



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

**INFECÇÃO DO VÍRUS DENGUE AUMENTA A CITOADESÃO DOS ERITRÓCITOS
INFECTADOS COM PLASMODIUM VIVAX**

Maria Geuziane Soares da Cruz

**MANAUS - AMAZONAS
2019**



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

Maria Geuziane Soares da Cruz

**INFECÇÃO DO VÍRUS DENGUE AUMENTA A CITOADESÃO DOS ERITRÓCITOS
INFECTADOS COM *PLASMODIUM VIVAX***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Pritesh Jaychand Lalwani

MANAUS - AMAZONAS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C957i Cruz, Maria Geuziane Soares da
Infecção do vírus dengue aumenta a citoadesão dos eritrócitos infectados com plasmodium vivax : Citoadesão na coinfeção de dengue e malária / Maria Geuziane Soares da Cruz . 2019
71 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Pritesh Jaychand Lalwani
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Dengue. 2. Malária. 3. Receptores endoteliais. 4. Coinfeção.
5. Citoadesão. I. Lalwani, Pritesh Jaychand. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

Maria Geuziane Soares da Cruz

**INFECÇÃO DO VÍRUS DENGUE AUMENTA A CITOADESÃO DOS ERITRÓCITOS
INFECTADOS COM PLASMODIUM VIVAX**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

BANCA EXAMINADORA

**Dr. Pritesh Jaychand Lalwani, Presidente
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ**

**Dra. Gisely Costa Melo, Membro Externo
Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT/HVD**

**Dr. Paulo Afonso Nogueira, Membro Externo
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ**

DEDICATÓRIA

A Deus, a quem sempre me direciona a fazer as melhores escolhas para a minha vida. E aos meus pais e irmãos por sempre estarem ao meu lado, torcerem e orarem por mim. Obrigada por tanto amor à mim dedicado.

IN MEMORIAN

A minha mãe Maria de Fátima, que sempre esteve e sempre estará presente em todos os momentos da minha vida, dando força e amor, mesmo com sua ausência carnal. Mulher forte e guerreira, a quem sempre me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos e principalmente dos estudos. Você é uma linda estrela que iluminará sempre o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos (Provérbios 16:9).

“Onde estão os anjos de plantão? Sei como é difícil atender todos os pedidos, e que a minha prece é mais uma na multidão, será que Deus pode me ouvir? Só quero agradecer tudo que um dia eu já consegui”

Longo e árduo é o percurso, mas enfim chegou o tão sonhado e aguardado momento, a defesa de mestrado. Nada na vida conquistamos sozinhos ou sem a ajuda de alguém. Nesse sentido gostaria de expressar meus sinceros e profundos agradecimentos à todos que puderam fazer esse trabalho se tornar realidade.

Quero agradecer primeiramente a **Deus**, pois ele é o autor da vida, e é ele que conduz meus passos. Sou extremamente grata por todas as bênçãos concedidas em minha vida Senhor, nada é sem o seu consentimento.

Aos meus pais, **Maria de Fátima e Marcelino** por sempre insistirem e incentivarem nos estudos e no caminho a seguir na vida. Obrigada por tudo, tudo o que sou e consegui na vida devo a vocês, amo vocês.

Ao meu orientador, **Pritesh Lalwani** que acreditou em mim e me ajudou a progredir quanto ao meu nível de conhecimento científico. Sem a sua ajuda talvez eu não soubesse um terço do que aprendi durante sua orientação.

Aos **meus irmãos**, que sempre oraram e me apoiaram durante essa caminhada do mestrado. Vocês são os melhores irmãos do mundo, amo vocês.

A minha amiga **Amanda Araújo**, que esteve e está comigo durante todos os momentos da minha vida, vibrando com cada conquista minha, com companheirismo, cumplicidade, lealdade e me incentivando a nunca desistir. Você foi também foi essencial para que eu chegasse até aqui. Te amo

Aos meus amigos do grupo de pesquisa **IDI: Bárbara, Thiago, Rafaella, Nani, Aguyda, Cristiano, Vanessa, Adriane e Wlademir** por toda ajuda e suporte que a mim foi dada durante essa caminhada. Obrigada pelo tempo de risadas e descontrações, vocês são incríveis.

Ao meu amigo **Nilton**, por me incentivar a seguir meus sonhos e objetivos, incentivar nos estudos e nunca me deixar desistir dele. Obrigada pelas noites que me fez companhia durante os experimentos que duraram até tarde da noite

Ao meu namorado **Leandro**, que mesmo me acompanhando por pouco tempo durante a fase de mestrado, me ajudou muito com todo seu apoio e ombro amigo durante minhas crises de ansiedade e medo. Obrigada amor, você é sensacional e obrigada por entender quando eu não queria sair de casa. Te amo

A minha amiga **Barbará Salgado** pelo apoio, vibração com cada resultado obtido e principalmente pela ajuda durante as análises das minhas amostras. Obrigada amiga, você é 10

A todos do PPGIBA: **funcionários, professores e colaboradores** que sempre nos incentivaram e deram oportunidade de progredir nos conhecimentos de imunologia.

Ao colega Yuri Chaves, pela ajuda durante o processo das minhas análises.

Aos colaboradores da gerência de malária, em especial a **Dra Stefanie Lopes** que me ajudou em todo o processo de extração de eritrócitos infectados e citoadesão.

Ao Dr. **Marcus Lacerda**, por permitir que eu realizasse minhas coletas de amostras na Fundação de Medicina Tropical – FMT/AM.

Á **Dra Jaila Borges**, por compartilhar comigo todo seu conhecimento durante meu estágio de docência.

Aos funcionários da coleta de malária: **Marta, Izabel, Valéria, Ednildo, Auxiliadora, Tatá, Mauro e Bethe** por me acolherem e tratarem tão bem durante minha passagem pela coleta de malária. Vocês são maravilhosos.

Aos **pacientes** que aceitaram participar do meu projeto.

Á **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de mestrado e á **Fundação de Amparo a Pesquisa do estado do Amazonas (FAPEAM)** pelo apoio financeiro.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ** por disponibilizarem materiais e equipamentos para o desenvolvimento desse projeto.

Á **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** por investir no futuro de seus alunos e proporcionar uma estrutura para que esse projeto pudesse ser executado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para que esse projeto pudesse ser realizado com êxito.

RESUMO

A malária e a dengue são doenças prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais e de grande importância em saúde pública. Na malária, existe um fenômeno associado ao aumento da patogenicidade chamado citoaderência, no qual ocorre o sequestro do parasita para outros órgãos do corpo. Alguns receptores de células endoteliais estão envolvidos nesse processo como ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1 e P-selectina. Em áreas endêmicas para o parasita malárico e o vírus da dengue podem ocorrer infecções simultâneas. Contudo, pouco se sabe sobre coinfeção por malária e dengue no Brasil. Nenhum estudo mostrou até o presente momento o que ocorre na citoadesão durante a coinfeção dengue-malária. Por isso, nosso objetivo foi observar se a adesão de eritrócitos infectados por *Plasmodium vivax* (*PviEs*) aumenta em células do hepatocarcinoma humano (HEP-G2) infectadas concomitantemente por dengue. O estoque viral de dengue 4 (DENV4) foi feito em células C6/36 e os *PviEs* foram enriquecidos por gradiente Percoll para serem usados no ensaio de citoadesão com células HEP-G2. Nossos resultados mostraram que as células HEP-G2 expressam a molécula de adesão ICAM-1, mas não PECAM-1 e VCAM-1, enquanto as células A549 não expressam nenhuma destas. Mostramos também que DENV4 se replica em células HEP-G2 e houve um aumento da expressão de ICAM-1 nas células infectadas pelo vírus, após 4 dias de infecção. Junto a isso, observamos que a citoadesão de *PviEs* aumentou após infecção por DENV4. O tratamento com tripsina, degradante das proteínas do parasita, diminuiu a adesão de *PviEs*, enquanto a presença de soro humano anti-*Pv* não preveniu a citoadesão. O uso do inibidor BX795 reduziu os níveis de *PviEs*, ao contrário da cloroquina. Por fim, a adesão de *PviEs* diminuiu 5,5 vezes em células HEP-G2 tratadas com o anticorpo α -ICAM-1, quando comparadas ao controle sem bloqueador. Esses resultados demonstram que a citoadesão de *PviEs* aumenta com uma infecção concomitante por DENV e sugerem maiores investigações sobre receptores e vias imunes envolvidos nesse fenômeno durante a coinfeção dengue-malária. Este estudo também nos alerta para uma maior atenção aos pacientes diagnosticados com monoinfecção por dengue ou malária em áreas endêmicas.

Palavra chaves: dengue; malária; receptores endoteliais; células do hepatoma humano; citoadesão; co-infecção.

ABSTRACT

Malaria and dengue are prevalent diseases in tropical and subtropical regions and are of great importance in public health. In malaria, there is a phenomenon associated with pathogenicity called cytoadherence, in which parasite sequestration occurs to other organs of the body. Some endothelial cell receptors are involved in this process such as ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1 and P-selectin. In endemic areas to the malarial parasite and dengue virus, simultaneous infections may occur. However, little is known about malaria and dengue coinfection in Brazil. No study has yet shown what occurs in cytoadhesion during dengue-malaria coinfection. Therefore, our objective was to observe whether the adhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes (PviEs) increases in human hepatocarcinoma (HEP-G2) cells concomitantly infected with dengue. Dengue 4 viral stock (DENV4) was done on C6/36 cells and PviEs were enriched by Percoll gradient to be used in the HEP-G2 cell cytoadhesion assay. Our results showed that HEP-G2 cells express the adhesion molecule ICAM-1, but not PECAM-1 and VCAM-1, while A549 cells do not express the molecules. We also showed that DENV4 replicates in HEP-G2 cells and increased ICAM-1 expression in virus-infected cells after 4 days of infection. In addition, we observed that PviEs cytoadhesion increased after DENV4 infection. Trypsin treatment, degrading parasite proteins, decreased PviEs adhesion, while the presence of anti-Pv human serum was not protective against cytoadhesion. Use of the BX795 inhibitor reduced PviEs levels, unlike chloroquine. Finally, PviEs adhesion decreased 5.5-fold in HEP-G2 cells treated with the α -ICAM-1 antibody when compared to the without blocker control. These results demonstrate that PviEs cytoadhesion increases with a concomitant DENV infection and suggest further investigations into receptors and immune pathways involved in this phenomenon during dengue-malaria coinfection. This study also alerts us to greater attention to patients diagnosed with dengue or malaria monoinfection in endemic areas.

Key words: dengue; malaria; endothelial receptors; human hepatocarcinoma cells; cytoadhesion; co-infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	20
Figura 2: Incidência de malária globalmente.....	21
Figura 3: Epidemiologia de malária no Brasil	22
Figura 4: Ciclo de replicação do DENV	24
Figura 5. Ativação de monócitos/macrófagos por PAMP's do plasmodium	27
Figura 6: Representação esquemática do mecanismo de replicação viral de dengue através de células endoteliais.....	30
Figura 7: A: Formas maduras de Pv-iEs obtidos após enriquecimento do gradiente Percoll. B e C: Adesão das formas maduras de Pv-iEs (trofozoítos e esquizontes) a células endoteliais	34
Figura 8: Ativação das moléculas de adesão durante o sequestro de eritrócitos infectados por <i>Plasmodium</i>	35
Figura 9: Local de coleta das amostras - FMT-HVD	37
Figura 10: Expressão de moléculas de adesão em células HEP-G2 e A549. As células cresceram até uma confluência de 80% até o dia da análise.	43
Figura 11: Replicação viral e expressão de ICAM-1 em células HEP-G2 infectadas por DENV4.....	44
Figura 12: Adesão de estágios maduros de PviEs em células HEP-G2 infectadas por DENV-4.....	46
Figura 13: Citoadesão de Pv-iEs em células HEP-G2 infectadas por DENV-4 ativo e inativo	47
Figura 14: Adesão de Pv-iEs tripsinizados em células HEP-G2 infectadas por DENV4.	48
Figura 15: Adesão de Pv-iEs tratados com soro humano anti- <i>Plasmodium vivax</i> em células HEP-G2 infectadas por DENV-4	48
Figura 17: Citoadesão de PviEs em células HEP-G2 infectadas por DENV-4 na presença dos imunomoduladores BX795 e Cloroquina	50
Figura 18: Adesão de Pv-iEs em células HEP-G2 infectadas por DENV-4 tratadas com α -ICAM-1	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos avaliando sintomas e manifestações clínicas em pacientes coinfectados por dengue e malária.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADE - Aumento de anticorpo dependente
- CMC – Carboximetil celulose
- D0 - Dia 0
- D28 - Dia 28
- DC-SIGN - DC- molécula de adesão intercelular específica 3 agarradas a não integrinas
- DENV - Vírus do Dengue
- DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco
- EPCR - Receptor de proteína C endotelial
- FHD - Febre Hemorrágica do Dengue
- FMT-HVD - Fundação de Medicina Tropical
- HBMEC - Célula endotelial da microvasculatura do cérebro humano
- HCV - Vírus da hepatite C
- HEP-G2 – célula epitelial do hepatoma humano
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- HMEC-1- Célula endotelial da microvasculatura imortalizada
- HMVEC-d - Célula endotelial da microvasculatura primária
- HZ - Hemozoina
- ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1
- IL - Interleucina
- IFN- γ - Interferon-gama
- LES - Lúpus eritomatoso sistêmico
- LPS - Lipopolissacarideo
- MAVS - Proteína de sinalização antiviral mitocondrial
- MDA5 - Proteína 5 associada a diferenciação de melanoma
- PAMPS - Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
- PBMC - Células mononucleares do Sangue Periférico
- PCR - Proteína C reativa
- Pf - *Plasmodium falciparum*
- Pf-iEs - Eritrócitos Infectados por *P.falciparum*
- PRR - Receptor de Reconhecimento Padrão
- Pv - *Plasmodium vivax*

Pv-iEs - Eritrócitos Infectados por *P. vivax*
RER - Reticulo endoplasmático rugoso
RIG-I - Gene indutível pelo ácido retinoico I
SCD - Síndrome do Choque do Dengue
SFB - Soro fetal bovino
SDRA - Síndrome do desconforto respiratório agudo
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR - Receptor Toll
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
UV – Luz ultravioleta
UvDENV – Vírus da dengue inativado por luz ultravioleta
HCV - Vírus da hepatite C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Malária	18
2.1.1 Ciclo biológico da malária.....	19
2.1.2 Epidemiologia da Malária	20
2.2 Dengue	22
2.2.1 Ciclo de replicação do dengue	23
2.2.2 Epidemiologia de Dengue	24
2.3 Resposta imune	25
2.3.1 Resposta imune na malária.....	25
2.3.2 Resposta imune no dengue.....	28
2.3.1.1 Coinfecção na malária e vírus	31
2.3.1.2 Citoadesão em malária.....	33
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Critérios de Inclusão e Exclusão de pacientes	37
4.2 Comitê de Ética	37
4.3 Cultura de células e cepa viral de DENV4	38
4.4 Citometria de Fluxo.....	38
4.5 Isolamento e enriquecimento do parasita	38
4.6 Titulação Viral.....	39
4.7 Ensaio de citoadesão	40
5. ANÁLISES DOS RESULTADOS	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Células HEP-G2 expressam a molécula de adesão ICAM-1 em condições basais	42
6.2 Replicação de DENV4 e expressão da molécula ICAM-1 está aumentada em células HEP-G2	43
6.3 Citoadesão de <i>PviEs</i> em células HEP-G2 infectadas por DENV4	45
6.4 DENV-4 inativado não aumenta a citoadesão de <i>PviEs</i>	47
6.5 O tratamento de <i>Pv-iEs</i> com tripsina diminui a adesão na coinfeção dengue-malária.....	47
6.6 Anticorpos contra <i>Plasmodium vivax</i> não diminuem a adesão de <i>Pv-iEs</i> em células HEP-G2 infectadas por DENV4.....	48
6.7 A droga BX795 aumenta a expressão de ICAM-1 em HEP-G2 infectadas por DENV4, mas não aumenta na presença de Cloroquina.....	49
6.8 Citoadesão de <i>PviEs</i> em célula HEP-G2 infectada por DENV-4 diminui na presença do inibidor BX795, mas não com Cloroquina.....	50
6.9 Bloqueio de ICAM-1 reduz a citoadesão de <i>Pv-iEs</i> em células HEP-G2 infectadas por DENV4.....	50
7. DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÃO.....	56
9. REFERÊNCIAS	57

10. ANEXOS.....	65
------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, cerca de 8,5 bilhões de pessoas, pertencentes a países de climas tropicais e subtropicais estão em constante risco de adquirir dengue (DENV) e malária, doenças transmitidas por artrópodes do gênero *Aedes* e *Anopheles*, respectivamente. De modo predominante no Sul da Ásia, África e Amazônia, constituindo assim uma grande ameaça para os países em desenvolvimento (ANDERS; HAY, 2012; FAUCI; MORENS, 2012). DENV é uma das doenças infecciosas agudas com maior circulação no Brasil, representando um grave problema de saúde pública principalmente nas regiões de climas tropicais ou subtropicais. Fatores como clima, crescimento populacional desordenado, estruturas básicas inadequadas, migração da zona rural para urbana são algumas condições favoráveis para o desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da doença (COSTA; CALADO, 2016). O DENV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, sendo um vírus de cadeia simples, sentido positivo, com RNA agrupado em quatro sorotipos antigenicamente distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

DENV manifesta um espectro clínico muito amplo, podendo apresentar desde quadros assintomáticos à mais graves (hemorragia e choque), podendo evoluir para óbito. (ARAUJO; DESMOULIÈRE; LEVINO, 2014). Segundo dados do Ministério da Saúde, a região Norte em 2019 apresentou uma taxa de incidência de 195,8 casos/100 mil habitantes. Destes, o estado do Amazonas registrou 2,8 mil casos prováveis. Em Manaus, todos os sorotipos de dengue ocorrem simultaneamente (MOURÃO et al., 2015).

Assim como DENV, a malária também é uma doença prevalente na região Amazônica, sendo responsável por mais de 42% dos casos de malária nas Américas. Houve uma redução significativa do ano de 2000 com 1,2 milhões de casos para 427.000 casos em 2013 (WHO, 2015). A propagação da malária no Brasil é fortemente afetada pelas particularidades sociodemográficas, políticas e ambientais da região amazônica (SIQUEIRA et al., 2016). O principal vetor da transmissão é o mosquito *Anopheles darlingi* presente em aproximadamente 80% do país, onde 99,8% dos casos são restritos à região da Bacia Amazônica. O *Plasmodium vivax* (Pv) corresponde a 83,7% dos casos registrados, o *Plasmodium falciparum* (Pf) a 16,3%, sendo raramente observados casos por *Plasmodium malariae* (OLIVEIRA-FERREIRA

et al., 2010).

No estado do Amazonas, durante os anos de 1960 a 1980, a malária apresentou pequenos níveis endêmicos, com casos de epidemias em poucos municípios. Na capital Manaus, a incidência da malária é epidêmica devido a presença de migrantes em grande escala, que saem da periferia da cidade, onde há uma maior presença de criadouros do mosquito *Anopheles*. O aumento do desmatamento e a ocupação desordenada de áreas antes cobertas por mata, e agora por invasões, podem estar envolvidos com a reintrodução e permanência da doença (SARAIVA et al., 2009).

Segundo dados da FVS, em 2018 foram notificados 68.396 casos de malária. Houve uma redução de 10% no número de casos, comparado com 2017 que registrou 76.106 casos notificados. O ciclo biológico do parasita ocorre quando o mosquito injeta os esporozoítos na corrente sanguínea e parte deles, chegam aos hepatócitos e conseguem se multiplicar e dar origem aos merozoítos, estes se rompem e são liberados na corrente sanguínea infectando as células do sangue. Esse processo é capaz de evadir uma resposta imune e no caso da *malária falciparum* ocasionar o sequestro das formas maduras de trofozoítos e esquizontes do parasita para outros órgãos do corpo.

A capacidade do *Pf* evadir a resposta imunológica do ser humano está associada ao sequestro de eritrócitos infectados para outros órgãos e este fenômeno está correlacionado com sua maior patogenicidade. Uma vasta gama de receptores endoteliais como ICAM-1, CD36, EPCR (receptor de proteína C endotelial), PECAM-1, P-selectina, E-selectina dentre outros receptores podem se ligar a eritrócitos infectados por *Pf* facilitando a citoaderência a essas moléculas de ligação (METWALLY et al., 2017).

Estudos mostraram que o *Pv* também tem a capacidade de realizar o sequestro de eritrócitos infectados, embora este processo seja 10 vezes menor comparado com o *Pf*. Este mecanismo de sequestro está associado a malária *vivax* severa. Ainda que a infecção por *Pv* seja menos grave que por *Pf*, a acumulação em determinados órgãos como pulmão e placenta de eritrócitos infectados por *Plasmodium vivax* (*Pv*-iEs) está relacionada a uma resposta inflamatória exacerbada e com um quadro clínico grave (CARVALHO et al., 2010)

Atualmente, uma co-infecção entre malária e outras diferentes espécies de vírus, como o HIV e influenza, tem sido reportada como um emergente problema

mundial. Na África sub-sahariana, estudos recentes têm demonstrado que pacientes infectados com o HIV (HOCHMAN; KIM, 2009) e a Influenza (THOMPSON et al., 2012) são mais susceptíveis à infecção por Pf. Além do mais, a infecção por Pf tornam os pacientes HIV mais vulneráveis para a progressão do quadro clínico da AIDS (CUADROS; BRANSCUM; CROWLEY, 2011; ROGERSON; WIJESINGHE; MESHNICK, 2010). Visto que, nesses pacientes a gravidade do quadro clínico poderá favorecer um aumento da citoaderência de *PfiEs*.

Como mencionado anteriormente, a malária e a dengue são doenças transmitidas por artrópodes para os seres humanos e consideradas emergentes. A co-infecção DENV-malária foi relatada em alguns estudos realizados na Índia, Paquistão, sudeste da Ásia, Guiana Francesa e Brasil. Além disso, colaboradores do nosso grupo, observaram a presença de co-infecção de DENV e malária (Pv e Pf) em regiões endêmicas, o quadro clínico destes pacientes parece ser mais grave (EPELBOIN et al., 2012; GUZMAN et al., 2010; HATI et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012). No entanto, até o presente momento não há estudos envolvendo a resposta imune em pacientes co-infectados com DENV-malária.

Tanto dengue quanto malária ocorrem em áreas endêmicas de países em desenvolvimento e ambas as patologias podem ocorrer simultaneamente. A infecção simultânea poderia levar o paciente a manifestar um quadro clínico mais grave, uma vez que na malária ocorre o mecanismo de citoadesão dos eritrócitos infectados pelo *plasmodium*, com o sequestro das formas maduras do parasita para outros órgãos do corpo, uma coinfecção poderia intensificar essa citoadesão. Nossa hipótese é de que células que são permissíveis tanto a infecção por dengue quanto malária e que apresentam os receptores envolvidos no processo de citoadesão, possam aumentar a citoadesão quando infectadas por DENV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Malária

Em países tropicais e subtropicais, a malária continua a ser um grave problema de saúde pública comparado com outras doenças parasitárias. Os mosquitos transmissores da malária pertencem ao gênero *Anopheles* e a ordem dos dípteros da família *Culicidae*. A transmissão ocorre em maior parte nas áreas rurais e em menor proporção em áreas urbanas. Nas últimas décadas, o mundo vêm realizando medidas preventivas para o controle da malária (ALONSO; TANNER, 2013). A malária continua endêmica em 20 países das Américas, onde a maior parte dos casos ocorrem na sub-região amazônica. A Argentina está em processo de certificação da erradicação da doença, além de países como Belize, Costa Rica e El Salvador, Equador, México e Suriname que já reduziram a incidência de casos autóctones. No Brasil, a área endêmica para a transmissão da doença é a Região Amazônica que correspondem a 99% dos casos apresentados no país. A região Amazônica, de todo o cenário brasileiro é considerada a área de maior endemia para malária, por apresentar condições socioeconômicas e ambientais tais como saneamento básico, clima e temperatura que favorecem a proliferação do vetor (PARISE, 2009)

Para o controle e prevenção da presença do vetor em áreas endêmicas é realizada a distribuição de redes tratadas com inseticidas, pulverização residual interna, controle do vetor (redução da densidade do vetor ou da taxa de infectividade) (YEWHALAW et al., 2017; HALSEY et al., 2017). Um dos problemas a serem enfrentados agora é a resistência do parasita ao tratamento contra malária. Em estudos realizados na Papua Guinéa, verificou-se a resistência de Pv a cloroquina, assim como ocorre em Pf (RUNGSIHIRUNRAT et al., 2015).

Como apoio a prevenção e controle da malária, a empresa britânica GlaxoSmithKline (GSK), está testando a vacina RTS,S em criança com idade entre 6 semanas a 17 meses na região. Os casos de malária foram reduzidos em 39% nos primeiros 4 anos de vidas das crianças e 27% para os bebês. A RTS,S possui como alvo a proteína de circunsporozoíta (CSP) do Pf, que é expressa no esporozoito do *Plasmodium* durante o estágio do seu ciclo de vida que ocorre nos hepatócitos (MORIS; JONGERT; MOST, 2017).

2.1.1 Ciclo biológico da malária

A transmissão ocorre após a picada do mosquito *Anopheles* fêmea durante o repasto sanguíneo com intuito de alimentar sua prole. No momento da picada, ocorre a inoculação da forma infectante para os humanos (os esporozoítos). Esses esporozoítos são levados da corrente sanguínea para os hepatócitos (ciclo pré-eritrocítico), onde amadurecem e transformam-se em merozoítos (ACHARYA et al., 2017). Esses merozoítos se rompem e são liberados na corrente sanguínea, onde infectam as hemácias, dando início a fase intraeritrocitária, onde ocorre a transformação de merozoítos em trofozoítos, que futuramente darão origem aos esquizontes. Esses esquizontes rompem-se e são liberados para a corrente sanguínea na forma de merozoítos, que podem infectar novos eritrócitos ou se diferenciar em gametócitos masculino ou gametócitos feminino (KIRK, 2001).

Os gametócitos masculino e feminino podem ser ingeridos pelo mosquito ao alimentar-se de sangue de uma pessoa infectada, dando fim a fase de esquizogonia. A próxima fase do ciclo ocorre no mosquito, chamada de esporogonia. Ao ingerir os gametas após o repasto ocorre a exflagelação, os gametócitos feminino diferenciam-se em macrogametócito no *Anopheles*. O microgameta se funde com o macrogameta dando origem ao zigoto, que se transforma na forma movél, o oocineto, no intestino médio do vetor, o oocineto se transforma em oocisto (havendo a formação de esporozoítos). Os oocistos se rompem e liberam milhares de esporozoítos para as glândulas salivares dos mosquitos, estando prontos para continuar o ciclo e infectar novos hospedeiros vertebrados (**Figura 1**) (MATUSCHEWSKI, 2006).

Na malária por Pv, ocorre um processo chamado de recaída, na qual a forma de hipnozoítas, ficam de forma latente no fígado e pode resultar na liberação de merozoítos para a corrente sanguínea, dando início novamente a infecção (WHITE, 2011).

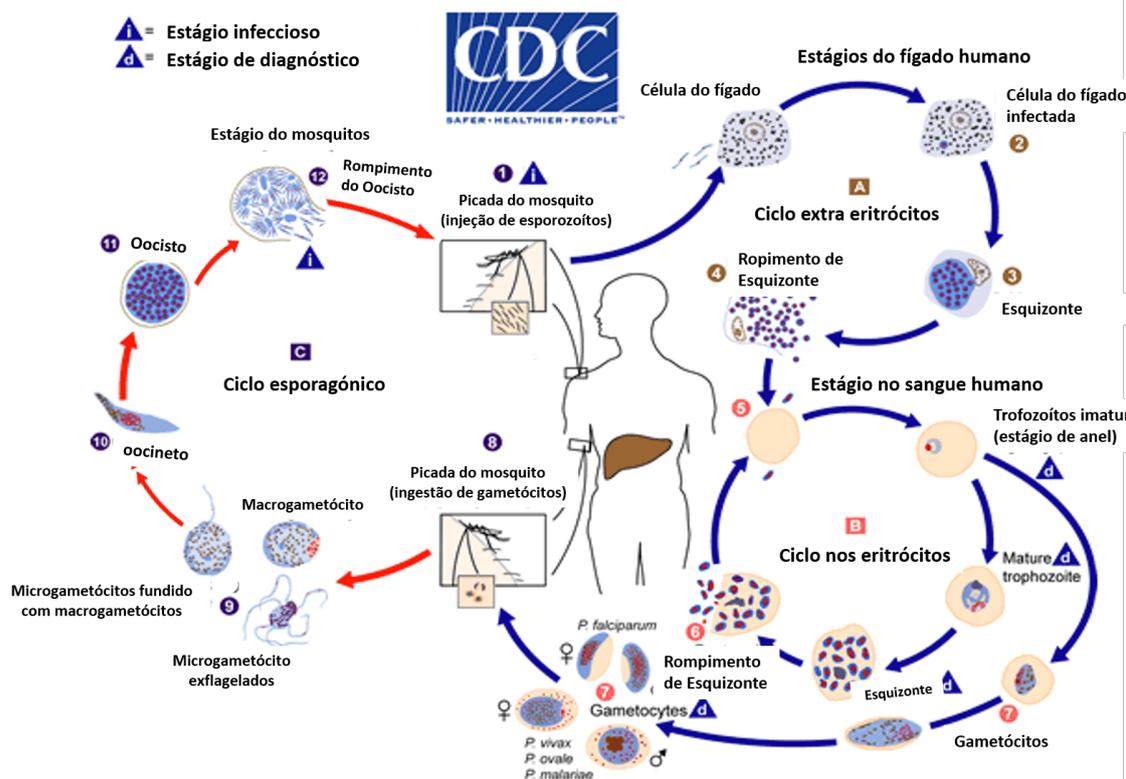
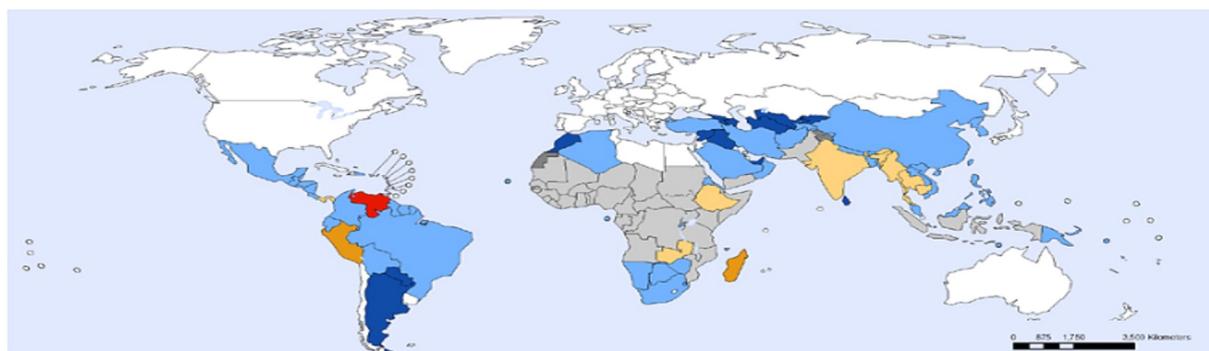


Figura 1: Ciclo biológico do *Plasmodium*. Fonte: Adaptado da sigla em inglês CDC (Centers for disease control and prevention).

2.1.2 Epidemiologia da Malária

Em 2017, estima-se que 219 milhões de casos tenham ocorrido mundialmente. Destas, cerca de 435.000 mortes por malária ocorreram em todo o mundo. No continente africano, ocorre a maior prevalência dos casos de malária no mundo, sendo responsável por aproximadamente 92% dos casos e 93% das mortes relacionadas a malária, o que ocorre principalmente em crianças menores de 5 anos por serem mais susceptíveis a doença, infecção e mortalidade. Em seguida, para os casos de incidência de malária estão o Sudeste da Ásia (5%) e Região oriental do Mediterrâneo (2%). A taxa de incidência de malária caiu para 18%, globalmente no período de 2010 a 2017. Mundialmente, cerca de 266 mil crianças vieram a óbito em 2017. Mesmo havendo redução na taxa, ainda continua elevado o número de mortes em menores de 5 anos em áreas endêmicas (**Figura 2**) (WHO, 2019).



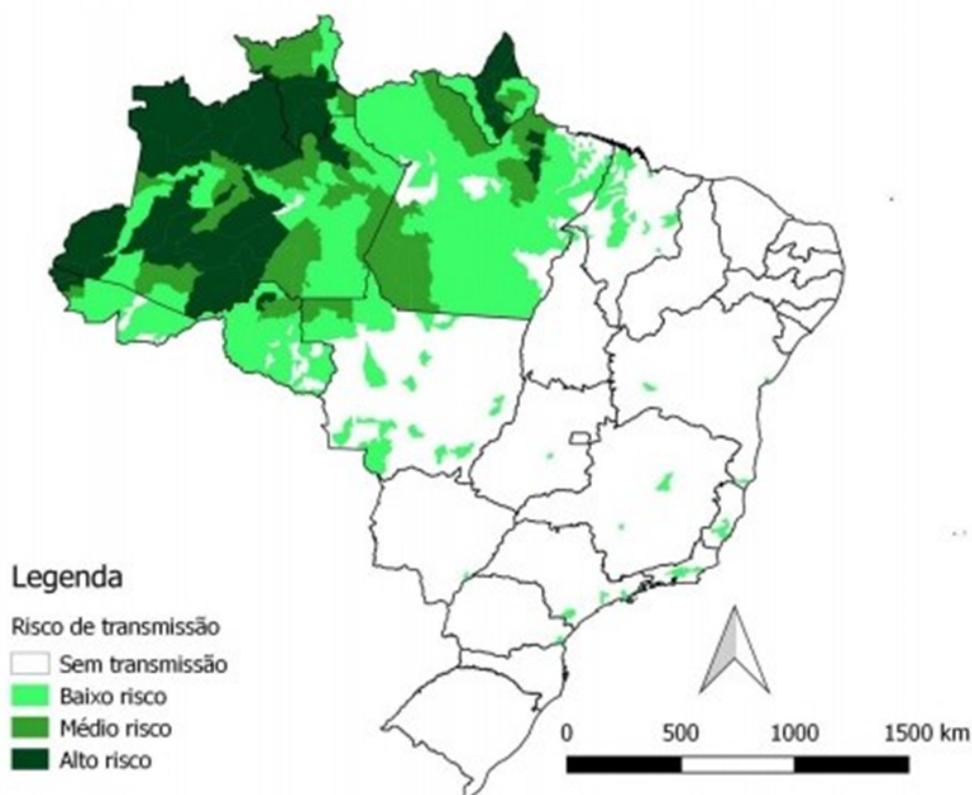
Taxas de incidência de Malária, por país 2000-2015



Figura 2: Incidência de malária globalmente. **Fonte:** Adaptado de (WHO,2015).

No Brasil, há 3 espécies responsáveis pela incidência da malária: Pv, Pf e Pm. Casos esporádicos podem ocorrer no Brasil por *Plasmodium ovale*, mas isto se deve a importação de infecções advindas de regiões do continente africano, já que esta espécie é restrita a este continente. O Brasil apresenta uma média de 422.858 casos totais por ano. De acordo com o Ministério da Saúde, em 2018, o Brasil registrou 186.863 novos casos de Malária (**Figura 3**). Dentre esses, mais de 90% dos casos ocorreram na Região Amazônica. A Região Amazônica é composta por: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Cerca de 73% dos casos registrados oriundos de outros países, pertencem a Venezuela. Os países africanos representam uma menor proporção nesse número de casos (Brasil, 2019).

Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2017.



Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Dados preliminares, sujeitos à alteração.

Figura 3: Epidemiologia de malária no Brasil. **Fonte:** Sinan e Sivep-Malária/SVS/MS.

Conforme dados do relatório do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, o estado do Amazonas em 2019 notificou 63.361 casos de malária, correspondendo um total de mais de 20% dos casos da Amazonia Legal. Os municípios que tiveram maior incidência de casos de malária foram São Gabriel da Cachoeira, Barcelos, Manaus e Santa Isabel do Rio Negro. A Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas também registrou uma diminuição no número de casos por Pf, foram 1.417 casos a menos em relação ao ano anterior. O número de internações também reduziu tanto no estado quanto nos municípios 16% e 15,8%, respectivamente (Brasil, 2011).

2.2 Dengue

DENV é transmitido pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e em menor proporção pelo *Aedes albopictus*. O DENV possui 4 sorotipos circulantes, antigenicamente distintos (DENV1-4), os quais pertencem a família Flaviviridae do gênero *Flavivirus*. (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013). É um vírus de RNA,

com polaridade positiva e cadeia simples codificando 10 proteínas, sendo estas divididas em três proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (prM) e envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (BÄCK; LUNDKVIST, 2013).

A prevenção e controle da dengue pode ser em três etapas: controle físico, controle biológico e controle químico. No controle físico, são medidas preventivas: o mapeamento dos focos de dengue, vigilância, determinação dos locais de oviposição, programas de controle nas comunidades e educação de estratégias de prevenção. Como estratégia no controle biológico pode-se utilizar: bactérias geneticamente modificadas que são reintroduzidas no vetor limitando assim a transmissão da doença, vetores geneticamente modificados, uso de técnica de insetos estéreis, peixes larvicolas e crustáceos. O controle químico tem como foco o uso de inseticidas e derivados de plantas, reguladores de crescimento de insetos, feromônios como abordagem de atrair e matar o inseto (RATHER et al., 2017).

Embora dengue não seja uma doença recente, ainda não há comercialização de vacinas específicas mundialmente, mas existem algumas vacinas candidatas. Uma dessas candidatas é vacina Dengvaxia que foi recentemente aprovada em 12 países incluindo o Brasil, para indivíduos de 9 a 45 anos que moram em áreas endêmicas, e vêm sendo licenciada nesses países desde dezembro de 2015. Essa aprovação foi baseada em estudos de fase III, porém os estudos ainda estão avaliando a melhor definição da eficácia da vacina e segurança (FEZZAZI, EL et al., 2017; WICHMANN et al., 2017).

2.2.1 Ciclo de replicação do dengue

A infecção pelo DENV inicia quando o mosquito realiza seu repasto sanguíneo no hospedeiro e o vírus é introduzido. A partir da picada, o vírus entra e internaliza em uma célula por endocitose, mediada pelos receptores do hospedeiro como Dendritic Cell- molécula de adesão intercelular específica 3 agarradas a não integrinas (DC-SIGN), sulfato de heparan, glicosíngolípido nLc4Cer, manose, CD14 e HSP70/90. Após a entrada do vírus ocorre a acidificação do endossoma, fazendo com que haja a fusão da membrana vesicular e viral, permitindo a entrada do nucleocápsídeo no citoplasma e no genoma (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015).

O RNA de sentido positivo é traduzido em uma grande poliproteína no retículo endoplasmático rugoso (RER). Essa poliproteína é processada por clivagem pela

ação de proteases virais e do hospedeiro gerando as proteínas estruturais maduras. Após essa clivagem, ocorre a tradução do RNA sentido positivo em um RNA de sentido negativo, que atua como uma fita molde para formar novas partículas virais de sentido positivo. Os virions imaturos ficam no RER, durante seu transporte para o meio extracelular, a proteína prM funciona como uma proteção, para impedir a fusão prematura. Com a maturação dos virions no complexo de Golgi, através da clivagem da proteína prM em M, as partículas virais estão prontas para serem liberadas por exocitose no meio extracelular (**Figura 4**) (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009).

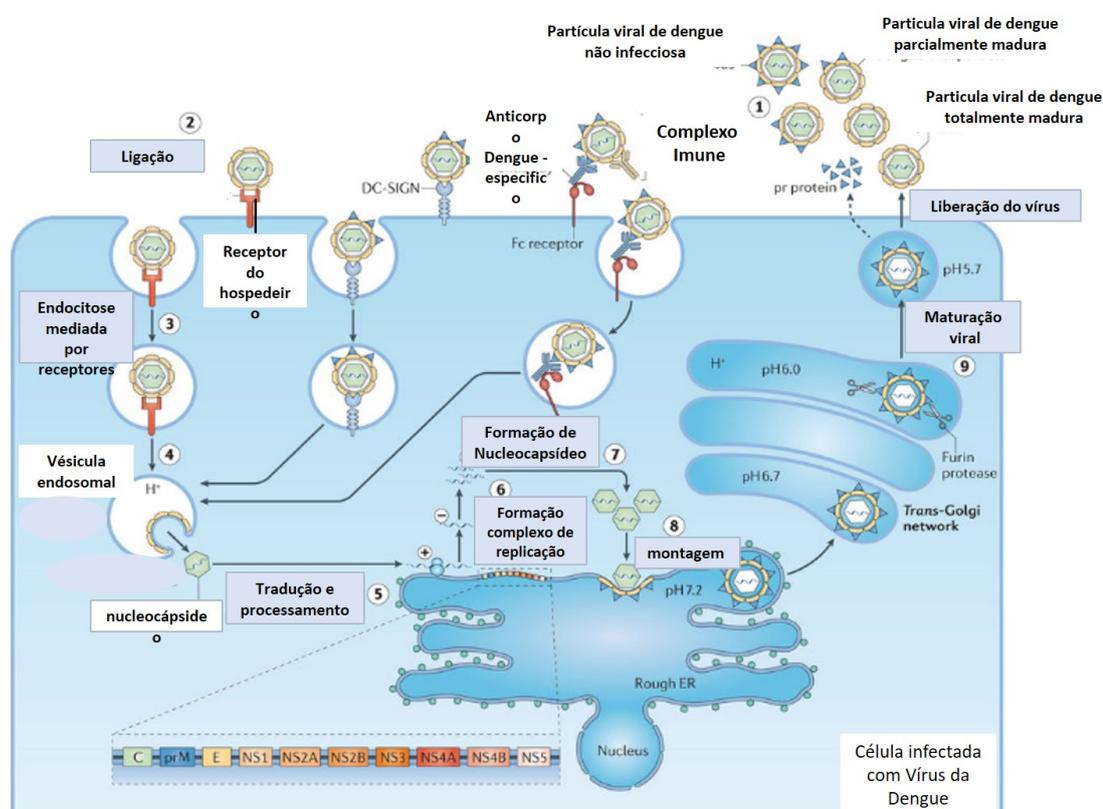


Figura 4: Ciclo de replicação do DENV. **Fonte:** Adaptado de (SCREATON et al., 2015)

2.2.2 Epidemiologia de Dengue

Nos últimos anos, a incidência de dengue aumentou mundialmente, muitos casos de dengue estão subnotificados, no entanto, uma estimativa recente indica que 390 milhões de indivíduos podem ser infectados por ano, desses 96 milhões podem apresentar sintomas. Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas em 128 países, estão em risco de infecção por dengue. De 2010 para 2016, os números de registros aumentaram de 2,2 milhões para 3,2 milhões. O número de casos em toda a América,

Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental superaram a margem de 3,4 milhões em 2016. Em 2016, as Américas relataram mais de 2,35 milhões de casos (WHO, 2017).

No Brasil, segundo dados do boletim epidemiológico lançado pelo Ministério da Saúde, em 2019 até a semana epidemiológica 11 (SE 11), foram registrados mais de 229 mil casos prováveis de dengue, tendo uma incidência de 109,9 casos/100 habitantes. A incidência por regiões geográficas mostrou que as regiões Centro-oeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas de incidência: 250,8/100 mil hab. casos e 170,8/100 mil hab., respectivamente (Brasil, 2019).

No estado do Amazonas em 2016, foram notificados 3694 casos de dengue, destes 204 obtiveram positividade para dengue. A taxa de incidência de casos notificados foi de 97,8/100.000 habitantes. Em 2019, de acordo com a SE 11 do Ministério da Saúde, o estado do Amazonas registrou 4.080.611 casos prováveis, com uma taxa de incidência de 18,6 casos/ 100 mil hab. (FVS, 2016; Brasil, 2019).

2.3 Resposta imune

A resposta imunológica é realizada pelo sistema imune inato (responsável pelo reconhecimento dos microrganismos patogênicos) e adaptativo (responsável pela memória imunológica e os perfis de resposta imune celular e humoral). O reconhecimento do Padrão Molecular Associado aos Patógenos (PAMPs) é realizado principalmente pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), Toll-like receptores (TLR) e RIG-like receptores (RLRs) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). A ativação desses PRRs modula a expressão de citocinas e de receptores de superfície em monócitos e células endoteliais. No entanto, as vias de sinalização envolvidas na resposta imune contra malária e DENV ainda não estão totalmente estabelecidas.

2.3.1 Resposta imune na malária

Na malária, um dos principais PRR's envolvidos são membros da família TLR's como TLR-2, TLR-4 e TLR-9, no entanto, o papel deles na patologia ainda não está claro. O fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) é essencial para a produção de citocinas por meio de TLR's (COBAN et al., 2007). Os fagócitos, como por exemplo a célula dendrítica, macrófagos e monócitos, apresentam em sua superfície os TLR's, o mecanismo de ação de reconhecimento através de PAMP's do patógeno incluem GPI, hemozoina e toxinas permitindo a ativação dessas células. Na malária, ocorre um fenômeno chamado tempestade de citocinas, onde o patógeno induz uma

produção exacerbada da produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-6. Os macrófagos e monócitos são os principais mediadores, para que ocorra esse evento que é observado durante o período de fase aguda da doença (LÓPEZ et al., 2017);(HUNT; GRAU, 2003; PORTILLO et al., 2012).

Foram estudados até o momento 3 componentes no parasita capazes de induzir uma resposta imune no hospedeiro: glicosilfosfatidinositol (GPI), hemozoina, DNA e RNA. GPI's são estruturas de carboidratos preservada, etanolamina-fostato-6Mana1-2Mana1-6Mana1-4GlcN, alpha (1-6) - ligada para o PI. Estes ativam a proteína tirosina quinase e a proteína quinase C, que juntos regulam a ativação do fator de transcrição NF-kB. Os efeitos danosos de GPI's podem ser associadas a possibilidade de induzir o TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, que contribuem para a patologia da doença. Estudos mostraram que o reconhecimento de GPI's de Pf por macrófagos ocorre por TLR2 e em menor proporção por TLR4 (Figura 5) (KRISHNEGOWDA et al., 2005)

A hemozoina (HZ), também conhecida como pigmento malárico é gerada a partir da desintoxicação de moléculas de heme que persistem nos vacúolos alimentares na malária. Quando ocorre a ruptura do esquizonte e fagocitose pelas células mielóides ocorre a liberação de HZ intracelular na circulação sanguínea, ocasionando sua concentração no reticulo-endotelial. Estas, assim como GPI's também ativam macrófagos para produzir citocinas, quimiocinas e óxido nítrico pró-inflamatórios e aumentam também a maturação de células dendríticas mielóides. Verificou-se que tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*, a HZ complexada ao DNA ativa TLR9 e esta ativação é dependente de MyD88 (**Figura 5**) (COBAN et al., 2005).

No entanto, ainda não é claro o papel da HZ na resposta imunológica, não se sabe se há outros receptores envolvidos além do TLR9. Pesquisas estão sendo desenvolvidas para identificar se este pode ativar o NLRP3 e os componentes da cascata de ativação do inflamassoma, sendo responsável por uma maior liberação de citocinas pró-inflamatorias (OLIVIER et al., 2014).

O genoma de Pf possui aproximadamente 300 CpG e 6000 motivos rico em AT imunoestimuladores, Pv possui um número parecido, contém próximo de 200 CpG. Quando estes estão no fagolissomos ativam o receptor TLR9. O DNA de esquizontes também induz a ativação de TLR9, através de sua presença citosólica (GOLENBOCK et al., 2014). Além disso, o RNA citosólico do *Plasmodium* induz a ativação de TLR7 via proteína 5 associada ao melanoma de diferenciação (MDA5) e não via RIG- I

(BACCARELLA et al., 2013)

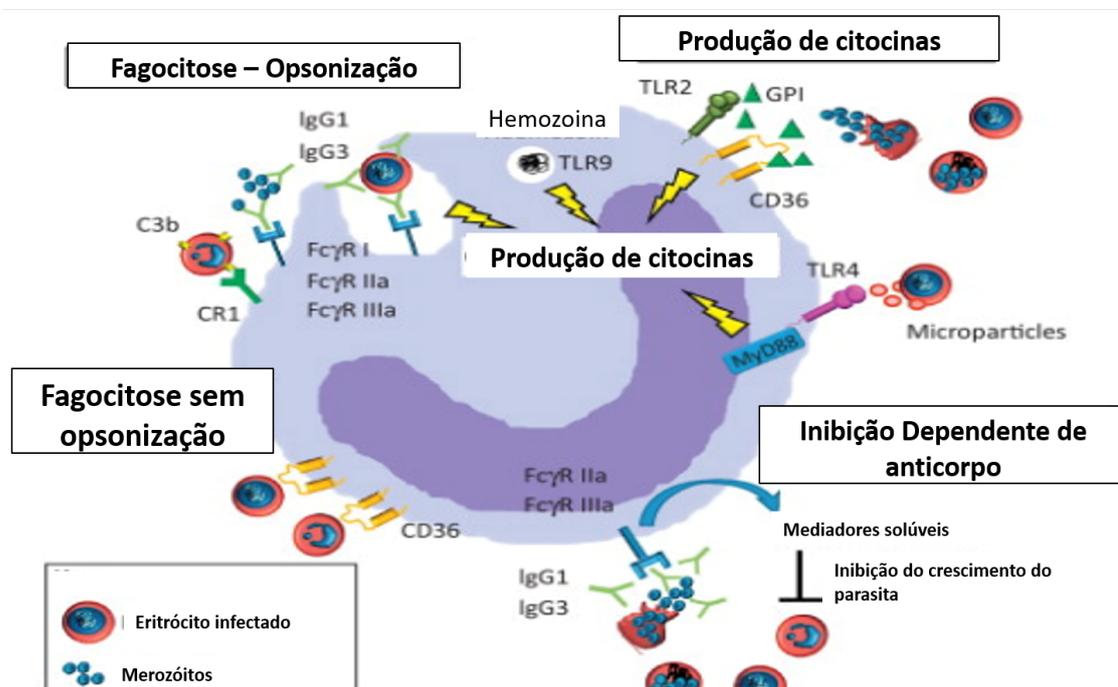


Figura 5. Ativação de monócitos/macrófagos por PAMP's do *Plasmodium*. **Fonte:** Adaptado de (CHUA et al., 2013).

Mediante uma infecção por malária, o hospedeiro produz uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias como: IL-6, TNF- α , IL-1, IL-12 IFN- γ , essas citocinas tem papel importante no crescimento parasitário (GOWDA, 2007). Segundo SAMPAIO; ERIKSSON; SCHOFIELD, 2018), macrófagos e monócitos de pacientes infectados com *plasmodium falciparum* apresentaram um nível menor de NF- κ B, TNF- α , IL-10, IL-6, MCP-1 (proteína quimioatraente monocitária), MIP-1 α (proteína 1 α) e MIP-1 β , sugerindo que essa regulação imune por Pf-EMP, afeta fatores de transcrição, citocinas e quimiocinas do hospedeiro.

A cloroquina além de ser usada como droga antimalárica, também tem um papel anti-inflamatório. Em doenças autoimunes é usada para tratar pacientes com LES (lúpus eritematoso sistêmico). A cloroquina com potencial anti-inflamatório interage com os ácidos nucleicos que são reconhecidos por TLR's, como consequência da interação da cloroquina com os ácidos nucleicos causam modificações estruturais nos TLR's impedindo que haja reconhecimento dos ácidos nucleicos. Um outro papel importante da cloroquina é a inibição da autofagia ao prejudicar a ligação do autofagossomo com os lisossomos. O fármaco também induz uma desorganização grave do complexo de Golgi endo-lisossômico, isso pode ter

como consequência o comprometimento da fusão e produção de novas proteínas (KUZNIK et al., 2011; MAUTHE et al., 2018).

2.3.2 Resposta imune no dengue

DENV pode ocasionar uma febre rápida ou uma forma mais grave, denominada febre hemorrágica. A patologia pelo DENV pode propiciar algumas alterações no sistema imune como: derrame vascular, diátese hemorrágica, ascite, derrame pleural, anemia e trombocitopenia. A trombocitopenia, desequilíbrio na regulação da coagulação e fibrinólise talvez sejam indutores da dengue hemorrágica (YEH et al., 2013a).

Durante uma infecção viral, o sistema imune inato reconhece RNA ou DNA do vírus através de PRR's, gerando um estado antiviral. Na resposta imune para dengue, os PRR's que estão correlacionados a induzir uma resposta imune são o gene indutível pelo ácido retinoico I (RIG-I) e a proteína 5 associada a diferenciação de melanoma (MDA5), além desses, o TLR3 e TLR7 participam do reconhecimento do vírus da dengue. O RIG-I ativa a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS). Como consequência dessa ativação, há a ativação da quinase de ligação TANK1 (TBK1) através de TRIF associado a TRAF3, levando a fosforilação de IKK ϵ , fatores reguladores de IFN fosforilantes (IRF3 e IRF7) que entram no núcleo para induzir a produção de IFN tipo I como IFN β . Vários inibidores para TBK1 já foram descobertos, dentre eles, o inibidor BX795, assim com a inibição de TBK1 não é possível ocorrer a fosforilação de IKK ϵ e gerar um estado antiviral, permitindo assim que o vírus possa se replicar ainda mais (CLARK et al., 2009; UNO; ROSS, 2018).

Estudos mostraram que algumas citocinas estão aumentadas em pacientes com febre hemorrágica do dengue, estas incluem, TNF- α e IFN- γ , contribuindo para o aumento da permeabilidade de células endoteliais durante o curso da doença, no entanto, outras citocinas também podem estar envolvidas como IL-12, IL-6 e IL-8. A infecção pelo DENV modifica a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e a produção de citocinas (DEWI; TAKASAKI; KURANE, 2004).

A ativação exacerbada de NF- κ B na resposta imune contra o DENV reduz o clareamento viral e ocorre uma produção aumentada de citocinas que afetam os monócitos e a permeabilidade das células endoteliais, aumentando a expressão de ICAM-1, CD-36 (YEH et al., 2013a). Essa elevação na expressão de receptores

ligantes de monócitos e plaquetas ativam estas células e aumentam os danos vasculares. Os mecanismos iniciais da patogênese dessa doença ainda estão sendo estudados e mais estudos são necessários para entender melhor o mecanismo de citoadesão de receptores e ativação de PRRs em células endoteliais infectadas pelo DENV.

Nas infecções por DENV, ocorre um fenômeno no qual infecções secundárias por diferentes sorotipos do dengue, podem levar a um aumento na gravidade da doença. O sistema imune após uma primo-infecção por um determinado sorotipo do vírus, leva a uma imunidade protetora posteriormente ao mesmo sorotipo viral da primeira infecção. Mas em infecções secundárias por heterótipos diferentes pode ocorrer um melhoramento dependente de anticorpo sigla em inglês de (ADE) Esse mecanismo de ADE inibi uma resposta antiviral através da diminuição da resposta de RLR-MAVS reduzindo a autofagia celular (HUANG et al., 2016)

Os anticorpos reativos cruzados neutralizantes que visam proteínas estruturais virais facilitam a infecção de células portadoras do receptor Fcy, levando a um aumento da carga viral. O aumento de anticorpos dependentes e células T de reação cruzada são hipotéticas para desencadear uma resposta imune exacerbada e distorcida a um sorotipo diferente de DENV, resultando em uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 que levam a permeabilidade vascular e endotelial (DEJNIRATTISAI et al., 2010; BEATTY et al., 2015).

No DENV ocorre uma disfunção da barreira endotelial ocasionada pela replicação viral, o qual leva o extravasamento plasmático, porém essa disfunção ainda é mal compreendida. Alguns estudos vêm mostrando que esse vazamento plasmático ocorre devido a uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, fatores de angiogênese e outros mediadores (por exemplo trombina, metaloproteinases e prostaglandinas), ocasionando uma diminuição da função da barreira endotelial e como consequência um aumento da permeabilidade vascular (LIU et al., 2009). As plaquetas também podem liberar uma grande quantidade de fatores, incluindo citocinas que alteram a levam a uma alteração da função endotelial e manifestações patológicas. Durante a infecção por dengue, as plaquetas ativam as vias dependentes de caspase-1 para liberar IL-1 β , essa liberação de IL-1 β está associada a um aumento da permeabilidade vascular durante a doença por DENV (HOTTZ et al., 2013)

Células endoteliais infectadas por DENV em pacientes pode agravar o quadro clínico do hospedeiro, como mencionado anteriormente essa alteração das funções

das barreiras permite a ativação de células do sistema imune aumentando a produção de citocinas e quimiocinas contribuindo para uma maior viremia (Figura 6). A proteína não estrutural NS1 que serve como marcador de diagnóstico para infecção aguda por DENV, pode se ligar a componentes do complemento do hospedeiro e inibir a ativação do complemento (BEATTY et al., 2015)

Os anticorpos reagem de forma cruzada com plaquetas, células endoteliais e trombina sugerindo que assim contribuam para a patogênese. Estudos verificaram que os proteoglicanos de heparan sulfato tiveram uma alta expressão em células endoteliais da microvasculatura primárias (HMVEC-d) e imortalizadas HMEC-1 infectadas com DENV. Derivados de *Escherichia coli* sulfatados conseguiram bloquear a infecção por DENV das células HMVEC-d e HMEC-1 mostrando que o vírus se liga ao receptor heparan sulfato das células. No entanto, esse mecanismo da gravidade de dengue como evasão da resposta imune por células endoteliais ainda é mal compreendido (DALRYMPLE; MACKOW, 2011; VERVAEKE et al., 2013).

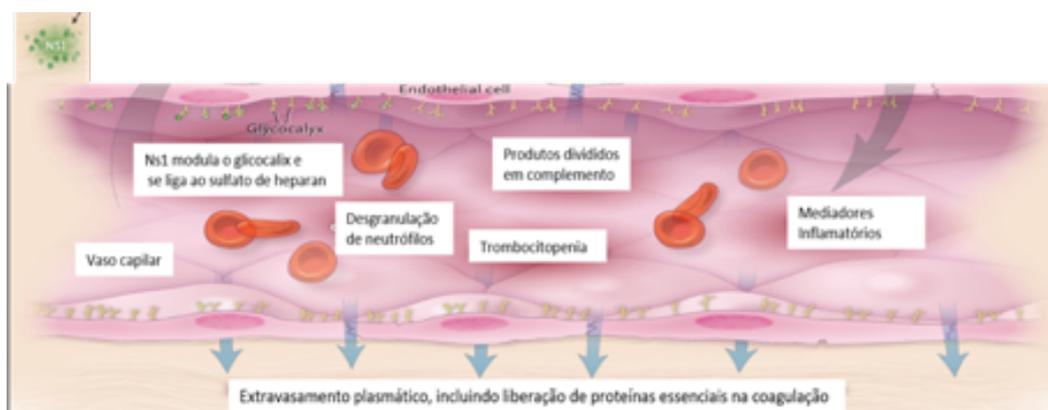


Figura 6: Representação esquemática do mecanismo de replicação viral de dengue através de células endoteliais.

O DENV, utiliza células como macrófagos, monócitos, células dendríticas e HEP-G2 para sua replicação. O vírus sofre endocitose via clatrina causando a ativação proteolítica de caspase 4, 7, 8 e 9, e mudança no potencial de membrana dessas células. Isso mostra que o vírus pode utilizar vários mecanismos para se replicar. Além disso, mostra a possibilidade do vírus se direcionar para vários compartimentos celulares do hospedeiro (THEPPARIT et al., 2004; SUKSANPAISAN; SUSANTAD; SMITH, 2009a).

A resposta imune em pacientes coinfectados com dengue e outros vírus já é descrita na literatura. Por exemplo, uma infecção concomitante entre Zika e dengue

reduz a capacidade de células TCD4 a produzir citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , e IL-2. Uma hiporresponsividade das células T efectoras, em uma grande maioria de pacientes agudos contra o antígeno da DENV NS1 pode ocorrer devido a uma exaustão clonal. Uma capacidade reduzida da função de células T, pode interferir no desenvolvimento de linfócitos de memória específicos ou de reação cruzada proporcionando uma baixa resposta em infecções futuras com outros arbovírus. (BADOLATO-CORRÊA et al., 2017)

Outra possível infecção simultânea é a de DENV com o vírus da influenza. Um estudo feito com camundongos infectados observou que ocorre aumento no título de anticorpos de DENV em órgãos como pulmão, rins e baço gerando um fenótipo exacerbado da doença. Além disso, esses animais apresentaram pneumonia grave, com necrose dos pulmões, e um maior número de neutrófilos em comparação com macrófagos ou monócitos. Essa infecção conjunta de DENV e vírus da influenza no estudo mostrou ser letal para os camundongos (BADOLATO-CORRÊA et al., 2017; SCHMID et al., 2017). Entretanto, a coinfeccao entre vírus e o parasita da malária também é possível.

Na literatura, vêm sendo descrito que o quadro clínico de pacientes coinfectados tendem a ser mais grave do que mono infectados. Um estudo retrospectivo realizado na Guiana Francesa no período de 2004 a 2010, identificou em 104 pacientes coinfectados com dengue e malária, que o nível de plaquetas e hematócrito estavam diminuídos, bem como proteína C reativa elevada (PCR) e baixa carga parasitaria de Pf (EPELBOIN et al., 2012).

2.3.1.1 Coinfecção de malária e vírus

A coinfecção entre malária e outros vírus já vêm sendo estudada a algum tempo. Alguns estudos verificaram que a contagem de células CD4 em pacientes coinfectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e malária diminui significativamente em comparação com mono infectados. Pacientes coinfectados apresentam malária grave associada ao HIV, caracterizada por uma alta parasitemia e anemia grave. As citocinas produzidas por células Th1 podem não ser protetoras contra a malária. A expansão de células Th17 e efectoras IL-22 podem atuar concomitantemente com os anticorpos e outros componentes imunológicos para evitar a malária fatal em pacientes com apenas o *plasmodium* em seu organismo

(RYAN-PAYSEUR et al., 2011; JEGEDE et al., 2017).

Uma outra possível infecção simultânea é da malária com o vírus da hepatite C (HCV), os últimos utilizam os hepatócitos para a replicação viral e parasitária, devido a esse mecanismo de compartilhamento de replicação no mesmo local, uma possível coinfeção de malária e HCV pode tornar o quadro de qualquer uma das doenças mais grave (NASIR; YAKUBU; MUSTAPHA, 2017).

A infecção simultânea por dengue e malária também é capaz de ocorrer. Alguns estudos mostraram que pacientes que apresentam concomitantemente as duas infecções podem manifestar um quadro clínico mais grave, podendo desenvolver anemia, hemorragia, plaquetopenia, febre, dentre outras manifestações clínicas. Esses patógenos têm tropismo por algumas células humanas, podendo levar ao aumento da permeabilidade vascular, facilitando a replicação viral e permissividade à infecção do parasita (EPELBOIN et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012; NG et al., 2015; DIONICIO et al., 2018).

Tabela 1: Estudos avaliando sintomas e manifestações clínicas em pacientes coinfectados por dengue e malária.

Espécie de <i>Plasmodium</i>	Local de estudo	Quadro clínico	Referências
P. vivax e P. falciparum	Cayene (Guiana Francesa)	Febre prolongada, anemia, trombocitopenia e baixo hematócrito	Epelboin et al, 2012.
P. vivax	Amazonas (Brasil)	Icterícia, vômito, síndrome febril aguda, mialgia, artralgia, dentre outros sintomas.	Magalhães et al, 2012.
P. vivax e P. falciparum	Lahore (Paquistão)	Icterícia	Assir, Masood, Ahmad, 2014
P. vivax	Amazonas (Brasil)	Trombocitopenia e baixo hematócrito	Magalhães et al, 2014
P. vivax	Amazonas (Brasil)	Hemorragia, febre prolongada, vômito, hepatomegalia e icterícia.	Mendonça et al, 2015

2.3.1.2 Citoadesão em malária

A mortalidade e a morbidade diferem para as espécies de parasita *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Pf tem um poder de se multiplicar em maior escala e infectar mais eritrócitos (*Pf-iEs*) contribuindo para sua maior virulência. Mas é o deslocamento das formas maduras de eritrócitos infectados por Pf da circulação sanguínea para outros órgãos do corpo que causam o sequestro. Este é um evento patogênico chave para o estabelecimento da infecção, fazendo com que raras formas maduras de *Pf-iEs* sejam observadas no sangue periférico durante a doença. Em Pv, a circulação das formas maduras do parasita podem ser observadas frequentemente em amostras de sangue periférico, sugerindo que esse sequestro talvez não ocorra com esta espécie. A maioria dos casos de malária grave registrados são quase que exclusivos em Pf, exemplos disso são os episódios de malária cerebral e placentária (CARVALHO et al., 2010b).

A citoaderência por Pf às células endoteliais é um fenômeno bastante conhecido que coopera para uma maior patogenicidade e sequestro parasitário (ROWE et al., 2009). Um estudo realizado por um de nossos colaboradores demonstrou que eritrócitos infectados por *Pv-iEs* também são capazes de aderir as células endoteliais (**Figura 6**) (CARVALHO et al., 2010b; COSTA et al., 2011). Os receptores endoteliais ICAM-1, VCAM-1 e P-selectina são sugeridos para o envolvimento na adesão. Células estimuladas com fator de necrose tumoral (TNF- α) ou lipopolissacarídeo (LPS) apresentam uma elevação na adesão de *Pv-iEs* (WASSMER; COMBES; GRAU, 2003).

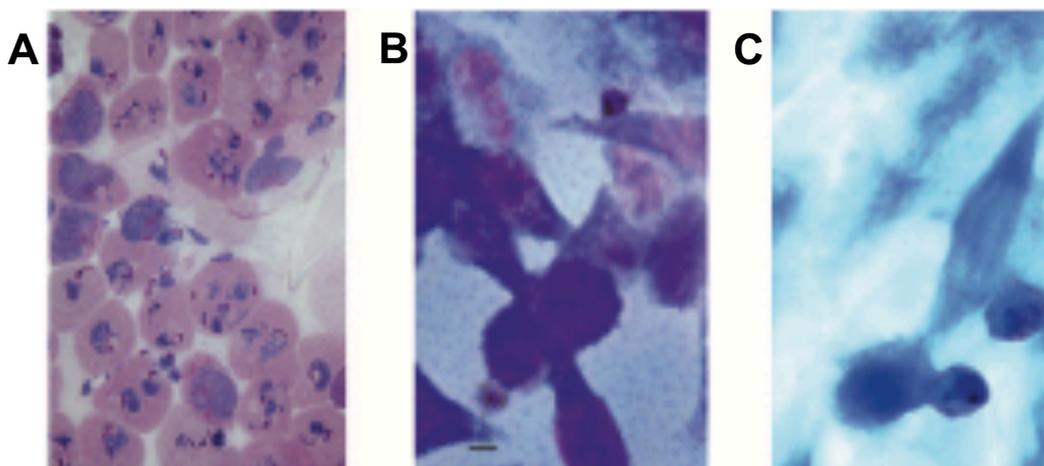


Figura 7: **A:** Formas maduras de *Pv-iEs* obtidos após enriquecimento do gradiente Percoll. **B e C:** Adesão das formas maduras de *Pv-iEs* (trofozoítos e esquizontes) às células endoteliais. **Fonte:** (COSTA, F. T. et al., 2011).

Pacientes com malária grave por Pf tem uma perda generalizada da barreira endotelial, devido a liberação de produtos ou componentes do parasita próximo ao endotélio, resultando em uma regulação de expressão de moléculas de adesão, produção de quimiocinas, citocinas e aumento da permeabilidade vascular. As histonas de merozoítos de Pf induzem uma resposta pró-inflamatória e permeabilidade endotelial. O aumento da permeabilidade endotelial pelas histonas induz a ruptura das proteínas juncionais e morte celular, ao qual pode estar relacionado com a alta carga parasitária (GILLRIE et al., 2012)

Outra consequência dessa disfunção da barreira endotelial é o comprometimento da permeabilidade vascular de órgãos vitais. Células endoteliais infectadas por *Plasmodium* modifica, em sua superfície celular a permeabilidade do endotélio vascular renal, contribuindo para um aumento dos microambientes hipóxicos, resultado de uma combinação final de estresse oxidativo produzido durante a infecção e diminuição da produção de oxigênio para células e tecidos (ELIAS et al., 2012; GILLRIE et al., 2012).

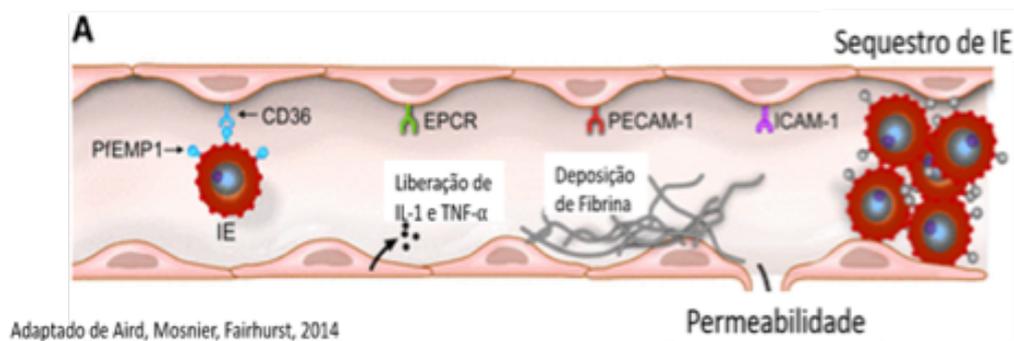


Figura 8: Ativação das moléculas de adesão durante o sequestro de eritrócitos infectados por *Plasmodium*.

O sequestro de eritrócitos infectados por *Plasmodium* não é um fenômeno que ocorre apenas *in vitro*. Estudos analisando autópsia de crianças de áreas endêmicas para malária como África e Malai, que morreram após infecção por *Plasmodium*, verificaram a presença de Pf no cérebro. Um único estudo realizado na região Amazônica, por um de nossos colaboradores observou a presença de Pv m tecidos do fígado, rins e pulmão e não detectou a presença no cérebro como nos outros estudos. A causa da morte desses pacientes da região Amazônica foi síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), edema pulmonar associado a infiltrado neutrofílico no espaço alveolar, ruptura do baço e disfunção de múltiplos órgãos. A provável causa dessas manifestações e complicações que levaram a morte desses pacientes, pode ser devido a infecção pelo *Plasmodium*, tendo em vista que, em todos os estudos observaram-se a presença de eritrócitos infectados nesses tecidos (DOROVINI-ZIS et al., 2011; LACERDA et al., 2012; MOXON et al., 2013).

No entanto, outras células humanas estão relacionadas a maturação do parasita. Nas células hepáticas do hospedeiro, local da transformação de esporozoítos em merozoítos liberam uma parcela dos estágios maduros do parasita. Essas células hepáticas também podem expressar moléculas de adesão como ICAM-1 (HOLLINGDALE; LELAND; SCHWARTZ, 1983; STONANS et al., 1999). Tanto dengue quanto a malária tem tropismo por moléculas de adesão. Visto isso, nós nos propusemos a avaliar se células infectadas por dengue aumentaria a adesão de eritrócitos infectados por *plasmodium vivax*. Até o presente momento ainda não há trabalhos mostrando a citoadesão por malária durante uma coinfeção com outra doença. Este é o primeiro trabalho a ser realizado mostrando a citoadesão na coinfeção dengue-malária.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de citoadesão dos eritrócitos infectados por *Plasmodium vivax* em células infectadas com vírus Dengue (DENV).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de moléculas de adesão em células HEP-G2 e investigar *in vitro* a capacidade de citoadesão de eritrócitos infectadas por *Plasmodium vivax* na presença ou ausência de infecção por vírus Dengue e sua replicação viral
- Analisar o papel da resposta imune inata na expressão de moléculas de adesão e capacidade de citoadesão de eritrócitos infectados por *Plasmodium vivax*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo do tipo transversal experimental foi usado para caracterização do mecanismo da citoadesão na coinfeção Dengue - Malária. As amostras foram coletadas no período de maio 2019 até agosto 2019, na Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD) de Manaus, Amazonas, centro de referência para tratamento de doenças tropicais na Amazônia Ocidental. Os pacientes confirmados positivos para malária vivax por gota espessa, foram convidados a participar do estudo, antes de iniciar qualquer tratamento antimalárico. Após a apresentação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e assinado pelo paciente, foi coletado 16mL de sangue periférico em tubos contendo heparina.



Figura 9: Local de coleta das amostras - FMT-HVD. **Fonte:** Imagens de divulgação FMT-HVD.

4.1 Critérios de Inclusão e Exclusão de pacientes

Foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, com diagnóstico microscópico positivo para *Pv* com parasitemia igual ou maior que duas cruzes. Foram excluídos do estudo os pacientes com diagnóstico microscópico para *Pf* ou infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*), gestantes e pacientes que fizeram uso recente de antimalárico como cloroquina e primaquina.

4.2 Comitê de Ética

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/FUA) CAAE: 36936614.3.0000.5020.

4.3 Cultura de células e cepa viral de DENV4

As células HEP-G2 (ATCC HB-8065), A549 (ATCC CCL185) e Vero (ATCC CCL81) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco), suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, Life Technologies, EUA), com 10.000 Unidades/mL de penicilina e 10.000 ug/mL de estreptomicina (Gibco®, Life Technologies, EUA) e mantidas em 37°C e 5% de CO₂. A cepa viral H241 (doação do Prof. Dr. Luiz Tadeu Figueiredo, FM-USP/Riberão Preto, São Paulo) de DENV4, foi replicada em células C6/36 (célula de *Aedes albopictus*), em meio Leibowitz L15 contendo 2% de soro fetal bovino e temperatura de 28°C. Após 6 a 7 dias de infecção, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm e congelado no -80°C para ser utilizado nos experimentos. As células HEP-G2 foram plaqueadas em placas de 24 poços, após confluência de 80% foram infectadas com 1 MOI (abreviatura do termo em inglês de "*Multiplicity of Infection*") de DENV4 para avaliar replicação e expressão de moléculas de adesão.

4.4 Citometria de Fluxo

As células HEP-G2 e A549 foram cultivadas e após confluência de 80%, foram tripsinizadas, em seguida foi adicionado DMEM com 10% de SFB e transferido 2×10^5 para cada tubo de ensaio. As células foram lavadas 3 vezes com PBS. Seguidamente foram homogeneizadas e adicionadas anticorpos monoclonais CD36 (10uL, Clone CB38), CD54(20uL, Clone HA58) e CD106 (20uL, Clone 5I-10C9) conjugados com fluorocromo APC (BD Biosciences) em 50uL volume final com PBS +10% SFB. Foram incubadas por 30 minutos na geladeira. Após a marcação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, homogeneizadas. Em seguida foi adicionado 200uL de paraformaldeído-PBS a 0,05% para a realização da leitura no citometro de fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do Instituto Leonidas e Maria Deane (ILMD)- Fiocruz Amazônia. Para as análises foi utilizado o programa FlowJo (versão 9.1).

4.5 Isolamento e enriquecimento do parasita

Após a coleta do sangue do paciente em tubo heparina foi feita uma lâmina para confirmar a presença de trofozoítos e esquizontes. Posteriormente, a amostra foi centrifugada para separação de plasma. Os sedimentos sanguíneos foram lavados 3

vezes em meio RPMI 1640 (Sigma) incompleto (meio de lavagem) para um hematócrito final de 10%. A suspensão foi conduzida a uma coluna de celulose (Sigma) para a remoção dos leucócitos. Depois, os eritrócitos foram lavados 3 vezes e suspensos em meio RPMI 1640.

Os eritrócitos contendo trofozoítos e esquizontes, foram separados das formas mais jovens, em um gradiente de 45% de Percoll (GE Healthcare) como descrito por (CARVALHO et al., 2010c). Cinco mililitros (5mL) dessa solução foram sobrepostos em uma solução de 5mL de Percoll a 45% (2,25mL de Percoll, 2,25mL de água ultrapura filtrada e 0,5 microlitros (0,5uL) de RPMI 1640 (10x), em um tubo falcon de 15 mililitros (15mL). A solução foi centrifugada a 1500g, sem freio e sem aceleração, por 15 minutos. Logo após, a interface de células foi coletada e depositadas em tubo falcon de 15mL e lavadas 3 vezes. Uma lâmina pós Percoll foi realizada para determinar a porcentagem de células parasitadas e o número total de células obtidas foi determinado a partir de contagem na câmara de Neubauer.

4.6 Titulação Viral

Foi adicionado 1×10^5 de células HEP-G2 em placas de 24 poços e mantidas por 24h em incubadoras com temperatura de 37°C, contendo 5% de CO₂, em meio DMEM suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, Life Technologies, EUA), com 10.000 Unidades/mL de penicilina e 10.000 ug/mL de estreptomicina (Gibco®, Life Technologies, EUA). Após o período de incubação, as células foram infectadas com três diferentes valores de MOI 0,1, 1 e 2 do vírus dengue. As células foram incubadas por 1h a 37°C, contendo 5% de CO₂ para que ocorresse a adsorção do vírus. Logo após, o sobrenadante viral foi retirado e adicionado meio DMEM suplementado com 1% de SFB, as células foram mantidas na incubadora até avaliação. O sobrenadante foi recolhido para avaliar a replicação do vírus nessas células.

Células Vero foram utilizadas para realizar a titulação viral. As células Vero foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 24h com temperatura de 37°C. Logo após, foram realizadas diluições do estoque viral de 10^1 a 10^5 e mantidas por 1h na incubadora. Depois, o vírus foi retirado e adicionado uma solução de DMEM 2X concentrado suplementado a 2% de SFB com 1.5% de CMC (carboximetil celulose). As células foram mantidas em cultura por 5 dias e após isso foi realizado o ensaio de PFU. As células foram fixadas com paraformaldeído a 2,5% dissolvido em

água destilada por 1h a temperatura ambiente. Foi realizado 3 lavagens com PBS e as células permeabilizadas com PBS+0,05% Tween (Sigma) por 10 minutos. Novamente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e bloqueadas com PBS +10% de SFB por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PBS e adicionado o anticorpo primário derivados de um pool de soro de pacientes sabidamente positivos com alta titulação para *Flavivirus* (1:200) e incubadas por 30 minutos. Após isso, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS1X e adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de humanos (1:5000) e incubados por 30 minutos. Novamente as células foram lavadas com PBS e adicionado 200uL do substrato TrueBlue para se ligar a enzima peroxidase conjugada ao anticorpo secundário anti-IgG de humanos e incubadas por 20 minutos no escuro. A placa foi lavada com água corrente e o número de focos foi estabelecido mediante contagem a olho nu.

4.7 Ensaio de citoadesão

Foram utilizados para o ensaio de citoadesão, as células HEP-G2 como descrito previamente (CARVALHO et al., 2010c) com modificações. Estas células foram utilizadas por apresentar constitutivamente a molécula de adesão CD54 (ICAM-1), sabidamente envolvidas na citoadesão de *Pv*. Ao atingirem a confluência de 80%, as células foram desagregadas, utilizando 1mL de Tripsina/EDTA. Em seguida, foram adicionadas em lâminas de 8 poços (Lab-Tek) na presença ou ausência de 1 MOI (multiplicidade de infecção) de DENV4, uvDENV (vírus da dengue inativo por luz ultra violeta por 30 minutos), a uma concentração de BX795 (10uM/mL) ou cloroquina (100uM/mL) e mantidas em incubação por 4 dias.

Para avaliar o papel de ICAM-1 na adesão de *Pv-iEs* em presença ou ausência do vírus dengue, as células foram incubadas com ou sem anti-CD54 (1:10) por 1h a 37°C. Para avaliar papel das proteínas de superfície do parasita na adesão, *Pv-iEs* foram tratados com Tripsina por 30 minutos, após foram centrifugados a 1500 RPM por 5 minutos. Também foi feito uma incubação de por 1h a 37°C com soro de pacientes com histórico de múltiplas infecção de malária para avaliar o possível papel de anticorpos em bloquear a adesão dos *Pv-iEs*. Em seguida, foram adicionados em cada poço, 1×10^5 de *Pv-iEs* por poço e incubados por 1h a 37°C. Após a incubação, os eritrócitos não aderidos foram removidos por meio de extensivas lavagens com

meio de adesão. As lâminas foram fixadas e coradas com panótico rápido e o número de *Pv-iEs* aderidos foram contados.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPadPrism (versão 8.0). Nossos dados foram realizados através de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Foram considerados valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Células HEP-G2 expressam a molécula de adesão ICAM-1 em condições basais

Primeiramente, nós verificamos a expressão de moléculas de adesão PECAM-1, ICAM-1 e VCAM-1 em células epiteliais do carcinoma hepatocelular humano (HEP-G2) e em células epiteliais do adenocarcinoma alveolar humano (A549). HEP-G2 expressa a molécula de adesão ICAM-1 em condições normais e não expressou a molécula PECAM-1 e VCAM-1 (Figura 10). No entanto, a célula A549 não expressou nenhuma das três moléculas de adesão avaliadas no nosso estudo em células tratadas nos tubos de ensaio com os marcadores acima.

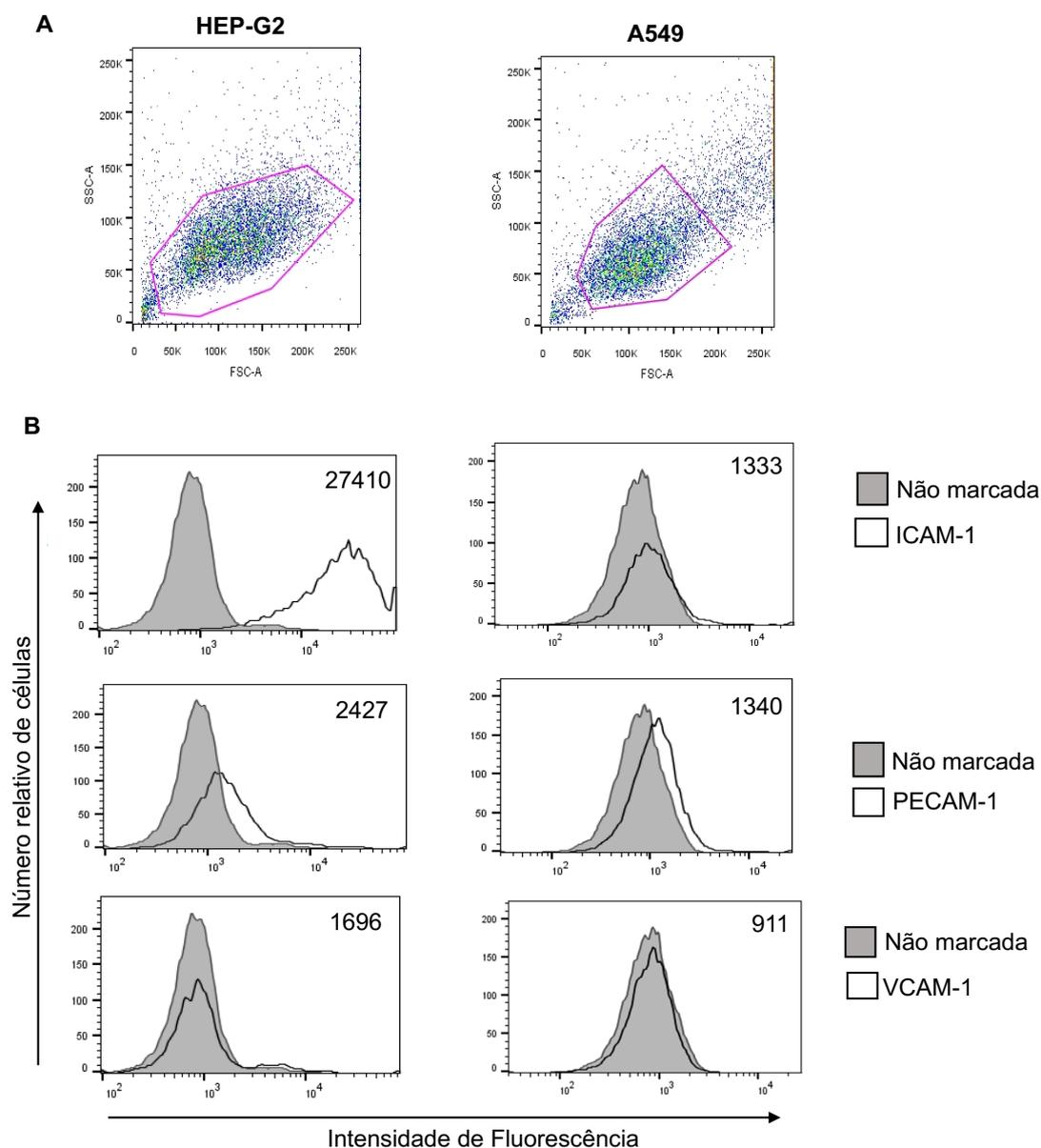


Figura 10: As células HEP-G2 expressam a molécula de adesão ICAM-1. As células cresceram até uma confluência de 80% até o dia da análise. **A:** Demonstração estratégica da população selecionada e citometria. **B:** A expressão celular das moléculas de adesão PECAM-1, ICAM-1 VCAM-1 foi analisada por imunofenotipagem por citometria de fluxo. O valor da intensidade média de fluorescência (MFI) é dado no canto superior direito. No eixo X é mostrado a MFI em escala logarítmica, enquanto o eixo Y representa o número de células. A imagem é representativa de um experimento, os dados foram gerados em triplicatas.

6.2 Replicação de DENV4 e expressão da molécula ICAM-1 está aumentada em células HEP-G2

Para verificar se o vírus DENV4 se replica em células HEP-G2, nós analisamos o sobrenadante dessas células com 48 e 96 horas pós-infecção, e com três concentrações diferentes de vírus (MOI 0,1,1 e 2). A **Figura 11A** mostra que, com dois dias de infecção, a replicação do vírus aumenta gradativamente em função da quantidade de partículas virais utilizadas, sendo representada pela quantidade de unidade formadora de focos por mL (FFU/mL) mas não é estatisticamente significativa. No entanto, após quatro dias de infecção, a replicação do vírus se mantém próxima entre as três concentrações de MOI (multiplicidade de infecção) de DENV4 utilizadas no nosso estudo.

A expressão de ICAM-1 também foi analisada em células HEP-G2 infectadas por DENV4 nesses dois tempos e nas três concentrações de MOI de vírus. Nós observamos que, após dois dias de infecção, não houve diferença nos níveis de expressão de ICAM-1 para as três concentrações de MOI em comparação ao controle de células sem infecção. No entanto, com quatro dias de infecção é possível observar que a expressão de ICAM-1 aumentou significativamente de acordo com a quantidade de partículas virais na célula, comparado ao controle, e se mantém similar entre as concentrações de MOI 1 e 2 de vírus (**Figura 11B**).

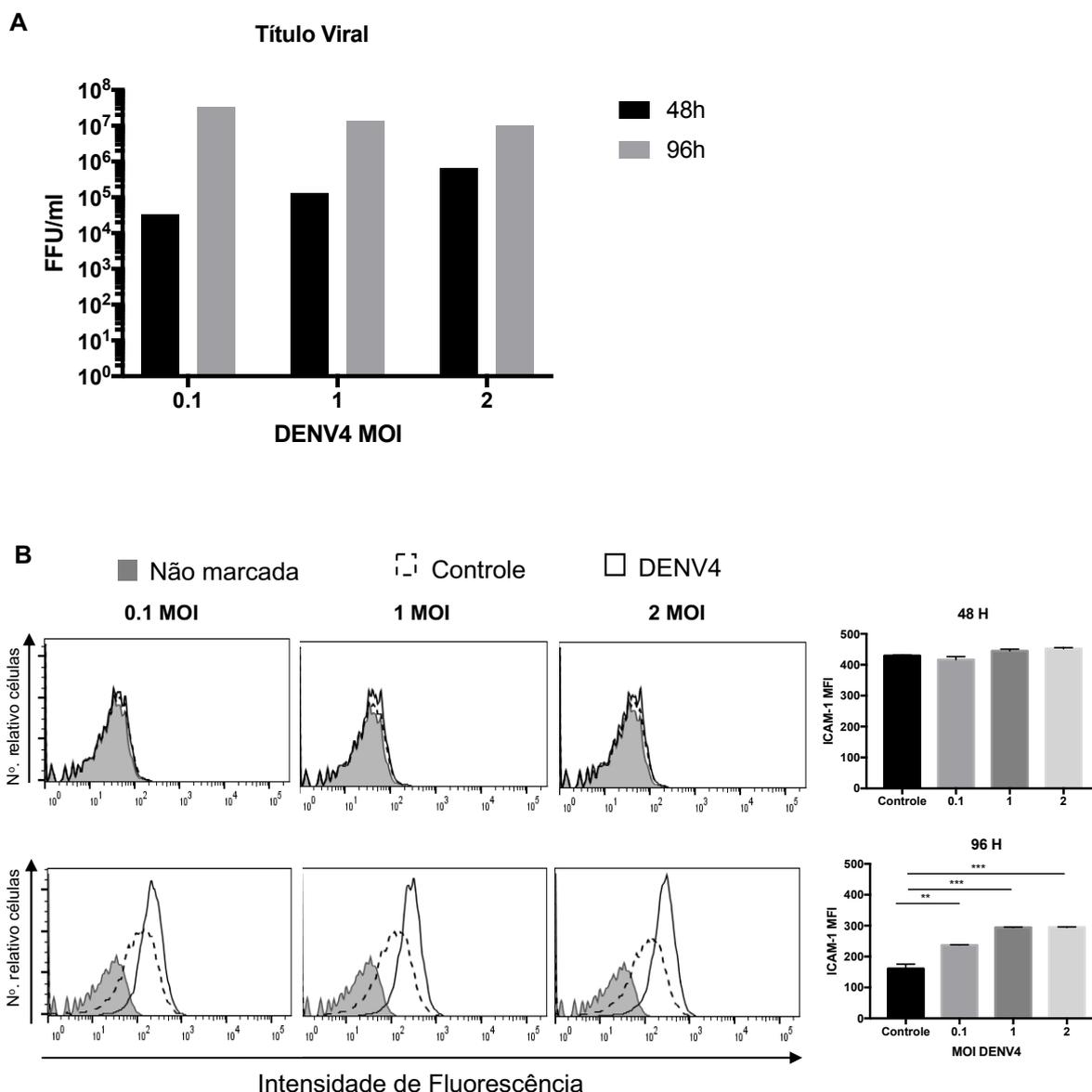


Figura 11: DENV4 se replica em células HEP-G2 e aumentam a expressão de ICAM-1 após 96H de infecção pelo vírus. As células foram infectadas e incubadas por 48 e 96 horas e foram utilizadas três concentrações de MOI de 0.1, 1 e 2 de DENV4. **A:** Replicação de DENV4 em células epiteliais HEP-G2. O sobrenadante foi coletado para avaliar a replicação do vírus por Unidade Formadora de Foco por mL (FFU/mL). **(B)** As células foram marcadas e imunofenotipadas por citometria de fluxo e o nível de expressão de ICAM-1 foi dado por porcentagem de MFI. **B:** Expressão de ICAM-1 após 48 horas e 96 horas de infecção por DENV4. As medidas foram feitas em triplicatas e os resultados mostrados representam a média \pm desvio padrão; $n=3$. Os dados foram analisados usando o two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0.05$, sendo mostrados: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Todos os gráficos são representativos de um experimento.

6.3 Citoadesão de *PviEs* em células HEP-G2 infectadas por DENV4

Os *PviEs* foram testados pela primeira vez quanto a sua capacidade de citoaderir em células HEP-G2. Os *PviEs* foram obtidos de pacientes não graves. O fenômeno de citoadesão do parasita foi avaliado em dois momentos (48 e 96 horas), na presença ou ausência de células infectadas com DENV4 ou na presença do vírus inativado por luz ultravioleta (UV).

Nós observamos que após 48 horas de infecção por DENV4, não houve aumento da adesão do parasita a célula infectada (**Figura 12 A-B**). Sugere-se que o vírus não está conseguindo se replicar suficientemente em 48 horas para aumentar a expressão de ICAM-1, suportando os dados da **Figura 11B** avaliando a expressão de ICAM-1 após dois dias de infecção. No entanto, com 96 horas de infecção da célula pelo vírus, conseguimos observar um aumento na taxa de adesão do parasita (**Figura 12 A-B**). Esses dados corroboram com os resultados da **Figura 11B**, no qual a infecção por vírus aumentou a expressão de ICAM-1 com quatro dias de infecção. Nós avaliamos também a porcentagem das fases do parasita obtidos após o gradiente Percoll (**Figura 12C**). Vimos que a maior porcentagem dentre as fases obtidas foi de trofozoítos (82,3%), seguido de gametócitos (13,4%) e esquizontes (4,1%).

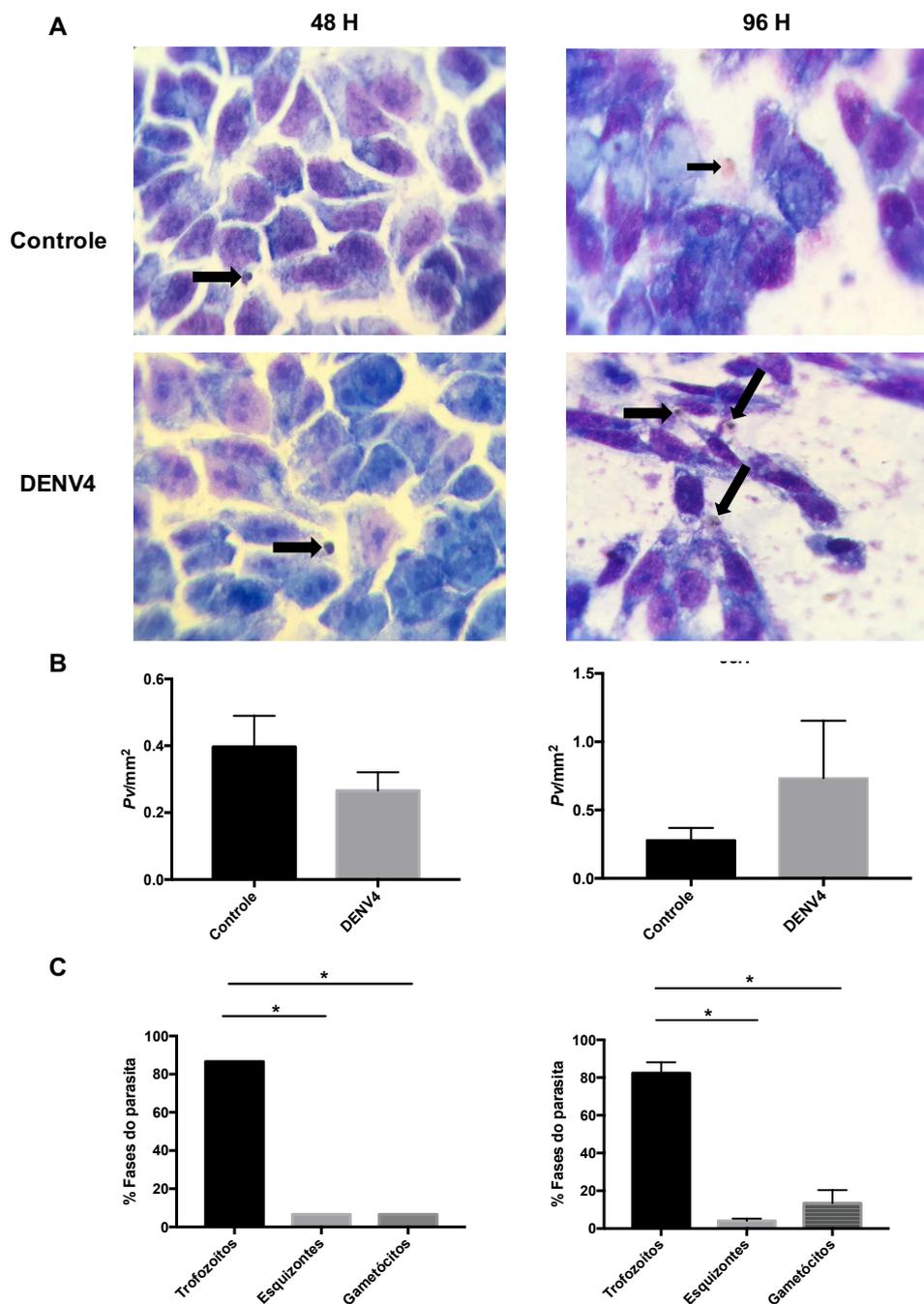


Figura 12: A citoadesão de *PviEs* está elevada nas células infectadas por DENV4. (A, B): A citoadesão de eritrócitos parasitados em células HEP-G2 foi analisada com 48 horas e 96 horas de infecção na concentração de 1 MOI de vírus. **B:** Adesão de *PviEs* por mm² em células HEP-G2 não infectadas e infectadas por DENV4 após 48 horas (gráficos à esquerda) e 96 horas de infecção (gráficos à direita). **C:** Fases do parasita obtidos para ensaio de citoadesão após extração pelo gradiente Percoll. As lâminas foram coradas com panótico. Os dados representam a média de *Pv-iEs* aderidos por poço ± desvio padrão de três experimentos; n=3. Os dados foram analisados usando o two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando p<0.05, sendo mostrado: *p<0.05.

6.4 DENV-4 inativado não aumenta a citoadesão de *PviEs*

Para confirmar se infecção pelo vírus em células HEPG2, aumenta a adesão de *PviEs*, nós inativamos o vírus por UV e observamos a capacidade de adesão dos *PviEs* (**Figura 13**). Verificamos que a adesão dos *PviEs* não aumentou quando colocados em contato com as células infectadas com o vírus inativado, quando comparada às células infectadas com o vírus ativo. Isso mostra que a replicação do vírus tem um papel importante no aumento da citoadesão em células infectadas.

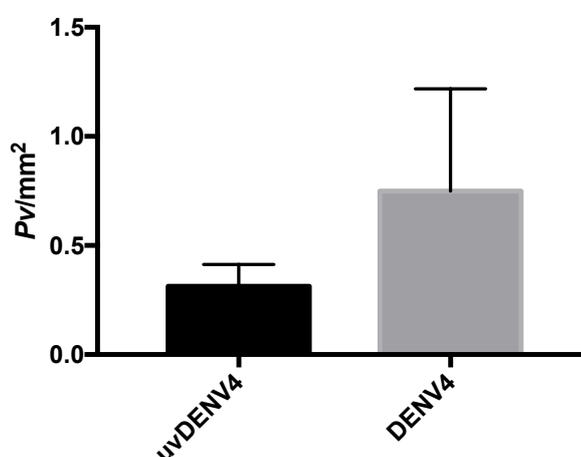


Figura 13: DENV4 inativado por UV não aumenta a adesão de *PviEs* nas células. O experimento foi realizado em células HEP-G2 infectadas por DENV4 na concentração de 1MOI e uvDENV4 (vírus DENV4 inativado por UV). O tempo de infecção por DENV4 foi de 96h. Foi adicionado 1×10^5 de parasita, incubados por 1h a 37°C em lâminas de 8 poços de cultura (0,80 cm²/poço), extensivamente lavados e os *Pv-iEs* aderidos foram contados. O resultado é representativo de 3 experimentos independentes. Os dados representam a média de *Pv-iEs* aderidos por poço \pm desvio padrão de três experimentos; n=3. Os dados foram analisados usando o two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

6.5 O tratamento de *Pv-iEs* com tripsina diminui a adesão na coinfeção dengue-malária

Para observar se as proteínas do parasita estavam envolvidas na citoadesão dos eritrócitos aos receptores celulares, eritrócitos infectados foram pré-tratados com ou sem tripsina (**Figura 14**). A adesão dos *Pv-iEs* tratados com tripsina diminuiu tanto nas células não infectadas ($p < 0.05$) quanto nas infectadas por DENV4 ($p < 0.001$) comparada com o *PviEs* aderidos em células sem tratamento.

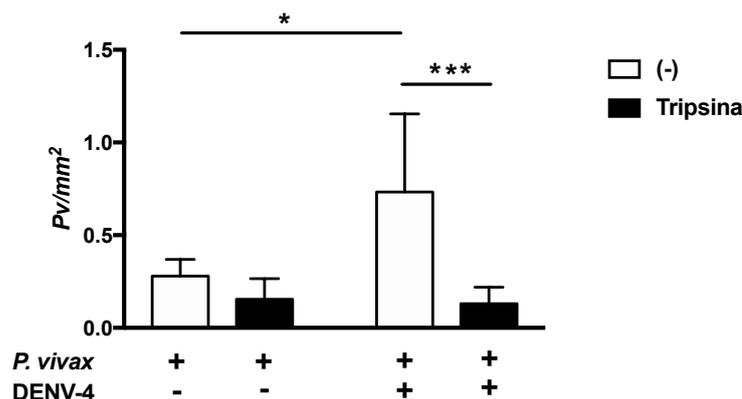


Figura 14: As proteínas do parasita parecem estar envolvidas na citoadesão de células coinfectadas. O experimento foi realizado em células HEP-G2 não infectadas e na presença de *Pv-iEs* tratados com ou sem tripsina (à esquerda), e em células infectadas por DENV4 na presença de *Pv-iEs* tratados com ou sem tripsina (à direita). Foi adicionado 1×10^5 de parasita, incubados por 1h a 37°C em lâminas de 8 poços de cultura (0,80 cm²/poço), foram lavados 10 vezes no meio de citoadesão e os *Pv-iEs* aderidos foram contados. O resultado é representativo de dois experimentos independentes. Os dados representam a média de *Pv-iEs* aderidos por poço \pm desvio padrão de dois experimentos; n=3. Os dados foram analisados usando o two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0.05$, sendo mostrados: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

6.6 Anticorpos contra *Plasmodium vivax* não diminuem a adesão de *Pv-iEs* em células HEP-G2 infectadas por DENV4

Foi avaliado também a capacidade de adesão de *Pv-iEs* após tratamento com soro humano contendo anticorpos contra *Plasmodium vivax* (soro anti-*Pv*). Nós observamos, que não houve alteração na citoadesão tanto em células não-infectadas quanto infectadas por DENV-4 tratadas com anti-*Pv* (**Figura 15**).

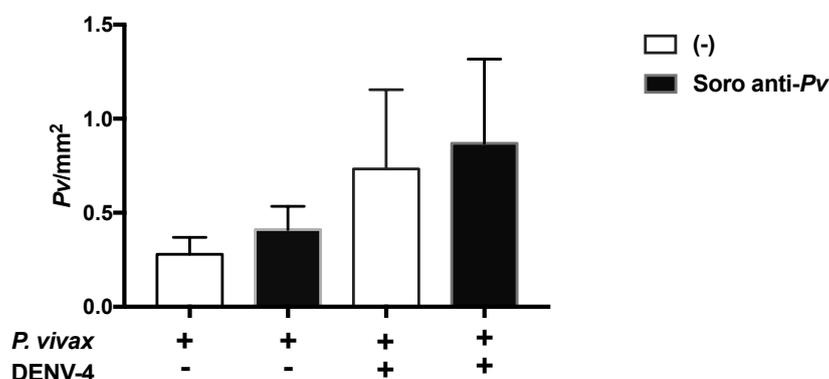


Figura 15: Anticorpos contra *Plasmodium vivax* não reduzem a citoadesão em células infectadas por DENV4. O experimento foi realizado em células HEP-G2 não

infectadas e infectadas por DENV-4 e na presença de *Pv-iEs* tratados com e sem soro anti-*Pv*. Foi adicionado 1×10^5 de parasita, incubados por 1h a 37°C em lâminas de 8 poços de cultura (0,80 cm²/poço), extensivamente lavados e os *Pv-iEs* aderidos foram contados. O resultado é representativo de 3 experimentos independentes. Os dados representam a média de *Pv-iEs* aderidos por poço \pm desvio padrão de três experimentos; n=3. Os dados foram analisados usando o two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

6.7 A droga BX795 aumenta a expressão de ICAM-1 em HEP-G2 infectadas por DENV4, mas o mesmo não ocorre para Cloroquina

Nós avaliamos a expressão de ICAM-1 após as células infectadas serem tratadas na presença ou ausência dos imunomoduladores BX795 e Cloroquina. Observamos que a expressão de ICAM-1 aumentou nas células infectadas na presença de BX795 comparada às células infectadas sem estímulo com o inibidor ($p < 0.0001$) (**Figura 16A**). As células em contato com cloroquina sem infecção por DENV4 aumentou a expressão de ICAM-1 comparada com as células sem a presença da droga ($p < 0.0001$). O tratamento das células infectadas por DENV4 com cloroquina não alterou a expressão de ICAM-1 comparada a células infectadas não tratadas. (**Figura 16B**).

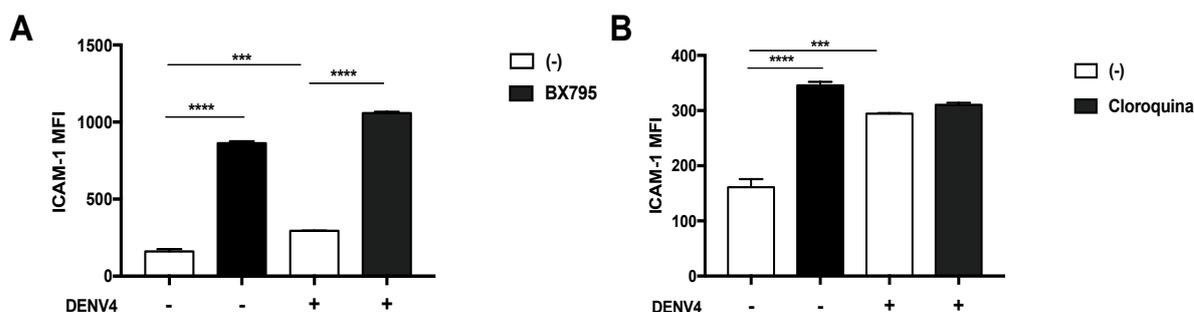


Figura 16: Os inibidores BX795 e Cloroquina aumentam a expressão de ICAM-1 em células infectadas por DENV4. A expressão da molécula de adesão foi determinada em células infectadas ou não na presença ou ausência de BX795 (**A**) e de cloroquina (**B**). As células foram marcadas e imunofenotipadas por citometria de fluxo e o nível de expressão de ICAM-1 foi dado por porcentagem de MFI. O resultado é representativo de três experimentos independentes. Os dados representam a média de expressão de ICAM-1 \pm desvio padrão de três experimentos; n=3. Os dados foram analisados usando o two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0.05$, sendo mostrados: *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

6.8 Citoadesão de *PviEs* em células HEP-G2 infectadas por DENV-4 diminui na presença do inibidor BX795, mas não na presença de Cloroquina

Para avaliar a adesão dos *PviEs* após o estímulo com BX795 ou Cloroquina, as células foram tratadas na presença ou ausência de cada droga, e com ou sem infecção por DENV4. Nós notamos que nas células infectadas, a adesão dos *PviEs* diminuiu na presença de BX795 comparada a célula infectada sem estímulo com o inibidor ($p < 0.05$) (**Figura 17A**). O uso de cloroquina não influenciou a diminuição da adesão de *PviEs* em células infectadas por DENV-4 comparada aos *PviEs* aderidos a células infectadas na ausência da droga (**Figura 17B**).

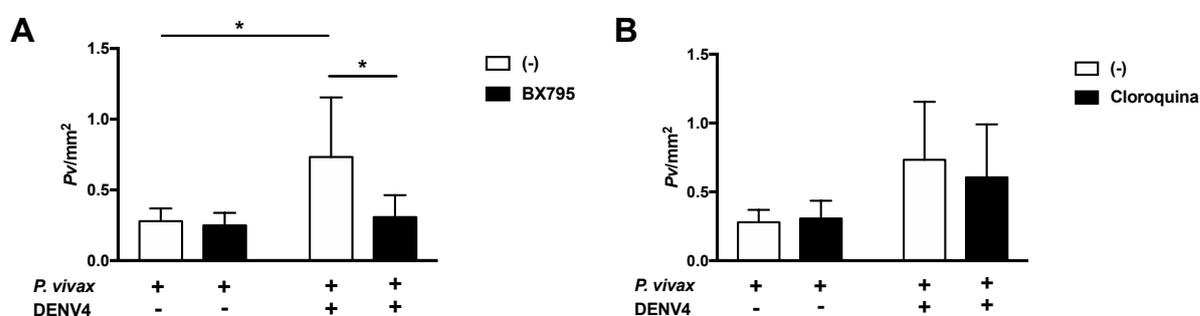


Figura 17: Citoadesão de *PviEs* em células HEP-G2 infectadas por DENV-4 diminui na presença de BX795 mas não reduz na presença de Cloroquina. Adesão de *PviEs* em células infectadas ou não na presença ou ausência de BX795 (**A**) e da droga cloroquina (**B**). Foi adicionado 1×10^5 de parasita, incubados por 1h a 37°C em lâminas de 8 poços de cultura (0,80 cm²/poço), extensivamente lavados e os *Pv-iEs* aderidos foram contados. O resultado é representativo de 2 experimentos independentes. Os dados representam a média de *Pv-iEs* aderidos por poço \pm desvio padrão de três experimentos; $n=3$. Os dados foram analisados usando o two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0.05$, sendo mostrados: * $p < 0.05$.

6.9 Bloqueio de ICAM-1 reduz a citoadesão de *Pv-iEs* em células HEP-G2 infectadas por DENV4

Em seguida, nós investigamos se o receptor ICAM-1 estava envolvido no fenômeno de citoadesão. A habilidade de citoadesão foi avaliada na presença ou ausência de anticorpo anti-ICAM-1 (α -ICAM-1) em células infectadas ou não por DENV-4 (**Figura 18**). Nós observamos que a adesão de *Pv-iEs* diminuiu com a presença de α -ICAM-1 mesmo após infecção por DENV-4 comparado ao grupo de *PviEs* infectados por DENV-4 na ausência de α -Icam-1 ($p < 0.001$).

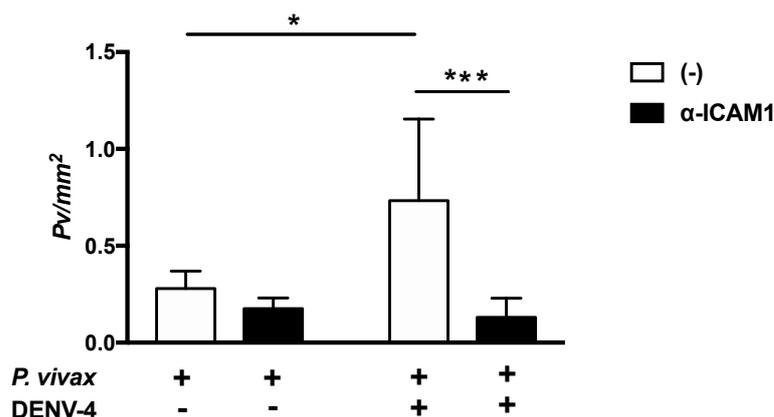


Figura 18: A molécula de adesão ICAM-1 participa da adesão de *PviEs* em células infectadas. O experimento foi realizado em células HEP-G2 não infectadas e na presença ou ausência de α -Icam-1 (à esquerda), e em células infectadas por DENV4 na presença ou ausência de α -ICAM-1 (à direita). Foi adicionado 1×10^5 de parasita, incubados por 1h a 37°C em lâminas de 8 poços de cultura (0,80 cm²/poço), extensivamente lavados e os *Pv-iEs* aderidos foram contados. O resultado é representativo de três experimentos independentes. Os dados representam a média de *Pv-iEs* aderidos por poço \pm desvio padrão de dois experimentos; n=3. Os dados foram analisados usando o two-way ANOVA com o teste de múltiplas comparações de Tukey. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0.05$, sendo mostrados: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

7. DISCUSSÃO

É de conhecimento da literatura que tanto o vírus da dengue quanto a malária têm tropismo por células hepáticas. O vírus utiliza a maquinaria celular para sua replicação mediado por clatrina e sulfato de heparan. Já o parasita da malária usa os hepatócitos para dar início a esquizogonia, onde começa a fase extraeritrocítica do parasita onde passa de esporozoíto para merozoíto, para então dar início a fase intraeritrocítica do parasita (KAISER; CAMARGO; KAPPE, 2003; SUKSANPAISAN; SUSANTAD; SMITH, 2009b; ARTPRADIT et al., 2013). Baseado nesses achados e sabendo a capacidade do parasita da malária em realizar o fenômeno da citoaderência, nós nos propusemos a investigar a capacidade citoadesiva do parasita em células HEP-G2 com coinfeção dengue-malária.

A expressão de moléculas de adesão é constitutiva de células endoteliais como HBMEC, HUVEC, HMEC-1 e está relacionada a migração transendotelial de leucócitos durante um processo infeccioso e inflamatório. Essas moléculas formam uma barreira que separa a corrente sanguínea dos órgãos e tecidos subjacentes. Algumas dessas moléculas como VCAM-1, PECAM-1, ICAM-1 e E-selectina estão

envolvidas nesse processo de recrutamento de leucócitos (CERUTTI; RIDLEY, 2017; TAVARES; MUSCARÁ, 2018). Nosso estudo mostrou que células HEP-G2, mas não A549, expressam a molécula de adesão ICAM-1 e que essa molécula é constitutiva dessa linhagem celular em crescimento em monocamada celular em superfície plástica. Outras duas moléculas, PECAM-1 e VCAM-1, foram avaliadas. PECAM-1 apresentou uma baixa expressão em HEP-G2, e VCAM-1 não foi expressa por nenhuma das duas linhagens utilizadas em nosso projeto. Um estudo avaliando a expressão de ICAM-1 mostrou que IFN- γ é uma das principais citocinas nos hepatócitos responsáveis pela expressão de ICAM-1 (STONANS et al., 1999).

Como mencionado anteriormente, o vírus da dengue utiliza a maquinaria celular para se replicar via endocitose. Uma das principais vias para entrada em células HEP-G2 é a clatrina, no entanto, essa não é a única via utilizada pelo vírus para replicação. Como consequência da entrada do vírus na célula, ocorre estresse no retículo endoplasmático, apoptose e indução de autofagia. Além disso, dengue pode estimular macrófagos e células endoteliais a expressar fator inibitório de migração de macrófago (MIF), o qual leva a ativação de Trombomodulina e ICAM-1 por meio de sinalização de Erk, JNK MAPK e PI3K. O aumento da expressão de ICAM-1 pode ser dependente do contato com o sobrenadante de macrófagos infectados pelo vírus (THEPPARIT et al., 2004; SUKSANPAISAN; SUSANTAD; SMITH, 2009a; YEH et al., 2013b). Nós observamos que dengue conseguiu se replicar em células HEP-G2, como observado em outros estudos. E em virtude da replicação viral, houve um aumento da expressão de ICAM-1, totalmente dependente do contato do vírus com a célula.

O mecanismo de citoadesão na malária tem sido fortemente relacionado com casos de malária grave em infecções por *Plasmodium falciparum* (*Pf*) e *P. vivax* (*Pv*), uma vez que eritrócitos infectados por essas espécies de *Plasmodium* foram encontrados citoaderidos em órgãos de diferentes tecidos em estudo *post-mortem* (DOROVINI-ZIS et al., 2011; LACERDA et al., 2012). Entretanto, a capacidade adesiva do *Pf* não é restrita à gravidade da doença, pois os estágios maduros dos parasitas não são encontrados na corrente sanguínea de pacientes com quadro clínico sem gravidade. Portanto, demonstra que esse sequestro das formas maduras para outros tecidos é um mecanismo pertencente a biologia do parasita e não é exclusivo de casos graves de malária (HUGHES; BIAGINI; CRAIG, 2010; OCHOLA et al., 2011). Atualmente, sabe-se que a citoaderência e sequestro dos eritrócitos

infectados é um mecanismo de escape do parasita contra a resposta imune do hospedeiro, fazendo com que não ocorra sua depuração no baço (PASTERNAK; DZIKOWSKI, 2009).

Alguns estudos analisaram fatores biológicos envolvidos nesse fenômeno, mostrando a participação da proteína de membrana de *Pf* (PfEMP-1) e de proteínas codificadas por genes variantes presentes na superfície de eritrócitos infectados. Além disso, identificaram em células endoteliais, os receptores responsáveis por esse mecanismo de adesão como ICAM-1, CD36, VCAM-1 e CSA (CARVALHO et al., 2010c; HUGHES; BIAGINI; CRAIG, 2010; BERNABEU et al., 2012; MUSTAFFA et al., 2017).

Estudos já têm demonstrado que a citoadesão não é um processo exclusivo de *Pf*, sendo observado que isolados de pacientes infectados por *Pv* também são capazes de citoaderir (CARVALHO et al., 2010c). O presente estudo corroborou com trabalhos anteriores e mostrou pela primeira vez que eritrócitos infectados por *P. vivax* foram capazes de aderir a células HEP-G2 na presença ou ausência de DENV-4.

Nesse estudo foi avaliada a capacidade citoadesiva das formas maduras de *PviEs* em modelo *in vitro* de células HEP-G2 com e sem infecção por DENV4 e vírus inativado por UV. Foi possível observar que *PviEs* apresentaram habilidade de aderir às células HEP-G2, no entanto, com 48 horas de infecção, não observamos aumento da adesão dos eritrócitos infectados em células infectadas por DENV4. Junto a isso, a expressão de ICAM-1 não aumentou após dois dias de infecção da célula pelo vírus. Mas a adesão de *PviEs* e expressão de ICAM-1 aumentou após 96 horas de infecção da célula. Mostrando que o tempo de exposição da célula ao vírus é determinante para o aumento ICAM-1 e adesão de *PviEs*.

Vimos também que as fases maduras parasitárias estavam envolvidas no fenômeno da citoadesão, corroborando com dados da literatura que observaram as formas maduras do parasita de trofozoítos, esquizontes e gametócitos envolvidos no processo de citoadesão (ROGERS et al., 2000; CARVALHO et al., 2010a)

Os experimentos com eritrócitos infectados tratados com tripsina mostram que os ligantes do parasita aos receptores estão presentes na superfície dos eritrócitos, uma vez que a adesão diminuiu nos eritrócitos tratados com tripsina mesmo na presença do DENV4. Isso nos leva a pensar que a citoadesão é uma ligação entre proteína do parasita com receptor da célula. Esses resultados também foram

encontrados em um estudo que exibiu a resistência dos *PfiEs* à tripsina e que estes estão implicados na adesão de *PfiEs* (CHAKRAVORTY et al., 2007).

Nós mostramos também que não houve diferença na inibição da ligação do parasita tanto á célula infectada quanto não infectada, quando os parasitas foram expostos a um *pool* de soro humano contendo anticorpos contra malária vivax. Outros estudos já apontaram que a inibição da adesão do parasita não diminuiu após utilização de soro humano imune à *Plasmodium* sp. Acredita-se que os domínios de adesão sejam mais conservados ou antigenicamente restritos que outros domínios de reconhecimento do anticorpo, sendo assim, os anticorpos direcionados aos sítios de ligação ao receptor podem ter uma atividade mais ampla. Existe também uma grande diferença antigênica entre os isolados, o que pode ser explicado pelas diferenças nas formas de PfEMP1 expressas. Além disso, o polimorfismo de *var2csa* se correlaciona com a variação antigênica, influenciando assim na ligação de anticorpos de memória e diferenças nas propriedades de PfEMP1 e adesão do parasita. A exposição sucessiva à infecção por malária, em mulheres grávidas primigestas ou que tiveram mais de uma gravidez, pode aumentar a reação de anticorpos cruzados e/ou elevar o repertório de anticorpos específicos de variantes com a quantidade de vezes que a pessoa teve contato com o parasita (BEESON et al., 2004, 2005, 2006).

Os receptores de reconhecimento padrão (PRR's) TLR3 e TLR4 e os receptores citosólicos RIG-I e MDA-5 podem ativar a via de sinalização TRIF para indução de um estado antiviral (KAWAI; AKIRA, 2006). A quinase de ligação de TANK 1 (TBK1) e a quinase IKB ϵ (IKK ϵ) são proteínas necessárias para a regulação e produção de interferons Tipo 1 em estímulo por infecções virais e bacterianas. O uso do inibidor BX795 específico para TBK1 e IKK ϵ bloqueia a fosforilação, translocação nuclear e atividade transcricional do fator regulador interferon 3, mas não tem influência na ativação de NF κ B ((KAWAI; AKIRA, 2006; TAKEUCHI; AKIRA, 2008; CLARK et al., 2009). A cloroquina é uma droga de primeira escolha para o tratamento antimalárico em regiões onde não há resistência ao tratamento pela medicação, no entanto, é bem descrito na literatura que até mesmo nessas áreas ocorre certa resistência ao tratamento. Além de ser uma droga antimalárica, a cloroquina também tem potencial anti-inflamatório em doenças autoimunes. Em tais doença, a ligação do ácido nucléico ao TLR endossomal ativa a via de sinalização, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, a associação de ácido nucleico com a droga

antimalárica inibe a ativação de TLR's, levando a modificações estruturais do ligante TLR e impedindo a ativação de ácido nucleicos pelo TLR (KUŽNIK et al., 2011; YUAN et al., 2015).

Nossos resultados revelaram por citometria que as células HEP-G2 infectadas e tratadas com BX795 aumentaram a expressão da molécula ICAM-1 em comparação a células infectadas sem estímulo da droga. No entanto, quando as células infectadas foram tratadas com cloroquina, a expressão de ICAM-1 não aumentou. Isso mostra que o uso do inibidor BX795, mas não a cloroquina aumenta a replicação viral, induzindo o aumento da expressão de ICAM-1. Nós observamos também que a citoadesão de *PviEs* diminuiu apenas nas células infectadas por DENV4 na presença de BX795 e a cloroquina não influenciou na citoadesão de *PviEs*, tanto nas células não infectadas quanto nas células infectadas.

Nós conseguimos demonstrar que *PviEs* são passíveis de aderir a célula HEP-G2 infectadas. Em virtude disso, decidimos investigar o potencial efeito do receptor expresso na célula envolvido nesse fenômeno e, assim, testamos um dos principais receptores deste processo, o ICAM-1. Foi possível verificar que a capacidade adesiva dos *PviEs* na presença do anticorpo contra ICAM-1 reduziu a quantidade de parasitas aderidos, inclusive nas células infectadas por DENV-4. Um outro trabalho observou o mesmo fenômeno, e os pesquisadores estudaram a capacidade de adesão do parasita após o uso de anticorpo contra ICAM-1, CD36 e CSA em diferentes isolados de pacientes, e revelaram a redução da taxa de adesão na presença de α -ICAM-1 e α -CSA, mas não α -CD36 (CARVALHO et al., 2010c).

Resumindo, pela primeira vez demonstramos que *PviEs* podem citoaderir a células HEP-G2. Essa adesão aumenta em células infectadas por DENV4. As proteínas do parasita e receptor ICAM-1 estão envolvidos nesse fenômeno, uma vez que a adesão diminuiu na presença de tripsina e α -ICAM-1, mas não reduziu na presença de soro anti-*Pv*. A citoadesão de eritrócitos infectados por *Pv* foi menor quando as células foram tratadas com o inibidor BX795, entretanto, a cloroquina não influenciou na citoadesão.

8. CONCLUSÃO

- Em conclusão, nossos resultados mostraram que a citoadesão de *PviEs* aumentou em células HEP-G2 infectadas por DENV4,

- A molécula de ICAM-1 estava envolvida nesse mecanismo.

- Entretanto, é preciso mais estudos para verificar se há outros receptores endoteliais envolvidos no processo de citoadesão, durante a coinfeccção por dengue-malária.

-É também necessário, uma melhor compreensão sobre a influência do mecanismo de resposta imune no hospedeiro durante a coinfeccção por ambas as patologias.

9. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P. et al. Host–Parasite Interactions in Human Malaria: Clinical Implications of Basic Research. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, maio 2017.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- ALONSO, P. L.; TANNER, M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 150–155, 6 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm.3077>>. Acesso em: 28 fev. 2018.
- ARAÚJO, M. R. de; DESMOULIÈRE, S. J. M.; LEVINO, A. Padrão espacial da distribuição da incidência de dengue e sua relação com a variável renda na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 2, p. 11–20, jun. 2014.
- ARTPRADIT, C. et al. Recognition of heparan sulfate by clinical strains of dengue virus serotype 1 using recombinant subviral particles. **Virus research**, v. 176, n. 1–2, p. 69–77, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707399>>. Acesso em: 16 ago. 2019.
- BACCARELLA, A. et al. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. **Infection and immunity**, v. 81, n. 12, p. 4431–42, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24042114>>. Acesso em: 16 jul. 2019.
- BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, ago. 2013.
- BADOLATO-CORRÊA, J. et al. Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection. **Immunity, Inflammation and Disease**, 28 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29282904>>. Acesso em: 24 jan. 2018.
- BEATTY, P. R. et al. Dengue Virus NS1 Triggers Endothelial Permeability and Vascular Leak That Is Prevented by NS1 Vaccination. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 304ra141-304ra141, set. 2015.
- BEESON, J. G. et al. Antibodies to Variant Surface Antigens of *Plasmodium falciparum* –Infected Erythrocytes and Adhesion Inhibitory Antibodies Are Associated with Placental Malaria and Have Overlapping and Distinct Targets. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 3, p. 540–551, 1 fev. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/381186>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- BEESON, J. G. et al. Targets of Protective Antibodies to Malaria during Pregnancy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 9, p. 1647–1650, 1 nov. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/496895>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- BEESON, J. G. et al. Antigenic Differences and Conservation among Placental *Plasmodium falciparum* –Infected Erythrocytes and Acquisition of Variant-Specific and Cross-Reactive Antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 5, p. 721–730, 1 mar. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/500145>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- BERNABEU, M. et al. Functional analysis of Plasmodium vivax VIR proteins reveals different subcellular localizations and cytoadherence to the ICAM-1 endothelial receptor. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 386–400, 1 mar. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2011.01726.x>>. Acesso em: 31 jul. 2019.
- BRASIL. Relatório de situação : Amazonas . Ministério da Saúde, Secretaria de

- Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 38 p. : il. ISBN 978-85-334-1865-3.
- BRASIL. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2018 e 2019. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2019.
- CARVALHO, B. O. et al. On the Cytoadhesion of Plasmodium vivax–Infected Erythrocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 638–647, ago. 2010a.
- CARVALHO, B. O. et al. On the Cytoadhesion of Plasmodium Vivax–Infected Erythrocytes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 638–647, ago. 2010b.
- CARVALHO, B. O. et al. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax* –Infected Erythrocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 638–647, 15 ago. 2010c. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617923>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- CERUTTI, C.; RIDLEY, A. J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 1, p. 31–38, 1 set. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482717303336#bib4>>. Acesso em: 26 jul. 2019.
- CHAKRAVORTY, S. J. et al. Altered phenotype and gene transcription in endothelial cells, induced by Plasmodium falciparum-infected red blood cells: Pathogenic or protective? **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 8–9, p. 975–987, 1 jul. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907000483#fig5>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- CHUA, C. L. L. et al. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 26–34, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142189>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- CLARK, K. et al. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and I κ B kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 21, p. 14136–46, 22 maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307177>>. Acesso em: 24 jul. 2019.
- COBAN, C. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 1, p. 19–25, jan. 2005.
- COBAN, C. et al. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. **International Immunology**, v. 19, n. 1, p. 67–79, jan. 2007.
- COSTA, F. T. et al. On cytoadhesion of Plasmodium vivax: raison d'être? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 79–84, ago. 2011.
- COSTA, I. M. P.; CALADO, D. C. Incidence of Dengue Cases (2007-2013) and Seasonal Distribution of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) (2012-2013) in Barreiras, Bahia, Brazil. **Epidemiologia E Servicos De Saude: Revista Do Sistema Unico De Saude Do Brasil**, v. 25, n. 4, p. 735–744, dez. 2016.
- CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. **Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells** **FEMS Microbiology Reviews** Narnia, , 1 mar. 2015. Disponível em: <<http://academic.oup.com/femsre/article/39/2/155/635122/Receptors-and-routes-of-dengue-virus-entry-into>>. Acesso em: 16 jul. 2019.
- DALRYMPLE, N.; MACKOW, E. R. Productive Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Is Directed by Heparan Sulfate-Containing Proteoglycan Receptors. **Journal of Virology**, v. 85, n. 18, p. 9478–9485, set. 2011.
- DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in

- humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5979, p. 745–8, 7 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448183>>. Acesso em: 16 jul. 2019.
- DEWI, B. E.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 121, n. 2, p. 171–180, nov. 2004.
- DIONICIO, C. L. et al. Dengue virus induced changes in Ca²⁺ homeostasis in human hepatic cells that favor the viral replicative cycle. **Virus Research**, v. 245, p. 17–28, 2 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170217306329?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 jan. 2019.
- DOROVINI-ZIS, K. et al. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 5, p. 2146–58, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514429>>. Acesso em: 1 abr. 2019.
- EL FEZZAZI, H. et al. Resource Use and Costs of Dengue: Analysis of Data from Phase III Efficacy Studies of a Tetravalent Dengue Vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, out. 2017.
- ELIAS, R. M. et al. Oxidative stress and modification of renal vascular permeability are associated with acute kidney injury during P. berghei ANKA infection. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e44004, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952850>>. Acesso em: 2 jan. 2018.
- EPELBOIN, L. et al. Is dengue and malaria co-infection more severe than single infections? A retrospective matched-pair study in French Guiana. **Malaria journal**, v. 11, p. 142, 1 maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22549018>>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- FERNANDEZ-GARCIA, M.-D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318–328, 23 abr. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380111>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- GILLRIE, M. R. et al. Plasmodium falciparum histones induce endothelial proinflammatory response and barrier dysfunction. **The American journal of pathology**, v. 180, n. 3, p. 1028–39, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260922>>. Acesso em: 2 jan. 2018.
- GOLENBOCK, D. T. et al. Innate Sensing of Malaria Parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744, nov. 2014.
- GOWDA, D. C. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 12, p. 596–604, 1 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980663>>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- HALSEY, E. S. et al. Capacity Development through the US President’s Malaria Initiative-Supported Antimalarial Resistance Monitoring in Africa Network. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 13, dez. 2017.
- HOLLINGDALE, M. R.; LELAND, P.; SCHWARTZ, A. L. In Vitro Cultivation of the Exoerythrocytic Stage of Plasmodium Berghei in a Hepatoma Cell Line. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 4, p. 682–684, 1 jul. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6349397>>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- HOTTZ, E. D. et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3405–14, 14 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009231>>. Acesso em:

15 jan. 2018.

- HUANG, X. et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection inhibits RLR-mediated Type-I IFN-independent signalling through upregulation of cellular autophagy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22303, 29 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep22303>>. Acesso em: 16 jul. 2019.
- HUGHES, K. R.; BIAGINI, G. A.; CRAIG, A. G. Continued cytoadherence of Plasmodium falciparum infected red blood cells after antimalarial treatment. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 169, n. 2, p. 71–78, 1 fev. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016685109002382>>. Acesso em: 31 jul. 2019.
- HUNT, N. H.; GRAU, G. E. **Cytokines: Accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria** *Trends in Immunology* Elsevier, , 1 set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967673>>. Acesso em: 16 jul. 2019.
- JEGEDE, F. E. et al. Effect of HIV and malaria parasites co-infection on immunehematological profiles among patients attending anti-retroviral treatment (ART) clinic in Infectious Disease Hospital Kano, Nigeria. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0174233, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28346490>>. Acesso em: 15 jan. 2018.
- KAISER, K.; CAMARGO, N.; KAPPE, S. H. I. Transformation of sporozoites into early exoerythrocytic malaria parasites does not require host cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 8, p. 1045–50, 21 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707302>>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infection. **Nature Immunology**, v. 7, n. 2, p. 131–137, 19 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni1303>>. Acesso em: 2 ago. 2019.
- KIRK, K. Membrane Transport in the Malaria-Infected Erythrocyte. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 495–537, abr. 2001.
- KRISHNEGOWDA, G. et al. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of Plasmodium falciparum: CELL SIGNALING RECEPTORS, GPI STRUCTURAL REQUIREMENT, AND REGULATION OF GPI ACTIVITY. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8606–8616, mar. 2005.
- KUZNIK, A. et al. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 8, p. 4794–804, 15 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398612>>. Acesso em: 24 jul. 2019.
- KUŽNIK, A. et al. Mechanism of Endosomal TLR Inhibition by Antimalarial Drugs and Imidazoquinolines. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 8, p. 4794–4804, 15 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398612>>. Acesso em: 24 jul. 2019.
- LACERDA, M. V. G. et al. Postmortem Characterization of Patients With Clinical Diagnosis of Plasmodium vivax Malaria: To What Extent Does This Parasite Kill? **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 8, p. e67–e74, 15 out. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis615>>. Acesso em: 31 out. 2018.
- LIU, P. et al. Dengue virus infection differentially regulates endothelial barrier function over time through type I interferon effects. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 2, p. 191–201, 15 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19530939>>. Acesso em: 15 jan. 2018.
- LÓPEZ, C. et al. What Is Known about the Immune Response Induced by Plasmodium

- Vivax Malaria Vaccine Candidates? **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- MAGALHÃES, B. M. L. et al. Clinical profile of concurrent dengue fever and Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: case series of 11 hospitalized patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 6, p. 1119–24, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033396>>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- MAGALHÃES, B. M. L. et al. P. vivax Malaria and Dengue Fever Co-infection: A Cross-Sectional Study in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3239, 23 out. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003239>>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- MATUSCHEWSKI, K. Getting infectious: formation and maturation of Plasmodium sporozoites in the Anopheles vector. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1547–1556, out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984410>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- MAUTHE, M. et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. **Autophagy**, v. 14, n. 8, p. 1435–1455, 3 ago. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29940786>>. Acesso em: 13 ago. 2019.
- MENDONÇA, V. R. et al. Networking the host immune response in Plasmodium vivax malaria. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 69, 21 fev. 2013. Disponível em: <<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-69>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- METWALLY, N. G. et al. Characterisation of Plasmodium falciparum populations selected on the human endothelial receptors P-selectin, E-selectin, CD9 and CD151. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4069, 22 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-04241-3>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- MORIS, P.; JONGERT, E.; MOST, R. G. van der. Characterization of T-cell immune responses in clinical trials of the candidate RTS,S malaria vaccine. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 0, n. ja, p. 00–00, set. 2017.
- MOURÃO, M. P. G. et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 20–26, jun. 2015.
- MOXON, C. A. et al. Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children. **Blood**, v. 122, n. 5, p. 842–51, 1 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741007>>. Acesso em: 2 jan. 2018.
- MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299–309, ago. 2013.
- MUSTAFA, K. M. F. et al. In vitro inhibition and reversal of Plasmodium falciparum cytoadherence to endothelium by monoclonal antibodies to ICAM-1 and CD36. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 279, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28679447>>. Acesso em: 9 nov. 2018.
- NASIR, I. A.; YAKUBU, S.; MUSTAPHA, J. O. Epidemiology and Synergistic Hepatopathology of Malaria and Hepatitis C Virus Coinfection. **Virology: Research and Treatment**, v. 8, p. 1178122X1772441, 4 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28814840>>. Acesso em: 24 jan. 2018.
- NG, S. et al. Human iPSC-Derived Hepatocyte-like Cells Support Plasmodium Liver-Stage Infection In Vitro. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 3, p. 348–359, 10 mar. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213671115000053>>. Acesso em:

em: 16 jun. 2019.

- OCHOLA, L. B. et al. Specific Receptor Usage in Plasmodium falciparum Cytoadherence Is Associated with Disease Outcome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e14741, 3 mar. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0014741>>. Acesso em: 31 jul. 2019.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 2010.
- OLIVIER, M. et al. Malarial Pigment Hemozoin and the Innate Inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, v. 5, fev. 2014.
- PARISE, É. V. Malária grave em Palmas, Estado do Tocantins: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 463–468, ago. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822009000400021&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 28 fev. 2018.
- PASTERNAK, N. D.; DZIKOWSKI, R. PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite Plasmodium falciparum. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 7, p. 1463–1466, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150410>>. Acesso em: 31 jul. 2019.
- PORTILLO, D. et al. The Role of the Spleen in Malaria. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 343–355, mar. 2012.
- RATHER, I. A. et al. Prevention and Control Strategies to Counter Dengue Virus Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 336, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28791258>>. Acesso em: 23 jan. 2018.
- RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971–977, 19 set. 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673697124837?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 abr. 2019.
- ROGERS, N. J. et al. A model for sequestration of the transmission stages of Plasmodium falciparum: adhesion of gametocyte-infected erythrocytes to human bone marrow cells. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3455–62, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816498>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- ROWE, J. A. et al. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, maio 2009.
- RUNGSIHIRUNRAT, K. et al. Plasmodium vivax Drug Resistance Genes; Pvmdr1 and Pvcrt-o Polymorphisms in Relation to Chloroquine Sensitivity from a Malaria Endemic Area of Thailand. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 43–49, fev. 2015.
- RYAN-PAYSEUR, B. et al. Virus infection stages and distinct Th1 or Th17/Th22 T-cell responses in malaria/SHIV coinfection correlate with different outcomes of disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 204, n. 9, p. 1450–62, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921207>>. Acesso em: 24 jan. 2018.
- SAMPAIO, N. G.; ERIKSSON, E. M.; SCHOFIELD, L. Plasmodium falciparum PfEMP1 Modulates Monocyte/Macrophage Transcription Factor Activation and Cytokine and Chemokine Responses. **Infection and immunity**, v. 86, n. 1, p. e00447-17, 1 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29038124>>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- SARAIVA, M. das G. G. et al. Urban expansion and spatial distribution of malaria in the municipality of Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 515–522, out. 2009.

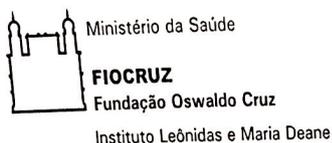
- SCHMID, M. A. et al. Influenza and dengue virus co-infection impairs monocyte recruitment to the lung, increases dengue virus titers, and exacerbates pneumonia. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 3, p. 527–539, mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995614>>. Acesso em: 24 jan. 2018.
- SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 1 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nri3916>>. Acesso em: 3 mar. 2018.
- SIQUEIRA, A. M. et al. Plasmodium Vivax Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87–96, dez. 2016.
- STONANS, I. et al. HepG2 HUMAN HEPATOMA CELLS EXPRESS MULTIPLE CYTOKINE GENES. **Cytokine**, v. 11, n. 2, p. 151–156, fev. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089137>>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- SUKSANPAISAN, L.; SUSANTAD, T.; SMITH, D. R. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. **Journal of biomedical science**, v. 16, n. 1, p. 17, 4 fev. 2009a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19272179>>. Acesso em: 24 jun. 2019.
- SUKSANPAISAN, L.; SUSANTAD, T.; SMITH, D. R. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. **Journal of biomedical science**, v. 16, n. 1, p. 17, 4 fev. 2009b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19272179>>. Acesso em: 15 jun. 2019.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. MDA5/RIG-I and virus recognition. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 1, p. 17–22, 1 fev. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791508000046?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 ago. 2019.
- TAVARES, J. C.; MUSCARÁ, M. N. Adhesion Molecules and Endothelium. **Endothelium and Cardiovascular Diseases**, p. 189–201, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128123485000143>>. Acesso em: 26 jul. 2019.
- THEPPARIT, C. et al. Internalization and Propagation of the Dengue Virus in Human Hepatoma (HepG2) Cells. **Intervirology**, v. 47, n. 2, p. 78–86, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192271>>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- UNO, N.; ROSS, T. M. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 4 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0168-0>>. Acesso em: 12 ago. 2019.
- VERVAEKE, P. et al. Sulfated Escherichia coli K5 Polysaccharide Derivatives Inhibit Dengue Virus Infection of Human Microvascular Endothelial Cells by Interacting with the Viral Envelope Protein E Domain III. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. e74035, ago. 2013.
- WASSMER, S. C.; COMBES, V.; GRAU, G. E. Pathophysiology of Cerebral Malaria: Role of Host Cells in the Modulation of Cytoadhesion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 992, p. 30–38, maio 2003.
- WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 297, 11 out. 2011. Disponível em: <<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-297>>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- WICHMANN, O. et al. Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccines: The Needs and Challenges of Post-Licensure Evaluation of Vaccine Safety and Effectiveness. **Vaccine**, v. 35, n. 42, p. 5535–5542, out. 2017.
- WHO. “World Malaria Report 2015”, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

2015.

- WHO. Dengue and severe dengue. World Health Organization, Abril 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em: 29 nov. 2017.
- WHO, Malaria. World Health Organization, March 27 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>> Acesso em: 2 junho, 2019
- YEH, T.-M. et al. Dengue Virus Enhances Thrombomodulin and ICAM-1 Expression through the Macrophage Migration Inhibitory Factor Induction of the MAPK and PI3K Signaling Pathways. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55018, jan. 2013a.
- YEH, T.-M. et al. Dengue Virus Enhances Thrombomodulin and ICAM-1 Expression through the Macrophage Migration Inhibitory Factor Induction of the MAPK and PI3K Signaling Pathways. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55018, 28 jan. 2013b. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055018>>. Acesso em: 28 nov. 2018.
- YEWHALAW, D. et al. Determination of the residual efficacy of carbamate and organophosphate insecticides used for indoor residual spraying for malaria control in Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 471, nov. 2017.
- YUAN, L. et al. Therapeutic responses of Plasmodium vivax malaria to chloroquine and primaquine treatment in northeastern Myanmar. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1230–5, 1 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512415>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

10. ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa chamada: " **Avaliação da resposta Imune em paciente com Malária-Dengue co-infecção**", realizada por pesquisadores da Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus-AM.

A Malária e a Dengue são um crescente problema de saúde pública no Brasil e, em especial na região Amazônica, estão associadas ao aumento da morbidade e mortalidade. A influência da co-infecção na resposta imunológica de doenças não está clara, sendo assim, o objetivo deste projeto é tanto obter informações e dados para diferencia-las clinicamente e biologicamente das infecções sozinhas, assim como, determinar os mecanismos e a via de sinalização em células e identificar biomarcadores em pacientes co-infectados para Malária e Dengue, e compará-los às infecções sozinhas. Estes estudos terão impacto no conhecimento básico desses patógenos humanos e, também, serão primordiais para a criação de novas terapias e vacinas eficazes contra doenças transmissíveis por artrópodes.

A sua participação nesta pesquisa consiste em permitir a coleta de 60mL de sangue da veia, em três momentos: dia 0 (quando apresentam sintomas e incluídos no estudo), dias 8-10 e dias 25-28 com o uso de agulha e seringa descartáveis, além de responder a um questionário com dados epidemiológicos. O seu sangue será analisado nos laboratórios da ILMD e poderá ser guardado para futuras pesquisas, se você permitir. Os exames realizados no seu sangue servem para detecção de infecções, marcadores da resposta imunológica e genéticos do patógeno e do hospedeiro. O FMT dará a você o resultado dos testes para dengue e malária .

Os riscos relacionados com sua participação são a dor causada pela picada da agulha e um pequeno sangramento que pode acontecer após a coleta de sangue. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado e experiente na coleta de sangue e com a adoção rigorosa dos procedimentos padrão de biossegurança para a coleta de sangue. O único benefício relacionado com a sua participação é o de nos ajudar a conhecer essa doença no seu município e as situações de risco para sua transmissão, além do conhecimento gerado concorrem para tal desfecho.

A sua participação neste estudo é voluntária, não implicando em qualquer custo para você. A qualquer momento você pode desistir de participar e isso não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a UFAM. Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento.

Solicitamos sua autorização para armazenamento de suas amostras de sangue por dez anos, e se o Sr(a) autorizar ela poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual. Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores:

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores.

Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde e doenças infecciosas.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados

Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Nome _____
 Endereço _____
 E-mail _____
 Celular/ telefone _____

O Sr(a) receberá uma via deste termo, que será assinado pelo Sr(a) e o pesquisador responsável. Logo abaixo, você tem o nome, telefone e o endereço do pesquisador principal e CEP/UFAM que poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação quando você desejar.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

_____, ____ de _____ de _____

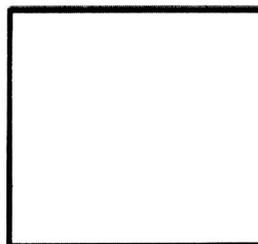
_____, ____ de _____ de _____

 Assinatura do Pesquisador responsável

 Assinatura do Participante

Pritesh Lalwani, Dr. rer. nat.
 Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD),
 Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ),
 Rua Terezina 457, Adrianópolis,
 69057070 - Manaus, AM - Brasil

Telefone: +55 92 36212407
 Cellular: +5592 981636775
 Email: priteshlalwani@amazonia.fiocruz.br



Assinatura alternativa
 (Impressão do dedo polegar)

Anexo 2: Parecer do comitê de Ética em Pesquisa – CEP – UFAM**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** Avaliação da resposta imune em paciente com Malária-Dengue co-infecção**Pesquisador:** Pritesh Jaychand Lalwani**Área Temática:****Versão:** 2**CAAE:** 36936614.3.0000.5020**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 925.169**Data da Relatoria:** 16/12/2014**Apresentação do Projeto:**

O estudo foi classificado pelo pesquisador responsável, Pritesh Jaychand Lalwani, Professor Visitante da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, na Grande Área 2. Ciências Biológicas. O estudo será do tipo descritivo, transversal para caracterização da ativação de células da imunidade em pacientes com Malária (Pv), Dengue (DENV) e DENV-Pv coinfeção. As mesmas serão coletadas na Fundação de Medicina Tropical (FMT) de Manaus, Amazonas.

Haverá formação de Biorrepositório que ficará armazenado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM (FCF/UFAM).

Foi indicado Financiamento Próprio no valor de R\$ 29.950,00 e a proposta será submetida ao EDITAL CHAMADA UNIVERSAL– MCTI/CNPq No 14/2014.

Fazem parte da equipe de pesquisa: Adriana Malheiro, Emerson Silva Lima, Fabio Trindade Maranhão Costa., Jaila Dias Borges, Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Maria Paula Gomes Mourão, Rafaela Oliveira dos Santos, Rodrigo da Silva e Silva

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Diferenciar clínica e biologicamente o quadro de co-infecções e monoinfecções,

Endereço: Rua Teresina, 4950**Bairro:** Adrianópolis**CEP:** 69.057-070**UF:** AM**Município:** MANAUS**Telefone:** (92)3305-5130**Fax:** (92)3305-5130**E-mail:** cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 925.169

identificar biomarcadores e estudar os mecanismos de citoadesão e via de sinalização da resposta imune inata em células endoteliais envolvidas na inflamação e imunopatologia por P. vivax e Dengue.

Objetivo Secundário:

1. Identificação e quantificação de mediadores Inflamatórios e Biomarcadores de pacientes com Pv, DENV e DENV- Pv coinfeção;
2. Quantificar a expressão de moléculas de adesão e ativação da monócitos por citometria de fluxo multicolor em pacientes com Pv, DENV e DENV- Pv coinfeção;
3. Determinar in vitro a capacidade de citoadesão de gametócitos de Pv e identificar os receptores envolvidos na adesão de gametócitos em células endoteliais.
4. (Por meio de ensaios de citoadesão estático na presença ou na ausência de anticorpos anti-ICAM-1, anti-CD36, enzimas proteolíticas, glicosaminoglicanos);
5. Avaliar in vitro a capacidade de citoadesão de Pvgametócitos e Identificar os receptores envolvidos na adesão de gametócitos em endoteliais células infectados com DENV;
6. Identificar as vias de sinalização envolvidas na resposta imune inata e adesão de gametócitos em células endoteliais. (Por meio de ensaios de citoadesão estático na presença do inibidor de TLR e RLRs).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador responsável:

Riscos:

Os sujeitos da pesquisa podem sentir um leve desconforto durante a coleta de sangue. Porém para minimizar tais desconfortos serão responsáveis pela coleta, pessoas capacitadas e que tenham domínio na realização dos procedimentos.

Benefícios:

O benefício esperado é a elucidação dos processos envolvidos na imunopatogênese da Malária,

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 925.169

Dengue e co-infecção DENV/Malária, a busca e identificação de novos biomarcadores que contribua positivamente para que futuramente esse estudo possa servir como base na elaboração de novas vacinas.

COMENTÁRIOS: Descrição suficiente dos riscos e benefícios

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será do tipo descritivo, transversal para caracterização da ativação de células da imunidade inata em pacientes com Pv, DENV e DENV-Pv coinfeção. As mesmas serão coletadas na Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD) de Manaus, Amazonas. Recrutamento e Abordagem dos Pacientes Todas os indivíduos que atendem aos critérios de inclusão do presente estudo na Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD), serão convidados para participar desta pesquisa e concordando em participa, tornar-se-ão sujeitos da pesquisa após assinar o TCLE, responder questionário e a coleta da amostra de sangue ser realizada. Será coletado 60 mLs de sangue venoso periférico de cada voluntário em três momentos: dia 0 (quando apresentam sintomas e incluídos no estudo), dias 8-10 e dias 25-28. A amostragem será baseada no quantitativo de Pv não grave (n=120), Pv grave (n=60), febre da dengue (n=120), febre hemorrágica da dengue (FHD) (n=60), co-infecção DENV-Pv (n=60) e 30 pessoas saudáveis. De cada paciente será realizado hemograma completo (para aferição de variáveis hematológicas), incluindo contagem de reticulócitos e dosagem de ferro e do receptor de transferrina. Malária diagnóstico: Para a confirmação da espécie, será realizada a revisão da gota espessa, com contagem de parasitemia diferencial (estágios sexuais e assexuais) em 500 leucócitos, e PCR em tempo real para confirmação molecular da monoinfecção por Pv. RT-PCR (com a detecção de transcritos do gene específico de gametócitos maduros pvs25) será realizado para a detecção e quantificação de estágios sexuais. Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) não tem nenhum critério para malária vivax casos graves, usaremos os critérios utilizados anteriormente definida por nossos colaboradores (LACERDA et al., 2012). Dengue diagnóstico: Para diagnóstico e detecção da Dengue, serão realizados testes específicos, como NS1 ELISA e RT-PCR (MAGALHÃES et al., 2012). Nós vamos usar os critérios da OMS e Ministério da Saúde para definir pacientes com FHD. Dengue-malária co-infecção: Vamos rastrear os pacientes positivos de malária, por infecção de dengue. Assim, todas as amostras positivas de malária será usado em NS1 ELISA ou dengue PCR para identificar os pacientes co-infectados com dengue e malária. Critério de inclusão: • Idade > 18 anos. • O TCLE deve estar devidamente assinado. • Devem ser selecionados aqueles que participarem de todas

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 925.169

(três) as coletas (D0, D8-10 e D25-28). • Malária: Todos aqueles que forem positivo para gota espessa. • Dengue: Todos que forem positivos para PCR ou IgM ELISA. • Co-infecção: Todos que forem positivos para Gota espessa para Malária e PCR ou IgM ELISA para Dengue. Critério de Exclusão: • Casos de exclusão acontecerão se a pessoa envolvida não assinar O TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido). • Pacientes com co-infecção *P. vivax* e *P. falciparum* • Não retornar para o segundo e ou terceiro visita. Quantificação da Biomarcadores Vários mediadores solúveis serão mensurados em amostra de soro de doadores saudáveis (HD), pacientes com Pv não grave, Pv grave, febre da dengue, febre hemorrágica da dengue, co-infecção DENV-Pv e pessoas saudáveis. A identificação e quantificação destes mediadores será realizada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

FOLHA DE ROSTO: Adequada. Assinada pelo pesquisador responsável, e pela Diretora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Profa. Dra. Maria de Meneses Pereira.

TERMO DE ANUÊNCIA: Foi apresentada a anuência da Fundação de Medicina Tropical de Manaus, onde haverá o recrutamento.

INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS: Não apresentado, cita na metodologia as variáveis a serem coletadas.

TCLE: Apresentava-se com pendências que foram atendidas.

Orçamento e cronograma: adequados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente protocolo de pesquisa apresenta relevância científica, em segunda versão, apresentava-se com pendências que foram atendidas. O protocolo atende as exigências das Resoluções CNS 466/2012 e Res. 441/2011 (Biobanco e Biorrepositório). Diante do exposto somos pela aprovação. Salvo melhor juízo é o parecer.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 925.169

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 22 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br