar uma vez com RPMI e centrifugar;

14. REFERÊNCIAS

Methods in Malaria Research – Sixth Edition. Edited by Kirsten Moll, Akira Kaneko, Arthur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR Glasgow, UK, 2013.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LAB_	Versão 02	
Título	Procedimento operacional padrão para preparação de meios de cultura: RPMI, IMDM, meio completo para <i>P. vivax</i> , meio completo para <i>P. falciparum</i>		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aprovação:
Glenda Q. Ramos	Camila Fabbri	Stefanie Lopes	

Nome	Versão	Alterações realizadas
Camila Fabbri	2	Alterações no procedimento, adição de referências, mudança para o novo modelo de POP

15. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de preparo dos meios de cultura utilizados no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

16. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todos os profissionais que realizarão a produção de meios de cultura no IPCCB.

17. DEFINIÇÕES

Meios de Cultura: Os meios de culturas são preparações químicas geralmente usadas para a realização de análises laboratoriais, que possuem na sua fórmula nutrientes entre outras substâncias que provém as condições necessárias para que os microrganismos inoculados se multipliquem em um meio artificial, para entre outras funções, o seu estudo e análise.

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM): Em 1976, Guilbert e Iscove demonstraram que células precursoras de eritrócitos e macrófagos podiam ser cultivadas em meio com soro reduzido suplementado com albumina, transferrina, lecitina e selênio. O Meio Iscove é uma variação do Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo selênio, aminoácidos

adicionais, vitaminas, piruvato de sódio, tampão HEPES e nitrato de potássio em vez de nitrato férrico.

Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI): O meio RPMI foi originalmente desenvolvido para cultivar células leucêmicas humanas em suspensão e como uma monocamada. Tem sido considerado adequado para uma variedade de células de mamíferos, incluindo HeLa, Jurkat, MCF-7, PC12, PBMC, astrócitos e carcinomas.

Meio completo *P. vivax*: adição de soro inativado AB para cultivo de formas assexuadas e sexuadas

Meio completo *P. falciparum*: adição de plasma A+ para cultivo de formas assexuadas e sexuadas

18. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

19. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

20. PROCEDIMENTOS

20.1 Materiais

- a) Copo Becker em vidro 1000 mL;
- b) Espátula;
- c) Bastão de vidro;
- d) Barras magnéticas ("peixinhos");
- e) Garrafa de vidro estéril para armazenamento (estéril);
- f) Meio de cultura comerciais em pó;
- g) Filtro a vácuo estéril;
- h) Filtro de seringa a 0,22 μM ;
- i) Seringa de 10 mL.

20.2 Equipamentos

- a) Balança analítica;
- b) Agitador magnético;
- c) Bomba para filtração a vácuo.

20.3 Meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

- a) Adicionar 1000 ml de água destilada em um Becker de vidro e adicionar os reagentes abaixo relacionados, na ordem que se apresentam, agitando levemente entre uma adição e outra:
- b) 3,024 g/ L de Bicarbonato de Sódio;
- c) 3,024 g/L de Glicose;
- d) 1 envelope de IMDM comercial.
- e) Levar a solução ao agitador magnético em temperatura ambiente. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução em câmara de fluxo laminar com auxílio do filtro a vácuo e a bomba;
- f) Acondicionar em vidro estéril identificando a data de produção;
- g) Armazenar na geladeira (4°C).

20.4 Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (meio de lavagem 1x)

- a) Observar o rótulo do meio a ser preparado. Caso o meio de cultura em pó não contenha glicose e bicarbonato de sódio, pesar 2,4 g de glicose e 2,4 g de bicarbonato de sódio.
- b) Levar a solução ao agitador magnético em temperatura ambiente. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução em câmara de fluxo laminar com auxílio do filtro a vácuo e a bomba;
- c) Acondicionar em vidro estéril identificando a data de produção;
- d) Armazenar na geladeira (4°C).

20.5 Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (meio para percoll 10x)

O RPMI 10x é utilizado para o protocolo de enriquecimento de parasitos pelo percoll a 45%. Não é necessário adicionar glicose ou bicarbonato de sódio, apenas prosseguir da seguinte forma:

- a) Em um Becker de 200 mL adicionar 100 mL de água destilada;
- b) Adicionar o meio de cultura em pó;

- e) Levar a solução ao agitador magnético em temperatura ambiente. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução em câmara de fluxo laminar com auxílio do filtro para seringa de 0,22 μ M;
- f) Acondicionar em vidro estéril identificando a data de produção;
- g) Armazenar na geladeira (4°C).

20.6 Preparação do meio do *P. vivax* completo

- a) Adicionar soro inativo humano AM no meio IMDM apenas quando for aliqotado no falcon de 50ml (40ml de meio IMDM + 10 ml de soro inativado humano AB).
- b) Identificar e armazenar em geladeira 4°C

20.7 Preparação do meio do *P. falciparum* completo

- a) A cada 1L de RPMI, adicionar 50mg de hipoxantina;
- b) Levar a solução ao agitador magnético em temperatura ambiente. Após, 40 minutos de agitação, filtrar a solução em câmara de fluxo laminar;
- c) Adicionar o plasma A+ apenas quando for aliqotado no falcon de 50ml (40ml de meio P.f + 10 ml de Plasma) para o cultivo.
- d) Identificar e armazenar em geladeira 4°C

21. REFERÊNCIAS

Methods in Malaria Research – Sixth Edition. Edited by Kirsten Moll, Akira Kaneko, Arthur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR Glasgow, UK, 2013.

Doolan, Denise L. (2002). Malaria Methods and Protocols Volume 72 || In Vitro Culture of Plasmodium Parasites. doi:10.1385/1-59259-271-6:477

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão 01	
Título	Procedimento operacional padrão para a preparação e execução do enriquecimento com Percoll a 45%		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por: Camila Fabbri	Revisado por: Rosa Amélia Santana	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aprovação:

22. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de preparação e execução do enriquecimento com Percoll a 45% no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

23. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todos os profissionais que realizarão a realização do enriquecimento com Percoll a 45% no IPCCB.

24. DEFINIÇÕES

EPIs: Equipamentos de proteção individual

RCF: do inglês *RelativeCentrifugal Force*, é a unidade padrão para medidas de centrífugas

RPM: rotações por minuto. Uma das unidades de rotação da centrífuga que não leva em conta o diâmetro do equipamento.

RPMI 1X: meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 diluído em 1 litro de água destilada filtrada.

RPMI 10X: meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 diluído em 50 mL de água destilada filtrada.

25. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

26. POP'S RELACIONADOS

5.1 Coleta de sangue;

5.2 Meios de cultura;

5.3 Coluna de celulose;

27. PROCEDIMENTOS

27.1 Materiais e Reagentes:

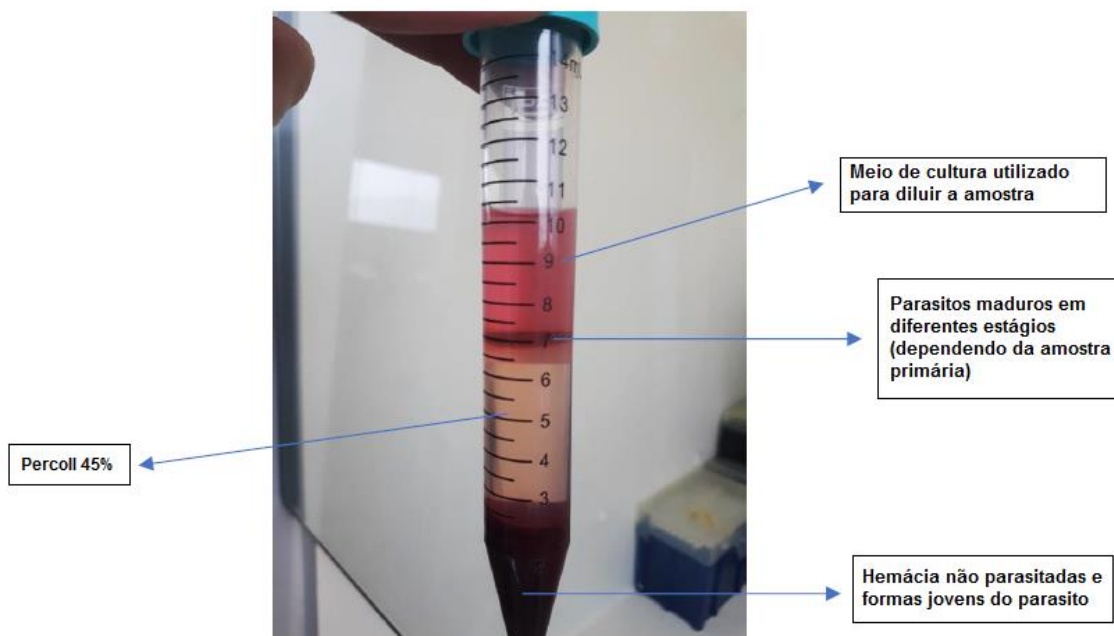
- a) tubo falcon estéril de 15 mL,
- b) percoll,
- c) meio RPMI 10X,
- d) meio RPMI 1X (checar o POP de meios de cultura),
- e) água destilada filtrada com filtro de seringa de especificação 20 µm
- f) pipeta estéril descartável pasteur;

27.2 Diluição do percoll a 45%

- a) Em um falcon de 15 mL pipetar: 4,5 mL de água, 4,5 mL de percoll, 1 mL de RPMI 10x.
- b) Homogeneizar vertendo o tubo falcom fechado. Isso é a conta para 10 mL de percoll 45%.
- c) Passar 5 mL para outro falcon de 15 mL, tendo assim, dois falcons com 5 mL de percoll 45% cada;

27.3 Enriquecimento de amostra com percoll 45%

- a) Em posse da amostra a ser utilizada (cultura de gametócitos, cultura de oocinetos, amostra fresca proveniente da coluna de celulose, dentre outras) com objetivo de enriquecer utilizando o percoll 45%, diluir a amostra na proporção de 1:1 usando o meio RPMI 1X;
- b) Adicionar a amostra diluída vagarosamente no percoll 45% na proporção de 1:1. Ou seja, se há 5 mL de percoll 45% no falcon de 15 mL, apenas 5mL da amostra diluída deve ser adicionada. Esse processo deve ser realizado com o tubo falcon já contendo o percoll 45% inclinado em 45 graus e a amostra diluída sendo adicionada vagarosamente com auxílio de uma pipeta pasteur. Quando a primeira camada de amostra estiver formada sobre o percoll 45%, o tubo pode voltar a posição de 90 graus e o ritmo de adição da amostra pode ser acelerado;
- c) Centrifugar o tubo falcon por 15 min, 1500g (ou RCF), sem freio e sem aceleração;
- d) Após a centrifugação, deverá formar as seguintes camadas:



- e) Com atenção e uma pipeta pasteur estéril, retirar o anel de parasitas maduros e transferir para um falcon 15 mL limpo. Pode retirar também o meio simultaneamente. Cautela para não gerar refluxo no momento que estiver sugando o anel, dessa forma, retirar aos poucos;
- f) Com o falcon de 15 mL contendo meio e o anel de parasitos maduros, centrifugar em 1500 RPM por 5 min. Irá formar um pellet bem pequeno no fundo do falcon;
- g) Lavar o pellet com RPMI 1x. Repetir o procedimento mais duas vezes;
- h) Após as lavagens, retirar o máximo do sobrenadante do pellet (de forma segura, com uma ponteira de 50 uL) e homogeneizar. Esse é o pellet de parasito maduros pronto para ser utilizado no próximo passo do objetivo final da amostra que está sendo processada.

28. REFERÊNCIAS

Bounkeua V, Li F, Chuquiyauri R, Abeles SR, Mcclean CM, Neyra V, et al. Lack of Molecular Correlates of Plasmodium vivax Ookinete Development. 2011;85(2):207–13.

Pukrittayakamee S, Imwong M, Singhasivanon P, Stepniewska K, Day NJ, White NJ. Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in *P. vivax* malaria. Am J Trop Med Hyg. 2008;79(3):378–84.

Methods in Malaria Research – Sixth Edition. Edited by Kirsten Moll, Akira Kaneko, Arthur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR Glasgow, UK, 2013.

Doolan, Denise L. (2002). Malaria Methods and Protocols Volume 72 || In Vitro Culture of Plasmodium Parasites. doi:10.1385/1-59259-271-6:477

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		Versão 01	
Título	Procedimento operacional padrão para a preparação e execução do enriquecimento com Percoll a 70%		
Língua do Documento	Português		
Elaborado por: Camila Fabbri	Revisado por: Rosa Amélia Santana	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aprovação:

29. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo de preparação e execução do enriquecimento com Percoll a 70% no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB).

30. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se a todos os profissionais que realizarão a realização do enriquecimento com Percoll a 70% no IPCCB.

31. DEFINIÇÕES

EPIs: Equipamentos de proteção individual

RCF: do inglês *Relative Centrifugal Force*, é a unidade padrão para medidas de centrífugas

RPM: rotações por minuto. Uma das unidades de rotação da centrífuga que não leva em conta o diâmetro do equipamento.

RPMI 1X: meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 diluído em 1 litro de água destilada filtrada.

32. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores.

33. POP'S RELACIONADOS

5.1 Coleta de sangue;

5.2 Meios de cultura;

5.3 Coluna de celulose;

34. PROCEDIMENTOS

34.1 Materiais e Reagentes:

g) tubo falcon estéril de 15 mL

h) tubo falcon estéril de 50 mL

i) percoll,

j) PBS 10x

k) PBS 1x

l) água destilada filtrada com filtro de seringa de especificação 0,22 μM ;

m) filtros de seringa de 0,22 μM ;

n) pipeta estéril descartável pasteur.

34.2 Produção do PBS 10x

a) Diluir 1 tablet de PBS (sigma) em 20 mL de água filtrada dentro do fluxo laminar em um falcon de 50 mL;

b) Identificar, colocar a data de produção e armazenar em geladeira (4°C);

34.3 Produção do PBS 1x

c) Diluir 1 tablet de PBS (sigma) em 200 mL de água destilada;

d) Filtrar em de seringa de 0,22 μM ;

e) Aliquotar em tubos falcons de 50 mL;

f) Identificar, colocar a data de produção e armazenar em geladeira (4°C).

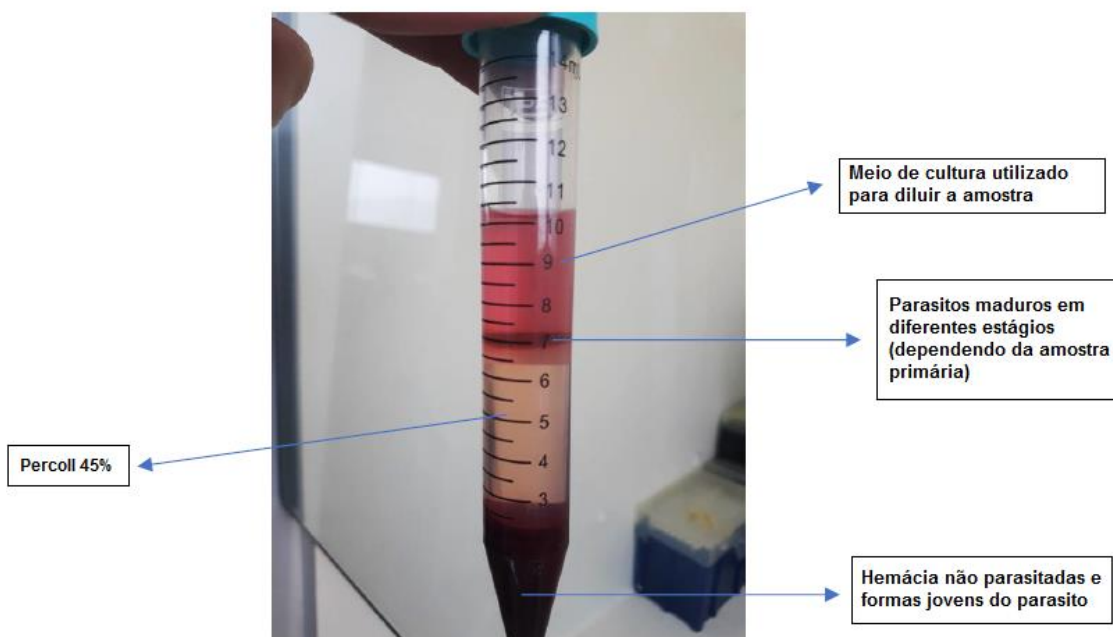
34.4 Diluição do percoll a 70%

d) Preparar percoll isotônico: 9 mL de percoll e 1 mL de PBS 10x;

e) Preparar percoll 70%: 7 partes de percoll isotônico e 3 partel de PBS 1x

34.5 Enriquecimento de amostra com percoll 70%

- i) Em posse da amostra a ser utilizada (cultura de gametócitos, cultura de oocinetos, amostra fresca proveniente da coluna de celulose, dentre outras) com objetivo de enriquecer utilizando o percoll 70%, diluir a amostra na proporção de 1:1 usando o meio RPMI 1X;
- j) Adicionar a amostra diluída vagorosamente no percoll 70% na proporção de 1:1. Ou seja, se há 5 mL de percoll 45% no falcon de 15 mL, apenas 5mL da amostra diluída deve ser adicionada. Esse processo deve ser realizado com o tubo falcon já contendo o percoll 45% inclinado em 45 graus e a amostra diluída sendo adicionada vagorosamente com auxílio de uma pipeta pasteur. Quando a primeira camada de amostra estiver formada sobre o percoll 45%, o tubo pode voltar a posição de 90 graus e o ritmo de adição da amostra pode ser acelerado;
- k) Centrifugar o tubo falcon por 15 min, 1500g (ou RCF), sem freio e sem aceleração;
- l) Após a centrifugação, deverá formar as seguintes camadas:



- m) Com atenção e uma pipeta pasteur estéril, retirar o anel de parasitas maduros e transferir para um falcon 15 mL limpo. Pode retirar também o meio simultaneamente. Cautela para não gerar refluxo no momento que estiver sugando o anel, dessa forma, retirar aos poucos;
- n) Com o falcon de 15 mL contendo meio e o anel de parasitas maduros, centrifugar em 1500 RPM por 5 min. Irá formar um pellet bem pequeno no fundo do falcon;
- o) Lavar o pellet com RPMI 1x. Repetir o procedimento mais duas vezes;
- p) Após as lavagens, retirar o máximo do sobrenadante do pellet (de forma segura, com uma ponteira de 50 uL) e homogeneizar. Esse é o pellet de parasito maduros pronto para ser utilizado no próximo passo do objetivo final da amostra que está sendo processada.

35. REFERÊNCIAS

Bounkeua V, Li F, Chuquiyauri R, Abeles SR, Mcclean CM, Neyra V, et al. Lack of Molecular Correlates of Plasmodium vivax Ookinete Development. 2011;85(2):207–13.

Pukrittayakamee S, Imwong M, Singhasivanon P, Stepniewska K, Day NJ, White NJ. Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in P. vivax malaria. Am J Trop Med Hyg. 2008;79(3):378–84.

Methods in Malaria Research – Sixth Edition. Edited by Kirsten Moll, Akira Kaneko, Arthur Scherf and Mats Wahlgren. EVIMalaR Glasgow, UK, 2013.

Doolan, Denise L. (2002). Malaria Methods and Protocols Volume 72 || In Vitro Culture of Plasmodium Parasites. doi:10.1385/1-59259-271-6:477

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LAB_026_v01_PT		
Título	Procedimento operacional padrão para o Ensaio de Deformabilidade		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Dayanne Barros	Revisado por:	Aprovado por: Stefanie Lopes	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura:	Data da próxima revisão:

Histórico de revisões

Nome	Assinatura	Data (DD/MM/AA)	Alterações realizadas

1. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo do Ensaio de Deformabilidade, conduzido no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, mestrando, doutorando, alunos de iniciação científica ou qualquer outro membro da equipe apto para execução.

3. SIGLAS

Não se aplica.

4. DEFINIÇÕES

Ensaio de deformabilidade: procedimento que visa simular a filtração pelo baço através das beads metálicas.

5. RESPONSABILIDADES

Técnicos, estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e pesquisadores dos laboratórios

6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1 Matérias

- a. Pipetas e ponteiras
- b. Falcon de 15ml
- c. Lâminas
- d. Seringa
- e. Cânulas
- f. Suporte

6.2 Reagentes

- a. Meio RPMI (lavagem)
- b. Meio RPMI+ 5% DE ALBUMAX

6.3 Equipamentos

- a. Centrifuga
- b. Câmara de fluxo laminar

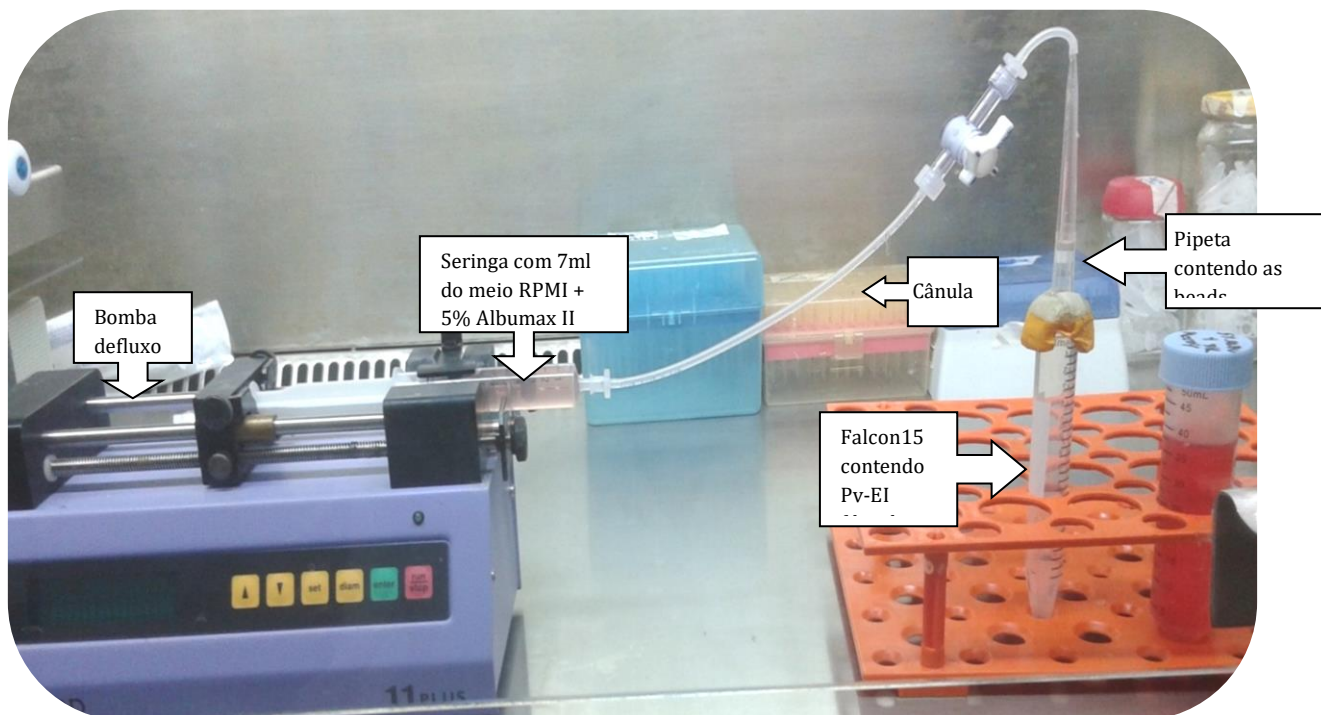
- c. Balança
- d. Bomba de fluxo

7. PROCEDIMENTO

7.1 ENSAIO DE DEFORMABILIDADE

- a. Pesar 200mg de cada beads em tamanho diferente totalizando 400mg em um eppendorf;
- b. Coloca-se todo o material necessário no fluxo;
- c. Com a pipeta com filtro pipetar 800ul do meio rpmi+ 5% albumax e transferir para o eppendorf que está com as beads pesadas;
- d. Pipeta-se então 1000ul do que está no eppendorf e faz a suspensão na pipeta;
- e. Após essa suspensão com o suporte para o falcon coloca a pipeta no falcon 15 e preenche com a seringa de um ml com o meio rpmi+ 5% albumax;
- f. Colocar-se a seringa na bomba de fluxo com 7 ml do meio RPMI 5%albumax para passar na cânula ;
- g. Liga a bomba de fluxo e faz a padronização que é 1ml/min, no volume de 7ml;
- h. Após isso se começa a passar a amostra;

Ex da montagem do circuito



8 ANEXOS

Título	Mudanças ou traduções realizadas

9 DECLARAÇÃO

Este documento se refere à versão final deste POP e encontra-se em vigor a partir da data estipulada no cabeçalho.

10 REFERÊNCIAS

Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood*. 2011.