



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

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E  
FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO TLR-4 EM  
PACIENTES COM MALÁRIA DA CIDADE DE COARI,  
ESTADO DO AMAZONAS**

**ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA**

**MANAUS - AMAZONAS  
2013**

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

**ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E  
FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO TLR-4 EM  
PACIENTES COM MALÁRIA DA CIDADE DE COARI,  
ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra Adriana Malheiro**

**Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Izabel Ovellar Heckmann**

**MANAUS - AMAZONAS  
2013**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Costa, Allyson Guimarães da

C837a Avaliação da resposta imune celular e frequência dos polimorfismos do TLR-4 em pacientes com malária da cidade de Coari, Estado do Amazonas / Allyson Guimarães da Costa. - Manaus: UFAM, 2013.

180 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) — Universidade Federal do Amazonas, 2013.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Malheiro

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Izabel Ovellar Heckmann

1. Malária - Epidemiologia 2. Malária – Resposta imune 3. Imunologia I. Malheiro, Adriana (Orient.) II. Heckmann, Maria Izabel Ovellar (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 616.936(811.3)(043.3)

**ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E  
FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO TLR-4 EM  
PACIENTES COM MALÁRIA DA CIDADE DE COARI,  
ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

**APROVADA EM: 26 / 04 / 2013**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa Dra. Adriana Malheiro, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas**

---

**Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, Membro Externo  
Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ-Minas**

---

**Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, Membro Externo  
Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado**

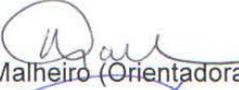


UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

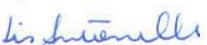


Ata da defesa de Dissertação do aluno  
**Allyson Guimarães da Costa**, em 26  
de abril de 2013.

Aos vinte e seis dias do mês de abril do ano de dois mil e treze, às nove horas, no Auditório Paulo Buhnrnheim, o discente deste Programa, **Allyson Guimarães da Costa**, orientado pela Professora Doutora Adriana Malheiro (PPGIBA/UFAM), e co-orientado pela Professora e Doutora Maria Izabel Ovellar Heckmann, apresentou à banca examinadora sua dissertação intitulado **“Avaliação da Resposta Imune Celular e Frequência dos Polimorfismos do TLR-4 em Pacientes com Malária da Cidade de Coari, Estado do Amazonas”**. A banca examinadora composta pelos seguintes membros: Professora Doutora Adriana Malheiro (Orientadora e Presidente), Professor Doutor Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado FMT/HVD-AM) e Doutora Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Instituto René Rachou, FIOCRUZ-MG), decidiu, após a apresentação e arguição, pela aprovação  ou não aprovação (  ) de sua dissertação.

  
Professora Doutora Adriana Malheiro (Orientadora e Presidente)

  
Professor Doutor Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda (Membro)

  
Professora Doutora Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Membro)

Aos meus pais *Selionete* e *Adelson*  
por todo o apoio, amor e dedicação  
incondicional.

Ao meu irmão *André* pela paciência  
e compreensão e a minha Avó *Maria*  
*Antonia* pelo exemplo de vida.

*Dedico*

## *Agradecimentos*

A *Deus*, por ser o arquiteto da minha vida e Senhor dos meus caminhos e principalmente por colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

Aos meus amados pais *Selionete* e *Adelson* e minha avó *Maria Antônia*, pelo amor incondicional, dedicação, paciência e por serem os grandes exemplos de vida para mim.

Ao meu irmão *André*, por muitas vezes suportar o meu mau humor e pela paciência, muito obrigado.

Ao meu Avô *Raimundo Matias (in memorian)*, por sempre acreditar em mim, sempre ter orgulho do meu crescimento profissional e pessoal e por nunca me deixar abater com as adversidades/dificuldades da vida.

Aos meus avós *Elizabeth* e *André* e bisavós *Manoel* e *Maria* por toda a confiança e carinho.

Aos meus Tios *Regilson, Sionete e Sirlene* por me receberem em suas casas/apartamentos, me acomodarem e se preocuparem sempre com o meu bem estar. A minha prima *Karine*, por dividir o apartamento comigo e sempre me ajudar, inclusive na “recepção” das amostras do projeto em Manaus.

Aos meus Tios (*Ediberto, Vando, Eliseu, Eládio e Vidal*) e Tias (*Emília, Erotilde, Elena, Simone e Sirlania*), primos, familiares e agregados por sempre se preocuparem com meu bem estar, entenderem minha ausência nas reuniões de família e desejarem o melhor para mim.

A minha orientadora, *Dra. Adriana Malheiro*, pelo exemplo de pesquisadora, pela brilhante orientação e por me aceitar em seu grupo de pesquisa (minha segunda família) acreditando no meu potencial e viabilidade do projeto.

A minha Co-orientadora *Dra. Maria Izabel*, por ser responsável pela minha paixão a pesquisa e por todos os ensinamentos no início de minha vida acadêmica, auxiliando na construção da base de meu conhecimento.

Aos Grandes Amigos: *Andréa, Elisa, João Paulo, Lizy, Lorena, Nadja, Péricles, Tati e Walter*, por toda a ajuda durante as várias etapas do mestrado, pela sua amizade, conversas e risadas nos momentos em que eu mais precisei.

A todos os amigos da *DEP-Hemoam: Adélia, Andri, Carla, Carol, Daniel, Gleicy, Iaci, Jéssica, Josy, Josi fashion, Lú, Lucyane, Mariana, Nani, Nilberto, Rechfy, Rafael, Soriane, Valdete e Wilmara*, pelo carinho, acolhida, amizade e pelos infinitos gestos de companheirismo.

A todos os amigos do *Mestrado em Imunologia: Alysson, Andreza, Diogo, Edilene, Helaine, Juliana, Luciana e Paula*, por se tornarem meus irmãos e pelas prazerosas tardes de estudos aplicados em Imunologia, com lanches e muitas risadas ao final.

Aos amigos conquistados ao longo dessa caminhada: *Adriana Daumas, Antonia Franco, Helena, Lívio, Thaís e Yury*. Muito obrigado por tudo.

A *Dra. Aya Sadahiro* e *Dr. Maurício Ogusku* pela acolhida em seu laboratório, pelas valiosas sugestões na padronização da PCR-RFLP e ajuda nas análises dos dados, deixo aqui meu muito obrigado.

Ao *Dr. Olindo Assis Martins Filho* pela ajuda com as análises estatísticas/altos produtores e por toda a colaboração desde a minha qualificação de mestrado, não tenho palavras para expressar minha gratidão. A *Dra. Lis Antonelli, Dra. Fernanda Freire e Msc. Pedro Costa* pela ajuda nas análises e sugestões para o *paper*.

Ao *Dr. Paulo Nogueira* e *Dr. André Mariúba* pela ajuda com a purificação das proteínas do Plasmódio e por todo auxílio no laboratório multidisciplinar do ILMD-Fiocruz

A *Equipe dos Laboratórios de Análises Clínicas e Sorologia* da Fundação Hemoam pela ajuda com os testes bioquímicos e sorologias dos pacientes.

Aos amigos *Marta, Josy, Renato e Renatha* por toda a ajuda durante as coletas e processamento das amostras no *LABGEN* e por sempre estarem presentes.

A amiga *Dra. Jocilene Guimarães*, por sempre me ouvir, ceder um espaço em seu Laboratório (*LABMAIP*) e pelo auxílio com a tipagem sanguínea dos pacientes.

Aos amigos do *LABMAIP*: *Alana, Dobles, Jonilson, Mayana e Ramon* pela companhia durante minha estadia em Coari e pelos momentos de descontração.

A todos os *Pacientes* do *Instituto de Medicina Tropical de Coari (IMTC)* pela simpatia e doação das amostras, pois sem eles esta pesquisa jamais seria realizada.

A todos os *Municípios de Coari* pela doação das amostras que serviram de controles.

Aos novos amigos do Tropical-Coari: *Cida (falta de ética), Deuzilene, D.O, Ednair, Elem, Geo, Iolanda, Iris, Jucia, Maria, Patrícia, Richard, Rogério, Samuel, Sônia, Teixeira, e cia* por todo o suporte durante a coleta das amostras e por me acolherem no seu local de trabalho mostrando o verdadeiro espírito de equipe.

Ao *Dr. Maurício Borborema e Socorro Lopes (IMTC)* por confiarem e acreditarem na viabilidade do projeto.

Aos colegas *Suzeni, Donald, Marli, Simone, Perpetua, Dr. Osni e Dra. Sueli* do *Laboratório Central (LACEN)* e *Hospital Regional de Coari (HRC)* pela paciência e ajuda com os hemogramas, mesmo quando os equipamentos estavam com problemas.

A *Secretária Municipal de Saúde* e a *Prefeitura Municipal de Coari* pela disponibilização do espaço no *IMTC* e parceria no Projeto.

Ao *Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB-Coari)* na pessoa do diretor *Dr. Helder Manuel da Costa*, por ceder o espaço físico para a realização prática do mestrado e pela confiança.

A **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** por ceder os espaços e equipamentos necessários para a execução do projeto.

Ao **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)** por ceder os espaços e equipamentos de Biologia Molecular necessários para a execução de parte do projeto.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fiocruz Amazônia** por ceder o espaço e equipamentos necessários para a execução do projeto.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** e o **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)**, seus **Docentes e Técnicos** pelos valorosos ensinamentos e pela oportunidade de qualificação profissional.

A **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** pela oportunidade de cursa o mestrado em Imunologia Básica e Aplicada.

*“Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não experiências, mas nem mesmo percebemos que as certezas só podem surgir através das dúvidas e os resultados somente através das experiências”.*

*Carl G. Jung*

## RESUMO

**Introdução:** A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, com imunopatogênese diferenciada, relacionado aos fatores biológicos do parasita e do hospedeiro. De acordo com a OMS, ocorrem cerca de 300 a 500 milhões de novos casos e um milhão de mortes por ano. O processo patogênico é iniciado com a inoculação dos esporozoítos pelo vetor nos tecidos subcutâneos e a liberação das formas merozoítas na circulação. Vários mecanismos de defesa são associados e resultam no processo inflamatório e de resistência do indivíduo ao patógeno. **Objetivos:** O presente estudo tem como objetivo avaliar a resposta imune celular e determinar a frequência alélica do polimorfismo dos receptores do tipo *Toll-4* em indivíduos com malária, da cidade de Coari-AM. **Material e Métodos:** Para este estudo foram coletadas amostras de 77 pacientes infectados com *P. vivax* e 58 amostras de indivíduos não infectados. A imunofenotipagem foi realizada pela técnica de citometria de fluxo e as dosagens de citocinas por ELISA e CBA. A determinação das frequências alélicas dos polimorfismos do TLR-4 foi obtida por PCR-RFLP. As análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 5.0*. **Resultados:** Os resultados revelaram que os pacientes apresentaram quadros de leucopenia e trombocitopenia, aumento significativo no percentual de monócitos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células T regulatórias, além do aumento nas citocinas IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- $\gamma$  nos pacientes com malária em comparação com os controles. Em relação aos polimorfismos *Asp299Gly* e *Thr399Ile* do TLR-4, foi observada frequência em heterozigose de 10% e 5% nos pacientes com malária, respectivamente. **Conclusão:** Em conclusão, nossos dados sugerem processo de exacerbação da resposta imune, com perfil pró- e anti-inflamatório atuante, sem influência direta dos polimorfismos na imunopatogênese da doença.

**Palavras-Chave:** Resposta Imune; *P. vivax*; Malária, Coari-AM.

## ABSTRACT

**Introduction:** Malaria is caused by protozoa, genus Plasmodium, with immunopathogenesis differentiated, related to biological factors to the parasite and the host. According to WHO, there are about 300 to 500 million new cases and one million deaths per year. The pathogenic process initiates by sporozoite inoculation by the vector in the subcutaneous tissues releases merozoites into the circulation forms. Several defense mechanisms are associated with the inflammatory process and the individual's resistance to the pathogen. **Objectives:** The aim of this study is to evaluate the cellular immune response and determine the frequency of allelic polymorphism of Toll-Like Receptor-4 in patients with malaria, the city of Coari-AM. **Material and Methods:** For this study, samples were collected from 77 patients infected with *P. vivax* and 58 samples from uninfected individuals. Immunophenotyping was performed by flow cytometry and levels of cytokines by ELISA and CBA. The determination of the allele frequencies of the polymorphisms of TLR-4 was obtained by PCR-RFLP. Statistical analyzes were performed with the GraphPad Prism 5.0. **Results:** The results revealed leukopenia and thrombocytopenia, significant increase in the percentage of monocytes, CD4 + T cells and T regulatory cells, and an increase in IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 and IFN- $\gamma$  in malaria patients compared with controls. Regarding the Thr399Ile polymorphisms Asp299Gly and TLR-4 was observed in heterozygous frequency of 10% and 5% in malaria patients, respectively. **Conclusion:** Our data suggest that exist a exacerbation of immune response profile with pro- and anti-inflammatory cytokines acting without direct influence of polymorphisms in the immunopathogenesis of the disease.

**Keywords:** Immune Response; *P. vivax*; Malaria; Coari-AM.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Países com áreas de risco para Transmissão da Malária.....	23
<b>Figura 02:</b> Número de casos de Malária diagnosticados no Brasil nos de 2005 a 2012 .....	24
<b>Figura 03:</b> Áreas de transmissão da Malária no Brasil, distribuição de acordo com o IPA ...	25
<b>Figura 04:</b> Áreas de transmissão da Malária no Amazonas, com os respectivos valores do IPA, ano 2010.....	26
<b>Figura 05:</b> Número de casos de Malária diagnosticados no Município de Coari nos de 2005 a 2012.....	26
<b>Figura 06:</b> Ciclo do Plasmodio no hospedeiro .....	28
<b>Figura 07:</b> Invasão do eritrócito pelos Merozoítos.....	31
<b>Figura 08:</b> Diagrama esquemático demonstrando a indução da febre na malária.....	32
<b>Figura 09:</b> O complexo ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i> no hospedeiro vertebrado e o seu reconhecimento pelo sistema imune inato .....	36
<b>Figura 10:</b> Mecanismos envolvidos na resposta imune na malária por células fagocíticas....	38
<b>Figura 11:</b> Apresentação de antígenos e ativação celular mediado pelas DCs, com posterior ação dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , células NK e macrófagos.....	40
<b>Figura 12:</b> Receptores <i>Toll-like</i> e ativação da resposta imune inata .....	42
<b>Figura 13:</b> Interação entre os PAMPs do <i>Plasmodium</i> e os receptores <i>Toll-like</i> .....	43
<b>Figura 14:</b> Posição dos SNPs <i>Asp299Gly</i> e <i>Thr399Ile</i> na sequência codificadora do TLR-4	44
<b>Figura 15:</b> Mapa com a localização da cidade de Coari-Amazonas-Brasil .....	46
<b>Figura 16:</b> Análise do Polimorfismo <i>Asp299Gly</i> do TLR4.....	51
<b>Figura 17:</b> Análise do Polimorfismo <i>Thr399Ile</i> do TLR4 .....	51
<b>Figura 18:</b> Identificação dos Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , Linfócito B (CD19 <sup>+</sup> ) e B1 (CD5 <sup>+</sup> /CD19 <sup>+</sup> ) .....	55
<b>Figura 19:</b> Análise da Expressão das Moléculas de Adesão LFA-1 (CD11a <sup>+</sup> ), MAC-1 (CD11b <sup>+</sup> ) e VLA-4 (CD49d <sup>+</sup> ) em Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	56
<b>Figura 20:</b> Análise da Expressão das Moléculas de Adesão LFA-1 (CD11a <sup>+</sup> ), MAC-1 (CD11b <sup>+</sup> ) e VLA-4 (CD49d <sup>+</sup> ) em Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> .....	57
<b>Figura 21:</b> Identificação dos Linfócitos Treg (CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /FoxP3 <sup>+</sup> ) .....	58
<b>Figura 22:</b> Identificação das Células NK (CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> ) e NKT (CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> ).....	59

<b>Figura 23:</b> Identificação dos Monócitos (CD14 <sup>+</sup> ), Monócitos Ativados (CD14 <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup> ) e Agregados Celulares (CD14 <sup>+</sup> /CD51/61 <sup>+</sup> ) .....	60
<b>Figura 24:</b> Análise da Expressão do Receptor do tipo Toll 4 (CD284 <sup>+</sup> ) e Fagocitose (CD36 <sup>+</sup> ) em Monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) .....	61
<b>Figura 25:</b> Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14 <sup>-</sup> /CD11c <sup>+</sup> /CD123 <sup>-</sup> ) e Plasmocitóides (CD14 <sup>-</sup> /CD11c <sup>-</sup> /CD123 <sup>+</sup> ) .....	62
<b>Figura 26:</b> Frequência e ativação dos monócitos, neutrófilos e porcentagem celular dos agregados celulares monócitos/plaquetas e neutrófilos/plaquetas com base na parasitemia ...	68
<b>Figura 27:</b> Frequência e ativação dos monócitos, neutrófilos e porcentagem celular dos agregados celulares monócitos/plaquetas e neutrófilos/plaquetas com base no número de infecções .....	69
<b>Figura 28:</b> Frequência das células dendríticas (DCs) totais, células dendríticas mielóides(DC <sub>s<sub>m</sub></sub> ) e células dendríticas plasmocitóides (DC <sub>s<sub>p</sub></sub> ) com base na parasitemia .....	70
<b>Figura 29:</b> Frequência das células dendríticas (DCs) totais, células dendríticas mielóides(DC <sub>s<sub>m</sub></sub> ) e células dendríticas plasmocitóides (DC <sub>s<sub>p</sub></sub> ) com base no número de infecções .....	71
<b>Figura 30:</b> Expressão do receptor <i>Toll-Like-4</i> e molécula CD36 em monócitos com base na parasitemia e número de infecções .....	72
<b>Figura 31:</b> Frequência e ativação dos linfócitos totais e subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> com base na parasitemia .....	74
<b>Figura 32:</b> Frequência e ativação dos linfócitos totais e subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> com base no número de infecções .....	75
<b>Figura 33:</b> Razão dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> e frequência dos linfócitos T reguladores (Treg), B, B1 e células NK e NKT com base na parasitemia .....	77
<b>Figura 34:</b> Razão dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> e frequência dos linfócitos T reguladores (Treg), B, B1 e células NK e NKT com base no número de infecções .....	78
<b>Figura 35:</b> Expressão das moléculas de adesão LFA-1, MAC-1 e VLA-4 nos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> com base na parasitemia .....	80
<b>Figura 36:</b> Expressão das moléculas de adesão LFA-1, MAC-1 e VLA-4 nos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> com base no número de infecções .....	81
<b>Figura 37:</b> Concentrações séricas de citocinas Pró-inflamatórias e de perfil Th1 com base na parasitemia .....	83

<b>Figura 38:</b> Concentrações séricas de citocinas Pró-inflamatórias e de perfil Th1 com base no número de infecções .....	84
<b>Figura 39:</b> Concentrações séricas de citocinas Regulatórias e de perfil Th2 e Th17 com base na parasitemia .....	86
<b>Figura 40:</b> Concentrações séricas de citocinas Regulatórias e de perfil Th2 e Th17 com base no número de infecções.....	87
<b>Figura 41:</b> Distribuição dos indivíduos altos e baixos produtores de citocinas nos grupos de pacientes com malária e controle.....	88
<b>Figura 42:</b> Assinatura das citocinas no grupo de pacientes e controles.....	89
<b>Figura 43:</b> Expressão do receptor <i>Toll-Like-4</i> e associação com os genótipos dos polimorfismos <i>Asp299Gly/Thr399Ile</i> .....	91
<b>Figura 44:</b> Concentrações séricas das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12p70 e IFN- $\gamma$ e associação com os genótipos do polimorfismo <i>Asp299Gly</i> .....	92
<b>Figura 45:</b> Concentrações séricas das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12p70 e IFN- $\gamma$ e associação com os genótipos do polimorfismo <i>Thr399Ile</i> .....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Descrição dos <i>primers</i> , temperaturas de pareamento ( $T_p$ ) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que foram obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP) .....	50
<b>Tabela 02:</b> Descrição dos clones, lotes, número dos catálogos, fluorescências, marca e perfil celular dos anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo .....	52
<b>Tabela 03:</b> Dados demográficos e características clínico-epidemiológicas dos pacientes com malária e grupo controle.....	66
<b>Tabela 04:</b> Teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) e genótipos dos polimorfismos do TLR-4 .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferase
<b>APC</b>	Aloficocianina
<b>AST</b>	Aspartato Aminotransferase
<b>APCs</b>	Células Apresentadoras de Antígeno
<b>CAEE</b>	Certificado de Apresentação para Certificação Ética
<b>CBA</b>	“ <i>Cytometric Bead Array</i> ”
<b>CD</b>	“ <i>Cluster Differentiation</i> ”
<b>DC</b>	Células Dendríticas
<b>FACS</b>	“ <i>Fluorescence Absorbing Cell Sorting</i> ”
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>HBV</b>	Vírus da Hepatite B
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HEMOAM</b>	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMTC</b>	Instituto de Medicina Tropical de Coari
<b>ISB</b>	Instituto de Saúde e Biotecnologia
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MCH</b>	Hemoglobina Globular Média
<b>MCHC</b>	Concentração de Hemoglobina Globular Média
<b>MCV</b>	Volume Globular Médio
<b>MPV</b>	Volume Plaquetário Médio

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NK</b>	“ <i>Natural killer</i> ”
<b>NK-T</b>	“ <i>Natural killer-T</i> ”
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pb</b>	Pares de Base
<b>PBS</b>	Solução Tamponada com Fosfato
<b>PBS-P</b>	Solução Tamponada com Fosfato, Albumina e Saponina
<b>PBS-W</b>	Solução Tamponada com Fosfato e Albumina
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PDW</b>	Variação no Tamanho das Plaquetas
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PE-Cy5</b>	Ficoeritrina e Ciano Cy5
<b>PerCP</b>	Clorofilpiridina
<b><i>P. falciparum</i></b>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<b><i>P. knolesi</i></b>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<b><i>P. malarie</i></b>	<i>Plasmodium malarie</i>
<b><i>P. ovale</i></b>	<i>Plasmodium ovale</i>
<b><i>P. vivax</i></b>	<i>Plasmodium vivax</i>
<b>RBC</b>	Contagem Total de Hemácias
<b>RDW</b>	Variação no Tamanho das Hemácias
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SA<sub>v</sub>-HRP</b>	Streptavidina + Horseradish Peroxidase
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal

<b>SNP</b>	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Crescimento Transformador-beta
<b>TLR</b>	Receptor do tipo Toll
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina e Peróxido de Hidrogênio
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral-alfa
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>WBC</b>	Contagem Total de Leucócitos
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Malária</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2 Epidemiologia da Malária</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3 Etiologia</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4 Ciclo Parasitário</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5 Sinais e Sintomas</b> .....	<b>28</b>
<b>2.6 Diagnóstico</b> .....	<b>29</b>
<b>2.7 Patogênese</b> .....	<b>30</b>
<b>2.8 Resposta Imune na Malária</b> .....	<b>33</b>
2.8.1 Resposta Imune Inata .....	34
2.8.2 Resposta Imune Adaptativa .....	39
<b>2.9 Receptores <i>Toll-Like</i> e Polimorfismos no TLR-4</b> .....	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>45</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1 Tipo de Estudo</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2 População de Estudo: Coari</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3 Amostragem: Instituto de Medicina Tropical de Coari (IMT)</b> .....	<b>47</b>
<b>4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão</b> .....	<b>47</b>
<b>4.5 Aspectos Éticos</b> .....	<b>47</b>
<b>4.6 Fluxograma</b> .....	<b>48</b>
<b>4.7 Coleta de Dados e Material Biológico</b> .....	<b>48</b>
<b>4.8 Testes Hematológicos</b> .....	<b>49</b>
<b>4.9 Extração de DNA</b> .....	<b>49</b>
<b>4.10 Genotipagem dos Polimorfismos do TLR-4 (<i>Asp299Gly</i> e <i>Thr399Ile</i>) pela Técnica de PCR-RFLP</b> .....	<b>49</b>
4.10.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	50
4.10.2 Reação de Restrição (RFLP).....	50

<b>4.11 Imunofenotipagem Celular por Citometria de Fluxo.....</b>	<b>52</b>
4.11.1 Identificação da População de Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , Linfócito B (CD19 <sup>+</sup> ) e B1 (CD5 <sup>+</sup> /CD19 <sup>+</sup> ).....	55
4.11.2 Análise da Expressão das Moléculas de Adesão LFA-1 (CD11a <sup>+</sup> ), MAC-1 (CD11b <sup>+</sup> ) e VLA-4 (CD49d <sup>+</sup> ) em Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	56
4.11.3 Identificação dos Linfócitos T regulatórios (CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /FoxP3 <sup>+</sup> ) .....	58
4.11.4 Identificação das Populações de Células NK (CD3 <sup>-</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> ) e NKT (CD3 <sup>+</sup> /CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> ).....	59
4.11.5 Identificação dos Monócitos (CD14 <sup>+</sup> ), Monócitos Ativados (CD14 <sup>+</sup> /CD80 <sup>+</sup> ) e Agregados Celulares (CD14 <sup>+</sup> /CD51/61 <sup>+</sup> ) .....	60
4.11.6 Análise da Expressão do Receptor do tipo Toll 4 (CD284 <sup>+</sup> ) e Fagocitose (CD36 <sup>+</sup> ) em Monócitos (CD14 <sup>+</sup> ).....	61
4.11.7 Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14 <sup>-</sup> /CD11c <sup>+</sup> /CD123 <sup>-</sup> ) e Plasmocitóides (CD14 <sup>-</sup> /CD11c <sup>-</sup> /CD123 <sup>+</sup> ).....	62
<b>4.12 Dosagem de Citocinas Plasmáticas por CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>).....</b>	<b>63</b>
<b>4.13 Dosagem de Citocinas Plasmáticas por ELISA .....</b>	<b>63</b>
<b>4.14 Testes Bioquímicos – Transaminases (AST e ALT) .....</b>	<b>64</b>
<b>4.15 Análises Estatísticas.....</b>	<b>64</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Dados Demográficos e Características Clínico-Epidemiológicas.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2 Perfil de Resposta Celular nos pacientes com Malária .....</b>	<b>66</b>
<b>5.3 Concentração das Citocinas Séricas nos pacientes com Malária .....</b>	<b>82</b>
5.3.1 Citocinas Pró-inflamatórias e de Perfil Th1 .....	82
5.3.2 Citocinas Regulatórias e de Perfil Th2 e Th17 .....	85
<b>5.4 Análise de Altos Produtores de Citocinas.....</b>	<b>88</b>
<b>5.5 Frequência dos Polimorfismos <i>Asp299Gly</i> e <i>Thr399Ile</i> do TLR-4 e associação com a resposta imune.....</b>	<b>89</b>
5.5.1 Associação entre os polimorfismos <i>Asp299Gly</i> e <i>Thr399Ile</i> e a expressão do receptor TLR-4 em monócitos.....	90
5.5.2 Associação entre os polimorfismos <i>Asp299Gly</i> e <i>Thr399Ile</i> do TLR-4 e a produção de citocinas.....	91
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>6.1 Análise das Características Clínico-Epidemiológicas.....</b>	<b>94</b>
<b>6.2 Análise do perfil de Resposta Celular nos pacientes com Malária .....</b>	<b>95</b>
<b>6.3 Análise da Concentração das Citocinas Séricas nos pacientes com Malária.....</b>	<b>101</b>

6.4 Análise da Frequência dos Polimorfismos <i>Asp299Gly</i> e <i>Thr399Ile</i> do TLR-4 e associação com a resposta imune .....	104
CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107
APÊNDICE .....	132
Apêndice 01: Termo de Aprovação no Comitê de Ética .....	132
Apêndice 02: TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	133
Apêndice 03: Questionário .....	135
ANEXOS .....	136
Anexo 01: Artigo de Revisão .....	135
Anexo 02: Artigo Original.....	160

---

*Introdução e  
Revisão Bibliográfica*

## INTRODUÇÃO

A malária é um grave problema de saúde pública em mais de 100 países, sendo a doença parasitária de regiões tropicais e subtropicais que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo (GREENWOOD *et al.*, 2008; PARISE, 2009; OMS, 2011). No Brasil, as áreas endêmicas estão localizadas em áreas rurais da região Amazônica, com casos isolados em outras regiões (BRASIL, 2003; OLIVEIRA-FILHO & MARTINELLI, 2009).

A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium sp.*, com processo patogênico diferenciado, relacionado aos fatores biológicos do parasita e do hospedeiro (MILLER *et al.*, 2002). A infecção ocorre após a inoculação do parasita na corrente sanguínea pelo inseto vetor, com posterior interação entre o parasita e as células do sistema imune (SCHOFIELD & GRAU, 2005).

A transmissão da malária ocorre devido à maioria dos parasitas sobreviver tanto a resposta imune inata quanto adaptativa do hospedeiro, possibilitando reinfecções e o desenvolvimento de formas crônicas da doença. As respostas inatas e adaptativas são fundamentais para o controle da infecção parasitária, destacando-se a resposta imune celular em doenças causadas por protozoários intracelulares (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que a resposta imune contra esse parasita é ineficaz, uma vez que o ciclo biológico do protozoário ocorre dentro de células do hospedeiro, impossibilitando o desenvolvimento de uma resposta efetiva, e eliminação/erradicação do patógeno (MARSH & KINYANJUI, 2006).

Estudos recentes têm gerado dados sobre a resposta imune e a interação parasita hospedeiro na infecção pelo *Plasmodium*. A partir dos resultados obtidos nessas pesquisas, tem-se notado que os mecanismos de resposta imune em humanos e a influência dos polimorfismos em genes de receptores da imunidade inata ainda não foram totalmente elucidados. Assim, caracterizar a resposta imune celular e determinar a frequência de polimorfismos encontrados nos genes de receptores em pacientes residentes na cidade de Coari-AM é importante para avaliar a influência desses polimorfismos na resposta imune, no controle da parasitemia e na gravidade da doença.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Malária

A malária atualmente é umas das doenças infecciosas humanas de maior prevalência no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a doença parasitária mais devastadora do ponto de vista social e econômico, sendo uma das doenças mais mortais das regiões tropicais e subtropicais (**Figura 01**), em conjunto com o HIV e a Tuberculose (BARRY, 2005; OMS, 2011).

A transmissão da doença ocorre em locais com características ambientais, climáticas e ecológicas favoráveis, estando restritas as regiões intertropicais nos continentes, Africano, Americano e Asiático. Nesses locais, a maioria dos casos ocorre em áreas rurais, com registro de casos em áreas urbanas (BRASIL, 2006).

As informações epidemiológicas sobre a notificação da malária são essenciais para as medidas de controle da doença, bem como ensaios com novos medicamentos e testes com vacinas (OWUSU-AGYEI *et al.*, 2009). As principais informações exigidas são: prevalência de parasitas, características e comportamento dos vetores, variabilidade genética do parasita/vetor/hospedeiro, intensidade da transmissão, local de infecção e os valores de morbimortalidade da doença (BARRY, 2005; OWUSU-AGYEI *et al.*, 2009).

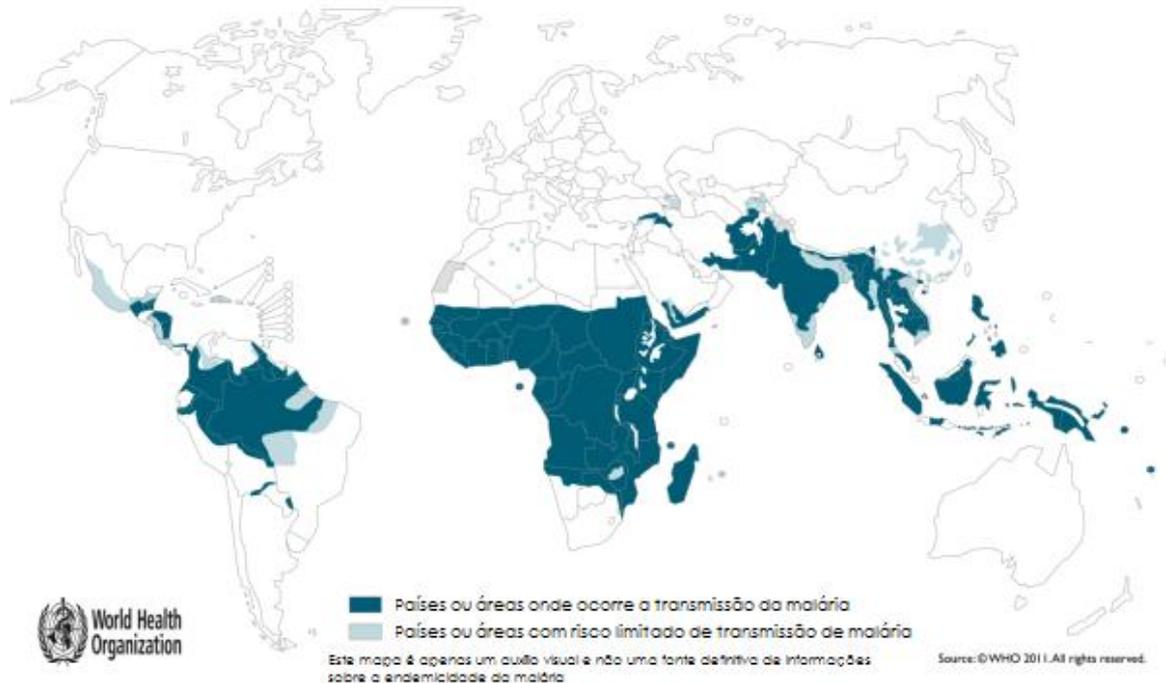
A interação parasita/vetor/hospedeiro é conhecida como “*Complexo Patogênico da Malária*” e suas reciprocidades ampliam as condições de desenvolvimento necessárias e específicas para cada espécie de *Plasmodium*. O processo de urbanização e desmatamento gerados por ação humana em geral resultam no aumento do número de casos de malária, sendo considerada condição fundamental para o desenvolvimento da malária nativa em certos locais ou regiões. (MAYOR *et al.*, 2007).

### 2.2. Epidemiologia da Malária

Segundo estimativas da OMS, cerca de 3,3 bilhões de pessoas (40% da população mundial) residem em áreas de risco para contrair a malária. Deste quantitativo, calcula-se que aproximadamente 216 milhões de pessoas foram infectadas no ano de 2010, com 655 mil mortes (OMS, 2011).

As áreas de transmissão da doença estão distribuídas em aproximadamente 106 países, localizados predominantemente em três continentes: Africano, Americano e Asiático (**Figura 01**).

## Malária, Países ou Áreas de Risco de Transmissão, 2010

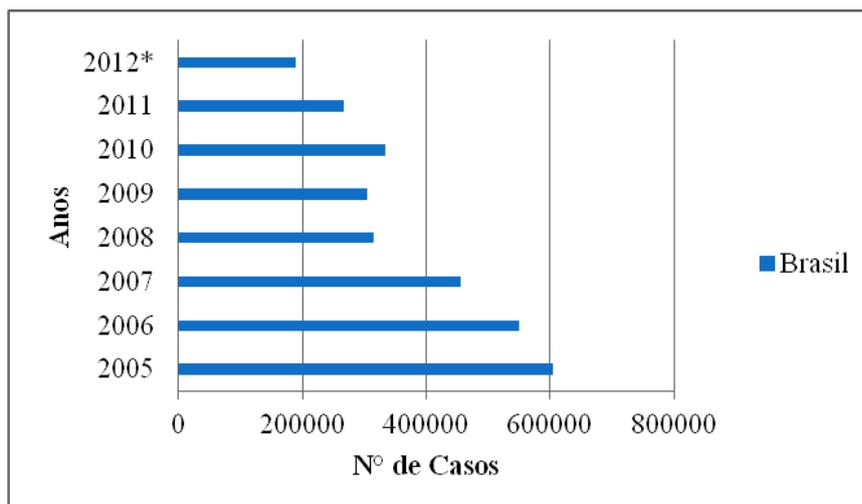


**Figura 01:** Países com áreas de risco para Transmissão da Malária.

Fonte: OMS, 2010

No continente Americano, somente em 2010 foram diagnosticados aproximadamente 675.000 casos nos 19 países com áreas de transmissão. Desse total, calcula-se que a maioria (70%) foram causadas pelo *Plasmodium vivax* (OMS, 2011). Nas áreas da América do Sul, a malária é considerada como uma doença recorrente nos países endêmicos, com períodos de flutuações no número de casos (ROBERTS *et al.*, 1997).

No Brasil, de 2005 a meados de 2012 foram confirmados 3.017.444 casos de malária (**Figura 02**). O número de hospitalizações anuais está estimado em 5.000, com cerca de 100 óbitos (SIVEP, 2012).



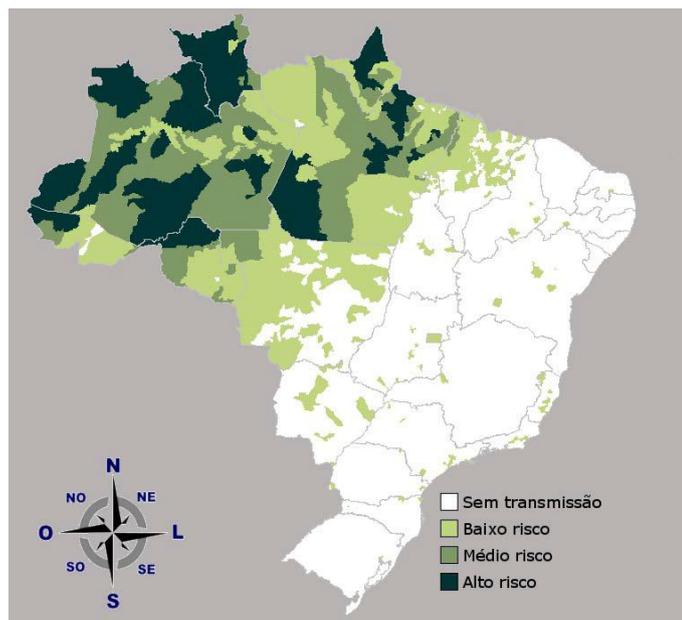
**Figura 02:** Número de casos de Malária diagnosticados no Brasil nos de 2005 a 2012.

**Fonte:** SIVEP, 2012 - \*Dados confirmados até o mês de Setembro.

As áreas endêmicas de malária no Brasil estão localizadas na região Amazônica, com casos isolados em outras regiões (**Figura 03**). A maioria dos casos ocorre em áreas rurais, no entanto, há registros de casos em áreas urbanas, principalmente nas áreas cercadas por florestas e lagos (BRASIL, 2003). A transmissão nessa região se dá pelas favoráveis características ambientais, climáticas e ecológicas, sem distribuição homogênea da doença, sendo esta problemática geralmente associada aos processos de ocupação urbana e exploração natural (OLIVEIRA-FILHO & MARTINELLI, 2009).

A malária no Brasil é causada por três espécies: *Plasmodium vivax* (83,7% dos casos), *Plasmodium falciparum* (16,3%) e pequenas proporções de *Plasmodium malariae* (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Além disso, casos importados de malária ocasionados pelo *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* são notificados (BRASIL, 2009).

As áreas de risco no Brasil estão classificadas em 4 situações distintas. Essa divisão em “regiões” é realizada de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA) dos casos notificados de malária, que levam em consideração as características epidemiológicas do local e o risco de contrair a doença. O IPA é quantificado através do número de casos da doença por mil habitantes (BRASIL, 2006).



**Figura 03:** Áreas de transmissão da Malária no Brasil, distribuição de acordo com o IPA.

**Fonte:** BRASIL, 2011

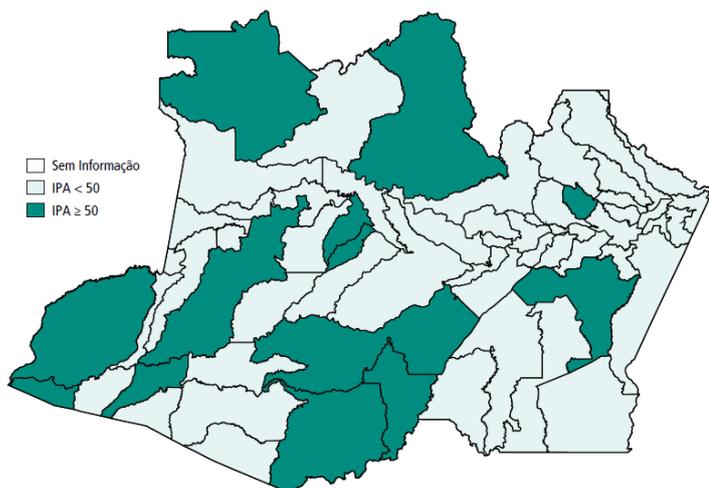
Assim, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) dividiu o território brasileiro em 4 áreas de acordo com o IPA: Áreas de Alto Risco (IPA > 49,9 casos/1.000 habitantes): áreas de transmissão com alta densidade de vetores/anofelinos; Áreas de Médio Risco (IPA de 10 a 49,9 casos/1.000 habitantes): áreas caracterizadas pela menor densidade de vetores, com transmissão da doença em locais delimitados; Áreas de Baixo Risco (IPA de 0,1 a 9,9 casos/1.000 habitantes): locais com ocupações estáveis, com baixa transmissão da doença; Áreas Não-Endêmicas (IPA = zero): Locais onde não há transmissão da malária.

Para Saraiva *et al.* (2009), as áreas de alto, médio e baixo risco são regiões de florestas tropicais úmidas, florestas menos densas e periferias das cidades, respectivamente. Em geral, as periferias das cidades são os locais onde há portadores do plasmódio, vetores e indivíduos suscetíveis, que moram em aglomerados de casas em condições precárias.

Vale ressaltar que, as ocupações humanas desordenadas e as ações como a abertura de estradas, construção de hidrelétricas, exploração de minérios e combustíveis fósseis, colocam o homem em contato com o vetor nas áreas de risco e o aumento do número de infectados (RODRIGUES *et al.*, 2008).

O Estado do Amazonas é considerado uma área altamente endêmica para a malária, com média do Índice Parasitário Anual (IPA) de 42,2 por mil habitantes nos últimos 10 anos (SUÁREZ-MURTIS *et al.*, 2007). No ano de 2010, 15 municípios (Manaus, São Gabriel da Cachoeira, Eirunepé, Atalaia do Norte, Coari, Barcelos, Tabatinga, Manicoré, Tefé, Lábrea,

Borba, Tapauá, Rio Preto da Eva, Itacoatiara e Guajará) do estado contribuíram com mais de 80% dos casos de malária no Amazonas, conforme demonstrado na **Figura 04** (BRASIL, 2011b).

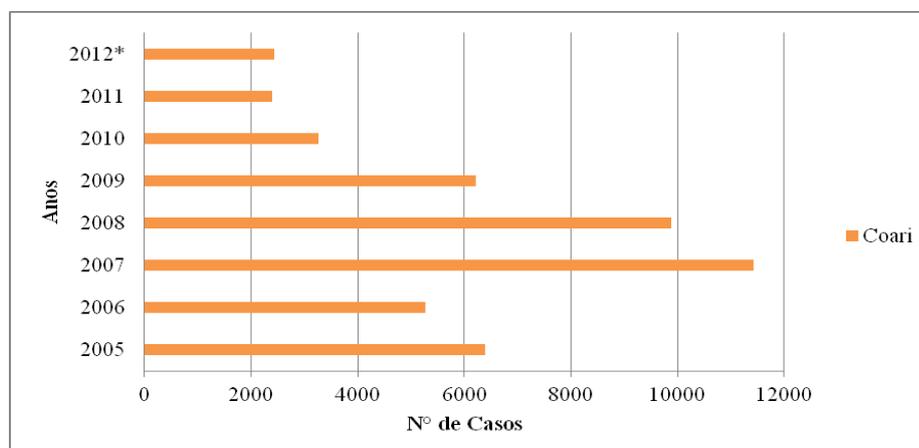


**Figura 04:** Áreas de transmissão da Malária no Amazonas, com os respectivos valores do IPA no ano 2010

**Fonte:** BRASIL, 2011b

No período de 2005 a meados de 2012 foram confirmados 1.047.171 casos de malária no estado do Amazonas, com média de 550 hospitalizações anuais (SIVEP, 2012).

O município de Coari foi responsável por mais de 40% dos casos diagnosticados de malária no Estado do Amazonas no ano de 2000, com IPA de 113,3 casos por mil habitantes (BRAGA-MIRANDA *et al.*, 2006). No período de 2005 a meados de 2012 foram confirmados 47.308 casos (**Figura 05**), com média de IPA de 76,9 nesse período. (SIVEP, 2012).



**Figura 05:** Número de casos de Malária diagnosticados no Município de Coari nos de 2005 a 2012\*.

**Fonte:** SIVEP, 2012 - \*Dados confirmados até o mês de Setembro.

### 2.3. Etiologia

A Malária é causada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, com cinco espécies que infectam o homem, o *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale* e *knowlesi* (BRASIL, 2006; COX-SINGH *et al.*, 2008; CRAWLEY *et al.*, 2010). O *Plasmodium* pertence ao Filo Apicomplexa, Família *Plasmodidae*, que abrange outros patógenos humanos, como o *Toxoplasma*, com duas formas de reprodução (assexuada e sexuada). Possui mais de 200 espécies descritas que infectam aves, répteis e mamíferos (RICH & AYALA, 2006).

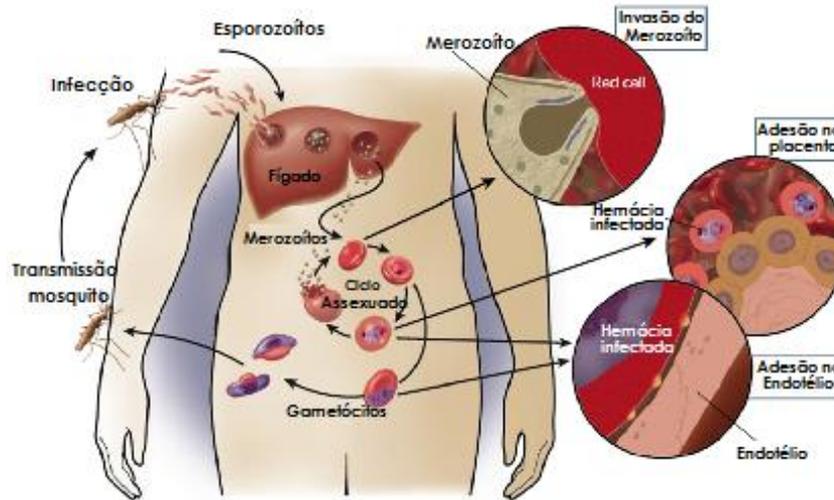
No Brasil há apenas a presença de três espécies: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (BRASIL, 2006). O *P. ovale* é encontrado somente no continente africano, mais precisamente na África Subsaariana e Ocidental, com casos importados em outros continentes (MAYXAY *et al.*, 2004; COLLINS & JEFFERY, 2005). Quanto ao *P. knowlesi*, foi à última espécie descrita a infectar o homem. Inicialmente acreditava-se que infectava apenas primatas, no entanto, em 2004, os primeiros casos de infecção humana foram descritos em pacientes das Filipinas, Malásia, Singapura e Tailândia (COX-SINGH *et al.*, 2008; VAN HELLEMOND *et al.*, 2009).

Os vetores do *Plasmodium* são mosquitos do gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae, Anophelinae, Anophelini), com aproximadamente 400 espécies. Desse total, 54 estão presentes no Brasil, sendo o principal vetor a espécie *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, por sua capacidade de transmitir diferentes espécies de *Plasmodium* e alto grau de endofagia, distribuição em todo o território nacional e alta densidade na região Amazônica. Outras espécies como o *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) bellator* também podem infectar hospedeiros humanos. Vale ressaltar que, os criadouros geralmente são em locais onde há água parada e limpa, sombreada e de baixa correnteza (TAUIL & DANIEL-RIBEIRO, 1998; BRASIL, 2005; BRASIL, 2009).

### 2.4. Ciclo Parasitário

O ciclo do parasita dentro do hospedeiro humano segue alguns passos básicos (**Figura 06**), como: 1) Inoculação de esporozoítos pelo mosquito no homem; 2) Migração dos parasitas para circulação sanguínea e em seguida para o fígado; 3) Invasão dos hepatócitos no órgão e reprodução na forma assexuada, originando os esquizontes teciduais que amadurecem e liberam milhares de merozoítos; 4) Liberação na corrente sanguínea destes e invasão das hemácias, iniciando nova esquizogonia; 5) Transformação em trofozoítos, que amadurecem e se dividem, gerando esquizontes, que rompem as hemácias e são liberados novamente na

corrente sanguínea na forma de merozoítos; por fim, 7) Invasão de novas hemácias e/ou diferenciação em gametócitos machos ou fêmeas que serão ingeridos pelo mosquito no repasto sanguíneo, dando origem a um novo ciclo (MILLER *et al.*, 2002).



**Figura 06:** Ciclo do Plasmodium no hospedeiro

Fonte: MILLER *et al.*, 2002

O processo patológico tem início com a reprodução assexuada do parasita nas hemácias, com pouco dano no fígado, onde ocorrem eventos isolados como apoptose e estresse celular, com liberação inicial de citocinas pró-inflamatórias, mediadas pelo parasita (VAUGHAN *et al.*, 2008). Os eventos celulares e moleculares que ocorrem durante o ciclo de vida do parasita podem influenciar na patogênese da doença, elevando os casos de malária grave (MOTA *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2002).

## 2.5. Sinais e Sintomas

A sintomatologia da malária possui uma tríade clássica constituída por febre com elevação rápida da temperatura (variando entre 39°C e 41°C), calafrios e cefaleia intermitente. (BRASIL, 2006; COSTA *et al.*, 2010). Os sintomas da fase inicial (mal-estar geral e abundante sudorese, mialgias e artralgias, cansaço, náuseas e tonturas) podem ser confundidos com outras doenças febris, principalmente em áreas não endêmicas da doença (ROSAS, 2003).

Complicações podem ser observadas em crianças, mulheres grávidas e indivíduos de áreas não endêmicas, que em geral apresentam palidez, icterícia, hepatoesplenomegalia,

anemia e trombocitopenia. Nos casos graves, como a malária cerebral, podem ser observados convulsões, disfunções do sistema nervoso central, anemia grave, hipoglicemia, acidose, insuficiência respiratória e renal e choque (TAYLOR *et al.*, 2010).

Os episódios febris são caracterizados por suas recorrências. Em geral, são denominadas de acordo com a gravidade dos eventos. O *P. vivax*/*P. ovale* e *P. malariae* geralmente originam a “*febre terçã benigna*” e a “*febre quartã*”, respectivamente, pois se considerava que esses parasitas não estão associados às formas graves da doença (CARTER & MENDIS, 2002; SCHOFIELD & GRAU, 2005). O *P. falciparum* é responsável pela “*febre terçã maligna*” e “*sub-terçã maligna*”, pois esta relacionado às formas severas e com complicações da malária (VERRA *et al.*, 2009). Quanto ao *P. knowlesi*, este tem se demonstrado como uma importante causa de malária grave em humanos (COX-SINGH *et al.*, 2008; VAN HELLEMOND *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que, estudos recentes têm relatado a associação do *P. vivax* com casos graves e com complicações na malária (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Este fenômeno tem sido observado principalmente em estudos na Amazônia e na Índia e tem colocado a equipe clínica atuante em constante alerta (KOCHAR *et al.*, 2005; KOCHAR *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2012)

## 2.6. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da malária no Brasil é realizado pelo método da gota espessa, consistindo na identificação dos parasitas no sangue periférico, por meio de microscopia óptica. A inclusão de corantes biológicos permitiu identificar a espécie, estágio de desenvolvimento, viabilidade e quantificação dos parasitas, tornando o método simples, rápido e satisfatório quanto à sua sensibilidade e especificidade e o padrão ouro em todo o mundo (MAKLER *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2008). Vale ressaltar que, apesar de ser simples e de baixo custo, este procedimento depende da formação e conhecimentos quanto à diferenciação morfológica das espécies de plasmódio pelo microscopista, limitando o diagnóstico da malária (BRASIL, 2006). Assim, testes alternativos como de imunocromatografia têm sido desenvolvidos tanto para o *Plasmodium falciparum* quanto para o *Plasmodium vivax*, com o intuito de agilizar o diagnóstico da malária (FIGUEIREDO-FILHO *et al.*, 2003).

Outro método de diagnóstico empregado na identificação das espécies de *Plasmodium* é a PCR, pois torna possível a diferenciação com segurança, de todas as espécies, visto que amplifica regiões alvos do gene que diferenciam distintamente o *P. falciparum*, *P. vivax*, *P.*

*malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (SANTI *et al.*, 2004; COX-SINGH *et al.*, 2008). Esta técnica utiliza dois iniciadores gênero-específicos em uma primeira reação de amplificação além de *primers* específicos para cada espécie em uma segunda reação. Pode ser utilizada como método adicional, a microscopia para a identificação e confirmação da infecção em amostras clínicas, visto que numerosos ensaios com técnica de PCR convencional e em tempo real estão sendo desenvolvidas para o diagnóstico laboratorial (JOHNSTON *et al.*, 2006). Vale ressaltar que, o uso de métodos mais precisos de diagnóstico permite a seleção tanto de indivíduos sintomáticos como também de assintomáticos, que podem ser coletados de forma aleatória na população e que poderiam produzir uma melhor compreensão dos múltiplos fatores epidemiológicos que afetam a infecção de malária (RODULFO *et al.*, 2007).

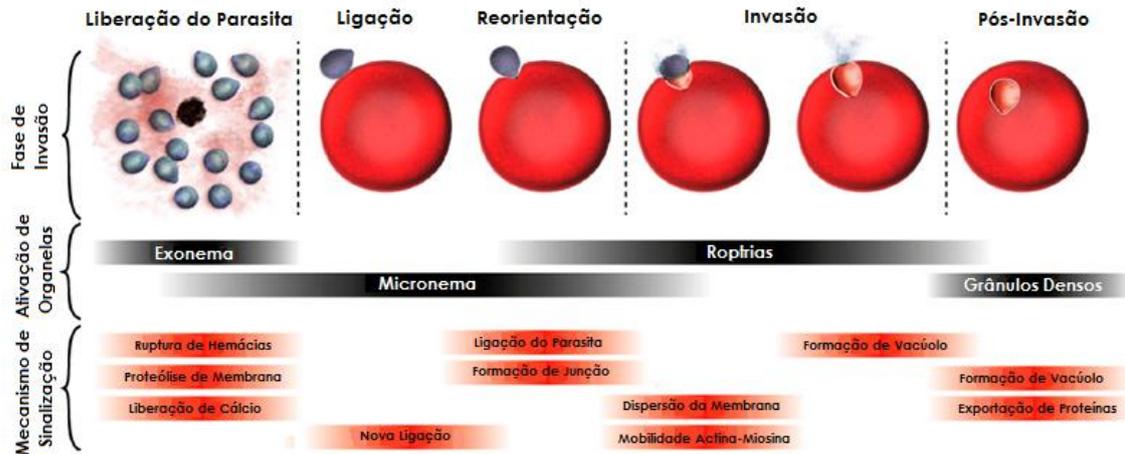
Métodos imunológicos também são utilizados para diagnóstico. Os testes Imunoenzimáticos (ELISA), são um bom exemplo, sendo realizado com o DNA do *Plasmodium*, após a lise desses parasitas em cultura (CORBETT *et al.*, 2004; QUASHIE *et al.*, 2006). No entanto, ensaios de ELISA utilizando proteínas, como a HRP2, demonstraram ser mais específicos e sensíveis, mas sem dados promissores (KIFUDE *et al.*, 2008). A Citometria de Fluxo também tem sido utilizada como método de diagnóstico da malária. Esta técnica se baseia na utilização de corantes de DNA fluorescentes, como o Iodeto de Protídeo, Brometo de Etídio, *Sybr Green*, Acridina Orange entre outros, em hemácias fixadas, que ao serem excitadas pelos lasers do aparelho emitem um sinal fluorescente. No entanto, ainda não é possível a identificação da espécie infectante (BARKAN *et al.*, 2000; APTE *et al.*, 2011; GRIMBERG, 2011).

## 2.7. Patogênese

Na malária, o processo patogênico é iniciado com a inoculação dos esporozoítos pelo vetor nos tecidos subcutâneos. Após a infecção, ocorre a migração dos parasitas para o fígado e invasão das células hepáticas, onde ocorre parte do processo de desenvolvimento do *Plasmodium* e a replicação intracelular. O processo é mediado pela proteína de adesão relacionada à Trombospondina (TRAP) e aos proteoglicanos de sulfato de heparina, (MOTA *et al.*, 2001; SCHOFIELD & GRAU, 2005).

As formas exoeritrocíticas são observadas após a ruptura dos hepatócitos e a invasão das hemácias ocorre de forma rápida (**Figura 07**), remodelando a estrutura das células infectadas e tornando estas mais rígidas (PRUDÊNCIO *et al.*, 2011; COWMAN *et al.*, 2012). Com a liberação de dezenas de parasitas (merozoítos) na corrente sanguínea, os sintomas são

evidenciados, principalmente com o início dos ciclos assexuados nas hemácias (MILLER *et al.*, 2002).



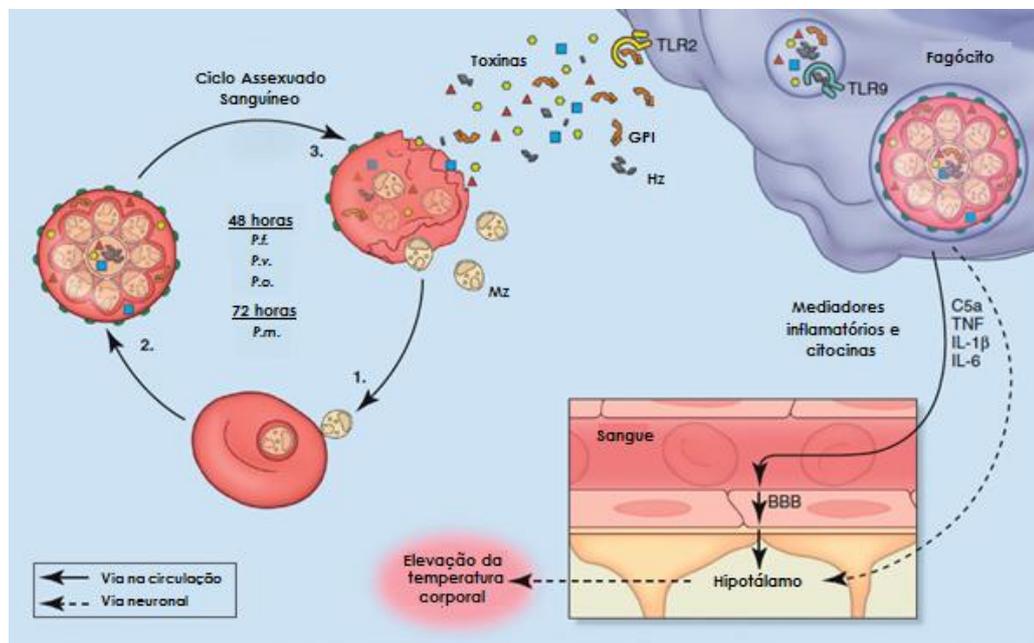
**Figura 07:** Invasão do eritrócito pelos Merozoítos.

**Fonte:** COWMAN *et al.*, 2012

Com a infecção das hemácias, o processo de cito-aderência destas no endotélio vascular é observado, diminuindo significativamente o número de células vermelhas na circulação e causando obstrução microvascular. O processo antes restrito a infecção por *P. falciparum*, hoje é relatado em infecções por *P. vivax*, aumentando o relato de complicações (MILLER *et al.*, 2002; ANSTEY *et al.*, 2009). Além dos fenômenos de citoaderência, outros processos da fisiopatologia estão ligados à gravidade da doença, como a formação das rosetas de hemácias, auto-aglutinação das células vermelhas e agregação dos leucócitos (UDOMSANPETCH *et al.*, 1995; PAIN *et al.*, 2001; DEANS *et al.*, 2006; KARUNAWEEERA *et al.*, 2007). A deformidade dos glóbulos vermelhos infectados pelos parasitas aumenta ainda a fragilidade dos eritrócitos e contribui para o déficit na perfusão sanguínea dos órgãos (HANDAYANI *et al.*, 2009).

A resposta inflamatória decorrente da patogênese da doença está intimamente relacionada com o nível da parasitemia. Estudos recentes têm demonstrado que o processo inflamatório e a produção de citocinas são maiores na infecção por *P. vivax* do que em outras espécies, como o *P. falciparum* (ANSTEY *et al.*, 2007; PRICE *et al.*, 2007; KARYANA *et al.*, 2008). A produção de agentes inflamatórios e pirogênicos podem estar associadas às toxinas de cada espécie e a composição destas, que podem gerar resposta imune exacerbada ou não (HEMMER *et al.*, 2006).

Os episódios febris da malária são iniciados pela interação entre as toxinas liberadas pela ruptura de esquizontes e células fagocíticas do sistema imune inato (OAKLEY *et al.*, 2011). As toxinas (âncoras de *GlicosilFosfatidilInositol*, hemozoína e DNA), também denominadas de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) são reconhecidas principalmente pelos Receptores do tipo *Toll* – TLRs (GOWDA *et al.*, 2007). A fagocitose dessas toxinas livres pelas células não possui um local exato para ocorrer (**Figura 08**), assim, o sequestro de parasitas da malária pode desencadear o processo de sinalização para a indução da febre e demais sintomas, podendo ser associado a casos graves da doença (AMODU *et al.*, 1998; OAKLEY *et al.*, 2011).



**Figura 08:** Diagrama esquemático demonstrando a indução da febre na malária.

Fonte: OAKLEY *et al.*, 2011

O isolamento dos PAMPs derivados do *Plasmodium* em ensaios *in vitro* levou ao descobrimento das âncoras de GPI, das proteínas MSP1 e MSP2, da hemozoína e do DNA. Foi relatado que estes componentes funcionam com indutores da produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos *in vitro*, principalmente de TNF- $\alpha$  (SCHOFIELD & HACKETT, 1993; TACHADO *et al.*, 1997; MILLER *et al.*, 2002; PARROCHE *et al.*, 2007). O TLR2, TLR4 e TLR9 são os responsáveis pelo reconhecimento desses componentes, ativando nas células dendríticas e macrófagos à produção de citocinas e gerando resposta inflamatória acentuada (PICHYANGKUL *et al.*, 2004; COBAN *et al.*, 2005; KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005; NEBL *et al.*, 2005).

Os mecanismos universais para indução da febre são ocasionados pela liberação de agentes pirogênicos, que atuam na termorregulação da temperatura corporal. A cascata de eventos que antecede a resposta febril ocorre com a liberação inicial de alguns pirogênicos, como as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, o fator 5a do Complemento (C5a) e a Prostaglandina E2 (PGE2). Células circulantes e localizadas nos tecidos, como os monócitos e as células de *Kupffer* no fígado, são as principais fontes desses agentes pirogênicos no processo patológico da malária, sendo necessária densidade parasitária mínima para desencadear a resposta (ROMANOVKY *et al.*, 2005; BLATTEIS, 2007; OAKLEY *et al.*, 2011). A liberação de mediadores, como o óxido nítrico (NO) são essenciais para a doença. Concentrações sistêmicas de NO foram observadas em pacientes com malária não complicada e níveis elevados em pacientes com malária cerebral, demonstrando que altos níveis podem causar neurotoxicidade nesses indivíduos (CLARK & COWDEN, 1999; CLARK *et al.*, 2004).

O uso de anticorpos monoclonais para anular o efeito dos agentes pirogênicos demonstrou que o TNF- $\alpha$  é a principal citocina que medeia à resposta imune na malária (VAN HENS BROEK *et al.*, 1996). Em concentrações elevadas, essa citocina pode induzir um quadro de malária grave, com disfunção de vários órgãos, anemia severa e malária cerebral (NEBL *et al.*, 2005). No entanto, os mecanismos da resposta imune serão modulados de acordo com o tipo de espécie infectante, a carga parasitária, o tipo de toxina/PAMP indutor da resposta, a fase eritrocítica e principalmente as características genéticas e a imunidade anti-malária do hospedeiro (OAKLEY *et al.*, 2011).

## **2.8. Resposta Imune na Malária**

As defesas imunológicas dos mamíferos, em específico dos humanos, são realizadas pelo sistema imune inato e adaptativo. A imunidade inata é responsável pelo reconhecimento dos microrganismos patogênicos, sendo a primeira barreira de defesa do organismo. Enquanto que a imunidade adaptativa é responsável pela memória imunológica e os perfis de resposta imune celular e humoral gerados pelas células linfócitos B e T (TAKEDA & AKIRA, 2005).

A eficiência do sistema imunológico tem sido moldada ao longo do processo evolutivo, possibilitando a coexistência de agentes infecciosos em hospedeiros e controlando as infecções (BOZZA *et al.*, 2012). Os danos ocasionados durante os processos infecciosos são causados em sua maioria pela exacerbação da resposta imunológica/inflamatória, com ativação das cascatas de sinalização intracelular, produção de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e reativos de oxigênio. A patogênese da doença pode ser resultado do efeito direto do microrganismo infeccioso e/ou intensidade da resposta inflamatória, que será

determinada pela ativação do sistema imune através do reconhecimento de moléculas patogênicas. Assim, os danos patológicos observados nas doenças infecciosas como a malária em geral são decorrentes da junção dessas forças de forma intrínseca (NATHAN, 2002; AKIRA *et al.*, 2006; POWERS *et al.*, 2006).

O processo de resposta imune na patogênese de doenças parasitárias como a malária tem um papel essencial na eliminação do agente infeccioso, além de promover a reparação tecidual (MEDZHITOV, 2007). As respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro podem estar relacionadas com a capacidade de sobrevivência e transmissão do protozoário, caso este não possua mecanismos de escape aos estímulos gerados (LOPES *et al.*, 2012). No entanto, a proteção conferida pela resposta imune é avaliada considerando o agente infeccioso, pois um mecanismo protetor contra uma bactéria extracelular pode não ser eficiente contra um parasita (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009).

Ambas as respostas imunes são fundamentais para o controle das infecções parasitárias, destacando-se neste a resposta imune celular em doenças causadas por protozoários intracelulares, como a malária. Neste tipo de resposta, observa-se tradicionalmente uma forte atuação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, de perfil T<sub>H</sub>1, linfócitos TCD8<sup>+</sup> citotóxico e a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ROLAND *et al.*, 2006; COELHO-CASTELO *et al.*, 2009).

Os parasitas como o *Plasmodium*, podem ser alvos ainda de anticorpos e do sistema complemento, no entanto, estes não são suficientes para controlar a doença. Apesar de ser observado que na fase eritrocítica, as formas merozoítas que saem das hemácias serem alvos comuns destes componentes neutralizantes e opsonizantes (MARSH & KINYANJUI, 2006). Desta forma, nota-se que se faz necessária a participação das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> citotóxica, tanto para produzir citocinas, quanto para destruir os parasitas e as células infectadas por estes (HAFALLA *et al.*, 2006). A ativação das células mononucleares pelo parasita pode estimular a produção e liberação das citocinas inflamatórias, no entanto, o desequilíbrio de atuação entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias parece ser fundamental para o agravamento da doença e o surgimento de complicações, sendo alvo de terapia específica (HO & WHITE, 1999; KWIATKOWSKI, 2005; SCHOFIELD & GRAU, 2005; CRAWLEY *et al.*, 2010).

### 2.8.1. Resposta Imune Inata

Estudos imunológicos em pacientes com malária sempre investigaram os mecanismos adaptativos da resposta, com o enfoque na identificação de antígenos alvos para a produção de

vacinas (ARTAVANIS-TSAKONAS & RILEY, 2002). Recentemente, pesquisas abordando os mecanismos do sistema imune inato foram desenvolvidas, demonstrando que o controle da parasitemia em infecções por plasmódio são dependentes tanto de mecanismos adaptativos quanto inato (FELL & SMITH, 1998).

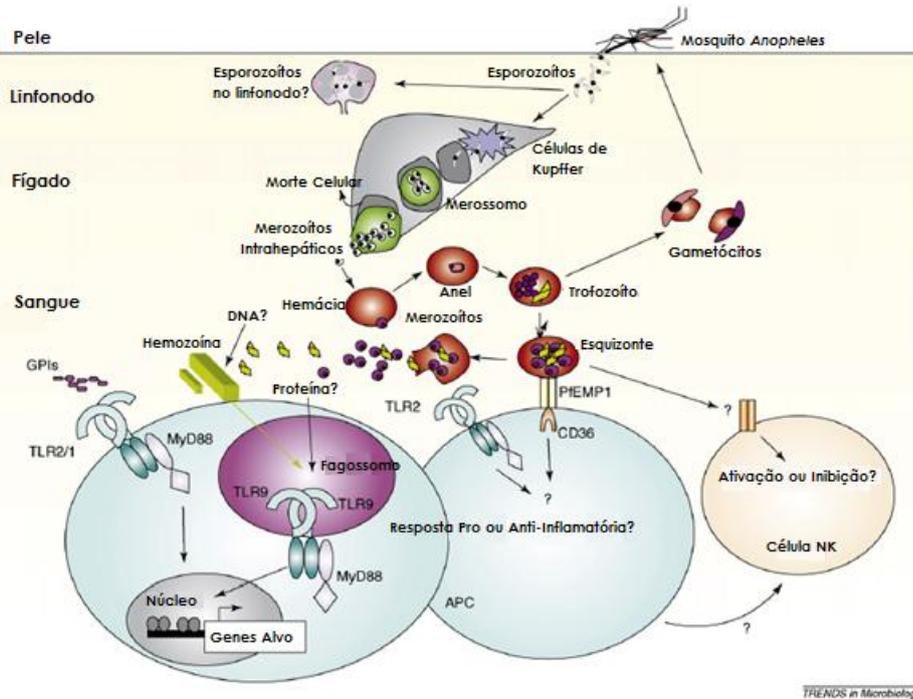
A imunidade inata, outrora descrita como inespecífica, passou a desempenhar papel fundamental nos processos infecciosos, principalmente com a descoberta dos PRRs (*pattern recognition receptors*) ou Receptores de Reconhecimento Padrão, tais como: *Toll-Like*, *Nod-Like*, *RIG-I-Like*, *Scavenger*, entre outros. Esses receptores reconhecem vários componentes microbianos (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*), como açúcares, ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, peptídeos ou mesmo a combinação desses (TEIXEIRA *et al.*, 2002). A resposta inata também tem sido associada a processos inflamatórios mais exacerbados, com ativação de macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e mastócitos, com reconhecimento dos patógenos pelos receptores descritos (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002).

O principal grupo de receptores na resposta imune inata a malária são os Receptores *Toll-like* (TLRs), que reconhecem vários componentes de bactérias, vírus e moléculas derivadas de protozoários, como o plasmódio (CAMPOS *et al.*, 2001). Essas moléculas compreendem uma grande família de receptores, constituídos por mais de 11 membros, no entanto, em células do sistema imune humano apenas do TLR1 ao TLR9 e o TLR11 são funcionais (ROCK *et al.*, 1998; GAZZINELLI & DENKERS, 2006; KAWAI & AKIRA, 2011).

Trabalhos recentes tem demonstrado que os TLRs são mediadores essenciais na resposta à malária (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Estudos com camundongos deficientes na expressão dos receptores e moléculas coestimulatórias apresentam produção menor de citocinas pró-inflamatórias e atenuação da resposta imune na infecção por diferentes espécies de *Plasmodium* (ADACHI *et al.*, 2001; COBAN *et al.*, 2007; FRANKLIN *et al.*, 2007).

As moléculas responsáveis pela ativação da resposta imune inata na malária ainda estão sendo caracterizadas. Atualmente, três PAMPs foram descritos como potenciais indutores: as âncoras de GlicosilFosfatidilInositol (GPI), as micropartículas e o DNA do parasita com o pigmento hemozoína. Essas moléculas são responsáveis pela ativação do TLR2, TLR4 e TLR9 (**Figura 09**), respectivamente, que parecem ser os principais receptores envolvidos na resposta inata, mediando à produção de citocinas, como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (COBAN *et*

al., 2005; KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005; PARROCHE *et al.*, 2007; FRANKLIN *et al.*, 2009).



**Figura 09:** O complexo ciclo de vida do *Plasmodium sp.* no hospedeiro vertebrado e o seu reconhecimento pelo sistema imune inato.

Fonte: COBAN *et al.*, 2007

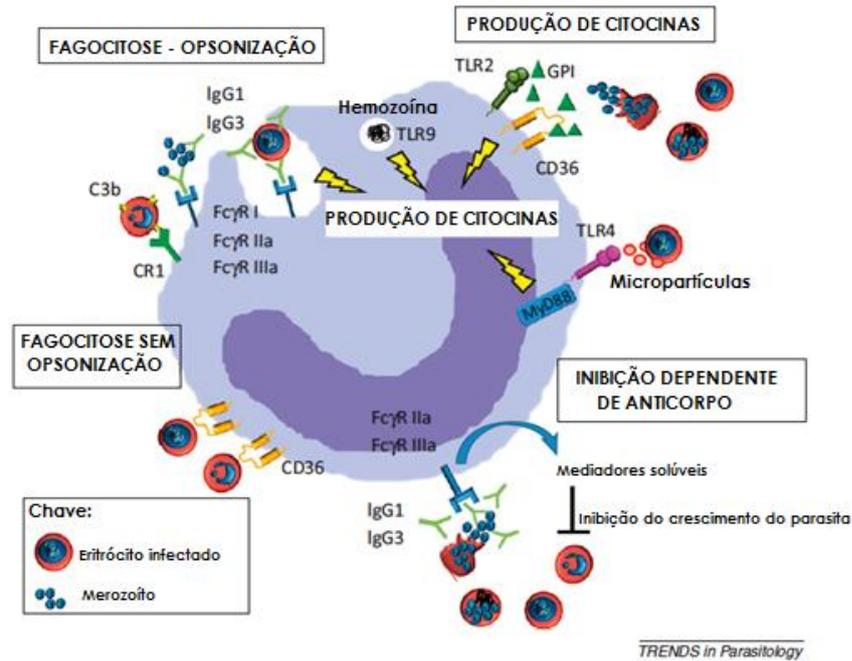
A definição do papel de cada receptor nos episódios patológicos é realizada com a análise da tolerância imunológica desenvolvida pelos pacientes que apresentam reinfecções da doença (FAVORITE & MORGAN, 1942). Células de pacientes com sepse bacteriana são similarmente hiporreativas ao LPS presente em bactérias gram-negativas quando estimuladas *in vitro*, demonstrando que a via de resposta do TLR4 esta em um processo de “latência imunológica inata” (MILLER *et al.*, 2005; TAKEDA & AKIRA, 2005). Pacientes com malária certamente apresentam processo de latência imunológica, visto que, indivíduos residentes em áreas endêmicas, acometidos sucessivas vezes pela doença não apresentam qualquer sinal/sintoma, mesmo com a presença de parasitas no sangue (GATTON & CHENG, 2002; BOUTLIS *et al.*, 2006). Assim, a função dos TLRs foi examinada em células mononucleares (PBMC) de pacientes com malária, que apresentaram aumento na resposta imune inata a agonistas dos TLR1/TLR2 e TLR4, contestando os dados desse processo na patogênese da malária (McCALL *et al.*, 2007). No entanto, os indivíduos estudados apresentavam parasitemia baixa e poucos sintomas, sugerindo que os efeitos da latência

imunológica após os primeiros estágios da doença ainda não haviam se desenvolvido (FRANKLIN *et al.*, 2009).

O sistema imune inato possui uma grande variedade de células que expressam os PRRs, estando entre elas às células dendríticas, os macrófagos, as células NK, os neutrófilos, entre outros. Estas células são responsáveis por iniciar o mecanismo de defesa do organismo/hospedeiro através do reconhecimento dos PAMPs pela discriminação dos componentes do hospedeiro e dos patógenos (MEDZHITOV *et al.*, 1997).

As células inatas têm papel importante na patogênese da malária, com resposta inflamatória rápida, caracterizada principalmente pelas células NK, macrófagos e células dendríticas (CHUA *et al.*, 2012). Em modelos experimentais, foi observado o reconhecimento das moléculas dos esporozoítos no fígado, com infiltrado dessas células, linfócitos T e produção de IFN- $\gamma$ , no entanto, a presença dos linfócitos T é dependente de células NK e IL-12 (DOOLAN & HOFFMAN, 1999; PASQUETTO *et al.*, 2000).

A infecção das hemácias pelo parasita transforma a membrana dessas células, inserindo proteínas do parasita que podem interagir com os receptores das células inatas (**Figura 10**), ativando de forma direta ou indireta a resposta (MOXON *et al.*, 2011; STOUTE, 2011; CHUA *et al.*, 2012). Com a ruptura das hemácias infectadas, restos celulares e micropartículas da membrana, que são importantes imunógenos, irão ativar o complemento e gerar deposição de C3b, iniciando o processo de fagocitose celular (SILVER *et al.*, 2010; COUPER *et al.*, 2010). Os merozoítos liberados durante a ruptura poderão ser alvos de anticorpos específicos (IgG1 e IgG3) que irão acentuar a fagocitose, pela ligação antígeno-anticorpo-receptor de monócito (Fc $\gamma$ Rs) e pela ativação dos receptores *Toll-like* descritos (DASARI *et al.*, 2012). Desta forma, nota-se que as células fagocíticas são importantes componentes na redução eficaz da parasitemia, no entanto, a fagocitose eficiente só é observada quando há opsoninas, tais como anticorpos, moléculas do complemento e fragmentos celulares, ativando o processo (SILVER *et al.*, 2010).



**Figura 10:** Mecanismos envolvidos na resposta imune na malária por células fagocíticas.

**Fonte:** CHUA *et al.*, 2012

As citocinas em geral são sintetizadas quando as células do sistema imune inato (ex: macrófagos) reconhecem os componentes microbianos através dos PAMPs. Estas compreendem um grande grupo de moléculas, que são diferenciados estruturalmente e incluem as Inter-Leucinas (ex: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12) e o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que apresentam vários efeitos locais e sistêmicos (BEVILACQUA *et al.*, 1994; DOWNEY, 1994; SPRINGER, 1994).

A IL-12 e a IL-18 são produzidas por monócitos/macrófagos no início da infecção com a função de diminuir a carga parasitária e ativar a produção de IFN- $\gamma$ , necessário para a remoção do parasita e ativação de funções pró-inflamatórias (TORRE, 2009). O pigmento hemozoína desencadeia a produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , além de quimioquinas como MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  e  $\beta$ , aumentando a resposta inflamatória (GIRIBALDI *et al.*, 2010).

Espécies distintas de *Plasmodium* podem influenciar na resposta imune inata na malária. A imunopatologia da doença está diretamente relacionada aos componentes parasitários e será mediada pelo processo de sinergismo entre a imunidade inata e adaptativa, importante para o controle da infecção e gravidade da doença (CHUA *et al.*, 2012).

### 2.8.2. Resposta Imune Adaptativa

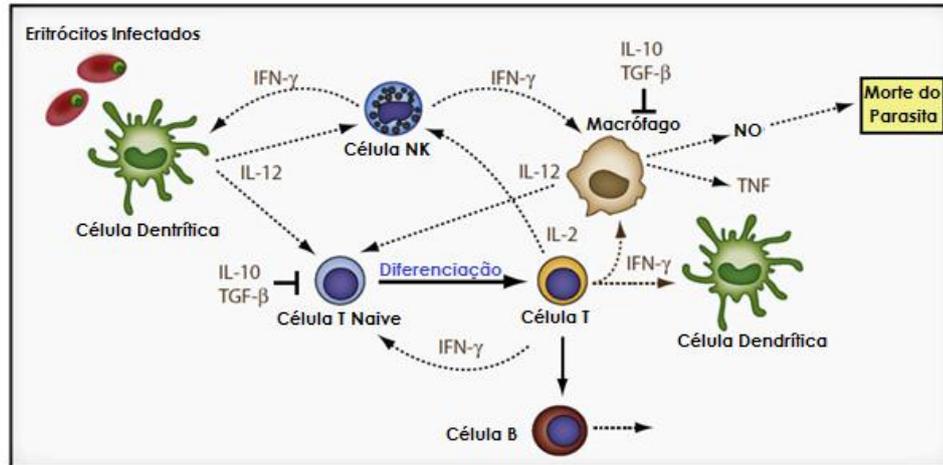
A diversidade de antígenos encontrados no *Plasmodium* interfere diretamente na detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro, atuando na elaboração da resposta adaptativa. O desenvolvimento da imunidade adaptativa ocorre de forma lenta e com pouca efetividade, uma vez que o parasita possui mecanismos de escape que limitam a destruição do Plasmodio (ANSTEY *et al.*, 2009).

A patogênese da doença e os mecanismos envolvidos na resposta imune ainda não estão totalmente esclarecidos. A compreensão sobre os componentes envolvidos na interação, parasita-hospedeiro podem auxiliar na concepção de novos fármacos e vacinas (LIEHL & MOTA, 2012).

O papel da resposta imune adquirida tem sido definido como o estado de resistência à infecção, com destruição do plasmódio pelas células e neutralização da multiplicação dos parasitas pelos anticorpos. O processo de aperfeiçoamento da resposta é resultado de sucessivas infecções, conferindo ao hospedeiro, mecanismos de defesa ao agente patogênico (DOOLAN *et al.*, 2009).

Estudos em humanos e camundongos têm exemplificado os processos patogênicos e as respostas imunológicas na malária. A eliminação do parasita é dependente da ativação da resposta imune adaptativa via células T e B (HIRUNPETCHARAT *et al.*, 1999; WEATHERALL *et al.*, 2002).

A resposta imune adaptativa é mediada pelas Células Dendríticas (DCs) com papel crucial no *priming*/ativação das respostas mediadas pelos linfócitos T e (**Figura 11**). Em humanos, estudos sugerem que as DCs podem ser moduladas pelas proteínas do parasita expressas na membrana das hemácias e pela diminuição de IL-12 e aumento de IL-10, inibindo ou não sua atividade (URBAN *et al.*, 1999; OCAÑA-MORGNER *et al.*, 2003; ING *et al.*, 2006).



**Figura 11:** Apresentação de antígenos e ativação celular mediado pelas DCs, com posterior ação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células NK e macrófagos.

Fonte: GOOD & DOOLAN, 2010

Os linfócitos B e T CD4<sup>+</sup> possuem papel primordial no controle da parasitemia, atuando na destruição do plasmódio. Ambos são essenciais para a completa erradicação do parasita, apesar de estudos demonstrarem que os anticorpos isoladamente serem suficientes para eliminar o patógeno da circulação (HIRUNPETCHARAT *et al.*, 1999).

A resposta imune celular inicial é mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de perfil Th1, com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ . O controle da parasitemia no hospedeiro está associado à ativação dos macrófagos e produção sinérgica de IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e de radicais livres, como o Óxido Nítrico (NO) (ROCKET *et al.*, 1991; JACOBS *et al.*, 1996). Quanto ao *clearance*/eliminação dos parasitas, este é caracterizado pela presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de perfil Th2 e o subconjunto de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-6), além da ativação das células T  $\gamma\delta$  e células NK produtoras de IFN- $\gamma$ . (ARTAVANIS-TSAKONAS & RILEY, 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003; MACKINTOSH *et al.*, 2004; BOUTLIS *et al.*, 2006).

A ação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na patogênese da malária está restrito a destruição de células hepáticas infectadas na fase pré-eritrocítica, visto que as hemácias não expressam moléculas de HLA de classe I. Estudos *in vitro* evidenciaram o papel dessas células na destruição de hepatócitos infectados pelo Plasmódio (GOOD *et al.*, 2005). Após a ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em Linfócitos T Citotóxicos (LTcs) pelas células de Kupffer, ocorre a migração do nódulo linfático para o fígado, onde iniciam o processo de lise/morte dos hepatócitos infectados através da liberação de perforinas, granzimas e IFN- $\gamma$  (SCHWENK & RICHIE, 2011).

A morbidade da malária aguda esta associada principalmente com a exacerbação da resposta imune na fase eritrocítica (SCHOFIELD & GRAU, 2005). Essas complicações estão associadas principalmente com o desequilíbrio na produção de citocinas como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , além de outros mediadores como o NO (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado a existência de um equilíbrio entre o controle da infecção e a imunopatologia da malária, prevenindo complicações. Esse equilíbrio é mediado pelas células T reguladoras (Tregs), que desempenham papel importante na homeostase imune e controle das respostas inflamatórias (SAKAGUCHI & POWRIE, 2007).

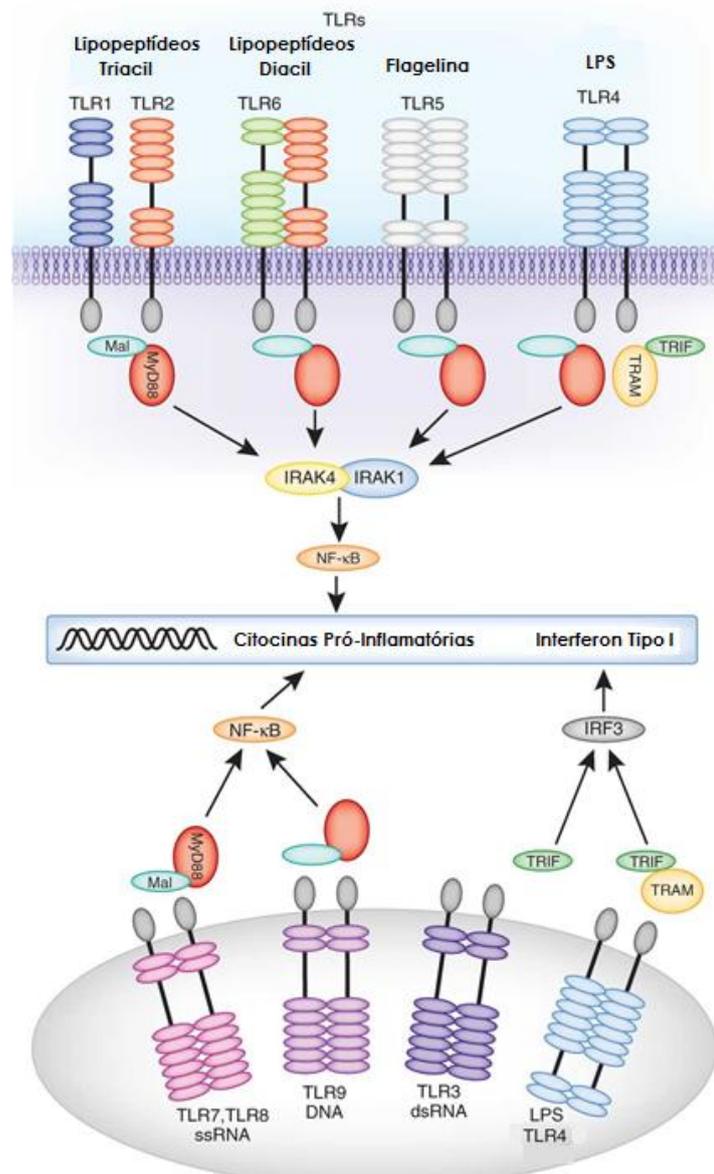
Na infecção pelo plasmódio, as células Tregs atuam na supressão da resposta inflamatória, através do contato direto com as células efectoras e na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  (RILEY *et al.*, 2006; BELKAID *et al.*, 2007). A função das células Tregs tem sido associada com o controle das respostas inflamatórias e na diminuição da parasitemia, contudo, o aumento no número dessas células tem gerado ação inversa, favorecendo o aumento do número de parasitas e o desenvolvimento da infecção (WALTHER *et al.*, 2005; TODRYSK *et al.*, 2008; MINIGO *et al.*, 2009). Na infecção por *P. vivax* em humanos, foi observado aumento no número dessas células produtoras de IL-10 em culturas in vitro e aumento sérico desta citocina (JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2008; BUENO *et al.*, 2010).

Além da resposta mediada por células, os anticorpos possuem papel importante na imunopatogênese da malária. O controle da parasitemia é mediado por essas moléculas através da opsonização dos parasitas (merozoítos), bloqueio da citoaderência e na interrupção da formação das rosetas de hemácias (CARLSON *et al.*, 1994). Em indivíduos residentes em áreas endêmicas, foi observada forte resposta humoral, com ativação de linfócitos B policlonais e níveis elevados de diferentes Imunoglobulinas anti-*plasmodium*, que foram associadas ao menor risco para o desenvolvimento da doença, além do suporte as drogas antimaláricas durante a fase aguda (KYES *et al.*, 2001; BERECZKY *et al.*, 2004; MAYXAY *et al.*, 2004).

## **2.9. Receptores *Toll-Like* e Polimorfismos no TLR-4**

Os *Toll-Like Receptors* (TLRs), são proteínas transmembranas, presentes em monócitos, macrófagos e células dendríticas (ESPOSITO *et al.*, 2012). Foram descobertos no final do século XX, a princípio como um receptor denominado *Toll*, que só estava presente na imunidade inata e mostrava-se essencial na defesa contra infecções fúngicas em *Drosophila* (LEMAITRE *et al.*, 1996).

Posteriormente, o receptor *Toll* (denominado de TLR4), foi identificado em mamíferos e passou a ser denominado de “*Toll-Like Receptors*” devido sua semelhança com o receptor “*Toll*” de *Drosophila* (NOMURA et al., 1994; MEDZHITOV et al., 1997). Esses receptores fazem parte de uma família de receptores composta por 11 membros em humanos (**Figura 12**), no entanto, apenas TLR1-TLR9 e o TLR11 são funcionais (ROCK et al., 1998; GAZZINELLI & DENKERS, 2006; KAWAI & AKIRA, 2011).



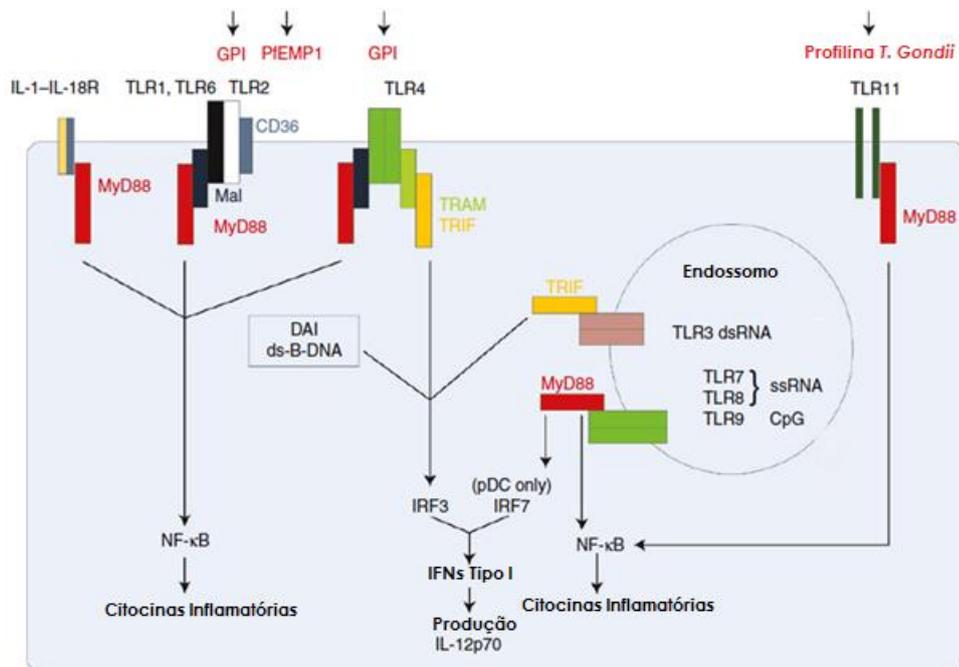
**Figura 12:** Receptores *Toll-like* e ativação da resposta imune inata.

Fonte: NETEA et al., 2012

Os TLRs contêm matriz extracelular rica em repetições de leucina (LRR) e um domínio citoplasmático ou intracelular homólogo ao receptor de interleucina 1 (IL-1R) denominado domínio TIR (*Toll/IL-1R*). Esses domínios são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs

de bactérias, parasitas, fungos e vírus, induzindo a expressão de vários genes diretamente envolvidos na produção de citocinas inflamatórias em resposta á infecções (BOWIE & O'NEILL, 2000; TAKEDA & AKIRA, 2005).

O TLR-4 é um subtipo de TLR e inicialmente foi caracterizado na identificação do componente LPS microbiano (POLTORAK *et al.*, 1998; HOSHINO *et al.*, 1999). Estudos posteriores descreveram o papel do TLR-4 na sinalização de resposta imune as proteínas de choque térmico 70 (Hsp70), âncoras de *Glicosilfosfatidilinositol* (GPI) e o DNA de *Trypanosoma cruzi* e âncoras de GPI de *Plasmodium falciparum* (**Figura 13**), ativando a resposta imune dependente de *MyD88*, com sinalização específica para a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  e componentes como Óxido Nítrico (ASEA *et al.*, 2002; ALMEIDA & GAZZINELLI, 2001; GAZZINELLI *et al.*, 2004; NEBL *et al.*, 2005; KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005).



**Figura 13:** Interação entre os PAMPs do *Plasmodium* e os receptores Toll-like.

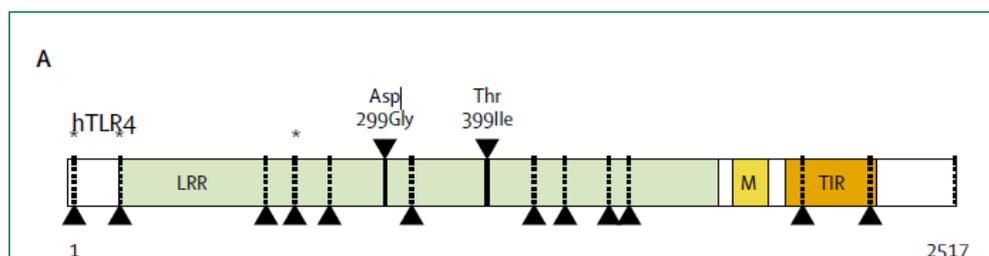
Fonte: LANGHORNE *et al.*, 2008

No entanto, esses ligantes endógenos necessitam de uma alta concentração para ativar o TLR4, enquanto que o LPS possui um potente imuno-ativador do TLR4, ou seja, mesmo que se apresente em pequenas quantidades, são capazes de gerar de forma eficiente a ativação do receptor (GAO & TSAN, 2003; TAKEDA & AKIRA, 2005).

O Gene humano que codifica a proteína formadora do receptor TLR4 foi mapeada no braço longo do Cromossomo 9, locus 9q32-q33 (SCHMITT *et al.*, 2002; SCRÖDER &

SCHUMANN, 2005). A partir do mapeamento foram descritas duas alterações polimórficas (SNPs) no gene humano do TLR4 (**Figura 14**) que alteram a estrutura proteica, sendo uma delas a substituição de um único nucleotídeo (SNP) de uma adenina (A) por uma glicina (G) que gera a modificação do ácido aspártico em uma glicina no resíduo 299 (*Asp299Gly*) e outra a transição de uma citosina (C) para uma timina (T) que gera a substituição do aminoácido treonina por uma isoleucina no resíduo 399 (*Thr399Ile*) da região extracelular do TLR4 (ARBOUR *et al.*, 2000; AGNESE *et al.*, 2002; SCHMITT *et al.*, 2002; BARBER *et al.*, 2004).

Estes SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são alterações de apenas um par de bases, chamado de mutação pontual, que podem levar à troca de aminoácido na proteína codificada pelo gene ou na maior ou menor taxa de expressão da proteína normal. Em geral essas mutações podem causar uma alteração nos mecanismos de defesa das doenças, que associado a fatores ambientais podem conferir ao paciente maior ou menor predisposição a desenvolver tal doença, com complicações ou não. Assim, esses polimorfismos (SNP 299 e 399) podem gerar uma diminuição na resposta imune do indivíduo portador e consequentemente uma quebra na cadeia de defesa do organismo, visto que a primeira barreira de defesa do sistema imune é efetuada pelos receptores e células da imunidade inata (SCRÖDER & SCHUMANN, 2005).



**Figura 14:** Posição dos SNPs *Asp299Gly* e *Thr399Ile* na sequência codificadora do TLR-4.

**Fonte:** SCRÖDER & SCHUMANN, 2005

Estudo com crianças africanas, moradoras de áreas endêmicas de malária, associou o aparecimento de manifestações clínicas da malária severa aos polimorfismos no receptor TLR-4 (MOCKENHAUPT *et al.*, 2006a). No entanto, em pesquisas com pacientes adultos não foi observado correlação entre os polimorfismos e complicações da malária e outras doenças parasitárias, como a doença de chagas crônica (MOCKENHAUPT *et al.*, 2006b; GRENE *et al.*, 2009; ZAFRA *et al.*, 2008).

---

*Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a resposta imune celular e determinar a frequência alélica dos polimorfismos do receptor *Toll-Like-4* em indivíduos com Malária da cidade de Coari, Estado do Amazonas.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a resposta imune celular por Citometria de Fluxo de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com Malária;
- Determinar a frequência alélica dos polimorfismos do receptor TLR-4, através dos marcadores *Asp299Gly* e *Thr399Ile*;
- Quantificar as concentrações séricas das citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) nesta população;
- Relacionar a resposta imune celular e as concentrações das citocinas aos polimorfismos do receptor *Toll-like-4*.

---

# *Material e Métodos*

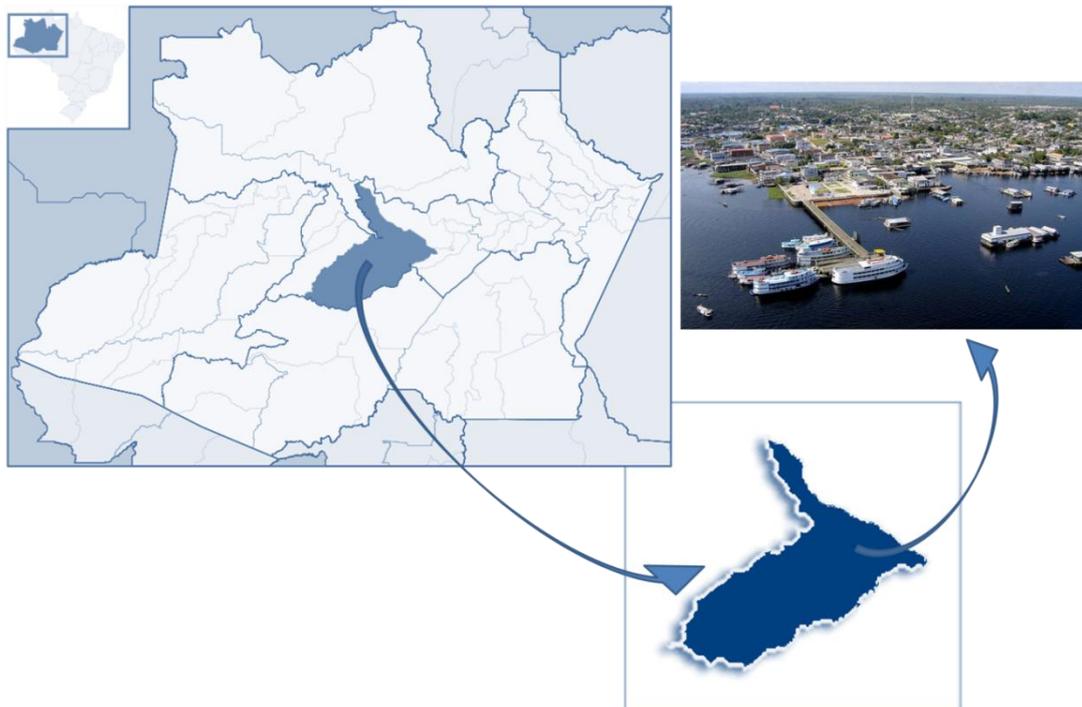
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, com coleta de amostras de pacientes diagnosticados com malária causada pelo *P. vivax* para avaliar a resposta imune celular e determinar a frequência alélica dos polimorfismos do receptor *Toll-Like-4*.

### 4.2. População de Estudo: Coari

O município de Coari (**Figura 15**), no Estado do Amazonas, está localizado na parte da planície Amazônica revestida de um lado pelas florestas tropicais da região e banhado por outro pelo Rio Solimões e calhas dos Lagos Coari e Mamiá. A cidade possui uma área de 57.277.090 km<sup>2</sup>, sendo a 5<sup>a</sup> maior cidade do estado do Amazonas (IBGE, 2012). Segundo o IBGE, Coari apresenta uma estimativa populacional de 77.305 habitantes (CENSO, 2010). Possui clima equatorial quente e úmido, com duas estações distintas, inverno (período chuvoso) e verão (período de seca) e temperatura média anual variando de 24°C e 26°C. A cidade atualmente é umas das mais ricas da região Norte em decorrência da exploração de petróleo e gás natural pela Petrobrás na bacia de Urucu.



**Figura 15:** Mapa com a localização da cidade de Coari-Amazonas-Brasil.

**Fonte:** IBGE, 2012 - Modificado por Costa, AG.

### **4.3. Amostragem: Instituto de Medicina Tropical de Coari (IMTC)**

A amostragem foi composta por 77 pacientes infectados com *P. vivax* e diagnosticados com malária que procuraram atendimento no Instituto de Medicina Tropical de Coari (vinculado a Secretaria Municipal de Saúde de Coari e a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD) no período de Março a Julho de 2012. Vale ressaltar que, a amostragem possui ainda 58 indivíduos enquadrados no grupo controle, que foram coletados ao acaso, com lâmina negativa para malária e sem doenças aparentes.

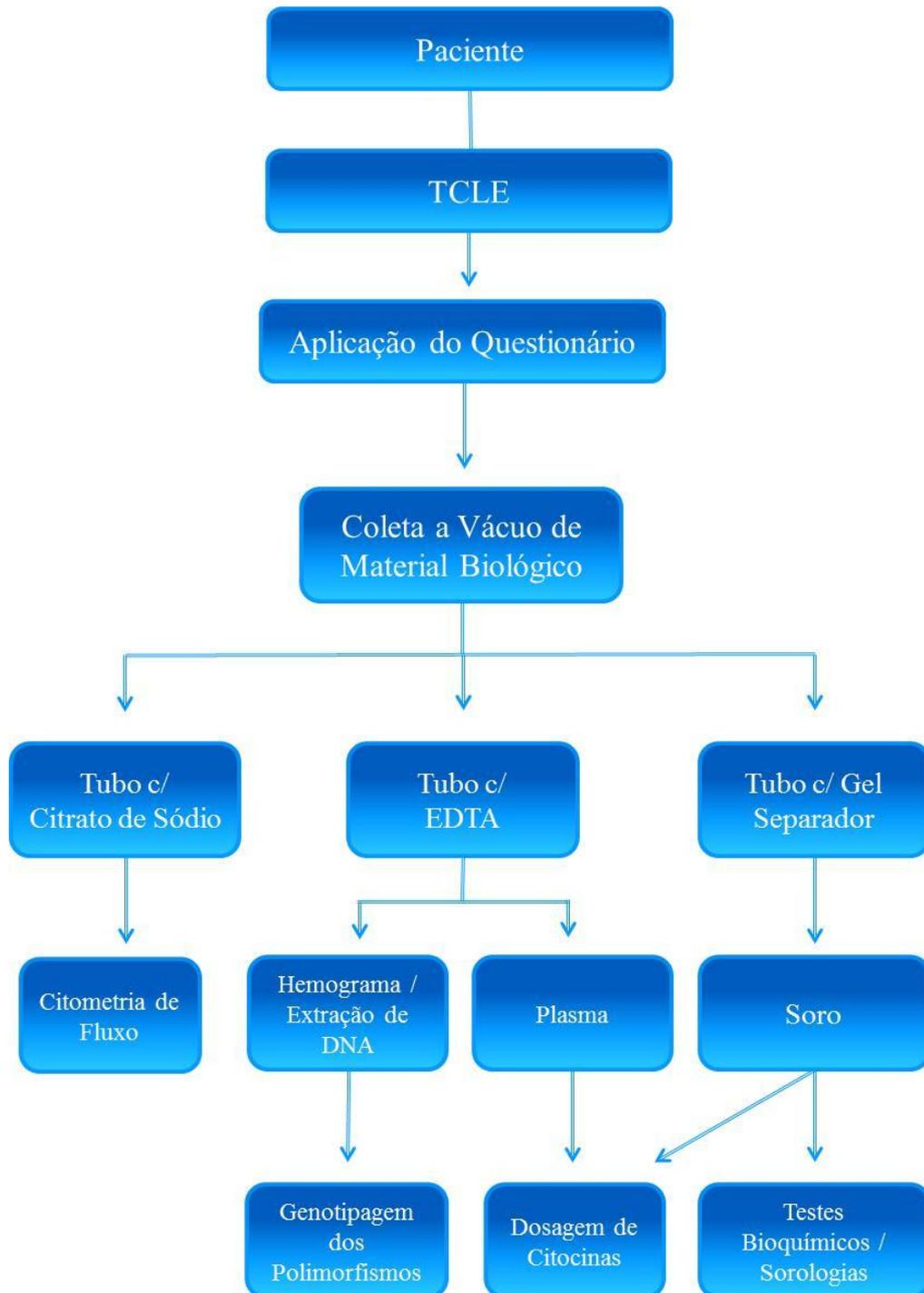
### **4.4. Critérios de Inclusão e Exclusão**

Os critérios de inclusão utilizados foram: Indivíduos de ambos os sexos, não aparentados, residentes na cidade de Coari, Estado do Amazonas, com idade entre 18 e 70 anos, que apresentaram sintomas característicos da doença e com o teste de Gota Espessa positivo para malária. Como critérios de exclusão foram utilizados os seguintes parâmetros: Mulheres grávidas e pacientes em tratamento para malária.

### **4.5. Aspectos Éticos**

O projeto de pesquisa intitulado “*Avaliação da Resposta Imune Celular e Frequência dos Polimorfismos do TLR-4 em Pacientes com Malária da cidade de Coari-AM*”, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM) sob o CAAE N° 0014.0.112.000-11 (**Anexo 01**).

#### 4.6. Fluxograma de Atividades



#### 4.7. Coleta de Dados e Material Biológico

A coleta de dados epidemiológicos e de material biológico foi realizada no período de Março a Julho de 2012 no Instituto de Medicina Tropical de Coari (IMTC), onde os indivíduos foram abordados e convidados a participar da pesquisa, assinando em seguida o

*Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo 02)*. Posteriormente foi aplicado um questionário estruturado (**Anexo 03**), com itens como: Número de identificação, nome do candidato amostrado, sexo, idade, local de nascimento e origem; Dados sobre a sintomatologia da doença, n° de infecções, diagnóstico e parasitemia, além das informações epidemiológicas referentes às doenças tropicais como malária, dengue, leishmaniose entre outros. Os dados obtidos nos questionários foram armazenados em planilha de dados tipo *Excel*, para realização das análises. Vale ressaltar que só foram coletadas amostras de indivíduos adultos e sem nenhuma incapacidade mental aparente de acordo com a resolução 196/96.

Foram coletados aproximadamente 12 mL de sangue periférico por punção venosa em tubos com sistema a vácuo, contendo EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2*), Citrato de Sódio (*BD Vacutainer® de Citrato de Sódio Tamponado*) e com Gel separador (*Gel BD SST® II Advance®*) para a realização do Hemograma e Genotipagem dos polimorfismos; Citometria de Fluxo; Dosagem de Citocinas, Testes Bioquímicos e Sorologias, respectivamente.

#### **4.8. Testes Hematológicos**

Para a avaliação hematológica, foram realizadas a contagem global dos leucócitos totais e diferencial, das células vermelhas (hemácias), das plaquetas, determinação do hematócrito, dosagem de hemoglobina e índices hematimétricos em contador hematológico *ABX MICROS 60 (HORIBA® Medical)* do Hospital Regional de Coari (HRC).

#### **4.9. Extração de DNA**

A extração de DNA genômico das amostras de sangue total foi realizada com o *Kit Comercial AccuPrep® Genomic DNA Extration (Bioneer, Cat. N° K3032, Lot.: 10071, Daejeon, KOR)* seguindo as orientações descritas no protocolo do fabricante. Após a extração as amostras foram congeladas a -20°C.

#### **4.10. Genotipagem dos Polimorfismos TLR-4 (*Asp299Gly* e *Thr399Ile*) pela Técnica de PCR-RFLP**

Os polimorfismos *Asp299Gly* e *Thr399Ile* do gene do TLR-4 foram genotipados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) associada à análise de polimorfismos por Fragmentos de Restrição (RFLP) no Laboratório de Micobacteriologia da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

#### 4.10.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a genotipagem dos polimorfismos, foi utilizado mix, com volume total de 25  $\mu\text{L}$ , contendo: 4,0  $\mu\text{L}$  (100 ng) de DNA genômico; 0,25  $\mu\text{L}$  (2,5 mMol/L) de cada primer (**Tabela 01**); 2,5  $\mu\text{L}$  (1,25 mM) de dNTPs (*CENT BIO*<sup>®</sup>); 0,75  $\mu\text{L}$  (50 mMol/L) de  $\text{MgCl}_2$ ; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X de PCR (500 mM KCl e 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 0,2  $\mu\text{L}$  (1U) de Taq DNA polimerase (*CENT BIO*<sup>®</sup>) e 14,55  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

A amplificação foi realizada em Termociclador da *Applied Biosystems (Veriti*<sup>®</sup> 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA) de acordo com programa descrito para cada marcador:

**Asp299Gly (TLR-4):** 1 ciclo inicial a 94°C por 5 min. (desnaturação inicial); 37 ciclos: 30 segundos (94°C - desnaturação), 30 segundos (50°C - anelamento) e 30 segundos (72°C - extensão); finalizando com extensão final por 5 min. a 72°C.

**Thr399Ile (TLR-4):** 1 ciclo inicial a 95°C por 5 min. (desnaturação inicial); 35 ciclos: 30 segundos (95°C - desnaturação), 30 segundos (60°C - anelamento) e 45 segundos (72°C - extensão); finalizando com extensão final por 5 min. a 72°C.

**Tabela 01:** Descrição dos *primers*, temperaturas de pareamento (Tp) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que foram obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

TLR-4 <sup>1</sup>	LSR <sup>2</sup> e ER <sup>3</sup>	Primers	Seqüências 5' → 3'	Tp <sup>4</sup> (°C)	PCR	RFLP	Ref. <sup>5</sup>
TLR-4	A 896 G <i>NcoI</i>	TLR4299F	ATACTTAGACTACTACCTCCATG	50°C	259pb	259pb	1, 2
		TLR4299R	AAACTCAAGGCTTGGTAGATC			20pb*	
TLR-4	C 1196 T <i>Hinf-I</i>	TLR4399F	GCTGTTTTCAAAGTGATTTTGGGAGAA	60°C	147pb	147pb	1, 2
		TLR4399R	CACTCATTGTTTCAAATTGGAATG			41pb*	

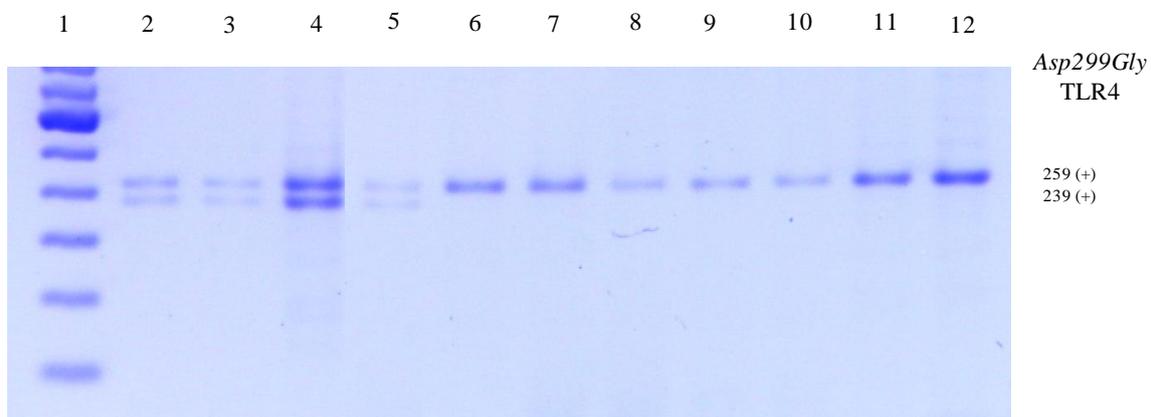
1. Marcador do *Receptor Toll-Like-4*; 2. Localização do Sítio de Restrição; 3. Enzima de Restrição; 4. Temperatura de Pareamento; \*Fragmento não visualizado. 5. Referências: 1- Lorenz *et al.*, 2001; 2- Van der Graaf *et al.*, 2006.

#### 4.10.2. Reação de Restrição (RFLP)

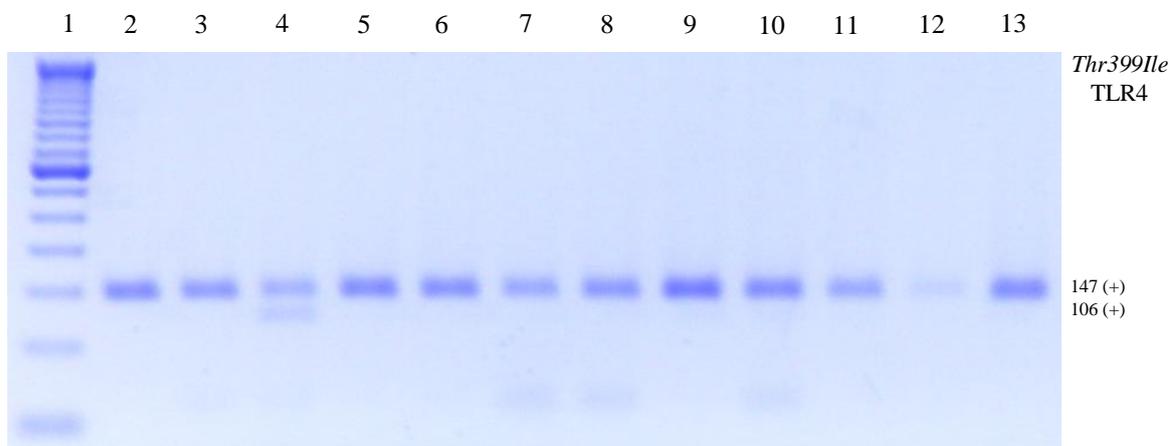
Após a amplificação do DNA, o produto da PCR foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* (*BioLabs*<sup>®</sup>, *New England, Ipswich, MA, USA*) e *Hinf-I* (*BioLabs*<sup>®</sup>, *New England, Ipswich, MA, USA*), de acordo com a seguinte mix de reação de clivagem: produto

da PCR (10,0  $\mu$ L); tampão de reação específico de cada enzima (2,0  $\mu$ L); H<sub>2</sub>O ultrapura (7,5  $\mu$ L) e enzima de restrição específica (5U - 10U/ $\mu$ L), totalizando volume final de 20  $\mu$ L. As amostras foram incubadas a 37 °C *overnight*.

Os produtos da PCR e reação de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em Tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA) e visualizados por fluorescência UV no Transluminador de luz azul da *Invitrogen Corporation (Safer Imager<sup>TM</sup> S37102, Carlsbad, CA, USA)* após coloração com *SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (Invitrogen<sup>TM</sup> Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)*. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 50 pb como referência para o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos e as imagens dos géis foram capturas com sistema de fotodocumentação (**Figuras 16 e 17**).



**Figura 16:** Análise do Polimorfismo *Asp299Gly* do TLR4 em Pacientes com malária atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Coari-AM por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR-RFLP). Eletroforese em Gel de Agarose a 2,5% corados com *SYBR Safe DNA gel stain*. Alelo selvagem do gene *Asp299Gly* do TLR4 (259pb), deleção de 20pb do alelo variante (239pb). Slots 1: Peso molecular de 50bp; Slots 2-5: Heterozigoto (A/G). Slots 6-12: Homozigoto selvagem (A/A).



**Figura 17:** Análise do Polimorfismo *Thr399Ile* do TLR4 em Pacientes com malária atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Coari-AM por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR-RFLP). Eletroforese em Gel de Agarose a 2,5% corados com *SYBR Safe DNA gel stain*. Alelo selvagem do gene *Thr399Ile* do TLR4 (147pb), deleção de 41pb do alelo variante (106pb). Slots 1: Peso molecular de 50bp; Slots 4: Heterozigoto (C/T). Slots 2, 3, 5-13: Homozigoto selvagem

#### 4.11. Imunofenotipagem Celular por Citometria de Fluxo

As células foram obtidas de sangue periférico coletado em tubo com anticoagulante Citrato de Sódio. Para a caracterização imunofenotípica, foi realizada a técnica de Citometria de Fluxo.

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (**Tabela 02**) que se ligam a epítomos específicos que são analisados pelo Citômetro de Fluxo para a caracterização das populações celulares. Neste estudo foi utilizado um painel de anticorpos monoclonais marcados, divididos em 16 tubos para a quantificação e caracterização das populações celulares como descrito abaixo:

**Tabela 02:** Descrição dos clones, lotes, número dos catálogos, fluorescências, marca e perfil celular dos anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.

Tubo	Anticorpo	Fluorescência	Clone	Lote	Cat. N°	Marca	Perfil Celular
01	-	-	-	-	-	-	CN
02	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	BD® Biosciences	Linf. T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> e Ativação Celular
	Human Anti-CD4	PE	RPA-T4	75982	555346	BD® Biosciences	
	Human Anti-CD8	FITC	HIT8a	15483	555634	BD® Biosciences	
	Human Anti-CD69	APC	FN50	68183	555533	BD® Biosciences	
03	Human Anti-CD5	FITC	UCHT2	63832	555352	BD® Biosciences	Linf. B e B1
	Human Anti-CD19	PE	HIB19	66211	555413	BD® Biosciences	
04	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	BD® Biosciences	Células NK e NKT
	Human Anti-CD16	FITC	3G8	74331	555406	BD® Biosciences	
	Human Anti-CD56	PE	B159	67211	555516	BD® Biosciences	
	Human Anti-CD69	APC	FN50	68183	555533	BD® Biosciences	
05	Human Anti-CD14	FITC	M5E2	60801	555397	BD® Biosciences	Monócitos e Células Ativadas
	Human Anti-CD80	PE	L307.4	57050	557227	BD® Biosciences	
06	Human Anti-CD14	FITC	M5E2	60801	555397	BD® Biosciences	Expressão de TLR4 CD36 em Monócitos
	Human Anti-CD36	APC	CD38- NL07	26894	550956	BD® Biosciences	
	Human Anti-CD284	PE	HTA125	B144261	312806	BioLegend®	
07	Human Anti-CD14	APC	M5M2	87809	555399	BD® Biosciences	Células Dendríticas
	Human Anti-CD11c	PE	3.9	B140910	301606	BioLegend®	
	Human Anti-CD123	FITC	6H6	B140008	306014	BioLegend®	

<b>08</b>	Human Anti-CD14	FITC	M5E2	60801	555397	<i>BD® Biosciences</i>	Agregados Celulares
	Human Anti-CD51/61	PE	23C6	25760	550037	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>09</b>	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Expressão da Mol. de Adesão LFA-1 nos Linf. T CD4 <sup>+</sup>
	Human Anti-CD4	FITC	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD11a	PE	HI111	B119504	301208	<i>BioLegend®</i>	
<b>10</b>	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Expressão da Mol. de Adesão MAC-1 nos Linf. T CD4 <sup>+</sup>
	Human Anti-CD4	FITC	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD11b	PE	ICRF44	12263	555388	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>11</b>	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Expressão da Mol. de Adesão VLA-4 nos Linf. T CD4 <sup>+</sup>
	Human Anti-CD4	FITC	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD49d	PE	9F10	20137	555503	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>12</b>	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Expressão da Mol. de Adesão LFA-1 nos Linf. T CD8 <sup>+</sup>
	Human Anti-CD8	FITC	HIT8a	15483	555634	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD11a	PE	HI111	B119504	301208	<i>BioLegend®</i>	
<b>13</b>	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Expressão da Mol. de Adesão MAC-1 nos Linf. T CD8 <sup>+</sup>
	Human Anti-CD8	FITC	HIT8a	15483	555634	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD11b	PE	ICRF44	12263	555388	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>14</b>	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Expressão da Mol. de Adesão VLA-4 nos Linf. T CD8 <sup>+</sup>
	Human Anti-CD8	FITC	HIT8a	15483	555634	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD49d	PE	9F10	20137	555503	<i>BD® Biosciences</i>	
<b>15</b>	-	-	-	-	-	-	CN Intracelular
<b>16</b>	Human Anti-CD4	PE	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. Treg
	Human Anti-CD25	FITC	M-A251	66993	555431	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-FoxP3	AF647	259D/C7	68982	560015	<i>BD® Biosciences</i>	

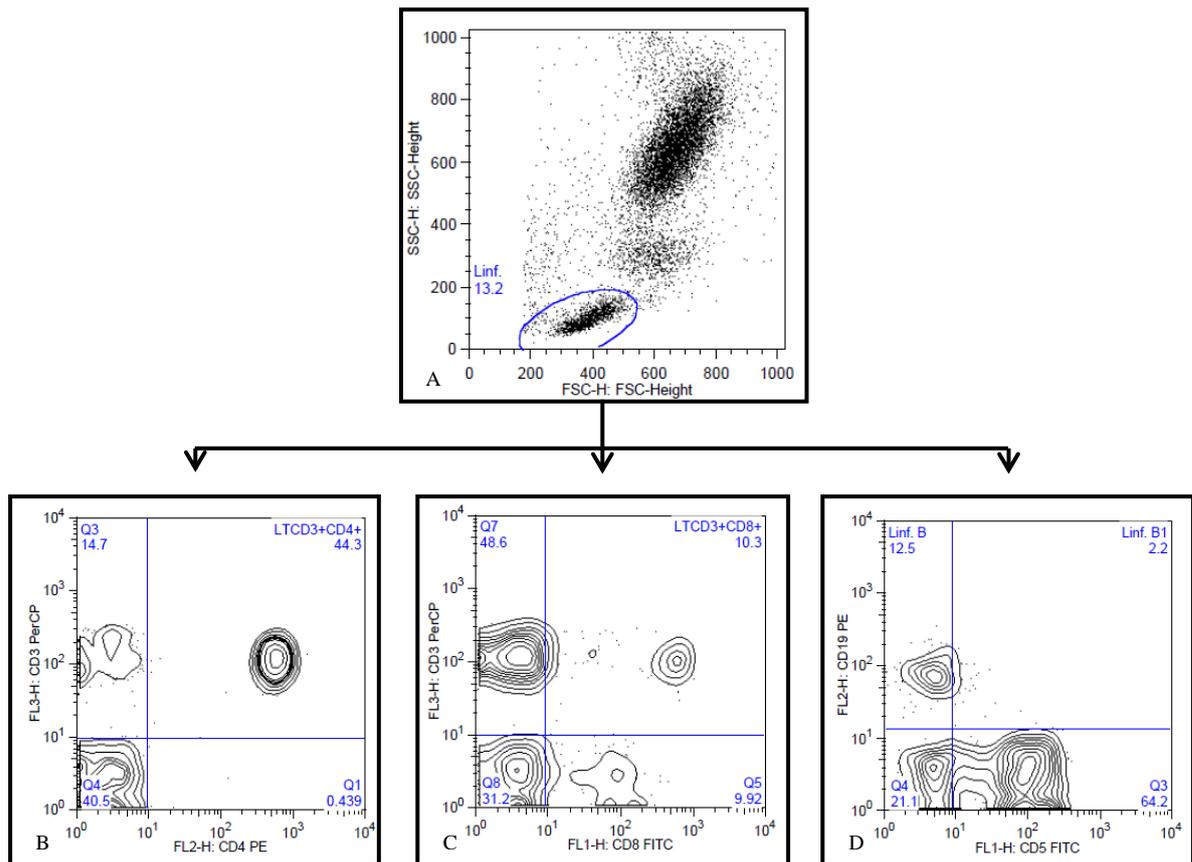
Inicialmente foi incubado 50µL de sangue total nos tubos 1-14 e 200µL nos tubos 15 e 16 com 2 µL de cada anticorpo nos seus respectivos tubos. Estes foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a marcação, foi feito a lise das hemácias com o uso da solução de lise (*BD FACS™ Lysing Solution, Cat. N° 349202, Lot.: 24299, BD® Biosciences San Jose, CA, USA*), diluída 10 vezes em água destilada. Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Passado a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 7 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 2 mL de PBS-W (8,0g de NaCl, 1,16g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g de KCl e 5,0g de BSA, qsp 1L H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,2) para lavagem do pellet formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 300µL de Solução Fixadora (40,0g de HO(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>OHNaCl, 0,106g de NaOH, 40,04g de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsOONa e 26,6g de NaCl, qsp 200mL de H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,2) nos tubos 1-14, sendo armazenados em geladeira até o momento da leitura.

Aos tubos 15 e 16, foi adicionado 2 mL de PBS-P (8,0g de NaCl, 1,16g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g de KCl, 5,0g de BSA e 5,0g de Saponina, qsp 1L H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,2) para permeabilização celular. Os tubos foram homogeneizados novamente e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida os tubos foram centrifugados a 1.300 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 2 mL de PBS-W para lavagem do pellet formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente. Ao término da centrifugação, os tubos foram incubados por mais 30 minutos com PBS-P (tubo 15) e 100 µL de anticorpo anti-FoxP3 AF647, diluído (1:10) em PBS-P (tubo 16), complementando o protocolo. Após a incubação as células foram lavadas com 2 mL PBS-W e centrifugadas. Ao final o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300µL de Solução fixadora e armazenadas até o momento da leitura.

A aquisição das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo *FACSCalibur®* (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) da Fundação HEMOAM. Para a identificação morfológica e imunofenotípica das células foi utilizado o programa *FlowJo (v9.4)*, com o auxílio de “*gates*” para a seleção das populações de interesse em gráficos que combinaram características morfológicas (tamanho e granulosidade) com características imunofenotípicas através das fluorescências dos anticorpos monoclonais utilizados para identificar as células alvos. Os gráficos utilizados foram do tipo “*dot plot*”, “*contour plot*” e histograma, pois apresentaram uma melhor visualização das estratégias de análise.

#### 4.11.1. Identificação da População de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Linfócito B (CD19<sup>+</sup>) e B1 (CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>).

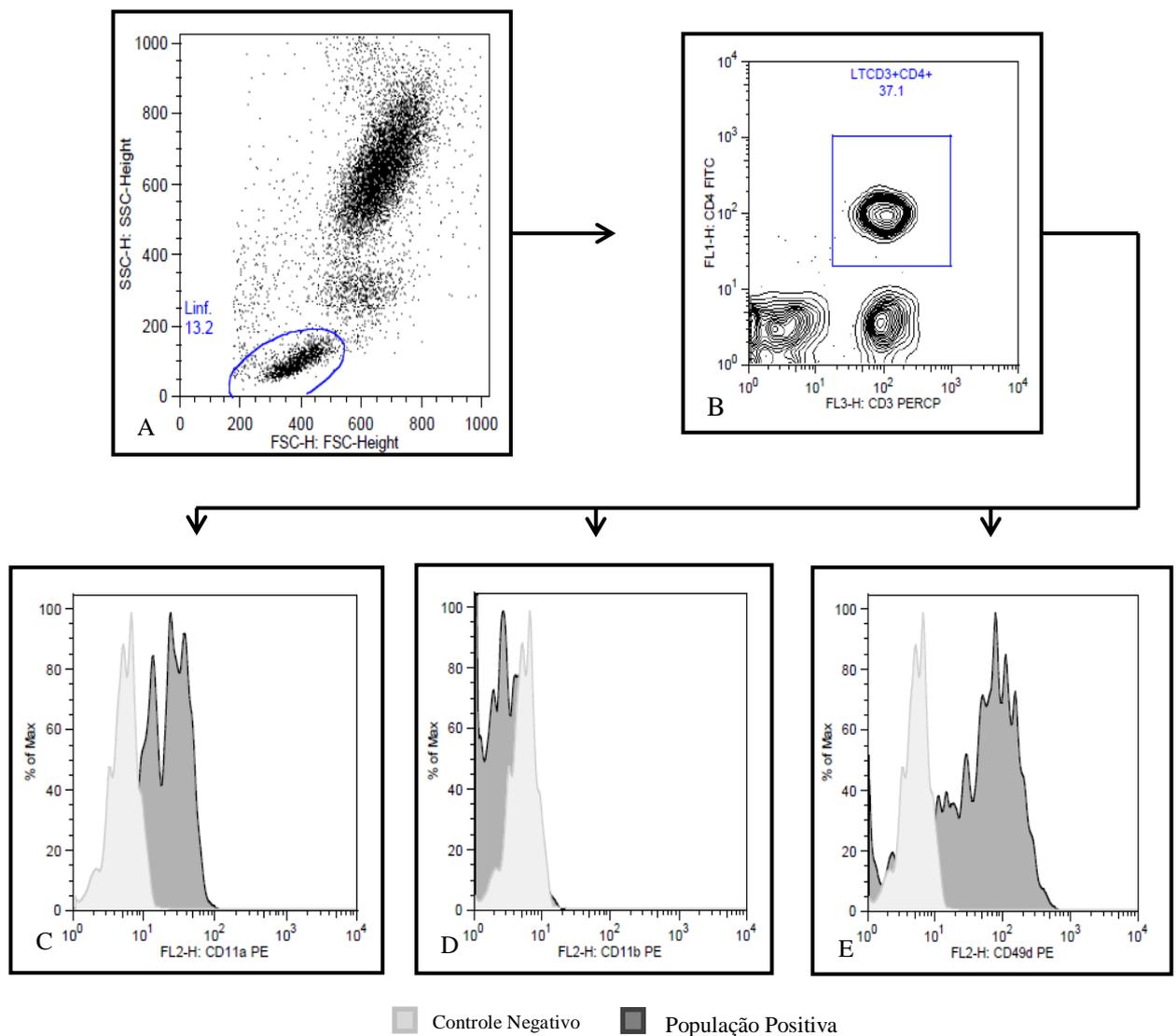
A identificação das populações de Linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), Linfócitos B e B1 foram realizadas primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 18A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Em seguida foram elaborados três gráficos: 1) CD3 PercP x CD4 PE (**Figura 18B**); 2) CD3 PercP x CD8 FITC (**Figura 18C**); 3) CD19 PE x CD5 FITC (**Figura 18D**). Em seguida foi selecionado as populações positivas para CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Linfócitos T CD4<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Linfócitos T CD8<sup>+</sup>), CD19<sup>+</sup> (Linfócitos B), CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (Linfócitos B1).



**Figura 18:** Identificação dos Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Linfócito B (CD19<sup>+</sup>) e B1 (CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) no programa *FlowJo* (v9.4).

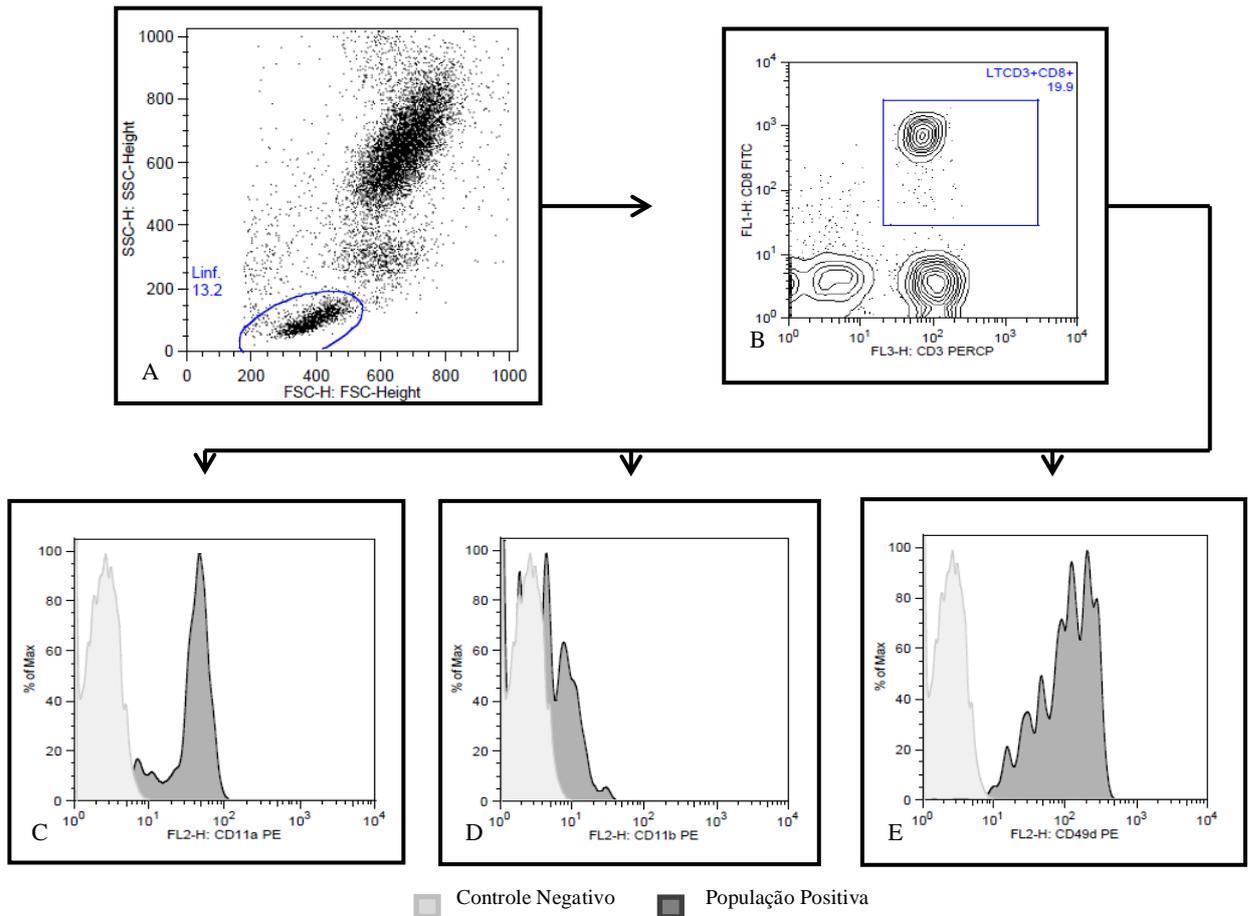
#### 4.11.2. Análise da Expressão das Moléculas de Adesão LFA-1 (CD11a<sup>+</sup>), MAC-1 (CD11b<sup>+</sup>) e VLA-4 (CD49d<sup>+</sup>) em Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

Para a análise da expressão das moléculas de adesão LFA-1, MAC-1 e VLA-4 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi feito com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 19A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Em seguida foi selecionado a população duplo positiva para CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (**Figura 19B**) e posteriormente foi analisado a expressão por Intensidade Média de Fluorescência (MFI) das moléculas LFA-1 (CD4<sup>+</sup>CD11a<sup>+</sup>), MAC-1 (CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e VLA-4 (CD4<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>) nos LTCD4<sup>+</sup>. Vale ressaltar que esta análise foi elaborada em três gráficos distintos e estão representadas em histograma (**Figura 19C, 19D e 19E**).



**Figura 19:** Análise da Expressão das Moléculas de Adesão LFA-1 (CD11a<sup>+</sup>), MAC-1 (CD11b<sup>+</sup>) e VLA-4 (CD49d<sup>+</sup>) em Linfócitos T CD4<sup>+</sup> no programa *FlowJo* (v9.4)

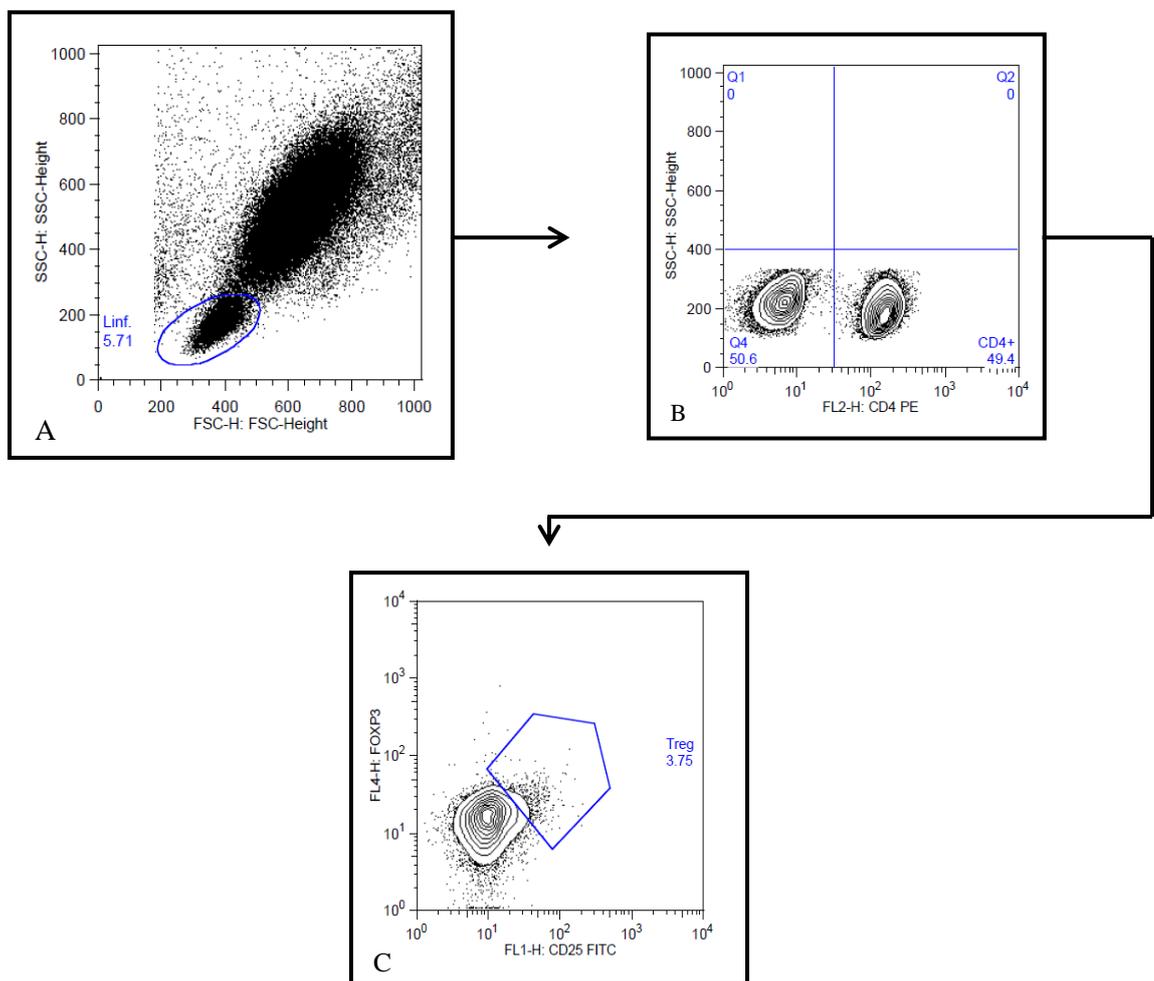
Da mesma forma, foi realizado a análise da expressão das moléculas de adesão LFA-1, MAC-1 e VLA-4 nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Os gráficos estão demonstrados abaixo (**Figura 20A, 20B, 20C, 20D e 20E**).



**Figura 20:** Análise da Expressão das Moléculas de Adesão LFA-1 (CD11a<sup>+</sup>), MAC-1 (CD11b<sup>+</sup>) e VLA-4 (CD49d<sup>+</sup>) em Linfócitos T CD8<sup>+</sup> no programa *FlowJo* (v9.4)

#### 4.11.3. Identificação dos Linfócitos T regulatórios ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ )

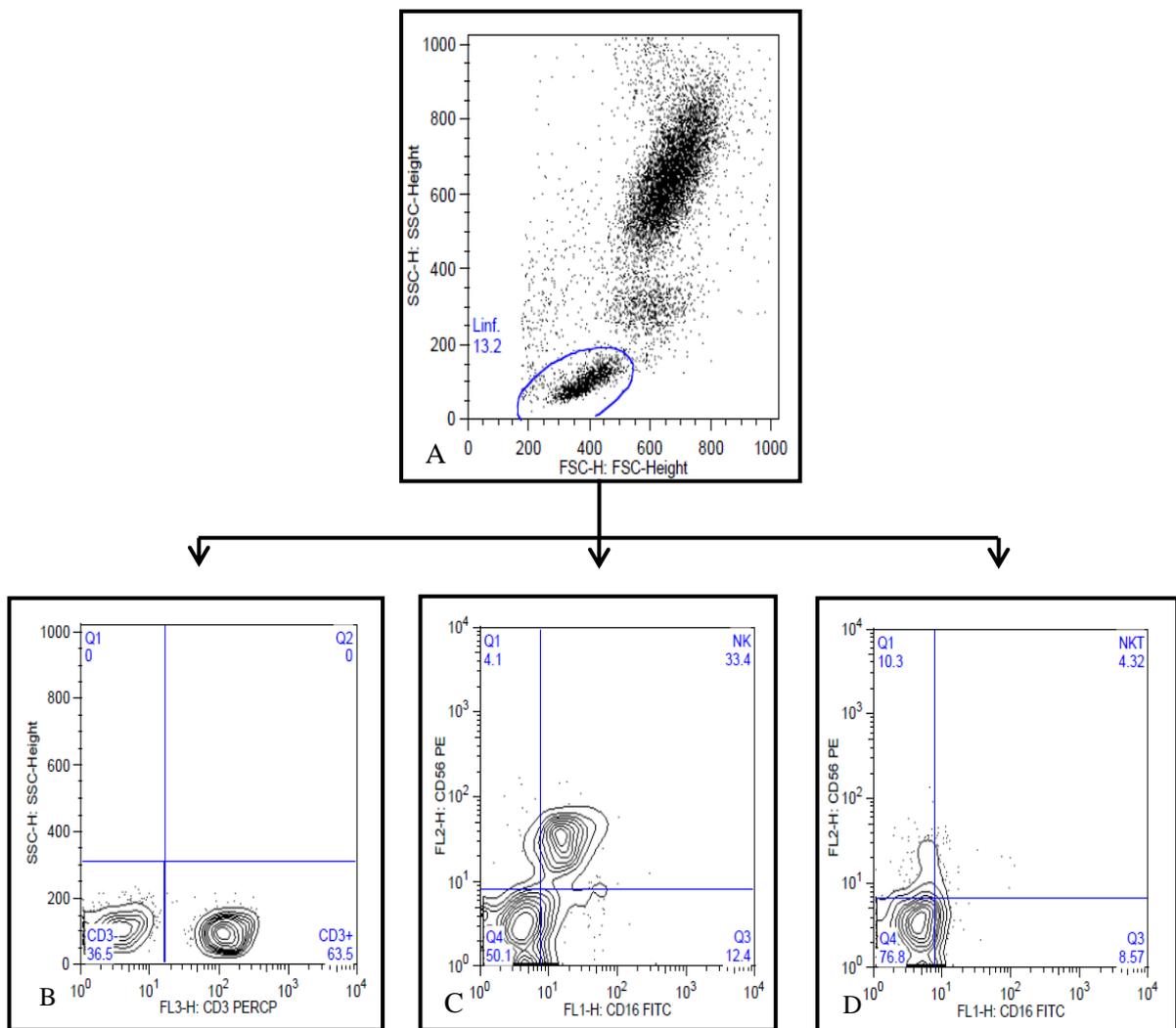
A identificação dos linfócitos T regulatórios (Treg) foi feito com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 21A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado gráfico de SSC x CD4 PE (**Figura 21B**) e em seguida foi criado um gráfico CD25 FITC x FoxP3 AF647 (**Figura 21C**) com a população de LTCD4<sup>+</sup>. A população positiva para  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  foi selecionada, caracterizando os linfócitos Treg.



**Figura 21:** Identificação dos Linfócitos Treg ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ) no programa *FlowJo* (v9.4)

#### 4.11.4. Identificação das Populações de Células NK ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ).

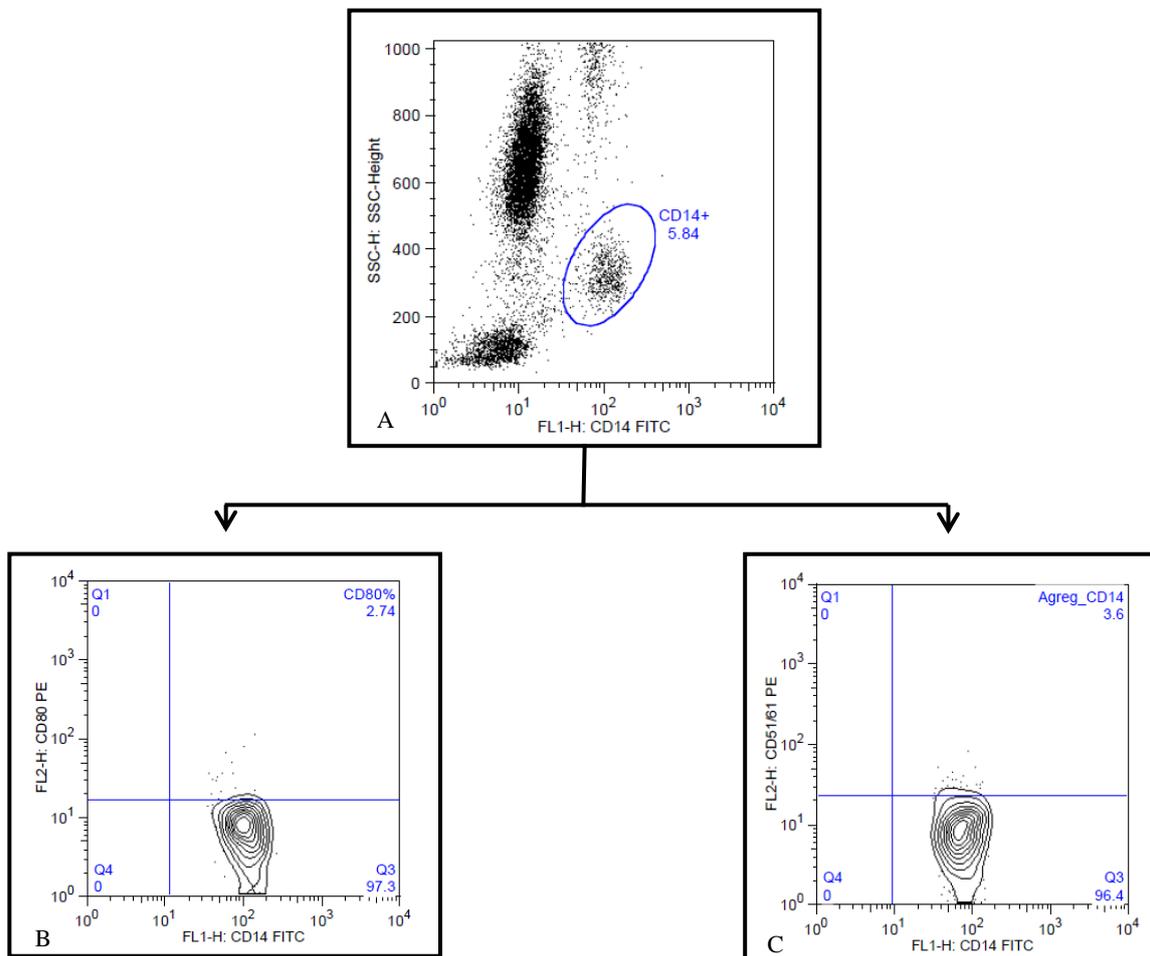
A identificação das populações de Células NK ( $CD3^-/CD16^+/CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ) foram realizadas primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 22A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado gráfico de SSC x CD3 PercP (**Figura 22B**). Em seguida foram elaborados dois gráficos: 1)  $CD3^-$  e  $CD56$  PE x  $CD16$  FITC (**Figura 22C**); 2)  $CD3^+$  e  $CD56$  PE x  $CD16$  FITC (**Figura 22D**). Ao final foram selecionados as populações  $CD3^-CD16^+CD56^+$  (Células NK) e  $CD3^+CD16^+CD56^+$  (Células NKT).



**Figura 22:** Identificação das Células NK ( $CD3^-CD16^+CD56^+$ ) e NKT ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ) no programa FlowJo (v9.4).

#### 4.11.5. Identificação dos Monócitos ( $CD14^+$ ), Monócitos Ativados ( $CD14^+CD80^+$ ) e Agregados Celulares ( $CD14^+CD51/61^+$ )

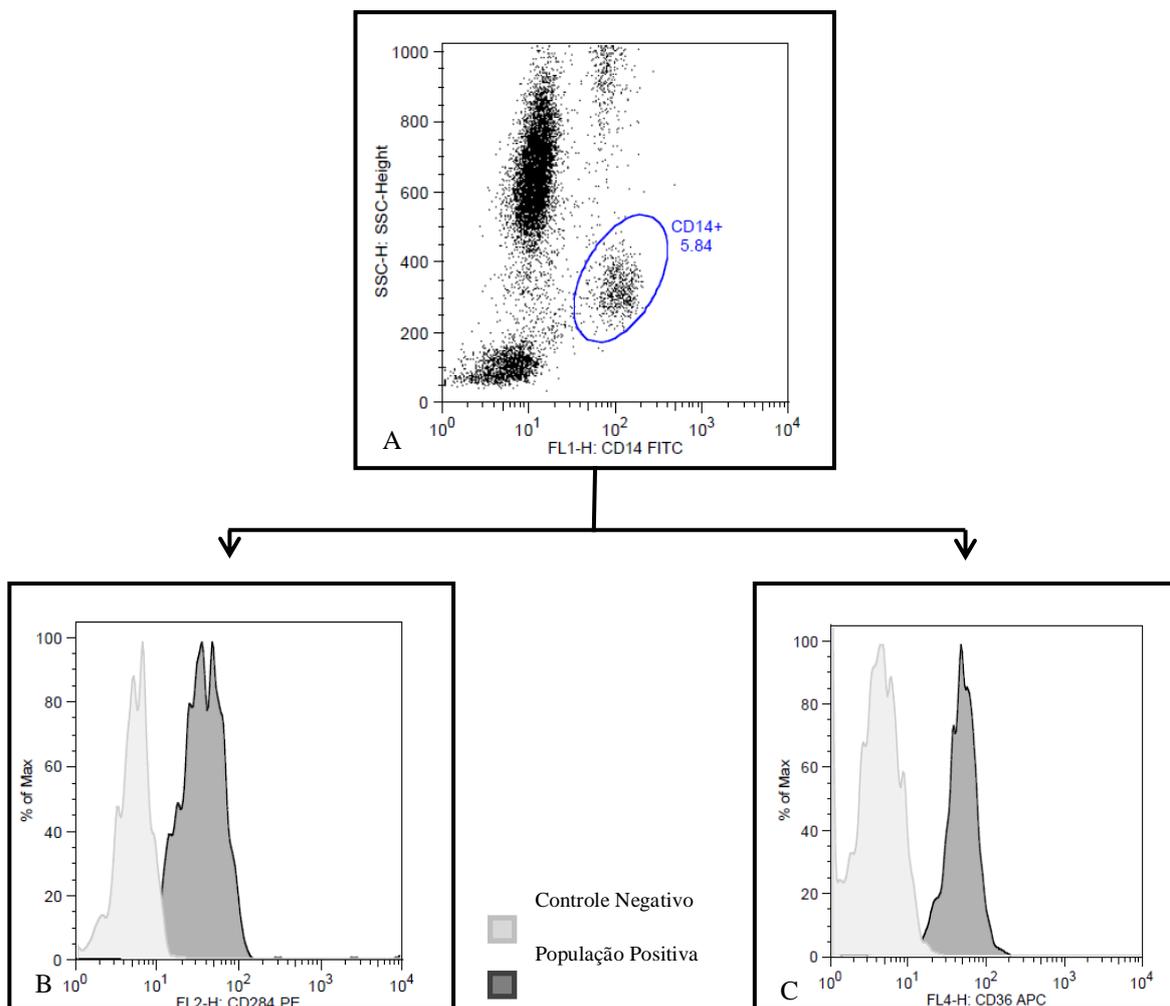
Para a identificação dos Monócitos, Monócitos Ativados e Agregados Celulares foi realizada com um gráfico de SSC x CD14 FITC (**Figura 23A**) e uma “gate” foi feita na região positiva para monócitos ( $CD14^+$ ). Em seguida foi feito duas análises distintas: A primeira com um gráfico de CD14 FITC x CD80 PE (**Figura 23B**), selecionando a população duplo positiva ( $CD14^+CD80^+$ ), que são conhecidas como monócitos ativados; A segunda análise foi elaborada selecionando a população duplo positiva ( $CD14^+CD51/61^+$ ), que são conhecidas como agregados celulares, utilizando um gráfico de CD14 FITC x CD51/61 PE (**Figura 23C**).



**Figura 23:** Identificação dos Monócitos ( $CD14^+$ ), Monócitos Ativados ( $CD14^+CD80^+$ ) e Agregados Celulares ( $CD14^+CD51/61^+$ ) no programa *FlowJo* (v9.4)

#### 4.1.1.6. Análise da Expressão do Receptor do tipo Toll 4 (CD284<sup>+</sup>) e Fagocitose (CD36<sup>+</sup>) em Monócitos (CD14<sup>+</sup>)

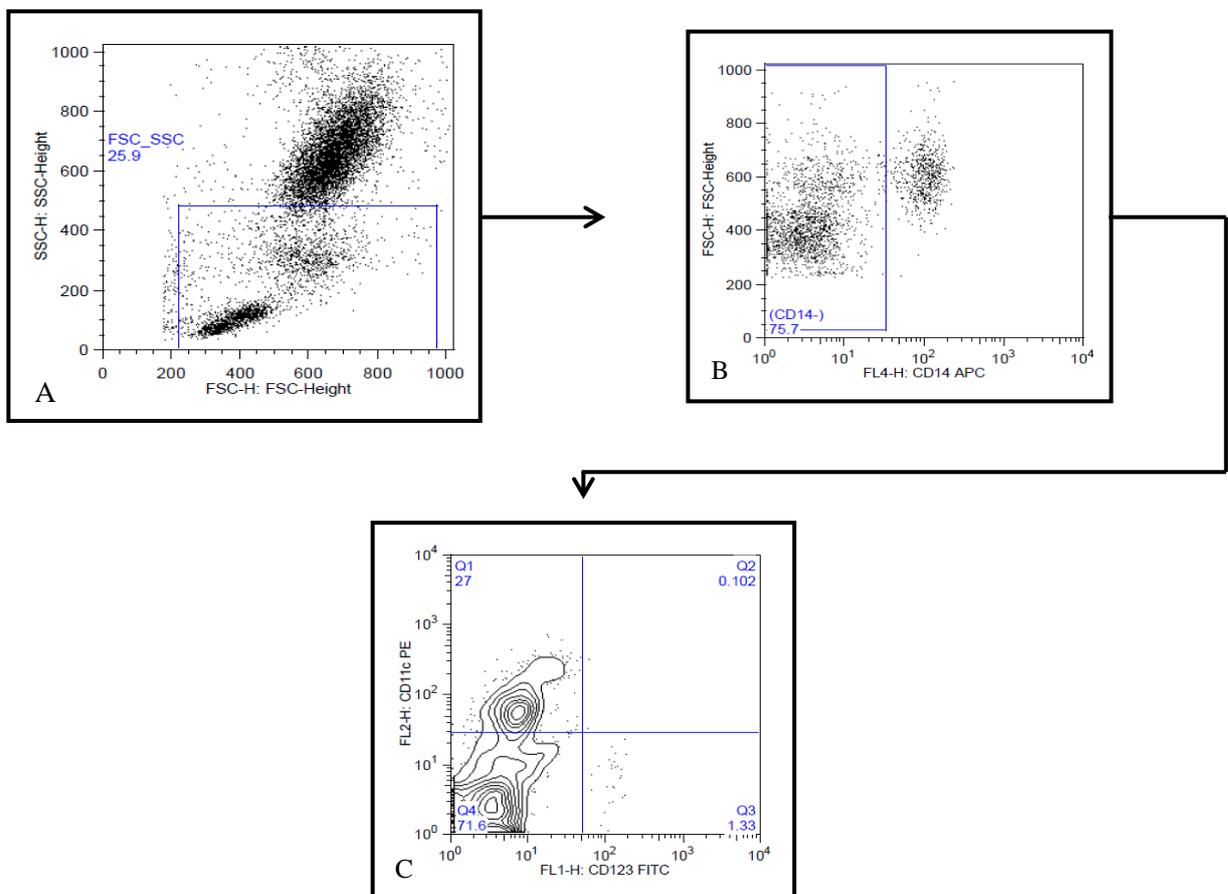
Para a análise da expressão do Receptor do tipo Toll 4 (TLR4) e Fagocitose em monócitos foi feito um gráfico de SSC x CD14 FITC (**Figura 24A**) e uma “gate” foi feita na região positiva para monócitos (CD14<sup>+</sup>). Em seguida foi analisado a expressão por Intensidade Média de Fluorescência (MFI) do TLR4 (CD14<sup>+</sup>CD284<sup>+</sup>) e fagocitose (CD14<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup>) nessas células, com dois gráficos distintos (**Figura 24B e 24C**).



**Figura 24:** Análise da Expressão do Receptor do tipo *Toll* 4 (CD284<sup>+</sup>) e Fagocitose (CD36<sup>+</sup>) em Monócitos (CD14<sup>+</sup>) no programa *FlowJo* (v9.4)

#### 4.11.7. Identificação das Células Dendríticas Mielóides ( $CD14^-CD11c^+CD123^-$ ) e Plasmocitóides ( $CD14^-CD11c^-CD123^+$ )

A identificação das Células Dendríticas Mielóides (mDCs) e Plasmocitóides (pDCs) foram realizadas primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 25A**) e uma “gate” foi criada na região das células mononucleares. Após, foi elaborado gráfico de SSC x CD14 APC (**Figura 25B**) e selecionado a população  $CD14^-$ . Em seguida foi elaborado gráfico  $CD11c$  PE x  $CD123$  FITC (**Figura 25C**). Ao final foram selecionadas as populações  $CD14^-CD11c^+CD123^-$  (mDCs) e  $CD14^-CD11c^-CD123^+$  (pDCs).



**Figura 25:** Identificação das Células Dendríticas Mielóides ( $CD14^-CD11c^+CD123^-$ ) e Plasmocitóides ( $CD14^-CD11c^-CD123^+$ ) no programa *FlowJo* (v9.4)

#### 4.12. Dosagem de Citocinas Plasmáticas por CBA (*Cytometric Bead Array*)

A dosagem de citocinas das amostras de plasma dos pacientes e controles foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (*Cytometric Bead Array*) com o Kit *BD<sup>TM</sup> Human T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>17 Cytokine* (Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca *BD<sup>®</sup> Biosciences, San Diego, CA, USA*), seguindo as orientações descritas pelo fabricante. As citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL17.

O Kit *BD<sup>TM</sup> CBA* utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads*) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada *bead* de captura esta conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção são quantificados através da Citometria de Fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo *FACSCanto II* (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia.

Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina foi utilizado o software *FCAP-Array<sup>TM</sup>* (v3.0.1).

#### 4.13. Dosagem de Citocinas Plasmáticas por ELISA

O teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8, IL-12, IL-23 e TGF- $\beta$  em plasma de pacientes com malária e do grupo controle. Foi utilizado o Kit *Human BD<sup>TM</sup> OptEIA<sup>®</sup> Set II* para as citocinas IL-1 $\beta$  (Cat. N° 557953, Lot.: 89123, marca *BD<sup>®</sup> Biosciences, San Jose, CA, USA*), IL-5 (Cat. N° 555202, Lot.: 79299, marca *BD<sup>®</sup> Biosciences, San Jose, CA, USA*), IL-8 (Cat. N° 555244, Lot.: 37391, marca *BD<sup>®</sup> Biosciences, San Jose, CA, USA*) e IL-12p70 (Cat. N° 555183, Lot.: 23572, marca *BD<sup>®</sup> Biosciences, San Jose, CA, USA*). Foram seguidas todas as recomendações técnicas descritas pelos fabricantes.

As etapas realizadas foram: Impregnação do Anticorpo de Captura em placa de 96 poços *overnight* a 4°C; incubação: por 1 hora a temperatura ambiente com o Diluente de Ensaio, para a reação de bloqueio de ligação inespecífica; 2 horas com a curva padrão e as amostras; 1 hora com o Anticorpo de Detecção (*Biotinilado*) + Enzima *SAv-HRP*; 30 minutos

com o Substrato *BD Pharmingen™ TMB Set* (Cat. N° 555214, Lot.: 2104750, San Jose, CA, USA); ao final foi adicionado solução de parada (*Stopping*) e efetuado a leitura.

As etapas de lavagem entre as incubações foram realizadas com a Lavadora Automática de Microplacas *Atlantis Microplate Washer* (Asys HITECH, Eugendorf, Salzburg, AU). A leitura foi realizada em Leitora Automatizada *Expert Plus Microplate Reader* (Asys HITECH, Eugendorf, Salzburg, AU), com medição da absorvância de luz a 450nm, para geração das análises e gráficos de correlação logarítmica entre a absorvância e a concentração sérica de cada citocina.

#### **4.14. Testes Bioquímicos – Transaminases (AST e ALT)**

As dosagens das concentrações das Transaminases (AST e ALT) foram realizadas com método automatizado utilizando equipamento *ARCHITECT® C8000 System Clinical Biochemistry Analyzed* (ABBOTT® Diagnostics, Illinois, USA) do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

#### **4.15. Análises Estatísticas**

As análises estatísticas dos dados da imunofenotipagem dos leucócitos e os níveis séricos das citocinas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram considerados como apresentando uma distribuição não paramétrica, e, portanto, as análises comparativas entre os grupos foram realizadas por meio da análise de variância ANOVA seguido pelo teste de *Kruskal-Wallis*. A significância estatística foi definida em ambos os casos em  $p < 0,05$ . Os testes *Exato de Fisher* e *Qui-Quadrado* ( $\chi^2$ ) foram utilizados para determinar a frequência alélica dos polimorfismos do TLR-4 e o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Análise do qui-quadrado foi utilizada ainda para comparar a assinatura de produtores de citocinas elevadas entre os grupos. Para montar as curvas da assinatura de citocinas de cada grupo clínico, o valor da mediana global de cada citocina sérica foi calculada usando a população total do estudo, sendo utilizados como valor de corte para definir cada indivíduo como baixo ou alto produtor de citocinas. O perfil das citocinas ascendente do grupo não infectado foi montado e considerado como a curva de assinatura de referência para a análise comparativa entre o grupo de paciente com malária e os subgrupos. Diferenças significativas foram observadas quando a frequência de produção das citocinas foi elevada no grupo e subgrupo de pacientes deslocando percentil distinto (intervalos de 50%) quando comparado com a curva de referência.

---

*Resultados*

## 5. RESULTADOS

Foram coletadas 77 amostras de pacientes infectados com *Plasmodium vivax* atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Coari. Além das amostras dos pacientes, foram coletadas 58 amostras de indivíduos não infectados enquadrados como grupo controle.

### 5.1. Dados Demográficos e Características Clínico-Epidemiológicas

Na **Tabela 02** estão descritos os dados demográficos e as características clínico-epidemiológicas dos pacientes e indivíduos não infectados, obtidas a partir dos questionários aplicados, resultados dos exames e testes hematológicos e bioquímicos realizados.

A faixa etária no grupo de pacientes foi maior que no grupo controle. Em relação ao gênero, observamos um predomínio de pacientes com malária do sexo masculino (69%), sendo observado o inverso no grupo controle, com porcentagem maior de indivíduos do sexo feminino (67%). Quanto ao número de infecções, nota-se que a maioria dos indivíduos possui entre duas e cinco reinfecções (51%).

A parasitemia de ++ e +/2 foi observada na maioria dos pacientes (74%), com sintomatologia básica da malária relatada/observada nos participantes da pesquisa. Mialgia foi à queixa mais frequente entre os pacientes (92%), seguido de fraqueza (97%), cefaleia (84%), calafrios (75%) e febre no momento da coleta (69%).

Em relação às características hematológicas, observou-se diminuição significativa do número de leucócitos (WBC), concentração de hemoglobina globular média (MCHC), volume globular médio (MCV) e plaquetas, além do aumento significativo do volume plaquetário médio (MPV) e variação no tamanho das plaquetas (PDW) nos pacientes. A análise dos resultados bioquímicos demonstrou aumento significativo da transaminase AST, sendo maior significativamente no grupo de pacientes com malária quando comparado ao controle.

**Tabela 02:** Dados demográficos e características clínico-epidemiológicas dos pacientes com malária e grupo controle

Características	Controle (n=58)	Pacientes (n=77)	<i>p value</i>
<b>Demográficas e Epidemiológicas</b>			
Masculino/Feminino	19/39	53/24	-
Idade (média ±DP)	29,41 ±8,45	37,06 ±14,32	-
Nº episódios de malária	-	5,57 ±6,77 (1-40)	-
	<b>Primo-Infetado</b>	15 (19%)	-
Número de Infecções	<5 Infecções	39 (51%)	-
	>5 Infecções	23 (30%)	-
<b>Parasitológicos (Parasitas / mm<sup>3</sup>)</b>			
Parasitemia	200-300 (+/2)	20 (26%)	-
	301-500 (+)	18 (23%)	-
	501-10.000 (++)	37 (48%)	-
	10.000-100.000 (+++)	2 (3%)	-
<b>Hematológicos e Bioquímicos (Média ±DP)</b>			
Hematocrito (%)	38,81 ±4,93	38,43 ±5,54	0,8224*
Níveis de Hemoglobina g/dL	13,13 ±1,66	13,11 ±1,87	0,9982
WBC (unid. x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	5,971 ±1,66	4,54 ±1,47	<0,0001
RBC (unid. x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,12 ±0,64	4,15 ±0,60	0,5754
MCV (fL)	94,47 ±7,16	89,09 ±19,24	<b>0,0272</b>
MCH (pg)	31,96 ±2,76	31,78 ±2,96	0,3571
MCHC (g/dL)	33,73 ±1,13	34,19 ±1,16	<b>0,0373</b>
RDW (%)	13,99 ±1,92	13,66 ±2,40	0,9886
Plaquetas (unid. x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	237,3 ±84,04	118,3 ±58,71	<0,0001
MPV (fL)	7,37 ±2,24	8,44 ±2,42	<b>0,0007</b>
PDW (%)	14,30 ±2,31	13,41 ±2,32	<b>0,0266</b>
AST (U/L)	20,78 ±10,01	55,27 ±252,4	<b>0,0154</b>
ALT (U/L)	20,66 ±15,18	42,87 ±167,5	0,4493
<b>Parâmetros Clínicos</b>			
Febre durante a Coleta Sanguínea, n (%)	-	52 (69%)	-
Mialgia nos últimos 3 dias, n (%)	-	71 (92%)	-
Cefaleia nos últimos 3 dias, n (%)	-	64 (84%)	-
Calafrios nos últimos 3 dias, n (%)	-	58 (75%)	-
Fraqueza nos últimos 3 dias, n (%)	-	67 (87%)	-

\*Teste não paramétrico *Mann-Whitney*

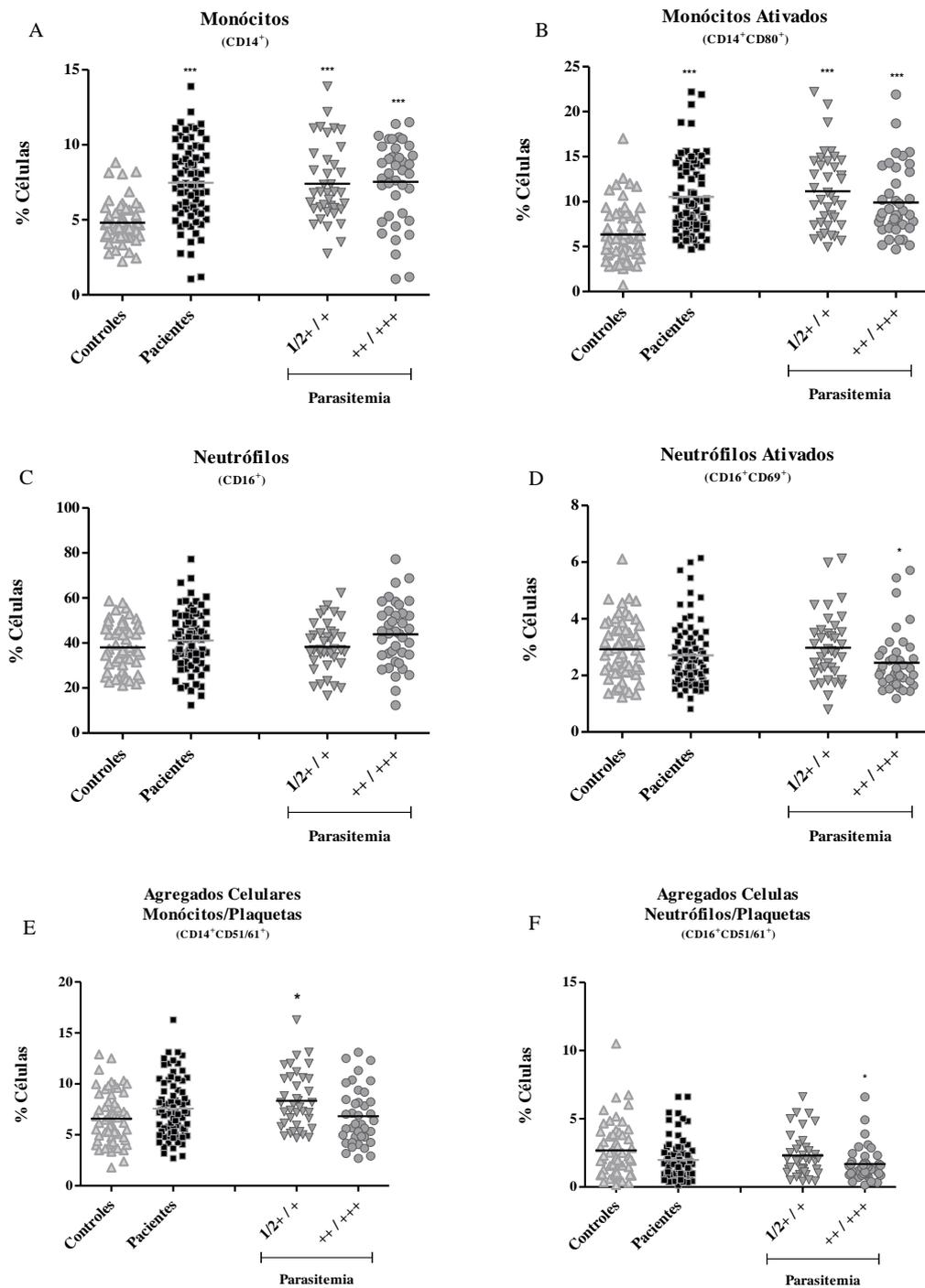
## 5.2. Perfil de Resposta Celular nos pacientes com Malária

A resposta imune celular foi analisada na população de pacientes com malária e no grupo controle. Foi avaliado o perfil celular de monócitos, neutrófilos, agregados celulares/plaquetas, células dendríticas, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, Treg, B, B1 e células NK e NKT. Além dessas células, foram analisados marcadores de ativação celular e a expressão de moléculas de adesão.

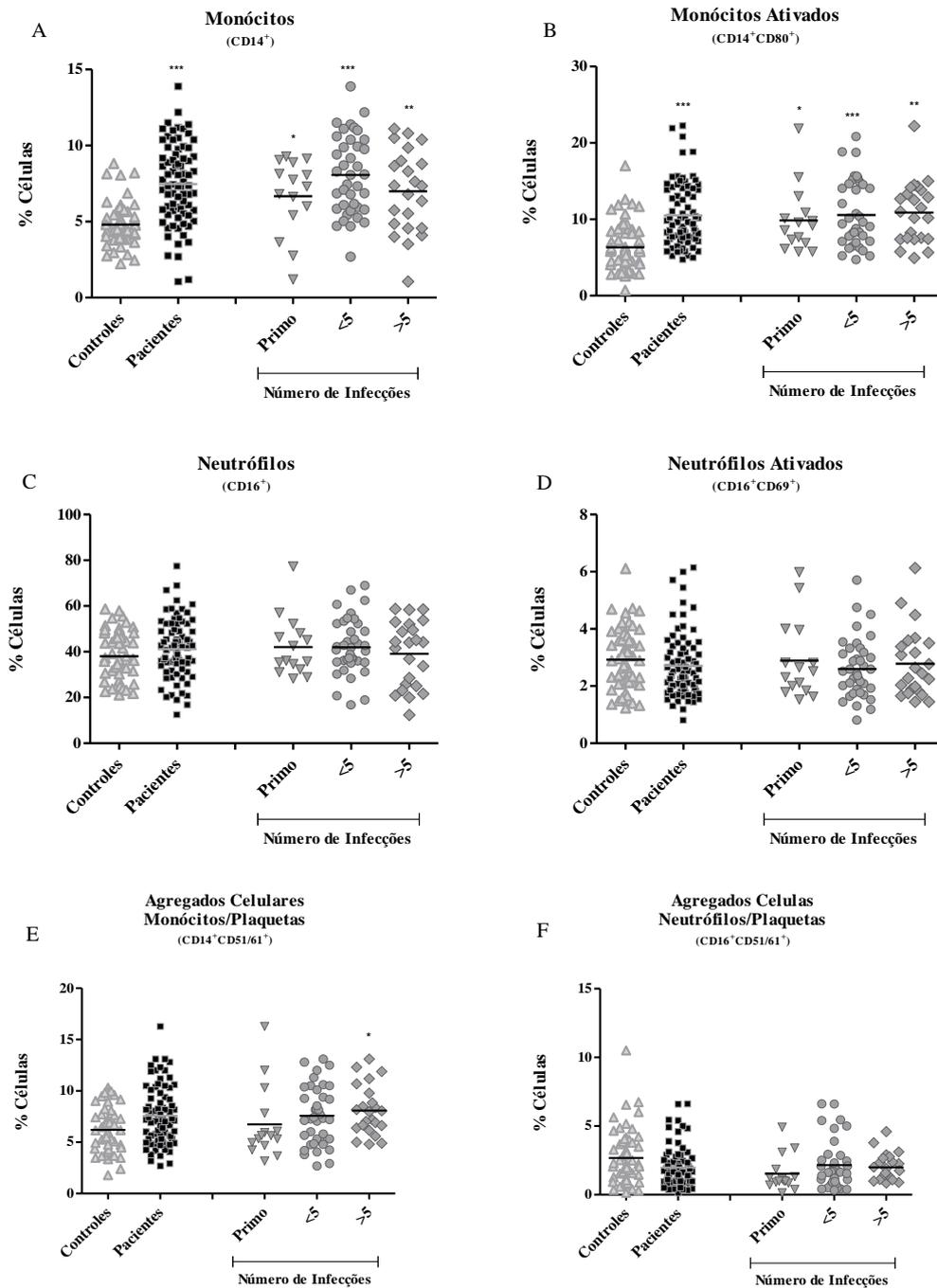
Inicialmente foi analisada a porcentagem de monócitos e monócitos ativados (macrófagos circulantes), sendo observado aumento significativo no número de células dos pacientes quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , **Figura 26A, 26B, 27A e 27B**). Na análise dos subgrupos segregados de pacientes em parasitemia (+/2 e + / ++ e +++) e número de infecções (primoinfectado / <5 infecções / >5 infecções), notou-se aumento significativo entre os subgrupos quando comparados com os indivíduos não infectados.

Quanto aos neutrófilos, foram observadas diferenças significativas apenas quando analisadas as variáveis do grupo controle comparado ao subgrupo ++/+++, com diminuição na porcentagem de células ativadas ( $p < 0,301$ , **Figura 27D**). Os demais resultados estão descritos nas **Figuras 26C, 26D e 27C**.

A análise dos agregados celulares de monócitos/plaquetas mostraram aumento significativo apenas nos subgrupos +/2/+ e >5 infecções quando comparado com o controle ( $p < 0,0143$  e  $p < 0,0126$ , **Figura 26E e 27E**). Em relação aos agregados celulares de neutrófilos/plaquetas, foi observado diminuição significativa no subgrupo ++/+++ ( $p < 0,0207$ , **Figura 26F**).

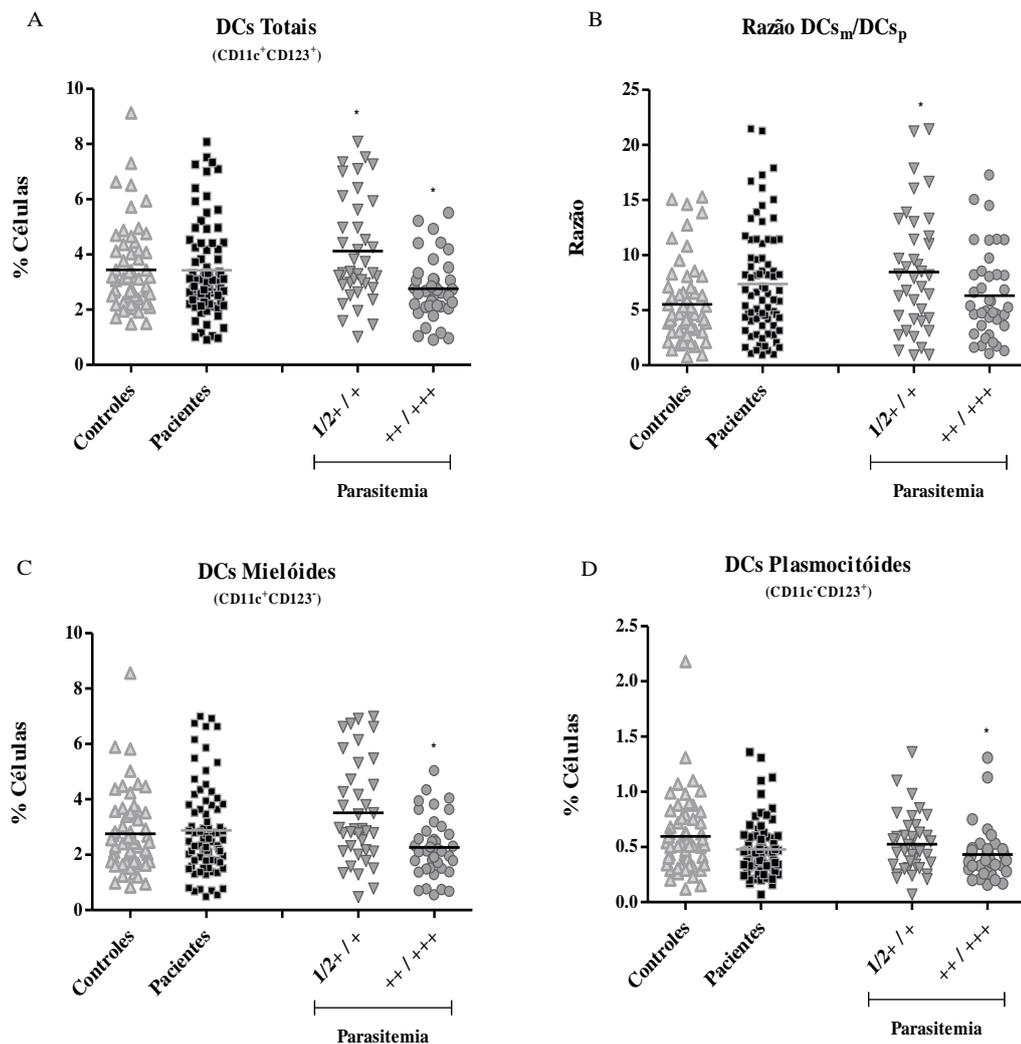


**Figura 26:** Frequência e ativação dos monócitos, neutrófilos e porcentagem celular dos agregados celulares monócitos/plaquetas e neutrófilos/plaquetas em pacientes com malária (Pacientes=■) e não infectados (controles =▲). Pacientes com malária foram categorizados com base na Parasitemia (+/2+/+=▼ e ++/+++)=●). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de monócitos (CD14<sup>+</sup>), neutrófilos (CD16<sup>+</sup>), ativação celular (CD69<sup>+</sup>) e Agregados de monócitos/plaquetas (CD14<sup>+</sup>CD51/61<sup>+</sup>) e neutrófilos/plaquetas (CD16<sup>+</sup>CD51/61<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.



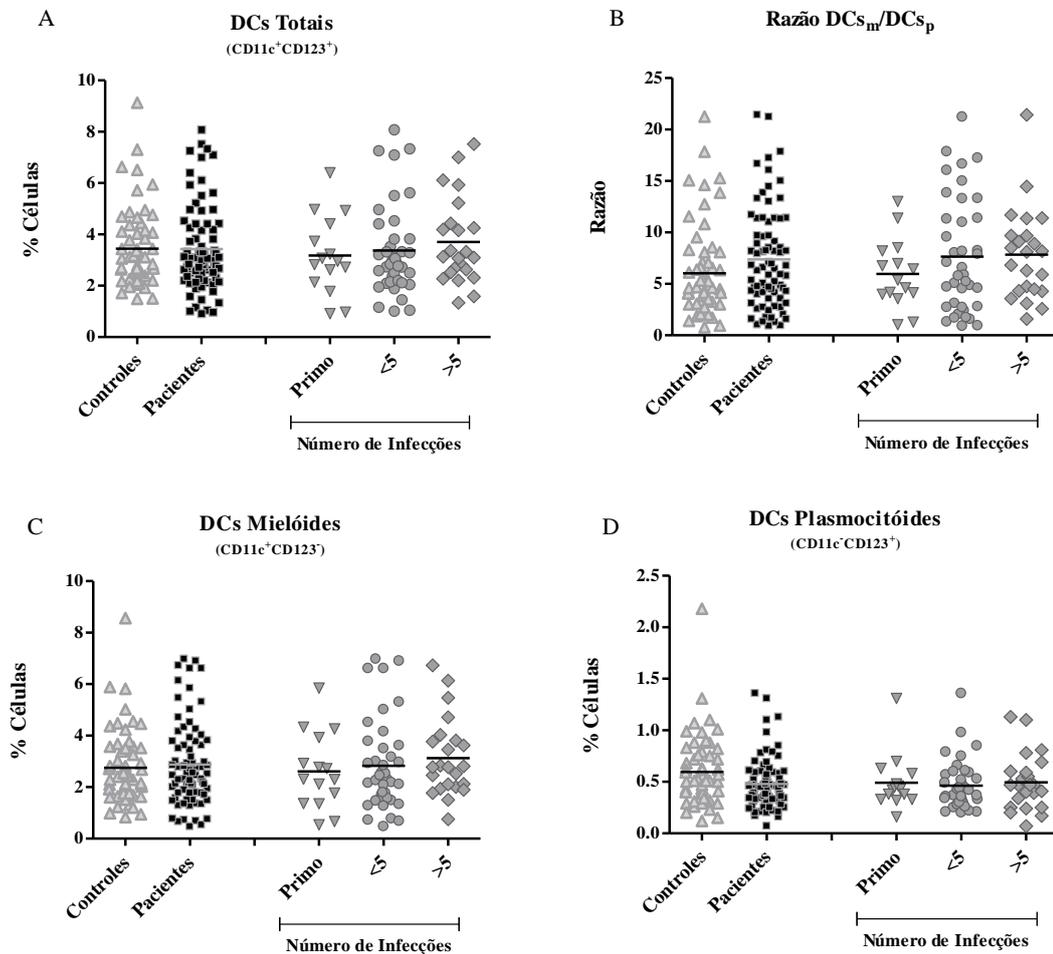
**Figura 27:** Frequência e ativação dos monócitos, neutrófilos e porcentagem celular dos agregados celulares monócitos/plaquetas e neutrófilos/plaquetas em pacientes com malária (Pacientes=■) e não infectados (controles =▲). Pacientes com malária foram categorizados com base no número de infecções (primoinfectado=▼, <5 infecções=●, >5 infecções=◆). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de monócitos (CD14<sup>+</sup>), neutrófilos (CD16<sup>+</sup>), ativação celular (CD69<sup>+</sup>) e Agregados de monócitos/plaquetas (CD14<sup>+</sup>CD51/61<sup>+</sup>) e neutrófilos/plaquetas (CD16<sup>+</sup>CD51/61<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

As células dendríticas (DC) foram avaliadas quanto a porcentagem de DC totais, DC mielóides (DC<sub>m</sub>), DC plasmocitóides (DC<sub>p</sub>) e razão DC<sub>m</sub>/DC<sub>p</sub> (Figura 28 e 29). Aumento significativo foi observado no subgrupo +/2/+ em relação ao controle na análise das DC totais e razão DC<sub>m</sub>/DC<sub>p</sub> (p<0,0046 e p<0,0306, Figura 28A e 28B). Quanto as DC<sub>m</sub> e DC<sub>p</sub>, notou-se diminuição significativa no subgrupo ++/+++ quando comparado com o grupo não infectado (p<0,0166 e p<0,0111, Figura 28C e 28D).



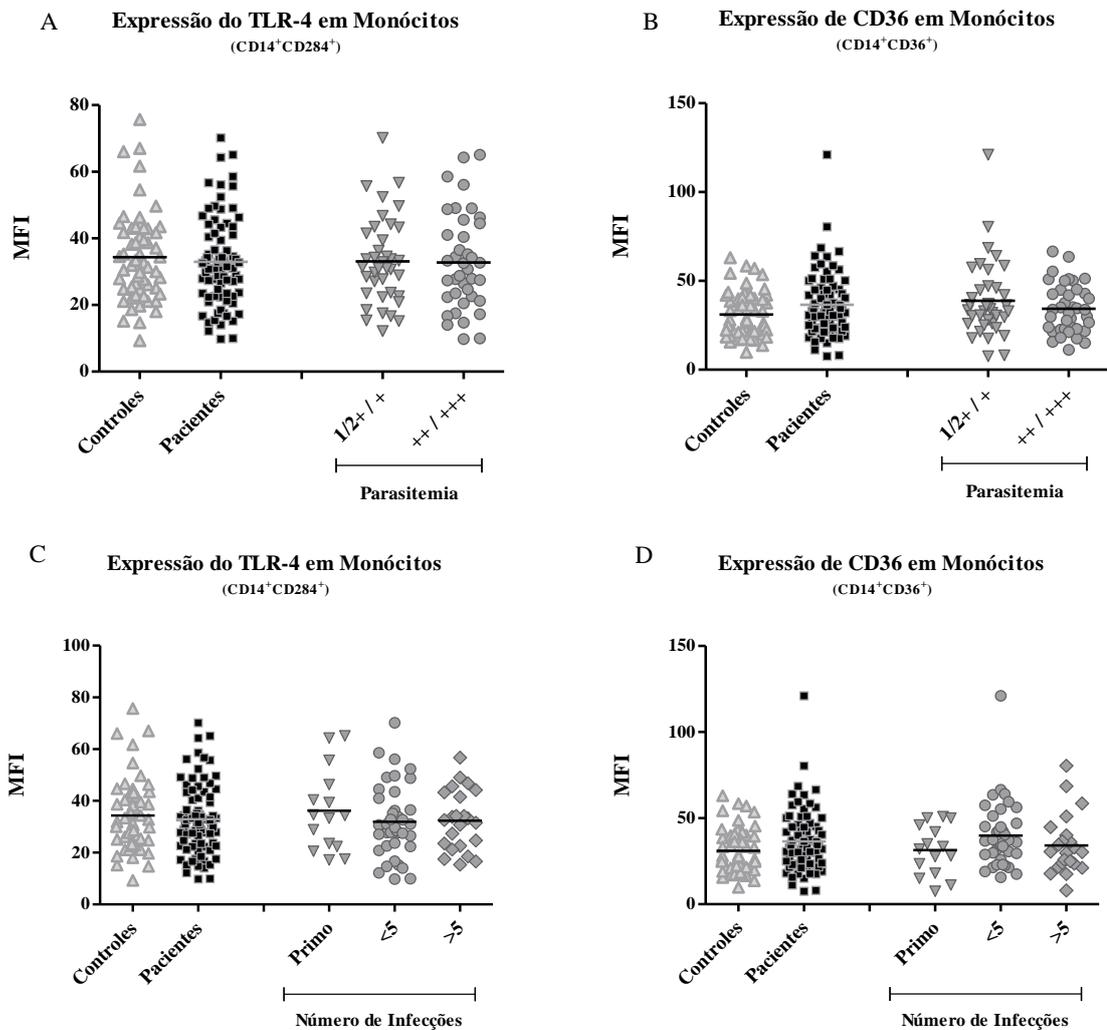
**Figura 28:** Frequência das células dendríticas (DC) totais, células dendríticas mielóides (DC<sub>m</sub>) e células dendríticas plasmocitóides (DC<sub>p</sub>) em pacientes com malária (Pacientes=■) e não infectados (controles =▲). Pacientes com malária foram categorizados com base na Parasitemia (+/2/+ = ▽ e ++/+++ = ●). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de DC<sub>m</sub> (CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>) e DC<sub>p</sub> monócitos (CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

Os resultados das DC segregados em número de infecções, não mostraram, diferenças estatísticas significantes (**Figura 29A, 29B, 29C e 29D**), em nenhum grupo ou subgrupo estudado.



**Figura 29:** Frequência das células dendríticas (DC) totais, células dendríticas mielóides (DC<sub>m</sub>) e células dendríticas plasmocitóides (DC<sub>p</sub>) em pacientes com malária (Pacientes=■) e não infectados (controles=▲). Pacientes com malária foram categorizados com base no número de infecções (primoinfectado=▽, <5 infecções=●, >5 infecções=◆). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de DC<sub>m</sub> (CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>) e DC<sub>p</sub> monócitos (CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

A expressão do receptor TLR-4, responsável pelo reconhecimento de alguns PAMPs e da molécula CD36 (indução de fagocitose celular) foram analisados em monócitos, no entanto, não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos (**Figura 30A, 30B, 30C e 30D**).

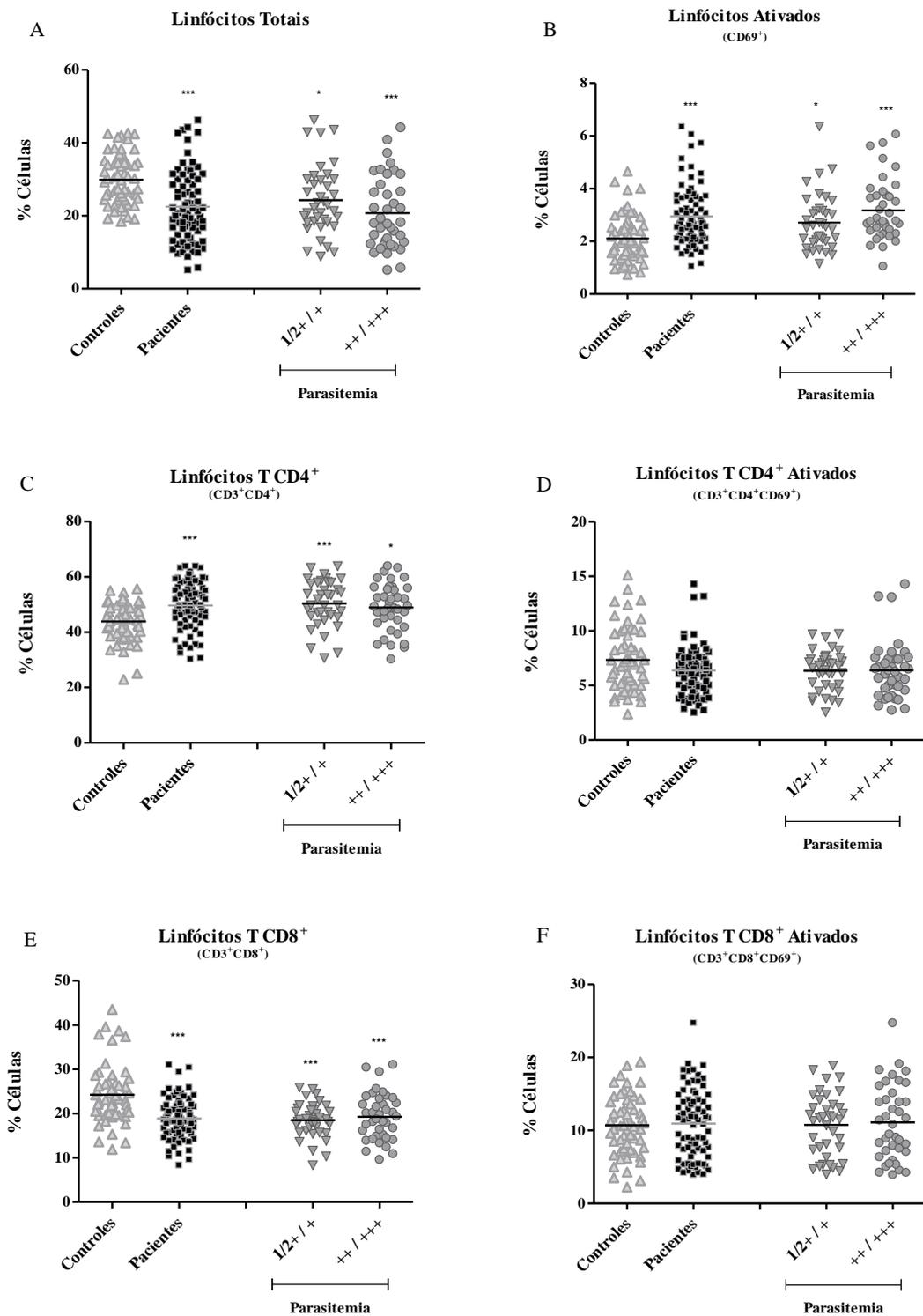


**Figura 30:** Expressão do receptor *Toll-Like-4* e molécula CD36 em monócitos dos pacientes com malária (Pacientes=■) e grupo não infectados (controles =▲). Pacientes com malária foram categorizados com base na Parasitemia (+/2/+ =▼ e ++/+++ =●) e no número de infecções (primoinfectado=▼, <5 infecções=●, >5 infecções=◆). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a expressão do receptor TLR-4 (CD14<sup>+</sup>CD284<sup>+</sup>) e molécula CD36 (CD14<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média da expressão em Intensidade Média de Fluorescência (MFI) das populações. “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

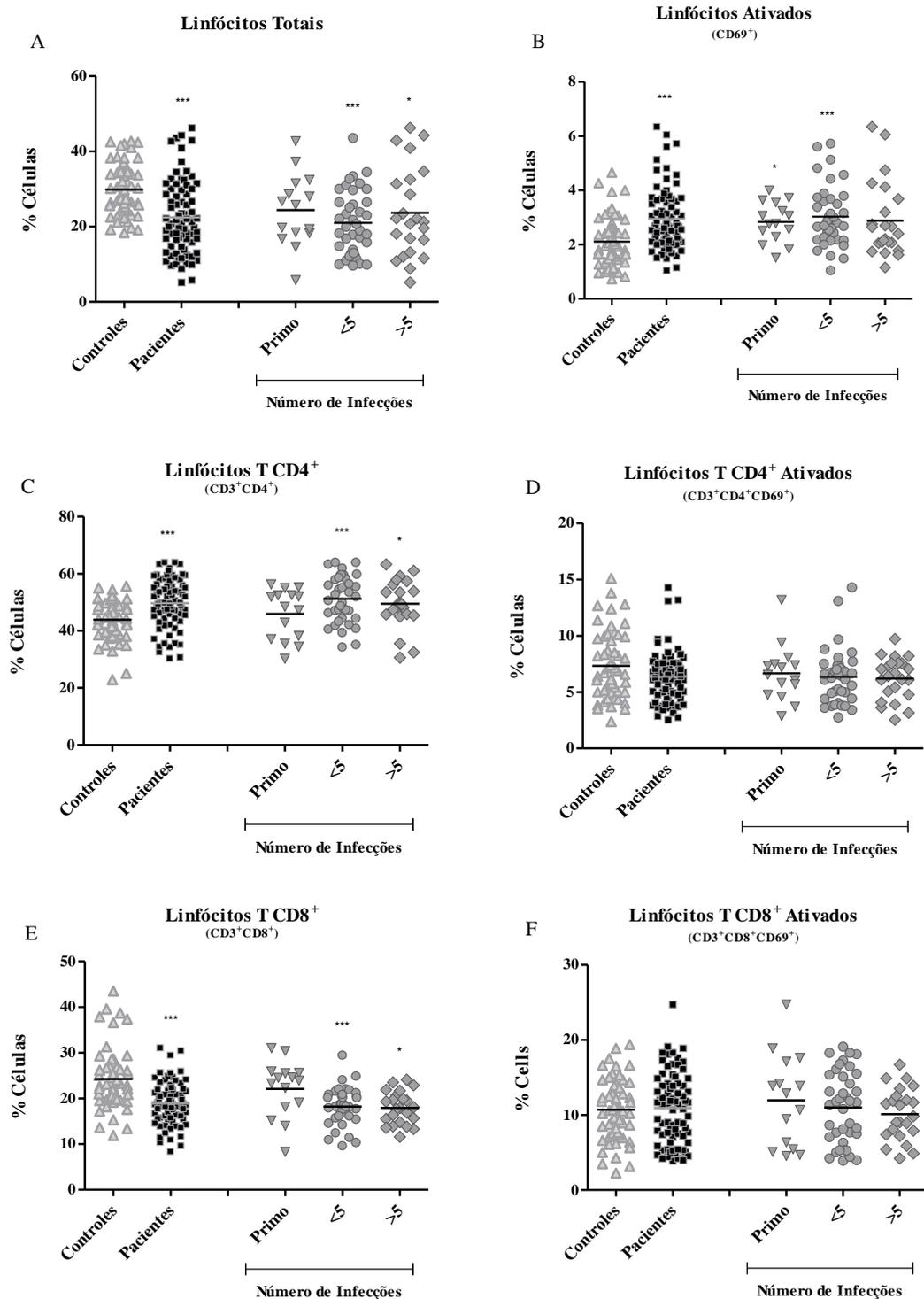
Para melhor compreensão do perfil de resposta imune nos pacientes com malária, além de células e receptores presentes e importantes na imunidade inata, avaliamos também células da resposta imune adaptativa. Para tanto foram analisados os linfócitos totais, sendo observado diminuição significativa no número de células do grupo de pacientes quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,0001$ , **Figuras 31A e 32A**). Devido a esta alteração, avaliamos em seguida a ativação dessas células, e como demonstrado nas **Figuras 31B e 32B**, observou-se aumento significativo no grupo infectado ( $p < 0,0001$ ) da expressão de CD69, um importante marcador de ativação celular. Na análise dos subgrupos foram observados resultados similares, com diminuição na porcentagem de linfócitos e aumento dos linfócitos ativados em relação ao grupo controle. No entanto, quando comparou-se apenas os dados dos subgrupos, não foi observado diferenças significantes.

A análise dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> mostrou aumento significativo no percentual de células do grupo e subgrupos de indivíduos infectados quando comparado com o grupo não infectado ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , **Figura 31C e 32C**), com valores similares entre os controles e o subgrupo primoinfectado. Em relação à ativação das células T CD4<sup>+</sup>, notou-se percentual menor no grupo e subgrupos de pacientes, apesar de não haver diferença estatística significativa (**Figura 31D e 32D**).

Em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a análise dos dados demonstrou diminuição significativa entre os grupos e subgrupos em comparação com o grupo controle ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , **Figura 31E e 32E**), com porcentagem similar entre os controles e o subgrupo primoinfectado. Valores percentuais semelhantes foram observados entre os grupos e subgrupos quanto à ativação das células T CD8<sup>+</sup>.



**Figura 31:** Frequência e ativação dos linfócitos totais e subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em pacientes com malária (Pacientes=■) e grupo não infectado (controles =▲). Pacientes com malária foram categorizados com base na Parasitemia (+/2/+ =▼ e ++/+++ =●). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos (FSCxSSC), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) e ativação celular (CD69<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações e subpopulações. “\*\*\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.



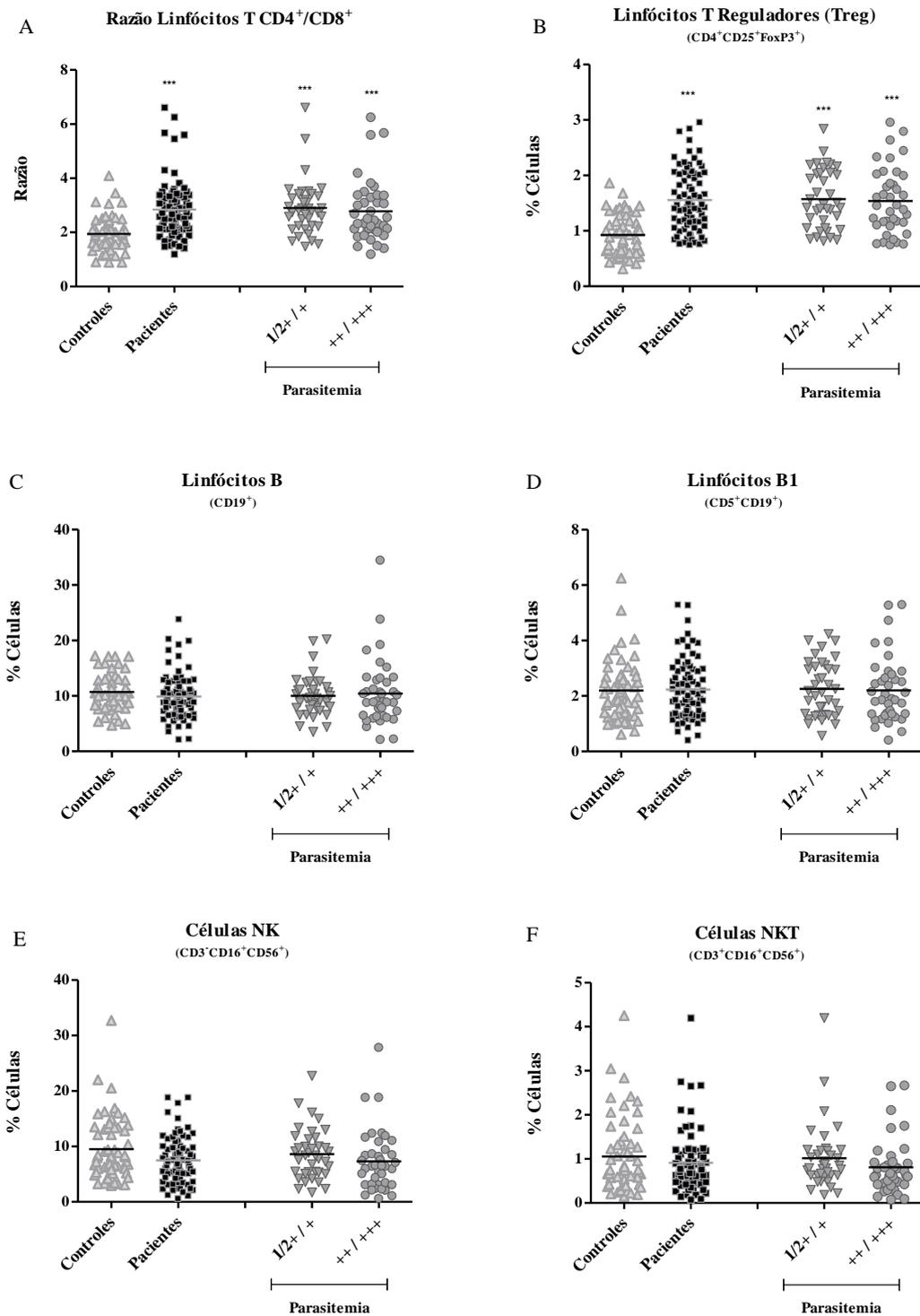
**Figura 32:** Frequência e ativação dos linfócitos totais e subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em pacientes com malária (Pacientes=■) e não infectados (controles =△). Pacientes com malária foram categorizados com base no número de infecções (primoinfectado=▽, <5 infecções=●, >5 infecções=◆). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos (FSCxSSC), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) e ativação celular (CD69<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações e subpopulações. “\*\*\*) É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

A razão entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foram maiores entre o grupo e subgrupos infectados quando comparado com os controles ( $p < 0,0001$ , **Figura 33A e 34A**), com valores semelhantes entre o grupo não infectado e primoinfectado..

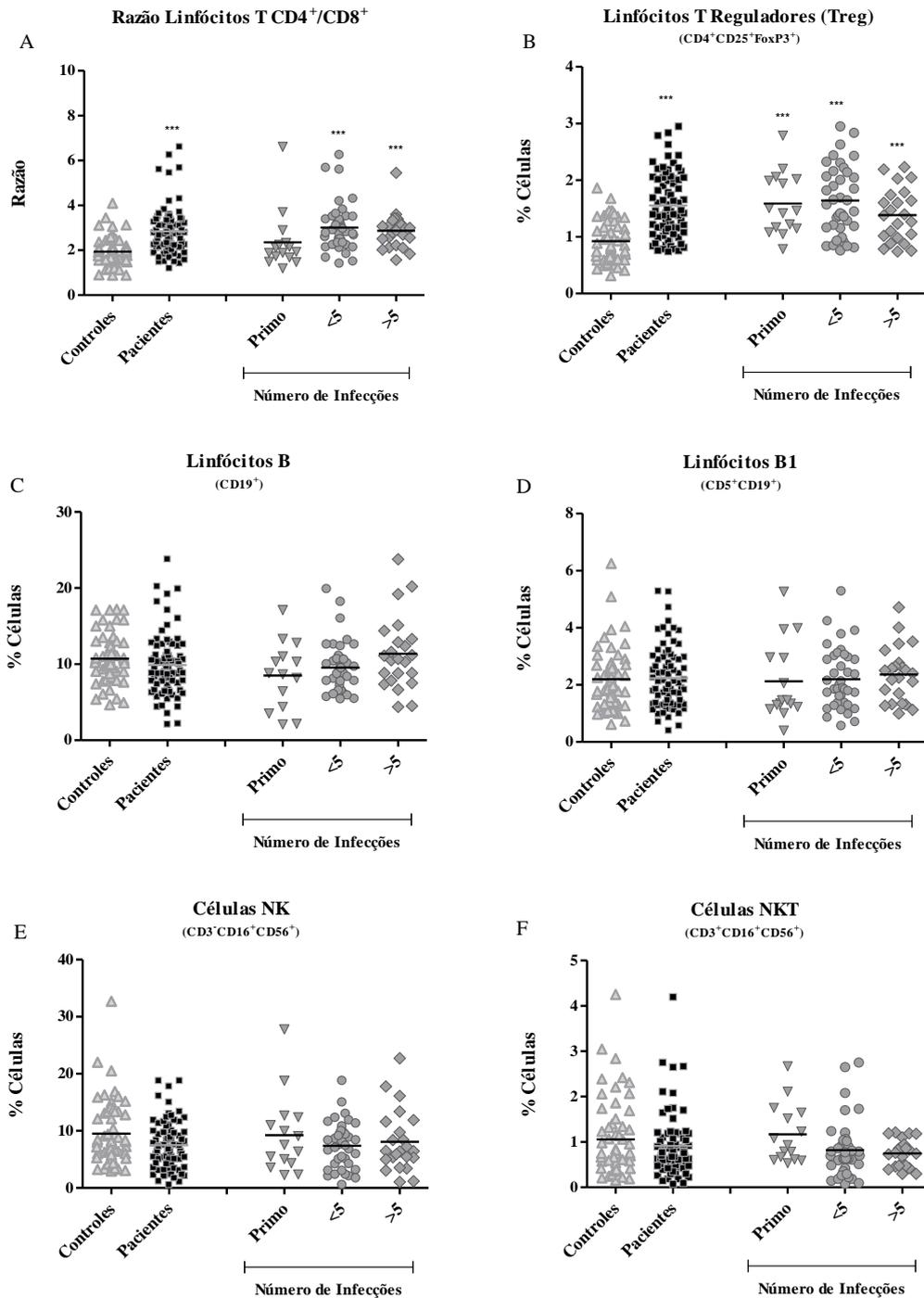
Quanto aos linfócitos T reguladores (Treg), responsáveis pela supressão/regulação da resposta imune, observou-se aumento significativo nos valores percentuais do grupo e subgrupos de pacientes com malária em relação aos controles ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , **Figura 33B e 34B**).

Os linfócitos B e B1 apresentam valores similares entre o grupo infectado e não infectado, com aumento gradativo não significativo no percentual celular de acordo com o número de infecções ( $p < 0,0886$  e  $p < 0,8451$ , **Figura 34C e 34D**). Em relação à parasitemia, os valores foram semelhantes entre os grupos e subgrupos (**Figura 33C, 33D**).

Ao analisarmos as células NK e NKT, observamos declínio nos valores percentuais dos pacientes comparados com os controles, sem diferenças estatísticas significantes ( $p = 0,2758$  e  $p = 0,2977$ , **Figura 33E, 33F**). Vale ressaltar que, quando segregamos os pacientes no subgrupo número de infecções, notamos que há redução gradativa no percentual celular de acordo com o aumento das reinfecções (**Figura 34E e 34F**), no entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significantes.



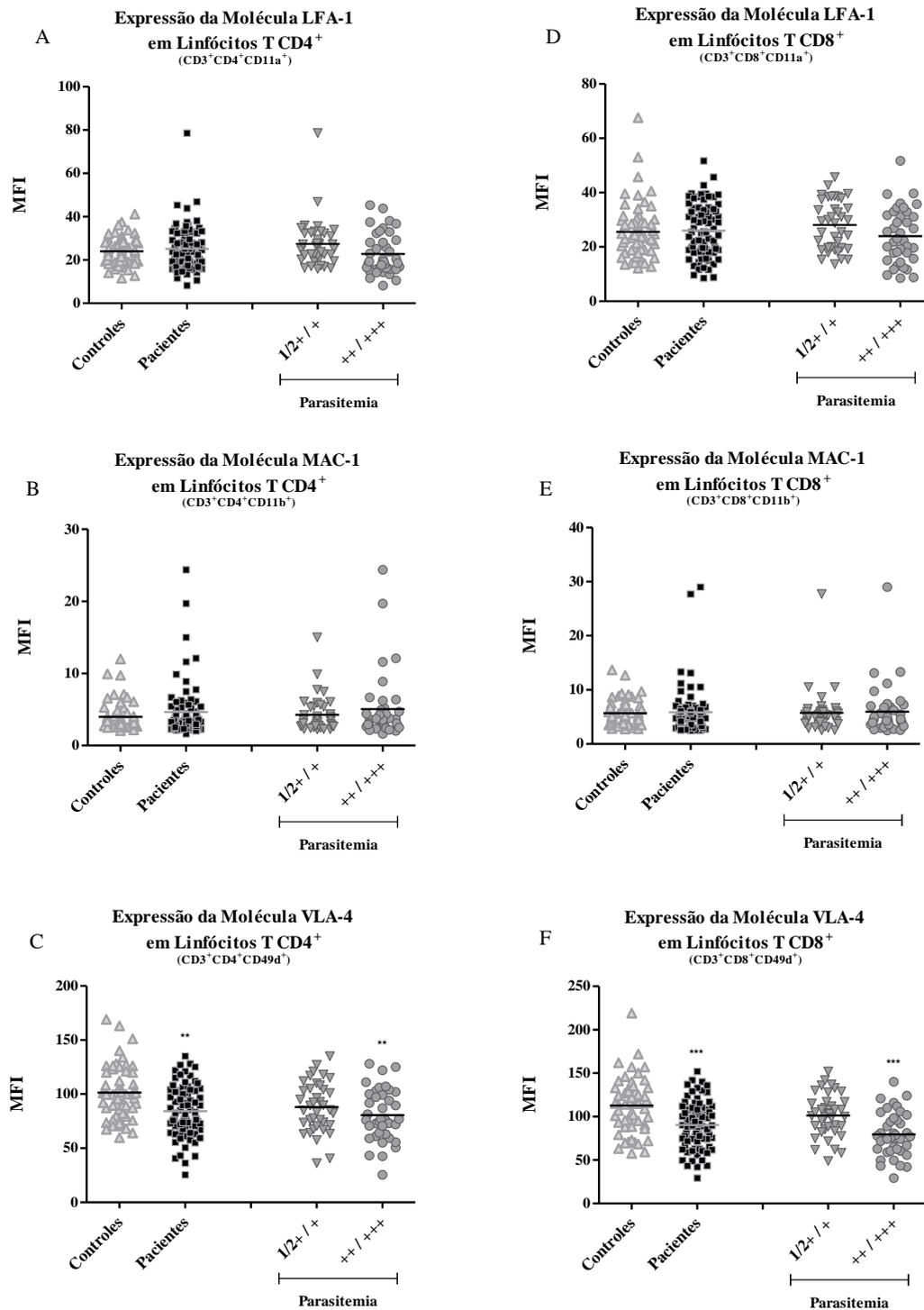
**Figura 33:** Razão dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e frequência dos linfócitos T reguladores (Treg), B, B1 e células NK e NKT em pacientes com malária (Pacientes=■) e grupo não infectado (controles=▲). Pacientes com malária foram categorizados com base na Parasitemia (+/2+ / + = ▼ e ++ / +++ = ●). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), linfócitos B1 (CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) e células NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “\*\*\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.



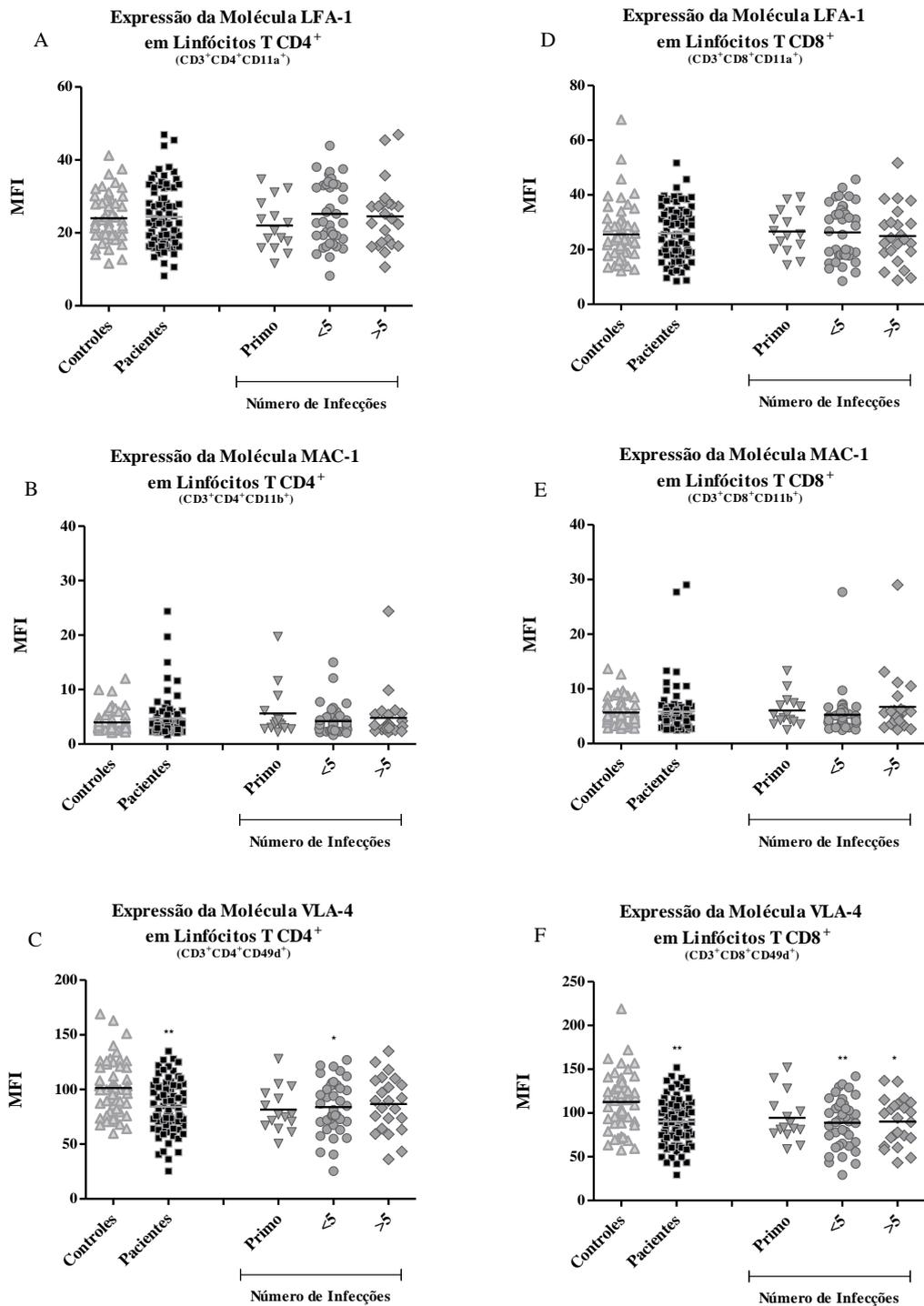
**Figura 34:** Razão dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> e frequência dos linfócitos T reguladores (Treg), B, B1 e células NK e NKT em pacientes com malária (Pacientes=■) e grupo não infectado (controles =▲). Pacientes com malária foram categorizados com base no número de infecções (primoinfectado=▼, <5 infecções=●, >5 infecções=◆). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), linfócitos B1 (CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) e células NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

A expressão das moléculas de adesão LFA-1, MAC-1 e VLA-4 foram quantificadas nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. A análise demonstrou diminuição significativa da expressão da molécula VLA-4 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do grupo de pacientes quando comparado com aos controles (p=0,0021 e p=0,0004, **Figura 35C e 36C**). Quando os dados foram segregados, notou-se diferença estatística apenas nos subgrupos ++/+++, <5 e >5 infecções.

Os resultados da expressão de todas as moléculas de adesão estão descritos nas **Figuras 35 e 36**.



**Figura 35:** Expressão das moléculas de adesão LFA-1, MAC-1 e VLA-4 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em pacientes com malária (Pacientes=■) e grupo não infectado (controles =△). Pacientes com malária foram categorizados com base na Parasitemia (+/2+=▽ e ++/+++=●). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a expressão das moléculas LFA-1 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD11a<sup>+</sup>), MAC-1 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e VLA-4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>) nas células T CD4<sup>+</sup> e LFA-1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD11a<sup>+</sup>), MAC-1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e VLA-4 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>) nas células T CD8<sup>+</sup>. Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) das populações. “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.



**Figura 36:** Expressão das moléculas de adesão LFA-1, MAC-1 e VLA-4 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em pacientes com malária (Pacientes=■) e grupo não infectado (controles =△). Pacientes com malária foram categorizados com base no número de infecções (primoinfectado=▽, <5 infecções=●, >5 infecções=◆). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a expressão das moléculas LFA-1 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD11a<sup>+</sup>), MAC-1 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e VLA-4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>) nas células T CD4<sup>+</sup> e LFA-1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD11a<sup>+</sup>), MAC-1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) e VLA-4 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>) nas células T CD8<sup>+</sup>. Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) das populações. “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

### 5.3. Concentração das Citocinas Séricas nos pacientes com Malária

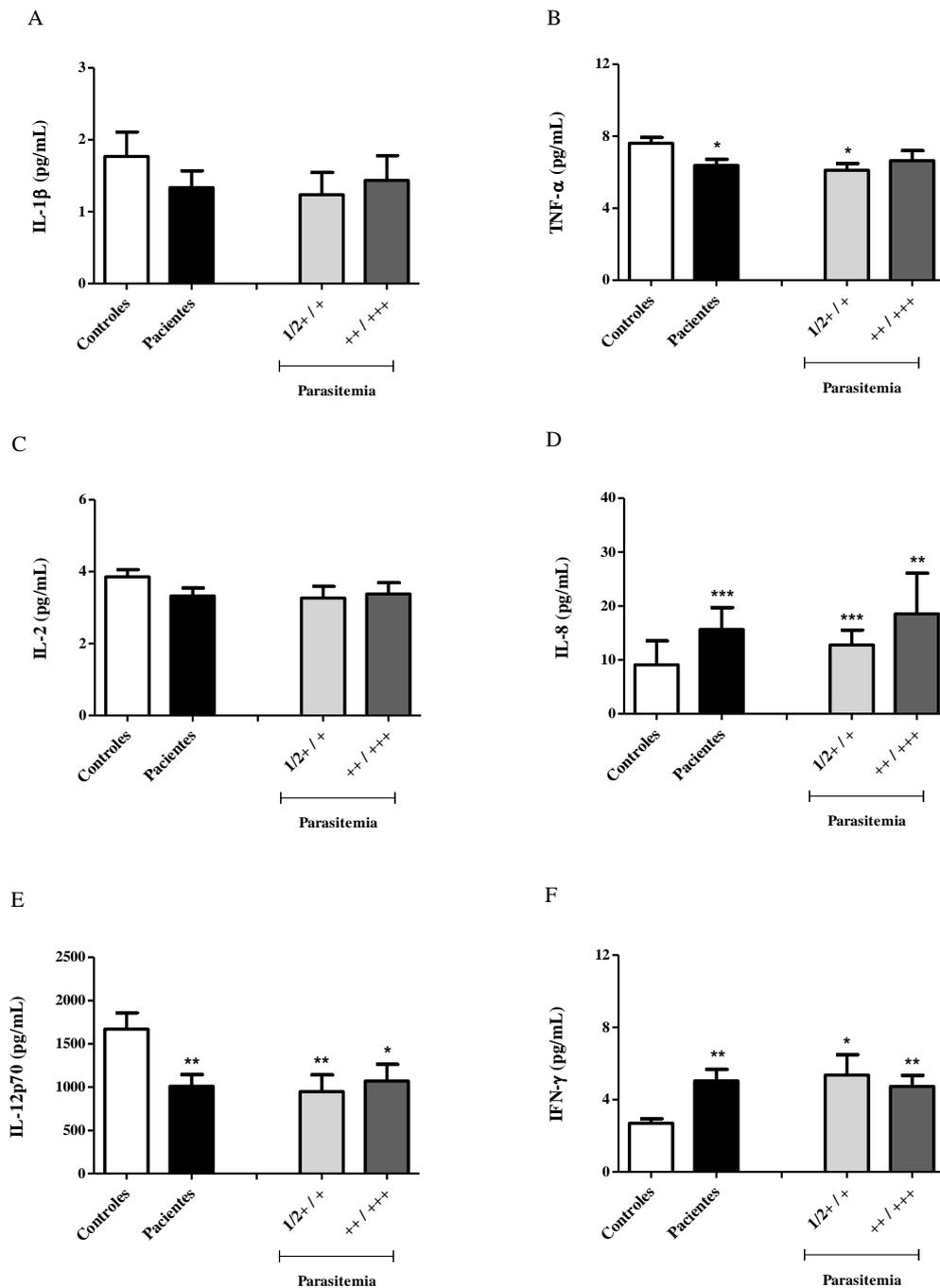
O perfil de citocinas dos pacientes com malária, infectados com *P. vivax* foi traçado com a análise das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . As concentrações séricas das citocinas estão descritas em pg/mL e foram utilizadas nas análises estatísticas.

#### 5.3.1. Citocinas Pró-inflamatórias e de Perfil Th1

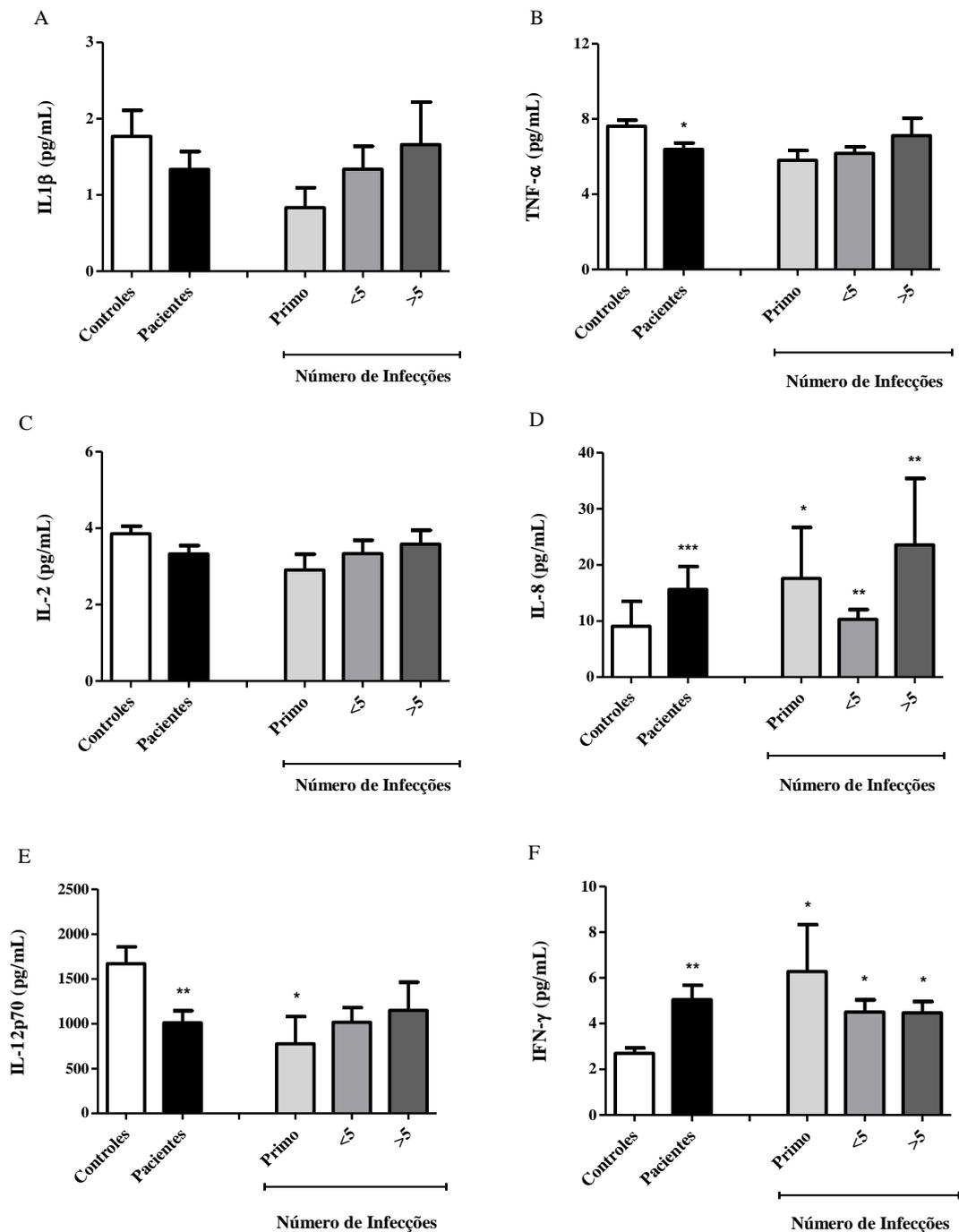
As **Figuras 37A/38A e 37B/38B** mostram as concentrações das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-2 entre os pacientes com malária e o grupo controle, no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e subgrupos analisados ( $p=0,9023$  e  $p=0,2829$ ).

As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12p70 apresentaram diminuição significativa nas concentrações séricas das amostras do grupo infectado quando comparado com o controle ( $p=0,0085$  e  $p=0,0013$ , **Figuras 37B/38B e 37E/38E**). Os dados mostram ainda que as concentrações de TNF- $\alpha$  são maiores no subgrupo +/2/+, enquanto que na citocina IL-12p70 essa diferença foi observada nos subgrupos +/2/+, ++/+++ e primoinfectados.

Aumento significativo nas concentrações de IL-8 e IFN- $\gamma$  foram observados nos indivíduos infectados em relação aos não infectados ( $p<0,0001$  e  $p=0,0007$ , **Figura 37D/38D e 37F/38F**). Diferenças estatísticas foram observadas ainda em todos os subgrupos analisados (Parasitemia - +/2 / + e ++ / +++; Número de infecções – Primo-infectado, <5 infecções e >5 infecções).



**Figura 37:** Concentrações séricas de citocinas em pacientes com malária (Pacientes=■) e indivíduos não-infectados (Controles=□). Pacientes com malária foram categorizados com base na Parasitemia (+/2/+ =□ e +++/+++ =■). Os testes Cytometric beads array (CBA) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foram usados para quantificar as concentrações de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-8, IL-12p70 e IFN- $\gamma$ , os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$ desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL). “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.



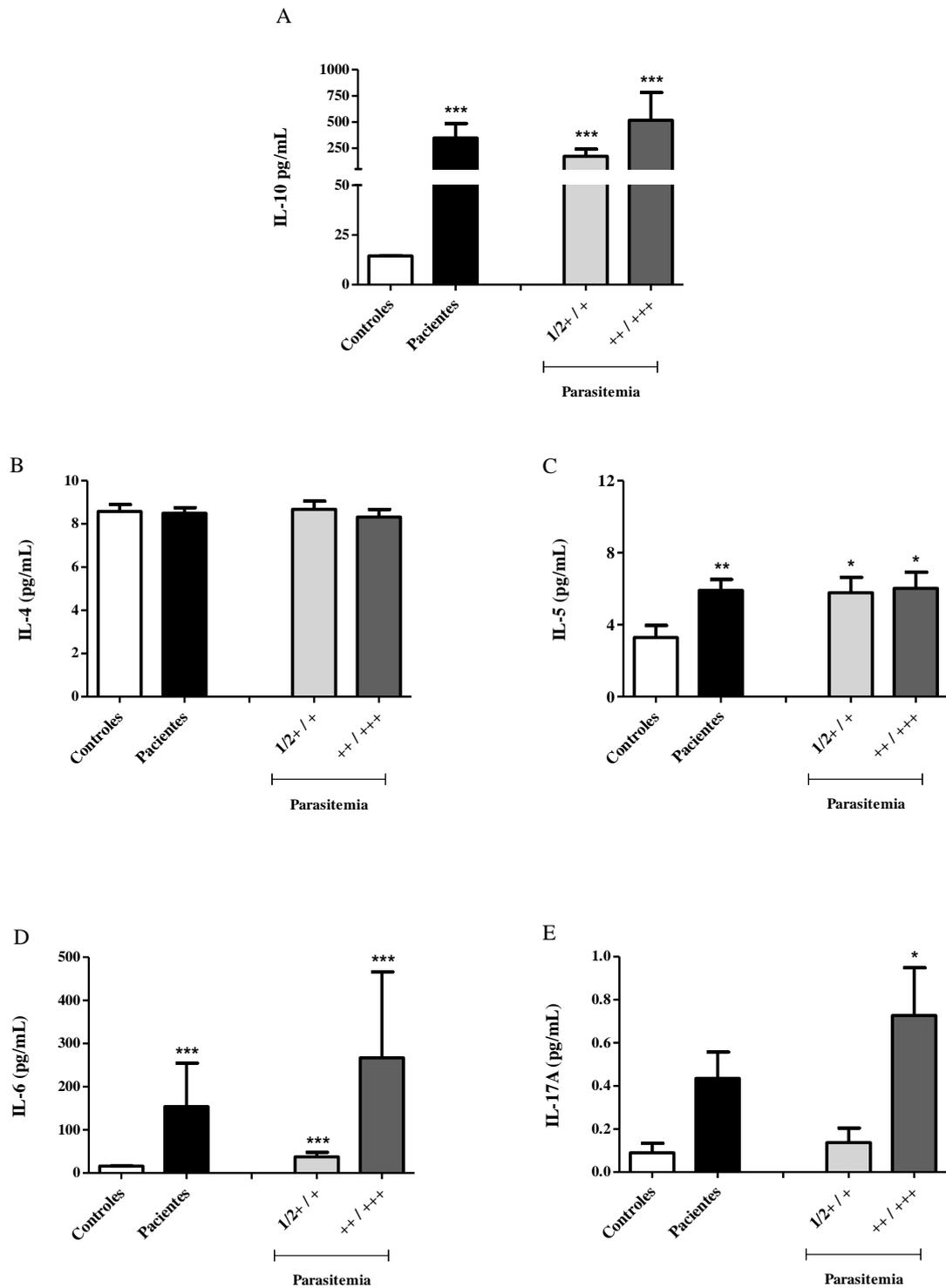
**Figura 38:** Concentrações séricas de citocinas em pacientes com malária (Pacientes=■) e indivíduos não-infectados (Controles=□). Pacientes com malária foram categorizados com base no número de infecções (primo-infecção =□, <5 infecções =■ e >5 infecções =■). Os testes *Cytometric beads array* (CBA) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foram usados para quantificar as concentrações de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-8, IL-12p70 e IFN- $\gamma$ , os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$ desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL). “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

### 5.3.2. Citocinas Regulatórias e de Perfil Th2 e Th17

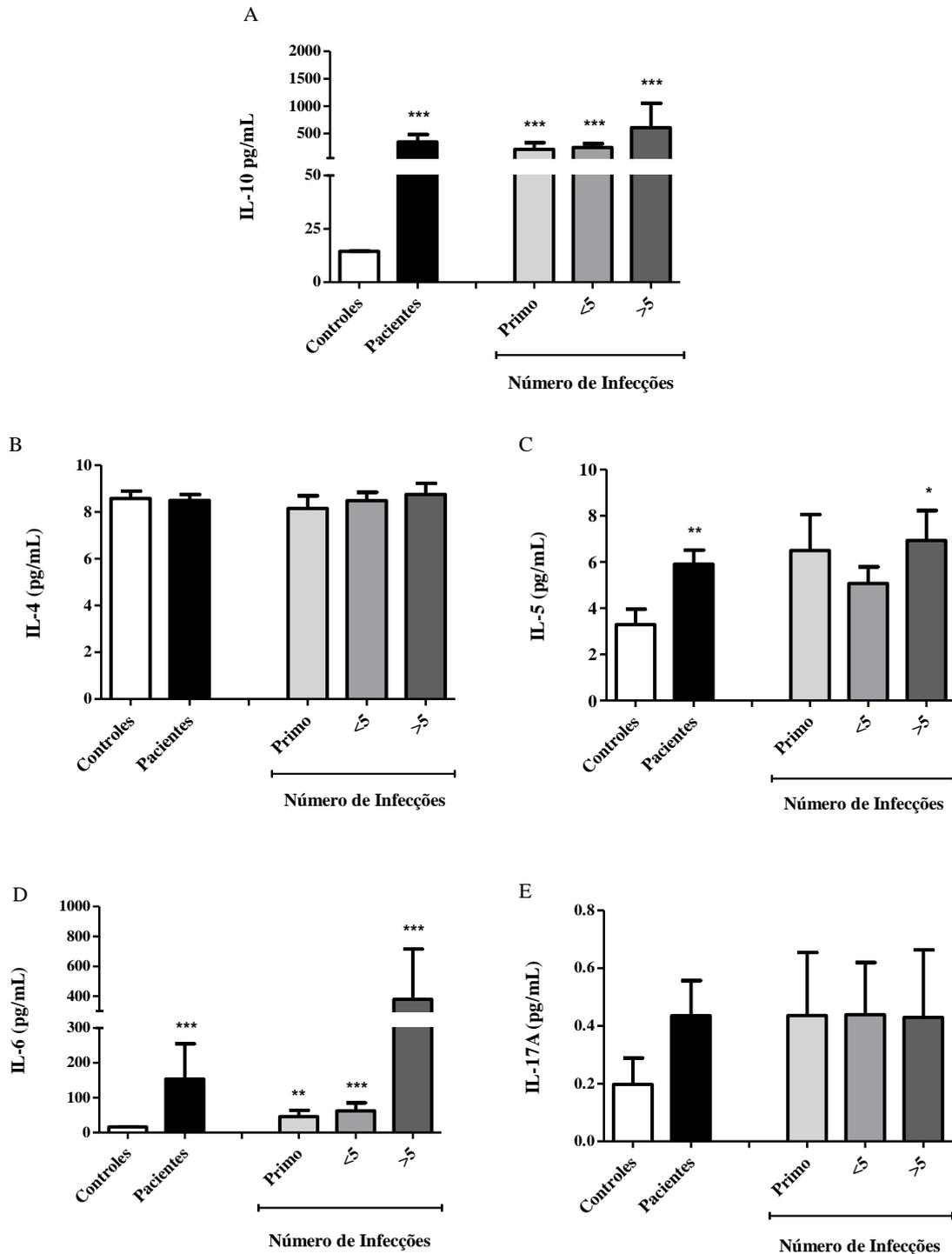
A citocina regulatória IL-10 apresentou aumento significativo no grupo de indivíduos infectados quando comparado com os controles ( $p < 0,0001$ , **Figuras 39A e 40A**) Diferenças estatísticas significantes foram observadas ainda em todos os subgrupos analisados, destacando o aumento nos subgrupos ++/+++ e >5 infecções.

As citocinas IL-5 e IL-6 apresentaram aumento significativo entre os grupos analisados ( $p = 0,0029$  e  $p < 0,0001$ , **Figuras 39C/40C e 39D/40D**). Em relação à parasitemia, as concentrações de IL-6 foram maiores no subgrupo ++/+++. Quanto ao número de infecções, nota-se que ambas as citocinas apresentam valores maiores no subgrupo >5 infecções.

As **Figuras 39B/40B** mostram que as concentrações da citocina IL-4 foram similares entre os grupos estudados, não havendo diferença estatística significante. Na análise da citocina IL-17A, notou-se que houve aumento na concentração sérica dos pacientes em relação aos controles. No entanto, diferenças estatísticas significantes só foram observadas quando comparados aos valores do subgrupo ++/+++ e os controles ( $p = 0,0029$ , **Figura 39E e 40E**).



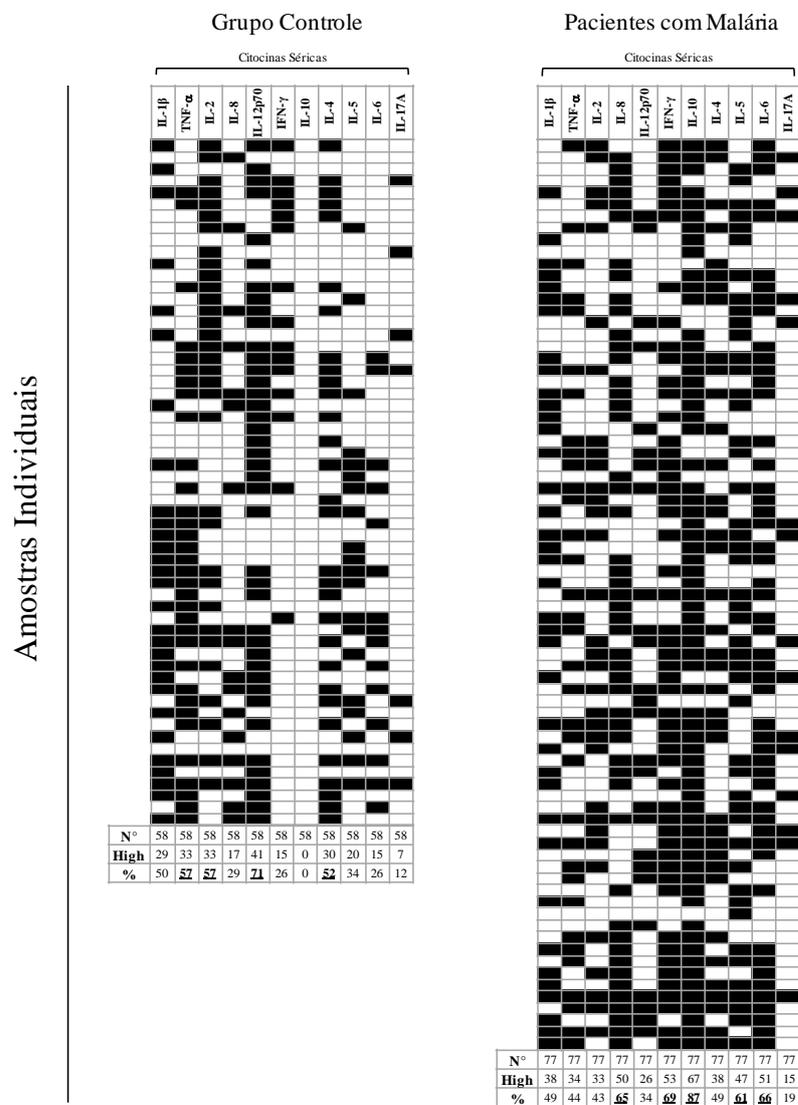
**Figura 39:** Concentrações séricas de citocinas em pacientes com malária (Pacientes=■) e indivíduos não-infectados (Controles=□). Pacientes com malária foram categorizados com base na Parasitemia (+/2/+ =□ e ++/+++ =■). Os testes Cytometric beads array (CBA) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foram usados para quantificar as concentrações de IL-10, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-17A, os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL). “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.



**Figura 40:** Concentrações séricas de citocinas em pacientes com malária (Pacientes=■) e indivíduos não-infectados (Controles=□). Pacientes com malária foram categorizados com base no número de infecções (primo-infecção =□, <5 infecções =■ e >5 infecções =■). Os testes *Cytometric beads array* (CBA) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foram usados para quantificar as concentrações de IL-10, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-17A, os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$ desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL). “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*.

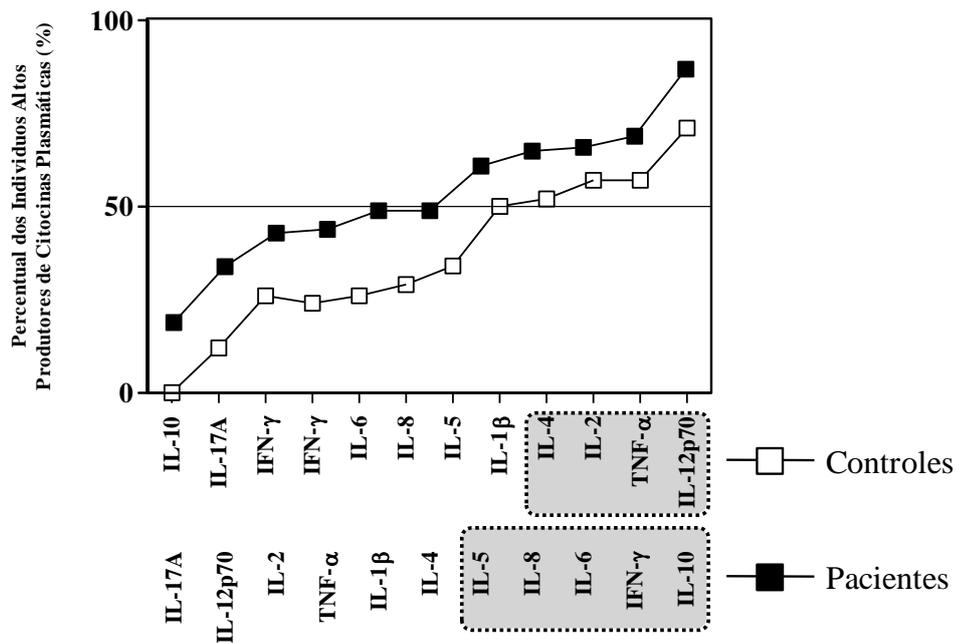
#### 5.4. Análise de Altos Produtores de Citocinas

Com o intuito de caracterizar ainda mais o perfil de citocinas envolvidos no processo de resposta imune na malária, foi realizada a segregação da síntese das citocinas analisadas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e classificadas em altos e baixos produtores. A classificação foi realizada pela determinação da mediana global dos valores em pg/mL de cada amostra. As amostras que apresentaram valores acima da mediana foram consideradas como altos produtores e abaixo desse valor, foram tratadas como baixos produtores. A **Figura 41** demonstra a produção individual das citocinas. Os indivíduos altos produtores estão representados em quadros pretos, enquanto que os indivíduos que produziram níveis abaixo da mediana estão apresentadas em quadros brancos.



**Figura 41:** Distribuição dos indivíduos altos e baixos produtores de citocinas nos grupos de pacientes com malária e controle. N°: Número de Pacientes; High: N° de altos produtores; %: Porcentagem de altos produtores.

Através da **Figura 41** foi possível determinar o percentual de altos produtores nas amostras. Os valores percentuais foram utilizados para demonstrar o panorama geral da produção de citocinas e gerar um gráfico de assinatura ascendente de citocinas (**Figura 42**) de cada grupo, com o objetivo de identificar as características associadas à infecção pelo *P. vivax*.



**Figura 42:** Assinatura das citocinas no grupo de pacientes e controles. A frequência ascendente de indivíduos altos produtores foi criada com a sobreposição dos gráficos do grupo controle e pacientes com malária. Para identificar os elementos relevantes na assinatura, foi destacado com retângulo cor de cinza as citocinas que estão acima do percentil 50 ou da linha de corte (*cut-off*).

A análise da assinatura revela que a maioria dos indivíduos do grupo controle tem um padrão de resposta inflamatória, com produção de citocinas de indução do perfil Th1 e Th2. Em contraste, o grupo de pacientes com malária exibe uma tendência para o perfil inflamatório, com frequência elevada das citocinas IL-5 e IL-10.

### 5.5. Frequência dos Polimorfismos *Asp299Gly* e *Thr399Ile* do TLR-4 e associação com a resposta imune.

Para esta análise foram realizadas as tipagens genóticas de amostras de 77 pacientes com malária e 58 indivíduos não infectados. A genotipagem revelou que 10% dos pacientes com malária possuem o polimorfismo *Asp299Gly* em heterozigose (A/G). No grupo controle,

essa frequência foi menor, sendo estimada em 2%. A frequência do polimorfismo *Thr399Ile* em heterozigose (C/T) foi similar entre os grupos, com 5% e 3%, nos indivíduos infectados e não infectados, respectivamente (**Tabela 03**).

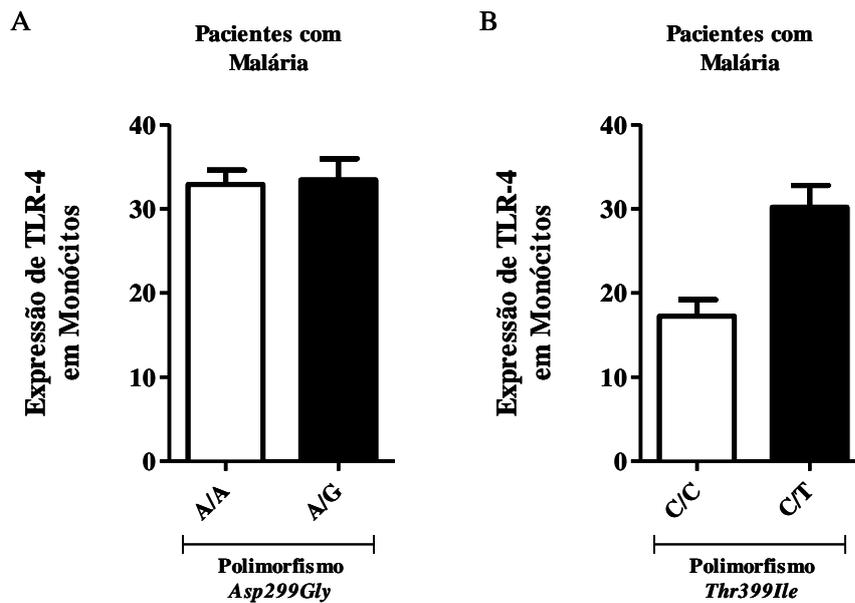
Quando aplicado o teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ), foi observado que apenas o polimorfismo *Asp299Gly* não se encontra em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $\chi^2=4,7030$ ,  $p=0,0457$ ), conforme descrito **Tabela 03**.

**Tabela 03:** Teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) e resultados dos genótipos dos polimorfismos do TLR-4.

Polimorfismo	Genótipo	N° Controles (58)	N° Pacientes (77)	p valor	$\chi^2$
<i>Asp299Gly</i> TLR-4	A/A	57 (98%)	69 (90%)	<b>0,0457*</b>	4.703
	A/G	1 (2%)	8 (10%)		
	G/G	0 (0%)	0 (0%)		
<i>Thr399Ile</i> TLR-4	C/C	56 (97%)	73 (95%)	0,6259	2.376
	C/T	2 (3%)	4 (5%)		
	T/T	0 (0%)	0 (0%)		

#### 5.5.1. Associação entre os polimorfismos *Asp299Gly* e *Thr399Ile* e a expressão do receptor TLR-4 em monócitos

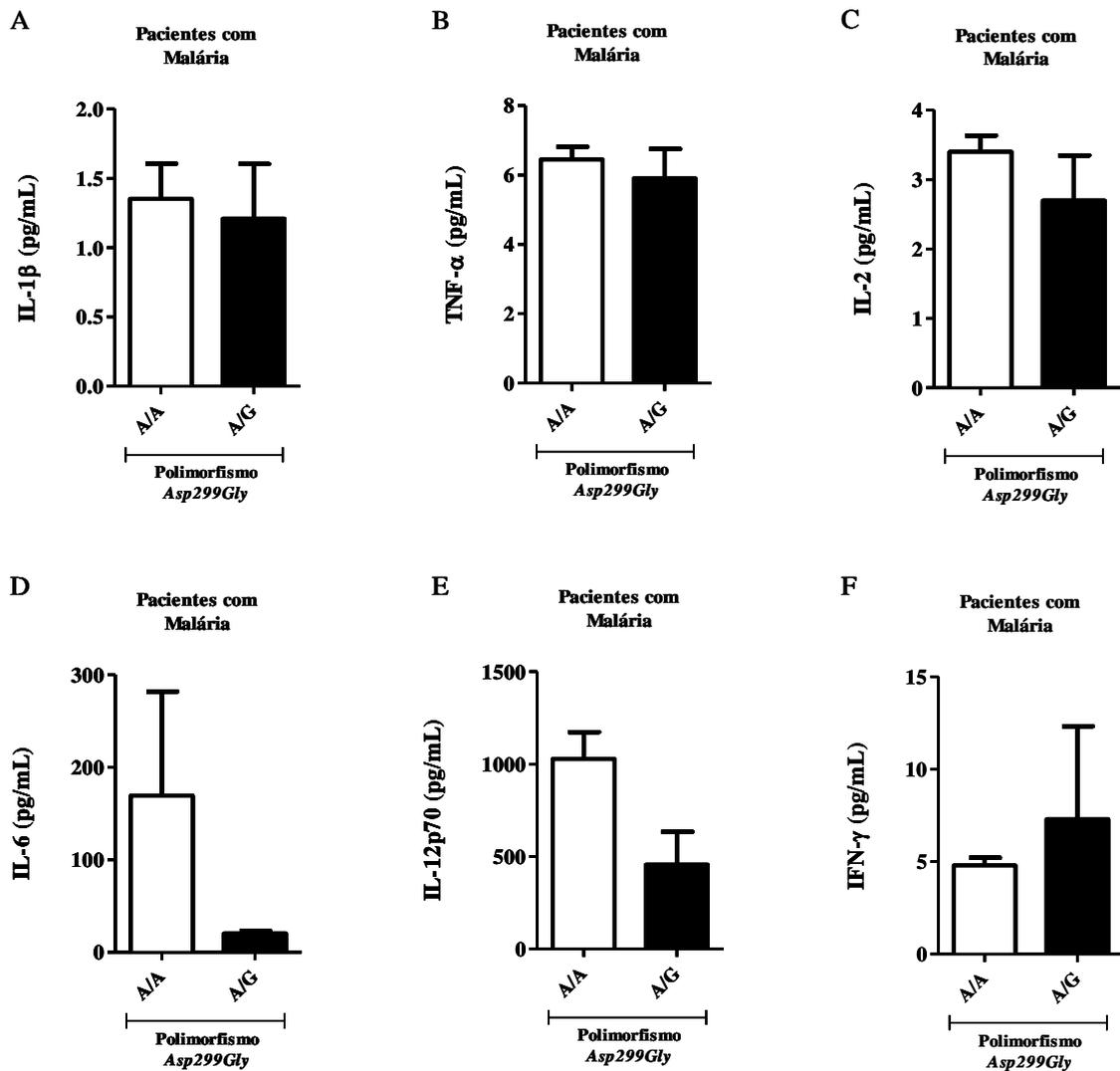
A expressão do receptor TLR-4 em monócitos foi relacionada com os polimorfismos desse receptor. A análise demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos de genótipos dos polimorfismos *Asp299Gly* e *Thr399Ile* ( $p=0,6048$  e  $p=0,0984$ , **Figura 43A/B**). Vale ressaltar que, apesar de não haver diferenças significantes, os pacientes com o polimorfismo *Thr399Ile* em heterozigose (CT) tiveram expressão maior do receptor TLR-4.



**Figura 43:** Expressão do receptor *Toll-Like-4* em monócitos dos pacientes com malária. Os pacientes foram categorizados de acordo com o genótipo dos polimorfismos *Asp299Gly/Thr399Ile*: A/A - C/C (Homozigoto Normal=□) e A/G - C/T (Heterozigoto=■). “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes com genótipo que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), obtido através do teste não paramétrico *Mann-Whitney*.

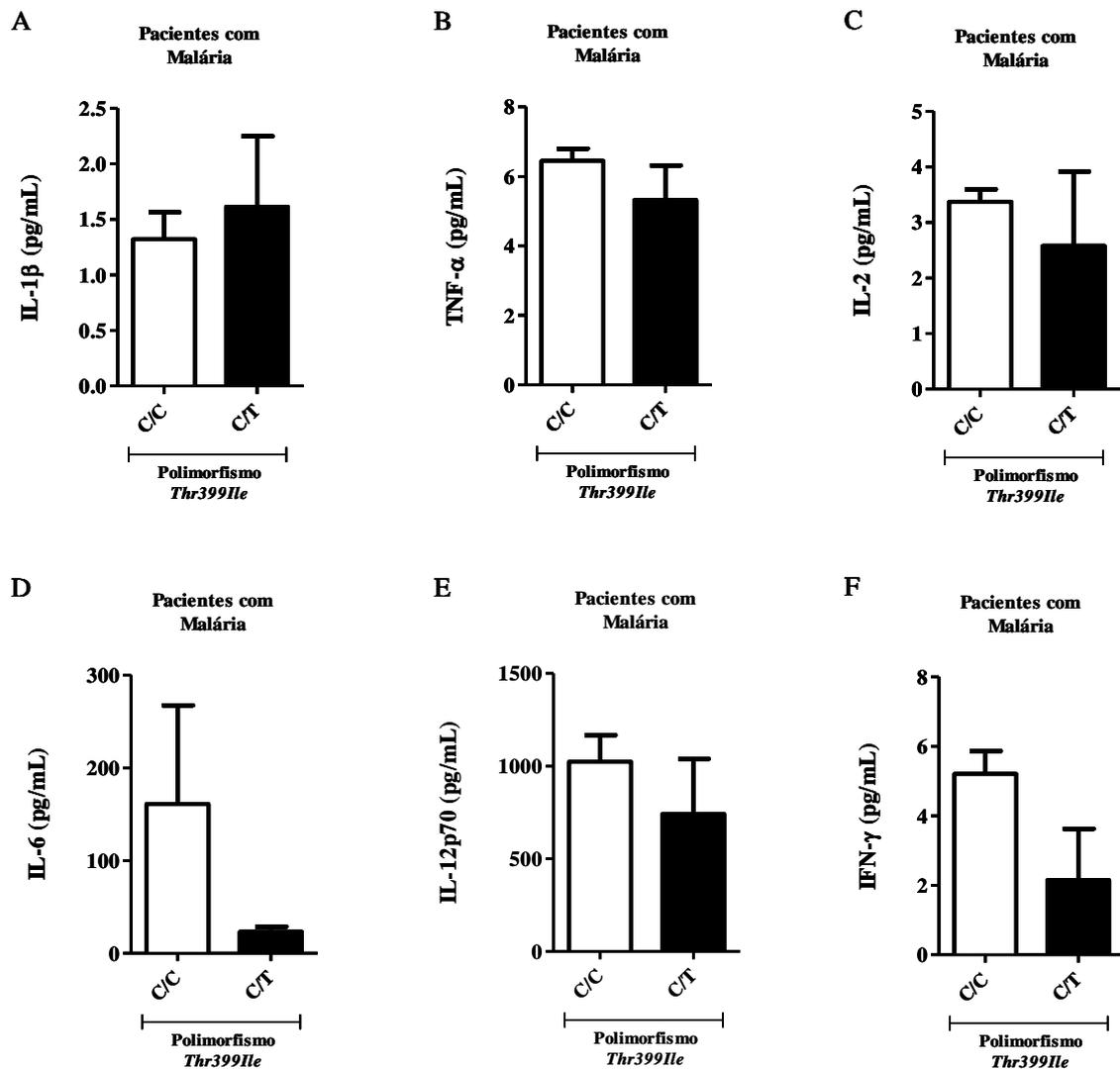
### 5.5.2. Associação entre os polimorfismos *Asp299Gly* e *Thr399Ile* do TLR-4 e a produção de citocinas

A produção das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12p70 e IFN- $\gamma$  foi associada com o polimorfismo *Asp299Gly* do TLR-4. A análise dos resultados demonstrou que os pacientes com o polimorfismo em heterozigose apresentaram menor concentração das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e IL-12p70 em relação aos homozigotos (**Figura 44A/C/D/E**). A citocina TNF- $\alpha$  manteve níveis similares (**Figura 44B**), enquanto que a citocina IFN- $\gamma$  apresentou aumento nas concentrações analisadas (**Figura 44F**). Diferenças estatísticas não foram observadas em nenhuma variável descrita.



**Figura 44:** Concentrações séricas das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12p70 e IFN- $\gamma$  em pacientes com malária. Os pacientes foram categorizados de acordo com o genótipo do polimorfismo *Asp299Gly*: A/A (Homozigoto Normal=□) e A/G (Heterozigoto=■). “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes com genótipo que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), obtido através do teste não paramétrico *Mann-Whitney*.

Quanto a associação das citocinas descritas e o polimorfismo *Thr399Ile* do TLR-4, verificou-se que houve diminuição na concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12p70 e IFN- $\gamma$  (Figura 45 B/C/D/E/F) e aumento da citocina IL-1 $\beta$  (Figura 45A) nos pacientes com o polimorfismo em heterozigose em comparação com os indivíduos homozigotos. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados.



**Figura 45:** Concentrações séricas das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12p70 e IFN- $\gamma$  em pacientes com malária. Os pacientes foram categorizados de acordo com o genótipo do polimorfismo *Thr399Ile*: C/C (Homozigoto Normal=□) e C/T (Heterozigoto=■). “\*” É usado para identificar o grupo de pacientes com genótipo que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), obtido através do teste não paramétrico *Mann-Whitney*.

---

*Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

A malária é uma doença febril aguda, com processo patogênico diferenciado e relacionado aos fatores biológicos do parasita e hospedeiro. Nesse trabalho expomos as alterações clínicas e imunológicas causadas pela infecção do *Plasmodium vivax* em pacientes diagnosticados com malária e que não haviam iniciado o tratamento recomendado pelo Ministério da Saúde.

### 6.1. Análise das Características Clínico-Epidemiológicas

A sintomatologia básica da malária foi observada em nossos pacientes, sendo as queixas mais frequentes mialgias, fraqueza, cefaleia, calafrios e febre. Para Costa *et al.*, (2010), os sinais e sintomas da malária são constituídos por uma tríade clássica composta por febre-calafrios-cefaleia. No entanto, Rosas (2003) alerta para a familiaridade desses sintomas com outras doenças febris, como a dengue. No estudo de Franklin *et al.*, (2011), foi observado que os pacientes infectados com *P. vivax* foram acometidos principalmente por febre, mialgias, calafrios e cefaleia, corroborando com nossos achados.

Apesar dos pacientes incluídos nesse estudo não apresentarem sinais de gravidade da doença, estudos recentes tem relatado a associação da infecção pelo *P. vivax* com casos graves e complicações na malária (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2012)

Quadros anêmicos são comuns em pacientes com malária grave ocasionada pelo *P. vivax*. Em geral os valores do hematócrito, hemoglobina e RBC estão diminuídos nesses indivíduos (FERNANDES *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2012). Em alguns casos, os pacientes são submetidos à transfusão de concentrados de hemácias devido à severidade da anemia (ALEXANDRE *et al.*, 2010). Embora a literatura indique os processos anêmicos na malária, a contagem das células vermelhas (hemácias), os valores do hematócrito e da hemoglobina e os índices hematimétricos apresentaram valores similares entre os grupos estudados, com exceção do MCV, que foi menor no grupo de pacientes infectados com *P. vivax*.

Os valores da contagem global de leucócitos (WBC) foram menores no grupo de pacientes com malária nos resultados apresentados. Dados da literatura descrevem a redução no número de leucócitos em pacientes com malária (McKENZIE *et al.*, 2005; TCHINDA *et al.*, 2012). No entanto, em indivíduos infectados com *P. vivax* com malária grave, foi observado aumento no número de leucócitos (ALEXANDRE *et al.*, 2010). No estudo de

Tangpukdee *et al.*, (2008), foi exposto ainda que o WBC foi menor que o controle em indivíduos com *P. vivax*, com aproximação dos valores normais observados no grupo não infectado, após o tratamento.

A trombocitopenia foi observada nas amostras de pacientes com malária no presente estudo, diminuindo o volume plaquetário médio (PDW) e aumentando a variação no tamanho das plaquetas (MPV). A plaquetopenia é definida como a contagem de plaquetas menor que 150.000 u/ $\mu$ L, sendo comum na patogênese da malária, principalmente na infecção pelo *P. vivax* (KOCHAR *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2012). Pacientes infectado com *P. vivax* em geral apresentam diminuição no número de plaquetas devido à ativação da cascata de coagulação e os fatores envolvidos, além dos processos inflamatórios inerentes a doença (FRANCISCHETTI *et al.*, 2008; LACERDA *et al.*, 2011)

Nossos dados sugerem ainda dano hepático sofrido por esses pacientes, com aumento das enzimas hepáticas AST e ALT. Dados similares foram observados por Onyesom & Onyemakonor (2011) e Elbadawi *et al.*, (2012) que descreveram o aumento das enzimas em pacientes da Nigéria e em mulheres grávidas do Sudão infectados com *P. falciparum*. O relato de aumento das transaminases AST e ALT foram observados em pacientes com *P. vivax*, evidenciando a necrose dos hepatócitos durante a infecção (KOCHAR *et al.*, 2003; LACERDA *et al.*, 2012). Estudos realizados por Alexandre *et al.*, (2010), Andrade *et al.*, (2010) e Mendonça *et al.*, (2013) relataram o aumento de AST e ALT em pacientes internados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, com malária grave de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Hospital São Gabriel em Rondônia, com diagnóstico e sintomatologia da doença.

## **6.2. Análise do perfil de Resposta Celular nos pacientes com Malária**

A resposta imune na patogênese da malária é complexa e ocorre através da interação parasita-hospedeiro. Os mecanismos imunológicos envolvidos no controle da doença são mediados por células da imunidade inata e adaptativa (LANGHORNE *et al.*, 2008). A resposta inata contribui para controlar/erradicar os parasitas por meio da fagocitose e produção de mediadores inflamatórios pelas células dendríticas, natural killer (NK), monócitos, neutrófilos e linfócitos T- $\gamma\delta$  (TARAMELLI *et al.*, 2000; STEVENSON *et al.*, 2004; ENGWERDA & GOOD, 2005). O processo de resposta imune adaptativa ocorre pela ativação de linfócitos T, estimulados pela apresentação de antígenos das DCs e monócitos, com posterior ação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e B, atuando na destruição e opsonização dos parasitas (SKOROKHOD *et al.*, 2004; SCHOFIELD & GRAU, 2005). A regulação das

respostas inflamatórias e homeostase imune na malária são mediadas pelos linfócitos T regulatórios (Treg), prevenindo complicações decorrentes da exacerbação da resposta imunológica (SAKAGUCHI & POWRIE, 2007).

O percentual de monócitos e macrófagos circulantes foi maior no grupo de pacientes com malária em nosso estudo. Urban & Roberts, (2002) e Chua *et al.*, (2012) relataram que os monócitos/macrófagos possuem atividade essencial no controle da doença, produzindo mediadores como o NO e citocinas pirogênicas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de realizarem a fagocitose dos parasitas e ativação dos linfócitos T. Nossos dados foram diferentes dos observados por Chiumma *et al.*, 2009, que descreveram percentual menor de monócitos em pacientes com malária aguda não grave ocasionada pelo *P. falciparum*. No mesmo estudo, foi mostrado ainda o aumento de monócitos inflamatórios (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), indicando uma possível mudança de fenótipo dessas células frente à infecção. Estudos *in vitro* tem demonstrado que a fagocitose do pigmento hemozoína pelos macrófagos diminui a produção de mediadores associados à malária grave e anemia grave (AWANDARE *et al.*, 2007).

Funções similares são atribuídas aos neutrófilos, no entanto, sua ação muitas vezes é restrita ao local da infecção/inflamação (URBAN & ROBERTS, 2002; HUY *et al.*, 2006). A diminuição na porcentagem dessas células nas amostras dos pacientes estudados pode ser relacionada à migração das mesmas ao sitio de infecção nos tecidos. Neutrófilos que expressam receptores para o anticorpo IgE anti-*plasmodium* (*Fc $\epsilon$ RI*) podem ainda representar células inflamatórias que acentuam a resposta na malária e o risco de complicações (PORCHERIE *et al.*, 2011).

Semelhante a outros estudos descritos na literatura, pacientes com malária apresentaram maior número de agregados celulares de monócitos/plaquetas em relação ao grupo controle. Karunaweera *et al.*, (2007) observaram aumento nos agregados de pacientes infectados com *P. vivax*, que desenvolveram a sintomatologia da malária em relação ao grupo controle (saudável), indivíduos residentes em áreas de risco (semi-ímmunes) e infectados sem febre. A formação de agregados celulares na infecção por *P. falciparum* foi descrita também por Giribaldi *et al.*, (2011) como um evento relacionado a ação dos anticorpos na citoaderência dos eritrócitos infectados.

A relevância biológica da formação dos agregados celulares ainda permanece especulativa. Karunaweera *et al.*, (2003) sugerem que esse evento ocorra como processo natural de limpeza dos restos celulares de parasitas e eritrócitos pelas células fagocíticas do hospedeiro. Provavelmente esse evento foi observado devido à ampliação do processo de fagocitose pelos monócitos em resposta à alta parasitemia e ruptura de hemácias dos pacientes

(SKOROKHOD *et al.*, 2004) . O aumento no número de agregados celulares pode justificar ainda a trombocitopenia nos indivíduos infectados com *P. vivax* (KARUNAWEEERA *et al.*, 2007).

As células dendríticas (DCs) possuem o papel de ativação/*priming* dos linfócitos T, sendo moduladas pelas proteínas do parasita expressa nas membranas dos eritrócitos e pelas citocinas IL-12 e IL-10 (URBAN *et al.*, 1999; OCAÑA-MORGNER *et al.*, 2003; ING *et al.*, 2006). O receptor TLR-9 mostrou ser a via de ativação das DCs na malária, reconhecendo as moléculas CpG-DNA e o pigmento hemozoína (PICHYANGKUL *et al.*, 2004; PARROCHE *et al.*, 2007).

Nossos resultados revelam que as porcentagens das DCs mieloides (DC<sub>sm</sub>) e plasmocitoides (DC<sub>sp</sub>) foram menores no grupo de pacientes. Resultados similares foram observados em tailandeses com malária aguda, causada por *P. vivax*, que apresentaram número de células menores no sangue periférico em relação aos indivíduos não infectados (JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2008). Em crianças quenianas com infecção grave por *P. falciparum*, foi observado decréscimo no número dessas células, corroborando os nossos resultados (URBAN *et al.*, 2006). Gonçalves *et al.*, (2010), descreveram aumento não significativo das DC<sub>sp</sub> e diminuição das DC<sub>sm</sub> no grupo de pacientes infectados com *P. vivax* de Rondônia, Brasil.

Urban *et al.*, (1999) e Skorokhod *et al.*, (2004) relataram ainda que os parasitas da malária atuam como agentes imunossupressores na maturação e diferenciação das DCs. Quanto ao baixo número das DCs na periferia, estudos sugerem a migração dessas células para o baço, fígado e linfonodos, além do processo de linfopenia observado tanto na infecção por *P. faciparum* como *P. vivax* (HVIID & KEMP, 2000; KASSA *et al.*, 2006).

Dados da literatura descrevem a importância dos receptores TLR-2 e TLR-9 no reconhecimento de PAMPs, como as ancoras de GPI, pigmento hemozoína e as moléculas CpG-DNA, oriundos do *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* (KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005; PARROCHE *et al.*, 2007; FRANKLIN *et al.*, 2009). Recentemente, o papel do receptor TLR-4 foi descrito no reconhecimento de micropartículas e ancoras de GPI (COBAN *et al.*, 2007). Devido às características desse receptor, foi avaliada a expressão do TLR-4 em monócitos nas amostras de pacientes com malária e no grupo controle, no entanto, não foram observadas diferenças estatísticas significantes. Nosso resultados diferem dos encontrados por Franklin *et al.*, (2009), que descreveram o aumento significativo na expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 em monócitos (CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>).

Células fagocíticas como os monócitos, são essenciais para a eliminação do parasita e de eritrócitos infectados. Essa função é observada principalmente em hospedeiros não-imunes, como mecanismo alternativo às respostas específicas e ação dos anticorpos (SERGHIDES *et al.*, 2003). Estudos com essa molécula demonstraram que na malária, os macrófagos realizam fagocitose das hemácias infectadas via ligação CD36. A maturação e diferenciação das DCs, além do aumento na atividade fagocítica, também é mediada pela molécula CD36. (McGILVRAY *et al.*, 2000; LIU, 2001; NOBES *et al.*, 2002). Schwarzer *et al.*, (1998) descreveram a diminuição da expressão de CD36 e conseqüentemente da fagocitose em células mantidas em culturas *in vitro* estimuladas com o pigmento hemozoína. Monócitos mantidos em cultura com eritrócitos infectados apresentaram decréscimo na atividade fagocítica e expressão de CD36 (SERGHIDES & KAIN, 2000).

Nossos resultados demonstraram a diminuição significativa dos linfócitos totais. Hviid & Kemp (2000) e Kassa *et al.*, (2006) descreveram que na fisiopatologia da malária o processo de linfopenia ocorre, sendo causado pela infecção do *P. falciparum* e *P. vivax*. A homeostasia dos valores celulares foi observada após o tratamento e confirmação do fim da infecção (TANGPUKDEE *et al.*, 2008).

Embora o número de linfócitos totais tenha sido menor, o perfil de ativação celular foi maior nos linfócitos. Resultados similares foram observados por Chen *et al.*, (2003), que mostraram maior ativação dessas células em pacientes com malária e co-infectados com *P. vivax* e HIV.

A eliminação do parasita é dependente da ativação da resposta imune adaptativa via linfócitos T. Estudos em humanos e camundongos têm exemplificado o processo de resposta imunológica das células T na malária (HIRUNPETCHARAT *et al.*, 1999; WEATHERALL *et al.*, 2002).

No processo patogênico da malária, a resposta imune celular inicial é mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de perfil Th1, com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ , com ação das células T CD4<sup>+</sup> de perfil Th2 e o subconjunto de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-6) na eliminação/*clearance* dos parasitas (ARTAVANIS-TSAKONAS & RILEY, 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003; MACKINTOSH *et al.*, 2004; BOUTLIS *et al.*, 2006).

Para Tsuji & Zavala (2003), as células T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel triplo na imunopatogênese da malária, com ativação dos linfócitos B e produção de anticorpos específicos pelos plasmócitos; indução da resposta via células T CD8<sup>+</sup> e ação direta, com produção de citocinas e ativação de fagócitos.

Em nossos resultados foram observados aumento na porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no grupo de pacientes. Resultados similares foram observados por Watanabe *et al.*, (2003), que relataram o aumento de células T CD4<sup>+</sup> nos pacientes com *P. vivax* do Sri Lanka. Gonçalves *et al.*, (2010), mostraram diminuição significativa no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em pacientes com *P. vivax*, oriundos do estado de Rondônia, Brasil. Dados descritos por Srisurapanon *et al.*, (2003) e Chuangchaiya *et al.*, (2010), divergem dos observados em nosso estudo, com diminuição dessas células em pacientes com malária *vivax* da Tailândia. Worku *et al.*, (2001) e Kassas *et al.*, (2006), também notaram diminuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em indivíduos com malária aguda da Etiópia, infectados com *P. vivax*. A depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram relatadas em modelos murinos infectados com *P. berghei* e *P. yoelii* (XU *et al.*, 2002).

A ativação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram similar entre os grupos. Achados semelhantes foram descritos por Pichyangkul *et al.*, (2004), em linfócitos T de pacientes infectados com *P. falciparum*, estimuladas *in vitro* com fragmentos solúveis de esquizontes.

Em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a análise dos dados demonstrou diminuição significativa entre o grupo de pacientes quando comparado aos controles. A ação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na patogênese da malária está restrita a destruição de células hepáticas infectadas na fase pré-eritrocítica, visto que as hemácias não expressam moléculas de MHC de classe I. Schwenk & Richie (2011) relataram migração dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (LTcs) para o fígado, onde iniciam o processo de lise/morte dos hepatócitos infectados através da liberação de perforinas, granzimas e IFN- $\gamma$ .

Estudos em modelos murinos infectados com esporozoítos do *P. berghei* e *P. yoelii* revelaram que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão em menor proporção no sangue periférico, com migração e aumento dessas células no baço, fígado e linfonodos. No entanto, os padrões observados podem ser alterados, caso seja utilizado hemácias infectadas com o parasita, modulando a resposta imune e a migração celular (BAGOT *et al.*, 2004; HAFALLA *et al.*, 2006; CHANDELE *et al.*, 2011).

A razão entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foi maior no grupo de pacientes. Esse aumento na razão era esperado devido ao aumento significativo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e diminuição significativa dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no grupo de pacientes em relação ao grupo não infectado. Dados similares foram observados por Kassas *et al.*, (2006), enquanto que Chuangchaiya *et al.*, (2010) relataram razão menor dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> em tailandeses infectados com *P. vivax*, em relação ao grupo controle. A diminuição da razão

entre as subpopulações de células T foi descrita ainda em pacientes co-infectados com *P. vivax* e o HIV (CHEN *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado a existência de um equilíbrio entre o controle da infecção e a imunopatologia da malária, prevenindo complicações. Esse equilíbrio é mediado pelas células Tregs, que desempenham papel importante na homeostase imune e controle das respostas inflamatórias (SAKAGUCHI & POWRIE, 2007).

Na infecção pelo plasmódio, as células Tregs atuam na supressão da resposta inflamatória, através do contato direto com as células efetoras e na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  (RILEY *et al.*, 2006; BELKAID *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram aumento significativo dos linfócitos Tregs. Esse aumento foi observado com alta parasitemia e com o maior número de reinfecções.

Bueno *et al.*, (2010) observaram resultados similares aos encontrados em nosso estudo, com aumento significativo de células Treg em pacientes infectados com *P. vivax* oriundos da cidade de Manaus, Brasil. Nesse estudo, foi descrito ainda o aumento de células Treg produtoras tanto de IL-10 quanto de TGF- $\beta$ , em células mantidas em cultura com a proteína Pv-AMA-1. Aumento significativo dos linfócitos Treg foi observado ainda em indivíduos com malária aguda, por *P. vivax*, residentes na Tailândia e China (JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2008; JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2012). Gonçalves *et al.*, (2010), relataram aumento não significativo dessas células na malária *vivax* de amostras de Rondônia, Brasil. Enquanto Wammes *et al.*, (2003), descreveram diminuição na proporção dos linfócitos Treg em crianças com malária da Indonésia.

Nossos resultados mostraram valores similares de linfócitos B e B1 entre os grupos estudados. Dados similares foram observados em pacientes chineses com malária *vivax* (JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2012). Aumento não significativo dos linfócitos B foi descrito em indivíduos tailandeses infectados com *P. vivax* e em crianças quenianas com malária *falciparum* não grave (SRISURAPANON *et al.*, 2003; KORIR *et al.*, 2012)

Asito *et al.*, (2008), relataram diminuição não significativa de linfócitos B em crianças infectadas com o *P. falciparum*, embora o grupo tenha relatado aumento em pacientes em tratamento. Em pacientes da Etiópia com malária *vivax*, foi observado redução no número dessas células (KASSAS *et al.*, 2006)

Os linfócitos B são essenciais para produção de anticorpos anti-*Plasmodium*. Estudos têm relatado aumento de anticorpos totais e linfócitos B em grande número de indivíduos moradores de áreas endêmicas. Em geral, esses anticorpos são específicos para antígenos do merozoíto (WHITTLE *et al.*, 1990; DORFMAN *et al.*, 2005)

As células *Natural Killer* (NK) são importantes na imunidade inata, devido a capacidade de lisar células infectadas (CARAYANNOPOULOS & YOKOYAMA, 2004). A ativação dessas células influencia na migração para o local da infecção e liberação de citocinas e grânulos contendo perforinas e granzimas no espaço intracelular (RUSSELL & LEY, 2002).

O percentual das células NK e NKT foram menores no grupo de pacientes com malária. Resultados similares foram observados por Jangpatarapongsa *et al.*, (2012), em pacientes chineses e por Worku *et al.*, (1997), em indivíduos da Etiópia, ambos os grupos com malária *vivax*. Estudo com indivíduos infectados com *P. vivax* residentes na Coreia do Sul, relataram diminuição significativa de células NK e aumento de células NKT (LEE *et al.*, 2001). Watanabe *et al.*, (2003) e Ribeiro-Dias & Tosta (2006) descreveram aumento das células NK em pacientes com malária *vivax* do Sri Lanka e de áreas endêmicas da região Amazônica, enquanto Kassa *et al.*, (2006) descreveram a diminuição dessas células em indivíduos da Etiópia.

A molécula de adesão VLA-4 é uma glicoproteína com múltiplas funções. Sua principal atuação foi associada com a ativação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> através da interação com a fibronectina (NOJIMA *et al.*, 1990). No entanto, observamos a diminuição significativa na expressão dessa molécula nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e resultados similares de ativação dessas células. Alon *et al.*, (1995), descreveram que a adesão VLA-4/VCAM-1 proporcionam mecanismo de aderência linfócito-endotélio, no *homing* dessas células da periferia para o local da infecção no tecido. VLA-4-like do *Plasmodium* podem ser expressos por eritrócitos induzidos pela maturação intracelular do parasita (HO & WHITE, 1999; SULTAN, 1999).

Em relação a molécula LFA-1 os resultados foram similares entre os grupos estudados. No entanto outros autores sugerem que esta molécula desempenha papel central na indução da resposta imunológica na malária (HO & WHITE, 1999).

### **6.3. Análise da Concentração das Citocinas Séricas nos pacientes com Malária**

As citocinas em geral, possuem papel central na resposta imune da malária, apresentando efeitos locais e sistêmicos (BEVILACQUA *et al.*, 1994; DOWNEY, 1994; SPRINGER, 1994). O equilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias determina o perfil de resposta imune, além de influenciar na gravidade da doença (GIRIBALDI *et al.*, 2010).

As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12p70 e TNF- $\alpha$  apresentaram concentrações menores no grupo de pacientes em relação aos controles. Dados divergentes foram observados por Zeyrek

*et al.*, (2006) e Mendonça *et al.*, (2013), que relataram o aumento significativo dessas citocinas em pacientes com malária *vivax* da Turquia e do Brasil. Lyke *et al.*, (2004) descreveram aumento das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12p70 e TNF- $\alpha$  em crianças africanas com malária *falciparum*. Altas concentrações de IL-12 e TNF- $\alpha$  foram descritas ainda por Fernandes *et al.*, (2008) e Gonçalves *et al.*, 2012, em estudos realizados na região Amazônica brasileira com pacientes infectados com *P. vivax*. Em amostras de indivíduos com malária *vivax* de Rondônia, foram relatados aumento de TNF- $\alpha$ , no entanto a diferença não foi significativa em comparação com os controles (ANDRADE *et al.*, 2010). Resultado similar ao observado em nosso estudo foi descrito por Medina *et al.*, (2011), que relataram diminuição de IL-12 em pacientes infectados com *P. vivax* atendidos no Instituto Evandro Chagas. Alguns autores relatam que altas concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são observadas durante a ruptura dos esquizontes, induzindo os processos febris e a gravidade da doença (KARUNAWEEERA *et al.*, 1998). A citocina IL-12 esta envolvida na imunidade protetora e resposta celular, ativando o perfil Th1, embora altas concentrações podem ser associadas a gravidade da doença (LYKE *et al.*, 2004).

No presente estudo aumento significativo nas concentrações de IL-8 e IFN- $\gamma$  foram observados nos indivíduos infectados em relação aos não infectados. Corroborando os nossos resultados, dados similares em relação ao IFN- $\gamma$  foram descritos em estudos na região Amazônica com pacientes infectados por *P. vivax* (FERNANDES *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012). Lyke *et al.*, (2004) e Zeyrek *et al.*, (2006) descreveram aumento de IL-8 em crianças infectadas com *P. falciparum* e pacientes com malária *vivax*. Aumento significativo das duas citocinas foram observados por Mendonça *et al.*, (2013), corroborando os nossos resultados.

Um papel importante da IL-8 é de estimular a migração dos neutrófilos, intensificando a resposta imune nas doenças infecciosas e podendo determinar a gravidade na patogênese da malária por *P. vivax* (BURGMANN *et al.*, 1995). Em relação ao IFN- $\gamma$ , sabe-se que essa citocina está relacionada com a resistência imune do hospedeiro ao *Plasmodium*, manutenção do perfil de resposta celular Th1, eliminação do parasita e imunopatologia da doença, como o aparecimento de complicações da malária (GAZZINELLI *et al.*, 1993; WROCZYŃSKA *et al.*, 2005; D'OMBRAIN *et al.*, 2008).

Assim como para as citocinas citadas acima, também IL-5, IL-6 e IL-10 foram observados aumento significativo no grupo de pacientes com malária *vivax*. Dados similares em relação a citocina IL-5 foram descritos por Prakash *et al.*, (2006) e Nmorsi *et al.*, (2010), em pacientes infectados com *P. falciparum* da Nigéria e Índia, enquanto valores

significativamente aumentados de IL-6 e IL-10 foram encontrados por Zeyrek *et al.*, (2006), Gonçalves *et al.*, (2012) e Mendonça *et al.*, (2013). Altas concentrações de IL-10 foram relatadas ainda em pacientes com malária *vivax* das cidades de Belém-PA e Burutis-RO (FERNANDES *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; MEDINA *et al.*, 2011). Lyke *et al.*, (2004) descreveram aumento significativo dessas citocinas na infecção por *P. falciparum*.

A gravidade da doença tem sido relacionada com as citocinas IL-5 e IL-6. Concentrações elevadas de IL-6 tem sido relatadas durante a ruptura dos esquizontes e nos episódios de febre elevada, devido a função de pirógeno endógeno (KARUNAWEEERA *et al.*, 1998; Seoh *et al.*, 2003). Baixas concentrações desta citocina tem sido observadas em pacientes com alta parasitemia (LYKE *et al.*, 2004). Vale ressaltar que, poucos estudos tem associado a infecção por *P. vivax* à IL-5, limitando a discussão sobre a real função dessa citocina.

A IL-10 desempenha função regulatória na resposta imune. Os principais alvos dessa citocina vão desde a inibição de mediadores inflamatórios até a produção de respostas Th1, Th2 e a ativação de monócitos (SIEWE *et al.*, 2006; SABAT *et al.*, 2010). Zieryk *et al.*, (2006), relataram aumento na parasitemia em relação a elevação significativa de IL-10. No entanto, baixos níveis de IL-10 tem sido associado a quadros de anemia grave (OWUSGU-AGYEI *et al.*, 2002).

Para a IL-4 não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados. Alguns autores divergem dos nossos achados, e ao contrário do observado neste estudo relatam aumento significativo em pacientes com malária, como em dados da Turquia e dos estados brasileiros do Acre e Amazonas (ZEYREK *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2012). Mendonça *et al.*, (2013), observaram modesto aumento dessa citocina em pacientes com *P. vivax*, enquanto que Medina *et al.*, (2011), descreveram diminuição na concentração dessa citocina.

Bueno *et al.*, (2012), descreveram aumento da produção de IL-17 por células mononucleares de pacientes infectados com *P. vivax*. No entanto, neste estudo não foi observado aumento significativo de IL-17A nos pacientes estudados. A IL-17 possui múltiplos efeitos, atuando tanto na indução de citocinas pró-inflamatórias quanto no recrutamento e ativação de leucócitos. Apesar de não haver dados que esclareçam o papel desta na malária, outros estudos, como por exemplo na leishmaniose cutânea humana revelaram um importante papel desta citocina na patogênese da doença (BACELLAR *et al.*, 2009). No entanto, seu papel na resposta imune à doenças parasitárias ainda permanece pouco compreendido (BUENO *et al.*, 2012)

#### **6.4. Análise da Frequência dos Polimorfismos *Asp299Gly* e *Thr399Ile* do TLR-4 e associação com a resposta imune**

Em nossos resultados foram observados que a frequência do polimorfismo *Asp299Gly* em heterozigose (A/G) foi de 10% no grupo de pacientes e de 2% no grupo controle. Estudos com crianças africanas com malária grave, assintomática e sem infecção descreveram frequências de 24,1%, 22,8% e 17,6%, respectivamente (MOCKENHAUPT *et al.*, 2006a). Os valores percentuais foram maiores que os descritos em nossos resultados, no entanto, não foi observado associação entre o polimorfismo e a malária grave.

Estudo similar de Mockenhaupt *et al.*, (2006b) apresentou frequências maiores que em nosso dados em mulheres grávidas, com 17,3% em pacientes com malária e de 21,8% em amostras controles. Esposito *et al.*, (2012) descreveram frequência de 11,9% nos pacientes pediátricos de Burundi e de 10,7% em controles sem infecção. Estes autores não encontraram associação entre o polimorfismo e malária grave, pois um baixo percentual dos pacientes com malária grave apresentaram o polimorfismo em heterozigose.

No estudo de Grene *et al.*, (2009), foi observado frequência do polimorfismo variando entre 0% - 13,1% em populações do Quênia, Papua Nova Guiné e América do Norte, localizadas em áreas endêmicas de malária. Em amostras de pacientes iranianos com malária, foi encontrado frequência de 12,1%, enquanto que em populações indianas foram descritas frequências de 11% e 13% do polimorfismo (ZAKERI *et al.*, 2011; SAWIAN *et al.*, 2012)

Em relação ao polimorfismo *Thr399Ile* (C/T), foi observado frequência de 5% nos pacientes com malária e 3% no grupo controle. Mockenhaupt *et al.*, (2006a) e Mockenhaupt *et al.*, (2006b) descreveram frequências maiores, variando de 6,2%, 4,1% e 1,6% dessa mutação em crianças e mulheres grávidas com malária. No primeiro estudo, foi constatado associação entre o polimorfismo e a malária grave.

Grene *et al.*, (2009), relataram frequência do polimorfismo variando entre 0,7% - 9,5% em populações africanas e norte americanas residentes em áreas endêmicas de malária. Zakeri *et al.*, (2011), descreveram frequência de 7,7% em indivíduos iranianos com malária, enquanto que variação de 6% - 28,5% foi observada em indivíduos indianos (BALI *et al.*, 2013)

O receptor TLR-4 é responsável pelo reconhecimento de PAMPs de bactérias e parasitas, induzindo a expressão de vários genes diretamente envolvidos na produção de citocinas inflamatórias em resposta a infecções (BOWIE & O'NEILL, 2000; TAKEDA & AKIRA, 2005).

A presença de polimorfismos no gene do receptor TLR-4 podem gerar uma diminuição na resposta imune do indivíduo portador e conseqüentemente uma quebra na cadeia de defesa do organismo, visto que a primeira barreira de defesa do sistema imune é efetuada pelos receptores e células da imunidade inata (SCRÖDER & SCHUMANN, 2005).

Agnesse *et al.*, (2002), notaram diminuição da resposta do TLR-4 ao LPS de bactérias gram-negativas, corroborando com os resultados obtidos por Poltorak *et al.*, (1998) que descreveram resultados semelhantes em modelo murino.

Na malária, Basu *et al.*, (2010), descreveram aumento da parasitemia associado aos polimorfismos *Asp299Gly* e *Thr399Ile* do receptor TLR-4 em pacientes infectados com *P. falciparum* da cidade Calcutá na Índia.

---

*Conclusão*

## CONCLUSÃO

A patogênese relacionada à infecção pelo *P. vivax* tem sido muito estudada nos últimos anos, no entanto, o papel de cada componente na resposta imune ao parasita ainda permanece pouco compreendido. Frente aos resultados do presente estudo, podemos concluir que:

- Apesar do número de pacientes com alta parasitemia e com plaquetopenia, não foram observados quadros graves da doença;
- As altas concentrações de AST e ALT sugerem possível dano hepático;
- O aumento no número de células fagocíticas indica eliminação do parasita pelo hospedeiro, apesar dos valores baixos das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ;
- O número elevado de agregados celulares monócitos/plaquetas pode estar relacionado à plaquetopenia nos pacientes;
- Altas concentrações de IFN- $\gamma$  e aumento no número linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sugerem perfil de resposta Th1 nos pacientes com malária *vivax*;
- A diminuição no número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico sugere migração para o tecido, sendo relacionada ao aumento das concentrações de IL-8;
- Os resultados sugerem haver regulação da resposta imune devido ao aumento de IL-10 e de linfócitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), corroborando o fato de não haver complicações da doença;
- Os linfócitos B apresentaram aumento gradativo, relacionado ao número de infecções, indicando modulação da resposta imune e memória celular;
- A frequência dos polimorfismos foi menor que a descrita em outros estudos e não houve relação dos polimorfismos com a malária *vivax*;
- Não foi observado relação entre os polimorfismos e a resposta imune, apesar de haver diminuição não significativa na produção de algumas citocinas.

---

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

- Adachi, K; Tsutsui, H; Kashiwamura, S; Seki, E; Nakano, H; Takeuchi, O; Takeda, K; Okumura, K; Van Kaer, L; Okamura, H; Akira, S; Nakanishi, K. **Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism.** *J Immunol* 167(10): 5928-5934, 2001
- Agnese, DM; Calvano, JE; Hahm, SJ; Coyle, SM; Corbett, SA; Calvano, SE; Lowry, SF. **Human toll-like receptor 4 Mutation but not CD14 Polymorphisms are associated with an increase Risk of Gram-negative infections.** *J Infect Dis.* 186(10): 1522-1525. 2002
- Akira, S; Uematsu, S; Takeuchi, O. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell* 124(4): 783-801, 2006
- Alexandre, MA; Ferreira, CO; Siqueira, AM; Magalhães, BL; Mourão, MP; Lacerda, MVG; Alecrim, MGC. **Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon.** *Emerg Infect Dis.* 16(10): 1611-1614, 2010
- Almeida, IC. & Gazzinelli, RT. **Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses.** *J Leukoc Biol.* 70(4): 467-477, 2001
- Alon, R; Kassner, PD; Carr, MW; Finger, EB; Hemler, ME; Springer, TA. **The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1.** *J Cell Biol.* 128(6): 1243-1253, 1995
- Amodu, OK; Adeyemo, AA; Olumese, PE; Gbadegesin, RA. **Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92(1): 54-56, 1998
- Andrade, BB; Reis-Filho, A; Souza-Neto, SM; Clarêncio, J; Camargo, LMA; Barral, A; Barral-Netto, M. **Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance.** *Malar J.* 9(13): 1-8, 2010
- Anstey, NM; Handojo, T; Pain, MCF; Kenangalem, E; Tjitra, E; Price, RN; Maguire, GP. **Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation.** *J. Infect. Dis.* 195(4): 589-596, 2007
- Anstey, NM; Russell, B; Yeo, TW; Pricel, RC. **The pathophysiology of vivax malaria.** *Trends Parasitol.* 25(5): 220-227, 2009

- Apte, SH; Groves, PL; Roddick, JS; Hora, VP; Doolan, DL. **High-throughput multi-parameter flow-cytometric analysis from micro-quantities of plasmodium-infected blood.** *Int J Parasitol.* 41(12): 1285-1294, 2011
- Arbour, NC; Lorenz, E; Schutte, BC; Zabner, J; Kline, JN; Jones, M; Frees, K; Watt, JL; Schwartz, DA. **TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans.** *Nat Genet.* 25(2): 187-191, 2000
- Artavanis-Tsakonas, K & Riley, EM. **Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *J Immunol.* 169(6): 2956-2963, 2002
- Artavanis-Tsakonas, K; Tongren, JE; Riley, EM. **The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology.** *Clin Exp Immunol.* 133(2): 145-152, 2003
- Asea, A; Rehli, M; Kabingu, E; Boch, JA; Bare, O; Auron, PE; Stevenson, MA; Calderwood, SK. **Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular Hsp70: Role Of Toll-Like Receptor (TLR2) TLR4.** *J Biol Chem.* 277(17): 15028-15034, 2002
- Asito, AS; Moormann, AM; Kiprotich, C; Ng'ang'a, ZW; Ploutz-Snyder, R; Rochford, R. **Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children.** *Malar J.* 7(238): 1-8, 2008
- Awandare, GA; Ouma, Y; Ouma, C; Were, T; Otieno, R; Keller, CC; Davenport, GC; Hittner, JB; Vulule, J; Ferrell, R; Ong'echa, JM; Perkins, DJ. **Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia.** *Infect Immun.* 75(1): 201-210, 2007
- Bacellar, O; Faria, D; Nascimento, M; Cardoso, TM; Gollob, KJ; Dutra, WO; Scott, P; Carvalho, EM. **Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis.** *J Infect Dis.* 200(1): 75-78, 2009
- Bagot, S; Nogueira, F; Collette, A; Rosario, V; Lemonier, F; Cazenave, PA; Pied, S. **Comparative study of brain CD8+ T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage Plasmodium berghei ANKA involved in the development of cerebral malaria.** *Infect Immun.* 72(5): 2817-2826, 2004
- Bali, P; Pradhan, S; Sharma, D; Adak, T. **Toll like receptor 2 and 4 polymorphisms in malaria endemic populations of India.** *Hum Immunol.* 74(2): 223-229, 2013

- Bali, P; Pradhan, S; Sharma, D; Adak, T. **Toll like receptor 2 and 4 polymorphisms in malaria endemic populations of India.** *Hum Immunol.* 74(2): 223-229, 2013
- Barber, RC; Aragaki, CC; Rivera-Chaves, FA; Purdue, GF; Hunt, JL; Horton, JW. **TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury.** *J Med Genet.* 41(11): 808-813, 2004
- Barkan, D; Ginsburg, H; Golenser, J. **Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in plasmodium-infected mice.** *Int. J. Parasitol.* 30(5): 649-653, 2000
- Barry, AE. **Malaria epidemiology: Insights from the genome of the malaria parasite.** *Journal of Molecular and Genetic Medicine,* 1(2): 76-86, 2005
- Basu, M; Maji, AK; Chakraborty, A; Banerjee, R; Mullick, S; Saha, P; Das, S; Kanjilal, SD; Sengupta, S. **Genetic association of Toll-like-receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with Plasmodium falciparum blood infection levels.** *Infect Genet Evol.* 10(5):686-896, 2010
- Belkaid, Y. **Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity.** *Nat Rev Immunol.* 7(11): 875-888, 2007
- Berczky, S; Montgomery, SM; Troye-Blomberg, M; Rooth, I; Shaw, MA; Färnert, A. **Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria.** *Int J Parasitol.* 34(8): 935-942, 2004
- Bevilacqua, MP; Nelson, RM; Mannori, G; Cecconi, O. **Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease.** *Annu Rev Med.* 45: 361-378, 1994
- Blatteis, CM. **The onset of fever: new insights into its mechanism.** *Prog Brain Res.* 162: 3-14, 2007
- Boutlis, CS; Yeo, TW; Anstey, NM. **Malaria tolerance - for whom the cell tolls?** *Trends Parasitol* 22(8): 371-377, 2006
- Bowie, A; O'Neill, LA. **The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products.** *J Leukoc Biol.* 67(4): 508-514, 2000
- Bozza, MT; Martins, YC; Carneiro, LAM; Paiva, CN. **Macrophage Migration Inhibitory Factor in Protozoan Infections.** *J Parasitol Res.* Review: 1-14, 2012
- Braga-Miranda, WS; Souza-Botelho, RA; Silva, EB; Fonseca-Ferraz, JC; Tosta, CE. **Co-infecção humana pelo plasmódio e o vírus da hepatite B: aspectos**

**clínicos, sorológicos e imunológicos.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39(1): 27-31, 2006

- Brasil, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo 2010.** [Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?uf=13&dados=1>, acessado em: 15/12/2012]. 2010
- Brasil, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Dados Demográficos de Coari.** [Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=130120>, acessado em 15/12/2012]. 2012
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Ações de controle da Malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica.** Editora do Ministério da Saúde; 52p, Brasília, 2006
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.** Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/10001021559.pdf>>. Acessado em: 10 de Setembro de 2012. 6 ed. rev. 320p, Brasília, 2005
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Malária in SUS de A a Z: Garantindo Saúde nos Municípios.** Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/sus\\_3edicao\\_completo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/sus_3edicao_completo.pdf)>. Acessado em 10 de Setembro de 2012. 2009
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM.** Ministério da Saúde, Brasília, 2003
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia.** Ministério da Saúde, Brasília, 2011a
- Brasil, Ministério da Saúde, Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório de Situação: Amazonas.** 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011b
- Brasil, Ministério da Saúde, Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. **SIVEP-Malária.** Disponível em: <[http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/default.asp](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp)>. Acessado em 15 de Outubro de 2012, 2012

- Bueno, LL; Morais, CG; Araújo, FF; Gomes, JA; Corrêa-Oliveira, R; Soares, IS; Lacerda, MV; Fujiwara, RT; Braga, EM. **Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites.** *PLoS One* 5(3): 1-10, 2010
- Bueno, LL; Morais, CG; Lacerda, MV; Fujiwara, RT; Braga, EM. **Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural Plasmodium vivax infection.** *Acta Trop.* 123(1): 53-57, 2012
- Burgmann, H; Hollenstein, U; Wenisch, C; Thalhammer, F; Looareesuwan, S; Graninger, W. **Serum concentrations of MIP-1 alpha and interleukin-8 in patients suffering from acute Plasmodium falciparum malaria.** *Clin Immunol Immunopathol.* 76(1 Pt 1): 32-36, 1995
- Campos, MA; Almeida, IC; Takeuchi, O; Akira, S; Valente, EP; Procópio, DO; Travassos, LR; Smith, JA; Golenbock, DT; Gazzinelli, RT. **Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite.** *J Immunol* 167(1): 416-423, 2001
- Carayannopoulos, LN & Yokoyama, WM. **Recognition of infected cells by natural killer cells.** *Curr Opin Immunol.* 16(1): 26-33, 2004
- Carlson, J; Nash, GB; Gabutti, V; al-Yaman, F; Wahlgren, M. **Natural protection against severe Plasmodium falciparum malaria due to impaired rosette formation.** *Blood* 84(11): 3909-3914, 1994
- Carter, R & Mendis, KN. **Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria.** *Clin. Microbiol. Rev.* 15(4): 564-594, 2002
- Chandele, A; Mukerjee, P; Das, G; Ahmed, R; Chauhan, VS. **Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with Plasmodium yoelii.** *Immunology.* 132(2): 273-286, 2011
- Chen, X; Xiado, B; Shin, W; Xu, H; Gao, K; Rao, J; Zhang, Z. **Impact of acute vivax malaria on the immune system and viral load of HIV-positive subjects.** *Chinese Medical Journal* 116(12): 1810-1820, 2003
- Chimma, P; Roussilhon, C; Sratongno, P; Ruangveerayuth, R; Pattanapanyasat, K; Pérignon, JL; Roberts, DJ; Druilhe, P. **A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.** *PLoS Pathog.* 5(10): 1-10, 2009

- Chua, CL; Brown, G; Hamilton, JA; Rogerson, S; Boeuf, P. **Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?** *Trends Parasitol.* 29(1): 26-34, 2013
- Chuangchaiya, S; Jangpatarapongsa, K; Chootong, P; Sirichaisinthop, J; Sattabongkot, J; Pattanapanyasat, K; Chotivanich, K; Troye-Blomberg, M; Cui, L; Udomsangpetch, R. **Immune response to Plasmodium vivax has a potential to reduce malaria severity.** *Clin Exp Immunol.* 160(2): 233-239, 2010
- Clark, IA & Cowden, WB. **Why is the pathology of falciparum worse than that of vivax malaria?** *Parasitol Today* 15(11): 458-461, (1999)
- Clark, IA; Alleva, LM; Mills, AC; Cowden, WB. **Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions.** *Clin Microbiol Rev.* 17(3): 509-539, 2004
- Coban, C; Ishii, KJ; Kawai, T; Hemmi, H; Sato, S; Uematsu, S; Yamamoto, M; Takeuchi, O; Itagaki, S; Kumar, N; Horii, T; Akira, S. **Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin.** *J Exp Med.* 201(1): 19-25, 2005
- Coban, C; Ishii, KJ; Uematsu, S; Arisue, N; Sato, S; Yamamoto, M; Kawai, T; Takeuchi, O; Hisaeda, H; Horii, T; Akira, S. **Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria.** *Int Immunol* 19(1): 67-79, 2007
- Coelho-Castelo, AAM; Trombone, APF; Rocha, CD; Lorenzi, JCC. **Resposta imune a Doenças Infeciosas.** *Medicina* 42(2): 127-142, 2009
- Collins, WE & Jeffery, GM. **Plasmodium ovale: parasite and disease.** *Clin Microbiol Rev.* 18(3): 570-581, 2005
- Corbett, Y; Herrera, L; Gonzalez, J; Cubilla, L; Capson, TL; Coley, PD; Kursar, TA; Romero, LI; Ortega-Barria, E. **A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70(2): 119-124, 2004
- Costa, AP; Bressan, CS; Pedro, RS; Valls-de-Souza, R; Silva, S; Souza, PR; Guaraldo, L; Ferreira-da-Cruz, MF; Daniel-Ribeiro, CT; Brasil, P. **Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43(5): 571-574, 2010
- Costa, MRF; Vieira, PPR; Ferreira, CO; Lacerda, MVG; Alecrim, WD; Alecrim, MGC. **Diagnóstico Molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41(4): 381-385, 2008

- Couper, KN; Barnes, T; Hafalla, JCR; Combes, V; Ryffel, B; Secher, T; Grau, GE; Riley, EM; Souza, JB. **Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation.** *PLoS Pathog.* 6(1): 1-13, 2011
- Cowman, AF; Berry, D; Baum, J. **The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell.** *J Cell Biol.* 198(6): 961-971, 2012
- Cox-Singh, J; Davis, TME; Lee, KS; Shamsul, SSG; Matusop, A; Ratnam, S; Rahman, HA; Conway, DJ; Singh, B. **Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** *Clin Infect Dis.* 46(2): 165-171, 2008
- Crawley, J; Chu, C; Mtove, G; Nosten, F. **Malaria in children.** *Lancet* 375(9724): 1468-1481, 2010
- Dasari, P; Heber, SD; Beisele, M; Torzewski, M; Reifenberg, K; Orning, C; Fries, A; Zapf, AL; Baumeister, S; Lingelbach, K; Udomsangpetch, R; Bhakdi, SC; Reiss, K; Bhakdi, S. **Digestive vacuole of Plasmodium falciparum released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation.** *Blood* 119(18): 4301-4310, 2012
- Deans, AM & Rowe, JA. **Plasmodium falciparum: Rosettes do not protect merozoites from invasion-inhibitory antibodies.** *Exp Parasitol.* 112(4): 269-273, 2006
- Di Santi, SM; Kirchgatter, K; Brunialti, KCS; Oliveira, AM; Ferreira, SRS; Boulos, M. **PCR – Based diagnosis to Evaluate the performance of malaria reference centers.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 46(4): 183-187, 2004
- D'Ombra, MC; Robinson, LJ; Stanisic, DI; Taraika, J; Bernard, N; Michon, P; Mueller, I; Schofield, L. **Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children.** *Clin Infect Dis.* 47(11):1380-1387, 2008
- Doolan, DL & Hoffman, SL. **IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the Plasmodium yoelii model.** *J. Immunol.* 163(2): 884-892, 1999
- Doolan, DL; Dobaño, C; Baird, JK. **Acquired immunity to malaria.** *Clin Microbiol Rev.* 22(1): 13-36, 2009
- Dorfman, JR; Bejon, P; Ndungu, FM; Langhorne, J; Kortok, MM; Lowe, BS; Mwangi, TW; Williams, TN; Marsh, K. **B cell memory to 3 Plasmodium**

- falciparum* blood-stage antigens in a malaria-endemic area. *J Infect Dis.* 191(10): 1623-1630, 2005
- Downey, GP. **Mechanism of leukocyte motility and chemotaxis.** *Curr Opin Immunol* 6(1): 113-124, 1994
  - Elbadawil, NEE; Mohamed, MI; Elzaki, H; Ounsa, MAAGE; Mohamed, EY; Ibrahim, EK. **The Effect of Malaria on Biochemical Liver Function Parameters in Sudanese Pregnant Women.** *J Physiobiochem Metab.* 2(2): 1-4, 2012
  - Engwerda, CR & Good, MF. **Interactions between malaria parasites and the host immune system.** *Curr Opin Immunol.* 17(4): 381-387, 2005
  - Erridge, C; Stewart, J; Poxton, IR. **Monocytes Heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile Mutations in the Toll-like Receptor 4 Gene Show No Deficit in Lipopolysaccharide Signalling.** *J. Exp. Med.* 197(12): 1787-1791, 2003
  - Esposito, S; Molteni, CG; Zampiero, A; Baggi, E; Lavizzari, A; Semino, M; Daleno, C; Groppo, M; Scala, A; Terranova, L; Miozzo, M; Pelucchi, C; Principi, N. **Role of polymorphisms of toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) and FCGR2A genes in malaria susceptibility and severity in Burundian children.** *Malar J* 11(196): 1-8, 2012
  - Favorite, GO & Herbert R. Morgan, HR. **Effects produced by the intravenous injection in man of a toxic antigenic material derived from *Eberthella typhosa*: Clinical, hematological, chemical and serological studies.** *J Clin Invest* 21(5): 589-599, 1942
  - Fell, AH & Smith, NC. **Immunity to asexual blood stages of Plasmodium: is resistance to acute malaria adaptive or innate?** *Parasitol Today.* 14(9): 364-369, 1998
  - Fernandes, AA; Carvalho, LJ; Zanini, GM; Ventura, AM; Souza, JM; Cotias, PM; Silva-Filho, IL; Daniel-Ribeiro, CT. **Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region.** *Clin Vaccine Immunol.* 15(4): 650-658, 2008
  - Figueiredo-Filho, AF; Figueiredo, MC; Nascimento, JM; Calvosa, VSP; Póvoa, MM; Machado-Dantas, RL. **Performance of an immunochromatography test for vivax malaria in the Amazon region, Brazil.** *Rev Saúde Pública* 37(3): 390-392, 2003

- Francischetti, IM; Seydel, KB; Monteiro, RQ. **Blood coagulation, inflammation, and malaria.** *Microcirculation*. 15(2): 81-107, 2008
- Franklin, BS; Rodrigues, SO; Antonelli, LR; Oliveira, RV; Goncalves, AM; Sales-Junior, PA; Valente, EP; Alvarez-Leite, JI; Ropert, C; Golenbock, DT; Gazzinelli, RT. **MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria.** *Microbes Infect* 9(7): 881890, 2007
- Franklin, BS; Parroche, P; Ataíde, MA; Lauw, F; Ropert, C; Oliveira, RB; Pereira, D; Tada, MS; Nogueira, P; Silva, LH; Bjorkbacka, H; Golenbock, DT; Gazzinelli, RT. **Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(14): 5789-5794, 2009
- Franklin, BS; Vitorino, BL; Coelho, HC; Menezes-Neto, A; Santos, ML; Campos, FM; Brito, CF; Fontes, CJ; Lacerda, MVG; Carvalho, LH. **Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of *Plasmodium vivax* malaria.** *PLoS One*. 6(5): 1-9, 2011
- Gao, B. & Tsan, MF. **Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor a release by murine macrophages.** *J. Biol. Chem.* 278(1): 174-179, 2003
- Gatton, ML & Cheng, Q. **Evaluation of the pyrogenic threshold for *Plasmodium falciparum* malaria in naive individuals.** *Am J Trop Med Hyg* 66(5): 467-473, 2002
- Gazzinelli, RT; Hieny, S; Wynn, TA; Wolf, S; Sher, A. **Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(13): 6115-6119, 1993
- Gazzinelli, RT; Ropert, C; Campos, MA. **Role of the *Toll/interleukin-1* receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites.** *Immunol Rev*. 201(1): 9-25, 2004
- Gazzinelli, RT & Denkers, EY. **Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism.** *Nat Rev Immunol*. 6(12): 895-906, 2006

- Giribaldi, G; Prato, M; Ulliers, D; Gallo, V; Schwarzer, E; Akide-Ndunge, OB; Valente, E; Saviozzi, S; Calogero, RA; Arese, P. **Involvement of inflammatory chemokines in survival of human monocytes fed with malarial pigment.** *Infect Immun.* 78(11): 4912-4921, 2010
- Giribaldi, G; Valente, E; Khadjavi, A; Polimeni, M; Prato, M. **Macrophage inflammatory protein-1alpha mediates matrix metalloproteinase-9 enhancement in human adherent monocytes fed with malarial pigment.** *Asian Pac J Trop Med.* 4(12): 925-930, 2011
- Gonçalves, RM; Salmazi, KC; Santos, BAN; Bastos, MS; Rocha, SC; Boscardin, SB; Silber, AM; Kallás, EG; Ferreira, MU; Scopel, KKG. **CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells, Dendritic Cells, and Circulating Cytokines in Uncomplicated Malaria: Do Different Parasite Species Elicit Similar Host Responses?** *Infect Immun.* 78(11): 4763-4772, 2010
- Gonçalves, RM; Scopel, KK; Bastos, MS; Ferreira, MU. **Cytokine balance in human malaria: does Plasmodium vivax elicit more inflammatory responses than Plasmodium falciparum?** *PLoS One.* 7(9): 1-10, 2012
- Good, MF; Xu, H; Wykes, M; Engwerda, CR. **Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research.** *Annu Rev Immunol.* 23:69-99, 2005
- Good, MF. & Doolan, DL. Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity* 33(4): 555-566, 2010
- Gowda, DC. **TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs.** *Trends Parasitol.* 23(12): 596-604, 2007
- Greene, JA; Moormann, AM; Vulule, J; Bockarie, MJ; Zimmerman, PA; Kazura, JW. **Toll-like receptor polymorphisms in malaria-endemic populations.** *Malar J.* 8(50): 1-10, 2009
- Greenwood, BM; Fidock, DA; Kyle, DE; Kappe, SHI; Alonso, PL; Collins, FH; Duffy, PE. **Malaria: progress, perils, and prospects for eradication.** *J. Clin. Invest.* 118(4): 1266-1276, 2008
- Grimberg, BT. **Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites.** *J Immunol Methods.* 367(1-2): 1-16, 2011
- Hafalla, JC; Cockburn, IA; Zavala, F. **Protective and pathogenic roles of CD8<sup>+</sup> T cells during malaria infection.** *Parasite Immunol.* 28(1-2): 15-24, 2006

- Handayani, S; Chiu, DT; Tjitra, E; Kuo, JS; Lampah, D; Kenangalem, E; Renia, L; Snounou, G; Price, RN; Anstey, NM; Russell, B. **High deformability of Plasmodium vivax-infected red blood cells under microfluidic conditions.** *J. Infect. Dis.* 199(3): 445-450, 2009
- Hemmer, CJ; Holst, FG; Kern, P; Chiwakata, CB; Dietrich, M; Reisinger, EC. **Stronger host response per parasitized erythrocyte in Plasmodium vivax or ovale than in Plasmodium falciparum malaria.** *Trop. Med. Int. Health* 11(6): 817-823, 2006
- Hirunpetcharat, C; Vukovic, P; Liu, XQ; Kaslow, DC; Miller, LH; Good, MF. **Absolute requirement for an active immune response involving B cells and Th cells in immunity to Plasmodium yoelii passively acquired with antibodies to the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein-1.** *J. Immunol.* 162(12): 7309-7314, 1999
- Ho, M & White, NJ. **Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria.** *Am J Physiol.* 276(6): 1231-1242, 1999
- Hoshino, K; Takeuchi, O; Kawai, T; Sanjo, H; Ogawa, T; Takeda, Y; Takeda, K; Akira, S. **Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps hene product.** *J. Immunol.* 162(749): 3749-3752, 1999
- Huy, NT; Trang, DT; Kariu, T; Sasai, M; Saida, K; Harada, S; Kamei, K. **Leukocyte activation by malarial pigment.** *Parasitol Int.* 55(1): 75-81, 2006
- Hviid, L & Kemp, K. **What is the cause of lymphopenia in malaria?** *Infect Immun.* 68(10): 6087-6089, 2000
- Ing, R; Segura, M; Thawani, N; Tam, M; Stevenson, MM. **Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation.** *J Immunol.* 176(1): 441-450, 2006
- Jacobs, P; Radzioch, D; Stevenson, MM. **In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice.** *Infect Immun* 64(1): 44-49, 1996
- Janeway, CA Jr & Medzhitov, R. **Innate immune recognition.** *Annu Rev Immunol.* 20: 197-216, 2002
- Jangpatarapongsa, K; Chootong, P; Sattabongkot, J; Chotivanich, K; Sirichaisinthop, J; Tungpradabkul, S; Hisaeda, H; Troye-Blomberg, M; Cui, L;

Udomsangpetch, R. **Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells.** *Eur J Immunol.* 38(10): 2697-2705, 2008

- Jangpatarapongsa, K; Xia, H; Fang, Q; Hu, K; Yuan, Y; Peng, M; Gao, Q; Sattabongkot, J; Cui, L; Li, B; Udomsangpetch, R. **Immunity to malaria in Plasmodium vivax infection: a study in central China.** *PLoS One.* 7(9): 1-9, 2012
- Johnston, SP; Pieniazek, NJ; Xayavong, MV; Slemenda, SB; Wilkins, PP; Silva, AJ. **PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria.** *J Clin Microbiol.* 44(3): 1087-1089, 2006
- Karunaweera, ND; Carter, R; Grau, GE; Mendis, KN. **Demonstration of anti-disease immunity to Plasmodium vivax malaria in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease.** *Am J Trop Med Hyg.* 58(2): 204-210, 1998
- Karunaweera, ND; Wijesekera, SK; Wanasekera, D; Mendis, KN; Carter, R. **The paroxysm of Plasmodium vivax malaria.** *Trends Parasitol.* 19(4): 188-193, 2003
- Karunaweera, N; Wanasekera, D; Chandrasekharan, V; Mendis, K; Carter, R. **Plasmodium vivax: paroxysm-associated lipids mediate leukocyte aggregation.** *Malar. J.* 6(62): 1-14, 2007
- Karyana, M; Burdarm, L; Yeung, S; Kenangalem, E; Wariker, N; Maristela, R; Umana, KG; Vemuri, R; Okoseray, MJ; Penttinen, PM; Ebsworth, P; Sugiarto, P; Anstey, NM; Tjitra, E; Price, RN. **Malaria morbidity in Papua Indonesia, an area with multidrug resistant Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum.** *Malar. J.* 7(148): 1-10, 2008
- Kassa, D; Petros, B; Mesele, T; Hailu, E; Wolday, D; **Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute Plasmodium falciparum and P. vivax malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia.** *Clin. Vaccine Immunol.* 13(3): 376–337, 2006
- Kawai, T & Akira. S. **Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.** *Immunity* 34(5): 637-650, 2011
- Kifude, CM; Rajasekariah, HG; Sullivan-Jr, DJ; Stewart, VA; Angov, E; Martin, SK; Diggs, CL; Waitumbi, JN. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 in Blood, Plasma, and Serum.** *Clin Vaccine Immunol.* 15(6): 1012–1018, 2008

- Kochar, DK; Singh, P; Agarwal, P; Kochar, SK; Pokharna, R; Sareen, PK. **Malarial hepatitis.** *J Assoc Physicians India* 51: 1069-1072, 2003
- Kochar, DK; Saxena, V; Singh, N; Kochar, SK; Kumar, SV; Das, A. ***Plasmodium vivax* malaria.** *Emerg Infect Dis* 11(1):132-134, 2005
- Kochar, DK; Sirohi, P; Kochar, SK; Budania, MP; Lakhota, JP. **Dynamics of malaria in Bikaner, Rajasthan, India (1975-2006).** *J Vector Borne Dis* 44(4): 281-284, 2007
- Kochar, DK; Das, A; Kochar, A; Middha, S; Acharya, J; Tanwar, GS; Gupta, A; Pakalapati, D; Garg, S; Saxena, V; Subudhi, AK; Boopathi, PA; Sirohi, P; Kochar, SK. **Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India).** *Platelets* 21(8): 623-627, 2010
- Korir, JC; Magambo, JK; Mwatha, JK; Waitumbi, JN. **B-cell activity in children with malaria.** *Malar J.* 11(66): 1-6, 2012
- Krishnegowda, G; Hajjar, AM; Zhu, J; Douglass, EJ; Uematsu, S; Akira, S; Woods, AS; Gowda, DC. **Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: Cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity.** *J Biol Chem* 280(9): 8606-8616, 2005
- Kwiatkowski, DP. **How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria.** *Am J Hum Genet.* 77(2): 171-192, 2005.
- Kyes, S; Horrocks, P; Newbold, C. **Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria.** *Annu Rev Microbiol.* 55: 673-707, 2001
- Lacerda, MVG; Mourão, MP; Coelho, HC; Santos, JB. **Thrombocytopenia in malaria: who cares?** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(1): 52-63, 2011
- Lacerda, MG; Mourão, MPG; Alexandre, MAA; Siqueira, AM; Magalhães, BML; Martinez-Espinosa, FE; Santana-Filho, FS; Brasil, P; Ventura, AMRS; Tada, MS; Couto, VSCD; Silva, AR; Silva, RSU; Alecrim, MGC. **Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature.** *Malar J.* 11(12): 1-18, 2012
- Langhorne, J; Ndungu, FM; Sponaas, AM; Marsh, K. **Immunity to malaria: more questions than answers.** *Nat Immunol.* 9(7): 725-732, 2008

- Lee, HK; Lim, J; Kim, M; Lee, S; Oh, EJ; Lee, J; Oh, J; Kim, Y; Han, K; Lee, EJ; Kang, CS; Kim, BK. **Immunological alterations associated with Plasmodium vivax malaria in South Korea.** *Ann Trop Med Parasitol.* 95(1): 31-39, 2001
- Lemaitre, B; Nicolas, E; Michaut, L; Reichhart, JM; Hoffmann, JA. **The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.** *Cell.* 86(6): 973-983, 1996
- Liehl, P & Mota, MM. **Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts.** *Int. J. Parasitol.* 42(6): 557-566, 2012
- Liu, YJ. **Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity.** *Cell.* 106(3): 259-262, 2001
- Lopes, MF; Zamboni, DS; Lujan, HD; Rodrigues, MM. **Immunity to Protozoan Parasites.** *J Parasitol Res.* Editorial: 1-3, 2012
- Lorenz, E; Frees, KL; Schwartz, DA. **Determination of the TLR4 Genotype Using Allele-Specific PCR.** *Biotechniques* 31(1): 22-24, 2001
- Lyke, KE; Burges, R; Cissoko, Y; Sangare, L; Dao, M; Diarra, I; Kone, A; Harley, R; Plowe, CV; Doumbo, OK; Sztein, MB. **Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls.** *Infect Immun.* 72(10): 5630-5637, 2004
- Mackintosh, CL; Beeson, JG; Marsh, K. **Clinical features and pathogenesis of severe malaria.** *Trends Parasitol.* 20(12): 597-603, 2004
- Makler, MT; Palmer, CJ; Ager, AL. **A review of practical techniques for the diagnosis of malaria.** *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92(4): 419-433, 1998
- Marsh, K & Kinyanjui, S. **Immune effector mechanisms in malaria.** *Parasite Immunol.* 28(1-2): 51-60, 2006
- Mayor, A; Aponte, JJ; Fogg, C; Saúte, F; Greenwood, B; Dgedge, M; Menendez, C; Alonso, PL. **The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique.** *Malar J.* 6(3): 1-6, 2007
- Mayxay, M; Pukrittayakamee, S; Newton, P; White, NJ. **Mixed-species malaria infections in humans.** *Trends Parasitol.* 20(5): 233-240, 2004
- McCall, MB; Netea, MG; Hermsen, CC; Jansen, T; Jacobs, L; Golenbock, D; van der Ven, AJ; Sauerwein, RW. **Plasmodium falciparum infection causes**

**proinflammatory priming of human TLR responses.** *J Immunol* 179(1):162-171, 2007

- McKenzie, FE; Prudhomme, WA; Magill, AJ; Forney, JR; Permpanich, B; Lucas, C; Gasser, RA-Jr; Wongsrichanalai, C. **White blood cell counts and malaria.** *J Infect Dis.* 192(2): 323-330, 2005
- McGilvray, ID; Serghides, L; Kapus, A; Rotstein, OD; Kain, KC. **Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance.** *Blood.* 96(9): 3231-3240, 2000
- Medina, TS; Costa, SP; Oliveira, MD; Ventura, AM; Souza, JM; Gomes, TF; Vallinoto, AC; Póvoa, MM; Silva, JS; Cunha, MG. **Increased interleukin-10 and interferon- $\gamma$  levels in Plasmodium vivax malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism.** *Malar J.* 10(264): 1-10, 2011
- Medzhitov, R; Preston-Hurlburt, P; Janeway, CAJr. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature* 388(6640): 394-397, 1997
- Medzhitov, R & Janeway, CJr . **Innate immunity.** *N Engl J Med* 343(5): 338-344, 2000
- Medzhitov, R. **Recognition of microorganisms and activation of the immune response.** *Nature* 449(7164): 819-826, 2007
- Mendonça, VR; Queiroz, AT; Lopes, FM; Andrade, BB; Barral-Netto; M. **Networking the host immune response in Plasmodium vivax malaria.** *Malar J.* 12(69): 1-11, 2013
- Miller, LH; Baruch, DI; Marsh, K & Doumbo, OK. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature* 415(6872): 673-679, 2002
- Miller, SI; Ernst, RK; Bader, MW. **LPS, TLR4 and infectious disease diversity.** *Nat Rev Microbiol* 3(1): 36-46, 2005
- Minigo, G; Woodberry, T; Piera, KA; Salwati, E; Tjitra, E; Kenangalem, E; Price, RN; Engwerda, CR; Anstey, NM; Plebanski, M. **Parasitedependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria.** *PLoS Pathog* 5(4): 1-10, 2009
- Mockenhaupt, FP; Cramer, JP; Hamann, L; Stegemann, MS; Eckert, J; Oh NR; Otchwemah, RN; Dietz, E; Ehrhardt, S; Schröder, NW; Bienzle, U; Schumann, RR.

**Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria.** *Proc Natl Acad Sci USA* 103(1): 177-182, 2006a

- Mockenhaupt, FP; Hamann, L; von-Gaertner, C; Bedu-Addo, G; von-Kleinsorgen, C; Schumann, RR; Bienzle, U. **Common Polymorphisms of Toll-Like Receptors 4 and 9 Are Associated with the Clinical Manifestation of Malaria during Pregnancy.** *The J Infect Dis.* 194(2): 184-188, 2006b
- Mota, MM; Pradel, G; Vanderberg, JP; Hafalla, JCR; Frevert, U; Nussenzweig, RS; Nussenzweig, V; Rodriguez, A. **Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection.** *Science* 291(5501): 141-144, 2001
- Moxon, CA; Grau, GE; Craig, AG. **Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host.** *Br. J. Haematol.* 154(6): 670-679, 2011
- Nathan, C. **Points of control in inflammation.** *Nature* 420(6917): 846-852, 2002
- Nebl, T; De Veer, MJ; Schofield, L. **Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors.** *Parasitology* 130(S1): S45-62, 2005
- Netea, MG; Wijmenga, C; O'Neill, LA. **Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility.** *Nat Immunol.* 13(6): 535-542, 2012
- Nmorsia, OPG; Isaaca, C; Ukwandub, NCD; Ohanemea, BA. **Pro-and anti-inflammatory cytokines profiles among Nigerian children infected with *Plasmodium falciparum* malaria.** *Asian Pac J Trop Med.* 3(1): 41-44, 2010
- Nobes, MS; Ghabrial, H; Simms, KM; Smallwood, RB; Morgan, DJ; Sewell, RB. **Hepatic Kupffer cell phagocytotic function in rats with erythrocytic-stage malaria.** *J Gastroenterol Hepatol.* 17(5): 598-605, 2002
- Nojima, Y; Humphries, MJ; Mould, AP; Komoriya, A; Yamada, KM; Schlossman, SF; Morimoto, C. **VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin.** *J Exp Med.* 172(4): 1185-1192, 1990
- Nomura, N; Miyajima, N; Sazuka, T; Tanaka, A; Kawarabayasi, Y; Sato, S; Nagase, T; Seki, N; Ishikawa, K; Tabata, S. **Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new Genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1.** *DNA Res.* 1(1): 27-35, 1994

- Oakley, MS; Gerald, N; McCutchan, TF; Aravind, L; Kumar, S. **Clinical and molecular aspects of malaria fever.** *Trends Parasitol.* 27(10): 442-449, 2011.
- Ocaña-Morgner, C; Mota, MM; Rodriguez, A. **Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells.** *J. Exp. Med.* 197(2): 143-151, 2003
- Oliveira-Ferreira, J; Lacerda, MVG; Brasil, P; Ladislau, JLB; Tauil, P; Daniel-Ribeiro, CT. **Malaria in Brasil: an overview.** *Malar J.* 9(115): 1-15, 2010
- Oliveira-Filho, AB; Martinelli, JM. **Casos notificados de malária no Estado do Pará, Amazônia Brasileira, de 1998 a 2006.** *Epidemiol. Serv. Saúde* 18(3): 277-284, 2009
- Onyesom, I & Onyemakonor, N. **Levels of Parasitaemia and Changes in Some Liver Enzymes among Malarial Infected Patients in Edo-Delta Region of Nigeria.** *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 3(2): 78-81, 2011
- Organização Mundial de Saúde (OMS). **World Malaria Map 2010.** World Health Organization (WHO). Disponível em: <[http://www.malaria.com/wp-content/uploads/Global\\_Malaria\\_2010\\_WHO.png](http://www.malaria.com/wp-content/uploads/Global_Malaria_2010_WHO.png)>. Acessado em 17 de Outubro de 2012
- Organização Mundial de Saúde (OMS). **World Malaria Report 2011.** World Health Organization (WHO), Library Cataloguing-in-Publication Data, 2011. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/). Acessado em 01 de Agosto de 2012
- Owusu-Agyei, S; Fryauff, DJ; Chandramohan, D; Koram, KA; Binka, FN; Nkrumah, FK; Utz, GC; Hoffman, SL. **Characteristics of severe anemia and its association with malaria in young children of the Kassena-Nankana District of northern Ghana.** *Am J Trop Med Hyg.* 67(4): 371-377, 2002
- Owusu-Agyei, S; Asante, KP; Adjuik, M; Adjei, G; Awini, E; Adams, M; Newton S; Dosoo, D; Dery, D; Agyeman-Budu, A; Gyapong, J; Greenwood, B; Chandramohan, D. **Epidemiology of malaria in the forest-savanna transitional zone of Ghana.** *Malar J.* 8(220): 1-10, 2009
- Pasquetto, V; Guidotti, LG; Kakimi, K; Tsuji, M; Chisari, FV. **Host-virus interactions during malaria infections in hepatitis B virus transgenic mice.** *J. Exp. Med.* 192(4): 529-536, 2000
- Pain, A; Ferguson, DJ; Kai, O; Urban, BC; Lowe, B; Marsh, K; Roberts, DJ. **Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is**

**a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(4): 1805-1810, 2001

- Parise, EV. **Malária grave em Palmas, Estado do Tocantins: relato de caso.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42(4): 463-468, 2009
- Parroche, P; Lauw, FN; Goutagny, N; Latz E, Monks, BG; Visintin, A; Halmen, KA; Lamphier, M; Olivier, M; Bartholomeu, DC; Gazzinelli, RT; Golenbock, DT. **Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9.** *Proc Natl Acad Sci USA* 104(6): 1919-1924, 2007
- Pichyangkul, S; Yongvanitchit, K; Kum-arb, U; Hemmi, H; Akira, S; Krieg, AM; Heppner, DG; Stewart, VA; Hasegawa, H; Looareesuwan, S; Shanks, GD; Miller, RS. **Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway.** *J Immunol.* 172(8): 4926-4933, 2004
- Porcherie, A; Mathieu, C; Peronet, R; Schneider, E; Claver, J; Commere, PH; Kiefer-Biasizzo, H; Karasuyama, H; Milon, G; Dy, M; Kinet, JP; Louis, J; Blank, U; Mécheri, S. **Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria.** *J Exp Med.* 208(11): 2225-2236, 2011
- Poltorak, A; He, X; Smirnova, I; Liu, MY; Van Huffel, C; Du, X; Birdwell, D; Alejos, E; Silva, M; Galanos, C; Freudenberg, M; Ricciardi-Castagnoli, P; Layton, B; Beutler, B. **Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in Tlr4 gene.** *Science* 282(5396): 2085-2088, 1998
- Powers, KA; Szászi, K; Khadaroo, RG; Tawadros, PS; Marshall, JC; Kapus, A; Rotstein, OD. **Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages.** *J Exp Med.* 203(8): 1951-1961, 2006
- Prakash, D; Fesel, C; Jain, R; Cazenave, PA; Mishra, GC; Pied, S. **Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India.** *J Infect Dis.* 194(2): 198-207, 2006
- Price, RN; Tjitra, E; Guerra, CA; Yeung, S; White, NJ; Anstey, NM. **Vivax malaria: neglected and not benign.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(6): 79-87, 2007

- Prudêncio, M; Mota, MM; Mendes, AM. **A toolbox to study liver stage malaria.** *Trends Parasitol.* 27(12): 565-574, 2011
- Quashie, NB; Koning, HP; Ranford-Cartwright, LC. **An improved and highly sensitive microfluorimetric method for assessing susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs in vitro.** *Malar J* 5(95): 1-6, 2006
- Ribeiro-Dias, F & Tosta, CE. **Dynamics and kinetics of natural killer cell cytotoxicity in human malaria as evaluated by a novel stepwise cytotoxicity assay.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39(4): 357-364, 2006
- Rich, SM & Ayala, FJ. **Evolutionary Origins of Human Malaria Parasites.** In: Dronamraju, KR & Arese, P. **Malaria: Genetic and Evolutionary Aspects.** Ed. Springer Science. USA. 2006
- Riley, EM; Wahl, S; Perkins, DJ; Schofield, L. **Regulating immunity to malaria.** *Parasite Immunol* 28(1-2): 35-49, 2006
- Roberts, DR; Laughlin, LL; Hsueh, P; Legters, LJ. **DDT, Global Strategies, and a Malaria Control Crisis in South America.** *Emerg Infect Dis.* 3(3): 295-302, 1997
- Rock, FL; Hardiman, G; Timans, JC; Kastelein, RA; Bazan, JF. **A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(2): 588-593, 1998
- Rockett, KA; Awburn, MM; Cowden, WB; Clark, IA. **Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives.** *Infect Immun* 59 (9): 3280-3283, 1991
- Rodrigues, IB; Tadei, WP; Santos-Cordeiro, RL; Santos, S; Baggio, JB. **Controle da Malária: Eficácia de Formulados de Bacillus Sphaericus 2362 Contra Larvas de Espécies de Anopheles em Criadouros Artificiais-Tanques de Piscicultura e Criadouros de Olaria.** *Rev Patol Trop.* 37(2): 161-176, 2008
- Rodolfo, H; Donato, M; Quijada, I; Pena, A. **High prevalence of malaria infection in Amazonas state, Venezuela.** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 49(2): 79-85, 2007
- Roland, J; Soulard, V; Sellier, C; Drapier, AM; Di Santo, JP; Cazenave, PA; Pied, S. **NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development.** *J Immunol.* 177(2): 1229-1239, 2006
- Romanovsky, AA; Almeida, MC; Aronoff, DM; Ivanov, AI; Konsman, JP; Steiner, AA; Turek, VF. **Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions.** *Front Biosci.* 10: 2193-2216, 2005

- Rosas, MJ. **Prevenção da malária.** *Rev Port Clin Geral* 19: 263-266, 2003
- Russell, JH & Ley, TJ. **Lymphocyte-mediated cytotoxicity.** *Annu Rev Immunol.* 20: 323-370, 2002
- Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. **Biology of interleukin-10.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(5): 331-344, 2010
- Sakaguchi, S. & Powrie, F. **Emerging challenges in regulatory T cell function and biology.** *Science* 317(5838): 627-629, 2007
- Saraiva, MGG; Amorim, RDS; Moura, MAS; Martinez-Espinosa, FE; Barbosa, MG. **Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42(5): 515-522, 2009
- Sawian, CE; Lourembam, SD; Banerjee, A; Baruah, S. **Polymorphisms and expression of TLR4 and 9 in malaria in two ethnic groups of Assam, northeast India.** *Innate Immun.* [Epub ahead of print], 2012
- Schmitt, C; Humeny, A; Becker, CM; Brune, K; Pahl, A. **Polymorphism of TLR4: Rapid Genotyping and Reduced Response to Lipopolysaccharide of TLR4 Mutant Alleles.** *Clin Chem.* 48(10): 1661-1667, 2002
- Schofield, L & Hackett, F. **Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites.** *J. Exp. Med.* 177(1): 145-153, 1993
- Schofield, L & Grau, GE. **Immunological processes in malaria pathogenesis.** *Nat Rev Immunol.* 5(9): 722-735, 2005
- Schwarzer, E; Alessio, M; Ulliers, D; Arese, P. **Phagocytosis of the Malarial Pigment, Hemozoin, Impairs Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen, CD54, and CD11c in Human Monocytes.** *Infect Immun.* 66(4): 1601-1606, 1998
- Schwenk, RJ. & Richie, TL. **Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria.** *Trends Parasitol.* 27(7): 306-314, 2011
- Schröder, NW. & Schumann, RR. **Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor and susceptibility in infectious disease.** *Lancet Infect Dis.* 5(3): 156-164, 2005
- Seoh, JY; Khan, M; Park, SH; Park, HK; Shin, MH; Ha, EH; Lee, BE; Yoo, K; Han, HS; Oh, S; Wi, JH; Hong, CK; Oh, CH; Kim, YA; Park, JW. **Serum cytokine profiles in patients with Plasmodium vivax malaria: a comparison between**

**those who presented with and without hyperpyrexia.** *Am J Trop Med Hyg.* 68(1): 102-106, 2003

- Serghides, L & Kain, KC. **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Retinoid X Receptor Agonists Increase CD36-Dependent Phagocytosis of Plasmodium falciparum-Parasitized Erythrocytes and Decrease Malaria-Induced TNF- $\alpha$  Secretion by Monocytes/Macrophages.** *J Immunol.* 166(11): 6742-6748, 2001
- Serghides, L; Smith, TG; Patel, SN; Kain, KC. **CD36 and malaria: friends or foes?** *Trends Parasitol.* 19(10): 461-469, 2003
- Siewe, L; Bollati-Fogolin, M; Wickenhauser, C; Krieg, T; Müller, W; Roers, A. **Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA.** *Eur J Immunol.* 36(12): 3248-3255, 2006
- Silver, KL; Higgins, SJ; McDonald, CR; Kain, KC. **Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases.** *Cell. Microbiol.* 12(8): 1036-1045, 2010
- Skorokhod, OA; Alessio, M; Mordmüller, B; Arese, P; Schwarzer, E. **Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect.** *J Immunol.* 173(6): 4066-4074, 2004
- Springer TA. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi- step paradigm.** *Cell* 76(2): 301-304, 1994
- Srisurapanon, S; Wiwattanakul, S; Apibal, S; Suwannuruk, R; Sujimanaskul, S; Petchsuwan, B; Pattanapanyasat, K. **Lymphocyte subpopulations in malaria infected individuals living in an endemic area.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 34(2): 310-315, 2003
- Stoute, J.A. **Complement receptor 1 and malaria.** *Cell. Microbiol.* 13(10): 1441-1450, 2011
- Suárez-Murtis, M; Cuervo, P; Leoratti, FMS; Moraes-Avila, SL; Ferreira, AW; Fernandes, O; Coura, JR. **Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic Plasmodium vivax infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 49(3): 159-164, 2007
- Sultan, AA. **Molecular mechanisms of malaria sporozoite motility and invasion of host cells.** *Int Microbiol.* 2(3): 155-160, 1999

- Stevenson, MM & Riley EM. **Innate immunity to malaria.** *Nat Rev Immunol.* 4(3): 169-180, 2004
- Tachado, SD; Gerold, P; Schwarz, R; Novakovic, S; McConville, M; Schofield, L. **Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: Activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties.** *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8): 4022-4027, 1997
- Takeda, K & Akira, S. **Toll-like Receptors in innate immunity.** *Int Immunol* 17(1): 1-14, 2005
- Tangpukdee, N; Yew, HS; Krudsood, S; Punyapradit, N; Somwong, W; Looareesuwan, S; Kano, S; Wilairatana, P. **Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria.** *Parasitol Int.* 57(4): 490-494, 2008
- Taramelli, D; Recalcati, S; Basilico, N; Olliaro, P; Cairo, G. **Macrophage preconditioning with synthetic malaria pigment reduces cytokine production via heme iron-dependent oxidative stress.** *Lab Invest.* 80(12): 1781-1788, 2000
- Tauil, P & Daniel-Ribeiro, C. **Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil.** *Res Rev Parasitol,* 58(3-4): 163-167, 1998
- Taylor, SM; Molyneux, ME; Simel, DL; Meshnick, SR; Juliano, JJ. **Does This Patient Have Malaria?** *JAMA* 304(18): 2048-2056, 2010
- Teixeira, MM; Almeida, IC; Gazzinelli, RT. **Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites.** *Microbes Infect* 4(9): 883-886, 2002
- Tchinda, GG Atashili, J; Achidi, EA; Kamga, HL; Njunda, AL; Ndumbe, PM. **Impact of Malaria on Hematological Parameters in People Living with HIV/AIDS Attending the Laquintinie Hospital in Douala, Cameroon.** *Plos One* 7(7): 1-8, 2012
- Todryk, SM; Bejon, P; Mwangi, T; Plebanski, M; Urban, B; Marsh, K; Hill, AV; Flanagan, KL. **Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4 CD25 high T cells with susceptibility in Kenyans.** *PLoS One* 3(4): 1-7, 2008
- Torre, D. **Early production of g-interferon in clinical malaria: Role of Interleukin-18 and Interleukin-12.** *Clin. Infect. Dis.* 48(10): 1481-1482, 2009
- Tsuji, M & Zavala, F. **T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*.** *Trends Parasitol.* 19(2): 88-93, 2003

- Udomsanpetch, R; Thanikkul, K; Pukrittayakamee, S; White, NJ. **Rosette formation by Plasmodium vivax.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89(6): 635-637, 1995
- Urban, BC; Ferguson, DJ; Pain, A; Willcox, N; Plebanski, M; Austyn, JM; Roberts, DJ. **Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells.** *Nature* 400(6739): 73-77, 1999
- Urban, BC & Roberts, DJ. **Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells.** *Curr Opin Immunol.* 14(4): 458-465, 2002
- Urban, BC; Cordery, D; Shafi, MJ; Bull, PC; Newbold, CI; Williams, TN; Marsh, K. **The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria.** *Infect. Immun.* 74(12): 6700-6706, 2006
- van der Graaf, CA; Netea, MG; Morr , AS; Den Heijer, M; Verweij, PE; Van der Meer, JW; Kullberg, BJ. **Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection.** *Eur. Cytokine Netw.* 17(1): 29-34, 2006
- van Hellemond, JJ; Rutten, M; Koelewijn, R; Zeeman, AM; Verweij, JJ; Wismans, PJ; Kocken, CH; van Genderen, PJJ. **Human Plasmodium knowlesi Infection Detected by Rapid Diagnostic Tests for Malaria.** *Emerg Infect Dis.* 15(9): 1478-1480, 2009
- van Hensbroek, MB; Palmer, A; Onyiorah, E; Schneider, G; Jaffar, S; Dolan, G; Memming, H; Frenkel, J; Enwere, G; Bennett, S; Kwiatkowski, D; Greenwood, B. **The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria.** *J Infect Dis.* 174(5): 1091-1097, 1996
- Vaughan, AM; Aly, ASI; Kappe, SHI. **Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Stage Infection: Gliding and Hiding.** *Cell Host Microbe* 4(3): 209-218, 2008
- Verra, F; Mangano, VD; Modiano, D. **Genetics of susceptibility to Plasmodium falciparum: from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies.** *Parasite Immunol.* 31(5): 234-253, 2009
- Wammes, LJ; Wiria, AE; Toenhake, CG; Hamid, F; Liu, KY; Suryani, H; Kaisar, MM; Verweij, JJ; Sartono, E; Supali, T; Smits, HH; Luty, AJ; Yazdanbakhsh, M. **Asymptomatic Plasmodial Infection Is Associated With Increased Tumor**

**Necrosis Factor Receptor II-Expressing Regulatory T Cells and Suppressed Type 2 Immune Responses.** *J Infect Dis.* [Epub ahead of print], 2013

- Watanabe, H; Weerasinghe, A; Miyaji, C; Sekikawa, H; Toyabe, S; Mannor, MK; Morshed, SR; Halder, RC; Kobayashi, J; Toma, H; Sato, Y; Iwai, K; Matsuoka, H; Abo, T. **Expansion of unconventional T cells with natural killer markers in malaria patients.** *Parasitol Int.* 52(1): 61-70, 2003
- Walther, M; Tongren, JE; Andrews, L; Korbel, D; King, E; Fletcher, H; Andersen, RF; Bejon, P; Thompson, F; Dunachie, SJ; Edele, F; Souza, JB; Sinden, RE; Gilbert, SC; Riley, EM; Hill, AV. **Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection.** *Immunity* 23 (3): 287-296, 2005
- Weatherall, DJ; Miller, LH; Baruch, DI; Marsh, K; Doumbo, OK; Casals-Pascual, C; Roberts, DJ. **Malaria and the red cell.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 35-57, 2002
- Whittle, HC; Brown, J; Marsh, K; Blackman, M; Jobe, O; Shenton, F. **The effects of Plasmodium falciparum malaria on immune control of B lymphocytes in Gambian children.** *Clin Exp Immunol.* 80(2): 213-218, 1990
- Worku S, Björkman A, Troye-Blomberg M, Jemaneh L, Färnert A, Christensson B. **Lymphocyte activation and subset redistribution in the peripheral blood in acute malaria illness: distinct gammadelta<sup>+</sup> T cell patterns in Plasmodium falciparum and P. vivax infections.** *Clin Exp Immunol.* 108(1): 34-41, 1997
- Worku, S; Troye-Blomberg, M; Christensson, B; Björkman, A; Fehniger, T. **Activation of T cells in the blood of patients with acute malaria: proliferative activity as indicated by Ki-67 expression.** *Scand J Immunol.* 53(3): 296-301, 2001
- Wroczyńska, A; Nahorski, W; Bakowska, A; Pietkiewicz, H. **Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease.** *Int Marit Health.* 56(1-4):103-114, 2005
- Xu, H; Wipasa, J; Yan, H; Zeng, M; Makobongo, MO; Finkelman, FD; Kelso, A; Good, MF. **The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection.** *J Exp Med.* 195(7): 881-892, 2002
- Zakeri, S; Pirahmadi, S; Mehrizi, AA; Djadid, ND. **Genetic variation of TLR-4, TLR-9 and TIRAP genes in Iranian malaria patients.** *Malar J.* 10(77): 1-7, 2011

- Zafra, G; Flórez, O; Morillo, CA; Echeverría, LE; Martín, J; González, CI. **Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in Chagas disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(1): 27-30, 2008
- Zeyrek, FY; Kurcer, MA; Zeyrek, D; Simsek, Z. **Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey.** *Parasite Immunol.* 28(5): 201-207, 2006

---

*Apêndice*

## APÊNDICES

### Apêndice A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-HEMOAM



## TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas analisou o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da resposta Imune Celular e Frequência dos Polimorfismos do TLR-4 em Pacientes com Malária da Cidade de Coari-AM**”, protocolo nº 0014.0.112.000-11, sob a responsabilidade do pesquisador **Allyson Guimarães da Costa**, obtendo a APROVAÇÃO na reunião do dia 31/10/2011, por estar de acordo com a Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde do Brasil.

**ADRIANA MALHEIRO**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Fundação Hemoam

## Apêndice B: TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
 FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS - FHEMOAM  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Nº Registro: \_\_\_\_\_

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

**1) Título do Projeto: “Avaliação da Resposta Imune Celular e Frequência dos Polimorfismos do TLR-4 em Pacientes com Malária da cidade de Coari, Estado do Amazonas”**

Você está sendo convidado a participar deste projeto de pesquisa, a ser realizado na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM. Ressaltando que você não deve participar desta pesquisa contra a sua vontade e que qualquer dúvida em relação aos procedimentos realizados devem ser questionadas, até que todas as dúvidas sejam esclarecidas.

**2) Objetivos do Estudo:**

O objetivo deste trabalho é estudar/avaliar a resposta imune dos pacientes com Malária na região onde resido, compreendendo assim a relação entre o parasita e o hospedeiro (doente) na infecção pela malária e como o organismo destes reage a essa infecção;

**3) Participação no Estudo**

Minha participação se resume em: 1) Responder algumas perguntas a respeito da minha vida (idade, local de nascimento, estado civil, Profissão, etc.) e da minha saúde (doenças que já tive ou que estou com sintomas, tipo sanguíneo, etc.), sendo que poderei não responder as perguntas que me causem constrangimentos de qualquer natureza; e 2) fornecer um pouquinho do meu sangue, que será coletado (tirado) pela equipe do IMT-Coari (Local da Coleta) e/ou pesquisadores da UFAM;

**4) Procedimentos a Serem Realizados e Risco Associados:**

Fui informado que será coletado 20 mL do meu sangue pela equipe técnica do Instituto de Medicina Tropical de Coari ou pelos Pesquisadores da Universidade Federal do Amazonas, sendo que depois de coletarem a amostra de sangue, me informaram que o local onde foi realizado a coleta poderá ou não ficar com uma mancha roxa (hematoma) ou um pouco dolorido;

**5) Direito a Retirada do Projeto, Perdas e Danos**

Não terei que realizar nenhum outro exame além da coleta, não terei qualquer tipo de gasto ou ganho e poderei sair da pesquisa a qualquer momento, sem que isto me cause qualquer prejuízo, bastando para isso

Responsáveis pela Pesquisa: Mestrando Allyson Guimarães da Costa, Dra Adriana Malheiro e Dra Maria Izabel O. Heckmann



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS - FHEMOAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

Nº Registro: \_\_\_\_\_

entrar em contato com um dos pesquisadores. Neste estudo, espera-se que não haja perdas ou danos físicos ou moral aos participantes, porém havendo tais ocorrências, estas devem ser comunicadas ao pesquisador principal que tomará as providências necessárias para solução dos mesmos;

**6) Confidencialidade do Estudo**

Me foi informado de que as amostras de sangue serão identificadas com um número e não com meu nome. Somente os pesquisadores saberão a quem corresponde cada número. O sangue ficará guardado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM, Manaus-AM e poderá ser utilizado para outras pesquisas. Quanto ao trabalho, este mostrará apenas os resultados e nunca meu nome ou outra informação que me identifique. Todas as informações sobre este estudo estarão sempre à minha disposição. Além disso, fui informado que este estudo contribuirá para o melhor conhecimento científico sobre a resposta imune na Malária humana;

**7) Contato com o Pesquisador Principal**

Fui informado que tenho o direito de conversar com o pesquisador, Enfermeiro Allyson Guimarães da Costa, diariamente na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), situado na Av. Constantino Nery, Nº 4397, Bairro Chapada, na cidade de Manaus-AM, telefone: 3655-0013, em qualquer etapa do estudo para pedir esclarecimentos ou retirar certas dúvidas sobre o estudo;

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura : \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa: \_\_\_\_\_



Responsáveis pela Pesquisa: Mestrando Allyson Guimarães da Costa, Dra Adriana Malheiro e Dra Maria Izabel O. Heckmann

## Apêndice C: Questionário e Ficha de Cadastro Individual



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
 FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS - FHEMOAM  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Nº Registro: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL:

Projeto: “Avaliação da Resposta Imune Celular e Frequência dos Polimorfismos do TLR-4 em Pacientes com Malária da cidade de Coari, Estado do Amazonas”

Nome: \_\_\_\_\_  
 Sexo: (M) (F) Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos  
 Local de Nascimento: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_  
 Cor de Pele: Branco ( ) Moreno ( ) Negro ( ) Escolaridade: \_\_\_\_\_  
 Trabalha: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
 Estado Civil: Solteiro ( ) Amigado ( ) Casado ( ) Divorciado ( ) Separado ( ) Viúvo ( ) a quanto tempo ( ) Possuem Filhos: Sim ( ) Não ( ) Quantos: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ Tipo de Moradia: \_\_\_\_\_  
 Quantas pessoas residem: \_\_\_\_\_ Poço: Sim ( ) Não ( ) Esgoto: (Tipo) \_\_\_\_\_

Tipo Sanguíneo	Malária	Tipo de Malária	Sintomas:		
O ( ) A ( ) AB ( ) B ( ) Rh: + ( ) - ( )	Sim ( ) Não ( ) Quantas _____ <b>1ª Infecção:</b> Sim ( ) Não ( )	<i>P. vivax</i> : ( ) Quant. _____ <i>P. falciparum</i> : ( ) Quant. _____ <i>P. malarie</i> : ( ) Quant. _____	Febre: Sim ( ) Não ( ) Dor no Corpo: Sim ( ) Não ( ) Dor de Cabeça: Sim ( ) Não ( ) Sudorese: Sim ( ) Não ( ) Tremedeira: Sim ( ) Não ( ) Fraqueza: Sim ( ) Não ( )		
<b>Exame de Gota Espessa</b>					
Resultado: ( ) <i>P. vivax</i> ; ( ) <i>P. falciparum</i> ; ( ) <i>P. malarie</i> ; ( ) Mista (F+V) Parasitemia: ( ) ½+ ( ) + ( ) ++ ( ) +++ ( ) ++++ ( ) _____ Parasitas Densidade Parasitaria: _____ / mm <sup>3</sup>					
Doença de Chagas	Dengue:	Leishmaniose	Alcoolismo	Fumante	Outras Drogas
Sim ( ) Não ( )	Sim ( ) Não ( ) Quantas _____	Sim ( ) Não ( ) LTA ( ) LV ( )	Sim ( ) Não ( ) Quant. Dia _____	Sim ( ) Não ( ) Quant. Temp. _____ Quant. Dia _____	Sim ( ) Não ( ) Tipo _____ Quant. Temp. _____

Obs:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Questionário Sócio-Demográfico e Epidemiológico dos Pacientes com Malária de Coari.  
 Responsável: Mestrando Allyson Guimarães da Costa, Dra Adriana Malheiro e Dra Maria Izabel O. Heckmann

---

*Anexos*

**ANEXOS****Anexo 01: Artigo de Revisão:**

Artigo Submetido à **Revista de Patologia Tropical - ISSN: 0301-0406**

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA PATOGÊNESE DA MALÁRIA****IMMUNOLOGICAL ASPECTS IN MALARIA PATHOGENESIS**

**Allyson Guimarães da Costa<sup>1,2</sup>, Maria Izabel Ovellar Heckmann<sup>1</sup>, Adriana Malheiro<sup>1,2</sup>**

1. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM. 2. Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, Manaus, AM.

**Endereço para Correspondência:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, Av. Constantino Nery, Nº 4.397, CEP: 69050-002, Chapada, Manaus, Amazonas, Brasil;

**Tel:** 55 92 3655-0013; 9114-9478

**E-mail:** [malheiroadriana@yahoo.com.br](mailto:malheiroadriana@yahoo.com.br).

**Resumo:** A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium sp.*, com imunopatogênese diferenciada, relacionado aos fatores biológicos do parasita e do hospedeiro. O processo patogênico é iniciado com a inoculação dos esporozoítos pelo vetor nos tecidos subcutâneos e a liberação das formas merozoítas na circulação. As respostas inatas e adaptativas são fundamentais para o controle da infecção parasitária, destacando-se a resposta imune celular. Na malária, os mecanismos da resposta imune serão modulados de acordo com o tipo de espécie infectante, a carga parasitária, a fase eritrocítica e principalmente as características genéticas e a imunidade do hospedeiro. Assim, o objetivo desta revisão é apresentar as principais características da resposta imune na malária e o processo de imunopatogênese da doença.

**Descritores:** Malária; Resposta Imune; Imunopatogênese

**Abstract:** Malaria is caused by *Plasmodium sp.*, immunopathogenesis with differentiated biological factors related to the parasite and the host. The pathogenic process is initiated by sporozoite inoculation by the vector in the subcutaneous tissues which release the merozoites into the circulation forms. The innate and adaptive responses are critical for the control of parasitic infection, highlighting the cellular immune response. In malaria, the mechanisms of the immune response will be modulated in accordance with the type of infecting species, the parasite load, the erythrocytic phase and mainly the genetic characteristics, and immunity of the host. The objective of this review is to present the main features of the immune response in malaria and immunopathogenesis of the disease process.

**Key Words:** Malaria; Immune Response; Immunopathogenesis

## INTRODUÇÃO

A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium sp.*, com processo patogênico diferenciado, relacionado aos fatores biológicos do parasita e do hospedeiro<sup>64</sup>. A infecção ocorre após a inoculação do parasita na corrente sanguínea pelo inseto vetor, com posterior interação entre o parasita e as células do sistema imune<sup>87</sup>.

A transmissão da malária ocorre devido à maioria dos parasitas sobreviverem tanto a reposta imune inata quanto adaptativa do hospedeiro, possibilitando reinfecções e o desenvolvimento de formas crônicas da doença. As respostas inatas e adaptativas são fundamentais para o controle da infecção parasitária, destacando-se a resposta imune celular em doenças causadas por protozoários intracelulares<sup>24</sup>.

A resposta imune contra esse parasita é ineficaz, uma vez que o ciclo biológico do protozoário ocorre dentro de células do hospedeiro, impossibilitando o desenvolvimento de uma resposta efetiva e eliminação/erradicação do patógeno<sup>60</sup>.

Desta forma, o objetivo deste artigo foi avaliar os principais estudos na área e apresentar informações relevantes sobre as características da resposta imune, os receptores da imunidade inata, o perfil de resposta celular e o padrão de citocinas que influenciam a imunopatogênese da malária. Para isso foi utilizada uma metodologia de busca baseada nos bancos de dados do PubMed (<http://www.pubmed.gov>) para a recuperação de artigos originais e revisões sobre o tema apresentado, usando o algoritmo [(*Malaria OR Plasmodium*) AND (*Immunity OR Immunology OR Immune Response OR Innate Immune Response OR Adaptative Immune Response*) AND (*Infection OR Disease*)].

Os limites de busca foram selecionados para a obtenção de artigos publicados em inglês, português ou espanhol no período de 1992 a 2012. Os artigos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de elegibilidade: Artigos adequados ao tema proposto; Artigos com o texto completo disponível.

## MALÁRIA

A malária atualmente é umas das doenças infecciosas humanas de maior prevalência no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a doença parasitária mais devastadora do ponto de vista social e econômico, sendo uma das doenças mais mortais das regiões tropicais e subtropicais, em conjunto com o HIV e a Tuberculose<sup>7,71</sup>.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 3,3 bilhões de pessoas (40% da população mundial) residam em áreas de risco para contrair a malária. Deste quantitativo, calcula-se que aproximadamente 216 milhões de pessoas foram infectadas no ano de 2010, com 655 mil mortes<sup>71</sup>.

A doença é causada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, com cinco espécies que infectam o homem, o *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale* e *knowlesi*<sup>14, 29, 30</sup>. O *Plasmodium* pertence ao filo Apicomplexa, família *Plasmodidae*, que abrange outros patógenos humanos, como o toxoplasma, com duas formas de reprodução (assexuada e sexuada). Possui mais de 200 espécies descritas que infectam aves, répteis e mamíferos<sup>78</sup>.

No Brasil há apenas a presença de três espécies: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*<sup>14</sup>. O *P. ovale* é encontrado somente no continente africano, mais precisamente na África Subsariana e Ocidental, com casos importados em outros continentes<sup>61, 25</sup>. Quanto ao *P. knowlesi*, foi a última espécie descrita a infectar o homem. Inicialmente acreditava-se que infectava apenas primatas, no entanto, em 2004, os primeiros casos de infecção humana foram descritos em pacientes das Filipinas, Malásia, Singapura e Tailândia<sup>29, 101</sup>.

Os vetores do *Plasmodium* são mosquitos do gênero *Anopheles* (Diptera: Culicidae, Anophelinae, Anophelini), com aproximadamente 400 espécies. Desse total, 54 estão presentes no Brasil, sendo o principal vetor a espécie *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, por sua capacidade de transmitir diferentes espécies de *Plasmodium* e alto grau de endofagia, distribuição em todo o território nacional e alta densidade na região Amazônica. Outras

espécies como o *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*, *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) bellator* também podem infectar hospedeiros humanos. Vale ressaltar que, os criadouros geralmente são em locais onde há água parada e limpa, sombreada e de baixa correnteza<sup>99, 15, 14</sup>.

A sintomatologia da malária possui uma tríade clássica constituída por febre com elevação rápida da temperatura (variando entre 39°C e 41°C), calafrios e cefaleia intermitente<sup>14, 26</sup>. Os sintomas da fase inicial (mal-estar geral e abundante sudorese, mialgias e artralgias, cansaço, náuseas e tonturas) podem ser confundidos com outras doenças febris, principalmente em áreas não endêmicas da doença<sup>84</sup>.

Complicações podem ser observadas em crianças, mulheres grávidas e indivíduos de áreas não endêmicas, que em geral apresentam palidez, icterícia, hepatoesplenomegalia, anemia e trombocitopenia. Nos casos graves, como a malária cerebral, podem ser observados convulsões, disfunções do sistema nervoso central, anemia grave, hipoglicemia, acidose, insuficiências respiratória e renal, e choque<sup>93</sup>.

Os episódios febris são caracterizados por suas recorrências. Em geral, são denominadas de acordo com a gravidade dos eventos. O *P. vivax/P. ovale* e *P. malariae* geralmente originam a “febre terçã benigna” e a “febre quartã”, respectivamente, pois se considerava que esses parasitas não estão associados às formas graves da doença<sup>19, 87</sup>. O *P. falciparum* é responsável pela “febre terçã maligna” e “sub-terçã maligna”, pois esta relacionado as formas severas e com complicações da malária<sup>102</sup>. Quanto ao *P. knowlesi*, este tem se demonstrado como uma importante causa de malária grave em humanos<sup>29, 101</sup>.

## **PATOGÊNESE DA MALÁRIA**

Na malária, o processo patogênico é iniciado com a inoculação dos esporozoítos pelo vetor nos tecidos subcutâneos. Após a infecção, ocorre a migração dos parasitas para o fígado

e invasão das células hepáticas, onde ocorre parte do processo de desenvolvimento do *Plasmodium* e a replicação intracelular. O processo é mediado pela proteína de adesão relacionada à Trombospondina (TRAP) e aos proteoglicanos de sulfato de heparina<sup>66, 87</sup>.

As formas exoeritrocíticas são observadas após a ruptura dos hepatócitos e a invasão das hemácias ocorre de forma rápida, remodelando a estrutura das células infectadas e tornando estas mais rígidas<sup>77, 28</sup>. Com a liberação de dezenas de parasitas (merozoítos) na corrente sanguínea, os sintomas são evidenciados, principalmente com o início dos ciclos assexuados nas hemácias<sup>64</sup>.

Com a infecção das hemácias, o processo de cito-aderência destas no endotélio vascular é observado, diminuindo significativamente o número de células vermelhas na circulação e causando obstrução microvascular. O processo antes restrito a infecção por *P. falciparum*, hoje é relatado em infecções por *P. vivax*, aumentando o relato de complicações<sup>64, 4</sup>. Além dos fenômenos de cito-aderência, outros processos da fisiopatologia estão ligados à gravidade da doença, como a formação das rosetas de hemácias, auto-aglutinação das células vermelhas e agregação dos leucócitos<sup>97, 73, 32, 51</sup>. A deformidade dos glóbulos vermelhos infectados pelos parasitas aumenta ainda a fragilidade dos eritrócitos e contribui para o déficit na perfusão sanguínea dos órgãos<sup>43</sup>.

A resposta inflamatória decorrente da patogênese da doença esta intimamente relacionada com o nível da parasitemia. Estudos recentes têm demonstrado que o processo inflamatório e a produção de citocinas são maiores na infecção por *P. vivax* do que em outras espécies, como o *P. falciparum*<sup>3, 76, 52</sup>. A produção de agentes inflamatórios e pirogênicos podem estar associadas às toxinas de cada espécie e a composição destas, que podem gerar resposta imune exacerbada ou não<sup>44</sup>.

Os episódios febris da malária são iniciados pela interação entre as toxinas liberadas pela ruptura de esquizontes e células fagocíticas do sistema imune inato<sup>69</sup>. As toxinas (âncoras

de *Glicosil-Fosfatidil-Inositol*, hemozoína e DNA), também denominadas de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) são reconhecidas principalmente pelos Receptores do tipo *Toll* – TLRs<sup>41</sup>. A fagocitose dessas toxinas livres pelas células não possui um local exato para ocorrer, assim, o sequestro de parasitas da malária pode desencadear o processo de sinalização para a indução da febre e demais sintomas, podendo ser associado a casos graves da doença<sup>2, 69</sup>.

O isolamento dos PAMPs derivados do *Plasmodium* em ensaios *in vitro* levou ao descobrimento das ancoras de GPI, das proteínas MSP1 e MSP2, da hemozoína e do DNA. Foi relatado que estes componentes funcionam com indutores da produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos *in vitro*, principalmente de TNF- $\alpha$ <sup>86, 92, 64, 74</sup>.

Os mecanismos universais para indução da febre são ocasionados pela liberação de agentes pirogênicos, que atuam na termorregulação da temperatura corporal. A cascata de eventos que antecede a resposta febril ocorre com a liberação inicial de alguns pirogênios, como as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além do fator 5a do Complemento (C5a) e a Prostaglandina E2 (PGE2). Células circulantes e localizadas nos tecidos, como os monócitos e as células de *Kupffer* no fígado, são as principais fontes desses agentes pirogênicos no processo patológico da malária, sendo necessária densidade parasitária mínima para desencadear a resposta<sup>83, 11, 69</sup>. A liberação de mediadores, como o óxido nítrico (NO) são essenciais para a doença. Concentrações sistêmicas de NO foram observadas em pacientes com malária não complicada e níveis elevados em pacientes com malária cerebral, demonstrando que altos níveis podem causar neurotoxicidade nesses indivíduos<sup>21, 22</sup>.

No entanto, os mecanismos da resposta imune serão modulados de acordo com o tipo de espécie infectante, a carga parasitária, o tipo de toxina/PAMP indutor da resposta, a fase eritrocítica e principalmente as características genéticas e a imunidade anti-malária do hospedeiro<sup>69</sup>.

## RESPOSTA IMUNE NA MALÁRIA

As defesas imunológicas dos mamíferos, em específico dos humanos, são realizadas pelo sistema imune inato e adaptativo. A imunidade inata é responsável pelo reconhecimento dos microrganismos patogênicos, sendo a primeira barreira de defesa do organismo. Enquanto que a imunidade adaptativa é responsável pela memória imunológica e os perfis de resposta imune celular e humoral gerados pelas células linfóides B e T<sup>98</sup>.

A eficiência do sistema imunológico tem sido moldada ao longo do processo evolutivo, possibilitando a coexistência de agentes infecciosos em hospedeiros e controlando as infecções<sup>13</sup>. Os danos ocasionados durante os processos infecciosos são causados em sua maioria pela exacerbação da resposta imunológica/inflamatória, com ativação das cascatas de sinalização intracelular, produção de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e reativos de oxigênio. A patogênese da doença pode ser resultado do efeito direto do microrganismo infeccioso e/ou intensidade da resposta inflamatória, que será determinada pela ativação do sistema imune através do reconhecimento de moléculas patogênicas. Assim, os danos patológicos observados nas doenças infecciosas como a malária em geral são decorrentes da junção dessas forças de forma intrínseca<sup>68, 1, 75</sup>.

O processo de resposta imune na patogênese de doenças parasitárias como a malária tem um papel essencial na eliminação do agente infeccioso, além de promover a reparação tecidual<sup>63</sup>. As respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro podem estar relacionadas com a capacidade de sobrevivência e transmissão do protozoário, caso este não possua mecanismos de escape aos estímulos gerados<sup>58</sup>. No entanto, a proteção conferida pela resposta imune é avaliada considerando o agente infeccioso, pois um mecanismo protetor contra uma bactéria extracelular pode não ser eficiente contra um parasita<sup>24</sup>.

Ambas as respostas imunes são fundamentais para o controle das infecções parasitárias, destacando-se neste a resposta imune celular em doenças causadas por protozoários intracelulares, como a malária<sup>82, 24</sup>.

Os parasitas como o *Plasmodium*, podem ser alvos ainda de anticorpos e do sistema complemento, no entanto, estes não são suficientes para controlar a doença, apesar de ser observado que na fase eritrocítica, as formas merozoítas que saem das hemácias serem alvos comuns destes componentes neutralizantes e opsonizantes<sup>60</sup>. Desta forma, nota-se que se faz necessária a participação das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> citotóxica, tanto para produzir citocinas, quanto para destruir os parasitas e as células infectadas por estes<sup>42</sup>. A ativação das células mononucleares pelo parasita podem estimular a produção e liberação das citocinas inflamatórias, no entanto, o equilíbrio de atuação entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias parece ser fundamental para o agravamento da doença e o surgimento de complicações, sendo alvo de terapia específica<sup>46, 55, 87, 30</sup>.

### **Resposta Imune Inata**

Estudos imunológicos em pacientes com malária sempre investigaram os mecanismos adaptativos da resposta, com o enfoque na identificação de antígenos alvos para a produção de vacinas<sup>5</sup>. Recentemente, pesquisas abordando os mecanismos do sistema imune inato foram desenvolvidas, demonstrando que o controle da parasitemia em infecções por plasmódio são dependentes tanto de mecanismos adaptativos quanto inato<sup>36</sup>.

A imunidade inata, outrora descrita como inespecífica, passou a desempenhar papel fundamental nos processos infecciosos, principalmente com a descoberta dos PRRs (*pattern recognition receptors*) ou Receptores de Reconhecimento Padrão, tais como: *Toll-Like*, *Nod-Like*, *RIG-I-Like*, *Scavenger*, entre outros. Esses receptores reconhecem vários componentes microbianos (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*), como açúcares, ácidos

nucleicos, proteínas, lipídeos, peptídeos ou mesmo a combinação desses<sup>94</sup>. A resposta inata também tem sido associada a processos inflamatórios mais exacerbados, com ativação de macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e mastócitos, com reconhecimento dos patógenos pelos receptores descritos<sup>49</sup>.

O principal grupo de receptores na resposta imune inata a malária são os Receptores *Toll-like* (TLRs), que reconhecem vários componentes de bactérias, vírus e moléculas derivadas de protozoários, como o plasmódio<sup>17</sup>. Essas moléculas compreendem uma grande família de receptores, constituídos por mais de 11 membros, no entanto, em células do sistema imune humano apenas do TLR1 ao TLR9 e o TLR11 são funcionais<sup>80, 38, 53</sup>.

As moléculas responsáveis pela ativação da resposta imune inata na malária ainda estão sendo caracterizadas. Atualmente, três PAMPs foram descritos como potenciais indutores: as âncoras de GlicosilFosfatidilInositol (GPI), as micropartículas e o DNA do parasita com o pigmento hemozoína. Essas moléculas são responsáveis pela ativação do TLR2, TLR4 e TLR9, respectivamente, que parecem ser os principais receptores envolvidos na resposta inata, mediando a produção de citocinas, como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12<sup>23, 54, 74, 37</sup>.

O sistema imune inato possui uma grande variedade de células que expressam os PRRs, estando entre elas às células dendríticas, os macrófagos, as células NK, os neutrófilos, entre outros<sup>62</sup>.

As células inatas têm papel importante na patogênese da malária, com resposta inflamatória rápida, caracterizada principalmente pelas células NK, macrófagos e células dendríticas<sup>20</sup>. Em modelos experimentais, foi observado o reconhecimento das moléculas dos esporozoítos no fígado, com infiltrado dessas células, linfócitos T e produção de IFN- $\gamma$ , no entanto, a presença dos linfócitos T é dependente de células NK e IL-12<sup>33, 72</sup>.

A infecção das hemácias pelo parasita transforma a membrana dessas células, inserindo proteínas do parasita que podem interagir com os receptores das células inatas, ativando de

forma direta ou indireta a resposta<sup>67, 91, 20</sup>. Com a ruptura das hemácias infectadas, restos celulares e micropartículas da membrana, que são importantes imunógenos irão ativar o complemento e gerar deposição de C3b, iniciando o processo de fagocitose celular<sup>89, 27</sup>. Os merozoítos liberados durante a ruptura poderão ser alvos de anticorpos específicos (IgG1 e IgG3) que irão acentuar a fagocitose, pela ligação antígeno-anticorpo-receptor de monócito (FcγRs) e pela ativação dos receptores *Toll-like* descritos<sup>31</sup>. Desta forma, nota-se que as células fagocíticas são importantes componentes na redução eficaz da parasitemia, no entanto, a fagocitose eficiente só é observada quando há opsoninas, tais como anticorpos, moléculas do complemento e fragmentos celulares, ativando o processo<sup>89</sup>.

A imunidade inata desempenha papel fundamental nas defesas do organismo contra patógenos invasores, principalmente nas doenças infecciosas, parasitárias e inflamatórias, uma vez que provoca uma resposta inflamatória generalizada, pois libera uma grande quantidade de citocinas e outros mediadores inflamatórios, que tem efeito sobre o agente invasor e impedem sua propagação no organismo<sup>105</sup>.

As citocinas em geral são sintetizadas quando as células do sistema imune inato (ex: macrófagos) reconhecem os componentes microbianos através dos PAMPs. Estas compreendem um grande grupo de moléculas, que são diferenciados estruturalmente e incluem as Inter-Leucinas (ex: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12) e o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que apresentam vários efeitos locais e sistêmicos<sup>10, 35, 90</sup>.

A IL-12 e a IL-18 são produzidas por monócitos/macrófagos no início da infecção com a função de diminuir a carga parasitária e ativar a produção de IFN- $\gamma$ , necessário para a remoção do parasita e ativação de funções pró-inflamatórias<sup>96</sup>. O pigmento hemozoína desencadeia a produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , além de quimionas como MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  e  $\beta$ , aumentando a resposta inflamatória<sup>39</sup>.

Espécies distintas de *Plasmodium* podem influenciar na resposta imune inata na malária. A imunopatologia da doença está diretamente relacionada aos componentes parasitários e será mediada pelo processo de sinergismo entre a imunidade inata e adaptativa, importante para o controle da infecção e gravidade da doença<sup>20</sup>.

### **Resposta Imune Adaptativa**

A diversidade de antígenos encontrados no *Plasmodium* interfere diretamente na detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro, interferindo na elaboração da resposta adaptativa. O desenvolvimento da imunidade clínica/adaptativa ocorre de forma lenta e com pouca efetividade, uma vez que o parasita possui mecanismos de escape que limitam a destruição do plasmódio<sup>4</sup>.

A patogênese da doença e os mecanismos envolvidos na resposta imune ainda não estão totalmente esclarecidos. A compreensão sobre os componentes envolvidos na interação parasita-hospedeiro podem auxiliar na concepção de novos fármacos e vacinas<sup>57</sup>.

O papel da resposta imune adquirida tem sido definido como o estado de resistência a infecção, com destruição do plasmódio pelas células e neutralização da multiplicação dos parasitas pelos anticorpos. O processo de aperfeiçoamento da resposta é resultado de sucessivas infecções, conferindo ao hospedeiro, mecanismos de defesa ao agente patogênico<sup>34</sup>.

Estudos em humanos e camundongos têm exemplificado os processos patogênicos e as respostas imunológicas na malária. A eliminação do parasita é dependente da ativação da resposta imune adaptativa via células T e B<sup>45, 104</sup>.

A resposta imune adaptativa é mediada pelas células dendríticas (DCs) com papel crucial no *priming*/ativação das respostas mediadas pelos linfócitos T. Em humanos, estudos sugerem que as DCs podem ser moduladas pelas proteínas do parasita expressas na membrana

das hemácias e pela diminuição de IL-12 e aumento de IL-10, inibindo ou não sua atividade<sup>100, 70, 47</sup>.

Os linfócitos B e T CD4<sup>+</sup> possuem papel primordial no controle da parasitemia, atuando na destruição do plasmódio. Ambos são essenciais para a completa erradicação do parasita, apesar de estudos demonstrarem que os anticorpos isoladamente sejam suficientes para eliminar o patógeno da circulação<sup>45</sup>.

A resposta imune celular inicial é mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de perfil Th1, com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ . O controle da parasitemia no hospedeiro está associado à ativação dos macrófagos e produção sinérgica de IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e de radicais livres, como o NO<sup>81, 48</sup>. Quanto ao *clearance*/eliminação dos parasitas, este é caracterizado pela presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de perfil Th2 e o subconjunto de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-6), além da ativação das células T  $\gamma\delta$  e células NK produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>5, 6, 59, 12</sup>.

A ação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na patogênese da malária está restrito a destruição de células hepáticas infectadas na fase pré-eritrocítica, visto que as hemácias não expressam moléculas de HLA de classe I. Estudos in vitro evidenciaram o papel dessas células na destruição de hepatócitos infectados pelo plasmódio<sup>40</sup>. Após a ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em T citotóxicos (LTcs) pelas células de *Kupffer*, ocorre a migração do nódulo linfático para o fígado, onde iniciam o processo de lise/morte dos hepatócitos infectados através da liberação de perforinas, granzimas e IFN- $\gamma$ <sup>88</sup>.

A morbidade da malária aguda esta associada principalmente com a exacerbação da resposta imune na fase eritrocítica<sup>87</sup>. Essas complicações estão associadas principalmente com o desequilíbrio na produção de citocinas como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , além de outros mediadores como o NO<sup>6</sup>.

Estudos recentes têm demonstrado a existência de um equilíbrio entre o controle da infecção e a imunopatologia da malária, prevenindo complicações. Esse equilíbrio é mediado

pelas células T reguladoras Tregs), que desempenham papel importante na homeostase imune e controle das respostas inflamatórias<sup>85</sup>.

Na infecção pelo plasmódio, as células Tregs atuam na supressão da resposta inflamatória, através do contato direto com as células efetoras e na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$ <sup>79, 8</sup>. A função das células Tregs tem sido associada com o controle das respostas inflamatórias e na diminuição da parasitemia, contudo, o aumento no número dessas células tem gerado ação inversa, favorecendo o aumento do número de parasitas e o desenvolvimento da infecção<sup>103, 95, 65</sup>. Na infecção por *P. vivax* em humanos, foi observado aumento no número dessas células produtoras de IL-10 em culturas in vitro e aumento sérico desta citocina<sup>50, 16</sup>.

Além da resposta mediada por células, os anticorpos possuem papel importante na imunopatogênese da malária. O controle da parasitemia é mediado por essas moléculas através da opsonização dos parasitas (merozoítos), bloqueio da cito-aderência e na interrupção da formação das rosetas de hemácias<sup>18</sup>. Em indivíduos residentes em áreas endêmicas, foi observada forte resposta humoral, com ativação de linfócitos B policlonais e níveis elevados de diferentes imunoglobulinas anti-*plasmodium*, que foram associadas ao menor risco para o desenvolvimento da doença, além do suporte as drogas antimaláricas durante a fase aguda<sup>56, 9, 61</sup>.

## CONCLUSÃO

A resposta imune contra os parasitas que causam a malária não oferece proteção adequada e não é capaz de promover a memória imunológica, vez que o parasita apresenta variação gênica das proteínas de membrana, permitindo que processos de reinfeção ocorram em curtos períodos de tempo.

As pesquisas e estudos apresentados nesta atualização demonstram as características peculiares e as vulnerabilidades da resposta imune ao *Plasmodium*. A descrição dos componentes envolvidos na imunopatogênese da doença podem auxiliar futuras pesquisas clínicas para o desenvolvimento de vacinas ou novos fármacos que protejam os indivíduos residentes em áreas endêmicas, impedindo a transmissão da doença.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4): 783-801, 2006
2. Amodu OK, Adeyemo AA, Olumese PE, Gbadegesin RA. Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92(1): 54-56, 1998
3. Anstey NM, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, Maguire GP. Lung injury in *vivax* malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J. Infect. Dis.* 195(4): 589-596, 2007
4. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Pricel RC. The pathophysiology of *vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 25(5): 220-227, 2009
5. Artavanis-Tsakonas K & Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* 169(6): 2956-2963, 2002
6. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol.* 133(2): 145-152, 2003

7. Barry AE. Malaria epidemiology: Insights from the genome of the malaria parasite. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 1(2): 76-86, 2005
8. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. 7(11): 875-888, 2007
9. Berezcky S, Montgomery SM, Troye-Blomberg M, Rooth I, Shaw MA, Färnert A. Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria. *Int J Parasitol*. 34(8): 935-942, 2004
10. Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med*. 45: 361-378, 1994
11. Blatteis CM. The onset of fever: new insights into its mechanism. *Prog Brain Res*. 162: 3-14, 2007
12. Boutlis CS, Yeo TW, Anstey NM. Malaria tolerance - for whom the cell tolls? *Trends Parasitol* 22(8): 371-377, 2006
13. Bozza MT, Martins YC, Carneiro LAM, Paiva CN. Macrophage Migration Inhibitory Factor in Protozoan Infections. *J Parasitol Res*. Review: 1-14, 2012
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da Malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. *Editora do Ministério da Saúde*; 52p, Brasília, 2006
15. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/10001021559.pdf>>. Acessado em: 10 de Setembro de 2012. 6 ed. rev. 320p, Brasília, 2005
16. Bueno LL, Morais CG, Araújo FF, Gomes JA, Corrêa-Oliveira R, Soares IS, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One* 5(3): 1-10, 2010
17. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167(1): 416-423, 2001
18. Carlson J, Nash GB, Gabutti V, al-Yaman F, Wahlgren M. Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood* 84(11): 3909-3914, 1994

19. Carter, R & Mendis, KN. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(4): 564-594, 2002
20. Chua CL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol.* 29(1): 26-34, 2013
21. Clark IA & Cowden WB. Why is the pathology of falciparum worse than that of vivax malaria? *Parasitol Today* 15(11): 458-461, 1999
22. Clark IA, Alleva LM, Mills AC, Cowden WB. Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions. *Clin Microbiol Rev.* 17(3): 509-539, 2004
23. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 201(1): 19-25, 2005
24. Coelho-Castelo AAM, Trombone APF, Rocha CD, Lorenzi JCC. Resposta imune a Doenças Infecciosas. *Medicina* 42(2): 127-142, 2009
25. Collins WE & Jeffery GM. *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev.* 18(3): 570-581, 2005
26. Costa AP, Bressan CS, Pedro RS, Valls-de-Souza R, Silva S, Souza PR, Guaraldo L, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Brasil P. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43(5): 571-574, 2010
27. Couper KN, Barnes T, Hafalla JCR, Combes V, Ryffel B, Secher T, Grau GE, Riley EM, Souza JB. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog.* 6(1): 1-13, 2011
28. Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol.* 198(6): 961-971, 2012
29. Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 46(2): 165-171, 2008
30. Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F. Malaria in children. *Lancet* 375(9724): 1468-1481, 2010

31. Dasari P, Heber SD, Beisele M, Torzewski M, Reifenberg K, Orning C, Fries A, Zapf AL, Baumeister S, Lingelbach K, Udomsangpetch R, Bhakdi SC, Reiss K, Bhakdi S. Digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation. *Blood* 119(18): 4301-4310, 2012
32. Deans, AM & Rowe, JA. *Plasmodium falciparum*: Rosettes do not protect merozoites from invasion-inhibitory antibodies. *Exp Parasitol*. 112(4): 269-273, 2006
33. Doolan DL & Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J. Immunol*. 163(2): 884-892, 1999
34. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*. 22(1): 13-36, 2009
35. Downey GP. Mechanism of leukocyte motility and chemotaxis. *Curr Opin Immunol* 6(1): 113-124, 1994
36. Fell AH & Smith NC. Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: is resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitol Today*. 14(9): 364-369, 1998
37. Franklin BS, Parroche P, Ataíde MA, Lauw F, Ropert C, Oliveira RB, Pereira D, Tada MS, Nogueira P, Silva LH, Bjorkbacka H, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(14): 5789-5794, 2009
38. Gazzinelli RT & Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol*. 6(12): 895-906, 2006
39. Giribaldi G, Prato M, Ulliers D, Gallo V, Schwarzer E, Akide-Ndunge OB, Valente E, Saviozzi S, Calogero RA, Arese P. Involvement of inflammatory chemokines in survival of human monocytes fed with malarial pigment. *Infect. Immun*. 78(11): 4912-4921, 2010
40. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol*. 23:69-99, 2005
41. Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol*. 23(12): 596-604, 2007
42. Hafalla JC, Cockburn IA, Zavala F. Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. *Parasite Immunol*. 28(1-2): 15-24, 2006

43. Handayani S, Chiu DT, Tjitra E, Kuo JS, Lampah D, Kenangalem E, Renia L, Snounou G, Price RN, Anstey NM, Russell B. High deformability of Plasmodium vivax-infected red blood cells under microfluidic conditions. *J. Infect. Dis.* 199(3): 445-450, 2009
44. Hemmer CJ, Holst FG, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC. Stronger host response per parasitized erythrocyte in Plasmodium vivax or ovale than in Plasmodium falciparum malaria. *Trop. Med. Int. Health* 11(6): 817-823, 2006
45. Hirunpetcharat C, Vukovic P, Liu XQ, Kaslow DC, Miller LH, Good MF. Absolute requirement for an active immune response involving B cells and Th cells in immunity to Plasmodium yoelii passively acquired with antibodies to the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein-1. *J Immunol.* 162(12): 7309-7314, 1999
46. Ho M & White NJ. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol.* 276(6): 1231-1242, 1999
47. Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol.* 176(1): 441-450, 2006
48. Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. *Infect Immun* 64(1): 44-49, 1996
49. Janeway CA Jr & Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20: 197-216, 2002
50. Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tunpradabkul S, Hisaeda H, Troye-Blomberg M, Cui L, Udomsangpetch R. Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 38(10): 2697-2705, 2008
51. Karunaweera N, Wanasekara D, Chandrasekharan V, Mendis K, Carter R. Plasmodium vivax: paroxysm-associated lipids mediate leukocyte aggregation. *Malar. J.* 6(62): 1-14, 2007
52. Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Kenangalem E, Wariker N, Maristela R, Umana KG, Vemuri R, Okoseray MJ, Penttinen PM, Ebsworth P, Sugiarto P, Anstey NM, Tjitra E, Price RN. Malaria morbidity in Papua Indonesia, an area with multidrug resistant Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum. *Malar. J.* 7(148): 1-10, 2008
53. Kawai T & Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34(5): 637-650, 2011

54. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S; Woods AS, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: Cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 280(9): 8606-8616, 2005
55. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet.* 77(2): 171-192, 2005.
56. Kyes S, Horrocks P, Newbold C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol.* 55: 673-707, 2001
57. Liehl P & Mota MM. Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts. *Int. J. Parasitol.* 42(6): 557-566, 2012
58. Lopes MF, Zamboni DS, Lujan HD, Rodrigues MM. Immunity to Protozoan Parasites. *J Parasitol Res.* Editorial: 1-3, 2012
59. Mackintosh CL, Beeson JG, Marsh K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol.* 20(12): 597-603, 2004
60. Marsh K & Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 28(1-2): 51-60, 2006
61. Mayxay M, Pukrittayakamee S, Newton P, White NJ. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends Parasitol.* 20(5): 233-240, 2004
62. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CAJr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640): 394-397, 1997
63. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164): 819-826, 2007
64. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415(6872): 673-679, 2002
65. Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, Price RN, Engwerda CR, Anstey NM, Plebanski M. Parasitedependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog* 5(4): 1-10, 2009
66. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JCR, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A. Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science* 291(5501): 141-144, 2001

67. Moxon CA, Grau GE, Craig AG. Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host. *Br. J. Haematol.* 154(6): 670-679, 2011
68. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917): 846-852, 2002
69. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol.* 27(10): 442-449, 2011
70. Ocaña-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197(2): 143-151, 2003
71. Organização Mundial de Saúde (OMS). World Malaria Report 2011. World Health Organization (WHO), Library Cataloguing-in-Publication Data, 2011. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/). Acessado em 01 de Agosto de 2012
72. Pasquetto V, Guidotti LG, Kakimi K, Tsuji M, Chisari FV. Host-virus interactions during malaria infections in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Exp. Med.* 192(4): 529-536, 2000
73. Pain A, Ferguson DJ, Kai O, Urban BC, Lowe B, Marsh K, Roberts DJ. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(4): 1805-1810. 2001
74. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, Halmen KA, Lamphier M, Olivier M, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Golenbock DT. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(6): 1919-1924, 2007
75. Powers KA, Szászi K, Khadaroo RG, Tawadros PS, Marshall JC, Kapus A, Rotstein OD. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med.* 203(8): 1951-1961, 2006
76. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(6): 79-87, 2007
77. Prudêncio M, Mota MM, Mendes AM. A toolbox to study liver stage malaria. *Trends Parasitol.* 27(12): 565-574, 2011
78. Rich SM & Ayala FJ. Evolutionary Origins of Human Malaria Parasites. In: Dronamraju KR & Arese P. Malaria: Genetic and Evolutionary Aspects. Ed. Springer Science. USA. 2006

79. Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol* 28(1-2): 35-49, 2006
80. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(2): 588-593, 1998
81. Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, Clark IA. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* 59 (9): 3280-3283, 1991
82. Roland J, Soulard V, Sellier C, Drapier AM, Di Santo JP, Cazenave PA, Pied S. NK cell responses to *Plasmodium* infection and control of intrahepatic parasite development. *J Immunol.* 177(2): 1229-1239, 2006
83. Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, Turek VF. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci.* 10: 2193-2216, 2005
84. Rosas MJ. Prevenção da malária. *Rev Port Clin Geral* 19: 263-266, 2003
85. Sakaguchi S & Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317(5838): 627-629, 2007
86. Schofield L & Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp. Med.* 177(1): 145-153, 1993
87. Schofield L & Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 5(9): 722-735, 2005
88. Schwenk RJ & Richie TL. Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. *Trends Parasitol.* 27(7): 306-314, 2011
89. Silver KL, Higgins SJ, McDonald CR, Kain KC. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cell. Microbiol.* 12(8): 1036-1045, 2010
90. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi- step paradigm. *Cell* 76(2): 301-304, 1994
91. Stoute JA. Complement receptor 1 and malaria. *Cell. Microbiol.* 13(10): 1441-1450, 2011
92. Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Schofield L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: Activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8): 4022-4027, 1997

93. Taylor SM, Molyneux ME, Simel DL, Meshnick SR, Juliano JJ. Does This Patient Have Malaria? *JAMA* 304(18): 2048-2056, 2010
94. Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect* 4(9): 883-886, 2002
95. Todryk SM, Bejon P, Mwangi T, Plebanski M, Urban B, Marsh K, Hill AV, Flanagan KL. Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4 CD25 high T cells with susceptibility in Kenyans. *PLoS One* 3(4): 1-7, 2008
96. Torre D. Early production of g-interferon in clinical malaria: Role of Interleukin-18 and Interleukin-12. *Clin. Infect. Dis.* 48(10): 1481-1482, 2009
97. Udomsanpetch R, Thanikkul K, Pukrittayakamee S, White NJ. Rosette formation by *Plasmodium vivax*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89(6): 635-637, 1995
98. Takeda K & Akira S. Toll-like Receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17(1): 1-14, 2005
99. Tauil P & Daniel-Ribeiro C. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. *Res Rev Parasitol*, 58(3-4): 163-167, 1998
100. Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, Roberts DJ. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 400(6739): 73-77, 1999
101. van Hellemond JJ, Rutten M, Koelewijn R, Zeeman AM, Verweij JJ, Wismans PJ, Kocken CH, van Genderen PJJ. Human *Plasmodium knowlesi* Infection Detected by Rapid Diagnostic Tests for Malaria. *Emerg Infect Dis.* 15(9): 1478-1480, 2009
102. Verra F, Mangano VD, Modiano D. Genetics of susceptibility to *Plasmodium falciparum*: from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies. *Parasite Immunol.* 31(5): 234-253, 2009
103. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, Andersen RF, Bejon P, Thompson F, Dunachie SJ, Edele F, Souza JB, Sinden RE, Gilbert SC, Riley EM, Hill AV. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23 (3): 287-296, 2005
104. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C, Roberts DJ. Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 35-57, 2002

105. Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood J* 98(13): 3800-3808, 2001

**Anexo 02: Artigo Original:**

Artigo Submetido à **Revista Plos One** - ISSN: 1932-6203

**IL-6 and IL-10 production triggered by *Plasmodium vivax* infection is dependent on the parasite load****IL-6 and IL-10 in *Plasmodium vivax* malaria**

Allyson Guimarães da Costa<sup>1,2</sup>; Lis Ribeiro do Valle Antonelli<sup>3</sup>; Pedro Augusto Carvalho Costa<sup>3</sup>; João Paulo Diniz Pimentel<sup>1,4</sup>; Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,2</sup>; Nadja Pinto Garcia<sup>2</sup>; Maria do Perpétuo Socorro Lopes dos Santos<sup>5</sup>; Paulo Afonso Nogueira<sup>4</sup>; Maria Izabel Ovellar Hekcmann<sup>1</sup>; Aya Sadahiro<sup>1</sup>; Andrea Teixeira-Carvalho<sup>6</sup>; Olindo Assis Martins Filho<sup>6</sup>; Adriana Malheiro<sup>1,2</sup>.

1. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, Brasil;
2. Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, Manaus, AM, Brasil;
3. Laboratório de Imunopatologia, Centro de Pesquisas René Rachou, FundaçãoOswaldo Cruz - FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil;
4. Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Manaus, AM, Brasil;
5. Instituto de Medicina Tropical de Coari, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado - FMT-HVD, Coari, AM, Brasil;
6. Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil.

## Abstract

**Background:** Recent studies have been shown that the inflammatory process, including the cytokine production, and the intense activation of innate immune responses are greater in the malaria caused by *Plasmodium vivax* than other species. Here, we examined the levels of circulating cytokines and their interaction during acute malaria.

**Material and Methods:** Blood samples were collected from *P. vivax*-infected patients at admission and from healthy donors. Circulating cytokine levels were measured by Cytometric Bead Assay or ELISA.

**Results:** *P. vivax* infection triggered the production of both inflammatory and regulatory cytokines. Levels of IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-5 and IL-10 were higher in *P. vivax*-infected patients than in healthy individuals. On the other hand, malaria patients produced lower levels of TNF- $\alpha$ , IL-12 and IL-2 than healthy individuals. While the levels of IL-10 and IL-6 were found independent on the number of malaria episodes, higher levels of these cytokines were seen in patients with higher parasite load.

**Conclusion:** A mixed pattern of pro-inflammatory and regulatory cytokines is produced in *P. vivax* malaria. Analysis of cytokine network suggested that IL-10 and IL-6 is a robust axis in malaria patients and that this interaction seems to be depend on the parasite burden.

## Introduction

Malaria is caused by infection with the protozoan parasite from the gender *Plasmodium* and affects millions of individuals causing serious morbidity. Despite *P. falciparum* is the main cause of deaths, *P. vivax* is responsible for approximately 60-70% of the malaria cases worldwide [1].

The exacerbation, as well as the control, of the disease depends on factors related to both host and parasite. In the murine model of malaria, pro-inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$  and IL-12, are required to control the parasite load in the circulation [2]. *P. falciparum* experimental infection of individuals who never had malaria caused an increase in the levels of circulating pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$ , IL-12p40 and IL-8 at the time of the appearance of parasitized erythrocytes [3]. As previously showed in the murine model of malaria, these cytokines are probably responsible for parasite control in humans [2,4,5]. On the other hand, pro-inflammatory cytokines are able to trigger pathology and the mechanism by which a balance is achieved is still unknown. The immunoregulatory cytokine IL-10 is also produced upon *Plasmodium* infection and it is likely to contribute to the regulation of inflammatory responses during malaria [6]. Indeed, high levels of IFN- $\gamma$  associated with low levels of IL-10 have been associated with the severe form of malaria caused by *P. vivax* [7]. In fact, despite most of the *P. vivax* infection has been considered a benign self-limited disease, severe complications associated with this parasite have been reported worldwide [7,8,9,10,11].

In addition to develop an effective innate immune response against the *Plasmodium*, the regulation of the inflammatory response is important to both achieve an effective adaptive immune response and to maintain the integrity of the host. To explore the role of cytokine during the malaria caused by *P. vivax* and the relationship among them, we perform cytokine measurements in the serum of *P. vivax*-infected patients and healthy donors to evaluate the different profiles of cytokines and its correlation to parasitemia. Our data show that both

inflammatory and anti-inflammatory cytokines are produced during malaria caused by *P. vivax* and the levels of IL-6 and IL-10 are dependent on the parasite load. Moreover, a series of correlation analysis showed that the production of these cytokines is strongly associated in patients bearing high parasitemia.

## Materials and Methods:

**Ethics Statement.** All protocols and consent forms were approved by the Ethical Committees on Research from the Hematology and Hemotherapy Foundation of Amazonas through the protocol CAEE (N° 0014.0.112.000-11). A signed informed consent was obtained from each subject, according to Resolution 196/96 of the National Health Board for research involving human subjects prior to enrollment in the study.

**Patients:** Patients were recruited and examined in the Tropical Medicine Institute of Medicine from Coari (linked to the Municipal Health Department of Coari and the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD), in Coari, a malaria endemic area in the Amazon region of Brazil. 5 ml of peripheral blood was collected immediately after confirmation of *P. vivax* infection by thick blood smear film (n=77). The clinical manifestations of malaria were fever, myalgia, chills, arthralgia, nausea, vomiting or diarrhea, but no patient had severe or complicated malaria. Peripheral blood was also collected from 58 healthy donors (HD) living in same endemic area who were negative for *P. vivax* infection by thick blood film. Individuals under eighteen years, pregnancy status, being treated for malaria and co-infected with HIV and hepatitis were excluded. During the analysis, patients were grouped according to the parasite load. Individuals bearing between 200 and 500 parasites/mm<sup>3</sup> were considered as low parasitemia patients, and those presenting between 501 and 100,000 parasites/mm<sup>3</sup> were considered as high parasitemia.

**Cytokine measurements.** The cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-17 were measured in cryopreserved serum using the Cytometric Bead Array kit (CBA, BD Biosciences Pharmingen, USA) following manufacturer's instructions. The cytokines IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8 and IL-12p70 were measured by ELISA (Kit Human BD™OptEIA® Set II, BD Biosciences Pharmingen, EUA).

**Cytokine network interactions.** After performing the correlation analysis between cytokines, a database was created. We then used the software Cytoscape 2.8.3 (link

<http://www.cytoscape.org/download.php>) to assess the interactions between the correlations found. The analyses were done according to the software instructions. The thickness of the lines was adjusted to represent the strength and the kind of the correlations, positive or negative. Filled or opened circles were used to represent high and low production of which cytokine, respectively.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed using Prism software, version 5.0 (GraphPad). The results were analyzed using two-tailed unpaired test. Mann Whitney testing and the Kruskal-Wallis test with the Dunn's post test were used. The correlations were analyzed through the Spearman's test since most of the data did not fit a Gaussian distribution. Differences were considered statistically significant, when  $p < 0.05$ .

## Results

### ***P. vivax* malaria patients display high levels of cytokines in the circulation.**

High levels of the pro-inflammatory cytokines, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  were found in sera from patients infected with *P. vivax*, when compared to healthy donors (HD). The levels of IL-5 and IL-10, a regulatory cytokine, were also higher in *P. vivax*-infected patients than in healthy individuals (Fig. 1). The levels of TNF- $\alpha$ , IL-12 and IL-2 were lower upon infection. The levels of IL-1 $\beta$  and IL-4 in the sera did not differ significantly when patients were compared with HD (Fig. 1).

### **The production of IL-6 and IL-10 is dependent on the levels of circulating *P. vivax*.**

The levels of IL-6 and IL-10 were evaluated in patients presenting the first episode of malaria and patients reporting less than five or five or more episodes of the diseases. Similar levels of both IL-6 and IL-10 were seen in the three group of patients analyzed (Fig. 2A). Despite no relation were observed between the number of malaria episodes and the levels of IL-6 and IL-10, patients with higher parasitemia produced higher levels of both cytokines (Fig. 2B, C). No correlations were observed between the other cytokine assessed and the number of malaria episodes or parasitemia (data not shown).

### **Overall signature of high cytokine producers triggered by *P. vivax* infection.**

Aiming to further characterize the overall signature of circulating cytokine, the global median cytokine were calculated for each cytokine from *P. vivax*-infected patients and HD (*P. vivax*: IL-1 $\beta$  = 0.0; IL-2 = 3.34; IL-4 = 8.42; IL-5 = 5.29; IL-6 = 19.69; IL-8 = 7.98; IL-10 = 44.765; IL-12 = 741.1; TNF- $\alpha$  = 6.235; IFN- $\gamma$  = 4.13; HD: IL-1 $\beta$  = 0.615; IL-2 = 3.86; IL-4 = 8.635; IL-5 = 0.0; IL-6 = 15.605; IL-8 = 4.06; IL-10 = 14.46; IL-12 = 1335.3; TNF- $\alpha$  = 7.555; IFN- $\gamma$  = 2.525)

(data not shown). Patients and HD who presented higher frequencies of cytokine producing cells than the median were considered high producer and the ones who presented lower frequencies than the median were considered low producers (Fig. 3). These cut off values were used for each individual and single HD (left panel) and single patients (right panel) are represented in a single line as high (back squares) and low producers (open squares). Proportions of individuals producing high levels of cytokines were first calculated for HD and the cytokines were represented in an ascendant pattern (left, bottom panel). The curve generated in this graph was superimposed on a second one representing the frequencies of patients producing high levels of each cytokine (right, bottom panel). *P. vivax*-infected patients displayed higher frequencies of high producers of IL-10, IL-8, IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-5 and lower proportions of, TNF- $\alpha$ , IL-2 and IL-12p70 when compared with HD.

### ***P. vivax* infection triggers a robust network connecting pro-inflammatory and regulatory cytokines**

In order to test in which degree the relationship among the levels of cytokine are altered upon *P. vivax* infection, a series of correlation analysis were performed. Comparisons that demonstrated significant negative or positive correlations are represented in Figure 4. The omission of a given correlation indicates that a given pair showed no associations between one another. In the absence of *P. vivax* infection, several correlations are observed. IL-6 is strongly correlated with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  with IL-2 (Fig. 4, upper, left panel). Moderated correlations are observed between IL-10 and IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 and between TNF- $\alpha$ , IL-4. Interestingly, besides the correlation between TNF- $\alpha$  and IL-4, all the moderate correlations are lost upon *P. vivax* infection (Fig. 4, upper, right panel). A strong, positive, correlation was seen between IL-10 and IL-6 when cytokines levels were analyzed. The same correlation analyses were performed categorizing the malaria patients in two different groups: low and high parasitemia. As we can observe, almost no correlation between the

production of different cytokines is seen in patients bearing low parasite load (Fig. 4, middle, left panel). On the other hand, correlations between cytokines considered weak in the malaria group became moderate when only patients with high parasitemia were considered for the analysis (Fig. 4, middle, right panel). The bottom panel shows interactions that are malaria independent and the ones acquired and lost upon *P. vivax* infection.

**Discussion:**

Malaria is a complex disease that affects approximately 300 million people every year. Among the different *Plasmodium* species that infect humans, *P. vivax* is responsible for approximately 60–80% of the malaria cases in the world [12,13]. While they are also essential for limiting the parasite load, in almost every infection, pro-inflammatory cytokines create a harmful microenvironment in the host, leading to pathology. Upon an infection, the inflammatory response needs to modulate not only to avoid pathology but also to allow the parasite control. This delicate balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory responses appears to be a major determinant of the clinical outcome of *Plasmodium* infection. Indeed, it has been reported that in severe disease caused by *P. vivax*, patients produce high levels of IFN- $\gamma$  and low levels of IL-10 [7]. On the other hand, high levels of IL-10 and low levels of IFN- $\gamma$  were observed in patients experiencing the mild clinical form of the disease [7]. In the present report, we have addressed this issue by assessing the levels of cytokines and correlating them with parasitemia and number of malaria episodes. Our findings establish a clear interaction between an inflammatory cytokine, IL-6, and an anti-inflammatory cytokine, IL-10 and their correlation with parasite load during malaria caused by *P. vivax*.

As described here the infection with the *P. vivax* caused an increase in the levels of cytokines produced by cells from the innate and adaptive immune system. *P. vivax*-infected patients displayed higher levels of IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-5 compared to HD. It has been shown in malaria, the importance of IL-6 and IL-8, which are produced mostly by monocytes [14]. Despite previous data have reported monocytes as the main source of IL-10 among cells from the innate immune system during malaria [14], this immunomodulatory cytokine can also be produced by T cells subpopulation such as T regulatory cells (Treg) in *P. falciparum* infection [6]. Also during malaria caused by *P. falciparum*, IFN- $\gamma$  can be produced by cells from both innate and adaptive immune system: NK cells, gamma-delta T cells and CD4 and CD8 alpha-beta T cells [15].

The levels of TNF- $\alpha$ , IL-12 and IL-2 were lower in *P. vivax*-infected patients compared to HD. Data from the literature are still unclear about the induction of TNF- $\alpha$  during *P. vivax* infection. Despite Goncalves and coworkers have described higher levels of circulating TNF- $\alpha$  in *P. vivax*-infected patients, other two different groups reported no induction of this cytokines during malaria [7,14,16,17]. IL-12 and IL-2, cytokines that contribute to the development of Th1 immune responses, were lower in *P. vivax*-infected patients than in HD. In malaria caused by *P. falciparum*, the levels of IL-12 decrease along with the increase of parasite load, suggesting its importance for parasite control (10). IL-2 has been also shown to be important during immune responses against *P. falciparum*. IL-2 leads to the activation of NK cells that in their turn produce IFN- $\gamma$ , the most important cytokine for parasite control [2,18].

Recently, it has been reported that the number of malaria infections caused by *P. falciparum* does not alter the levels of IL-6 and IL-10 [19]. Even in murine models of malaria, the influence of repeated exposures to *Plasmodium sp* in the production of cytokines is not well characterized. Furthermore, repeated malaria episodes have not been able to alter significantly *Plasmodium*-specific antibody levels [20,21,22,23,24]. To assess the influence of repeated exposures to *P. vivax*, our patients were classified in three groups according to the numbers of malaria episodes reported. No significant differences in the levels of any cytokine were found among patients presenting the first episode, up to five or more than five episodes of malaria. The lack of difference in the levels of IL-6 and IL-8 according to the number of malaria episodes was expected since they are cytokines produced by cells from the innate immune system [14,25,26]. However, it was expected that the levels of IL-10, IFN- $\gamma$  and even IL-5 presented differences between individual experiencing different number of malaria episodes due to the fact that these cytokines are also produced by cells from the adaptive immune response [14,27,28,29]. Interestingly, despite no relation were observed between the number of malaria episodes and the levels of IL-6 and IL-10, patients with higher parasitemia produced higher levels of both cytokines. It has been reported that *P. vivax*

infection induces a significant augmentation of circulating Treg producing IL-10 [30]. Despite no correlation were assessed between IL-10 and parasite load in this study, the authors found a positive correlation between the number of Treg and parasite burden [30].

In the absence of immunoregulation, the increase of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8 and IFN- $\gamma$  can be harmful to the host. IL-6 is produced by monocytes and can act direct on monocytes/macrophages determining their fate [31,32]. This inflammatory cytokine display a direct relation to the generation of fever, the hallmark of the acute phase of malaria [33,34]. Despite higher levels of IL-8, another inflammatory cytokine, are found in the circulation of *P. vivax*-infected patients, the chemotaxis of neutrophils towards this chemokine has been reported to be impaired during malaria [14]. No direct correlations were reported between IL-8 levels and severity or complications of malaria caused by *P. vivax*. In fact, a negative correlation between IL-8 levels and parasite burden was previously observed in Turkey [35]. It has been reported that mortality of patients with malaria and bacteremia is three to eight times higher than in individuals with malaria alone [36], and epidemiological evidence supports the hypothesis that infection with malaria predisposes to infection and mortality from pathogenic bacterial infections. In this context, the response of neutrophils to IL-8 is essential for the control of bacterial infections, avoiding complications caused by co-infection with *Plasmodium*. Different from IL-6 and IL-8, evidences suggest that exacerbated levels of IFN- $\gamma$  are directly correlated with the severity of the malaria caused by *P. vivax* and the more severe the symptoms the lower levels of IL-10 are produced [7].

To determine the interaction of cytokines triggered by *P. vivax* infection a network analysis was applied to the data. In the physiological conditions, strong correlations between the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  and between the levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  were observed.

Interestingly these interactions become weaker upon *P. vivax* infection. Malaria patients in their turn, display a strong correlation between the levels of IL-6 and IL-10. The net of interaction also makes evident the alterations in the levels of cytokines produced by HD and patients, as shown by the colors of the circles representing each cytokine. No interactions were observed between IL-1 $\beta$  and other cytokines, neither its levels were altered during malaria. Interesting, when the patients were segregated in individuals presenting low and high parasite burden, important changes were observed. Only few cytokine interactions were found among patients bearing low parasitemia. On the other hand, the correlations between cytokines that were weaker when patients were evaluated all together became moderate when patients presenting high parasitemia were analyzed. The strong interaction observed among malaria patients were only maintained in the group of patients with high parasitemia, However, this interaction became moderate when the network were analyzed in the group of patients with low parasitemia. In fact, the higher the levels of IL-6 and IL-10, the more parasites are found in the patients. Since none of our patients presented severe or complicated malaria, the correlation between IL-6 and IL-10 seems to suggest an attempt of IL-6 to induce mechanisms that control the parasite and IL-10, in its turn, to control the inflammation [37]. Mendonça e coworkers recently showed correlation between the levels of IL-10 and parasite burden in patients experiencing severe malaria caused by *P. vivax* [38]. The study also shows that individuals with asymptomatic malaria displayed multiple significant interactions involving IL-4 [38]. Indeed, the correlations preserved despite the *P. vivax* infection were in their majority interacted with IL-4.

All together, our study shows that *P. vivax* triggers the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, both correlated with parasite burden. Moreover, we demonstrated that the pattern of interactions among cytokines during malaria is dependent on the parasite load. Our data brings new information for the understanding of the immunoregulation of inflammatory response during malaria.

## References

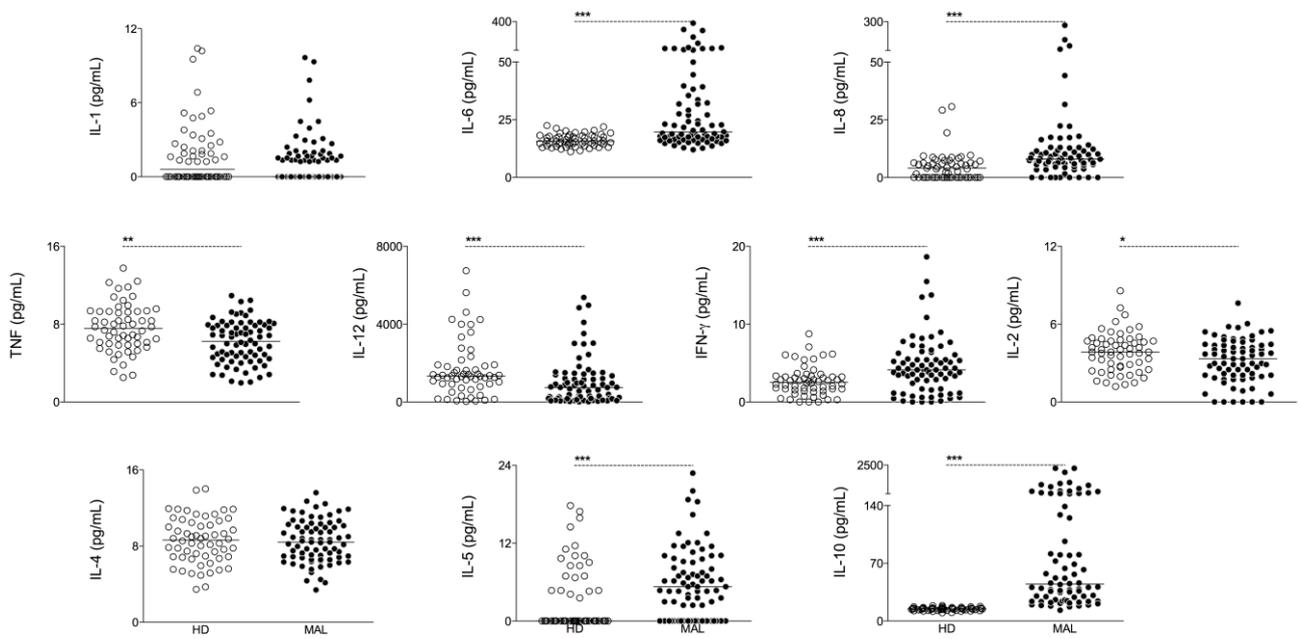
1. Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, et al. (2012) A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1814.
2. Su Z, Stevenson MM (2000) Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infect Immun* 68: 4399-4406.
3. Hermsen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loe C, van Deuren M, et al. (2003) Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clin Exp Immunol* 132: 467-472.
4. Su Z, Stevenson MM (2002) IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *J Immunol* 168: 1348-1355.
5. van der Heyde HC, Pepper B, Batchelder J, Cigel F, Weidanz WP (1997) The time course of selected malarial infections in cytokine-deficient mice. *Exp Parasitol* 85: 206-213.
6. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, et al. (2009) Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* 5: e1000364.
7. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarencio J, Camargo LM, et al. (2010) Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 9: 13.
8. Barcus MJ, Basri H, Picarima H, Manyakori C, Sekartuti, et al. (2007) Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg* 77: 984-991.
9. Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, et al. (2008) *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 5: e127.
10. Daniel-Ribeiro CT, Lacerda MV, Oliveira-Ferreira J (2008) [*Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses]. *Bull Soc Pathol Exot* 101: 243-248.
11. Lacerda MV, Mourao MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhaes BM, et al. (2012) Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J* 11: 12.
12. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, et al. (2009) Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* 9: 555-566.
13. WHO (2010) Malaria.

14. Leoratti FM, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PA, et al. (2012) Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1710.
15. Horowitz A, Newman KC, Evans JH, Korbel DS, Davis DM, et al. (2010) Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 184: 6043-6052.
16. Goncalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, et al. (2010) CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun* 78: 4763-4772.
17. Goncalves RM, Scopel KK, Bastos MS, Ferreira MU (2012) Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PLoS One* 7: e44394.
18. Horowitz A, Hafalla JC, King E, Lusingu J, Dekker D, et al. (2012) Antigen-specific IL-2 secretion correlates with NK cell responses after immunization of Tanzanian children with the RTS,S/AS01 malaria vaccine. *J Immunol* 188: 5054-5062.
19. Moncunill G, Mayor A, Jimenez A, Nhabomba A, Puyol L, et al. (2013) Cytokine and Antibody Responses to *Plasmodium falciparum* in Naive Individuals during a First Malaria Episode: Effect of Age and Malaria Exposure. *PLoS One* 8: e55756.
20. Achtman AH, Stephens R, Cadman ET, Harrison V, Langhorne J (2007) Malaria-specific antibody responses and parasite persistence after infection of mice with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Parasite Immunol* 29: 435-444.
21. Costa JD, Zanchi FB, Rodrigues FL, Honda ER, Katsuragawa TH, et al. (2013) Cross-reactive anti-PfCLAG9 antibodies in the sera of asymptomatic parasite carriers of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 98-105.
22. Freitas do Rosario AP, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, Sardinha LR, Zago CA, et al. (2008) Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to *Plasmodium chabaudi* AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody. *J Immunol* 181: 8344-8355.
23. Souza-Silva FA, da Silva-Nunes M, Sanchez BA, Ceravolo IP, Malafrente RS, et al. (2010) Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 82: 185-193.
24. Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, et al. (2010) Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog* 6: e1000770.
25. Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, Sehgal PB, May LT, et al. (1988) Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science* 239: 502-504.
26. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, 3rd, Weiss SJ (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254: 99-102.

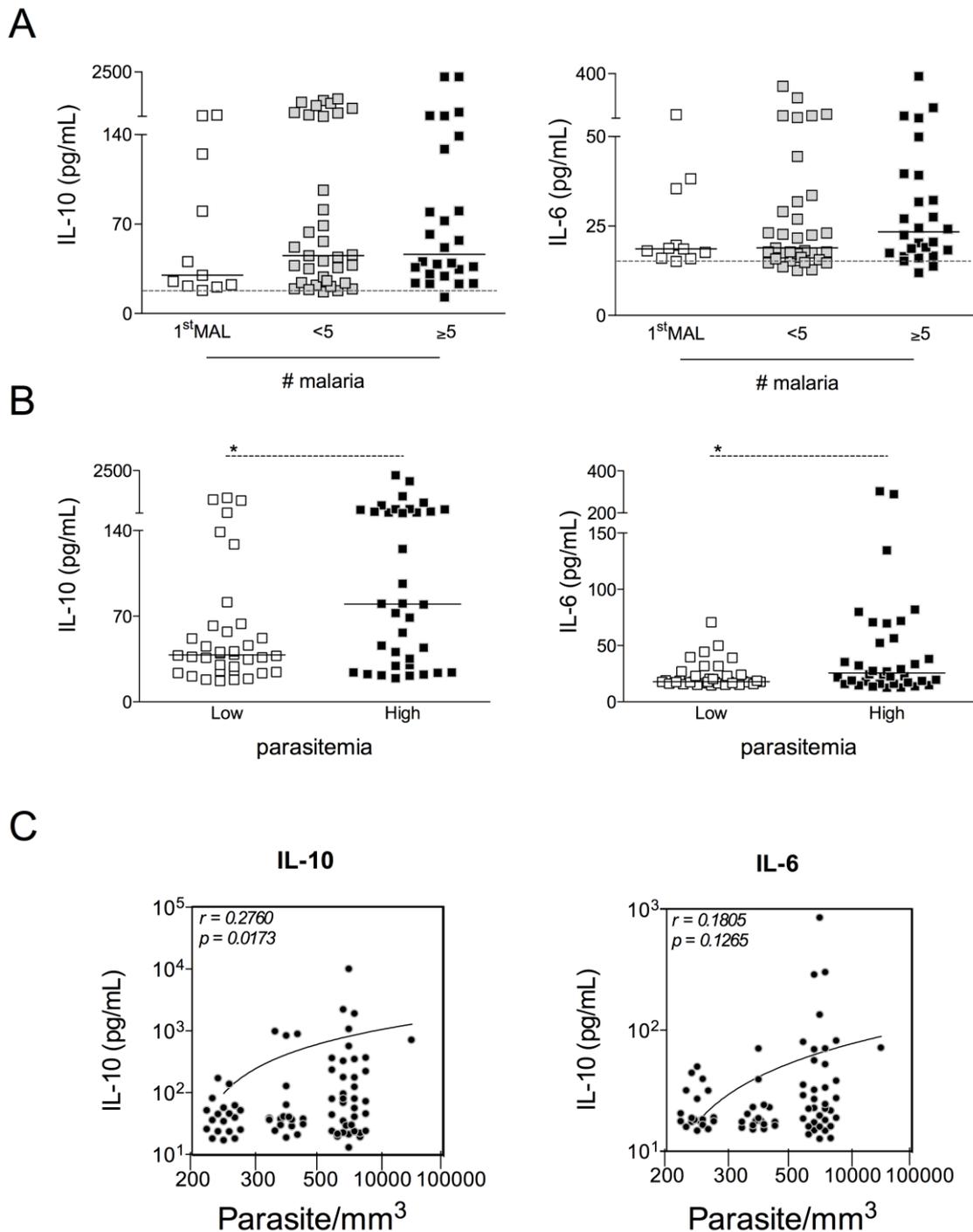
27. Troye-Blomberg M, Andersson G, Stoczkowska M, Shabo R, Romero P, et al. (1985) Production of IL 2 and IFN-gamma by T cells from malaria patients in response to Plasmodium falciparum or erythrocyte antigens in vitro. *J Immunol* 135: 3498-3504.
28. Taguchi T, Aicher WK, Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, et al. (1991) Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3+, gamma/delta TCR+ T cells produce IFN-gamma and IL-5. *J Immunol* 147: 3736-3744.
29. Eckwalanga M, Marussig M, Tavares MD, Bouanga JC, Hulier E, et al. (1994) Murine AIDS protects mice against experimental cerebral malaria: down-regulation by interleukin 10 of a T-helper type 1 CD4+ cell-mediated pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8097-8101.
30. Bueno LL, Morais CG, Araujo FF, Gomes JA, Correa-Oliveira R, et al. (2010) Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One* 5: e9623.
31. Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, et al. (2012) Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation* 9: 40.
32. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, et al. (2011) M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol* 187: 1157-1165.
33. Nijsten MW, de Groot ER, ten Duis HJ, Klasen HJ, Hack CE, et al. (1987) Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet* 2: 921.
34. Banks WA, Kastin AJ, Gutierrez EG (1994) Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 179: 53-56.
35. Zeyrek FY, Kurcer MA, Zeyrek D, Simsek Z (2006) Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey. *Parasite Immunol* 28: 201-207.
36. Berkley JA, Bejon P, Mwangi T, Gwer S, Maitland K, et al. (2009) HIV infection, malnutrition, and invasive bacterial infection among children with severe malaria. *Clin Infect Dis* 49: 336-343.
37. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220.
38. Mendonca VR, Queiroz AT, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M (2013) Networking the host immune response in Plasmodium vivax malaria. *Malar J* 12: 69.

## Figure legends

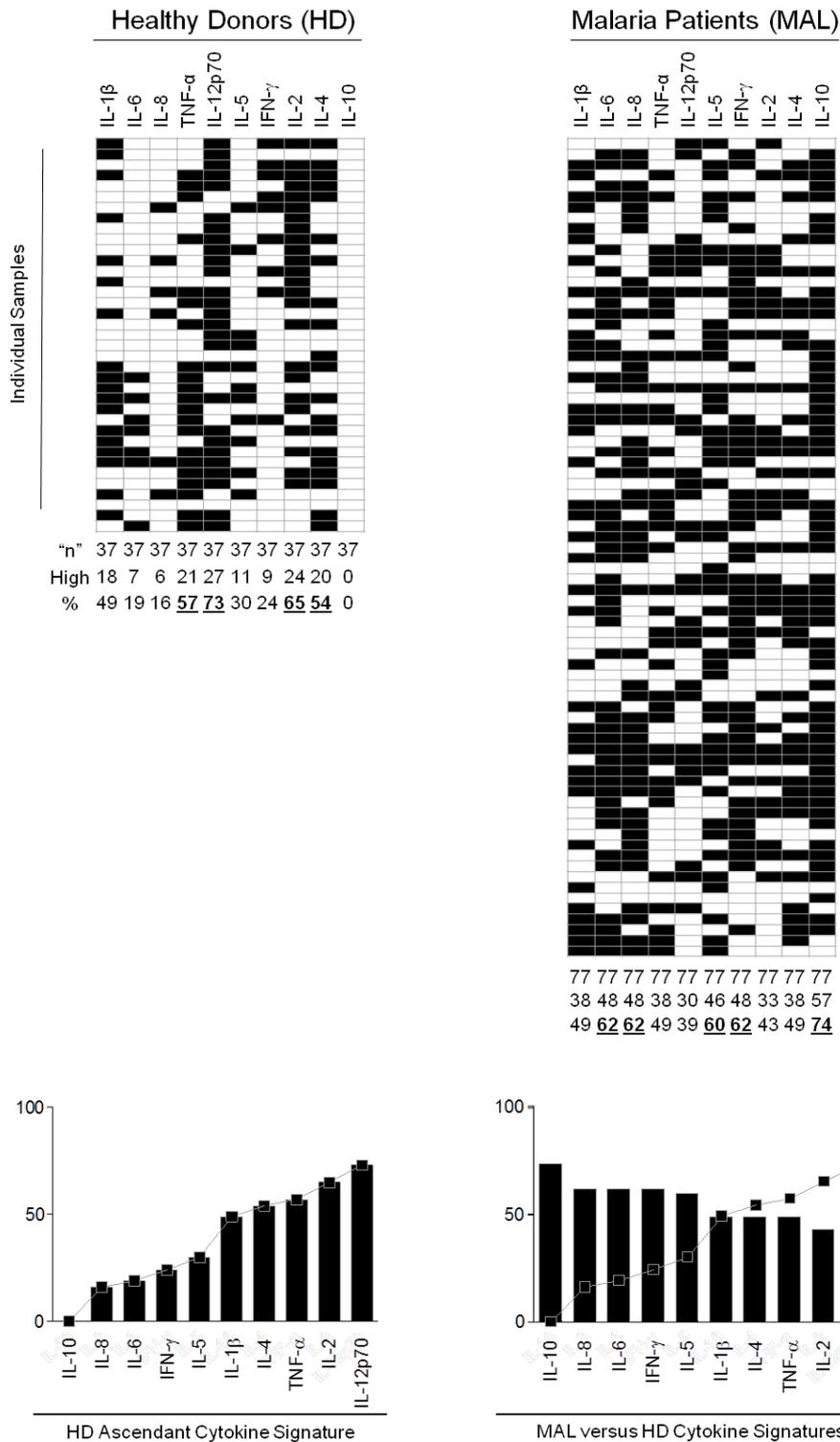
**Figure 1. High levels IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IL-5 and IL-10 are found in the circulation of patients infected with *P. vivax*.** The cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 and IL-10 were measured in the serum of healthy donors (open circles) and *P. vivax*-infected subjects (closed circles). Levels of cytokines were measured employing ELISA or Cytometric Bead Array (CBA).



**Figure 2. Levels of IL-6 and IL-10 are dependent on parasitemia.** Levels of IL-6 (graphs on the right) and IL-10 (graphs on the left) were measured and analyzed based on the number of malaria episodes (**A**) and on the parasitemia (**B**). Correlation between the levels of IL-6 and IL-10 (y-axis) and parasite load (x-axis) (**C**). Levels of cytokines were measured employing ELISA or Cytometric Bead Array (CBA).



**Figure 3 – Overall signature of high cytokine producers triggered by *P. vivax* infection.** Each healthy donor (top, left panel) or *P. vivax*-infected patient (top, right panel) is represented in a single line in the diagram as low (open squares) or high (black squares) cytokine producer. Bars graphs represent the proportions of high cytokine producers of HD and malaria patients (left and right bottom panels, respectively). The lines superposing the graphs represent the proportions of high cytokine producers of HD.



**Figure 4 – Interactions among circulating cytokines.** Plasma levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 and IL-10 were measured in the serum of healthy donors and *P. vivax*-infected subjects. Each connecting line represents a significant correlation between a pair of cytokines. Dashed lines represent negative correlations. Solid lines represent positive correlations and the degree of significance is represented by the line thickness. Filled circles represents higher producers and open circles represent low producers of a specific cytokines. Top panels represent cytokine interactions in HD (top, left diagram) and *P. vivax*-infected subjects (top, right diagram). Middle panels represent cytokine interaction in *P. vivax* presenting low (low) and high parasitemia (right). Bottom panels represent cytokine interactions that are preserved upon *P. vivax* infection and interactions gained or lost during malaria.

