

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E
APLICADA – PPGIBA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR DAS SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS E NÍVEIS DE PLAQUETAS EM PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX SEGUNDO HISTÓRICO DE INFECÇÃO PRÉVIA DE
MALÁRIA.

YURY OLIVEIRA CHAVES

MANAUS – AM

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E
APLICADA – PPGIBA

YURY OLIVEIRA CHAVES

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR DAS SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS E NIVEIS DE PLAQUETAS EM PACIENTES COM
MALÁRIA VIVAX SEGUNDO HISTÓRICO DE INFECÇÃO PRÉVIA DE
MALÁRIA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como pré-requisito para obtenção do título de mestre no curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

ORIENTADOR: PAULO AFONSO NOGUEIRA

CO-ORIENTADOR: MARCUS VINÍCIUS GUIMARAES DE LACERDA

MANAUS – AM

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

C512a

Chaves, Yury Oliveira.

Avaliação da resposta celular das subpopulações de linfócitos e níveis de plaquetas em pacientes com malária vivax segundo histórico de infecção prévia de malária. / Yury Oliveira Chaves. – Manaus: UFAM, 2013.

115f.

Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada), 2013.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius G. de Lacerda.

1. Malária 2. *Plasmodium vivax* 3. Plaquetopenia I. Título
II. Nogueira, Paulo Afonso (Orientador) III. Lacerda, Marcus
Vinicius G.de (Co-orientador)

CDU 616.9362(043.3)

YURY OLIVEIRA CHAVES

AVALIAÇÃO DA DINAMICA CELULAR DAS SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS EM PACIENTES INFECTADOS PELO *PLAMODIUM*
VIVAX SEGUNDO CRITÉRIOS DE EXPOSIÇÃO PRÉVIA DE
MALÁRIA E NÍVEIS DE HEMOGLOBINA E PLAQUETA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como pré-requisito para obtenção do título de mestre no curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira, Orientador e Presidente da Banca
(ILMD- FIOCRUZ)

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão da Costa, Membro externo
(UNICAMP)

Prof. Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, Membro externo
(FMT-HVD)

Aos meus Pais, ***Lindomar José dos Santos*** e ***Maria Neide Oliveira Santos***, pelo apoio e cuidado durante muitas fases da minha vida.

Aos meus Orientadores e amigos de laboratório pelo companheirismo e motivação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Orientadores (Paulo Afonso Nogueira e Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda) pela ajuda em muitos momentos difíceis na caminhada de pesquisador,

Aos amigos de Laboratório (FIOCRUZ – ILMD) André, Luciana, Edilene, Davi, Leidiane, Paula, Diogo, Tullio que sempre me motivaram a sempre prosseguir na determinação dos resultados positivos,

Aos amigos da Fundação de Medicina Tropical Doutor Viera Dourado, (Siuhellen, Gisely, Raimunda, Whellington, Wuelton, Ericilda) que me acolheram me ajudando nas coletas e execução dos experimentos,

Aos amigos e companheiros do HEMOAM (Adriana Malheiro, João Paulo, Allyson) que me ajudaram durante os experimentos na citometria de fluxo,

A minha família que sempre me apoiou apesar de ainda não entender direito o que faço no laboratório, mas que sempre estavam ali nas manhãs em claro estudando nos feriados perdidos pra estudar sem contar com os fins de semana, Obrigado Família!,

A todos que participaram do seminário Laveran no ano em que estive lá, eles lapidaram os conceitos de se fazer pesquisa, projeto e críticas construtivas,

A Pós-graduação na pessoa do corpo docente e professores-pesquisadores externos que me direcionaram a um amadurecimento fundamental para mais um passo na pesquisa, juntamente com a coordenação como facilitadores de aprendizagem,

Aos colegas de mestrado (Cacilda, André Corado, Walter que estavam sempre ali dando forças para alcançarmos boas notas durante o curso, choramos e rimos juntos,

E a Deus acima de tudo, por ter me dado à vida pela qual nunca conseguirei pagar, porém farei valer a pena cada segundo que tiver para ser feliz e fazer o que mais gosto, Pesquisa. AGRADEÇO

RESUMO

A resposta imune inata na fase aguda da malária resulta em um estado imunológico que é profundamente alterado podendo proteger o hospedeiro contra uma forma grave da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica celular das subpopulações de Linfócitos T (CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺), Linfócitos B (CD5⁺CD19⁺ e CD5⁻CD19⁺), NK (CD3⁺CD16⁺CD56⁺ e CD16⁺CD56⁺) e células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* segundo critérios de exposição previa de malária e níveis de hemoglobina e plaqueta. Durante maio e novembro (2012), amostras de sangue periférico de pacientes infectados exclusivamente pelo *P. vivax* com malária não complicada foram separadas em: Grupo 1 (Primo-infectado); Grupo 2 (Última infecção < 7 meses) e Grupo 3 (Última infecção mais de 7 meses). Infecções mistas e co-infecções com dengue foram excluídas por PCR. A expressão moléculas de Adesão (CD31 e CD54) e molécula de memória (CD45RO e as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ , foram analisadas por Citometria de Fluxo. Os dados hematológicos mostraram que os pacientes com malária vivax apresentaram diminuídas as porcentagens de linfócitos ($p < 0.0001$) em relação aos controles. Dos setenta e um pacientes, 36 foram Primo infectado; 16 tiveram malária < 7 meses e 19 há mais 1 ano. Foi observado diferenças significativas nas imunofenotipagens em relação ao aos pacientes com malária Recente (< 7 meses) em relação aos outros históricos. Esses pacientes apresentaram diminuídas quantidade de Linfócitos B1 ($p=0.042$) e T-CD8-CD69 ($p=0.027$). Foi também observada a Plaquetopenia acentuada nos pacientes primo infectados com correlação diretamente proporcional com as subpopulações de CD4 e CD8 ativados e expressão PECAM-1 em linfócitos T-CD8. Diferenças acentuadas no perfil de citocinas puderam de ser observadas com as citocinas TNF- α em relação com IL-10 e IL-6 e a redução no numero de algumas subpopulações linfocitárias nos pacientes cuja ultima malária ocorreu < 7 meses Estes resultados seriam indicativos de imunocompensação da resposta imune contra formas graves da doença nestes indivíduos com historia recente de malária, e o estado não imune de pacientes do *Primo infectado* poderia contribuir para a alteração da contagem de plaquetas comportando-se como um fator de risco para o desenvolvimento de Plaquetopenia na malária.

Palavras chaves: *Plasmodium vivax*, Linfócitos, Plaquetopenia.

ABSTRACT

The innate immune response in the acute phase of malaria results in an immune state that is profoundly altered can protect the host against a grave form of disease. The aim of this study was to evaluate the dynamics of cellular subpopulations of T lymphocytes (CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺), B lymphocytes (CD5⁺CD19⁺ e CD5⁻CD19⁺), NK (CD3⁺CD16⁺CD56⁺ e CD16⁺CD56⁺) and regulatory T cells ((CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) in patients infected with *Plasmodium vivax* according to exposure criteria provided malaria and hemoglobin and platelets. During May and November (2012) Peripheral blood samples from patients infected exclusively by *P. vivax* with uncomplicated malaria were separated into: Group 1 (Primo-infected), Group 2 (Last infection <7 months) and Group 3 (Last infection over 1 year). Mixed infections and co-infections with dengue were excluded by PCR. The expression of adhesion molecules (CD31 and CD54) molecule and memory (CD45RO) and cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α and IFN- γ , were analyzed by Flow Cytometry. Hematological data showed that patients with vivax malaria had decreased percentages of lymphocytes ($p < 0.0001$) compared to controls. Of the seventy-one patients, 36 were Primo infected; 16 had malaria <7 months and 19 for 1 more year. We observed significant differences in immunophenotyping in relation to the malaria patients recent (<7 months) relative to other features. These patients showed decreased amount of B1 lymphocytes ($p=0.042$) and T-CD8-CD69 ($p=0.027$). Was also noted Thrombocytopenia in patients infected with cousin directly proportional correlation with the subpopulations of activated CD4 and CD8 expression and PECAM-1 in CD8 T-lymphocytes. Marked differences in cytokine profile could be observed with cytokines TNF- α compared with IL-10 and IL-6 and the reduction in the number of some lymphocyte subpopulations in patients whose last malaria occurred <7 months. These results would indicate immunocompensation of the immune response against severe disease in these individuals with recent history malaria, and the state is not immune from the Primo-infected patients could contribute to the change in platelet count behaving as a risk factor for the development of thrombocytopenia in malaria.

Key words: *Plasmodium vivax*, Lymphocytes, Thrombocytopenia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Países ou áreas onde ocorre a transmissão de malária no mundo.....	19
Figura 2	Áreas de risco para a malária de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual no Brasil.....	21
Figura 3	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> sp. Fonte: http://www.atlas.malaria.com/images/cicobiologico.jpg	24
Figura 4	Amostras coletadas e sua utilização.....	36
Figura 5	Determinação de linfócitos totais e subpopulações de linfócitos TCD4 ⁺ ou linfócitos TCD8 ⁺ por citometria de fluxo.....	39
Figura 6	Determinação das subpopulações celulares de NK e NKT por citometria de fluxo.....	40
Figura 7	Determinação das subpopulações celulares de linfócitos B e B1 por citometria de fluxo.....	41
Figura 8	Determinação das subpopulações celulares de células T reguladoras por citometria de fluxo.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações dos dados clínicos de 71 pacientes infectados por <i>Plasmodium vivax</i>	33
Tabela 2	Informação dos dados clínicos dos 71 pacientes infectados por <i>Plasmodium vivax</i> mediante o histórico progresso de infecções, <i>Mann Whitney test</i>	35
Tabela 3	Painel de anticorpos (BD Antibodies) para marcação celular.....	37
Tabela 4	Dados hematológicos.....	44
Tabela 5	Dados epidemiológicos dos participantes do estudo	45
Tabela 6.	Media dos valores absolutos das diferentes subpopulações entre os diferentes grupos de pacientes.	47

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Matiz de correlação. Matriz de correlação das diferentes subpopulações celulares de todos os pacientes (A), Primo infectados (B), pacientes com malária recentes (C) e última malária há mais de 1ano(D)..... 49
- Gráfico 2** Box spot das medias dos valores absolutos as subpopulações celulares: CD8 ativado (A), Linfócitos B1(B) e NKT (C), entre os pacientes Primo infectado, pacientes recentes e pacientes com última malária há mais de 7 meses (à esquerda) media categórica entre os grupos em barras verticais mostrando a ordem variável entre os grupos (à direita)..... 51
- Gráfico 3** Box spot das media de intensidade de fluorescência das citocinas (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon-gama (IFN- γ), entre os pacientes primo infectados, pacientes recentes e pacientes com última malária há mais de 7 meses (à esquerda), media categórica entre os grupos em barras verticais mostrando a ordem variável entre os grupos (à direita)..... 53
- Gráfico 4** Correlação entre citocinas (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon-gama (IFN- γ) encontradas nos soros de pacientes infectados por malária vivax aguda. Primo infectados, recentes e ultima malária há mais de 7 meses mostrando em azul a correlação positiva e em vermelho correlação negativa, em que se e clara a correlação única nos pacientes recentes nas correlações entre TNF- α com as citocinas IL-10 e IL-6..... 55
- Gráfico 5** Analise de regressão linear simples entre os níveis TNF- α e IL-10 entre os diferentes os diferentes tipos de históricos, no quel pode ser visto nitidamente que somente os pacientes com malária recente apresentam valores de correlação positiva significantes (P=0,025, e r²=0,44)..... 56
- Gráfico 6** Box spot das medias dos níveis de plaquetas (A), media categórica entre os grupos em barras verticais mostrando a ordem variável entre os grupos (B)..... 57
- Gráfico 7** Correlação entre as diferentes subpopulações celulares, expressão de moléculas de Adesão (ICAM-1 – CD54, PECAM-1 – CD31), moléculas de memória (CD45RO) e o nível de plaquetas entre todos pacientes, Primo infectado e ultima malária há mais de 7 meses mostrando em Azul a correlação positiva e em vermelho correlação

	negativa.....	58
Gráfico 8	Analise de regressão linear simples entre os níveis de plaquetas e as subpopulações de CD4 ativados entre todos os pacientes, $P=0,005$; $r^2= 0,26$ (A), Primo infectado, $P=0,002$; $r^2= 0,44$ (B), ultima malária há mais de 7 meses , $P=0,7$; $r^2= 0,02$ (C).	59
Gráfico 9	Analise de regressão linear simples entre os níveis de plaquetas e as subpopulações de CD4 de memória entre todos os pacientes, $P=0,06$; $r^2= 0,13$ (A), Primo infectado, $P=0,34$; $r^2= 0,06$ (B), ultima malária há mais de 7 meses , $P=0,04$; $r^2= 0,41$ (C) e as subpopulações de CD8 de memória entre todos os pacientes, $P=0,09$; $r^2= 0,10$ (D), Primo infectado, $P=0,55$; $r^2= 0,02$ (E), ultima malária há mais de 7 meses , $P=0,45$; $r^2= 0,41$ (F).	60
Gráfico 10	Analise de regressão linear simples entre os níveis de plaquetas e a expressão de CD31 (PECAM-1) entre todos os pacientes, $P=0,001$; $r^2= 0,32$ (A), Primo infectado, $P=0,01$; $r^2= 0,31$ (B), ultima malária há mais de 7 meses , $P=0,05$; $r^2= 0,39$ (C).	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

µL	Microlitro
ADCI	inibição celular dependente de anticorpo
APC	Alofocianina
C°	Graus Celsius
CD	cluster of differentiation
CM	Malária Cerebral
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminotetraacetato
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Frammento Cristallizzabile
FITC	Isotiocianato de fluorescência
FSC	Tamanho
g	Grama
HCM	hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KC	células de Kupffer
MHC	Major Histocompatibility Complex

mL	Mililitro
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Celular mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução Tampão Salina
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule
Percp	Peridinin chlorophyll protein
PLT	Plaquetas
RBC	Eritrócitos
RDW	Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos
SSC	Granulosidade
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Transforming growth factor beta
Th	T helper
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Malária no mundo.....	19
2.2	Malárias no Brasil.....	20
2.3	Ciclo do parasito causador da malária	22
2.4	Malária grave e não-grave	24
2.5	Anemia e plaquetopenia.....	25
2.6	Resposta celular na Malária.....	27
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	Infraestrutura utilizada.....	31
4.2	Modelo de Estudo	31
4.3	População de estudo.....	31
4.4	Critérios de inclusão.....	32
4.5	Critérios de exclusão.....	32
4.6	Regulamentação ética.....	32
4.7	Procedimentos	33
4.7.1	Coleta	33
4.7.2	Análises hematológicas	33
4.7.3	NESTED PCR.....	34
4.7.4	Teste de RNA viral para detectar dengue (DENV 1-4)	34
4.7.5	Definição dos grupos	34
4.7.6	Análises estatísticas e apresentação dos dados	34
4.8	Processamento das amostras.....	37
4.8.1	Marcação periférica	37
4.9	Análise por citometria de fluxo para determinação das subpopulações celulares.....	38

4.9.1	Determinação dos linfócitos totais e subpopulações celulares de linfócitos TCD4 ⁺ e linfócitos TCD8 ⁺	38
4.9.2	Determinação das subpopulações celulares de NK e NKT	40
4.9.3	Determinação das subpopulações celulares de B e B1	41
4.9.4	Determinação das subpopulações de células T reguladoras	42
4.9.5	Dosagem de citocinas extracelulares nos soros de pacientes com malária vivax não-grave.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Dados hematológicos pacientes com malária aguda	44
5.2	Análise de PCR das amostras	45
5.3	Análise fenotípica de Linfócitos	45
5.4	Níveis circulantes de citocinas malária aguda.....	52
5.5	Avaliação da dinâmica celular utilizando plaqueta como variável resposta	57
6	DISCUSSÃO.....	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
10	APÊNDICES	87
10.1	Termo De Consentimento Livre E Esclarecido (TCLE).....	88
10.2	Questionário epidemiológico.....	91
10.3	Artigo de Revisão.....	93
11	ANEXOS.....	109
11.1	Comprovante de submissão do Artigo de Revisão.....	110
11.2	Comprovante de Aceite pelo comitê de ética para desenvolvimento do Projeto de Pesquisa	112

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados Organização Mundial de Saúde aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas encontraram-se sob o risco de contrair malária em 2010 e cerca de 216 milhões de episódios de malária foram registrados, principalmente, na África e Ásia (WHO, 2011). No Brasil, atualmente, a incidência da doença está concentrada nos estados da Bacia Amazônica, com mais de 99% dos casos registrados (FRASSON *et al.*, 2009; BRASIL, 2010).

O diagnóstico e tratamentos mais rápidos durante os anos resultaram na redução da malária, principalmente a causada pelo *Plasmodium falciparum*. Uma vez que o *Plasmodium vivax* possui a capacidade de formar hipnozoítos e os ciclos de formação de gametócitos tendem a ser mais cedo, quando comparados ao *Plasmodium falciparum*, a erradicação e o controle a incidência por *Plasmodium vivax* continua sendo um desafio (BRASIL, 2010; GREENWOOD, 2008). Quanto à gravidade, a visão de malária “benigna” causada pelo *P. vivax* vem sendo questionada pelos relatos de severidade em alguns casos (LACERDA *et al.*, 2012).

A linfopenia é uma característica comum na malária (KASSA *et al.*, 2006), porém existem poucas informações na literatura sobre a relação entre subpopulações de linfócitos, histórico dos pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* e dados clínicos, tais como anemia, Plaquetopenia linfopenia.

A região Amazônica detém grande maioria dos casos de malária registrados em todo o Brasil, sendo a *vivax* a de maior representatividade permitindo nessa região a realização de um estudo visando aumentar a compreensão da resposta imune. Portanto, entender o perfil da resposta imune dessas populações e conhecer a maneira pela qual a resposta imune pode desencadear complicações clínicas, tais como, anemia e plaquetopenia torna-se muito importante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Malária no mundo

Dados epidemiológicos mostram que aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas encontraram-se sob o risco de contrair malária em 2010, e no mesmo ano cerca de 216 milhões de episódios de malária foram registrados, principalmente, na África e Ásia (WHO, 2011). Aproximadamente 1 milhão de pessoas morrem por malária em todo mundo sendo a terceira doença infecciosa mais prevalente, perdendo apenas para a AIDS e a tuberculose (SCHMIDT *et al.*, 2010; MIYAKODA *et al.*, 2008; WHO, 2010). Segundo Keller *et al.* (2006) a maioria das mortes ocorrem em crianças menores de 5 anos devido a falta de imunidade natural adquirida contra a doença.



Figura 01. Países ou áreas onde ocorre a transmissão de malária no mundo (WHO, 2010).

As infecções maláricas mais importantes mundialmente são causadas por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. Responsável pelas infecções benignas, a malária causada pelo *P. vivax* é de grande ocorrência sendo 400 milhões de pessoas infectadas por essa espécie, além de ser a mais difundida, nas regiões da Amazônia brasileira. (ANDRADE *et al.*, 2010; BUENO *et al.*, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; RODULFO *et al.*, 2007)

2.2 Malárias no Brasil

No Brasil, atualmente, a incidência da doença está concentrada nos estados da Bacia Amazônica, com mais de 99% dos casos registrados (Figura 2). A infecção não está homogeneamente distribuída, nesta região (FRASSON *et al.*, 2009; BRASIL, 2010). Estima-se que cerca de 49 milhões de pessoas vivam em áreas de risco no Brasil, distribuídas entre moradores de áreas endêmicas e viajantes (BRASIL, 2010). Três espécies são causadoras de malária que possuem maior incidência nas regiões Amazônicas, *Plasmodium vivax* (83% dos casos) *Plasmodium falciparum* (16,3% dos casos) e *Plasmodium malariae* (menor proporção) (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

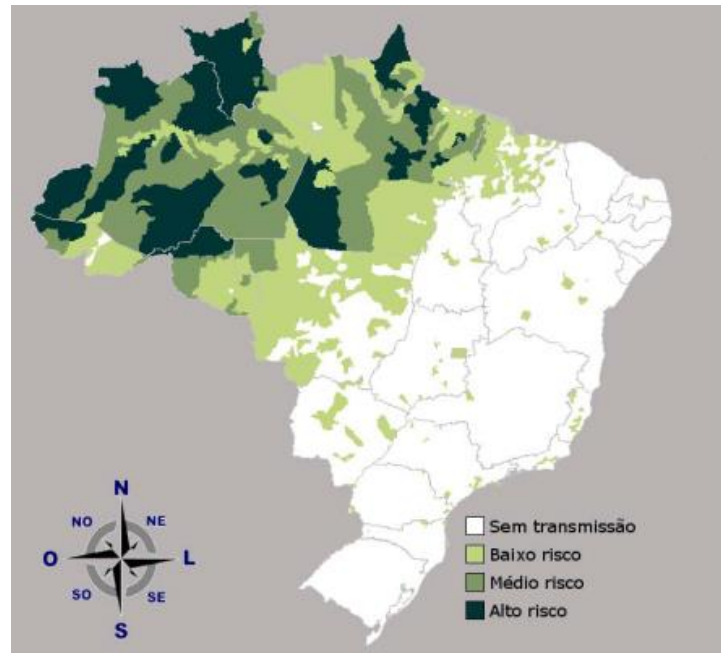


Figura 02. Áreas de risco para a malária de acordo com os diferentes níveis de incidência parasitária anual no Brasil (BRASIL, 2010).

As ações de controle da malária como as do Ministério da Saúde em Projetos como o PNCM (Programa Nacional de Controle da Malária) que graças à busca ativa e a utilização de metodologias como: mosquiteiros impregnados por inseticida, diagnóstico e tratamentos mais rápidos resultaram na redução da malária, principalmente a causada pelo *Plasmodium falciparum*. Uma vez que o *Plasmodium vivax* possui a capacidade de formar hipnozoítos e os ciclos de formação de gametócitos tendem a ser mais cedo, quando comparados ao *Plasmodium falciparum*, a erradicação e o controle a incidência por *P. vivax* continua sendo um desafio (BRASIL, 2010; GREENWOOD, 2008)

Quanto à gravidade, a visão de malária “benigna” causada pelo *Plasmodium vivax* vem sendo questionada pelos relatos de severidade em alguns casos (LACERDA *et al.*, 2012).

Recentemente foram relatados pacientes infectados com *Plasmodium vivax* apresentando Plaquetopenia grave, taquicardia, estado mental alterado, e síndrome de angústia respiratória (MEHMOOD *et al.*, 2012; OLIVEIRA-FERREIRA

et al., 2010; RAPOSO *et al.*, 2013). Em estudo realizado em Manaus, pacientes infectados com *P. vivax* também apresentaram Plaquetopenia severa (LACERDA, 2007)

Outra problemática observada nos casos malária pelo *Plasmodium vivax* é a crescente resistência à cloroquina. Segundo Andrade *et al.*, 2010, os casos de malária severa relacionados a infecções por *P. vivax* tem sido documentados nas regiões Amazônicas causando uma forte preocupação a saúde mundial.

2.3 Ciclo do parasito causador da malária

Plasmodium é parasita intracelular obrigatório durante a fase assexuada. O período de incubação da malária varia de 7 a 14 dias, podendo, contudo, chegar a vários meses, porém em condições especiais, após aparente cura da doença, no caso de *Plasmodium vivax* e *P. ovale*, como na formação do hipnozoíto (ASHLEY *et al.*, 2006).

O ciclo de vida do parasita compreende duas fases: a sexuada e a assexuada (Figura 3). A fase assexuada do parasito acontece no homem quando o *Anopheles* contaminado com esporozoítos inocula saliva contaminada através do repasto sanguíneo.

Os esporozoítos são levados pela corrente sanguínea para o fígado (1), dando início a fase tecidual ou fase pré-eritocítica (MILLER *et al.*, 2002) no qual os esporozoítos invadindo os hepatócitos sofrem divisão esquizogônica, rompendo os hepatócitos liberando na corrente sanguínea os merozoítas (2) fechando a fase pré-eritocítica (Figura 3C) - (FARID *et al.*, 1993; KROTOSKI, 1985).

Em algumas espécies, *Plasmodium vivax* e *P. ovale*, após a invasão dos esporozoítas, podem permanecer latentes no interior dos hepatócitos - os criptozoítas (do grego *kryptos* = oculto por vários meses e ou mesmo anos,

mantendo-se como hipnozoítas resistentes, ocasionado as recaídas quando despertam tardiamente e migram para a circulação sanguínea) (ASHLEY *et al.*, 2006; KROTOSKI, 1985).

A densidade parasitária desenvolvida após o processo de maturação para a fase sanguínea é marcada pelo número de merozoítos originados nos hepatócitos e o período para a ruptura e liberação destes variam de acordo com a espécie, num período de 6 a 15 dias (MOTA & RODRIGUEZ, 2001; MOORE *et al.*, 2002).

No sangue, a fase eritrocítica (Figura 3B) se inicia com os merozoítos infectantes (3) invadindo as hemácias, formando os trofozoítos (4). Estes passarão por processos de esquizogonia (5), rompendo as hemácias e liberando mais formas infectantes (merozoítos) que irão invadir novas hemácias repetindo o ciclo (BOTERO & RESTREPO, 1998; HVIID, 1998). Durante o ciclo eritócítico algumas formas se diferenciam em gametócitos (7), sendo estes ingeridos pelo mosquito, passando para fase sexuada da doença (BRUCE *et al.*, 1990; SOUZA & RILER, 2002).

A fase sexuada (Figura 3A) acontece dentro do mosquito fêmea, no qual ingere sangue contaminado com as formas sexuadas do parasita, os gametócitos (8), dentro do intestino do mosquito ocorre a diferenciação e a fecundação dessas formas formando o oocineto (9). Esta forma se fixa a parede intestinal do mosquito atravessando-a formando o oocisto (10), o qual sofrerá esquizogonia e ruptura para liberação dos esporozoítos (11), que migrarão até a glândula salivar do mosquito para serem inoculados através da probóscide do *Anopheles* (ALVARO, 1982; BRASIL, 2010, MOTA *et al.*, 2001; BRUCE *et al.*, 1990; MOORE *et al.*, 2002).

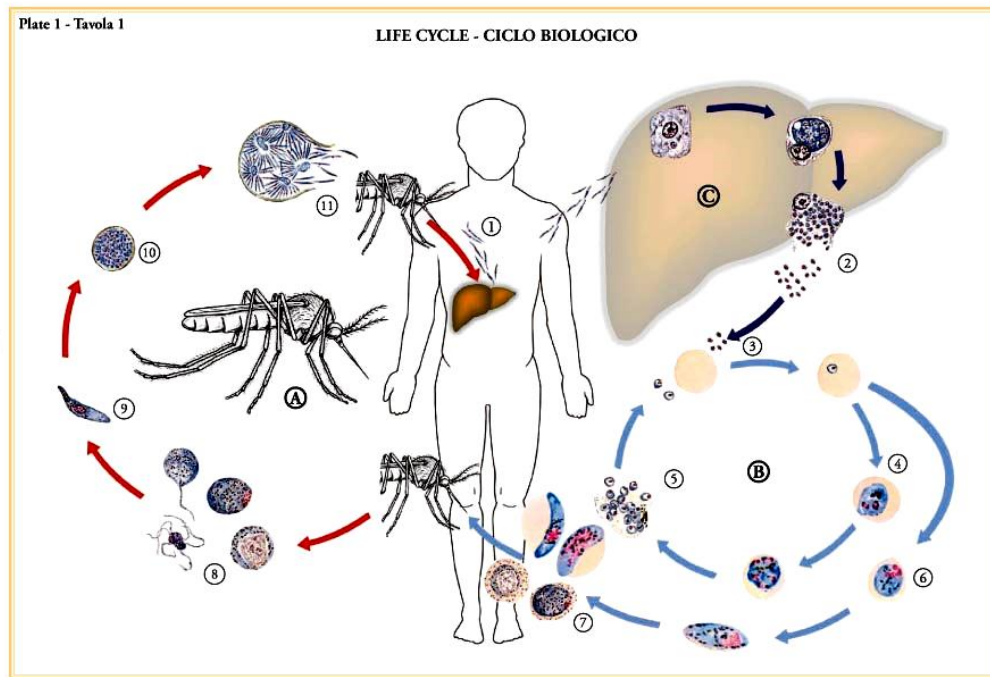


Figura 3. Ciclo de biológico do *Plasmodium* sp. Disponível em: <http://www.atlas-malaria.com/images/ciclobiologico.jpg>

2.4 Malária grave e não-grave

A malária não-grave é caracterizada segundo o Ministério da Saúde por episódios de calafrios, febre e sudorese com duração variável de 6 a 12 horas podendo estar com temperatura igual ou superior a 40°C. Em geral, esses podem ser acompanhados por cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos. Após os primeiros paroxismos, a febre pode passar a ser intermitente (BRASIL, 2010).

Os critérios para malária grave segundo o ministério da saúde devem ser vistos conforme os sinais e sintomas e as alterações laboratoriais. Nos sinais e sintomas temos a alteração da consciência (malária cerebral), convulsões, hipotensão arterial ou choque, hemorragias, icterícia, hemoglobinúria e nas alterações laboratoriais temos a anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, insuficiência renal, hiperparasitemia sendo caracterizada pela quantidade maior

que 100.000 parasitas/mm³ (BRASIL, 2010; CHALANDON & KOCHER, 2000; GOMES *et al.*, 2011).

A não preferência por um fase de maturação dos eritrócitos do *Plasmodium falciparum* pode estar relacionado ao desenvolvimento de altas parasitemias e os eventos de sequestração dos eritrócitos infectados parasitas na microcirculação de vários órgãos vitais contribuem na evolução quadros estados clínicos graves da doença, dentre elas a malária cerebral e a gestacional (GILLES, 1993; SOUZA *et al.*, 2002; IDRO *et al.*, 2010).

Em relação a infecções por vivax, estudos mostram que as complicações encontradas em crianças são insuficiência renal aguda, malária cerebral, anemia, acidose metabólica e altas parasitemias (KETEMA & BACHA, 2013; LIMAYE *et al.*, 2012).

2.5 Anemia e plaquetopenia

A anemia é caracterizada pela diminuição dos níveis de hemoglobina na circulação sanguínea e pode estar relacionados a fatores genéticos, nutricionais e parasitológicos e é um fator característico na malária devido ao ciclo eritrocítico (DAVIS *et al.*, 1991; HANSCHIED *et al.*, 2008). Segundo a OMS os casos de anemia grave apresentam níveis de hemoglobina menor que 7 g/dl, enquanto os níveis normais de hemoglobina estão entre 11,9 ±12,9 g/ dl. Em relação ao hematócrito, valores abaixo de 21% em adultos e 15% em crianças caracterizam a anemia grave em infecções maláricas (LACERDA, 2007; QUEIROZ & TORRES, 2000; VENTURA *et al.*, 2010 WHO, 2001)

Segundo a literatura a anemia parece ter uma relação com a produção exacerbada de citocinas inflamatórias que promovem dentre outros efeitos, uma desieritropoiese que é incapaz de compensar os eritrócitos perdidos durante a infecção. A anemia é mais comum e acentuada em infecções por *Plasmodium falciparum*, uma vez que o *Plasmodium vivax* invade exclusivamente os

reticulócitos (ALECRIM *et al.*, 2000; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2007; WEATHERALL *et al.*, 2002). No entanto, um aumento no número de malária complicada em pacientes infectados pelo *P. vivax* vem sendo visto, com quadros de icterícia, anemia grave e Plaquetopenia (ALEXANDRE *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2012).

A Plaquetopenia tem sido a alteração mais frequente encontradas na infecção pelo *Plasmodium*. As plaquetas são originadas dos megacariócitos, através de processos conhecidos como endomitose. As plaquetas possuem varias funções como recrutamento de leucócitos para lugares de injuria tecidual, reconhecimento de patógenos via *Toll*, opsonização pelo reconhecimento da porção Fc de anticorpos na superfície de patógenos e coagulação sanguínea (ANDONEGUI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2011; SOUZA & ELIAS, 2006).

A Plaquetopenia é redução do número de plaquetas abaixo de 150.000 plaquetas por microlitro, podendo apresentar hemorragias (LACERDA, 2007; WHO, 2000). Apesar de não ser um critério para a malária grave, Plaquetopenia é uma das complicações mais comuns de ambos *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*.

Recentemente, Kochar e colaboradores mostraram que a Plaquetopenia é mais freqüente e grave em pacientes com infecção por *Plasmodium vivax* (KOCHAR *et al.*, 2010). Estudos relacionam o nível de plaqueta com um indicativo no diagnostico de malária, pois pessoas que não são de áreas endêmicas que acabam contraindo a doença podem ser diagnosticadas levando em consideração as informações sobre episódios de febre, viagem recente para lugares onde a malária é endêmica e os níveis de plaqueta no sangue (PATEL *et al.*, 2004).

Nas infecções por *Plasmodium vivax*, a Plaquetopenia vem sendo relatada em estudos realizados entre 2000 e 2004 com pacientes portadores de infecção por *vivax* foi observado que uma média de 70% dos pacientes analisados apresentava Plaquetopenia (TAYLOR *et al.*, 2008; JADHAV *et al.*, 2004; LACERDA, 2007; MOHANTY *et al.*, 1988; PARK *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2008).

Há uma falta de estudos sobre a patogênese envolvendo a Plaquetopenia na malária. Estudos mostram relação da Plaquetopenia com anticorpos antiplaquetários e a produção de algumas citocinas como IL-10, TGF- β , IL-1 e IL-6. Independente da gravidade da infecção, a Plaquetopenia sendo um fenômeno transitório que se normaliza no sangue circulante com a instituição do tratamento antimalárico (COELHO *et al.*, 2013).

TNF-alfa é elevada apenas em pacientes com Plaquetopenia em comparação com os voluntários saudáveis e uma correlação positiva entre os níveis de TNF-alfa no soro e no índice de fagocitose foi encontrada. Além disso, verificaram-se altos níveis de IFN-gama em pacientes com Plaquetopenia em comparação com os não-trombocitopênicos. O TNF-alfa e os níveis elevados de IFN-gama tem sido associada com o *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* malária grave (KOCHAR *et al.*, 2010; MIRGHANI *et al.*, 2011). O conhecimento sobre a relação entre Plaquetopenia e malária grave ainda necessita de mais estudos para compreender a patogênese associada com Plaquetopenia.

2.6 Resposta celular na Malária

Após a picada do mosquito infectado no hospedeiro, os esporozoítos que possuem tropismo pelos hepatócitos, migram para o fígado. Alguns esporozoítos são reconhecidos e fagocitados pelas células de *Kupffer* (KC), que irão se dirigir para o linfonodo mais próximo onde apresentarão fragmentos de antígeno para células T indiferenciadas pela ligação com MHC Classe II (GOOD & DOOLAN, 2010; SCHWENK & RICHIE, 2011). Para a modulação de uma resposta efetiva, células dendríticas irão produzir IL-12 que direciona para um perfil de resposta imune Th1, culminando nas secreções de IL-2 e IFN- γ , promovendo a proliferação e a ativação de linfócitos T citotóxicos que migrarão para os sítios inflamatórios (BELNOUE *et al.*, 2008). A ativação dos linfócitos T citotóxicos resulta na produção e secreção de perforinas e granzimas que irão promover a morte da célula infectada, além de IFN- γ que auxilia na ativação de outras células e

aumento da expressão de MHC de classe I (FERREIRA *et al.*, 1986; GOOD, 2005; HOFFMAN *et al.*, 1989).

Outras células também desempenham a função citotóxica no auxílio da destruição de células infectadas, dentre elas células NKT, Linfócitos T- $\gamma\delta$ (SCHWENK & RICHIE, 2011). Alguns estudos em camundongos mostram que células NK ao produzirem IFN- γ recrutam células T para o cérebro contribuindo para a malária cerebral (HANSEN *et al.*, 2007; RILEY *et al.*, 2006; VAN DEN STEEN *et al.*, 2008). As células NK são as primeiras responsáveis pela produção de IFN- γ e estão intimamente relacionadas com as respostas pró-inflamatórias após contato com esquizontes de *Plasmodium falciparum*, importante na destinação de uma resposta para o perfil Th1 (PLEBANSKI *et al.*, 1999; Artavanis-Tsakonas & Riley 2002; Artavanis-Tsakonas & Riley 2010),

A resposta imune adaptativa é indispensável para o controle de infecções por parasitas. Observa-se uma forte tendência dos linfócitos para a produção de IFN- γ (ROESTENBERG *et al.*, 2009). Essa produção estimula a produção de NO (Óxido Nítrico) por monócitos, potencializando a resposta imune (GOOD & DOOLAN, 2010; POMBO *et al.*, 2002).

A ruptura dos eritrócitos pelo parasita estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ e citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β por células do sistema imune (FERNANDES *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2004; RILEY *et al.*, 2006). A resposta pró-inflamatória inicial durante a malária parece ter um papel crucial no desenvolvimento da malária cerebral e anemia (FERNANDES *et al.*, 2008; WALTHER *et al.*, 2006). Algumas citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α vem sendo relatadas como principais responsáveis por quadros clínicos graves quando apresentadas em altas quantidades, podendo causar danos ao hospedeiro comprometendo órgãos e destruindo células (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009; HVIID, 1998). Um equilíbrio de citocinas como IFN- γ , TNF α e IL-10 parece estar relacionada ao desenvolvimento de formas não graves da doença, porém o desequilíbrio levará a gravidade da doença (Andrade *et al.* (2010).

Por outro lado, citocinas como TGF- β e IL-10 produzidas por células T-reguladoras possuem papel importantíssimo no desenvolvimento do controle da parasitemia e ação de inibidores dos efeitos patológicos que podem vir a ser manifestadas pela exacerbação das respostas pró-inflamatórias (OMER *et al.*, 2003; YAZDANI *et al.*, 2006). Entretanto a resposta deve ser regulada, já que a alta produção de citocinas regulatórias também pode ser prejudicial à eliminação do parasita (ANDRADE *et al.*, 2010; BUENO *et al.* (2010). Pacientes com quadro clínico grave apresentaram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias em contra partida aos que não apresentavam sintomatologia (Andrade *et al.* (2010).

Por não expressar as moléculas de MHC classe I e II, a resposta humoral exerce um papel no reconhecimento dos eritrócitos infectados (LANGHORNE *et al.*, 2002). A exposição do antígeno pelos linfócitos B indiferenciados após cooperação com células T CD4⁺ efectoras provocam a diferenciação em linfócitos B produtores de anticorpos (Plasmócitos). A classe de anticorpos IgM e IgG quando secretados por esses linfócitos B, opsonizam os estágios do parasita além de ativar o sistema complemento e neutralizam a invasão em outros eritrócitos . Esta neutralização, é um fenômeno que ocorre pelo reconhecimento de proteínas na superfície dos merozoíto pelos anticorpos opsonizantes, que é essencial para o controle da infecção por impedir o crescimento da densidade parasitaria, fenômeno descritos como inibição celular dependente de anticorpo (ADCI), (HIRUNPETCHARAT & GOOD, 1998). Evidências mostram a interação de células TCD4⁺ Th1 com linfócitos B para a produção final de anticorpos específicos que exercem eliminação eficiente do parasito durante a infecção tardia (LANGHORNE *et al.*, 2002; MEDING & LANGHORNE, 1991).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as subpopulações de linfócitos de pacientes infectados por *Plasmodium vivax* com diferentes históricos prévios de malária.

3.2 Objetivos específicos

1. Quantificar subpopulações de linfócitos (T-CD4, T-CD8, B, B1, NK, NKT, Treg) além da expressão de moléculas de adesão (PECAM-1, ICAM-1) e moléculas de memória (CD45RO) em pacientes com malária não-grave por *Plasmodium vivax*.
2. Quantificar as citocinas ((IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) no soro dos pacientes com malária vivax não-grave.
3. Avaliar a relação entre os diferentes históricos maláricos e as quantidades de linfócitos, expressão moléculas de adesão e memória e produção de citocinas em pacientes com malária não-grave por *Plasmodium vivax*.
4. Correlacionar a quantidade de linfócitos, expressão de moléculas de adesão e memória com os níveis de plaquetas de pacientes infectados por *Plasmodium vivax*, com diferentes históricos da doença.

4 METODOLOGIA

4.1 Infraestrutura utilizada.

Este projeto está incluído em um projeto maior “Estudo da biologia de *Plasmodium vivax*: imunopatogênese, citoadesão e invasão” e tem, em Manaus, a parceria entre duas instituições a Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ que tem como sede, em Manaus, o Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane – ILMD que coopera com as análises de imunofenotipagem e análises de PCR para excluir infecções mistas e a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado FMT-HVD que coopera com a coleta das amostras e dos dados clínico-epidemiológicos e realização do diagnóstico dos pacientes.

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado é o hospital referência em diagnóstico laboratorial de doenças tropicais na cidade de Manaus, possui uma grande rede de pesquisas, sendo referência no desenvolvimento científico principalmente nos trabalhos com a malária.

4.2 Modelo de Estudo

O estudo foi do tipo transversal e durante 8 meses, os participantes foram selecionados por demanda espontânea no atendimento de rotina da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT-HVD, coordenado pelo Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda.

4.3 População de estudo

Participaram do estudo, pacientes que procuraram a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Viera Dourado durante o período de coleta e decidiram colaborar para o estudo .

4.4 Critérios de inclusão

- Ambos os sexos;
- Pacientes entre 16 e 70 anos;
- Pacientes com diagnóstico microscópico e molecular positivo para malária vivax com parasitemia (entre 501-10.000 parasitos/mm³).

4.5 Critérios de exclusão

- Pacientes com diagnóstico microscópico ou molecular para malária por *Plasmodium falciparum*, ou co-infecção vivax e falciparum (malária mista);
- Mulheres com história de gestação atual;
- Paciente em uso de medicação anti-malárica;
- Pacientes com diagnóstico sorológico concomitante de dengue.

4.6 Regulamentação ética

Os pacientes que aceitaram participar do estudo conforme a leitura e concordância do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Posteriormente foi preenchido um Questionário (Anexo 2) em seguida, coleta de sangue de cinco a dez mililitros serão coletados seguindo os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD (Processo CAEE: 0044.0.114.000-11-FMT-HVD).

4.7 Procedimentos

4.7.1 Coleta

Foram coletados durante oito meses setenta e um pacientes na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado com a confirmação do diagnóstico de malária pelo *Plasmodium vivax*. Os indivíduos que obedecerem aos critérios de inclusão foram informados e convidados a participar do projeto. Também foram coletados 5 ml de sangue em tubo contendo EDTA de indivíduos sadios, sem histórico de malária, para uso como controle nos ensaios de imunofenotipagem.

4.7.2 Análises hematológicas

Foram realizadas as análises hematológicas (hemograma) das amostras dos pacientes incluídos no estudo na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

4.7.3 NESTED PCR

Com o intuito de excluir a possibilidade de infecções mistas, o material nuclear do sangue dos pacientes selecionados será purificado de acordo com o *kit gDNA Blood* (Invitrogen), seguindo-se a instruções do fabricante. O DNA extraído foi utilizado como molde de reações de *Nested-PCR*, de acordo com protocolo descrito por Snounou & Singh (2002), na presença de oligonucleotídeos específicos para *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *P.malariae*, este procedimento foi realizado nas dependências da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane – ILMD.

4.7.4 Teste de RNA viral para detectar dengue (DENV 1-4)

A extração do RNA viral a partir de soro foi realizada utilizando-se o *QIAamp Viral RNA Kit* (Qiagen®), segundo instruções do fabricante. As amostras de RNA foram armazenadas em freezer a -80°C e depois realizada o PCR Nested Multiplex para detectar dengue (DENV 1-4) seguindo o protocolo descrito por BRONZONI *et al.* (2005).

4.7.5 Definição dos grupos

Dos pacientes selecionados para a pesquisa, foram entrevistados os que decidiram participar do projeto, participando de um questionário (Anexo 2) no qual possuía a informação quanto ao histórico progresso de infecção malárica, dessa forma foram divididos em três grupo como pode ser observado na tabela 2. Quanto à coleta de amostra, foram coletadas amostras de sangue periférico de indivíduos infectados pelo *Plasmodium vivax*, sendo tratadas com EDTA ou heparina e utilizadas para marcação de superfície com anticorpos monoclonais. Foram separados em 3 grupos (Tabela 2) conforme a entrevista a cerca da última infecção:

Grupo 1 (Primo infectado);

Grupo 2 (Última infecção < 7 meses);

Grupo 3 (Última infecção > 1 ano).

Essas informações foram obtidas através de um questionário submetido ao paciente (Figura 04) os grupos controles, n=30 são indivíduos que não possuem histórico malárico e estejam saudáveis no dia da coleta.

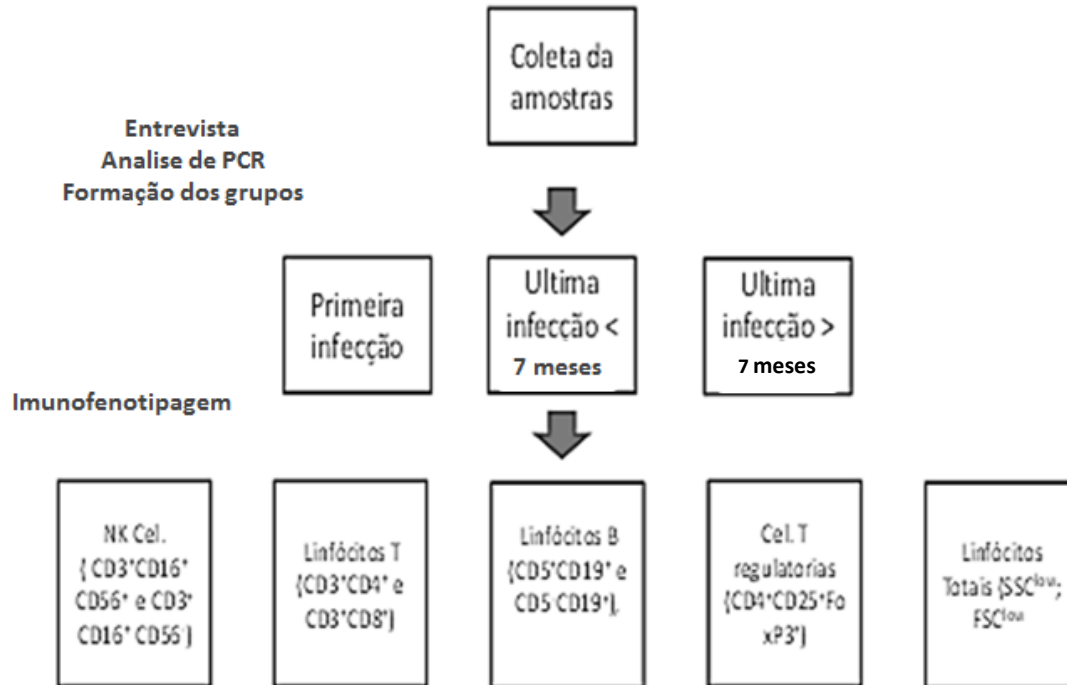


Figura 04. Amostras coletadas e sua utilização.

Após a coleta do sangue e dados dos pacientes, as amostras foram encaminhadas ao Instituto Leonidas e Maria Deane – ILMD, onde foram analisadas por citometria de fluxo (SILVA *et al.*, 2004; TAVARES & TAVARES, 2009), utilizando o painel de anticorpos monoclonais: anti-(CD3, CD16, CD56, CD69, CD4, CD8, CD25, CD31, CD54, CD45RO e FoxP3.) Serão avaliadas as subpopulações de leucócitos: Linfócitos totais (SSC^{low}; FSC^{low}), células NK e NKT (CD3⁺CD16⁺ CD56⁺ e CD3⁺ CD16⁺ CD56⁻), linfócitos T (CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺) e células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), moléculas de memória anti-(CD45RO) e moléculas de adesão celular anti-(CD31 e CD54) – tabela 3.

Tabela 3. Painel de anticorpos (BD Antibodies) para marcação celular

Subpopulação celular	FITC Alexa 488	PE	PECy7	Percp Percp Cy5-5	APC
Linf. T (PECAM-1)	anti-CD8	anti-CD69	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD31
Linf. T (ICAM-1)	anti-CD8	anti-CD69	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD54
Linf. T (Memory)	anti-CD8	anti-CD69	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD45RO
NK	anti-CD16	anti-CD56	anti-CD3		anti-CD45RO
Linf. Treg	anti-FoxP3	anti-CD4		anti-CD25	
Linf. B	anti-CD19	anti-CD5			

4.7.6 Análises estatísticas e apresentação dos dados

Os dados foram analisados no software *R* versão 2.1.5.2, os resultados foram considerados estatisticamente significativos até $p=0,05$. Todas as análises dos dados obedeceram às pressuposições de cada teste. Na análise de correlação, foi utilizado o coeficiente de correlação de *Spearman*, para testar a relação entre as variáveis utilizou-se o modelo de regressão linear simples e nas comparações de grupos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* juntamente com o teste de comparações múltiplas não-paramétrica (*Bonferroni*).

4.8 Processamento das amostras

4.8.1 Marcação periférica

Foram adicionados 100ul de sangue total em cada tubo para marcação das subpopulações de linfócitos, 200ul de sangue total nos tubos para marcação de Treg. e CN FoxP3. Foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação as hemácias foram lisadas com 2mL de solução de lise (billig) por 10 min com posterior centrifugação por 7 min. a 1.300 rpm e descarte do sobrenadante , em seguida os tubos foram lavados com 2mL de PBS (solução fisiológica tamponada com fosfato) e centrifugadas nas mesmas condições anteriormente descritas.

Após a lavagem as células foram ressuspensas em 300 µL de solução fixadora (Paraformaldeído+Cacodilato) e sendo posteriormente, analisadas no citometro de fluxo. FACSCanto®II. Os resultados foram analisados no software FlowJo® versão 9.3.2 da Tree Star®. Para marcação do FoxP3 foi utilizado o PBS-Permeabilizante para marcação intracelular.

4.9 Análise por citometria de fluxo para determinação das subpopulações celulares

4.9.1 Determinação dos linfócitos totais e subpopulações celulares de linfócitos TCD4⁺ e linfócitos TCD8⁺

A figura 5, representa as análises por citometria de fluxo para determinação das subpopulações celulares de linfócitos TCD4⁺ e linfócitos TCD8⁺ , em que, primeiramente são determinadas as populações de linfócitos totais através da triagem pelo seu tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) visto na figura... A, depois dessa análise, cria-se uma “gate”, ou seja, uma comando de separação

dessas populações representado pelo círculo visto na figura 5A. Após a separação por tamanho e complexidade, são analisadas as emissões de fluorescência pelo conjugado anticorpo-fluoróforo. Nas imunofenotipagens de linfócitos TCD4⁺ e linfócitos TCD8⁺ são utilizados os anticorpos anti-CD3, marcador de linfócitos e para diferenciar as duas populações seja de linfócitos TCD4⁺ ou linfócitos TCD8⁺ observamos a expressão dessas moléculas pelos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8. Na figura 5B é nítida a divisão de linfócitos através da divisão em quatro quadrantes, no qual pode ser observada que há a expressão de linfócitos CD3⁺CD4⁻ deslocado para cima e para a esquerda, e as populações de linfócitos CD3⁺CD4⁺, vistas no quadrante acime e a direita, e esta é a população de linfócitos TCD4. Para as subpopulações de linfócitos TCD8⁺ é realizada semelhante análise figura 5 C, que, caso haja a expressão dos marcadores CD3⁺ e CD8⁺, caracteriza a população desejada para o estudo.

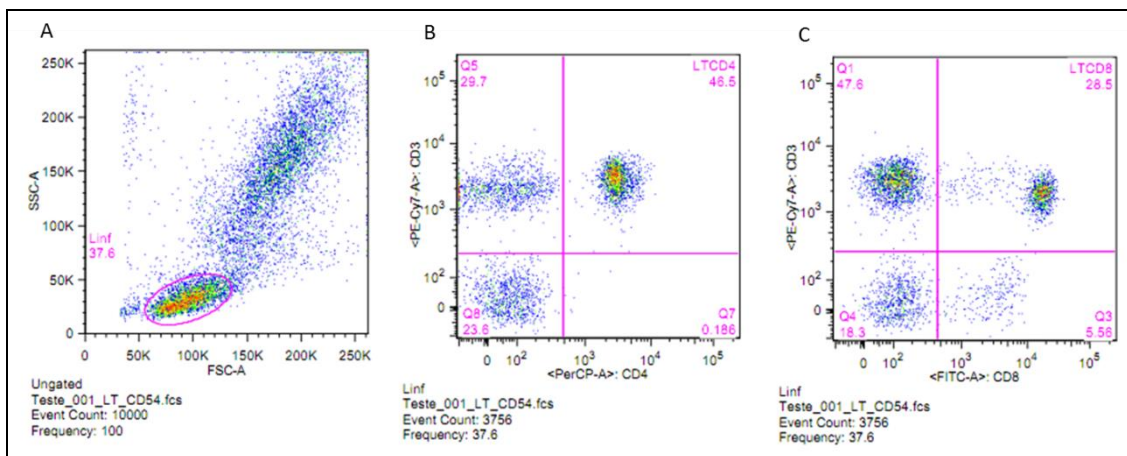


Figura 5. Determinação de linfócitos totais e subpopulações de linfócitos TCD4⁺ ou linfócitos TCD8⁺ por citometria de fluxo

4.9.2 Determinação das subpopulações celulares de NK e NKT

A expressão das moléculas CD16 e CD56 são responsáveis pela caracterização e diferenciação entre as células NK e NKT, como ambas estão enquadradas dentro da mesma análise de linfócitos (FSC e SSC) e também pela expressão da molécula CD3, para diferencia-las observamos a expressão de CD3⁺CD16⁺ caso seja NKT, já as NK são caracterizadas apenas pela expressão de CD3⁻CD16⁺.

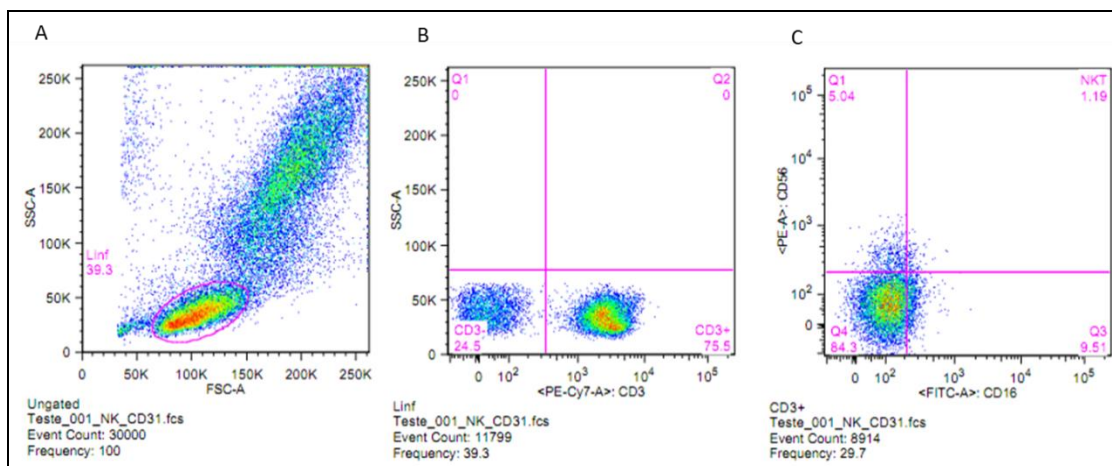


Figura 6. Determinação das subpopulações celulares de NK e NKT por citometria de fluxo

4.9.3 Determinação das subpopulações celulares de B e B1

A expressão das moléculas CD19 e CD5 são responsáveis pela caracterização e diferenciação entre os linfócitos B e B1, como ambas estão enquadradas dentro da mesma análise de linfócitos (FSC e SSC) para diferenciá-las observamos a expressão de CD5⁺CD19⁺ caso seja B1, enquanto que os linfócitos B são caracterizados apenas pela expressão de CD19⁺ apenas.

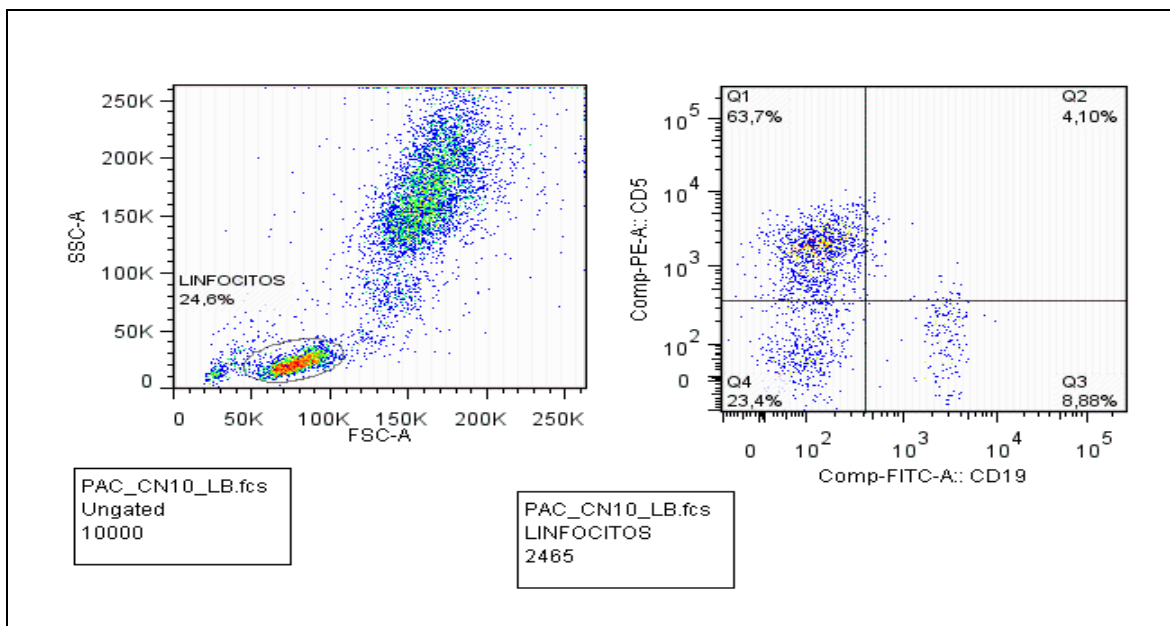


Figura 7. Determinação das subpopulação celular de linfócitos B e B1 por citometria de fluxo

4.9.4 Determinação das subpopulações de células T reguladoras

A expressão do FoxP3 é uma característica marcante para determinar as células T reguladoras além das expressões das moléculas CD4 e CD25, foram definidas essas células reguladoras, primeiramente foram selecionadas as populações de linfócitos pelo tamanho e complexidade (Figura 7A), em seguida selecionadas as populações de linfócitos que expressam a molécula CD4⁺ (Figura 7B) e ao fim determinada a população de linfócito CD4⁺ que expressam também as moléculas CD25⁺ e FoxP3 mostradas na “gate” (Figura 7C)

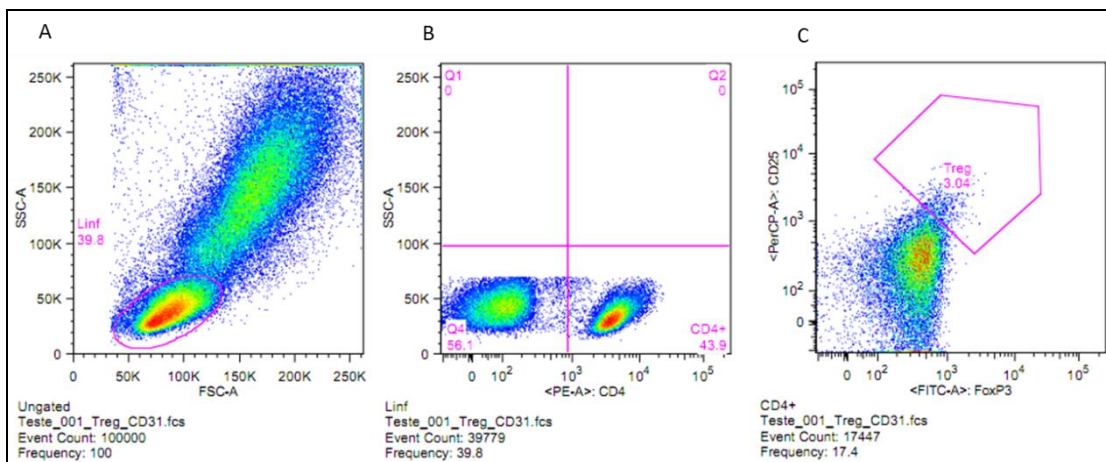


Figura 8. Determinação das subpopulação celular de células T reguladoras por citometria de fluxo

4.9.5 Dosagem de citocinas extracelulares nos soros de pacientes com malária vivax não-grave

Foram analisados as citocinas encontradas no soro dos pacientes e controles pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (*Cytometric Bead Array*) com o *KIT BDTM Human T_H1/ T_H2/ T_H17 Citokine* (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ) , seguindo as orientações descritas pelo fabricante.

O KIT utiliza um serie de microesferas que possuem tamanho e fluorescência conhecida, dessa forma, podendo ser detectadas simultaneamente através de um sistema de captura para as citocinas solúveis no soro. Através de uma ligação específica, cada *Bead* de captura esta conjugada com um anticorpo específico para cada citocina, e com o complemento de um anticorpo conjugado com um fluorocromo (PE - ficoeritrina) promovem a detecção das amostras de interesse. Os complexos *Bead* de captura +citocina da amostra+ anticorpo de detecção são quantificados através de Citometria de Fluxo. As análises das citocinas foram feitas pelo programa *FCAP-ArrayTM(v3.0.1)*

5 RESULTADOS

5.1 Dados hematológicos pacientes com malária aguda

Através de frequência de distribuição, os pacientes foram divididos em três grupos conforme o histórico progresso de infecção (Tabela 2)

Tabela 2. Informação dos dados clínicos dos 71 pacientes infectados por *Plasmodium vivax* mediante o histórico progresso de infecções, *Mann Whitney test*.

Grupos	N	Sexo		Idade (Mín e Max)	Nº de infecções (Mín e Max)	Parasitemia (+)
		M	F			
1	36	23	13	36 (16-63)		2 (1-2)
2	16	11	4	39 (17-62)	2 (1- <4)	2 (1-3)
3	19	10	8	42 (20-68)	2 (1-<4)	2 (1-2)

As alterações no hemograma dos pacientes com malária mostraram Plaquetopenia e linfopenia na fase aguda e sem anemia (Tabela 4). Os valores de - a concentração média de hemoglobina nas células (MCHC) e do volume da população celular eritrócitos (RDW) embora mostrassem diferenças significativas, estiveram dentro dos valores normais.

Tabela 4. Dados hematológicos

	Pacientes	Controles	P
WBC 10 ³ /ul	5.8 ± 2.3	6.7 ± 1.6	<0.01
RBC 10 ³ /ul	4.80 ± 0.8	4.8 ± 0.5	0.690
HGB g/Dl	13.09 ± 2.3	13.2 ± 1.3	0.680
HCT %	42.26 ± 7.7	43.9 ± 4.5	0.250
MCV fL	88.12 ± 3.5	90.1 ± 3.7	0.230
MCH pg	27.22 ± 1.34	27.4 ± 1.2	0.800
MCHC g/Dl	30.90 ± 0.9	30.5 ± 0.6	<0.01 *
PLT 10 ³ / uL	89.25 ± 54.4	289 ± 79.6	<0.0001
LYM# 10 ³ /ul	1.05 ± 0.5	2.2 ± 0.5	<0.0001
MXD# 10 ³ /ul	0.74 ± 0.46	0.7 ± 0.4	0.447
NEUT# 10 ³ /ul	3.61 ± 1.5	3.8 ± 1.1	0.132
RDW_SD fL	46.63 ± 3.5	44.8 ± 2.3	0.088
RDW_CV %	13.85 ± 0.9	12.9 ± 0.5	<0.001 **
MPV fL	10.68 ± 1.0	10.5 ± 1.1	0.741

* (MCHC) - a concentração média de hemoglobina nas células

** (RDW) - a variação do volume da população celular eritrócitos

5.2 Análise de PCR das amostras

Nenhuma das amostras apresentou malária mista (*falciparum* e *vivax*) confirmada durante o diagnóstico por gota expressa assim como não houve co-infecções com dengue.

5.3 Análise fenotípica de Linfócitos

A comparação entre a dinâmica celular entre indivíduos saudáveis (controles) e pacientes com malária demonstrou que a infecção aguda por *Plasmodium vivax* altera a porcentagem de células imunes em várias populações

de linfócitos, desta forma esta infecção modula algumas funções do sistema imunológico. Independentemente do número de episódios aos quais os pacientes foram acometidos no passado, o histórico malárico se encaixa em três grupos: infecção primária, malária recente ou malária antiga (Tabela 4).

Tabela 5. Dados epidemiológicos dos participantes do estudo

	Primo infectados (N=36)	Malária recente (N=19)	Malária > 1 ano (N=16)	Controles (N=20)
Idade	35.4 ± 14.3	39.5 ± 12.0	43.5 ± 14.0	27.1 ± 7.4
Sexo (masculino)	64%	85%	56%	45%
Última malária (meses)	-	4.5 ± 2.0	19 ± 13.2	-
Carga parasitária				
+	30.0% (11)	6.0% (1)	6.0% (1)	-
++	64.0% (23)	88.0% (17)	94.0% (16)	-
+++	6.0% (2)	6.0% (1)	-	-

Assim, setenta e um pacientes foram envolvidos neste estudo e classificados de acordo com os episódios passados e infecções agudas de *Plasmodium vivax*. Dessa forma, 36 pacientes foram classificados como Primo infectados e 31 como tendo pelo menos um episódio malárico anterior (Tabela 5). Devido à média temporal relativa ao último episódio malárico relatada por 33 pacientes ter sido 7 meses, este foi o tempo definido para classificação dos indivíduos em grupo *Recente* (N=17) e há mais de 7 meses (N=16).

Tabela 6. Media dos valores absolutos das diferentes subpopulações entre os diferentes grupos de pacientes.

Variáveis	Grupos									P
	Primo infectados			Recente			Mais de 7 meses			
	media	±	sd	media	±	Sd	media	±	sd	
LINFOCITOS	1470.78	±	164.40	974.00	±	125.12	1083.84	±	203.76	0.1175
B1	48.55 ^a	±	7.23	25.04 ^b	±	6.57	37.66 ^a	±	5.07	0.0422*
B	123.85	±	22.37	68.64	±	10.09	92.51	±	13.82	0.3568
T.CD4	693.12	±	86.33	426.45	±	56.05	489.80	±	96.91	0.1334
T.REG	37.23	±	4.95	24.55	±	3.54	28.04	±	4.88	0.1899
T.CD4CD69	45.58	±	10.71	23.01	±	6.37	43.94	±	19.75	0.0865
T.CD8	269.40	±	30.04	158.34	±	17.92	261.55	±	65.51	0.1713
T.CD8CD69	23.08 ^a	±	3.63	13.53 ^b	±	4.32	29.93 ^a	±	11.13	0.0273*
NKT	66.67 ^b	±	13.85	29.22 ^b	±	8.70	38.93 ^{ab}	±	11.08	0.0593
NK	99.98	±	13.55	58.67	±	13.26	77.88	±	14.39	0.0720

Foram utilizados os testes *Kruskal Wallis* e o teste de comparações múltiplas não-paramétricos.

A linfopenia, característica de infecções maláricas, pode ser observada na porcentagem de linfócitos dos grupos que passaram por pelo menos um episódio malárico, tanto recente quanto antigo. Em contraste, houve nos três grupos aumento na população de T-CD4 e nenhuma alteração na porcentagem de T-CD8 quando comparados aos pacientes saudáveis. Ainda, foi observada diferença significativa entre duas linhagens de NK ($p < 0.001$), enquanto apenas diferenças sutis foram observadas entre a maior parte da população de linfócitos (Tabela 6).

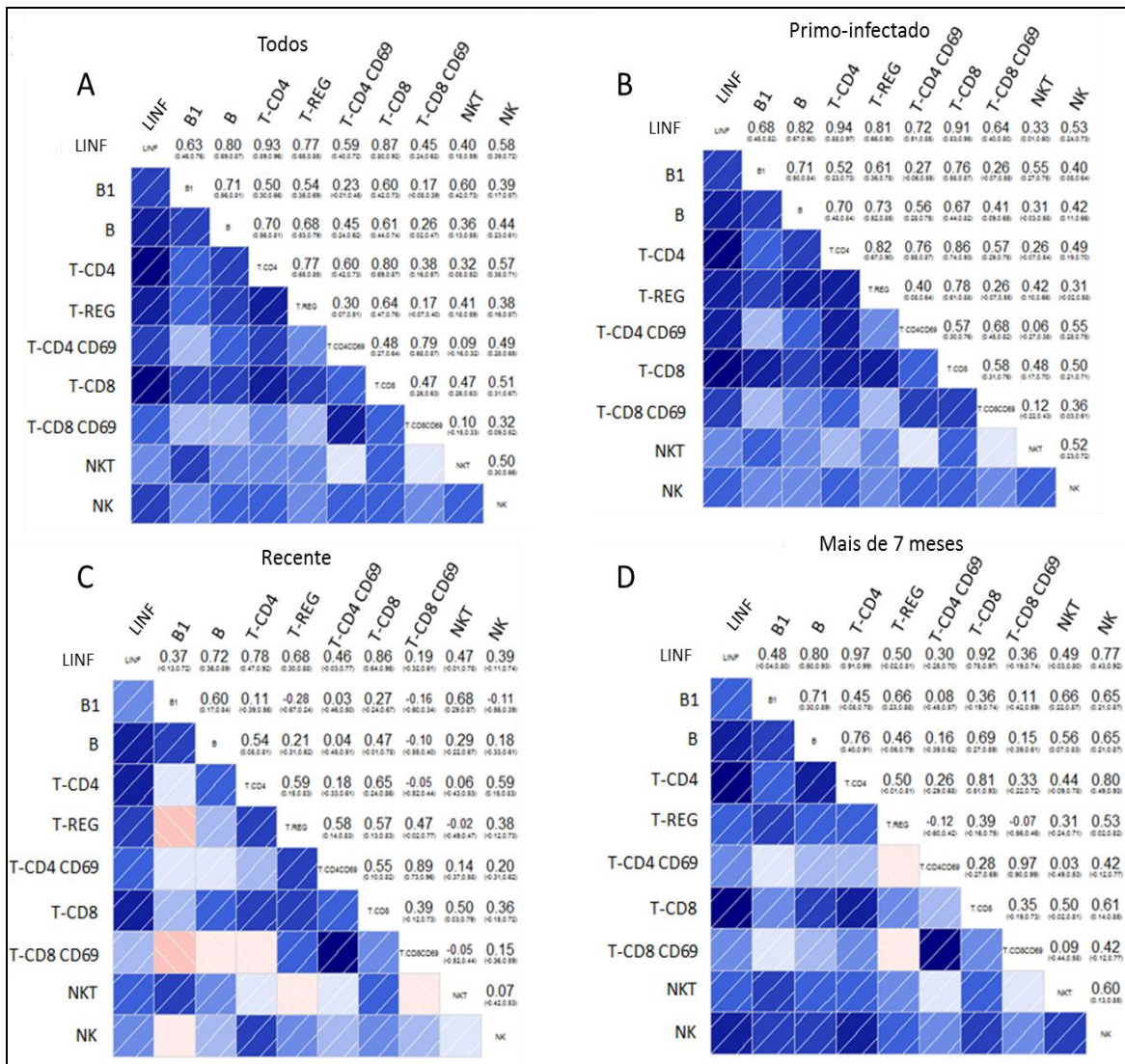


Gráfico 1. Matiz de correlação. Matriz de correlação das diferentes subpopulações celulares de todos os pacientes (A), Primo infectados (B), pacientes com malária recentes (C) e última malária há mais de 7 meses (D).

O número de células de várias subpopulações de linfócitos foi avaliado através da correlação de Spearman (Gráfico1). O correlograma de todos os pacientes, Primo infectados e de mais de 7 meses demonstraram forte correlação positiva entre a maioria das populações analisadas exceto para NKT, T-CD4 CD69 e T- CD8 CD69 (Gráfico1 B, D). Por outro lado, no grupo recente não existiu

correlação ou estas foram invertidas como no caso das células NK, B1 e T-CD8CD69 (Gráfico 1C).

Estas correlações podem ser mais bem interpretadas analisando as médias de cada grupo de células (Tabela 6). As correlações que foram invertidas no grupo Recente (Gráfico 1C) ocorrem devido a reduções significativas, já que as médias das células B1 ($p=0.042$) e T-CD8 CD69 ($p=0.027$) diferem significativamente entre os grupos pelo teste T *Kruskal Wallis*, onde letras distintas (*a* e *b*) diferem ao nível de significância $p<0.05$ (Gráfico 2A-B). Apesar das médias das células NKT tenham demonstrado diferença significativa somente ao nível de $p=0.059$, segue as comparações múltiplas não-paramétricas, onde a média entre o grupo Recente (*b*) e os Primo infectados (*a*) diferem ao nível de significância de $p=0.05$ (Gráfico 2C). A redução observada em algumas subpopulações celulares nos pacientes com infecção aguda por *Plasmodium vivax*, demonstrou a influência da imunocompensação na resposta celular.

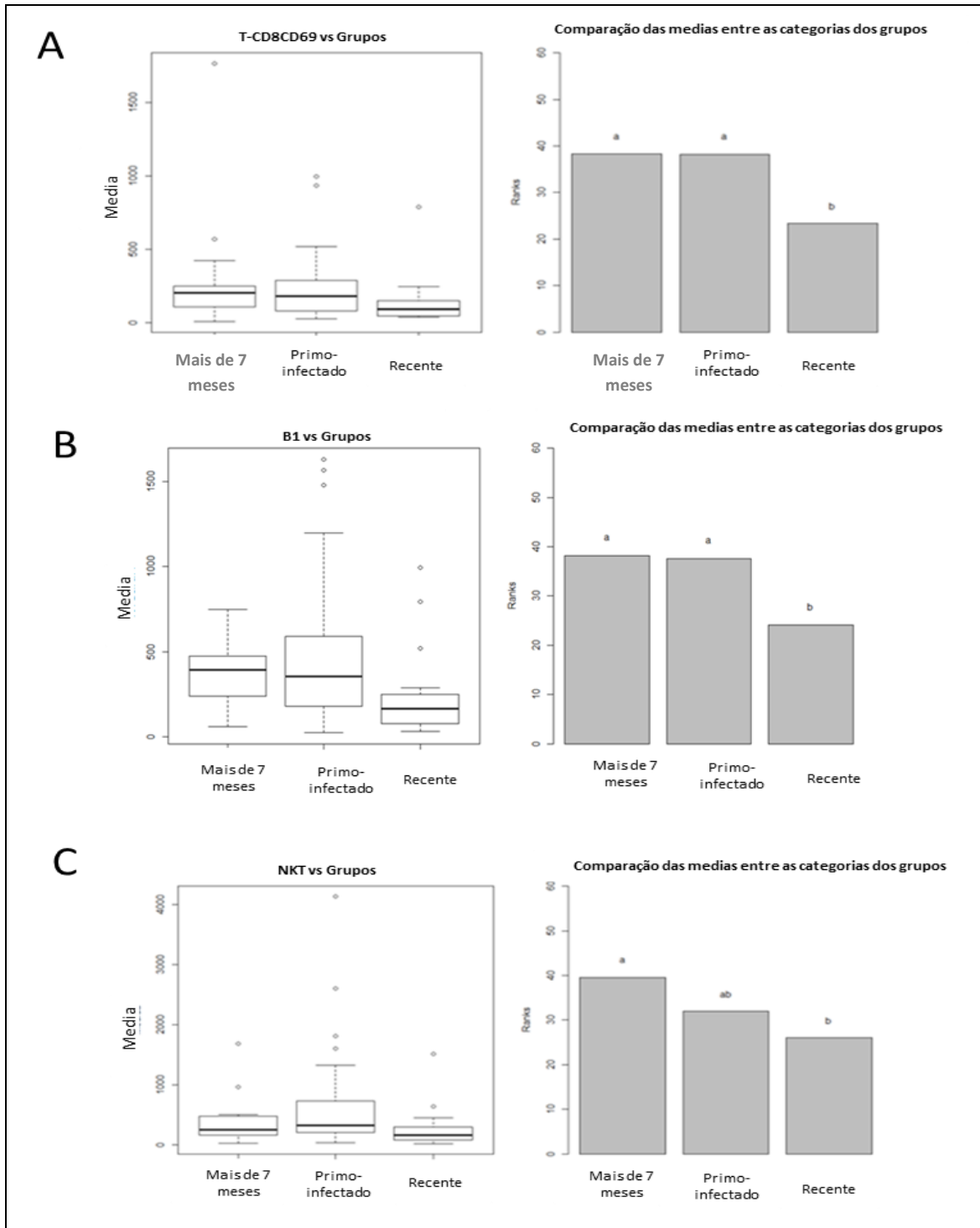


Gráfico 2. Boxplot dos valores absolutos as subpopulações celulares: CD8 ativado (A), Linfócitos B1(B) e NKT (C), entre os pacientes primo infectados, pacientes recentes e pacientes com última malária há mais de 7 meses (à esquerda) media dos *ranks* entre os grupos em barras verticais mostrando em ordem decrescente entre os grupos (à direita).

5.4 Níveis circulantes de citocinas malária aguda

Para elucidar se a possível correlação entre diferentes subpopulações celulares teriam relação com os níveis de interleucina (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon-gama (IFN- γ), foram quantificados nos plasma de pacientes e determinados a partir de quatro grupos de indivíduos: (i) prime-infectados, (ii) malária recente, (iii) último ataque malária a mais de 7 meses e (iv) controles.

Apenas os níveis de circulação de IL-2 em pacientes do grupo recente demonstraram níveis mais elevados do que os controles. Os níveis nos outros grupos não diferiram dos controles (Gráfico 3 A). Os níveis de IL-4 circulantes no grupos de pacientes que já tiveram malária (recentes e mais-1-ano) diferiram dos controles. Os níveis de IL-4 no grupo Primo infectado não diferiram do controle (Gráfico 3 B).

Os níveis de IL-6 e IL-10 circulantes exibiram os mais elevados em todos os grupos de pacientes do que os controles (Gráfico 3C-D). No entanto, os níveis de IL-10 no grupo Recente foram superiores ao primo-infectado, enquanto que no grupo com Mais de 7 meses, os níveis foram intermediários (Gráfico 3D). Os grupos Recentes e Primo infectado produziram mais TNF- α que o controle, enquanto que o grupo Mais de 7 meses não diferiu do controle (Gráfico 3E). Como IL-6, os níveis de IFN- γ apresentaram mais elevados em todos os grupos de pacientes do que nos controles, no entanto, não houve diferença entre eles (Gráfico 3F).

As correlações entre os níveis circulantes de seis citocinas são mostrados no Gráfico 4. Algumas correlações positivas eram comuns aos três grupos de pacientes: IL-2/IL-4; com TNF- α /IL-2 ou IL-4, e ainda IL-6/IL10 (Gráfico 4). Os níveis de interferon-gama foram correlacionados positivamente com a IL-2, IL-4 ou TNF- α apenas nos dois grupos de pacientes que tinham sido expostos ao episódio de malária (Gráfico 4B, C). TNF- α foi positivamente correlacionado com a IL-6 ou IL-10, apenas no grupo Recente (Gráfico 4B). Embora os níveis de circulação do

TNF- α foi maior na maioria dos pacientes, como mostrado no Gráfico 3E, o aumento de IL-6 e IL-10, em simultâneo com o TNF- α apenas foi observada no grupo recente (Gráfico 5).

Parece que a expressão aumentada de IL-10 e a correlação com citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) caracterizaria uma imunossupressão proporcionando controle a hiper-reatividade nos pacientes do grupo Recente suficiente para controlar a inflamação e limitar a patologia.

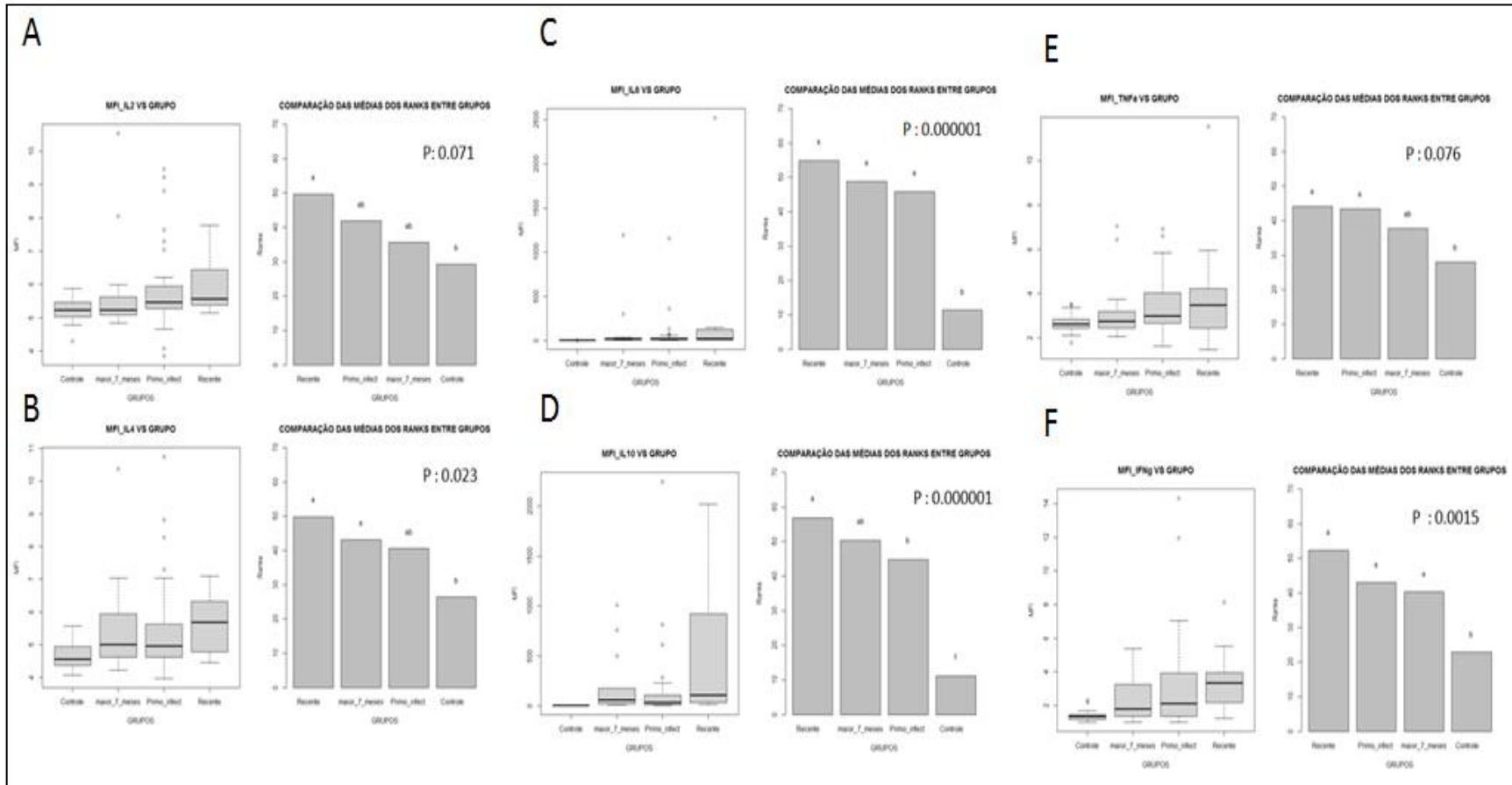


Gráfico 3. Boxplot das media de intensidade de fluorescência das citocinas (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon-gama (IFN- γ), entre os pacientes primo infectados, pacientes recentes e pacientes com última malária há mais de 7 meses (à esquerda), media categórica entre os grupos em barras verticais mostrando a ordem variável entre os grupos (à direita).

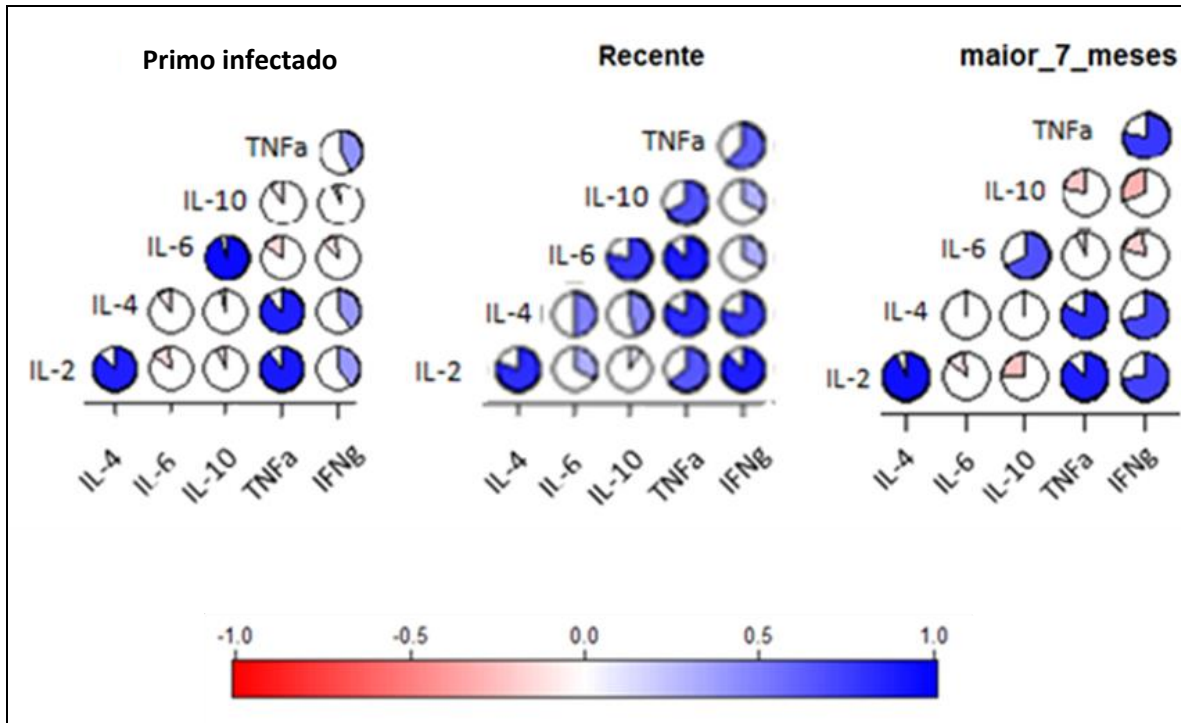


Gráfico 4. Correlação entre citocinas (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon-gama (IFN- γ) encontradas nos soros de pacientes infectados por malária vivax aguda. Primo infectados, recentes e ultima malária há mais de 7 meses mostrando em azul a correlação positiva e em vermelho correlação negativa.

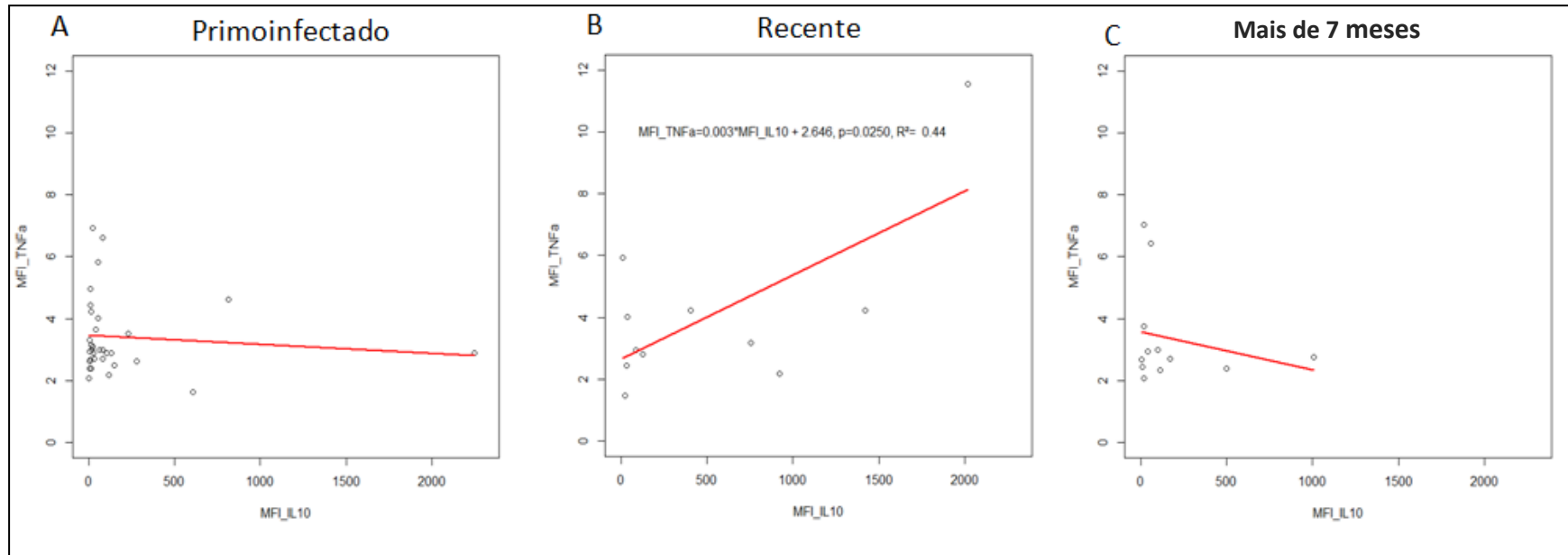


Gráfico 5. Análise de regressão linear simples entre os níveis TNF- α e IL-10 entre os diferentes tipos de históricos, no qual pode ser visto nitidamente que somente os pacientes com malária recente apresentam valores de correlação positiva significantes ($p=0,025$, e $r^2=0,44$)

5.5 Avaliação da dinâmica celular utilizando plaqueta como variável resposta

A dinâmica celular observada nos pacientes com malária vivax aguda (Primo infectados) chamou a atenção devido a redução no valor médio das plaquetas (Tabela 2). Quando comparadas através do teste *Kruskal-Wallis*, as médias destas apresentaram valores mais baixos, estatisticamente diferentes ($p=0.042$) em comparação com os outros grupos (Figura 3).

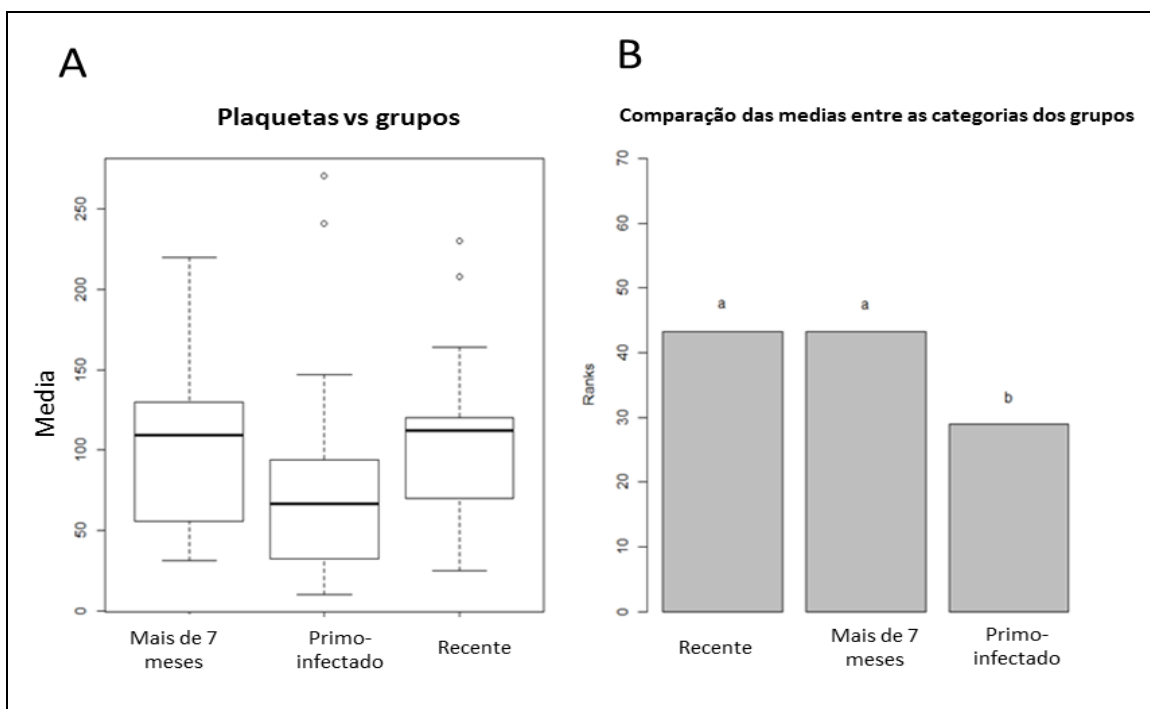


Gráfico 6. Boxplot das médias dos níveis de plaquetas (A), media categórica entre os grupos em barras verticais mostrando a ordem variável entre os grupos (B).

Adicionalmente, foram realizadas análises com o marcador para os principais grupos de linfócitos (CD45RO) e ainda dois marcadores de receptores do endotélio PECAM-1 (CD31) e ICAM-1(CD54). Somente os grupos Primo infectados e mais de 1 ano foram submetidos à análise.

Utilizando a média de plaquetas como resposta variável, mais uma vez o número de células de várias subpopulações de linfócitos foram analisados pela

correlação de *Spearman* e o correlograma de todos pacientes, Primo infectados e mais de 7 meses estão demonstrados no gráfico de pizza (Gráfico 7).

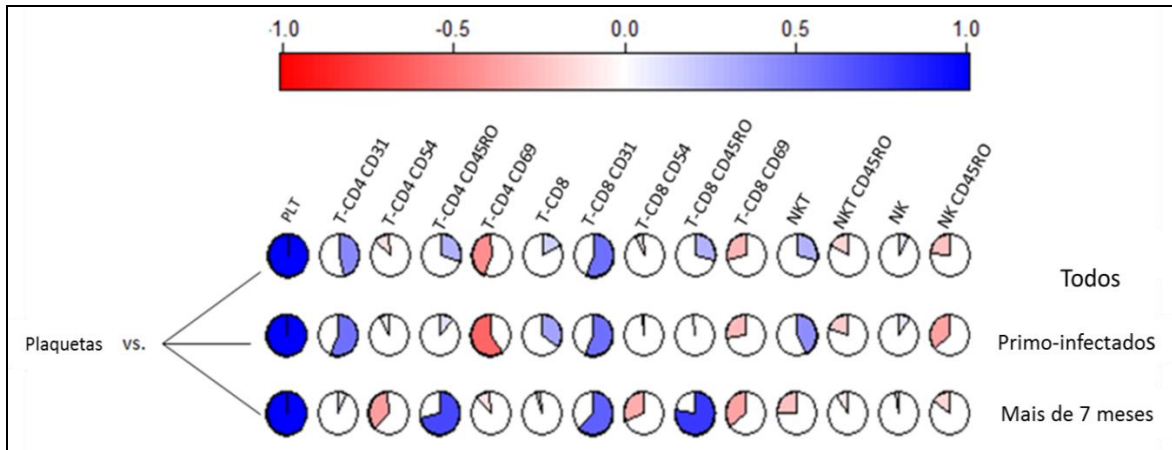


Gráfico 7. Correlação entre as diferentes subpopulações celulares, expressão de moléculas de Adesão (ICAM-1 – CD54, PECAM-1 – CD31), moléculas de memória (CD45RO) e o nível de plaquetas entre todos pacientes, primo infectados e ultima malária há mais de 7 meses mostrando em Azul a correlação positiva e em vermelho correlação negativa.

Através da análise do correlograma foi possível observar uma forte correlação negativa entre células T- CD4CD69 e os valores das contagens de plaquetas nos Primo infectados. Em contraste, esta correlação não foi observada no grupo mais de 7 meses, onde observou-se somente uma tendência em todos os pacientes. Usando a média da contagem de plaquetas como um fator variável, a regressão linear para todos os pacientes confirmaram que quanto maior número de células T- CD4CD69 menor a contagem de plaquetas (Gráfico 8 A). Esta forte associação negativa foi influenciada pelos indivíduos Primo infectados, já que a mesma associação não foi observada no grupo mais de 7 meses (Gráfico 8B-C).

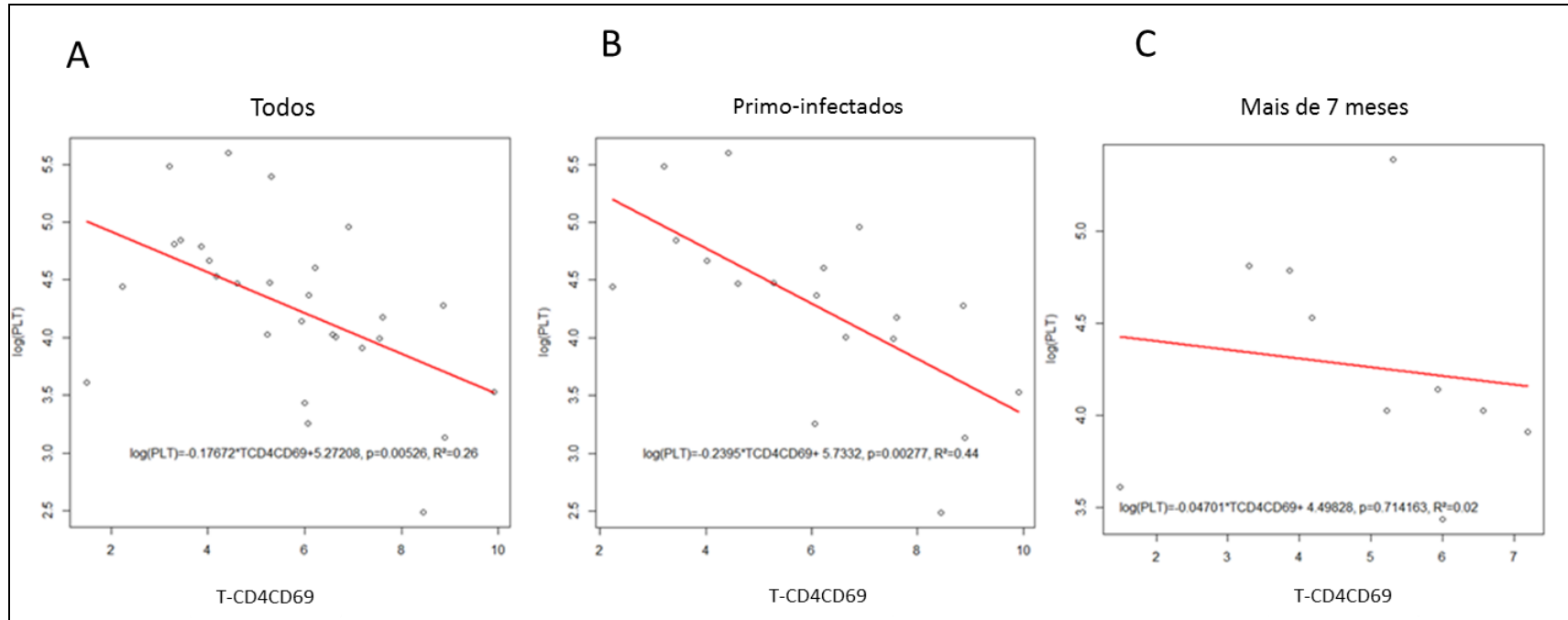


Gráfico 8. Análise de regressão linear simples entre os níveis de plaquetas e as subpopulações de CD4 ativados entre todos os pacientes, $P=0,005$; $r^2=0,26$ (A), primo infectados, $P=0,002$; $r^2=0,44$ (B), última malária há mais de 7 meses, $P=0,7$; $r^2=0,02$ (C).

Em relação à subpopulação madura CD45RO, foi observada exclusivamente no grupo mais de 7 meses, uma forte correlação positiva entre as médias da contagem de plaquetas e as células T-CD45RO e T- CD8 CD45RO. Estas correlações foram confirmadas por regressão linear. Estas associações somente no grupo que apresentou malária há mais de 7 meses demonstrou que o número de células T-CD4 e T-CD8 de memória foram positivamente correlacionadas com o número de plaquetas (Gráfico 9).

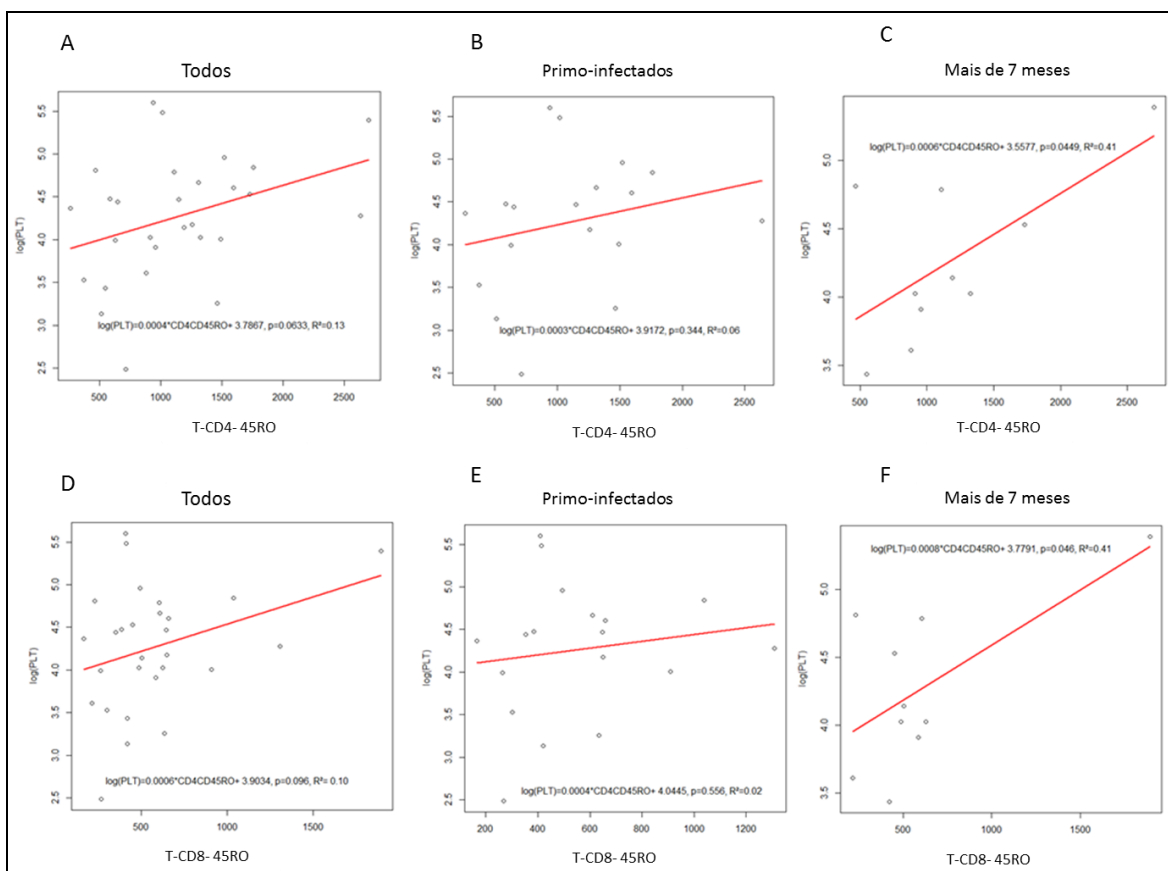


Gráfico 9. Análise de regressão linear simples entre os níveis de plaquetas e as subpopulações de CD4 de memória entre todos os pacientes, $P=0,06$; $r^2=0,13$ (A), Primo infectado, $P=0,34$; $r^2=0,06$ (B), última malária há mais de 7 meses, $P=0,04$; $r^2=0,41$ (C) e as subpopulações de CD8 de memória entre todos os pacientes, $P=0,09$; $r^2=0,10$ (D), Primo infectado, $P=0,55$; $r^2=0,02$ (E), última malária há mais de 7 meses, $P=0,45$; $r^2=0,41$ (F).

Finalmente, as análises de correlação foram avaliadas com os receptores endoteliais nas subpopulações de T-CD4 e T-CD8. Em relação à ICAM-1, não foi observada nenhuma correlação entre a expressão de CD54 em T-CD4 ou T-CD8 quando a média das plaquetas foi utilizada como variável resposta. Ainda, quando a análise foi realizada com PECAM-1, nenhuma correlação foi observada entre a expressão de CD31 em T-CD4. Nos resultados das análises com a subpopulação TCD-8 CD31, observou-se uma forte correlação positiva com a média da contagem das plaquetas (Gráfico 7). No entanto, a análise de regressão demonstrou que estas correlações foram estatisticamente significantes no grupo *Primo infectados* ou quando todos pacientes foram testados (Gráfico 10).

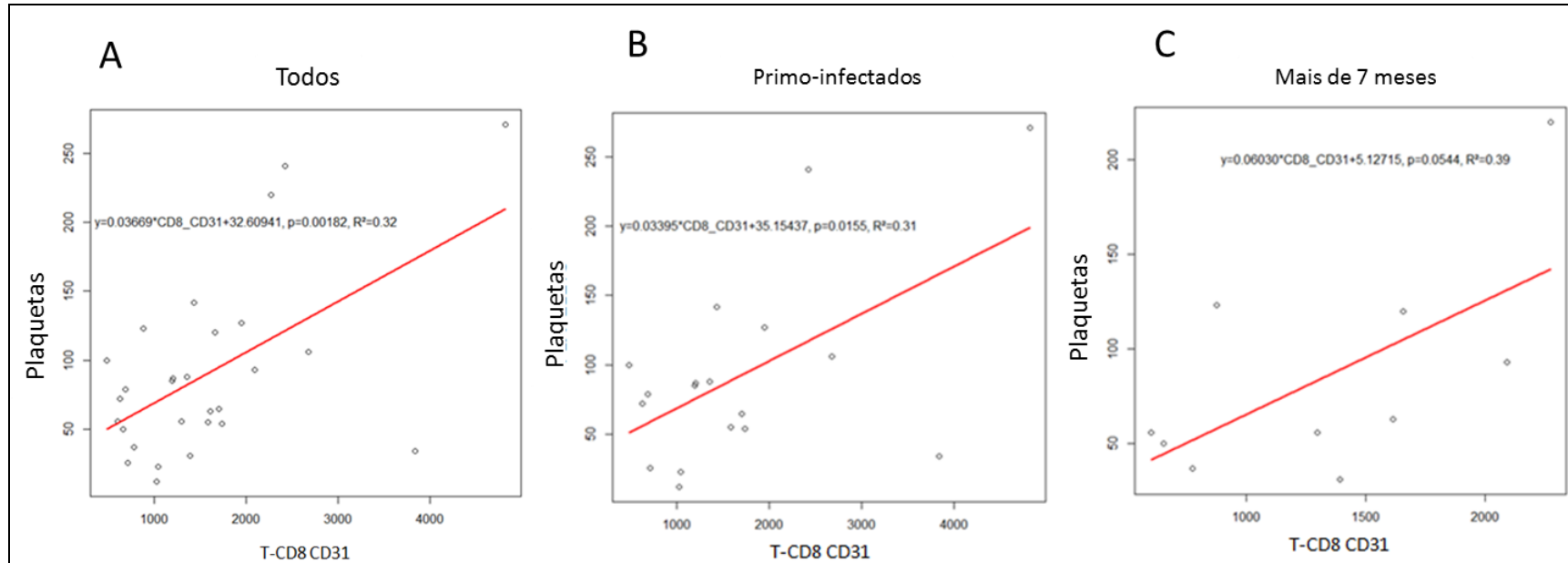


Gráfico 10. Análise de regressão linear simples entre os níveis de plaquetas e a expressão de CD31 (PECAM-1) entre todos os pacientes, $p=0,001$; $r^2=0,32$ (A), Primo infectado, $p=0,01$; $r^2=0,31$ (B), última malária há mais de 7 meses, $p=0,05$; $r^2=0,39$ (C).

Dependendo do episódio anterior de malária ou da infecção ser primária, algumas das principais células imunológicas em vários linfócitos podem ser moduladas durante infecção aguda por *Plasmodium vivax* e de alguma forma estão associadas com alterações no número de plaquetas.

6 DISCUSSÃO

Alguns dos principais obstáculos para indução de uma resposta imune protetora contra malária incluem polimorfismo antigênico, reconhecimento limitado dos antígenos candidatos vacina, inibição da função DC e apoptose de células T e B efectoras e de memória. Se a imunidade mediada por células pode reduzir ou eliminar a infecção, por que são necessários anos de exposição para o desenvolvimento de imunidade protetora em áreas endêmicas de malária? (GOOD *et al.*, 2005). O desenvolvimento de uma bem sucedida imunidade celular para proteção contra a malária permanece um gargalo. Um cenário imunorregulador explorado em modelos murinos indica que a infecção pelo parasita pode causar uma imunossupressão linfócitos específicos e não inespecíficas por apoptose (GOOD *et al.*, 2005).

A linfopenia com redução da frequência e do número de células T na circulação periférica é uma característica bem reconhecida em pacientes com malária aguda, incluindo crianças de áreas na África onde a malária é endêmica (HVIID *et al.*, 1997; GREENWOOD *et al.*, 1977). Está bem estabelecido que a malária induz uma série de alterações fisiopatológicas, incluindo alterações em ambas as células T e B. (HIRUNPETCHARAT & GOOD, 1998; XU *et al.*, 2002). Os pacientes com malária falciparum aguda, são linfopênicos, as subpopulações de células T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ são diminuídas sem alterações na razão celular CD4⁺/CD8⁺. A linfopenia é transitória, voltando para o número normal de linfócitos dentro de 24-48 h de tratamento antimalárico. Embora a causa da linfopenia não esteja clara, uma realocação temporária induzida pela infecção tem sido considerada também como uma provável explicação.

Em adição, nossos resultados demonstraram uma diminuição nos níveis de células B1 nos pacientes com infecção aguda por *Plasmodium vivax* que tiveram episódio recente de malária. Tem sido sugerido que a subsequente supressão da diferenciação de células B em células plasmáticas pode ser

diretamente suprimida por T- reg, como resultado da regulação negativa na produção de IL-2 ou IL-4 por linfócitos respondedores (LIM *et al.*, 2005).

Quanto aos outros tipos de linfócitos relacionados com a imunidade inata tem sido relatado que o baixo número de células NK e NKT pode ser explicado também pela linfopenia documentada tanto em infecções por *Plasmodium falciparum* quanto por *Plasmodium vivax* (KASSA *et al.*, 2006; JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2012).

A dicotomia entre células T-CD8 e T-CD4 vai além da visão demasiadamente simplista da imunidade pré-eritrocítica e eritrocítica, respectivamente. É a interação entre TCD4 e T CD8 T durante a infecção que dita a imunidade e/ou patogênese da malária (SPENCE & LANGHORNE, 2012). Tem sido demonstrado em modelos da malária por infecção *Plasmodium berghei* Anka (PbA) que as células T CD4⁺ contribuem para a elevação de cargas parasitárias e aparecimento de patologia mediada por células T-CD8 (BATISTA *et al.*, 2010; HERMSEN *et al.*, 1997). As células T CD4 controlam fracamente a carga parasitária, em vez de fornecer auxílio as células T CD8 patogênicas que mediam o desenvolvimento ECM (CLASER *et al.*, 2011; HAQUE *et al.*, 2011).

No estagio hepático, estudos recentes confirmaram que a exposição aos antígenos do estágio hepático de *Plasmodium vivax* (exoeritrocítico ou hipnozoíto) aumenta a população de células T-CD8 efectoras durante a infecção aguda por *P. vivax* (COCKBURN *et al.*, 2010; MORROT, & ZAVALA , 2004; REYES-SANDOVAL *et al.*, 2011). Comparando o nível de subpopulações de células T-CD8 em pacientes infectados por *P. vivax*, classificados como infecção primária ou infecção prévia, os T-CD8 ativados (CD69) foram rapidamente reduzidos nos indivíduos com infecção malárica aguda anterior ao episódio atual. Embora as recaídas por malária vivax não possam ser identificadas, esta possibilidade não é descartada pela historia relatadas pelos indivíduos do grupo Recente, já que a resistência de *P. vivax* aos antimaláricos comumente utilizados tem sido reportada em áreas de transmissão de malária no Brasil (LACERDA *et al.*, 2012). As consequências *in vivo* da resposta induzido na malária parecem ser semelhantes nas espécies de *Plasmodium* em

humanos. *Plasmodium vivax*, causador de malárias recidivas, apresenta estágio sanguíneo clinicamente relevante através do desenvolvimento de uma forte resposta imune pró-inflamatória e a perda de eritrócitos (KOEHLER *et al.*, 2009). A redução no número de células T-CD8 CD69 e a perda da correlação com outras células (como T-CD4 e B) no grupo de pacientes que apresentou um episódio malárico prévio recente reforçam os dados de imunocompensação e levantam a questão do papel das recaídas nesse processo.

Maior parte da patogenia na malária é mediada imunologicamente, o que implica que a resposta imune deve ser cuidadosamente regulada. A resolução bem sucedida de infecção da malária pode exigir iniciar com a progressão rápida e intensa de uma resposta pró-inflamatória e depois por uma diminuição suprimida por uma resposta anti-inflamatória, uma vez replicação do parasita tenha sido controlada. (RILEY *et al.*, 2006).

A imunossupressão e ativação de células T específicos do antígeno ocorrem na malária humana (JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2012; HO *et al.*, 1990). Alguns mecanismos regulatórios potenciais incluem: apoptose, modificação da resposta imune celular, a ativação das células T CD8+ e a auto-regulação de moléculas efetoras, tais como NO, IL-10 ou IFN- γ (LANGHORNE *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2003). Uma explicação óbvia de não resposta imunológica, tal como avaliado por estudos usando linfócitos periféricos é a ausência de células T específicas para o antígeno no sangue periférico (HO *et al.*, 1990).

Estudos não maláricos tem demonstrado o IFN- γ como responsável por eliminar células T CD4⁺ respondedoras através da indução de morte celular em vários outros sistemas, denominado com mecanismo de auto-tolerância (LIU & JANEWAY, 1990; DALTON *et al.*, 2000). Similar à malária *falciparum*, citocinas pró-inflamatórias são positivamente reguladas durante a malária vivax aguda e as células NK na circulação periférica produzem INF- γ após exposição ao *Plasmodium vivax* (ARTAVANIS-TSAKONAS & RILEY, 2002). O mecanismo de imunossupressão permanece com uma importante questão a ser respondida a fim de alcançar a imunidade protetora. Estudos prévios demonstraram a inibição de fenótipos de células B tanto em *Plasmodium*

falciparum quando em *P. vivax* (KASSA *et al.*, 2006; ASITO, *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2001).

IL-10, produzida por células T-reg e linfócitos B, é capaz de prevenir a imunopatologia em *P. chabaudi* e *Plasmodium yoelii*. Camundongos deficientes em IL10 tem uma taxa de sobrevivência diminuída devido ao aumento da imunopatologia, mesmo tendo um nível mais baixo de parasitemia (LINKE *et al.*, 1996; OMER & RILEY, 1998; LI *et al.*, 1999; COUPER *et al.*, 2008). Ela atua em várias células do sistema imune, incluindo as APCs e as células T, removendo sinais co-estimuladores na infecção (LI *et al.*, 1999; COUPER *et al.*, 2008; FIORENTINO *et al.*, 1991; DING & SHEVACH, 1992). Em humanos, a interleucina 10 pode direta ou indiretamente (através da inibição da função da célula acessória) suprimir a produção de IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, e a produção de LT por células T e na presença de monócitos/macrófagos inibe a proliferação de células T humanas (PLEBANSKI *et al.*, 1999). Nossos dados sugerem que a perda de correlação entre T-reg e B1 nos indivíduos com episódios recentes de malária também pode ser explicada pela concomitante imunossupressão.

Estudos recentes demonstram que indivíduos infectados por *Plasmodium falciparum* foram preparados para responder a vários TLR ligantes aumentando a resposta imune (MCCALL *et al.*, 2007, 23; FRANKLYN *et al.*, 2009). No estudo com voluntários infectados experimentalmente por *Plasmodium falciparum*, as respostas mediadas por TLR foram moduladas em duas etapas, a primeira primando o sistema inato, e a segunda posteriormente com uma resposta supressora (MCCALL *et al.*, 2007).

FRANKLYN *et al.* (2009) demonstraram através de análises e microarranjos em pacientes febris durante infecção natural por *Plasmodium falciparum* uma grande percentagem de genes supra regulados para transcrição induzida de IFN- γ . As células mononucleares do sangue periférico destes pacientes apresentaram uma hiper-resposta aos agonistas de TLR, resultando na sobreprodução de citocinas pró-inflamatórias. As consequências desta hiper-reatividade in vivo induzida na malária levariam as células a se tornarem primadas ao ponto de reagir durante infecções secundárias, capazes

de induzir estados inflamatórios prejudiciais. Esta hiper-reatividade parece ser aplicável à infecção com outras espécies de *Plasmodium* (FRANKLIN *et al.*, 2009).

A fim de comparar os eventos imunopatológicos em casos de malária vivax leve e grave, os status inflamatório e imunológico foram comparados em estudo realizado na Amazônia brasileira (ANDRADE *et al.*, 2010). Os níveis plasmáticos de IL-10 foram menores com o aumento da gravidade da doença, e ainda, a razão IFN- γ /IL-10 foi maior nos pacientes com maior gravidade da doença (ANDRADE *et al.*, 2010). O aumento do nível de IL-10 circulante e as correlações positivas de TNF- α com IL-6 e IL-10 pelo grupo de pacientes que apresentou um episódio malárico prévio recente reforçam os dados de imunocompensação apresentados pela redução no número de células T-CD8 CD69 e a perda da correlação com outras células (como T-CD4 e B). Nossos dados estariam de acordo que a imunocompensação demonstrada pelos pacientes do grupo Recente proporcionaria inflamação suficiente para desenvolvimento de uma malária moderada, porém limitaria a patogenia severa.

A ocorrência de Plaquetopenia é uma das mais comuns complicações da infecção por *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (TAYLOR *et al.*, 2008; KOCHAR *et al.*, 2012; ARAUJO *et al.*, 2008; KOCHAR *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2011; CHANDRA & CHANDRA, 2013; DASGUPTA *et al.*, 2012). O mecanismo exato desta complicação não está completamente elucidado. A patogênese da Plaquetopenia na malária é multifatorial e envolve mecanismos imunológicos e não imunológicos, como o gasto de plaquetas no processo trombótico ou adesão destas na superfície das células endoteliais ativadas pela infecção, destruição/limpeza por apoptose ou respostas mediadas pelo sistema imune. No entanto, nenhum dos mecanismos postulados como a causa foi inequivocamente demonstrado, portanto, é possível que vários destes fatores sejam responsáveis atuando em conjunto (revisto em LACERDA *et al.*, 2011)

Estudos da infecção vivax tem demonstrado a associação da Plaquetopenia com o aumento de IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β (PARK *et al.*, 2003).

Tem sido demonstrado que as plaquetas participam na patogênese microvascular na malária severa, aderindo ao endotélio previamente estimulado pelo fator de necrose tumoral (TNF) (LOU *et al.*, 1997).

Células endoteliais (*Endothelial cell* - EC) proporcionam uma superfície não-trombogênica e não-adesivo, mas após exposição a citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α ou IL-10 sob condições patológicas, EC sintetizam e expressam na superfície numerosas adesinas (moléculas de adesão) e outras moléculas que participam no recrutamento de leucócitos e plaquetas, se tornando pró-adesivas e pró-coagulante (JIMENEZ *et al.*, 2003). A Molécula de Adesão Celular Endotelial Plaquetária (PECAM-1, do inglês *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) é um dos membros da família CAM em plaquetas e são amplamente expressas nas células endoteliais e hematopoiéticas que ativam mecanismos para subsequente adesão de plaquetas, monócitos e granulócitos nos sítios de lesão vascular iniciando a inflamação, a formação do tampão de plaquetas e o processo de cicatrização de feridas (NEWMAN *et al.*, 1990).

Nossos resultados demonstraram uma forte correlação positiva entre os níveis de plaqueta e a expressão de CD31 em linfócitos T-CD8. A correlação foi estatisticamente significativa quando todos os indivíduos foram analisados em conjunto ($p=0.00182$; $r^2=0.31$) ou nos pacientes com infecção primária ($p=0.0155$; $r^2=0.31$) indicando que a tendência na redução de plaquetas está associada com a redução na expressão de CD31 nas células alvo, como evidenciado pelos linfócitos T-CD8. Tem sido demonstrado que PECAM-1 tem função estimulatória e inibitória que contribuem para importantes processos na vasculatura. O efeito inibitório contra ativação de plaqueta baseia-se em observações da resposta anormal de camundongos PECAM-1^{-/-} à Plaquetopenia imunomediada, como plaquetas PECAM-1 deficientes sob fluxo ou bloqueio por diferentes anticorpos monoclonais anti-PECAM-1 de camundongos. Na ausência de PECAM-1 as plaquetas foram hiperresponsivas e tem um atraso na agregação-adesão nos sítios de lesão do endotélios nas arteríolas cerebrais de camundongos (JONES *et al.*, 2001). Ainda, camundongos age PECAM-1^{-/-} exibem prognósticos nocivos em alguns condições, como artrite induzida por colágeno, choque séptico induzido por

LPS e encefalomielite, manifestando uma resposta defeituosa compatível com estresse (DHANJAL *et al.*, 2007). A possibilidade que PECAM-1 desempenhe um papel similar na regulação da recuperação de outras linhagens hematopoiéticas pode ser explicado pela forte correlação positiva observada em nossos resultados entre os níveis de plaquetas e expressão de CD31. A tendência para a redução de plaquetas está associada com uma expressão reduzida de CD31 nas células alvo tal como evidenciado pelos linfócitos T-CD8 substanciando o reconhecimento crescente de que PECAM-1 é uma molécula "compensatória", cujo papel principal é mais claramente evidenciados nos eventos patológicos evidentes no estresse.

O desenvolvimento da resposta imune leva a ativação de linfócitos por antígenos ou mitógenos, os quais rapidamente expressam genes conhecidos como genes iniciais-imediatos, incluindo proto-oncogenes, fatores de crescimento, receptores de citocinas e ativação célula pela expressão da molécula CD69, também denominados de Molécula indutora de ativação (do inglês *Activation Inducer Molecule (AIM/CD69)*). A AIM/CD69 é expressa principalmente pela ativação de células T, B e NK, sendo a indução de CD69 extremamente rápida, sendo detectada dentro de 2 horas a partir do estímulo ou após o surgimento da febre. Esta molécula age como um receptor coestimulador possuindo um importante papel na ativação e proliferação de linfócitos (LAUZURICA *et al.*, 2000).

Os níveis de T-CD4 CD69 demonstraram uma forte correlação negativa com a contagem de plaquetas quando todos os pacientes foram analisados em conjunto ($p=0.0052$; $r^2=0.26$), esta correlação foi mais evidente nos pacientes com infecção primária ($p=0.0027$; $r^2 = 0.44$). É interessante ressaltar que não houve diferença no número de T-CD4 CD69 entre os grupos *Primo infectados* e *Mais de 1 ano* (**Tabela 1 e Gráfico 1**), sugerindo que a correlação negativa com contagem plaquetária encontrada na infecção primária pode ser um reflexo da estimulação e expressão do receptor de CD69 nas células alvo, como tem sido observado na expressão de CD31. Tem sido sugerido que as características bioquímicas das plaquetas CD69 se assemelham aos linfóides CD69 e são capazes de transmitir sinais de ativação e agregação plaquetária (TESTI *et al.*, 1990). Assim, a forte correlação negativa observada aqui sugere

que as plaquetas de pacientes com infecção primária podem regular positivamente CD69, tornando-os mais adesivas.

Respostas primárias aos patógenos causam intensa proliferação de células T antígeno-específicas que se diferenciam rapidamente em células de longa vida expressando a molécula de memória CD45RO. O contato intermitente de células de memória antígeno-específicas com citocinas liberadas durante infecções patogênicas não específicas podem proporcionar a estas um aumento da sobrevivência (*survival boost*), ajudando na manutenção da memória (SPRENT *et al.*, 1997). Tem sido demonstrando que a longa duração de células de memória aos parasitos maláricos podem ser rapidamente induzidos após exposição ao longo de um ano (TEIRLINCK *et al.*, 2011). Em adição, as subpopulações de células T-CD4 CD45RO na infecção malárica nos últimos 6 anos, são capazes de expandir rapidamente após encontrar com antígenos específicos e diferenciar em células efetoras produtoras de citocinas (WIPASA *et al.*, 2011; ROGERS *et al.*, 2000; JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2006).

Neste trabalho, o grupo de pacientes com histórico prévio de malária (*Mais de 7 meses*) demonstrou Plaquetopenia moderada e os níveis de T-CD4 CD69 e T-CD8 CD69 não diferiram daqueles dos grupo *Primo infectados*, os quais a Plaquetopenia foi exacerbada (Tabela 4 e Gráfico 6). No entanto, somente células de memória T-CD4 e T-CD8 do grupo *Mais de um ano* apresentaram forte correlação positiva com a contagem de plaquetas (Gráfico 7 e 9). Foi estabelecido que entre populações naturalmente expostas, a imunidade aos sintomas clínicos da malária severa é adquirida rapidamente, mas a imunidade à infecção desenvolve lentamente e reduz a severidade da doença (WIPASA *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 1999; LANGHORNE *et al.*, 2008; TEIRLINCK *et al.*, 2011; JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2006). Nossos resultados demonstraram que células de memória de longa vida encontrada nos pacientes previamente expostos estão correlacionados com resposta protetora na Plaquetopenia severa na malária vivax.

Tem sido estabelecido que as plaquetas estimuladas com respostas pro-inflamatórias participam na patogênese microvascular na malária severa,

aderindo ao endotélio (LOU *et al.*, 1997). Em conclusão, os nossos resultados mostram que o estado não imune de pacientes do *Primo infectado* contribui para a alteração da contagem de plaquetas comportando-se como um fator de risco para o desenvolvimento de Plaquetopenia em malária.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALECRIM W. D.; ESPINOSA, F. E.; ALECRIM, M. G. PLASMODIUM FALCIPARUM INFECTION IN THE PREGNANT PATIENT. **Infect. Dis. Clin. North Am**, v. 14, n.1, 2000.

ALEXANDRE, M. A.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L.; MOURÃO, M. P. G.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G. C. Severe Plasmodium vivax Malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 16, p. 1611-1614, 2010.

ALVARO, C. A. Malária. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. p. 753-779. Veronesi, R. (7° ed.), Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982. p.1209.

ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M.; CLARÊNCIO, J.; CAMARGO, L. MA.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 13, 2010.

ANDONEGUI, G.; KERFOOT, S. M.; MCNAGNY, K.; EBBERT, K. V.; PATEL, K. D.; KUBES, P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. **Blood**, v.106, n.7, p.2417-2423, Oct 1 2005.

ARAUJO, C. F.; LACERDA, M. V.; ABDALLA, D. S.; LIMA, E. S. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.517-521, 2008.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- γ from Human NK Cells by Live Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes. **The Journal of Immunology**, v.169, n.6, p.2956-2963, 2002.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- γ from Human NK Cells by Live *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 2956-2963, September 15, 2002.

ASITO, A. S.; MOORMANN, A. M.; KIPROTICH, C.; NG'ANG'A, Z. W.; PLOUTZ-SNYDER, R.; ROCHFORD, R. Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. **Malar J**, v.7, p.238, 2008.

ASHLEY, E.; MCGREADY, R.; PROUX, S.; NOSTEN, F. Malaria. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 4, p. 159-173, 2006.

AUGUSTINE, A. D.; HALL, B. F.; LEITNER, W. W.; MO, A. X.; WALI, T. M.; FAUCI, A. S. NIAID workshop on immunity to malaria: addressing immunological challenges. **Nature Immunology**, v. 10, n.7, p. 673-678, 2009.

BARKAN, D.; GINSBURG, H.; GOLENSER, J. Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in plasmodium-infected mice. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 5, p. 649-53, 2000.

BASSAT, Q.; ALONSO, P. L. Defying malaria: Fathoming severe Plasmodium vivax disease. **Nature medicine**, v. 17, n. 1, p. 48-9, 2011.

BELNOUE, E.; POTTER, S. M.; ROSA, D. S.; MAUDUIT, M.; GRUNER, A. C.; KAYIBANDA, M.; MITCHELL, A. J.; HUNT, N. H.; RENIA, L. Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. **Parasite Immunol**, v.30, n.10, p.544-553, 2008.

BOTERO, D.; RESTREPO, M. Parasitosis Humanas. **Corporación para Investigaciones Biológicas**, p. 149-189, 1998.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; OEUVRAY, C.; LUNEL, F.; DRUILHE, P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 409–418, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**, 1ª Ed, 2010.

BRONZONI, R. V. D. M.; BALEOTTI, F. G.; RIBEIRO NOGUEIRA, R. M.; NUNES, M.; MORAES FIGUEIREDO, L. T. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.696-702, 2005.

BRUCE, M. C.; ALANO, P.; DUTHIE, S.; CARTER, R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, v. 100, p. 191-200, 1990.

BUENO, L. L.; MORAIS C. G.; ARAÚJO, F. F.; GOMES, J. A. S.; OLIVEIRA, R. C.; SOARES, I. S.; LACERDA, M. V.; FUJIWARA, R. T.; BRAGA, É. M. *Plasmodium vivax*: Induction of CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells during Infection Are Directly Associated with Level of Circulating Parasites. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9623, 2010

CHALANDON, Y.; KOCHER, A. Severe Malaria. **New England Journal of Medicine**, v.342, n.23, p.1715-1715, 2000.

CHANDRA, S.; CHANDRA, H. Role of haematological parameters as an indicator of acute malarial infection in uttarakhand state of India. **Mediterranean Journal Hematology Infectious Disease**, v.5, n.1, p.e2013009, 2013.

CLASER, C.; MALLERET, B.; GUN, S. Y.; WONG, A. Y.; CHANG, Z. W.; TEO, P.; SEE, P. C.; HOWLAND, S. W.; GINHOUX, F.; RENIA, L. CD8+ T cells and IFN-gamma mediate the time-dependent accumulation of infected red blood cells in deep organs during experimental cerebral malaria. **PLoS ONE**, v.6, n.4, p.e18720, 2011.

COBAN, C. ; ISHII, K.J. ; UEMATSU, S. ; ARISUE, N. ; SATO, S. ; YAMAMOTO, M. ; KAWAI, T. ; TAKEUCHI, O. ; HISAEDA, H. ; HORII, T. ; AKIRA, S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. **Int Immunol**, v.19, n.1, p.67-79, 2007

COCKBURN, I. A.; CHEN, Y. C.; OVERSTREET, M. G.; LEES, J. R.; VAN ROOIJEN, N.; FARBER, D. L.; ZAVALA, F. Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8+ T cell responses against malaria liver stage parasites. **PLoS Pathog**, v.6, n.5, p.e1000877, May 2010.

COELHO-CASTELO, A. A. M.; TROMBONE, A.P. F.; ROCHA, C. D.; LORENZ, J. C. C. Immune response to infectious diseases. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 2, n. 42, p. 127-42, 2009.

CORBETT, Y.; HERRERA, L.; GONZALEZ, J.; CUBILLA, L.; CAPSON, T. L.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRIA, E. A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 70, n. 2, p. 119-24, 2004.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; WILSON, M. S.; HAFALLA, J. C.; BELKAID, Y.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; DE SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. **PLoS Pathog**, v.4, n.2, p.e1000004, 2008.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M. E.; LEE, K.; SHAMSUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 2, p. 165-71, 2008.

DAVIS, T. M.; HO, M.; SUPANARANOND, W.; LOOAREESUWAN, S.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; WHITE, N. J. Changes in the peripheral blood eosinophil count in falciparum malaria. **Acta Trop.**, v. 48, n.3, 1991.

DALTON, D. K.; HAYNES, L.; CHU, C. Q.; SWAIN, S. L.; WITTMER, S. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. **J Exp Med**, v.192, n.1, p.117-122, 2000.

DASGUPTA, A.; RAI, S.; DAS GUPTA, A. Persistently elevated laboratory markers of thrombosis and fibrinolysis after clinical recovery in malaria points to residual and smouldering cellular damage. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v.28, n.1, p.29-36, Mar 2012.

DAVID, P. H.; DEL PORTILLO, H. A.; MENDIS, K. N. Plasmodium vivax malaria: parasite biology defines potential targets for vaccine development. **Biology of the Cell**, v. 64, n. 2, p. 251-280, 1988.

DHANJAL, T. S.; PENDARIES, C.; ROSS, E. A.; LARSON, M. K.; PROTTY, M. B.; BUCKLEY, C. D.; WATSON, S. P. A novel role for PECAM-1 in

megakaryocytopoiesis and recovery of platelet counts in thrombocytopenic mice. **Blood**, v.109, n.10, p.4237-4244, 2007.

DING, L.; SHEVACH, E. M. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. **J Immunol**, v.148, n.10, p.3133-3139, May 15 1992.

DONDORP, A. M.; PONGPONRATN, E.; WHITE, N. J. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. **Acta Trop**, v.89, n.3, p.309-317, Feb 2004.

DRUILHE, P. ; SPERTINI, F. ; SOESOE, D. ; CORRADIN, G. ; MEJIA, P. ; SINGH, S. ; AUDRAN, R. ; BOUZIDI, A. ; OEUVRAY, C. ; ROUSSILHON, C. A Malaria Vaccine That Elicits in Humans Antibodies Able to Kill *Plasmodium falciparum*. **PLoS Med**, v.2, n.11, p.e344, 2005.

ERDMAN, L.K. ; COSIO, G. ; HELMERS, A.J. ; GOWDA, D.C. ; GRINSTEIN, S. ; KAIN, K.C. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. **J Immunol**, v.183, n.10, p.6452-6459, 2009.

FARID, Z.; KILPATRICK, M. E.; CHIODINI, P. L. Parasites diseases of the liver. **Diseases of the Liver**, p.1338-1355, 1993.

FERNANDES, A. A. M.; CARVALHO, L. J. M.; ZANINI G. M.; VENTURA, A. M. R. S.; SOUZA, J. M.; COTIAS, P. M.; SILVA-FILHO, I. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Similar Cytokine Responses and Degrees of Anemia in Patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Infections in the Brazilian Amazon Region. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 4, p. 650–658, 2008.

FERREIRA, A. ; SCHOFIELD, L. ; ENEA, V. ; SCHELLEKENS, H. ; VAN DER MEIDE, P. ; COLLINS, W.E. ; NUSSENZWEIG, R.S. ; NUSSENZWEIG, V. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. *Science*, v.232, n.4752, p.881-884, 1986.

FERREIRA, M. U.; DA SILVA NUNES, M.; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 11, n.6, p. 987, 2004.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J Immunol**, v.146, n.10, p.3444-3451, May 15 1991.

FRANKLIN, B. S.; PARROCHE, P.; ATAÍDE, M. A.; LAUW, F.; ROPERT, C.; DE OLIVEIRA, R. B.; PEREIRA, D.; TADA, M. S.; NOGUEIRA, P.; DA SILVA, L. H. P.; BJORKBACKA, H.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of toll-like receptor expression and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n.14, p.5789-5794, 2009.

FRASSON, A. P.; BARLETTE, A. G.; DALPIZOLO, C.; SAUTER, I. P.; MACEDO, A. J.; TASCA, T. Estratégias e desafios no combate à malária. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 201-208, 2009.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 12, p. 895-906, 2006.

GILLES, H. M. The malaria parasite. **Essential Malariology**, p. 12-34, 1993.

GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. D. P.; MENDONÇA, E. G. D.; OLIVEIRA, M. G. D. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por Plasmodium falciparum. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.23, p.358-369, 2011.

GOOD, M.F. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. **Trends Parasitol**, v.21, n.1, p.29-34, 2005.

GOOD, M. F.; XU, H.; WYKES, M.; ENGWERDA, C. R. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annu Rev Immunol**, v.23, p.69-99, 2005.

GOOD, M.F. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 1, p. 29-34, 2005.

GOOD, M.F.; DOOLAN, D.L. Malaria vaccine design: immunological considerations. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 555-66, 2010.

GREENWOOD, B. M.; ODULOJU, A. J.; STRATTON, D. Lymphocyte changes in acute malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.71, n.5, p.408-410, 1977.

GREENWOOD, B. M. Control to elimination: implications for malaria research. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 10, p. 449-54, 2008.

GUPTA, S.; SNOW, R. W.; DONNELLY, C. A.; MARSH, K.; NEWBOLD, C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. **Nat Med**, v.5, n.3, p.340-343, Mar 1999.

HANSCHKEID, T.; LANGIN, M.; LELL, B.; POTSCHEKE, M.; OYAKHIROME, S.; KREMSNER, P.G.; GROBUSC, M. P. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. **Malar J.**, 2008.

HANSEN, D.S. ; BERNARD, N.J. ; NIE, C.Q. ; SCHOFIELD, L. NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during Plasmodium berghei-mediated cerebral malaria. **J Immunol**, v.178, n.9, p.5779-5788, 2007.

HAQUE, A.; BEST, S. E.; UNOSSON, K.; AMANTE, F. H.; DE LABASTIDA, F.; ANSTEY, N. M.; KARUPIAH, G.; SMYTH, M. J.; HEATH, W. R.; ENGWERDA, C. R. Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. **J Immunol**, v.186, n.11, p.6148-6156, Jun 1 2011

HIRUNPETCHARAT, C.; GOOD, M. F. Deletion of Plasmodium berghei-specific CD4+ T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 1715–1720, 1998.

HVIID, L.; KURTZHALS, J. A.; GOKA, B. Q.; OLIVER-COMMEY, J. O.; NKRUMAH, F. K.; THEANDER, T. G. Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. **Infect Immun**, v.65, n.10, p.4090-4093, 1997.

HVIID, L. Clinical disease immunity and protection against *Plasmodium falciparum* malaria in population living in endemics areas. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, p. 1-10, 1998.

HO, M.; WEBSTER, H. K.; TONGTAWE, P.; PATTANAPANYASAT, K.; WEIDANZ, W. P. Increased gamma delta T cells in acute Plasmodium falciparum malaria. **Immunol Lett**, v.25, n.1-3, p.139-141,1990.

HOFFMAN, S.L. ; ISENBARGER, D. ; LONG, G.W. ; SEDEGAH, M. ; SZARFMAN, A. ; WATERS, L. ; HOLLINGDALE, M.R. ; VAN DER MEIDE, P.H. ; FINBLOOM, D.S. ; BALLOU, W.R. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. **Science**, v.244, n.4908, p.1078-1081, 1989.

IDRO, R; MARSH, K.; JOHN, C. C.; NEWTON, C. R. J. Cerebral malaria mechanisms of brain injury and strategies for improved neuro-cognitive outcome. **UKPMC Funders Group Author Manuscript Pediatr. Res.**, v. 68, n. 4, p. 267-274, 2010.

JADHAV, U. M.; PATKAR, V. S.; KADAM, N. N. Thrombocytopenia in malaria--correlation with type and severity of malaria. **J Assoc Physicians India**, v.52, p.615-618, Aug 2004.

JAFARSHAD, A. ; DZIEGIEL, M.H. ; LUNDQUIST, R. ; NIELSEN, L.K. ; SINGH, S. ; DRUILHE, P.L. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes Fc gamma RII and Fc gamma RIII. **J Immunol**, v.178, n.5, p.3099-3106, 2007

JANGPATARAPONGSA, K.; SIRICHAISINTHOP, J.; SATTABONGKOT, J.; CUI, L.; MONTGOMERY, S. M.; LOOAREESUWAN, S.; TROYE-BLOMBERG, M.; UDOMSANGPETCH, R. Memory T cells protect against Plasmodium vivax infection. **Microbes Infect**, v.8, n.3, p.680-686, 2006.

JANGPATARAPONGSA, K.; XIA, H.; FANG, Q.; HU, K.; YUAN, Y.; PENG, M.; GAO, Q.; SATTABONGKOT, J.; CUI, L.; LI, B.; UDOMSANGPETCH, R. Immunity to malaria in Plasmodium vivax infection: a study in central China. **PLoS ONE**, v.7, n.9, p.e45971, 2012.

JIMENEZ, J. J.; JY, W.; MAURO, L. M.; SODERLAND, C.; HORSTMAN, L. L.; AHN, Y. S. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. **Thromb Res**, v.109, n.4, p.175-180, 2003.

JONES, K. L.; HUGHAN, S. C.; DOPHEIDE, S. M.; FARNDAL, R. W.; JACKSON, S. P.; JACKSON, D. E. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions. **Blood**, v.98, n.5, p.1456-1463, 2001.

JOHNSTON, S. P.; PIENIAZEK, N. J.; XAYAVONG, M. V.; SLEMENDA, S. B.; WILKINS, P. P.; SILVA, A. J. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1087-1089, 2006.

KASSA, D.; PETROS, B.; MESELE, T.; HAILU, E.; WOLDAY, D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. **Clin Vaccine Immunol**, v.13, n.3, p.376-379, 2006.

KHAN, S. J.; KHAN, F. R.; USMAN, M.; ZAHID, S. Malaria can lead to Thrombocytopenia. **RMJ**, v.33, n.2, p.183-185, 2008.

KELLER, C. C.; YAMO, O.; OUMA, C.; ONG'ECHA, J. M.; OUNAH, D.; HITTNER, J. B.; VULULE, J. M.; PERKINS, D. J. Acquisition of Hemozoin by Monocytes Down-Regulates Interleukin-12 p40 (IL-12p40) Transcripts and Circulating IL-12p70 through an IL-10-Dependent Mechanism: In Vivo and In Vitro Findings in Severe Malarial Anemia. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 5249-5260, 2006.

KETEMA, T.; BACHA, K. *Plasmodium vivax* associated severe malaria complications among children in some malaria endemic areas of Ethiopia. **BMC Public Health**, v.13, n.1, p.637, 2013.

KINYANJUI, S.; BEJON, P.; OSIER, F.; BULL, P.; MARSH, K. What you see is not what you get: implications of the brevity of antibody responses to malaria antigens and transmission heterogeneity in longitudinal studies of malaria immunity. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 242, 2009.

KOCHAR, D. K.; TANWAR, G. S.; AGRAWAL, R.; KOCHAR, S.; TANWAR, G.; FALODIA, S. K.; KOCHAR, A.; MIDDHA, S.; KOCHAR, S. K. Platelet count and parasite density: independent variable in *Plasmodium vivax* malaria. **J Vector Borne Dis**, v.49, n.3, p.191-192, 2012.

KOCHAR, D. K.; DAS, A.; KOCHAR, A.; MIDDHA, S.; ACHARYA, J.; TANWAR, G. S.; GUPTA, A.; PAKALAPATI, D.; GARG, S.; SAXENA, V.; SUBUDHI, A. K.; BOOPATHI, P. A.; SIROHI, P.; KOCHAR, S. K. Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). **Platelets**, v.21, n.8, p.623-627, 2010.

KOEHLER, J. W.; BOLTON, M.; ROLLINS, A.; SNOOK, K.; DEHARO, E.; HENSON, E.; ROGERS, L.; MARTIN, L. N.; KROGSTAD, D. J.; JAMES, M. A.; RICE, J.; DAVISON, B.; VEAZEY, R. S.; PRABHU, R.; AMEDEE, A. M.; GARRY, R. F.; COGSWELL, F. B. Altered Immune Responses in Rhesus Macaques Co-Infected with SIV and *Plasmodium cynomolgi*: An Animal Model for Coincident AIDS and Relapsing Malaria. **PLoS ONE**, v.4, n.9, p.e7139, 2009.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoites and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 1-11, 1985.

LACERDA, M. V. G. **Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária**. 2007. 344f (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

LACERDA, M. V.; MOURAO, M. P.; COELHO, H. C.; SANTOS, J. B. Thrombocytopenia in malaria: who cares? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106 Suppl 1, p.52-63, 2011.

LACERDA, M.; MOURAO, M.; ALEXANDRE, M.; SIQUEIRA, A.; MAGALHAES, B.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.; SANTANA FILHO, F.; BRASIL, P.; VENTURA, A.; TADA, M.; COUTO, V.; SILVA, A.; SILVA, R.; ALECRIM, M. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v.11, n.1, p.12, 2012.

LANGHORNE, J.; CROSS, C.; SEIXAS, E.; LI, C.; VON DER WEID, T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc**, v. 95, n.4, p.1730-4, 1998.

LANGHORNE, J.; QUIN, S. J.; SANNI, L. A. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines in protection and pathology. **Chem Immunol**, v. 80, p. 204-228, 2002.

LANGHORNE, J.; ALBANO, F. R.; HENSMANN, M.; SANNI, L.; CADMAN, E.; VOISINE, C.; SPONAAS, A. M. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. **Immunol Rev**, v.201, p.35-47, Oct 2004.

LANGHORNE, J.; NDUNGU, F. M.; SPONAAS, A. M.; MARSH, K. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat Immunol**, v.9, n.7, p.725-732, 2008.

LAUZURICA, P.; SANCHO, D.; TORRES, M.; ALBELLA, B.; MARAZUELA, M.; MERINO, T.; BUEREN, J. A.; MARTINEZ, A. C.; SANCHEZ-MADRID, F. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. **Blood**, v.95, n.7, p.2312-2320, 2000.

LEE, H. K.; LIM, J.; KIM, M.; LEE, S.; OH, E. J.; LEE, J.; OH, J.; KIM, Y.; HAN, K.; LEE, E. J.; KANG, C. S.; KIM, B. K. Immunological alterations associated with *Plasmodium vivax* malaria in South Korea. **Ann Trop Med Parasitol**, v.95, n.1, p.31-39, 2001.

LEE, K-S.; DIVIS, P. L. C. S.; ZAKARIA, S. K.; MATUSOP, A.; JULIN, R. A.; CONWAY, D. J.; COX-SINGH, J.; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi*: Reservoir Hosts and Tracking the Emergence in Humans and Macaques. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 4, p. e1002015, 2011.

LI, C.; CORRALIZA, I.; LANGHORNE, J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. **Infect Immun**, v.67, n.9, p.4435-4442, 1999.

LI C, SANNI LA, OMER F, RILEY E, LANGHORNE J. Pathology of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies. **Infect Immun**. V. 71, n. 9, p. 4850-6, 2003.

LI, Z.; YANG, F.; DUNN, S.; GROSS, A. K.; SMYTH, S. S. Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. **Thromb Res**, v.127, n.3, p.184-188, Mar 2011.

LIM, H. W.; HILLSAMER, P.; BANHAM, A. H.; KIM, C. H. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. **J Immunol**, v.175, n.7, p.4180-4183, 2005.

LIMAYE, C. S.; LONDHEY, V. A.; NABAR, S. T. The study of complications of vivax malaria in comparison with falciparum malaria in Mumbai. **J Assoc Physicians India**, v.60, p.15-18, 2012.

LINKE, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; HONARVAR, N.; LI, C.; LANGHORNE, J. *Plasmodium chabaudi chabaudi*: differential susceptibility of gene-targeted mice deficient in IL-10 to an erythrocytic-stage infection. **Exp Parasitol**, v.84, n.2, p.253-263, 1996.

LIU, Y.; JANEWAY, C. A., JR. Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. **J Exp Med**, v.172, n.6, p.1735-1739, 1990.

LOU, J.; DONATI, Y. R.; JUILLARD, P.; GIROUD, C.; VESIN, C.; MILI, N.; GRAU, G. E. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. **Am J Pathol**, v.151, n.5, p.1397-1405, 1997.

LUTY, A. J. F.; PERKINS, D. J.; LELL, B.; SCHMIDT-OTT, R.; LEHMAN, L. G.; LUCKNER, D.; GREVE, B.; MATOUSEK, P.; HERBICH, K.; SCHMID, D.; WEINBERG, J. B.; KREMSNER, P. G. Low Interleukin-12 Activity in Severe *Plasmodium falciparum* Malaria. **Infection and immunity**. v. 68, n. 7, 2000.

LUZZATTO, L.; NWACHUKU-JARRETT, E.S.; REDDY, S. Increased sickling of parasitized erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. **The Lancet**, n.1, 1970.

MAVOUNGOU, E. ; LUTY, A.J. ; KREMSNER, P.G. Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. **Eur Cytokine Netw**, v.14, n.3, p.134-142, 2003.

MCCALL M. B.; NETEA, M. G.; HERMSEN, C.C.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; GOLENBOCK, D.; VAN DER VEN, A.J.; SAUERWEIN, R.W. *Plasmodium*

falciparum Infection Causes Proinflammatory Priming of Human TLR Responses **The Journal of Immunology**, n.179, p.162–171, 2007.

MEDING, S. J.; LANGHORNE, J. CD4+ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **Europe Journal of Immunology**, v.21, n.6, p.1433-1438, 1991.

MEHMOOD, A.; EJAZ, K.; AHMED, T. Severity of *Plasmodium vivax* malaria in Karachi: a cross-sectional study. **J Infect Dev Ctries**, v.6, n.9, p.664-670, 2012.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673-679, 2002.

MINIGO, G. ; WOODBERRY, T. ; PIERA, K.A. ; SALWATI, E. ; TJITRA, E. ; KENANGALEM, E. ; PRICE, R.N. ; ENGWERDA, C.R. ; ANSTEY, N.M. ; PLEBANSKI, M. Parasite-Dependent Expansion of TNF Receptor II–Positive Regulatory T Cells with Enhanced Suppressive Activity in Adults with Severe Malaria. **PLoS Pathog**, v.5, n.4, p.e1000402, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde auxilia Moçambique a combater malária**, 2006. Disponível em: <http://www.abcdbrasil.org.br/noticias/Sa%FAde%20auxilia%20Mo%E7ambique%20a%20combater%20mal%E1ria.htm>. Acessado em: 17 de jun. de 2008.

MIRGHANI, H. A.; ELTAHIR, H. G.; TM, A. E.; MIRGHANI, Y. A.; ELBASHIR, M. I.; ADAM, I. Cytokine profiles in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria in an area of unstable malaria transmission in central Sudan. **J Trop Pediatr**, v.57, n.5, p.392-395, 2011.

MIYAKODA, M.; KIMURA, D.; YUDA, M.; CHINZEI, Y.; SHIBATA, Y.; HONMA, K.; YUI, K. Malaria-Specific and Nonspecific Activation of CD8+ T Cells during Blood Stage of *Plasmodium berghei* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 1420-1428, July 15, 2008.

MOHANTY, D.; MARWAHA, N.; GHOSH, K.; SHARMA, S.; GAREWAL, G.; SHAH, S.; DEVI, S.; DAS, K. C. Functional and ultrastructural changes of platelets in malarial infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.82, n.3, p.369-375, 1988.

MOORE, S. A.; SURGEY, E. G. E.; CARDWGAN, A. M. Malaria Vaccines: where are we and where are we going?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 737-743, 2002.

MORROT, A.; ZAVALA, F. Effector and memory CD8+ T cells as seen in immunity to malaria. **Immunol Rev**, v.201, p.291-303, 2004.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1123-1128, 2001.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRÍGUEZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141-4, 2001.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; TOSTA, C. E. The pathological bases of immunomodulatory therapy in malaria. **Antibiotiques**, v.9, n.3, p.164-172, 2007.

NEWMAN, P. J.; BERNDT, M. C.; GORSKI, J.; WHITE, G. C., 2ND; LYMAN, S.; PADDOCK, C.; MULLER, W. A. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. **Science**, v.247, n.4947, p.1219-1222, 1990.

OMER, F. M.; RILEY, E. M. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. **J Exp Med**, v.188, n.1, p.39-48, 1998.

OMER, F. M.; DE SOUZA, J. B.; CORRAN, P. H.; SULTAN, A. A.; RILEY, E.M. Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1817-27, 2003.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 1475-2875. 2010.

PARK, J. W.; PARK, S. H.; YEOM, J. S.; HUH, A. J.; CHO, Y. K.; AHN, J. Y.; MIN, G. S.; SONG, G. Y.; KIM, Y. A.; AHN, S. Y.; WOO, S. Y.; LEE, B. E.; HA, E. H.; HAN, H. S.; YOO, K.; SEOH, J. Y. Serum cytokine profiles in patients with Plasmodium vivax malaria: a comparison between those who presented with and without thrombocytopenia. **Ann Trop Med Parasitol**, v.97, n.4, p.339-344, 2003.

PATEL, U.; GANDHI, G.; FRIEDMAN, S.; NIRANJAN, S. Thrombocytopenia in malaria. **J Natl Med Assoc**, v.96, n.9, p.1212-1214, 2004.

PERKINS, D. J.; WERE, T.; DAVENPORT, G. C.; KEMPAIAH, P.; HITTNER, J.B.; ONG'ECHA, J.M. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. **International Journal Biology Science**, v. 7, n. 9, p. 1427-42, 2011.

PLEBANSKI, M.; FLANAGEN, K. L.; LEE, E. E. M.; REECE, W. H. H; HART, K.; GELDER, C.; GILLESPIE, G.; PINDER, M.; HILL, A. V. S. Interleukin 10 Mediated Immunosuppression by a Variant CD4 T Cell Epitope of Plasmodium falciparum. **Immunity**, v. 10, n. 6, p. 651-660, 1999.

POESPOPRODJO, J. R.; FOBIA, W.; KENANGALEM, E.; LAMPAH, D. A.; WARIKAR, N.; SEAL, A.; MCGREADY, R.; SUGIARTO, P.; TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; PRICE, R. N. Adverse pregnancy outcomes in an area where multidrug-resistant plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections are endemic. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 9, p.1374-81, 2008.

POMBO, D.J. ; LAWRENCE, G. ; HIRUNPETCHARAT, C. ; RZEPCZYK, C. ; BRYDEN, M. ; CLOONAN, N. ; ANDERSON, K. ; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y. ; MARTIN, L.B. ; WILSON, D. ; ELLIOTT, S. ; EISEN, D.P. ; WEINBERG, J.B. ; SAUL, A. ; GOOD, M.F. Immunity to malaria after administration of ultra-low

doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **Lancet**, v.360, n.9333, p.610-617, 2002

QUEIROZ, S. S. E TORRES, M. A. A. Anemia ferropriva na infância. **Jornal de Pediatria**. v. 76, Supl. 3, 2000.

RAPOSO, C. C.; SANTOS, J. B.; DOS SANTOS, G. M.; GONCALVES EDA, G.; DA SILVA, A. R. *Plasmodium vivax* malaria: related factors to severity in the State of Maranhao, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.46, n.1, p.67-72, 2013.

REYES-SANDOVAL, A.; WYLLIE, D. H.; BAUZA, K.; MILICIC, A.; FORBES, E. K.; ROLLIER, C. S.; HILL, A. V. CD8+ T effector memory cells protect against liver-stage malaria. **J Immunol**, v.187, n.3, p.1347-1357, 2011.

RILEY, E. M. WAHL, S.; PERKINS, D.J.; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunology**, n, 1-2, p.35-49, 2006.

RODULFO, H.; DE DONATO, M.; QUIJADA, I.; PEÑA, A. High prevalence of malaria infection in Amazonas State, Venezuela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 79-85, 2007.

ROESTENBERG, M. ; MCCALL, M. ; HOPMAN, J. ; WIERSMA, J. ; LUTY, A.J.F. ; VAN GEMERT, G.J. ; VAN DE VEGTE-BOLMER, M. ; VAN SCHAIJK, B. ; TEELLEN, K. ; ARENS, T. ; SPAARMAN, L. ; DE MAST, Q. ; ROEFFEN, W. ; SNOUNOU, G. ; RÉNIA, L. ; VAN DER VEN, A. ; HERMSEN, C.C. ; SAUERWEIN, R. Protection against a Malaria Challenge by Sporozoite Inoculation. **New England Journal of Medicine**, v.361, n.5, p.468-477, 2009

ROGERS, P. R.; DUBEY, C.; SWAIN, S. L. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. **J Immunol**, v.164, n.5, p.2338-2346, 2000.

SCHMIDT, N. W.; BUTLER, N. S.; BADOVINAC, V. P.; HARTY, J. T. Extreme CD8 T Cell Requirements for Anti-Malarial Liver-Stage Immunity following Immunization with Radiation Attenuated Sporozoites. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 7, p. e1000998, 2010.

SCHWENK, R. J.; RICHIE, T.L. Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. **Trends Parasitology**, n. 7, p.306-14, 2011.

SILVA, T. L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. C. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, n. 77, p. 32 – 40, 2004.

SNOUNOU, G. E SINGH, B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. **Methods Mol Med**, n. 72, p. 189-203, 2002.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. Fisiologia do sangue. in: **Fundamentos da Circulação Extracorpórea**. p. 103-138. Rio de Janeiro: Ed. Alfa Rio, 2006, p.796.

SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. Cerebral Malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 291-300, 2002.

SPENCE, P. J.; LANGHORNE, J. T cell control of malaria pathogenesis. **Curr Opin Immunol**, v.24, n.4, p.444-448, 2012.

SPRENT, J. Immunological memory. **Curr Opin Immunol**, v.9, n.3, p.371-379, Jun 1997.

STEVENSON M. M.; ING, R.; BERRETTA, F.; MIU, J. Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: role of dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. **International Journal Biology Science**, v.7, n.9, p.1311-22, 2011.

TAVARES, A. A.S.; TAVARES, J. M. R. S. Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante. **Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto - FEUP**. Jul. de 2009.

TAYLOR, W, R. J.; WIDJAJA, H.; BASRI, H.; OHRT, C.; TAUFIK, T.; TJITRA, E.; BASO, S.; FRYAUFF, D.; HOFFMAN, S. L.; RICHIE, T. L. Changes in the total leukocyte and platelet counts in Papuan and non-Papuan adults from northeast Papua infected with acute *Plasmodium vivax* or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Malaria Journal**, n. 7, p. 259, 2008.

TEIRLINCK, A. C.; MCCALL, M. B. B.; ROESTENBERG, M.; SCHOLZEN, A.; WOESTENENK, R.; DE MAST, Q.; VAN DER VEN, A. J. A. M.; HERMSEN, C. C.; LUTY, A. J. F.; SAUERWEIN, R. W. Longevity and Composition of Cellular Immune Responses Following Experimental *Plasmodium falciparum* Malaria Infection in Humans. **PLoS Pathog**, v.7, n.12, p.e1002389, 2011.

TESTI, R.; PULCINELLI, F.; FRATI, L.; GAZZANIGA, P. P.; SANTONI, A. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. **J Exp Med**, v.172, n.3, p.701-707, 1990.

TJITRA, E.; ANSTEY, N. M.; SUGIARTO, P.; WARIKAR, N.; KENANGALEM, E.; KARYANA, M.; LAMPAH, D. A.; PRICE, R. N. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Med**. n. 5, 2008.

TODRYK, S.M. ; BEJON, P. ; MWANGI, T. ; PLEBANSKI, M. ; URBAN, B. ; MARSH, K. ; HILL, A.V.S. ; FLANAGAN, K.L. Correlation of Memory T Cell Responses against TRAP with Protection from Clinical Malaria, and CD4⁺ CD25^{high} T Cells with Susceptibility in Kenyans. **PLoS One**, v.3, n.4, p.e2027, 2008.

VAN DEN STEEN, P.E. ; DEROOST, K. ; VAN AELST, I. ; GEURTS, N. ; MARTENS, E. ; STRUYF, S. ; NIE, C.Q. ; HANSEN, D.S. ; MATTHYS, P. ; VAN DAMME, J. ; OPDENAKKER, G. CXCR3 determines strain susceptibility to

murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur J Immunol*, v.38, n.4, p.1082-1095, 2008.

VENTURA, A. M. R. S. **Anemia da malária por *Plasmodium vivax*: estudo clínico e laboratorial em crianças e adolescentes**. 2010. 157f. (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010.

WALTHER, M.; WOODRUFF, J.; EDELE, F.; JEFFRIES, D.; TONGREN, J.E.; KING, E.; ANDREWS, L.; BEJON, P.; GILBERT, S.C.; DE SOUZA, J.B.; SINDEN, R.; HILL, A.V.; RILEY, E. M. Innate Immune Responses to Human Malaria: Heterogeneous Cytokine Responses to Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Correlate with Parasitological and Clinical Outcomes. **The Journal of Immunology**, n. 177: p. 5736–5745, 2006.

WALTHER, M.; JEFFRIES, D.; FINNEY, O. C.; NJIE, M.; EBONYI, A.; DEININGER, S.; LAWRENCE, E.; NGWA-AMAMBUA, A.; JAYASOORIYA, S.; CHEESEMAN, I. H.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; OKEBE, J.; CONWAY, D. J.; RILEY, E. M. Distinct Roles for FOXP3+ and FOXP3² CD4+ T Cells in Regulating Cellular Immunity to Uncomplicated and Severe Plasmodium falciparum Malaria. **PLoS Pathogens**. v. 5, n. 4, 2009.

WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med**, v.344, n.14, p.1058-1066, 2001

WEATHERALL D.J.; MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K.; CASALS-PASCUAL, C.; ROBERTS, D. J. Malaria and the red cell. **Hematology**. 2002.

WEATHERALL, D. J.; MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K.; CASALS-PASCUAL, C.; ROBERTS, D. J. Malaria and the red cell. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.35-57, 2002.

WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H. Blood and bone marrow changes in malaria. **Baillieres Best Pract Res Clin Haematol**, v.13, n.2, p.277-299, Jun 2000.

WIPASA, J.; OKELL, L.; SAKKHACHORNPHOP, S.; SUPHAVILAI, C.; CHAWANSUNTATI, K.; LIEWSAREE, W.; HAFALLA, J. C.; RILEY, E. M. Short-lived IFN-gamma effector responses, but long-lived IL-10 memory responses, to malaria in an area of low malaria endemicity. **PLoS Pathog**, v.7, n.2, p.e1001281, 2011.

WHO. World Health Organization. **World Malaria Report**, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html>.

WHO. World Health Organization. **World Health Statistics**, 2011. Disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2011_Full.pdf

WHO, World Health Organization. Iron Deficiency Anemia. Assessment, prevention and control. **A guide for programme managers**, 2001.

WHO. World Health Organization. Severe falciparum malaria. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, n. 94, 2000.

XU, H.; WIPASA, J.; YAN, H.; ZENG, M.; MAKOBONGO, M. O.; FINKELMAN, F. D.; KELSO, A.; GOOD, M. F. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. **J Exp Med**, v.195, n.7, p.881-892, 2002.

YAZDANI, S. S.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S.; CHITNIS, C.E. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. **Current Molecular Medicine**, v. 6, p.187-2003, 2006.

APÊNDICE 1

1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome (Paciente):
 Documento de Identidade:
 Endereço: CEP:
 Cidade: Estado..... Fone:.....

2. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

2.1 **Título:** Estudo da biologia de *Plasmodium vivax*: imunopatogênese, citoadesão e invasão.

2.2 **Investigador Principal:** Dr Marcus Vinicius Guimarães Lacerda

2.3 **Colaboradores:** MSc Stefanie Costa Pinto Lopes, Dra. Letusa Albrecht, Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa, Yury Chaves, Dr. Paulo Afonso Nogueira.

3. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “**Estudo da biologia de *Plasmodium vivax*: imunopatogênese, citoadesão e invasão**” na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Brasil. Você foi selecionado por ter visitado a FMT-HVD, hospital de referência para o tratamento da malária em Manaus, e apresentar essa doença. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Instituição. O acompanhamento da sua doença e tratamento continuará sendo realizado independentemente de você estar na pesquisa ou não.

A cidade de Manaus apresenta, anualmente, um grande número de pessoas acometidas com malária vivax e algumas dessas pessoas apresentam complicações decorrentes da doença. Pouco se sabe a respeito da biologia do parasita causador da malária, sua patogênese e a resposta imune envolvida durante a infecção. Esse estudo tem como objetivo entender melhor a biologia do *Plasmodium vivax*, um dos parasitas causadores da malária sendo o mais frequente em nossa região, e assim ajudar a compreender os mecanismos por trás da doença malária.

Você não precisa fazer qualquer coisa especial para participar desse projeto e receberá o mesmo tratamento e acompanhamento estabelecido pelo Ministério da Saúde. Como parte desse estudo nós coletaremos uma amostra de sangue (cerca de 15 ml) através da punção da veia do antebraço (venopunção) feita por técnico de saúde da equipe.

Você pode sentir alguma dor ou desconforto por causa da coleta da amostra de sangue. Mas qualquer dor deve durar poucos instantes. A amostra de sangue coletada é muito pequena e não representa nenhum risco à sua saúde. O benefício em estar participando deste estudo será o aumento de informações sobre malária vivax e você não receberá nenhum incentivo financeiro para esse estudo.

Se você concordar em participar, todas as informações coletadas serão confidenciais, usadas somente no estudo. Nós não compartilharemos suas informações e não tornaremos público qualquer detalhe sobre você.

4. CONTATO

Se você tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim se você desejar esclarecer suas dúvidas sobre a pesquisa, sinta-se a vontade para contatar o pesquisador principal do projeto Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda na Fundação de Medicina Tropical, situada no endereço Avenida Pedro Teixeira, nº25, Bairro Dom Pedro e telefone (92) 3656 0620. O endereço do comitê de ética em pesquisa da FMT-HVD (que é grupo de pessoas que avaliam este projeto e acompanham a pesquisa) é o mesmo acima e o telefone

para contato é (92) 2127 3432. O presidente deste comitê é o Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira.

5. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que recebi a explicação de que serei um dos participantes dessa pesquisa e entendo todas as suas etapas e objetivos. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento.

E por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresso meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

Assinatura do participante

____/____/____
Data

____/____/____
Nome do entrevistador
Data

Assinatura do entrevistador

APÊNDICE 2

Questionário epidemiológico

Dados do paciente:

1. Nome: _____

2. Sobrenome: _____

3. Data de nascimento (dd/mm/aa): ____/____/____ Idade (em anos): ____

4. Sexo (1= Homem, 2=Mulher): __

5. Residência:

Bairro: _____

Cidade: _____ Estado: ____

6. Tempo de residência nesse local (em anos): ____

Dados malária:

7. Malária (1=vivax, 2=falciparum, 3=malariae, 99= NA): ____

8. Parasitemia (1= <+/2, 2= +/2, 3= +, 4= ++, 5= +++): __

9. Foi diagnosticado com malária anteriormente (1=sim, 2=não): __

Se a resposta for sim:

10. Episódios anteriores de malária: ____ 11. No último ano (99=NA):

12. Data da última infecção malárica (mm/aa): ____/____

13. Tomou medicação antimalárica no último mês (1=sim, 2=não): __

14. Sintomas (1=sim, 2=não)

Febre __ Calafrio __ Cefaléia __ Dor abdominal __ Diarréia __

Vômitos __

APÊNDICE 5

Papel das células *Natural Killers* em infecções maláricas¹

Chaves, Y. O.²; Corado, A. L. G.³ e Nogueira, P.A.⁴

Resumo

A malária é um problema crucial de saúde pública, sendo a terceira doença infecciosa mais prevalente no mundo, atrás apenas para a AIDS e a Tuberculose. O agente etiológico é o protozoário do gênero *Plasmodium* transmitido pela picada de um mosquito. A complexidade no ciclo de vida do parasito causador de malária torna-se uma dificuldade no entendimento dos mecanismos imunes, já que o parasito desenvolveu escape a respostas imunes do hospedeiro. Desta forma, compreender a resposta imunológica aos agentes causadores de malária é fundamental para entender a patogênese e assim contribuir ao desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas. Uma das células envolvidas com a resposta aos protozoários causadores de malária são as *Natural Killers* (NK). Estas células são tidas como linfócitos da imunidade inata, distribuídas amplamente pelos tecidos linfóides e não linfóides, caracterizadas pela expressão em sua superfície de CD56 e com função de lise celular e produção de citocinas. Esta revisão busca descrever e discutir o papel das células NK em infecções maláricas, mostrando a importância das mesmas em secretar várias citocinas como TNF- α , IL-8, e em especial IFN- γ .

Palavras-Chave: malária, célula *natural killer*, IFN- γ , imunidade,

Abstract

Malaria is one of the major problem of public health, is the third most prevalent infectious disease in the world, behind only to AIDS and Tuberculosis. The causative agent is the protozoan of the genus *Plasmodium* transmitted by the bite of a mosquito. The complexity of the life cycle of the parasite that causes malaria, becomes a difficulty to understand the immune mechanisms, since the parasite has developed to escape host immune responses. Thus, understanding the immune response to the causative agents of malaria is crucial for understanding the pathogenesis and can give a new direction to the development of new drugs and vaccines. One of the cells involved in the response to the protozoa are the Natural Killers (NK). These cells are considered lymphocytes of innate immunity, distributed widely by lymphoid and non-lymphoid tissues, characterized by the expression of CD56 on their surface, and function of cell lysis and cytokine production. This review aim to describe and discuss the role of NK cells in malaria infections, showing their importance to secrete various cytokines such as TNF- α , IL-8, and in particular IFN- γ .

Key words: malaria, natural killer cell, IFN- γ , immunity,

1 Introdução

Aproximadamente 1 milhão de pessoas morrem por ano em decorrência da malária (SCHMIDT *et al.*, 2010) e em consequência ao grande número de casos, como os cerca de 216 milhões registrados em 2010, a malária ainda é um problema crucial de saúde pública (MIYAKODA *et al.*, 2008), sendo a terceira doença infecciosa mais prevalente no mundo, perdendo apenas para a AIDS e a Tuberculose (WHO, 2011; WHO, 2010).

A complexidade no ciclo de vida do parasito causador de malária torna-se uma dificuldade no entendimento das respostas inatas e adaptativas, já que o parasito desenvolveu ao longo do tempo escape as respostas imunes, corroborando para seu estabelecimento no hospedeiro (DAVID *et al.*, 1988; FERREIRA *et al.*, 2004). Desta forma, compreender a resposta imunológica aos agentes causadores da malária é fundamental para entender a patogênese e assim o desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas.

7.1 Malária

O agente etiológico desta doença é um protozoário do gênero *Plasmodium* (espécies endêmicas no Brasil são *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *P. maláriae*), transmitido ao homem pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* (BRASIL, 2009). Estes protozoários são parasitas intracelulares obrigatórios que infectam e destroem células, em especial os hepatócitos e os eritrócitos durante a fase assexuada, com período de incubação entre 7 a 14 dias (ASHLEY *et al.*, 2006).

O ciclo de vida do parasita compreende duas fases: a fase assexuada acontece no homem quando o *Anopheles* contaminado com esporozoítos inocula a substância salivar

composta por repasto sanguíneo, nela os esporozoítos são levados pela corrente sanguínea para o fígado, onde invadem os hepatócitos dando início a fase tecidual ou fase pré-eritrocítica (MILLER *et al.*, 2002). Nesta fase os esporozoítos sofrem sucessivas divisões esquizogônicas as quais acabam por romper os hepatócitos liberando na corrente sanguínea grande quantidade do protozoário, que passa a ser chamado merozoíto (KROTOSKI, 1985). Após esta liberação, inicia-se a fase eritrocítica da doença, onde os merozoítos invadem os eritrócitos e passam por sucessivas divisões celulares (esquizogonia), que geram grandes quantidades de novos protozoários rompem a membrana das hemácias liberando mais formas infectantes (HVIID, 1998). Durante o ciclo eritrocítico alguns protozoários se diferenciam em gametócitos, estes são ingeridos pelo mosquito, passando para fase sexuada da doença (BRUCE *et al.*, 1990; SOUZA & RILEY, 2002). A fase sexuada da doença acontece dentro do mosquito fêmea, precisamente no intestino do mosquito, onde os gametócitos diferenciam-se e formam um ovo móvel, chamado de oocineto, que migra até a parede intestinal do mosquito atravessando-a formando o oocisto. Este sofrerá processos de divisão que irá formar os esporozoítos, as formas infectantes do parasito, que posteriormente romperão o oocisto e migrarão até a glândula salivar do mosquito para serem inoculados através da proboscídea do *Anopheles* (BRUCE *et al.*, 1990; MOORE *et al.*, 2002; MOTA & RODRIGUEZ, 2001).

A malária pode causar em indivíduos infectados episódios de calafrios, febre (temperatura corpórea igual ou superior a 40°C) e sudorese, podendo acontecer também mialgia, náuseas e vômitos (BRASIL, 2009). Existe ainda a forma grave da doença, com sintomas que incluem alteração da consciência (malária cerebral), convulsões, hipotensão arterial ou choque, hemorragias, icterícia, hemoglobinúria, anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, insuficiência renal e hiperparastemia

(CHALANDON & KOCHER, 2000; GOMES *et al.*, 2011).

7.2 Imunidade a Malária

Após a picada do mosquito infectado no hospedeiro, os esporozoítos que possuem tropismo pelos hepatócitos, migram para o fígado. Alguns esporozoítos são reconhecidos e fagocitados pelas células de *Kupffer* (KC), que irão se dirigir para o linfonodo mais próximo onde apresentarão fragmentos de antígeno para células T *naive* pela ligação com MHC Classe II (GOOD & DOOLAN, 2010; SCHWENK & RICHIE, 2011). Para a modulação de uma resposta efetiva a essa infecção, células dendríticas irão produzir IL-12 que direciona para um perfil de resposta imune Th1, culminando nas secreções de IL-2 e IFN- γ , promovendo a proliferação e a ativação de linfócitos T citotóxicos que migrarão para os locais infectados (BELNOUE *et al.*, 2008). Alguns estudos em camundongos mostram que células NK ao produzirem IFN- γ recrutam células T para o cérebro contribuindo para a malária cerebral (HANSEN *et al.*, 2007; RILEY *et al.*, 2006; VAN DEN STEEN *et al.*, 2008). A ativação dos linfócitos T citotóxicos resulta na produção e secreção de perforinas e granzimas que irão promover a morte da célula infectada, além de IFN- γ que auxilia na ativação de outras células e aumento da expressão de MHC de classe I (FERREIRA *et al.*, 1986; GOOD, 2005; HOFFMAN *et al.*, 1989). Outras células também desempenham a função citotóxica no auxílio da destruição de células infectadas, dentre elas células NKT, Linfócitos T- $\gamma\delta$ (SCHWENK & RICHIE, 2011).

Estudos como os de Andrade *et al.* (2010) contribuem para o entendimento da relação gravidade da doença e produção de citocinas, pois como é mostrado, pacientes que possuem quadro clínico grave apresentam aumentados os níveis de citocinas pró-inflamatórias em contra partida os que não apresentam esse quadro

clínico (assintomáticos) apresentam aumentados os níveis de IL-10, citocina supressora de resposta pró-inflamatórias desta forma para que não haja uma exacerbação das respostas pró-inflamatórias, causando dano tecidual prejudicial ao hospedeiro, células T reguladoras são ativadas produzindo IL-10 que suprime as respostas de células T efetoras (SCHWENK & RICHIE, 2011; TODRYK *et al.*, 2008). No estudo de MINIGO *et al.* (2009) é visto que essas subpopulações de T reguladoras possuem relação com a gravidade da infecção causada pelo protozoário causador da malária. A fase eritrocitária caracterizada pela liberação de merozoítos na corrente sanguínea e posterior entrada do mesmo nos eritrócitos é um alvo potencial para as respostas imunes (LANGHORNE *et al.*, 2002). O parasita quando dentro do eritrócito passa a expressar na superfície dos mesmos, algumas de suas próprias proteínas, as quais são reconhecidas pela molécula CD36 de células fagocíticas e pelos receptores do tipo *Toll-like* (TLRs (Toll 4, Toll 2)) (COBAN *et al.*, 2007; ERDMAN *et al.*, 2009). Além disso, ao romper o eritrócito ocorre liberação de hemozoína que pode ser reconhecido via receptores do tipo *Toll* presentes nas células do sistema imune inato (AUGUSTINE *et al.*, 2009; PERKINS *et al.*, 2011).

Um dos quadros clínicos comuns na malária, é a febre, que acontece indiretamente devido liberação de moléculas derivadas do parasita decorrente da ruptura dos eritrócitos, tal evento estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ e citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β por células do sistema imune (FAU *et al.*; FERNANDES *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2004; RILEY *et al.*, 2006). A resposta pró-inflamatória inicial durante a malária parece ter um papel crucial no desenvolvimento da malária cerebral e anemia (FERNANDES *et al.*, 2008; WALTHER *et al.*, 2006). Segundo os estudos de Andrade *et al.* (2010), existe um equilíbrio de citocinas como IFN- γ , TNF α e IL-10 para o desenvolvimento de formas não graves da doença, porém o

desequilíbrio entre elas poderá promover um estado assintomático ou gravidade da doença.

Algumas citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α vem sendo relatadas como principais responsáveis por quadros clínicos graves quando apresentadas em altas quantidades, podendo causar danos ao hospedeiro comprometendo órgãos e destruindo células (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009; HVIID, 1998). Por outro lado, citocinas como TGF- β e IL-10 possuem a ação de inibidores dos efeitos patológicos que podem vir a ser manifestadas pela exacerbação das respostas pró-inflamatórias, como nas manifestações causada pela malária cerebral e anemia grave (OMER *et al.*, 2003; YAZDANI *et al.*, 2006). Para BUENO *et al.* (2010), a produção de IL-10 e TGF- β (citocinas antagonistas/supressoras de IFN- γ e TNF- α) por células T-reguladoras possui papel importantíssimo no desenvolvimento do controle da parasitemia, entretanto deve haver uma regulação exata, já que a alta produção de citocinas regulatórias também pode ser prejudicial às ações de erradicação do parasita, não havendo resposta forte suficiente para eliminação do patógeno (ANDRADE *et al.*, 2010).

A resposta imune adaptativa é indispensável para o controle de infecções por parasitas. Observa-se uma forte tendência dos linfócitos para a produção de IFN- γ (ROESTENBERG *et al.*, 2009). Essa produção estimula a produção de NO (Óxido Nítrico) por monócitos, potencializando a resposta imune (GOOD & DOOLAN, 2010; POMBO *et al.*, 2002).

Uma das problemáticas nas infecções maláricas está na razão de que as hemácias não expressam MHC classe I e nem MHC classe II, estruturas importantes nos reconhecimento das células infectadas. Devido a isso a resposta humoral exerce um papel crucial nesse dilema imunológico da fase eritrocítica (LANGHORNE *et al.*, 2002).

Evidências mostram a interação de células TCD4⁺ Th1 com linfócitos B para a produção final de

anticorpos específicos que exercem eliminação eficiente do parasito durante a infecção tardia (LANGHORNE *et al.*, 2002; MEDING & LANGHORNE, 1991). Por exemplo, na primeira exposição ao antígeno pela infecção, os linfócitos B virgens após co-ativação com células T CD4⁺ efetoras se diferenciam em linfócitos B produtores de anticorpos (Plasmócitos). A classe de anticorpos IgM e IgG quando secretados por esses linfócitos B, opsonizam os estágios do parasita além de ativar o sistema complemento e neutralizam a invasão em outros eritrócitos. Esta neutralização, é um fenômeno que ocorre pelo reconhecimento de proteínas na superfície dos merozoíto pelos anticorpos opsonizantes, que é essencial para o controle da infecção por impedir o crescimento da densidade parasitaria, fenômeno descritos como inibição celular dependente de anticorpo (ADCI), (HIRUNPETCHARAT & GOOD, 1998).

Os anticorpos opsonizantes secretados em infecções maláricas, em especial as subclasses de IgG1 e IgG3 possuem a função citofílica pois se ligam a superfície do eritrócito infectado ou do patógeno, e sua porção Fc favorecem a fagocitose de células infectadas e parasitos (LANGHORNE *et al.*, 1998). Além do efeito opsonizante estas subclasses mediam a produção por óxido nítrico liberado por monócitos (BOUHAROUN-TAYOUN *et al.*, 1995; KINYANJUI *et al.*, 2009), assim como, participam da citotoxicidade dependente de anticorpos (ACCD) (DRUILHE *et al.*, 2005; JAFARSHAD *et al.*, 2007; LANGHORNE *et al.*, 1998; MAVOUNGOU *et al.*, 2003; MOORE *et al.*, 2002).

Em alguns casos pode acontecer a disputa de subclasses de IgG, as subclasses IgG2 e IgG4 que podem inibir as respostas citofílicas das IgG1 e IgG3 pela competição dos mesmos domínios desencadeando um desequilíbrio na resposta imune a malária colaborando para o escape do parasito (STEVENSON *et al.*, 2011).

Anticorpos secretados pelas células B podem também ativar a via clássica do sistema

complemento, resultando numa cascata proteolítica que culminará na lise da célula ou do patógeno (WALPORT, 2001).

7.3 Células *Natural Killer* (NK)

Uma das células envolvidas com a resposta aos protozoários causadores de malária, foi descoberta em 1972 por Thornthwaite & Leif, que descreveram a destruição proporcionada por algumas células do baço de camundongos quando em contato com hemácias de carneiro, estas células posteriormente em 1975 receberiam o nome de *Natural Killer* (NK) (THORNTHWAITE, 2012).

Apesar da ausência do complexo CD3 e de seus receptores não sofrerem rearranjo gênico, as células NK apresentam algumas características pertencentes aos linfócitos, principalmente quanto à morfologia e as mesmas possuem origem um progenitor comum aos linfócitos T (GALY *et al.*, 1995; LEIDEN *et al.*, 1988; RITZ *et al.*, 1985). Por essa razão, são tidas como linfócitos, apesar de serem pertencentes ao sistema imune inato, distribuídas amplamente pelos tecidos linfóides e não linfóides, caracterizadas pela expressão em sua superfície de CD56 e com função de lise celular e produção de citocinas (CALIGIURI, 2008; MORETTA *et al.*, 2002).

As células NK são classificadas quanto à densidade da proteína CD56 localizada na sua superfície e pela presença do receptor FcγIII (CD16) em: CD56^{dim}, mais citotóxicas, e CD56^{bright} que secreta grande quantidade de citocinas, em especial IFN-γ (COOPER, 2001). Aproximadamente 90% das células NK encontradas no sangue periférico são CD56^{dim}CD16⁺ e o restante é CD56^{bright}CD16⁻, ou seja, grande parte das NK encontradas no sangue periférico são citotóxicas enquanto uma pequena mas significativa porcentagem é produtora de IFN-γ. Acredita-se que células NK CD56^{bright} imaturas (Produtora de IFN-γ) podem se

diferenciar células NK CD56^{dim} (Citotóxica) (CHAN *et al.*, 2007).

Na superfície das células NK existem os receptores inibitórios e os receptores ativadores que atuam no reconhecimento de estruturas celulares, tais receptores desempenham papel fundamental na ativação da célula NK.

Os principais receptores inibitórios das células NK em humanos são o KIRs (*killer cell-like receptors*) que se ligam ao MHC classe Ia (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e o heterodímero CD94/NKG2A que liga ao MHC classe Ib (HLA-E) (COLONNA & SAMARIDIS, 1995; DORFMAN & RAULET, 1996; LANIER, 2008). Estes receptores reconhecem MHC Classe I nas células alvo, se estas não expressarem em sua superfície alguma molécula MHC classe I “*missing self*” que possa ser reconhecida pelos receptores inibitórios, o que acontece em células tumorais e células infectadas, a célula NK pode exercer seu efeito citotóxico e lisar a célula alvo caso sejam CD56^{dim} ou ainda podem produzir grandes quantidades de IFN-α e TNF-β, IL-10, IL-13, e GM-CSF caso sejam CD56^{bright} (ANFOSSI *et al.*, 2006; KARRE *et al.*, 1986; NATARAJAN *et al.*, 2002; TOWNSEND *et al.*, 1989).

Além de um estímulo ativador ou inibidor em um dos receptores de superfície da célula NK por interação com células T, células dendríticas, células infectadas ou macrófagos é necessário ainda um segundo sinal estimulatório provido por citocinas, como IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 e IFN-αβ presentes no microambiente (COOPER, 2004; VIVIER *et al.*, 2004).

A produção de citocinas pelas células NK como o IFN-γ é importante para direcionar uma resposta adaptativa eficiente, além disso, as mesmas podem provocar a lise celular ser mediada por exocitose de granzimas e perforinas (SMYTH *et al.*, 2005).

7.4 Mecanismos de ativação de células NK nas infecções maláricas

Na invasão, o merozoíto induz a exposição de várias moléculas na superfície dos eritrócitos resultando em alterações morfológicas que afetam a rigidez e permeabilidade celular (MARTI *et al.*, 2004; SMITH & CRAIG, 2005), devido a essas mudanças moleculares na superfície dos eritrócitos as células NK desempenham seu papel principal: Produção precoce de IFN- γ e atividade citotóxica (KORBEL *et al.*, 2004; SCHARTON-KERSTEN & SHER, 1997).

Para o reconhecimento das células infectadas pelo protozoário, as células NK dispõem de uma variedade de mecanismos que envolvem desde a ligação a porção Fc de anticorpos, nível de expressão de MHC I até nos caso de células que não expressam MHC I, fator que pode dificultar seu reconhecimento, as células NK reconhecem diretamente os eritrócitos infectados pela expressão de moléculas na superfície desses eritrócitos, como por exemplo, a proteína da membrana do eritrócito-1 - PfEMP, (AGUDELO *et al.*, 2012; ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003; KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005; RAZAKANDRAINIBE *et al.*, 2012; ROETYNCK *et al.*, 2006) graças a esse reconhecimento, as atividades de citotoxicidade são realizadas. Portanto, analisando a problemática frente à falta de expressão de MHC-I as células NK necessitam de outras células, moléculas de reconhecimento na sua superfície e citocinas para que haja a ativação e ação citotóxica (MCCALL & SAUERWEIN, 2010). Se as células alvo não têm ou expressam insuficientemente a molécula MHC de classe I, tal como ocorre durante a infecção eritrocítica, a atividade citotóxica ocorre. Essa atividade nas células NK ocorre principalmente após a ligação de células NK a células alvo e liberação de grânulos pré-formados contendo perforina e granzimas no espaço intracelular, levando à lise da célula alvo em poucos minutos (RUSSELL &

LEY, 2002). Alguns estudos também reportam a formação de rosetas, quando as células NK (linhagem NK92) se ligam a vários eritrócitos infectados, e isto ajuda na liberação de citocinas (BARATIN *et al.*, 2005).

A citotoxicidade mediada por anticorpo (ADCC) nas células NK ocorre mediante a ligação da porção Fc do anticorpo específicos ao receptor de membrana Fc γ RIII (CD16), estudos mostram que essa ativação de células NK parece se mais eficaz quando está na presença de ambos anticorpo e monócitos (MAVOUNGOU *et al.*, 2003). Outras moléculas estão envolvidas com essa atividade: O sFasL, forma solúvel do FasL (TANAKA *et al.*, 1995) expresso na superfície das células NK estão relacionados com os processo de lise celular e para a imunorregulação dessa atividade temos FasR (CD95) que funciona como inibidor do desenvolvimento de uma imunopatogênese (BERKE, 1997), Na malária estudos mostram um aumento do sFasL no soro de pacientes e essa produção está relacionada com a linfopenia contribuindo para os quadros clínicos de anemia em crianças (ISSIFOU *et al.*, 2003; KERN *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2000)

Estudos mostram que as células NK dependem das células T para sua ativação, pois experimentos, *in vitro*, onde a citocina IL-2, responsável pela sinalização das células NK ativadas por eritrócitos infectados quando colocada em contato com essas células não foi suficiente para sua ativação, destacando que além da sinalização de citocinas, há a necessidade da interação dos linfócitos T para que ocorra a ativação, e produção de citocina e consequente memória celular (NEWMAN *et al.*, 2006).

Quando purificadas, as células NK não apresentam ativação significativa (expressão do marcador de superfície CD69) mesmo na presença de antígenos (Eritrócitos infectados), só há um *up-regulation* se essas estiverem em contatos com outras células do sistema imune, confirmando assim que para sua ativação e produção de sinais pró-inflamatório é necessário

a interação com outras células (pDC e mDC) (NEWMAN *et al.*, 2006). Outros estudos mostram uma dinâmica celular das células NK em que para uma melhor ação efetiva e posterior produção de IFN, as células NK necessitam de células T e IL-2, contudo, *in vitro*, na ausência de células T as células NK mantêm algumas respostas a eritrócitos infectados o que não foi observado quando adicionado somente de IL-2 (MCCALL & SAUERWEIN, 2010).

Estudos relacionados a ação das células NK mostram que não necessariamente para que haja uma boa resposta imune contra malária, o indivíduo precisou ser infectado pelo parasito, pois as células NK de indivíduos que nunca foram infectados pelo parasito, se essas células forem postas em cultura na presença de eritrócitos infectados, há a ativação celular, produção de interferon além da produção de perforinas e granzimas, moléculas ligadas à atividade citotóxica. No mesmo estudo alguns indivíduos podem possuir fatores imunogenéticos que proporcionam uma resposta oriunda da célula NK mais forte, ou seja, otimizada, enquanto que alguns outros indivíduos podem apresentar uma resposta fraca frente ao antígeno (KORBEL *et al.*, 2005).

2 Metodologia

Para esta revisão de literatura sobre o papel da célula *Natural Killer* em infecções maláricas buscou-se publicações nas bases de dados eletrônicos PUBMED com as seguintes palavras: “*malaria and natural killer cells*”, “*malaria and innate immunity*”, “*natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens*”, “*Cellular response of malária*”, “*immune response of malária*” e “*natural killer cells*”. Do resultado da busca, foram selecionados 153 artigos publicados no período de 1985 a 2012.

3 Papeis das células NK nas fases iniciais das infecções maláricas e na produção de IFN- γ

O mecanismo principal da resposta imune inata para a maioria dos parasitas é a ativação de células especializadas na erradicação do patógeno, dentre elas, as células NK (ROLAND *et al.*, 2006).

A malária pode apresentar diversas formas clínicas, que é determinada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias, apresentando desde uma forma mais branda (não grave) e até uma forma mais severa (grave). Buscando entender o papel das células NK e conseqüentemente da produção de IFN- γ nas diferentes formas clínicas de malária, AGUDELO *et al.* (2012) encontraram que os pacientes com malária grave a produção de INF- γ por células NK é significativamente maior que em pacientes com malária não grave e nos controles. Em outro trabalho envolvendo casos de crianças com malária cerebral, uma manifestação clínica característica de malária grave, é caracterizada pela intensa circulação de TNF, IL-1b e IL-6 (KERN *et al.*, 1989), CABANTOUS *et al.* (2005) esse perfil de produção de citocina sugerem que o INF- γ tem ação protetiva contra formas mais graves da doença como por exemplo, a malária cerebral.

Estudos voltados a relação INF- γ e as manifestações clínicas não grave para malária vem sendo investigadas pois, a possibilidade de que esta citocina confira certa imunidade contra o parasito. D'OMBRAIN *et al.* (2008) mostraram que a produção prematura de altos níveis de INF- γ está associada com a proteção contra alta e moderada carga parasitária em infecções por *P.falciparum*. Outra observação importante e a proteção contra reinfeção que também pode estar relacionada com a produção de IFN- γ , LUTY

et al. (1999) apontam que a produção de IFN- γ por PMBC em resposta a antígenos de algumas formas do ciclo está associada significativamente com baixa taxa de reinfeções.

As células NK estão entre os primeiros linfócitos a atuar nas respostas imunes e são as principais fontes de IFN- γ em resposta aos eritrócitos infectados pelo plasmódio durante o estágio sanguíneo do protozoário, liberando também grande quantidade de grânulos tóxicos, além de vários sinalizadores químicos (TNF- α , CXCL8 – IL-8) (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003; ARTAVANIS-TSAKONAS & RILEY, 2002; BARATIN *et al.*, 2005); KORBEL *et al.*, 2004).

A intensa produção de IFN- γ é muito importante em infecções maláricas, pois confere em humanos e em camundongos resistência aos esporozoítos e formas hepáticas (DELORON *et al.*, 1991; FAVRE *et al.*, 1997). Em camundongos, as células NK recebem uma sinalização química pela produção de IL-12, e isto colabora para uma atividade pró-inflamatória, além disso, há também a atividade citotóxica contra eritrócitos infectados (DOOLAN & HOFFMAN, 1999) e indução da diferenciação de linfócitos *naive* em Th1, facilitando a expansão clonal de linfócitos T e maturação de células dendríticas, que conseqüentemente, potencializam a resposta imune ao parasita através da ativação de macrófagos e células dendríticas via IFN- γ , controlando a multiplicação e disseminação do parasito (GOOD & DOOLAN, 2010; STEVENSON *et al.*, 2011). A produção de IFN- γ , as atividades citotóxicas são um fator importante para a diminuição da parasitemia, uma vez que há uma correlação positiva entre elas, já nas primeiras horas (RIBEIRO-DIAS & TOSTA, 2006). Esta relação é vista em alguns estudos em humanos, que apontam a importância da produção IFN- γ tanto com o ciclo sanguíneo quanto com o ciclo tecidual, (ARTAVANIS-TSAKONAS & RILEY, 2002).

Um fator interessante do papel das células NK em infecções maláricas está na proporção celular e sua relação com a produção de IFN- γ . Em vias de

produção normal o IFN- γ é considerado um mediador pró-inflamatório e está associado com a resistência do hospedeiro à infecção pelo *Plasmodium falciparum*, dessa forma, é visto que em consequência ao reconhecimento dos eritrócitos infectados, as células NK apresentam seu papel nas infecções maláricas pela produção dessa citocina que estimula outras células do sistema imune para a atividade anti-parasitária pela produção de NO por células fagocíticas (JACOBS *et al.*, 1996; ROCKETT *et al.*, 1991).

Durante o ciclo eritrocítico há uma resposta inata para Pf-RBC que ativam diretamente as células NK levando a produção de CXCL8 (IL-8) e, recrutam outras células para o local de infecção através de uma colaboração específica com os macrófagos que ativam as células NK levando a produção IFN- γ que ativarão outras células e através do contato com as células infectadas realizarão as atividades citotóxicas, (BARATIN *et al.*, 2005), o IFN- γ pode ter relação com a manutenção dessas células, fazendo com que uma quantidade significativa permaneça na circulação sanguínea como produtora de IFN- γ (MCCALL *et al.*, 2010).

Outras citocinas (IL-2) também são necessárias para a ativação dessas células, a IL-8 que pode estar envolvida no recrutamento de outros tipos celulares, formas clínicas da doença e aumentam as respostas das NK a eritrócitos infectados (ANDRADE *et al.*, 2010; SCHOFIELD & GRAU, 2005; WALTHER *et al.*, 2006).

A produção de citocinas, seja regulatórias ou pró-inflamatórias, nas infecções maláricas pode influenciar no resultado final das respostas imunes, algumas delas então envolvidas com a patogênese da doença (RENIA *et al.*, 2006). Há uma forte importância no processo anti-parasitário pela produção precoce da citocina IFN- γ pelas células NK (STEVENSON *et al.*, 2011) e essa produção é essencial para ativação de outras células, mostrando a vital importância das células NK nas infecções maláricas (BARATIN *et al.*, 2005). Por outro lado a inibição da ativação

celular, o TGF- β atua como supressor celular e dependendo deste balanço a fase aguda da malária tenderia para controle da parasitemia com exacerbação da resposta inflamatória ou inverso (LAOUAR *et al.*, 2005; NEWMAN *et al.*, 2006). Esta dinâmica relacionada com a manutenção das populações de célula NK também pode ser observada quando são analisadas as porcentagens de outros linfócitos que produzem a mesma citocina, podendo supor que há uma interação entre esses linfócitos para manutenção das respostas imunes (MCCALL & SAUERWEIN, 2010). Estes dados recebem suporte dos estudos utilizando modelos de camundongos mostram que apesar dessas células constituírem uma menor porcentagem em relação a quantidade de linfócitos totais encontrados na corrente sanguínea, estas células são significantes para produção dessa citocina pró-inflamatória (MCCALL & SAUERWEIN, 2010) colaborando para a erradicação do parasito.

4 Conclusão

A resposta imune contra o *Plasmodium* é complexa e dispõe de um arsenal de células que desempenham varias funções no sistema imune, algumas delas, apesar de representarem uma porcentagem muito pequena em relação aos linfócitos totais, tais como as células NK, desempenham uma papel chave para a sinalização de outras células mediante a uma resposta precoce à invasão mediante a produção de IFN- γ e com isto, promovendo a ligação entre imunidade inata e adaptativa, através da ativação de outros tipos celulares como os monócitos e colaborando para a diferenciação de uma resposta pro-inflamatória do perfil Th1, além de exercer participação importante no recrutamento de outras células para o local de infecção pela produção de IL-8. A importância inata dessas células deve-se ao reconhecimento de moléculas que podem ser expressas na superfície de células infectadas como no caso dos eritrócitos e da pouca expressão de MHC-I pelas células hepáticas infectadas, devido a esses fenômenos há a atividade citotóxica, e por fim com a

produção de anticorpos pelos linfócitos B ativados (plasmócitos), as NK exercem as respostas ADCC's pela ligação da porção Fc ao Receptor Fc γ RIII pelo reconhecimento de proteínas produzidas pelo parasito na membrana de células infectadas.

Agradecimentos

Agradeço a o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de VACINAS-INCVT, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Capes, Conselho nacional Científico e tecnológico- CNPq, Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada - PPGIBA pelo financiamento e participação, ao colaborador André Corado pela participação, aos Orientadores Paulo Afonso Nogueira e Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda e a *Revista Scientia Amazonia* pela credibilidade neste trabalho.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O autor e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

5 Referências

- AGUDELO, O. ; BUENO, J. ; VILLA, A. ; MAESTRE, A. High IFN-gamma and TNF production by peripheral NK cells of Colombian patients with different clinical presentation of *Plasmodium falciparum*. **Malar J**, v.11, p.38, 2012.
- ANDRADE, B.B. ; REIS-FILHO, A. ; SOUZA-NETO, S.M. ; CLARENCIO, J. ; CAMARGO, L.M. ; BARRAL, A. ; BARRAL-NETTO, M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malar J**, v.9, p.13, 2010.
- ANFOSSI, N. ; ANDRE, P. ; GUIA, S. ; FALK, C.S. ; ROETYNCK, S. ; STEWART, C.A. ; BRESO, V. ; FRASSATI, C. ; REVIRON, D. ; MIDDLETON, D. ; ROMAGNE, F. ; UGOLINI, S. ; VIVIER, E. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. **Immunity**, v.25, n.2, p.331-342, 2006.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K. ; ELEME, K. ; MCQUEEN, K.L. ; CHENG, N.W. ; PARHAM, P. ; DAVIS, D.M. ; RILEY, E.M. Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J Immunol**, v.171, n.10, p.5396-5405, 2003.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K. ; RILEY, E.M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J Immunol**, v.169, n.6, p.2956-2963, 2002.
- ASHLEY, E. ; MCGREADY, R. ; PROUX, S. ; NOSTEN, F. Malaria. **Travel Med Infect Dis**, v.4, n.3-4, p.159-173, 2006.
- AUGUSTINE, A.D. ; HALL, B.F. ; LEITNER, W.W. ; MO, A.X. ; WALI, T.M. ; FAUCI, A.S. NIAID workshop on immunity to malaria: addressing immunological challenges. **Nat Immunol**, v.10, n.7, p.673-678, 2009.
- BARATIN, M. ; ROETYNCK, S. ; LEPOLARD, C. ; FALK, C. ; SAWADOGO, S. ; UEMATSU, S. ; AKIRA, S. ; RYFFEL, B. ; TIRABY, J.G. ; ALEXOPOULOU, L. ; KIRSCHNING, C.J. ; GYSIN, J. ; VIVIER, E. ; UGOLINI, S. Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.41, p.14747-14752, 2005.
- BELNOUE, E. ; POTTER, S.M. ; ROSA, D.S. ; MAUDUIT, M. ; GRUNER, A.C. ; KAYIBANDA, M. ; MITCHELL, A.J. ; HUNT, N.H. ; RENIA, L. Control of pathogenic CD8+ T cell migration to the brain by IFN-gamma during experimental cerebral malaria. **Parasite Immunol**, v.30, n.10, p.544-553, 2008.
- BERKE, G. The Fas-based mechanism of lymphocytotoxicity. **Hum Immunol**, v.54, n.1, p.1-7, 1997.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H. ; OEUVRAY, C. ; LUNEL, F. ; DRUILHE, P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **J Exp Med**, v.182, n.2, p.409-418, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2009.
- BRUCE, M.C. ; ALANO, P. ; DUTHIE, S. ; CARTER, R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, v.100 Pt 2, p.191-200, 1990.
- BUENO, L.L. ; MORAIS, C.G. ; ARAUJO, F.F. ; GOMES, J.A. ; CORREA-OLIVEIRA, R. ; SOARES, I.S. ; LACERDA, M.V. ; FUJIWARA, R.T. ; BRAGA, E.M. *Plasmodium vivax*:

- induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. **PLoS One**, v.5, n.3, p.e9623, 2010.
- CABANTOUS, S. ; POUDIOUGOU, B. ; TRAORE, A. ; KEITA, M. ; CISSE, M.B. ; DOUMBO, O. ; DESSEIN, A.J. ; MARQUET, S. Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. **J Infect Dis**, v.192, n.5, p.854-860, 2005.
- CALIGIURI, M.A. Human natural killer cells. **Blood**, v.112, n.3, p.461-469, 2008.
- CHALANDON, Y. ; KOCHER, A. Severe Malaria. **New England Journal of Medicine**, v.342, n.23, p.1715-1715, 2000.
- CHAN, A. ; HONG, D.L. ; ATZBERGER, A. ; KOLLNBERGER, S. ; FILER, A.D. ; BUCKLEY, C.D. ; MCMICHAEL, A. ; ENVER, T. ; BOWNESS, P. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. **J Immunol**, v.179, n.1, p.89-94, 2007.
- COBAN, C. ; ISHII, K.J. ; UEMATSU, S. ; ARISUE, N. ; SATO, S. ; YAMAMOTO, M. ; KAWAI, T. ; TAKEUCHI, O. ; HISAEDA, H. ; HORII, T. ; AKIRA, S. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. **Int Immunol**, v.19, n.1, p.67-79, 2007.
- COELHO-CASTELO, A.A.M. ; TROMBONE, A.P.F. ; ROCHA, C.D. ; LORENZI, J.C.C. Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.42, n.2, p.127-142, 2009.
- COLONNA, M. ; SAMARIDIS, J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. **Science**, v.268, n.5209, p.405-408, 1995.
- COOPER, M. NK cell and DC interactions. **Trends Immunol**, v.25, n.1, p.47-52, 2004.
- COOPER, M.A. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. **Blood**, v.97, n.10, p.3146-3151, 2001.
- D'OMBRAIN, M.C. ; ROBINSON, L.J. ; STANISIC, D.I. ; TARAICA, J. ; BERNARD, N. ; MICHON, P. ; MUELLER, I. ; SCHOFIELD, L. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. **Clin Infect Dis**, v.47, n.11, p.1380-1387, 2008.
- DAVID, P.H. ; DEL PORTILLO, H.A. ; MENDIS, K.N. Plasmodium vivax malaria: parasite biology defines potential targets for vaccine development. **Biol Cell**, v.64, n.2, p.251-260, 1988.
- DELORON, P. ; CHOUGNET, C. ; LEPERS, J.P. ; TALLET, S. ; COULANGES, P. Protective value of elevated levels of gamma interferon in serum against exoerythrocytic stages of Plasmodium falciparum. **J Clin Microbiol**, v.29, n.9, p.1757-1760, 1991.
- DOOLAN, D.L. ; HOFFMAN, S.L. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the Plasmodium yoelii model. **J Immunol**, v.163, n.2, p.884-892, 1999.
- DORFMAN, J.R. ; RAULET, D.H. Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance. **Eur J Immunol**, v.26, n.1, p.151-155, 1996.
- DRUILHE, P. ; SPERTINI, F. ; SOESOE, D. ; CORRADIN, G. ; MEJIA, P. ; SINGH, S. ; AUDRAN, R. ; BOUZIDI, A. ; OEUVRAY, C. ; ROUSSILHON, C. A Malaria Vaccine That Elicits in Humans Antibodies Able to Kill *Plasmodium falciparum*. **PLoS Med**, v.2, n.11, p.e344, 2005.
- ERDMAN, L.K. ; COSIO, G. ; HELMERS, A.J. ; GOWDA, D.C. ; GRINSTEIN, S. ; KAIN, K.C. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. **J Immunol**, v.183, n.10, p.6452-6459, 2009.

- FAU, W.M. ; WOODRUFF, J. ; EDELE, F. ; FAU, J.D. ; TONGREN, J.E. ; KING, E. ; ANDREWS, L. ; BEJON, P. ; GILBERT, S.C. ; DE SOUZA, J.B. ; SINDEN, R. ; HILL, A.V.S. ; RILEY, E.M. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage Plasmodium falciparum correlate with parasitological and clinical outcomes. *n. ,*
- FAVRE, N. ; RYFFEL, B. ; BORDMANN, G. ; RUDIN, W. The course of Plasmodium chabaudi chabaudi infections in interferon-gamma receptor deficient mice. **Parasite Immunol**, v.19, n.8, p.375-383, 1997.
- FERNANDES, A.A. ; CARVALHO, L.J. ; ZANINI, G.M. ; VENTURA, A.M. ; SOUZA, J.M. ; COTIAS, P.M. ; SILVA-FILHO, I.L. ; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in the Brazilian Amazon region. **Clin Vaccine Immunol**, v.15, n.4, p.650-658, 2008.
- FERREIRA, A. ; SCHOFIELD, L. ; ENEA, V. ; SCHELLEKENS, H. ; VAN DER MEIDE, P. ; COLLINS, W.E. ; NUSSENZWEIG, R.S. ; NUSSENZWEIG, V. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. **Science**, v.232, n.4752, p.881-884, 1986.
- FERREIRA, M.U. ; DA SILVA NUNES, M. ; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.11, n.6, p.987-995, 2004.
- GALY, A. ; TRAVIS, M. ; CEN, D. ; CHEN, B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. **Immunity**, v.3, n.4, p.459-473, 1995.
- GOMES, A.P. ; VITORINO, R.R. ; COSTA, A.D.P. ; MENDONÇA, E.G.D. ; OLIVEIRA, M.G.D.A. ; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por Plasmodium falciparum. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.23, n.3, p.358-369, 2011.
- GOOD, M.F. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. **Trends Parasitol**, v.21, n.1, p.29-34, 2005.
- GOOD, M.F. ; DOOLAN, D.L. Malaria vaccine design: immunological considerations. **Immunity**, v.33, n.4, p.555-566, 2010.
- HANSEN, D.S. ; BERNARD, N.J. ; NIE, C.Q. ; SCHOFIELD, L. NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during Plasmodium berghei-mediated cerebral malaria. **J Immunol**, v.178, n.9, p.5779-5788, 2007.
- HIRUNPETCHARAT, C. ; GOOD, M.F. Deletion of Plasmodium berghei-specific CD4+ T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, n.4, p.1715-1720, 1998.
- HOFFMAN, S.L. ; ISENBARGER, D. ; LONG, G.W. ; SEDEGAH, M. ; SZARFMAN, A. ; WATERS, L. ; HOLLINGDALE, M.R. ; VAN DER MEIDE, P.H. ; FINBLOOM, D.S. ; BALLOU, W.R. Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes. **Science**, v.244, n.4908, p.1078-1081, 1989.
- HVIID, L. Clinical disease, immunity and protection against Plasmodium falciparum malaria in populations living in endemic areas. **Expert Rev Mol Med**, v.1998, p.1-10, 1998.
- ISSIFOU, S. ; MAVOUNGOU, E. ; BORRMANN, S. ; BOUYOU-AKOTET, M.K. ; MATSIEGUI, P.B. ; KREMSNER, P.G. ; NTOUMI, F. Severe malarial anemia associated with increased soluble Fas ligand (sFasL) concentrations in Gabonese children. **Eur Cytokine Netw**, v.14, n.4, p.238-241, 2003.

- JACOBS, P. ; RADZIOCH, D. ; STEVENSON, M.M. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. **Infect Immun**, v.64, n.1, p.44-49, 1996.
- JAFARSHAD, A. ; DZIEGIEL, M.H. ; LUNDQUIST, R. ; NIELSEN, L.K. ; SINGH, S. ; DRUILHE, P.L. A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes FcgammaRII and FcgammaRIII. **J Immunol**, v.178, n.5, p.3099-3106, 2007.
- KARRE, K. ; LJUNGGREN, H.G. ; PIONTEK, G. ; KIESSLING, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. **Nature**, v.319, n.6055, p.675-678, 1986.
- KERN, P. ; DIETRICH, M. ; HEMMER, C. ; WELLINGHAUSEN, N. Increased levels of soluble Fas ligand in serum in Plasmodium falciparum malaria. **Infect Immun**, v.68, n.5, p.3061-3063, 2000.
- KERN, P. ; HEMMER, C.J. ; VAN DAMME, J. ; GRUSS, H.J. ; DIETRICH, M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated Plasmodium falciparum malaria. **Am J Med**, v.87, n.2, p.139-143, 1989.
- KINYANJUI, S.M. ; BEJON, P. ; OSIER, F.H. ; BULL, P.C. ; MARSH, K. What you see is not what you get: implications of the brevity of antibody responses to malaria antigens and transmission heterogeneity in longitudinal studies of malaria immunity. **Malar J**, v.8, p.242, 2009.
- KORBEL, D.S. ; FINNEY, O.C. ; RILEY, E.M. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. **Int J Parasitol**, v.34, n.13-14, p.1517-1528, 2004.
- KORBEL, D.S. ; NEWMAN, K.C. ; ALMEIDA, C.R. ; DAVIS, D.M. ; RILEY, E.M. Heterogeneous human NK cell responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J Immunol**, v.175, n.11, p.7466-7473, 2005.
- KRISHNEGOWDA, G. ; HAJJAR, A.M. ; ZHU, J. ; DOUGLASS, E.J. ; UEMATSU, S. ; AKIRA, S. ; WOODS, A.S. ; GOWDA, D.C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **J Biol Chem**, v.280, n.9, p.8606-8616, 2005.
- KROTOSKI, W.A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, n.1, p.1-11, 1985.
- LANGHORNE, J. ; CROSS, C. ; SEIXAS, E. ; LI, C. ; VON DER WEID, T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.4, p.1730-1734, 1998.
- LANGHORNE, J. ; QUIN, S.J. ; SANI, L.A. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. **Chem Immunol**, v.80, p.204-228, 2002.
- LANIER, L.L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. **Nat Immunol**, v.9, n.5, p.495-502, 2008.
- LAOUAR, Y. ; SUTTERWALA, F.S. ; GORELIK, L. ; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. **Nat Immunol**, v.6, n.6, p.600-607, 2005.
- LEIDEN, J.M. ; GOTTESDIENER, K.M. ; QUERTERMOS, T. ; COURY, L. ; BRAY, R.A. ; GOTTSCHALK, L. ; GEBEL, H. ; SEIDMAN, J.G. ; STROMINGER, J.L. ; LANDAY, A.L. ; ET AL. T-cell receptor gene rearrangement

- and expression in human natural killer cells: natural killer activity is not dependent on the rearrangement and expression of T-cell receptor alpha, beta, or gamma genes. **Immunogenetics**, v.27, n.4, p.231-238, 1988.
- LUTY, A.J. ; LELL, B. ; SCHMIDT-OTT, R. ; LEHMAN, L.G. ; LUCKNER, D. ; GREVE, B. ; MATOUSEK, P. ; HERBICH, K. ; SCHMID, D. ; MIGOT-NABIAS, F. ; DELORON, P. ; NUSSENZWEIG, R.S. ; KREMSNER, P.G. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. **J Infect Dis**, v.179, n.4, p.980-988, 1999.
- MARTI, M. ; GOOD, R.T. ; RUG, M. ; KNUEPFER, E. ; COWMAN, A.F. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. **Science**, v.306, n.5703, p.1930-1933, 2004.
- MATSUMOTO, J. ; KAWAI, S. ; TERAOKA, K. ; KIRINOKI, M. ; YASUTOMI, Y. ; AIKAWA, M. ; MATSUDA, H. Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of *Macaca* monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection. **Infect Immun**, v.68, n.3, p.1183-1188, 2000.
- MAVOUNGOU, E. ; LUTY, A.J. ; KREMSNER, P.G. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. **Eur Cytokine Netw**, v.14, n.3, p.134-142, 2003.
- MCCALL, M.B. ; ROESTENBERG, M. ; PLOEMEN, I. ; TEIRLINCK, A. ; HOPMAN, J. ; DE MAST, Q. ; DOLO, A. ; DOUMBO, O.K. ; LUTY, A. ; VAN DER VEN, A.J. ; HERMSEN, C.C. ; SAUERWEIN, R.W. Memory-like IFN-gamma response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. **Eur J Immunol**, v.40, n.12, p.3472-3477, 2010.
- MCCALL, M.B. ; SAUERWEIN, R.W. Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. **J Leukoc Biol**, v.88, n.6, p.1131-1143, 2010.
- MEDING, S.J. ; LANGHORNE, J. CD4+ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **Eur J Immunol**, v.21, n.6, p.1433-1438, 1991.
- MILLER, L.H. ; BARUCH, D.I. ; MARSH, K. ; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v.415, n.6872, p.673-679, 2002.
- MINIGO, G. ; WOODBERRY, T. ; PIERA, K.A. ; SALWATI, E. ; TJITRA, E. ; KENANGALEM, E. ; PRICE, R.N. ; ENGWERDA, C.R. ; ANSTEY, N.M. ; PLEBANSKI, M. Parasite-Dependent Expansion of TNF Receptor II-Positive Regulatory T Cells with Enhanced Suppressive Activity in Adults with Severe Malaria. **PLoS Pathog**, v.5, n.4, p.e1000402, 2009.
- MIYAKODA, M. ; KIMURA, D. ; YUDA, M. ; CHINZEI, Y. ; SHIBATA, Y. ; HONMA, K. ; YUI, K. Malaria-specific and nonspecific activation of CD8+ T cells during blood stage of *Plasmodium berghei* infection. **J Immunol**, v.181, n.2, p.1420-1428, 2008.
- MOORE, S.A. ; SURGEY, E.G. ; CADWGAN, A.M. Malaria vaccines: where are we and where are we going? **Lancet Infect Dis**, v.2, n.12, p.737-743, 2002.
- MORETTA, L. ; BOTTINO, C. ; PENDE, D. ; MINGARI, M.C. ; BIASSONI, R. ; MORETTA, A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. **Eur J Immunol**, v.32, n.5, p.1205-1211, 2002.
- MOTA, M.M. ; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. **Microbes Infect**, v.3, n.13, p.1123-1128, 2001.

- NATARAJAN, K. ; DIMASI, N. ; WANG, J. ; MARIUZZA, R.A. ; MARGULIES, D.H. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.853-885, 2002.
- NEWMAN, K.C. ; KORBEL, D.S. ; HAFALLA, J.C. ; RILEY, E.M. Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer cell interferon-gamma responses to malaria. **PLoS Pathog**, v.2, n.12, p.e118, 2006.
- OMER, F.M. ; DE SOUZA, J.B. ; CORRAN, P.H. ; SULTAN, A.A. ; RILEY, E.M. Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. **J Exp Med**, v.198, n.12, p.1817-1827, 2003.
- PERKINS, D.J. ; WERE, T. ; DAVENPORT, G.C. ; KEMPAIAH, P. ; HITTNER, J.B. ; ONG'ECHA, J.M. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. **Int J Biol Sci**, v.7, n.9, p.1427-1442, 2011.
- POMBO, D.J. ; LAWRENCE, G. ; HIRUNPETCHARAT, C. ; RZEPczyk, C. ; BRYDEN, M. ; CLOONAN, N. ; ANDERSON, K. ; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y. ; MARTIN, L.B. ; WILSON, D. ; ELLIOTT, S. ; EISEN, D.P. ; WEINBERG, J.B. ; SAUL, A. ; GOOD, M.F. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **Lancet**, v.360, n.9333, p.610-617, 2002.
- RAZAKANDRAINIBE, R. ; PELLEAU, S. ; GRAU, G.E. ; JAMBOU, R. Antigen presentation by endothelial cells: what role in the pathophysiology of malaria? **Trends Parasitol**, v.28, n.4, p.151-160, 2012.
- RENIA, L. ; POTTER, S.M. ; MAUDUIT, M. ; ROSA, D.S. ; KAYIBANDA, M. ; DESCHEMIN, J.C. ; SNOUNOU, G. ; GRUNER, A.C. Pathogenic T cells in cerebral malaria. **Int J Parasitol**, v.36, n.5, p.547-554, 2006.
- RIBEIRO-DIAS, F. ; TOSTA, C.E. Dynamics and kinetics of natural killer cell cytotoxicity in human malaria as evaluated by a novel stepwise cytotoxicity assay. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, n.4, p.357-364, 2006.
- RILEY, E.M. ; WAHL, S. ; PERKINS, D.J. ; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunol**, v.28, n.1-2, p.35-49, 2006.
- RITZ, J. ; CAMPEN, T.J. ; SCHMIDT, R.E. ; ROYER, H.D. ; HERCEND, T. ; HUSSEY, R.E. ; REINHERZ, E.L. Analysis of T-cell receptor gene rearrangement and expression in human natural killer clones. **Science**, v.228, n.4707, p.1540-1543, 1985.
- ROCKETT, K.A. ; AWBURN, M.M. ; COWDEN, W.B. ; CLARK, I.A. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. **Infect Immun**, v.59, n.9, p.3280-3283, 1991.
- ROESTENBERG, M. ; MCCALL, M. ; HOPMAN, J. ; WIERSMA, J. ; LUTY, A.J.F. ; VAN GEMERT, G.J. ; VAN DE VEGTEBOLMER, M. ; VAN SCHAIJK, B. ; TELEN, K. ; ARENS, T. ; SPAARMAN, L. ; DE MAST, Q. ; ROEFFEN, W. ; SNOUNOU, G. ; RÉNIA, L. ; VAN DER VEN, A. ; HERMSEN, C.C. ; SAUERWEIN, R. Protection against a Malaria Challenge by Sporozoite Inoculation. **New England Journal of Medicine**, v.361, n.5, p.468-477, 2009.
- ROETYNCK, S. ; BARATIN, M. ; VIVE, É. ; UGOLINI, S. Cellules natural killer et immunité innée contre le paludisme. **Médecine sciences**, v.22, n.8-9, p.739-744, 2006.
- ROLAND, J. ; SOULARD, V. ; SELIER, C. ; DRAPIER, A.M. ; DI SANTO, J.P. ; CAZENAVE, P.A. ; PIED, S. NK cell responses to *Plasmodium* infection and control of intrahepatic parasite development. **J Immunol**, v.177, n.2, p.1229-1239, 2006.

- RUSSELL, J.H. ; LEY, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.323-370, 2002.
- SCHARTON-KERSTEN, T.M. ; SHER, A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. **Curr Opin Immunol**, v.9, n.1, p.44-51, 1997.
- SCHMIDT, N.W. ; BUTLER, N.S. ; BADOVINAC, V.P. ; HARTY, J.T. Extreme CD8 T cell requirements for anti-malarial liver-stage immunity following immunization with radiation attenuated sporozoites. **PLoS Pathog**, v.6, n.7, p.e1000998, 2010.
- SCHOFIELD, L. ; GRAU, G.E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.9, p.722-735, 2005.
- SCHWENK, R.J. ; RICHIE, T.L. Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. **Trends Parasitol**, v.27, n.7, p.306-314, 2011.
- SMITH, J.D. ; CRAIG, A.G. The surface of the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte. **Curr Issues Mol Biol**, v.7, n.1, p.81-93, 2005.
- SMYTH, M.J. ; CRETNEY, E. ; KELLY, J.M. ; WESTWOOD, J.A. ; STREET, S.E. ; YAGITA, H. ; TAKEDA, K. ; VAN DOMMELEN, S.L. ; DEGLI-ESPOSTI, M.A. ; HAYAKAWA, Y. Activation of NK cell cytotoxicity. **Mol Immunol**, v.42, n.4, p.501-510, 2005.
- SOUZA, J.B. ; RILEY, E.M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes Infect**, v.4, n.3, p.291-300, 2002.
- STEVENSON, M.M. ; ING, R. ; BERRETTA, F. ; MIU, J. Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: role of dendritic cells and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells. **Int J Biol Sci**, v.7, n.9, p.1311-1322, 2011.
- TANAKA, M. ; SUDA, T. ; TAKAHASHI, T. ; NAGATA, S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. **EMBO J**, v.14, n.6, p.1129-1135, 1995.
- THORNTHWAITE, J.T. The Natural Killer Cell: A Historical Perspective and the Use of Supplements to Enhance NKC Activity. **Journal of Immune Based Therapies, Vaccines and Antimicrobials**, v.01, n.03, p.21-51, 2012.
- TODRYK, S.M. ; BEJON, P. ; MWANGI, T. ; PLEBANSKI, M. ; URBAN, B. ; MARSH, K. ; HILL, A.V.S. ; FLANAGAN, K.L. Correlation of Memory T Cell Responses against TRAP with Protection from Clinical Malaria, and CD4⁺ CD25^{high} T Cells with Susceptibility in Kenyans. **PLoS One**, v.3, n.4, p.e2027, 2008.
- TOWNSEND, A. ; OHLEN, C. ; BASTIN, J. ; LJUNGGREN, H.G. ; FOSTER, L. ; KARRE, K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. **Nature**, v.340, n.6233, p.443-448, 1989.
- VAN DEN STEEN, P.E. ; DEROOST, K. ; VAN AELST, I. ; GEURTS, N. ; MARTENS, E. ; STRUYF, S. ; NIE, C.Q. ; HANSEN, D.S. ; MATTHYS, P. ; VAN DAMME, J. ; OPDENAKKER, G. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. **Eur J Immunol**, v.38, n.4, p.1082-1095, 2008.
- VIVIER, E. ; NUNES, J.A. ; VELY, F. Natural killer cell signaling pathways. **Science**, v.306, n.5701, p.1517-1519, 2004.
- WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med**, v.344, n.14, p.1058-1066, 2001.
- WALTHER, M. ; WOODRUFF, J. ; EDELE, F. ; JEFFRIES, D. ; TONGREN, J.E. ; KING, E. ; ANDREWS, L. ; BEJON, P. ; GILBERT, S.C. ; DE SOUZA, J.B. ; SINDEN, R. ; HILL, A.V. ; RILEY, E.M. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage Plasmodium falciparum correlate with parasitological

and clinical outcomes. **J Immunol**, v.177, n.8, p.5736-5745, 2006.

YAZDANI, S.S. ; MUKHERJEE, P. ; CHAUHAN, V.S. ; CHITNIS, C.E. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. **Curr Mol Med**, v.6, n.2, p.187-203, 2006.

ANEXO 1

Comprovante de submissão do Artigo de Revisão

The screenshot shows a web browser window displaying a Yahoo! Mail inbox. The address bar shows the URL: `br-mg6.mail.yahoo.com/neo/launch?.rand=4brbik2b6kl5t#mail`. The page title is "(69 não lidos) - yurychave". The main content area shows an email titled "Re: Review encaminhado Final" received on Tuesday, July 16, 2013, at 4:52. The email is from "Scientia Amazonia" and is addressed to "YURY OLIVEIRA CHAVES".

The email body contains the following text:

Prezado Yury Oliveira Chaves,
 Os editores da Revista Scientia Amazonia recebeu o seu manuscrito e encaminhamos para avaliação dos referee.
 Assim que recebemos as avaliações estaremos encaminhando a Vossa Senhoria.
 Atenciosamente,
 Dr. Genilson Pereira Santana
 Editor Chefe.

De: "YURY OLIVEIRA CHAVES" <yurychaves@yahoo.com.br>
Para: scientia@ufam.edu.br
Cc: "paulo nogueira" <paulonogueira@amazonia.fiocruz.br>, andreorado@gmail.com, mcsantos@ufam.edu.br
Enviadas: Segunda-feira, 8 de julho de 2013 15:08:01
Assunto: Enc: Review encaminhado Final

Encaminho este Artigo de revisão para o professor Dr. Genilson

The browser's taskbar at the bottom shows several open applications, including EndNote (endnote-citations (3).enw), and the system tray displays the time as 19:39 on 27/07/2013.

ANEXO 2

Comprovante de Aceite pelo comitê de ética para desenvolvimento do Projeto de Pesquisa



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO MEDICINA TROPICAL-FMT-HVD
DIRETORIA DE ENSINO, PESQUISA E CONTROLE DE ENDEMIAS.
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

Identificação do Projeto:

Estudo da biologia de *Plasmodium vivax*: imunopatogênese, citoadesão e invasão.

Pesquisadores responsáveis:

Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda

Instituição onde se realizará a pesquisa:

Gerência de Malária da Fundação Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado

Data da reapresentação ao CEP:

29 de novembro de 2011 – Protocolo nº 0013/2011

Entrega para parecer – 02 de dezembro de 2011

Objetivo da Reapresentação:

Correção das pendências apresentadas no parecer do dia 16/10/2011

Objetivo da Reapresentação:

Correção das pendências apresentadas no parecer do dia 16/10/2011

Parecer:

O pesquisador principal fez todas as alterações solicitadas no projeto:

- 1- Mencionar como os pacientes selecionados serão tratados e acompanhados:

Foi incluído um novo item na metodologia com todos os dados com acompanhamento dos pacientes = **Pendência atendida**

- 2- Mencionar o tamanho da amostra de pacientes controles, como serão obtidos e tratamento em relação TCLE.

Foi incluído os detalhes dos pacientes do grupo controle que serão 20 pacientes com diagnóstico microscópico negativo para malária e que concordarem e assinarem o TCLE, incluído também os critérios de inclusão e exclusão do grupo controle = **Pendência atendida**

- 3- Considerando mulheres grávidas serão excluídas como será feito o processo de identificação da gravidez.

Foi incluído no questionário (anexo 2) questionamento sobre gravidez vigente, só sendo considerado para inclusão no estudo aquelas que responderam convictamente Não = **Pendência atendida**



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO MEDICINA TROPICAL-FMT-HVD
DIRETORIA DE ENSINO, PESQUISA E CONTROLE DE ENDEMIAS.
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Todos os documentos exigidos estão anexados. O Termo de Consentimento Livre e esclarecido está anexado. **Achamos que o projeto deva ser aprovado.**

Salvo melhor juízo

Este é o meu parecer

Data: Manaus, 09/12/2011

Martins
Dra. Marilaine Martins
Chefe de Parasitologia
FMTAM



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL
 "Doutor Heitor Vieira Dourado"
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS-CEP



PARECER N° 2082-CEP/FMT-HVD

Registro CEP: Protocolo N°0013/2011- CEP/FMT-HVD

CAAE – 0044.0.114.000-11.

Projeto de Pesquisa: "Estudo da biologia de *Plasmodium vivax*: imunopatogênese, citoadesão e invasão".

Pesquisadora Responsável: Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda.

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical "Doutor Heitor Vieira Dourado"

Instituição Co-Participante: Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane.

Área Temática Especial: Não se aplica.

Patrocinador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp.

Registro para armazenamento de material biológico humano: Não.

Ao se proceder a análise do projeto de pesquisa em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical "Doutor Heitor Vieira Dourado" - CEP/FMT-HVD, em sessão ordinária do dia 16 de dezembro de 2011 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96 e suas complementares, manifesta-se favorável à aprovação do protocolo. A partir desta data o Pesquisador fica autorizado a dar início à coleta de dados da pesquisa e pela entrega do relatório final deste estudo, neste CEP, em janeiro de 2014, conforme Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, item IX, 2 letra "c".

Situação do Protocolo: APROVADO

Manaus, 16 de dezembro de 2011.


 Dra. Marilaine Martins

Coordenadora do CEP/FMT-HVD, em exercício