



Estabelecimento de ensaio ideal de invasão eritrocitária por merozoítos de *Plasmodium chabaudi*

Milena de Farias Azeredo, Pedro Souto Rodrigues, Sergio Henrique Seabra, Renato Augusto DaMatta

A malária causa a morte de mais de 400 mil pessoas por ano, sendo endêmica na maioria dos países tropicais. Existem enormes dificuldades em se estudar a malária humana e, devido a isso, diversos modelos experimentais têm sido cada vez mais utilizados. O modelo murino de infecção causado por *Plasmodium chabaudi* mostra-se um dos melhores para o estudo da malária humana com relevantes contribuições. A invasão eritrocitária pelo parasito envolve vários ligantes/receptores, todavia, um ensaio ideal para estudar essas interações moleculares para essa espécie de parasito não é bem estabelecido, sendo esse conhecimento determinante para o desenvolvimento de novos agentes antimaláricos. Acreditamos que a exposição do fosfolípido fosfatidilserina (PS) seja importante para o processo de invasão do parasito no eritrócito e, deste modo, ensaios de invasão serão realizados para melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro. Eritrócitos foram retirados do sangue da cauda de camundongos sadios da linhagem Balb/C e ressuspendidos em 1 ml de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Camundongos foram mantidos em um regime de 12h de luz e 12h de escuridão e *P. chabaudi* foi inoculado intraperitonealmente. Camundongos com parasitemia superior a 80% foram eutanasiados, sangue obtido por punção cardíaca, centrifugado, eritrócitos ressuspendidos em DMEM, incubados por 30 min a 37°C, sobrenadante contendo parasitos coletado e filtrado. Realizamos interações alterando o tempo e pretendemos variar diferentes parâmetros como proporção parasito:eritrócito, agitação e temperatura. Após as interações as células foram processadas por citospin, coradas com Panótico rápido, analisadas em microscopia de campo claro e a infecção quantificada. Resultados preliminares demonstraram que os merozoítos mantiveram boa viabilidade e infectaram os eritrócitos nessa condição. Toda via, o aumento do tempo resultou em menor infecção. Depois do aprimoramento desse ensaio e estabelecimento dos melhores parâmetros, pretendemos bloquear a PS do parasito com anticorpo anti-PS, a fim de verificar seu papel no processo infectivo. Espera-se desenvolver um ensaio de invasão otimizado entre merozoítos e eritrócitos, bem como demonstrar a possível importância de PS no processo infectivo. O conhecimento gerado a partir desse trabalho pode vir a ajudar no desenvolvimento de novas terapias contra a doença.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Fomento da bolsa: CNPQ



Establishment of an ideal assay for erythrocyte invasion by *Plasmodium chabaudi* merozoites

Milena de Farias Azeredo, Pedro Souto Rodrigues, Sergio Henrique Seabra, Renato Augusto DaMatta

Malaria causes the death of more than 400,000 people a year, being endemic in most tropical countries. There are enormous difficulties in studying human malaria and, because of this several experimental models have been increasingly used. The murine model of infection caused by *Plasmodium chabaudi* is one of the best models for the study of human malaria with relevant contributions. The erythrocyte invasion by the parasite involves several ligands/receptors, however, an ideal assay for the study of these molecular interactions with the used parasite specie is not well established, being this knowledge crucial for the development of new antimalarial agents. We believe that the exposure of the phospholipid phosphatidylserine (PS) is important for the process of invasion of the parasite in the erythrocyte and, therefore, invasion tests will be carried out to better understand the parasite-host relationship. Erythrocytes were obtained from the tail blood of healthy Balb/C mice and resuspended in 1 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Mice were maintained under a 12h light and 12h dark regime and *P. chabaudi* was inoculated intraperitoneally. Mice with parasitemia greater than 80% were euthanized, blood obtained by cardiac puncture, centrifuged, erythrocytes resuspended in DMEM, incubated for 30 min at 37°C, supernatant with parasites collected and filtered. Interactions were carry out altering the time and we intend to vary different parameters such as parasite:erythrocyte ratio, agitation and temperature. After the interactions, cells were processed by cytopspin, stained with fast Panotic, analyzed by bright field microscopy and infection quantified. Preliminary results have shown that merozoites viability was maintained and erythrocytes were infected under these conditions. However, the increase in time resulted in lower infection. After improving this assay and establishing the best parameters, we will block the parasite's PS with anti-PS antibody, in order to verify its role in the infectious process. It is expected to develop an optimized invasion assay between merozoites and erythrocytes, as well as to demonstrate the possible importance of PS in the infectious process. The knowledge generated from this work can help the development of new therapies against the disease.

State University of the North Fluminense Darcy Ribeiro
Promotion of the scholarship: CNPQ