

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Caracterização de moléculas reguladoras durante a
malária *vivax***

por

PEDRO AUGUSTO CARVALHO COSTA

**Belo Horizonte
Fev/2013**

DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR P.A.C.COSTA 2013

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Caracterização de moléculas reguladoras durante a
malária *vivax***

por

PEDRO AUGUSTO CARVALHO COSTA

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre
em Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

**Belo Horizonte
Fev/2013**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C837

2013

Costa, Pedro Augusto Carvalho.

**Caracterização de moléculas reguladoras
durante a malária *vivax* / Pedro Augusto Carvalho
Costa. - Belo Horizonte, 2013.**

xv, 81 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 86 - 95

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária *vivax*/imunologia 2. *Plasmodium vivax*/patogenicidade 3. Imunidade adaptativa/imunologia I. Título. II. Antonelli, Lis Ribeiro do Valle (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Caracterização de moléculas reguladoras durante a
malária *vivax***

por

PEDRO AUGUSTO CARVALHO COSTA

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Presidente)

Prof. Dr. Kenneth John Gollob

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho

Suplente: Cristina Toscano Fonseca

Dissertação defendida e aprovada em 19/02/2013.

*Dedico esse trabalho a todos que
me apoiaram.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais pela credibilidade, confiança e suporte.

A Lis por todo o apoio.

Aos meus amigos que muito me ajudaram quando precisei.

Aos colegas do laboratório pelos ensinamentos e paciência.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento: FAPEMIG, CNPq, INCTV, FIOCRUZ

| | |
|--|----|
| 4.7.1 CBA..... | 43 |
| 4.7.2 ELISA..... | 44 |
| 4.8 Avaliação da capacidade proliferativa..... | 44 |
| 4.9 Análise estatística..... | 44 |
| 4.10 Avaliação por comitês de ética..... | 45 |
| | |
| 5 RESULTADOS..... | 46 |
| 5.1 Caracterização da população..... | 47 |
| 5.2 Influência da malária sobre o compartimento linfocitário..... | 48 |
| 5.3 Avaliação dos níveis de citocinas em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 49 |
| 5.4 Padronização do painel..... | 50 |
| 5.5 Estratégias de <i>gate</i> adotada para caracterização das populações..... | 56 |
| 5.6 Caracterização fenotípica de células T..... | 57 |
| 5.7 Co-expressão dos marcadores avaliados..... | 62 |
| 5.8 Co-expressão exclusiva dos marcadores avaliados..... | 69 |
| 5.9 Avaliação das correlações..... | 71 |
| 5.9.1 Correlação entre marcadores..... | 71 |
| 5.9.2 Correlação entre dados laboratoriais..... | 73 |
| 5.9.3 Correlação entre dados laboratoriais e marcadores..... | 73 |
| | |
| 6 DISCUSSÃO..... | 76 |
| | |
| 7 CONCLUSÃO..... | 84 |
| | |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 86 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Ciclo do parasito no vetor..... | 27 |
| Figura 2: Ciclo do parasito no hospedeiro..... | 28 |
| Figura 3: Esquema representativo da resposta imune ao <i>Plasmodium vivax</i> durante a fase sanguínea da doença..... | 32 |
| Figura 4: Anticorpos e fluoróforos utilizados para imunofenotipagem..... | 42 |
| Figura 5: Pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam diminuição do número absoluto de linfócitos..... | 48 |
| Figura 6: Pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam níveis aumentados de IL-6 e IL-10 circulantes..... | 49 |
| Figura 7: Construção progressiva de painel multicolor em células T CD4..... | 51 |
| Figura 8: Construção progressiva de painel multicolor em células T CD8..... | 52 |
| Figura 9: Construção progressiva de painel multicolor em células T CD4 duplo-positivas..... | 54 |
| Figura 10: Construção progressiva de painel multicolor em células T CD8 duplo-positivas..... | 55 |
| Figura 11: Estratégia de combinação de <i>gates</i> para seleção de populações a serem analisadas..... | 56 |
| Figura 12: Expressão de ICOS é induzida em células T CD4 e CD8 de pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 57 |
| Figura 13: Expressão de CTLA-4 por células T CD4 e CD8 é induzida em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 58 |
| Figura 14: Expressão de PD-1 por células T CD4 e CD8 é induzida em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 59 |
| Figura 15: Expressão de TIM-3 por células T CD4 e CD8 é induzida em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 60 |
| Figura 16: Expressão de LAG-3 por células T CD8 é induzida pela infecção pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 61 |
| Figura 17: Expressão de Ki67 é induzida em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 62 |
| Figura 18: A infecção pelo <i>P. vivax</i> induz a co-expressão de moléculas reguladoras em células T CD4 e CD8..... | 64 |
| Figura 19: A infecção pelo <i>P. vivax</i> induz a co-expressão de moléculas reguladoras em células T CD4 e CD8..... | 65 |
| Figura 20: A infecção pelo <i>P. vivax</i> induz a co-expressão de moléculas reguladoras em células T CD4 e CD8..... | 66 |
| Figura 21: A infecção pelo <i>P. vivax</i> induz a co-expressão de moléculas reguladoras..... | 67 |
| Figura 22: A infecção pelo <i>P. vivax</i> induz a co-expressão de moléculas reguladoras em células T CD4 e CD8..... | 68 |
| Figura 23: Aumento da co-expressão de receptores em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 70 |
| Figura 24: Aumento de populações que co-expressam receptores em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> | 71 |
| Figura 25: Correlação negativa entre plaquetas (mm ³) e TGO (U/L) de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> | 73 |
| Figura 26: Níveis de TGO correlacionam com expressão de marcadores imunológicos em pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> | 74 |

Figura 27: Número de plaquetas correlacionam com a expressão de marcadores imunológicos por células T em pacientes infectados pelo *P. vivax*.....75

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|-----------|
| Quadro 1: Quadro representativo das regiões endêmicas determinadas pela OMS..... | 24 |
| Quadro 2: Caracterização clínica dos pacientes infectados e após cura..... | 47 |
| Quadro 3: Correlações das populações de células T CD4 em pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i>..... | 72 |
| Quadro 4: Correlações das populações de células T CD8 em pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i>..... | 72 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- APC – célula apresentadora de antígenos (do inglês *antigen-presenting cell*)
APC – aloficocianina
ART – tratamento anti-retroviral
CBA – *cytokine bead array*
CD – *cluster of differentiation*
CTLA-4 – antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)
Cu – cobre
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP – trifosfatos desoxirribonucleotídeos
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC – isotiocianato de fluoresceína
GPI – glicosilfosfatidilinositol
HIV – vírus da imunodeficiência humana
ICOS – co-estimulador induzível de células T (do inglês *inducible T-cell costimulatory*)
ICOS-L – ligante do co-estimulador induzível de células T (do inglês *inducible T-cell costimulatory ligand*)
IFN- γ – interferon- γ
IgV – imunoglobulina V
IL – interleucina
IPA – índice parasitário anual
IRIS – síndrome inflamatória de imunorreconstituição
iTreg – T reguladora induzida
LAG-3 – gene 3 de ativação linfocitária (do inglês *lymphocyte-activation gene 3*)
MHC – complexo de histocompatibilidade principal
NFATc1 – Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático 1 (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*)
NO – óxido nítrico
nTreg – T reguladora natural
PBMC – células mononucleares de sangue periférico
PBS – tampão salina fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
PD-1 – morte programada-1 (do inglês *Programmed death-1*)
PD-L1 – morte programada-ligante 1 (*Programmed death – ligand 1*)
PD-L2 – morte programada-ligante 2 (*Programmed death – ligand 2*)
PE – *Ficoeritrina*
P. vivax – *Plasmodium vivax*
SOD-1 – Superóxido dismutase 1
TCR – receptor de célula T
Th – T auxiliar (do inglês *T helper*)

TIM-3 – domínios de mucina e imunoglobulina de célula T (do inglês *T cell immunoglobulin domain, mucin domain-3*)

RESUMO

No Brasil a malária ainda é considerada um grande problema de saúde pública. Embora o número de casos de malária esteja diminuindo, a incidência foi maior que 300.000 casos nos últimos dois anos. Destes casos, o *Plasmodium vivax* foi considerado o principal agente causador, com 90% de incidência. A resposta imune adaptativa, com o auxílio da imunidade inata, tem a função de superar as estratégias impostas pelos agentes infecciosos, levando ao controle da infecção. A ativação de células T envolve além da sinalização através do receptor de célula T (TCR), sinalização secundária desencadeada por moléculas reguladoras. A combinação das interações mediadas por estes regula a extensão, qualidade e duração da ativação de células T e, portanto, influenciam significativamente no curso das respostas imunes em questão. O objetivo desse trabalho é avaliar o fenótipo de células T de pacientes infectados pelo *P. vivax* com o foco na expressão de moléculas reguladoras como morte programada-1 (PD-1), co-estimulador induzível de células T (ICOS), antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), domínios de mucina e imunoglobulina de célula T (TIM-3) e gene 3 de ativação linfocitária (LAG-3). Células mononucleares do sangue periférico foram coletadas de pacientes infectados pelo *P. vivax* em Porto Velho, RO. Os linfócitos foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados demonstram um aumento de citocinas inflamatórias e uma diminuição no número de linfócitos em pacientes infectados pelo *P. vivax*. Na literatura, a expressão desses receptores inibidores e moléculas co-estimulatórias é associada com a diminuição de função de células T. Nossos resultados demonstram um aumento da expressão das moléculas citadas acima em pacientes infectados pelo *P. vivax*. O aumento da expressão de algumas dessas moléculas correlacionam com o dano hepático e com plaquetopenia em pacientes infectados pelo *P. vivax*. Além disso, foi observado um aumento da expressão de um marcador específico da proliferação celular, o Ki67, em pacientes infectados pelo *P. vivax*. A caracterização fenotípica aqui realizada sugere disfuncionalidade das células T. Estudos adicionais devem ser realizados para avaliar a função destas moléculas durante a malária.

ABSTRACT

In Brazil, malaria is still considered a major public health problem. Although the number of malaria cases is declining, the incidence was greater than 300,000 cases in the past two years. Of these cases, *Plasmodium vivax* was considered the main causative agent, with 90% incidence. The adaptive immune response, along with innate immunity, has the function to overcome the strategy imposed by infectious agents, leading to infection control. The activation of T cells involves signaling through the T cell receptor (TCR) and regulatory receptors. The combination of these interactions regulates the extent and quality of the T cell activation and therefore influences significantly the course of immune responses in question. The aim of this study is to evaluate the phenotype of T cells from patients infected with *P. vivax* focusing on the expression of regulatory receptors such as programmed death-1 (PD-1), inducible T cell stimulator (ICOS), cytotoxic T lymphocyte attenuator (CTLA-4), T-cell immunoglobulin and mucin domain domain 3 (TIM-3) and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3). Peripheral blood mononuclear cells were collected from patients infected with *P. vivax* in Porto Velho, RO. Lymphocytes were analyzed by flow cytometry. Our data demonstrate an increase in inflammatory cytokines levels and a decrease in the number of lymphocytes during malaria. It has been described that the expression of these inhibitory receptors and costimulatory molecules is associated with decreased T cell function. Our results demonstrate that *P. vivax* infection triggers an increase in the expression of all molecules mentioned above. Increased expression of some of these molecules correlates with liver damage and thrombocytopenia. Moreover, we observed increased expression of a proliferation marker, the Ki67, in the same patients. The phenotype observed suggests a T cell dysfunction. Further studies have to be performed to evaluate the role of these molecules during malaria.

1 Introdução

A maioria dos trabalhos em malária que abordam o papel de moléculas reguladoras no desenvolvimento da resposta imunológica efetora e de memória são de natureza descritiva, e muitas vezes realizados somente em modelo experimental. Recentemente, foi demonstrado que o aumento na expressão do receptor PD-1 em células T CD4 e em menor extensão nas células T CD8 está relacionada com o desenvolvimento da Síndrome Inflamatória de Imunorreconstituição (IRIS) por indivíduos portadores do HIV que são submetidos a terapia anti-retroviral altamente ativa (1). Linfócitos T CD8 de pacientes com HIV expressando PD-1 foram anteriormente descritos como tendo capacidade diminuída de produzir mediadores inflamatórios e de evoluírem para a construção de memória imunológica (2).

A participação de receptores como PD-1 e TIM-3 no desenvolvimento da resposta imunológica tem sido abordada no contexto de infecções crônicas como HIV e LCMV, nas quais a persistência do agente agressor favorece o desligamento de células efetoras do sistema imunológico e a falha no estabelecimento de memória pelo hospedeiro. Acreditamos que este fenômeno não esteja acontecendo exclusivamente durante infecções crônicas, mas também em infecções nas quais a exposição aguda a agentes agressores é capaz de induzir inflamação exacerbada, como é o caso da malária. Desse modo a hipótese de nosso trabalho foi avaliar a expressão aumentada de ICOS, CTLA-4, PD-1, TIM-3 e LAG-3, moléculas de cunho regulador em células T parasito-específicas que são desencadeadas pela inflamação decorrente da infecção pelo *P. vivax*. Além disso, nosso trabalho avalia a capacidade proliferativa de células T CD4 e CD8 pela presença do Ki67, uma molécula sabidamente encontrada durante a intérfase celular. Por fim, a imunofenotipagem dessas moléculas foi correlacionada com parâmetros bioquímicos e hematológicos demonstrando a importância clínica desses marcadores. Nesse contexto, o presente estudo é de fundamental importância, uma vez que nos trará informações relevantes acerca da capacidade prejudicada do hospedeiro em controlar a infecção pelo *P. vivax*, prevenir reações inflamatórias exacerbadas e, por fim, desenvolver memória imunológica. Além de propiciar um maior entendimento dos mecanismos de regulação do sistema imunológico durante processos infecciosos, estas informações poderão auxiliar futuramente no desenvolvimento de imunoterapia e vacina.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de moléculas reguladoras em células T de pacientes infectados pelo *P. vivax* e correlacioná-las com parâmetros clínicos e hematológicos possivelmente envolvidos no desenvolvimento de resposta imune protetora durante a malária.

Para que o objetivo proposto pudesse ser alcançado, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

2.2 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Avaliar a expressão de citocinas no plasma de pacientes portadores malária *vivax* e dos mesmos após o tratamento;

avaliar no plasma congelado os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 por CBA;

avaliar no plasma congelado o nível de IFN- γ por ELISA;

Objetivo específico 2: Avaliar fenotipicamente as células T de sangue periférico de paciente portadores de malária *vivax*:

padronizar o painel de anticorpos para o ensaio de imunofenotipagem multicolor para a avaliação da expressão de moléculas reguladoras em células T;

avaliar a expressão dos receptores PD-1, ICOS, CTLA-4, LAG-3 e TIM-3 em células T CD4 e CD8 de pacientes na fase aguda da infecção malárica;

avaliar, um mês após o tratamento com drogas antimaláricas, a expressão das moléculas reguladoras;

avaliar a capacidade proliferativa, através de expressão de Ki67, de células T CD4 e CD8 de paciente durante a fase aguda da doença e nos mesmos após o tratamento com drogas antimaláricas;

avaliar a co-expressão de moléculas reguladoras em células T de pacientes durante a fase aguda da infecção malárica e nos mesmos após o tratamento com drogas antimaláricas;

Objetivo específico 3: Estudar as correlações entre fenótipos imunológicos e indicadores clínicos da malária humana:

avaliar as correlações entre a expressão de diferentes moléculas reguladoras e Ki67;

avaliar as correlações entre a expressão dos marcadores de ativação aqui fenotipados e indicadores bioquímicos e hematológicos como TGO e plaquetas comumente avaliados em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*.

3 Revisão da literatura

3.1 A Malária

A malária é um grande problema de saúde pública, consistindo uma das maiores endemias do mundo e um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico de comunidades e nações. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 40% da população mundial residem em áreas onde a doença é endêmica, sofrendo, portanto risco de infecção. A maior proporção da mortalidade causada pela malária ocorre na África (89%), seguida pela Ásia (10%) e por último nas Américas (1%) (3). Em 2011, no Brasil, foram relatados 263.323 casos de malária, sendo que mais de 99% desses ocorreram na Região Amazônica e aproximadamente 87% foram diagnosticados como malária *vivax* (4).

A malária é uma doença totalmente evitável e tratável, desde que as medidas profiláticas recomendadas sejam adequadamente implementadas. Estas incluem: o controle do vetor através da utilização de redes de mosquiteiros tratados com inseticida; pulverização residual de interiores em algumas condições específicas, controle de larvas; quimioprevenção para as populações mais vulneráveis, particularmente mulheres grávidas e crianças, e confirmação do diagnóstico por meio de microscopia ou testes de diagnóstico rápido para cada caso suspeito seguido de um tratamento oportuno com os devidos medicamentos antimaláricos (5).

Atualmente são conhecidas cinco espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* que afetam os seres humanos, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e o mais recentemente descrito *Plasmodium knowlesi* (6). A malária *falciparum* é considerada a mais letal, e é predominante no continente Africano, a infecção por *P. vivax*, embora considerada menos perigosa, encontra-se mais difundida mundialmente. Por outro lado, as infecções por *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* são menos frequentes.

A transmissão da malária aos seres humanos ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles* previamente infectados com o *Plasmodium*. Estima-se que 3,3 bilhões de pessoas estejam em risco de contração da doença em diferentes regiões geográficas (3) (Quadro 1).

Quadro 1: Quadro representativo das regiões endêmicas determinadas pela OMS (3).

| Regiões | Países |
|-----------------------|---------------|
| África | 43 |
| Américas | 21 |
| Sudeste da Ásia | 10 |
| Europa | 6 |
| Mediterrâneo Oriental | 9 |
| Pacífico Ocidental | 10 |
| Total | 99 |

Durante a fase sintomática inicial, os pacientes sentem mal estar generalizado, cefaléia, cansaço e mialgia, geralmente, tais sintomas precedem a febre da malária. A crise inicia-se com calafrios que duram de 15 minutos à uma hora, seguidos por uma fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41°C ou mais. Passado um período de duas a seis horas a febre diminui e o paciente apresenta sudorese profusa e fraqueza intensa (5).

Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, dependente do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio. O quadro clínico, dependendo da espécie infectante, pode evoluir para formas clínicas de malária grave, destacando-se forte cefaléia, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões (na malária cerebral), edema pulmonar agudo, insuficiência renal aguda, hipoglicemia, disfunção hepática, hemoglobinúria (hemólise intravascular aguda maciça) e choque, que podem levar a óbito em torno de 10% dos casos. Em exames hematológicos e sorológicos é comum observar durante a infecção um quadro de leucopenia, linfopenia, plaquetopenia e danos hepáticos caracterizados pela liberação de transaminases hepáticas no soro (5).

A malária *vivax*, doença que ameaça quase 40% da população mundial, é o foco do presente trabalho. A maioria dos casos se origina no sudeste da Ásia e ocidente do Pacífico, embora um número significativo ocorra na América do Sul e África. Apesar de ser considerada uma doença benigna, a doença causa um grande impacto econômico,

além disso, é importante salientar que recentes estudos demonstraram que a gravidade desta malária vem sendo subestimada (7).

3.2 A Malária vivax no Brasil

Durante a década de 30, um surto de malária, que ocasionou a morte de quatorze mil pessoas em dois anos, assolou o nordeste brasileiro, devido à introdução de mosquitos da espécie *Anopheles gambiae* na região (8). Essa endemia foi causada devido ao tráfego de navios franceses que saíam de Dakar para Natal, a fim de realizarem estudos meteorológicos (9).

A malária no Brasil passou a cobrir grande parte do território nacional e constituía um dos maiores desafios à colonização, não apenas da Amazônia, mas de várias áreas litorâneas do sudeste e de áreas da bacia dos rios Paraná-Prata, São Francisco e Doce, no Planalto Central (10).

Na década de 40, aproximadamente 20% da população se infectavam com o *Plasmodium* por ano (11). Diante desse quadro, na década de 50 foi lançado um programa de combate à doença orientado pela OMS que diminuiu consideravelmente os níveis de malária no Brasil até a década de 60. A estratégia adotada pelo Ministério da Saúde foi o uso de DDT na parede das casas e a administração de cloroquina em pacientes sintomáticos (12). Apesar do controle da doença devido ao programa, a partir de meados da década de 60 ocorreu uma forte colonização desorganizada da região norte do país, promovida pelo governo militar, que possibilitou que a doença ressurgisse em locais nos quais a mesma já se encontrava eliminada (9). Desde a grande migração ocorrida durante o governo militar, o número de casos de malária diminuiu, porém com algumas variações no número de casos de acordo com os programas de combate adotados (4;10;13).

No Brasil, a avaliação da gota espessa é adotada como método oficial para o diagnóstico da malária. Mesmo após o desenvolvimento de outras técnicas diagnósticas, este exame continua sendo o de escolha em função de ser um método simples, eficaz, de baixo custo e de fácil realização. Sua realização baseia-se na visualização do parasito através de microscopia ótica, após coloração com corante vital (azul de metileno e Giemsa), permitindo a diferenciação específica dos parasitos a partir da análise da sua morfologia e pelos estágios de desenvolvimento do parasito encontrados no sangue periférico (5).

3.3 Formas morfológicas e ciclo evolutivo

Após a picada da fêmea do mosquito *Anopheles sp.*, as formas esporozoítas do parasito migram para a corrente sanguínea ou para os vasos linfáticos (14). Os parasitos que entram no fígado invadem hepatócitos e iniciam o ciclo exo-eritrocítico. Normalmente, em aproximadamente 30 a 45 minutos após a picada, poucos hepatócitos são invadidos pelas formas esporozoítas, sendo que em média cada hepatócito infectado desenvolve aproximadamente 30.000 formas merozoítas. Depois de um período de cinco a seis dias, as formas merozoítas são liberadas através do rompimento do hepatócito causado pela esquizogonia (15). Os merozoítas liberados no sangue podem invadir células vermelhas usando várias proteínas de superfície para penetrarem nos eritrócitos.

A fase sanguínea possui dois estágios, o estágio sexuado e o estágio assexuado. No estágio sexuado, são formados gametócitos masculinos e femininos. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito não infectado ingere os gametócitos masculinos e femininos que vão se encontrar em aproximadamente uma hora após o repasto sanguíneo para que ocorra a fertilização. Após a fertilização, cada zigoto se transforma em um oocineto móvel que atravessa a parede do intestino médio e invade o epitélio do vetor. Nessa fase, cada oocineto se diferencia em um oocisto e se divide assexuadamente para produzir milhares de esporozoítas que são liberados na hemocele e posteriormente migram para as glândulas salivares. Desse modo, os esporozoítas estão prontos para serem inoculadas em um novo hospedeiro. O tempo entre a alimentação dos gametócitos e a transmissão de esporozoítas demora em média quatorze dias para ocorrer (16) (Figura1).

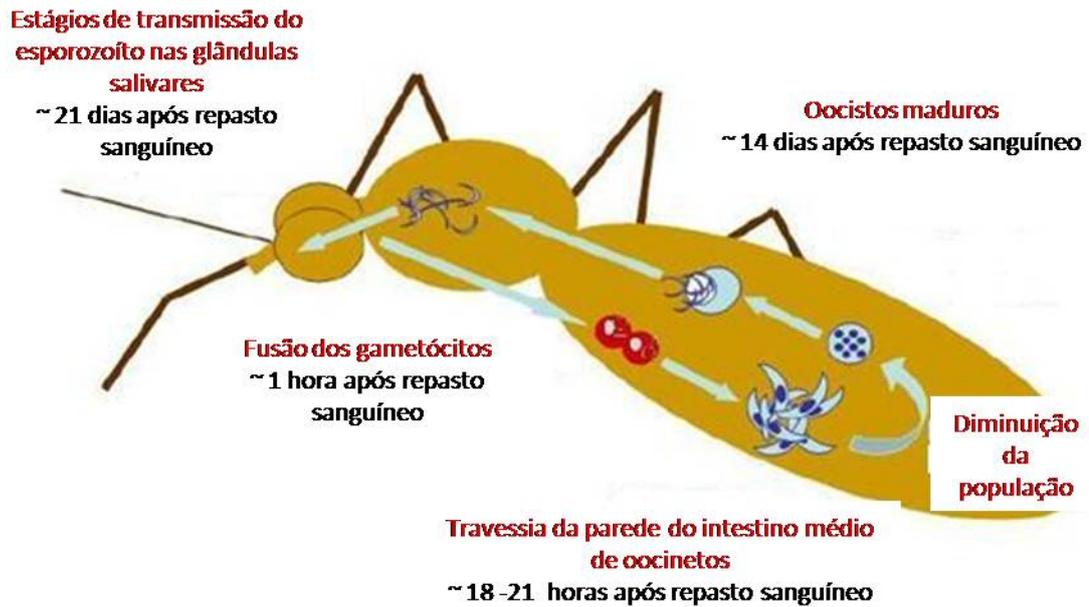


Figura 1: Ciclo do parasito no vetor. Encontro dos gametócitos gera os oocistos que vão invadir o intestino do anofelino e se diferenciarem em esporozoítas para serem inoculadas no hospedeiro (16).

Já no estágio assexuado as formas merozoítas liberadas dos hepatócitos invadem eritrócitos saudáveis e desenvolvem para a forma de anel, também chamado de trofozoíta imaturo. Dando continuidade ao ciclo, o anel evolui para a forma trofozoíta, estágio no qual o núcleo começa a se dividir para formar o esquizonte até que haja a lise do eritrócito e consequente liberação de novas formas merozoítas aptas a infectar outros eritrócitos perpetuando o ciclo eritrocítico (Figura 2).

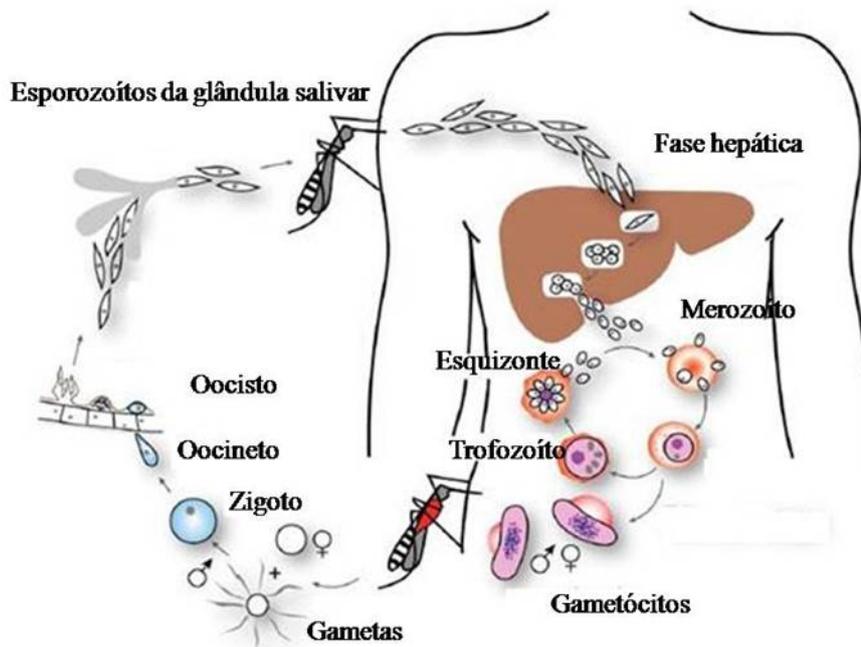


Figura 2: Ciclo do parasito no hospedeiro. Após a picada do anofelino as formas esporozoítas migram para o fígado onde se reproduzem liberando as formas merozoítas para iniciar o estágio eritrocítico assexuado e sexuado. As formas sexuadas iniciam a infecção do anofelino saudável após o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado (17).

3.4 Resposta imune na malária

A virulência do parasito, intensidade de transmissão, fatores econômicos e sociais e variações genéticas influenciam a suscetibilidade do hospedeiro e consequentemente o prognóstico da doença. Indivíduos que nunca foram expostos ao protozoário geralmente desenvolvem fortes sintomas após a exposição ao *Plasmodium*. Estimativas apontam que um quarto das mortes de crianças em áreas de alta endemicidade seja por malária, pois essas são mais susceptíveis à infecção (18). Entretanto, após a exposição ao parasito, crianças acima de cinco anos e adultos desenvolvem uma proteção contra sintomas graves e à morte pela malária. Em regiões onde a malária é altamente endêmica, a maioria das infecções causadas pelo *Plasmodium* é silenciosa, sugerindo que indivíduos residentes nestas regiões possuem a habilidade de manter mecanismos da imunidade inata em alerta por períodos prolongados de tempo ou desenvolver resposta imune adaptativa efetora, controlando o parasito. Esta adaptação, levando a ativação controlada do sistema imune, por outro lado, pode representar um mecanismo de escape do parasito, que permanecendo no

hospedeiro favorece sua transmissão a outros vetores que mantêm o seu ciclo evolutivo (19). Quando não existe tal co-adaptação, os indivíduos infectados apresentam manifestações clínicas que, em sua maioria, são debilitantes e podem se tornar graves. A intensidade destas manifestações depende da idade do indivíduo e de exposições prévias ao parasita (20). Além disto, a imunidade a malária é caracterizada por ser espécie e estágio-específica. Uma característica que difere a malária *vivax* é a presença de formas hipnozóticas, que já foi correlacionada com a presença de células T de memória, provavelmente, essas formas do fígado no indivíduo garantem a manutenção do antígeno (21).

3.4.1 Resposta imune inata contra o parasito

Atualmente muitos estudos têm se concentrado na resposta imune inata ao parasito. O desenvolvimento da imunidade inata influencia diretamente a resposta imune adaptativa do hospedeiro. Receptores do tipo *Toll* (TLR- *Toll like receptors*) são um grupo de receptores que reconhecem padrões moleculares que possuem um papel fundamental no início da resposta imune inata. As moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), encontradas no *P. falciparum* contribuem diretamente para a patogênese da malária devido a sua capacidade de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Foi demonstrado que a sinalização de GPI é mediada por TLR-2 e TLR-4 com baixa intensidade. Essa produção de citocinas mediada por TLR é dependente de MyD88 (22). Além disso, um aumento na produção de TNF- α , IL-1, IL-12 e NO por macrófagos ativados por GPI também foi observado (23). Durante a infecção na fase eritrocítica, o parasito realiza a digestão da hemoglobina, fato que leva à formação de resíduos extremamente tóxicos, o heme. Para evitar um dano oxidativo devido a estes resíduos, o parasito desenvolveu um mecanismo que converte heme em um cristal insolúvel, a hemozoína (24). A hemozoína envolvida pelo DNA do parasito pode ser reconhecida pelo TLR-9, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias (25). Através do bloqueio de TLR-9 foi demonstrada sua importância na sinalização para produção de citocinas, pois, foi observada uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias após o bloqueio (26). Dado a importância clínica e econômica da malária *vivax*, esforços têm sido feitos para a identificação de novos biomarcadores de prognóstico. Um marcador caracterizado foi a presença de altos níveis de ácidos nucleicos circulantes no plasma de pacientes infectados pelo *P. vivax* em maior

quantidade quando comparado aos pacientes saudáveis (27). Recentemente nosso grupo demonstrou que monócitos e neutrófilos encontram-se ativados durante a malária. Os monócitos se mostraram a principal fonte celular de citocinas em resposta à estimulação por agonistas de TLR durante a fase aguda da doença. Diferentemente dos neutrófilos que apresentaram uma baixa produção de citocinas (28). Já os neutrófilos destes pacientes, porém apresentam uma atividade fagocítica aumentada, apresentam paralisia e dificuldade de migrarem *in vitro* em direção a um gradiente de quimiocinas (28). As citocinas produzidas e secretadas na fase aguda da infecção determinam o perfil pró-inflamatório da malária (29). Uma característica importante da resposta imune inata na malária causada pelo *Plasmodium falciparum* é a alta produção de TNF- α , sendo estes níveis diretamente correlacionados com a patologia da malária cerebral (30).

3.4.2 Resposta imune adaptativa contra o parasito

A observação de pacientes em área endêmica sugere que a imunidade à infecção por malária se desenvolve de uma maneira incompleta e vagarosa (31;32). Até o momento existe apenas um estudo caracterizando a existência de populações de células T antígeno-específicas em pacientes residente em área endêmica após a cura da infecção pelo *P. vivax* (33). Isto se deve ao fato da existência de poucos antígenos proteicos bem definidos necessários para a análise de respostas adaptativas antígeno-específicas e principalmente pela falta de um método de cultivo eficaz do parasito.

Considerando-se a resposta imune celular, tanto células T CD4, quanto CD8 são ativadas durante a fase sanguínea da doença (34;35). Pacientes diagnosticados com malária apresentam forte linfopenia, em parte devido a apoptose de células T antígeno-específicas (36). As células T possuem um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune, por exemplo, na ativação de células B (37) para consequente produção de anticorpos (38) e citotoxicidade celular dependente de anticorpos, que na maioria das vezes controla, mas não é capaz de eliminar de maneira estéril o parasito (39). Uma característica da malária *vivax* é a presença da fase hepática. A persistência do antígeno em animais infectados foi encontrada em órgãos linfóides e depende de células CD11c. A persistência do antígeno no animal aumenta a magnitude da apresentação a células T CD8 de várias maneiras. Desse modo, o melhor desenvolvimento de imunidade protetora na fase hepática depende de uma apresentação antigênica prolongada a células T CD8 (40).

A funcionalidade das células T pode ser afetada por outros subtipos celulares do sistema imune. Foi anteriormente descrito que tanto a infecção pelo *Plasmodium falciparum* quanto pelo *vivax* leva a diminuição da frequência das células dendríticas (41;42). Altas parasitemias, característica da fase aguda da malária, leva a apoptose destas células (43). Além disso, já foi demonstrado que na malária causada pelo *Plasmodium falciparum* e *vivax* há uma diminuição da maturação das células dendríticas, avaliada pela baixa expressão de CD80, CD86 e MHC II (44;45). As alterações nas células dendríticas podem ter como consequência alterações na ativação das células T e na geração de células de memória específicas para o plasmódio. Os subtipos de células dendríticas também podem influenciar o perfil de células T geradas. Na malária *vivax* há um aumento da frequência de células dendríticas plasmocitóides em relação às mielóides, porém na malária *falciparum* o oposto pode ser observado (41). Foi demonstrado que células dendríticas plasmocitóides estimuladas por CpG ODN via TLR9 causam uma diferenciação de células *naive* em células T reguladoras (46). Esse cenário também poderia influenciar diretamente no aumento da proporção de células T reguladoras com o intuito de modularem a resposta imune na malária *vivax*. As infecções pelos *P. falciparum* e *P. vivax* são caracterizadas pelo aumento na frequência de células T reguladoras (47-49), o que sugere a participação destas células na doença. Em pacientes com malária também é observado um aumento na produção de IL-10 (28;29;42), citocina que pode ser responsável pela modulação da resposta imune durante a doença (50). As células T reguladoras geradas podem ser naturais (nTreg) ou induzidas (iTreg). As nTreg são um subtipo celular no qual é necessária a apresentação antigênica da célula dendrítica para a célula T no timo (51). Já as iTreg são formadas através da apresentação antigênica em órgãos linfóides periféricos através do estímulo antigênico (52). Ambas as populações são encontradas no sangue de indivíduos saudáveis, porém em diferentes proporções, 70% na forma de nTreg e o restante como iTreg, essa porcentagem foi definida através da expressão de Helios, uma molécula presente apenas em nTreg (53). Dentro desse cenário, na malária foi descrito que na presença de nTreg, células de memória de pacientes que tiveram episódios de malária nos últimos cinco meses, foram estimuladas com o extrato de esquizonte de *P. falciparum* e se converteram células iTreg, demonstrando a importância de células T reguladoras na resposta ao *Plasmodium* (54).

Outra possibilidade para a regulação da resposta imune desencadeada contra o *Plasmodium* seria a expressão de receptores inibidores por células T antígeno-

específicas, descrita recentemente em modelos experimentais da malária (55;56). Este fenômeno já é bem caracterizado em outras doenças (2;57;58).

O estudo da expressão destas moléculas moduladoras no contexto da malária é de fundamental importância para o entendimento da capacidade prejudicada do hospedeiro de ao mesmo tempo controlar a infecção, prevenir reações inflamatórias exacerbadas e por fim, levar ao desenvolvimento de memória imunológica.

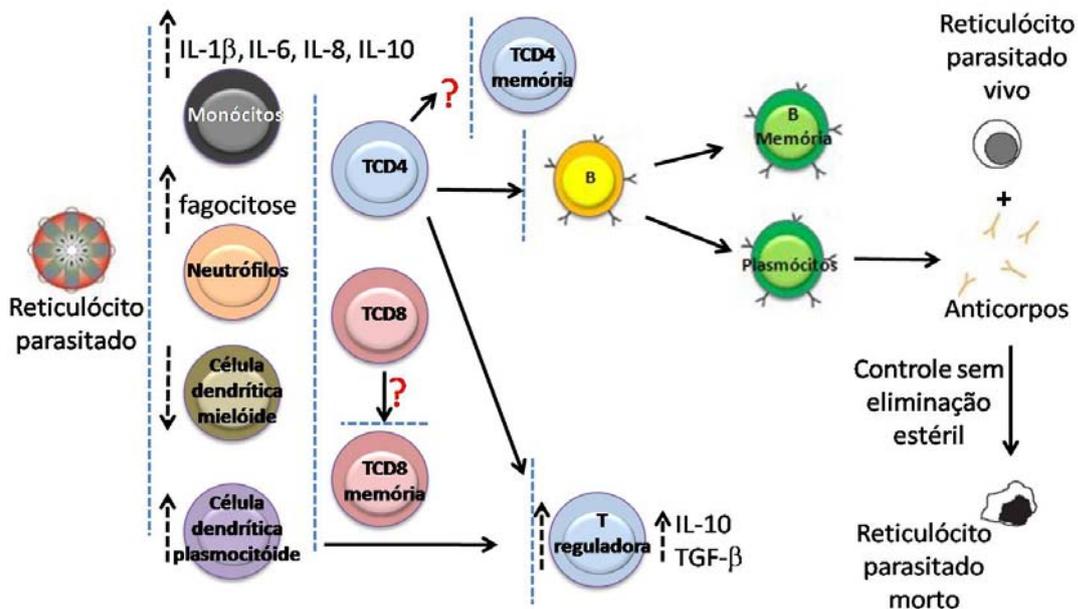


Figura 3: Esquema representativo da resposta imune ao *Plasmodium vivax* durante a fase sanguínea da doença. A resposta imune é iniciada após contato do reticulócito infectado com células da imunidade inata e células apresentadoras de antígenos (APC) que reconhecerão o parasito pela expressão de padrões moleculares e apresentarão antígenos às células T. Após apresentação, as células se tornam células efetoras podendo auxiliar, por exemplo, os linfócitos B na produção de anticorpos.

3.4.3 Receptores inibidores e o comprometimento das funções de células T

Antes que as células T expressem receptores inibidores estas necessitam de serem ativadas. Para que uma célula T seja ativada é necessária a interação do receptor de célula T (TCR) e CD4 ou CD8 com MHC de classe I ou II para correta sinalização. Outro sinal importante são os fatores solúveis, como a IL-2, além da ligação de moléculas co-estimulatórias de superfície que provêm sinais essenciais para a sinalização via TCR (59;60). CD28 é uma molécula co-estimulatória expressa

constitutivamente em grande parte das células T de humanos (61). Entretanto seus níveis aumentam após ativação (62). Por outro lado, o CTLA-4 é expresso após a ativação da célula T (63). Foi demonstrado em camundongos deficientes para CD28 que os níveis de CTLA-4 expressos eram menores em relação aos camundongos selvagens (64). Como a expressão do CTLA-4, outras moléculas inibitórias é apenas induzida após a ativação da célula T.

A modulação da resposta imune é essencial para o re-estabelecimento da homeostase, pois possui função de limitar ou terminar uma resposta imune induzida por um patógeno. Há mais de uma década, o comprometimento de respostas imunes efetoras tem sido atribuído a persistência de células T ativadas sem função efetora e a perda de células T antígeno-específicas em modelo murino de infecções crônicas virais (65;66). O estudo deste fenômeno levou a identificação de marcadores de perda de função celular, como o PD-1. A expressão de receptores inibidores é também importante para o desenvolvimento de tolerância, que é definida como a não responsividade a um antígeno ao qual o organismo foi exposto previamente. Desse modo, a presença de receptores inibidores, como o PD-1, também é importante para evitar o desenvolvimento de doenças auto-imunes (67). A expressão destes receptores tem sido relacionada à intensa sinalização via TCR, devido a altas cargas antigênicas, além de altos níveis de citocinas circulante, como IL-2, IL-7, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10. Na malária causada pelo *P. vivax*, observa-se um aumento da produção das quatro últimas citocinas citadas (28;68-72).

Um ponto importante a ser considerado é a diferença entre anergia e exaustão. As células T podem se tornar anérgicas durante a apresentação de antígenos, perdendo sua funcionalidade rapidamente, enquanto que a exaustão é um processo que ocorre de maneira gradativa. Neste último fenômeno, a célula T é ativada, e na presença de sinais co-estimulatórios, perde sua função. Além disso, existe uma diferença no perfil genômico entre esses estados de ativação (73). Importante lembrar que o perfil de exaustão difere do de senescência. Células senescentes humanas expressam CD57, marcador que indica baixa capacidade proliferativa e fase avançada de ativação (74). Outra observação que corrobora a diferença entre exaustão e senescência é a baixa correlação entre a expressão de CD57 e PD-1 (2).

A expressão de um conjunto de receptores inibidores, como por exemplo, morte programada-1 (PD-1), co-estimulador induzível de células T (ICOS), antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), domínios

de mucina e imunoglobulina de célula T (TIM-3) e gene 3 de ativação linfocitária (LAG-3) pode indicar que as células estejam mais ativadas e possivelmente entrando em um estágio de perda de função, caracterizando a exaustão celular (75-77). A importância dessas moléculas é observada em várias doenças. PD-1, por exemplo, foi observado em células não funcionais em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). O bloqueio de PD-1 causou um aumento da resposta de células T CD8 a antígenos específicos (2). Outro modelo caracterizado para demonstrar a importância de PD-1 na perda da função celular foi a coriomeningite linfocítica viral murina. Este trabalho mostra que é possível a restauração da função das células T após o bloqueio de PD-L1 (58). TIM-3 também foi caracterizado em pacientes infectados com HIV. Com características semelhantes ao PD-1 na modulação da resposta imune, após o bloqueio de TIM-3 a célula recupera sua funcionalidade voltando a responder aos antígenos e proliferar (78). Além disso, foi demonstrada a expressão de vários marcadores inibitórios em pacientes infectados com HIV que apresentaram a síndrome inflamatória de imunorreconstituição (IRIS) após início da terapia anti-retroviral (ART). Foi demonstrado que os pacientes que desenvolvem a síndrome possuem altas proporções de células T expressando LAG-3, ICOS e CTLA-4 em relação a pacientes que não desenvolvem a síndrome (1). O bloqueio combinado desses marcadores pode ser uma saída para a reversão da perda da função de linfócitos antígeno-específicos, como observado na hepatite C (79). Na malária murina existem alguns trabalhos que caracterizam fenotipicamente e funcionalmente a participação destes receptores. Os trabalhos mostram que o bloqueio dessas moléculas, e. g. PD-1, CTLA-4 e LAG-3, restauram a funcionalidade de linfócitos T (55;56;80). Em humanos existem trabalhos que caracterizam fenotipicamente alguns desses marcadores, porém apenas na malária *falciparum* (56;81).

ICOS: Seu gene é encontrado no cromossomo 2q33 (76). A molécula ICOS é um membro da família B7, é um heterodímero e cada cadeia apresenta apenas um domínio IgV exposto (76). O ICOS é expresso em baixos níveis nas células *naive*, porém sua expressão é elevada após sinalização via TCR e CD28 (82), além de ser expresso em células NK (76). Seu ligante, o ICOS-L, é encontrado em células B, T, monócitos e células dendríticas (76). É expresso em células T ativadas do tipo Th1, Th2, Th17, Treg e Tfh, mas sua expressão em estágios iniciais leva ao direcionamento para um perfil

Th2, pois aumenta a expressão de NFATc1 e c-MAF, fatores transcricionais relacionados à polarização da resposta para este perfil imunológico (82-86).

CTLA-4: Seu gene é encontrado no cromossomo 2q33 (76). O CTLA-4 é uma molécula homóloga ao CD28, também pertencente à família B7, sendo um heterodímero e cada cadeia apresenta apenas um domínio IgV exposto (76). O CTLA-4 é encontrado apenas em células T, e seus receptores, CD80 e CD86, são encontrados em linfócitos T ativados e B, monócitos e células dendríticas (76). Sua expressão é indispensável na regulação negativa de células T. O CTLA-4 é expresso em células ativadas e se liga ao CD80 e CD86, desse modo, compete diretamente com CD28, porém, o CTLA-4 apresenta uma maior afinidade aos seus ligantes (87;88).

PD-1: Seu gene é encontrado no cromossomo 2q37 (76). O PD-1, outra molécula pertencente à família dos receptores B7 é um monômero com apenas um domínio IgV exposto (76). O PD-1 é expresso em linfócitos B, T e em monócitos e seus ligantes, PD-L1 (CD274) e PD-L2 (CD273), próprios para a modulação celular (89), são encontrados em linfócitos B, T, em monócitos e em células dendríticas (76). A expressão do PD-1 é modulada positivamente em células T ativadas. Apesar de serem da mesma família e apresentarem grande similaridade em suas funções, CTLA-4 e PD-1 diferem em suas maneiras de atuar na célula. Essas diferenças podem ser devido a diferentes padrões de expressão de PD-1 e CTLA-4, além de seus ligantes em diferentes subtipos celulares e tecidos. Outro fato pode ser a diferença da sinalização da via de CTLA-4 e PD-1, ou seja, uma delas apresentar uma sinalização mais efetiva do que a outra (90). Uma curiosidade é que o CTLA-4 atua primeiro que outros receptores inibidores durante os momentos iniciais da resposta imune nos linfonodos, enquanto que o PD-1 é expresso mais tardiamente nos tecidos (91).

TIM-3: Seu gene é encontrado no cromossomo 5q33.2 (92). A família TIM é composta por glicoproteínas do tipo I expressas em células T que contém motivos estruturais comuns denominados como domínio IgV, que é um domínio de mucina altamente glicosilado, além de possuir um domínio citoplasmático (92). O TIM-3 é encontrado apenas em células T e a expressão de seu receptor, TIM-3L, é encontrado em linfócitos B, T, em monócitos e em células dendríticas (92). A família TIM em camundongos possui oito genes, TIM-1 ao TIM-8, entretanto, a família TIM em

humanos apresenta apenas três genes, TIM-1, TIM-3 e TIM-4. TIM-3 é expresso em células T após a diferenciação destas células para o perfil de resposta Th1, e através da ligação ao seu ligante TIM-3L, tem a capacidade de modular uma resposta imune exacerbada (92-94).

LAG-3: Seu gene é encontrado no cromossomo 12q13.3 (95). O LAG-3 apresenta um monômero possuindo quatro domínios expostos, um domínio V e três domínios C (96). O LAG-3 é expresso apenas em linfócitos T e seu receptor, MHC II, é expresso em linfócitos T ativados, linfócitos B, monócitos e em células dendríticas (95;96). É uma molécula responsável pela regulação negativa de células T quando esta se liga ao MHC II e então sinaliza via TCR (96). É importante salientar que as estruturas de CD4 e LAG-3 são semelhantes, competindo diretamente na ligação ao MHC II, porém LAG-3 apresenta maior afinidade (97). Um dado interessante é que LAG-3 afeta a progressão do ciclo celular em células T, mas não afeta de maneira contundente para levar a apoptose (98).

Desse modo a exaustão celular é um estágio atingido de maneira gradativa que pode ser gerado pela expressão da combinação demarcadores que modulam a resposta de células T por diferentes vias, alterando a produção de citocinas e a proliferação de linfócitos T. Vale ressaltar que esses marcadores também são indicadores de ativação celular, pois sua expressão, principalmente individualmente, é induzida como consequência do reconhecimento antigênico e presença de citocinas neste microambiente, e não necessariamente indica perda de funções celulares.

4 Material e Métodos

4.1 Pacientes - critérios de inclusão ou exclusão

Os pacientes participantes residentes em Porto Velho, RO, e foram selecionados em colaboração com o grupo de pesquisadores e médicos do IPEPATRO (Instituto de Pesquisas em Doenças Tropicais), CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical) e CEMETRON (Centro de Medicina Tropical de Rondônia). Todos os pacientes incluídos neste estudo foram examinados pelos médicos responsáveis e o assinaram o termo de consentimento redigido em português de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil (Anexo 1). Os pacientes foram informados, detalhadamente, dos objetivos e metodologias do estudo antes da coleta de sangue. Os pacientes que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa foram informados sobre a possibilidade de se retirarem do estudo quando assim o desejassem, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico e tratamento terapêutico. O tratamento foi realizado com os medicamentos e dosagens preconizadas pelo Ministério da Saúde. Aos pacientes foi indicado o uso de cloroquina (150 mg) por três dias, sendo administrados por via oral quatro comprimidos no primeiro dia e três comprimidos no segundo e terceiro dia. Após tratamento com cloroquina foi recomendado o uso de um comprimido por quatorze dias de primaquina (15 mg).

Amostras de sangue periférico foram coletadas de pacientes residentes em área endêmica, em fase aguda da infecção por *P. vivax*. Foram incluídos no estudo indivíduos adultos (idade > 18 anos), que não apresentavam nenhuma outra infecção aguda ou crônica ou gravidez, e nem apresentavam hematócrito < 33, eosinofilia > 4% e não estavam em tratamento com drogas imunossupressoras. Os indivíduos apresentavam exame de gota espessa e reação em cadeia da polimerase (PCR) positivos para *P. vivax*. Indivíduos apresentando co-infecção com outras espécies do plasmódio foram excluídos. Os mesmos indivíduos retornaram ao CEPEM 30-45 dias após o início do tratamento para reavaliação clínica e uma segunda coleta de sangue.

4.2 Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

A avaliação hematológica consistiu na realização do hemograma para avaliação de hemácias, plaquetas e leucócitos. Foi realizada a contagem global e diferencial de

leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Para realização do procedimento, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A glicose foi avaliada em amostras sanguíneas coletadas na presença de fluoreto de sódio e EDTA, e bilirrubinas, sódio, potássio, uréia, creatinina, e as enzimas hepáticas, transaminase glutâmico oxalacética e transaminase glutâmico pirúvica, foram medidas após coleta em tubos secos (sem anticoagulante).

4.3 Obtenção de PBMC

As amostras sanguíneas coletadas em tubos na presença de heparina e utilizadas para obtenção do PBMC. O sangue foi diluído em solução salina 0,9% estéril (vol/vol). Trinta mL do sangue diluído foram adicionados delicadamente em um tubo contendo 15 mL de Ficoll Hypaque (GE) e as amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 300 g. Realizamos a coleta da camada de PBMC, que foi transferida para um tubo cônico de 50 mL. As PBMC foram lavadas por três vezes em baixa a 300 g por 10 minutos e sua concentração celular foi determinada com a utilização de câmara de Neubauer e ajustada para o congelamento em soro fetal bovino a 20% DMSO.

4.4 Extração do DNA por Fenol-Clorofórmio

Alíquotas de 200 µL do sangue coletado em tubos de EDTA foram adicionadas em solução de saponina 1% para hemólise por 5 minutos à 37°C. Após incubação foram realizadas três lavagens a 2000 g por 15 minutos. Ao precipitado foi adicionada uma solução de lise (200µL) composta por 2µL Tris-HCl (pH 8.0) 1M, 2µL EDTA (pH 8.0) 500mM, 16µL NaCl 2,5M, 10µL SDS 10%, 168µL água autoclavada e 2µL Proteinase K(Sigma-Aldrich) (20mg/mL), uma serina-protease de amplo espectro, muito útil para digestão de proteínas em geral. Foi realizada uma incubação à 37° C por 3h ou durante a noite. Logo após, a proteinase foi inativada à 95° C por 10minutos. Foi acrescentado 250µL de fenol equilibrado, misturado delicadamente por 10 minutos. O fenol é usado na purificação de ácidos nucleicos. O reagente, que consiste no Fenol, é saturado com tampão Tris-HCl em um pH > 7,4. Quando a amostra é extraída com tampão de fenol saturado, as proteínas são desnaturadas e irão para a fase orgânica da solução ou para a interfase. A maior parte dos ácidos nucleicos irá para a fase aquosa. Foi realizada uma centrifugação a 10.000g por 5 minutos e removida a fase aquosa (superior) para um

novo tubo de 1,5 mL. 250 µL de uma solução de fenol-clorofórmio (1:1) foi adicionado aos tubos e centrifugado a 10.000g por 5 minutos para a remoção do fenol-clorofórmio (fase inferior), conservando a fase aquosa no tubo. Nessa fase aquosa do tubo, foi acrescentado 250µL de clorofórmio, centrifugado a 10.000g por 5 minutos. O clorofórmio é usado na purificação de ácidos nucleicos. Quando usado junto com o fenol, a eficiência da extração de proteínas do DNA total é maior. Foi removida a fase aquosa (superior) para um novo tubo e adicionado 25 µL de Acetato de sódio 3M pH 5,2 e 600µL de etanol gelado (100%), para incubação a -20°C overnight. Após incubação as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 20 minutos, a 4°C e ao seu pellet foi acrescentado 600µL de etanol gelado 80%. Para remoção do álcool, as amostras foram centrifugadas novamente a 14.000g por 20 minutos a 4°C, removido seu sobrenadante e deixadas secar a temperatura ambiente. O precipitado foi dissolvido em água destilada.

4.5 PCR

4.5.1 SEMI-NESTED-PCR

Para realização da reação da cadeia da polimerase (PCR) foi realizado um reação contendo 0,4 µM *iniciadores* P1 (ACG ATC AGA TAC CGT CGTCGT AAT CTT) e P2 (GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T), 1,25 µL dNTP 125 µM (Fermentas), 2 µL de tampão Taq polimerase 1X (Fermentas), 2 µL de MgCl₂ 2,5mM (Fermentas), 8µL de água e 0,15µL Taq polimerase 0,75U (Fermentas). Na reação foi adicionado 5 µL do DNA extraído. As reações foram realizadas nos termocicladores Mastercycler (Eppendorf) a 92° C por 2 minutos (desnaturação), 35 ciclos a 92° C por 30 segundos e 60° C por 90 segundos, e a extensão final da fita a 60° C 5 minutos. Para a segunda PCR, são feitos três reações diferentes. Cada reação contém 0,4 µM iniciadores P1 e seu iniciador espécie-específico *P. falciparum* (CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG), *P. vivax* (CCA TCT AGG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A), *P. malariae* (GGA AGC TAT CTA AAA GAA ACA CTC ATA T), 0,25 µL de dNTP 312,5 µM (Fermentas), 1,2 µL de MgCl₂ 1,5mM (Fermentas), 2,5 µL Tampão Taqpolimerase 1,25x (Fermentas), 2,3 µL de água. Para realizar a segunda PCR foi necessário diluir a amostra do 1° PCR (2µL 1° PCR + 98µL tampão Tris-EDTA). Desta diluição, foram acrescentados 2µL na reação e adicionada a Taqpolimerase (Fermentas)

0,75 U com tampão Taq polimerase 1X (Fermentas). Como controle negativo, foram utilizadas as reações dos reagentes mais água de injeção.

4.5.2 PCR em tempo real

A fim de quantificar a carga parasitária encontrada no sangue foi realizada uma PCR em tempo real. O DNA do parasito de pacientes infectados pelo *P.vivax* foi inserido e clonado no plasmídeo de expressão pGEM-T Easy Vector 50 ng (Promega) e utilizado nas seguintes concentrações, 10^6 a 10^2 em triplicata. Para o preparo da reação foi adicionado 0,15 μ L dos iniciadores P1 e *P. vivax*, 10 μ L de Master Mix Syber Green e 7,7 μ L de água por reação. Junto à reação foram adicionados 2 μ L de DNA genômico ou do padrão. Os componentes da reação foram homogeneizados e os 20 μ L foram adicionados em cada poço da placa. Após aplicar as amostras, a placa foi vedada com um selante e embrulhada em papel alumínio até ser colocada no equipamento. O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e o anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto no equipamento 7500 da marca Applied Biosystems (Life Technologies).

Como controle negativo, foram utilizadas as reações dos reagentes mais água de injeção.

4.6 Caracterização fenotípica de células T

A caracterização fenotípica foi realizada com a utilização de PBMC congelado em Porto Velho e transportado à Belo Horizonte em nitrogênio líquido. Aproximadamente 5×10^6 células, contidas em cada frasco, foram descongeladas rapidamente na presença de 10 mL de RPMI contendo 20 μ g/mL de benzonase nuclease (Novagen). As células foram lavadas por duas vezes com PBS a 300 g por 10 minutos para remoção de qualquer proteína e incubadas reagente para que possibilite a separação de células viáveis das células mortas (*Live/DeadFixableDeadCellStains*), conforme recomendado pelo fabricante (Invitrogen). A suspensão celular foi marcada com um painel contendo combinações distintas de anticorpos, para a avaliação das moléculas co-estimulatórias, receptores inibidores e proliferação de células T. O painel para a avaliação das células T foi composto por anticorpos contra as moléculas de superfície diluídos em PBS contendo 0,1% de BSA e 2 mM de azida (tampão de FACS): anti-CD3,

anti-CD4, anti-CD8, anti-LAG-3, anti-TIM-3, anti-ICOS e anti-PD-1 conjugados respectivamente com Qdot655, Qdot605, eFluor750, FITC, PE, PECy7 e APC. A incubação, com os anticorpos, foi realizada por 20 minutos e as células foram então lavadas duas vezes por centrifugação por 4 minutos a 300 g com tampão de FACS. Além disto, a suspensão celular foi fixada e permeabilizada para a avaliação da expressão de marcadores anti-Ki67 e anti-CTLA-4 conjugados respectivamente com PercpCy5.5 e biotina. Após incubação com anticorpos contra os marcadores intracelulares foi realizada uma nova lavagem por 4 minutos a 300 g para a realização da incubação por 15 minutos da estroptoavidina QD525 para a revelação da biotina conjugada ao anticorpo anti-CTLA-4. Para fixação e permeabilização foram utilizados os tampões da eBioscience (*Intracellular fixation and permeabilization buffer*), de acordo com as especificações do fabricante. Os anticorpos e fluoróforos utilizados estão especificados na figura 4. As células foram adquiridas no citômetro LSR Fortessa (BD Pharmingen) capaz de analisar 12 cores mais o tamanho e granulosidade. Para análise dos dados foi utilizado o programa *FlowJo 9.4.1 (TreeStar)*.

| Laser | Violeta | | | | | | | |
|-------------|----------------|--------|-----------|------------|-------|----------|-------|-------|
| | V450 | V525 | | V565 | V585 | V605 | V655 | |
| Fluorocromo | ViViD/PB/eF450 | Biot | QD525 | | | QD605 | QD655 | |
| Anticorpos | Live/dead | CTLA-4 | SA | | | CD4 | CD3 | |
| | Azul | | | | | Vermelho | | |
| | B515 | B562 | B600 | B675 | B750 | R660 | R710 | R750 |
| | FITC | PE | TEXAS RED | PercpCy5.5 | Cy7PE | APC | Ax700 | eF780 |
| | LAG-3 | TIM-3 | | Ki67 | ICOS | PD-1 | | CD8 |

Figura 4: Anticorpos e fluoróforos utilizados para imunofenotipagem. O painéis utilizados neste estudo foram desenvolvidos para análise em citômetro de fluxo contendo 3 lasers: violeta, azul e vermelho. Em cinza encontram-se discriminados os canais onde os anticorpos conjugados com os fluoróforos serão detectados representados por uma letra, que representa o laser, e um número, representando o comprimento máximo de detecção. Abaixo estão representados os fluoróforos e anticorpos. Em amarelo estão representados os anticorpos que foram utilizados após permeabilização celular.

4.7 Avaliação dos níveis de citocinas

4.7.1 CBA

A quantificação dos níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A foi realizada utilizando-se o sistema citofluorométrico com microesferas fluorescentes (CBA - *CytometricBeadArray*, BDPharmingen). Este emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas de interesse. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Antes de iniciar o processo da avaliação das citocinas do plasma, foi realizado uma incubação da reação das sete esferas com o tampão de enriquecimento destas (*Serum Enhancement Buffer*) como indicado pelo fabricante. Resumidamente, 50 μ L da mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais foram transferidas para placas de cultura celular de 96 poços, fundo redondo, destinados ao controle negativo e às amostras a serem testadas. Em seguida, 50 μ L do diluente G, denominação dada pelo fabricante, e das amostras a serem testadas foram adicionados aos seus respectivos poços. As misturas foram incubadas por 90 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas por duas vezes com 150 μ L da solução tampão (PBS) e centrifugadas a 200g, por 5 minutos. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado. As esferas de captura foram então incubadas por 90 minutos, ao abrigo da luz, com um coquetel de anticorpos monoclonais contra antígenos humanos marcadas com PE (*Human Inflammation PE Detection Reagent*). Após a incubação, as esferas foram novamente lavadas, o sobrenadante descartado, e 200 μ L de solução tampão adicionados para ressuspensão das esferas e posterior aquisição das amostras no citômetro de fluxo. Foi utilizado o software FACSComp Software e o *Calibrate Beads* da BD com o objetivo de ajustar o equipamento. Para cada amostra processada foram adquiridos 1800 eventos dentro de região pré-estabelecida (300 eventos por parâmetro testado). O cálculo dos níveis de citocinas foi realizado com a utilização do software FCAP Array (BDPharmingen).

4.7.2 ELISA

A quantificação dos níveis séricos de IFN- γ foi feita com a utilização de kit de ELISA comercial, de acordo com instruções do fabricante (eBioscience). As placas foram incubadas por aproximadamente doze horas com anticorpo de captura em temperatura ambiente e subsequentemente lavadas por três vezes com tampão de lavagem (PBS 0,05% *Tween* 20). Após lavagem as placas foram incubadas por uma hora com o tampão de bloqueio (PBS 1% BSA). Após incubação foram realizadas novas lavagens com tampão de lavagem e foram as amostras e os padrões foram adicionados nos devidos poços. Seguiu-se incubação por duas horas e posterior lavagem. Foi adicionado o anticorpo de detecção e realizada uma incubação por duas horas e outra lavagem após incubação. A solução de estreptoavidina-HRP foi adicionada, seguindo incubação por 15 minutos, adição da solução de parada (2N H₂SO₄) e a leitura realizada a 450 nm em leitor de ELISA.

4.8 Avaliação da capacidade proliferativa

A capacidade proliferativa foi avaliada pela detecção de Ki67 com a utilização de anticorpo monoclonal contra esta molécula conjugado com o fluoróforo PercpCy5.5. O Ki67 é marcador de ciclo celular encontrado durante a intérfase. A avaliação foi feita nas mesmas PBMC congeladas utilizadas no painel desenvolvido para a avaliação da expressão dos receptores inibidores.

4.9 Análise estatística

Para a avaliação da normalidade dos dados foi utilizado o teste de *D'Agostino* e *Pearson*. Para comparação dos pacientes infectados e após o tratamento foi utilizado o teste de *Wilcoxon*. Para as correlações entre os dados foi utilizado teste de *Spearman*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos. O software *GraphPadPrism* 5 foi utilizado para análise dos dados.

4.10 Avaliação por comitês de ética

Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz (Carta de aprovação número 24/2011-CEP/CPqRR/FIOCRUZ/MS)(Anexo 2).

5 Resultados

5.1 Caracterização da população de estudo

Nesse trabalho, quatorze pacientes da área endêmica de Porto Velho, que apresentaram gota espessa positiva e se enquadravam nos critérios de inclusão foram recrutados após serem examinados por médicos do CEPEM. Foram coletados 100 mL de sangue periférico dos pacientes para realização da separação do PBMC e para a realização das dosagens bioquímicas e hemograma. Os pacientes apresentavam em média idade de 41 anos, no momento da coleta, sendo a maioria do sexo masculino. Os níveis de TGO e os números de plaquetas encontram-se alterados nos pacientes infectados com *P. vivax* em comparação com os mesmos pacientes avaliados após a cura (AC). Os valores de TGO considerados dentro da normalidade variam de 11 a 39 U/L e os valores de plaquetas variam de 150.000 a 400.000 por mm³. Devido à problemas do laboratório responsável pelas análises, alguns níveis de TGO não foram obtidos. Em vermelho estão representados valores fora dos limites considerados normais (Quadro 2).

Quadro 2: Caracterização clínica dos pacientes infectados e após cura

| Paciente | Gênero | Idade | TGO (U/L) | | Plaqueta (mm ³) | | Semi-nested | | Real-time(moléculas de DNA) | | Microscopia | |
|----------|-----------|-------|-----------------|----|-----------------------------|--------|-----------------|----|-----------------------------|------|-----------------|----|
| | | | <i>P. vivax</i> | AC | <i>P. vivax</i> | AC | <i>P. vivax</i> | AC | <i>P. vivax</i> | AC | <i>P. vivax</i> | AC |
| 1 | Masculino | 34 | 11 | 16 | 151000 | 249000 | <i>P. vivax</i> | - | | | /+/ | - |
| 2 | Masculino | 44 | 47 | 13 | | 189000 | <i>P. vivax</i> | - | 69,9 | 0 | /++/ | - |
| 3 | Masculino | 38 | 85 | 14 | 52.000 | 238000 | <i>P. vivax</i> | - | 159,8 | 0 | /++/ | - |
| 4 | Masculino | 45 | 64 | 23 | 65.000 | 195000 | <i>P. vivax</i> | - | 21,9 | 0 | /++/ | - |
| 5 | Masculino | 37 | 172 | 25 | 30.000 | 94000 | <i>P. vivax</i> | - | 22 | 0 | /+/ | - |
| 6 | Masculino | 36 | 38 | 26 | 179000 | 201000 | <i>P. vivax</i> | - | 6 | 0 | /+/ | - |
| 7 | Masculino | 41 | 31 | 29 | 112000 | 121000 | <i>P. vivax</i> | - | 192 | 0 | /++/ | - |
| 8 | Feminino | 41 | 12 | 20 | 120000 | 171000 | <i>P. vivax</i> | - | 61 | 0 | /+/ | - |
| 9 | Masculino | 28 | 39 | 40 | 41000 | 177000 | <i>P. vivax</i> | - | 183,7 | 0 | /++/ | - |
| 10 | Masculino | 46 | 22 | 24 | 44000 | 101000 | <i>P. vivax</i> | - | 66,9 | 0 | /+/ | - |
| 11 | Masculino | 39 | 20 | 23 | 220.000 | 161000 | <i>P. vivax</i> | - | 573,6 | 0 | /++/ | - |
| 12 | Masculino | 26 | 28 | 23 | 119000 | 201000 | <i>P. vivax</i> | - | 662,9 | 0,05 | /+++/ | - |
| 13 | Feminino | 62 | 27 | 13 | 155000 | 255000 | <i>P. vivax</i> | - | 1933,15 | 0 | /+++/ | - |
| 14 | Masculino | 52 | | 23 | 53000 | 176000 | <i>P. vivax</i> | - | 621,8 | 0 | /++/ | - |

5.2 Influência da malária no compartimento linfocitário

Durante a doença a principal célula do sangue que é afetada são os eritrócitos. A infecção de reticulócitos pelo parasito e a resposta inflamatória desencadeada pela infecção podem ocasionar a destruição das hemácias, a ponto de levar o paciente a um quadro de anemia. Dentre os leucócitos, os linfócitos são um dos subtipos celulares afetados pela infecção pelo *Plasmodium vivax*. Os pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* apresentam diminuição do número absoluto dos linfócitos em relação aos mesmos pacientes após o tratamento com drogas antimaláricas. É importante ressaltar que pacientes saudáveis apresentam o mesmo número de linfócitos quando comparados aos pacientes após a cura da doença. (Figura 5). Os valores 1000 a 3500 linfócitos por mm^3 são considerados normais.

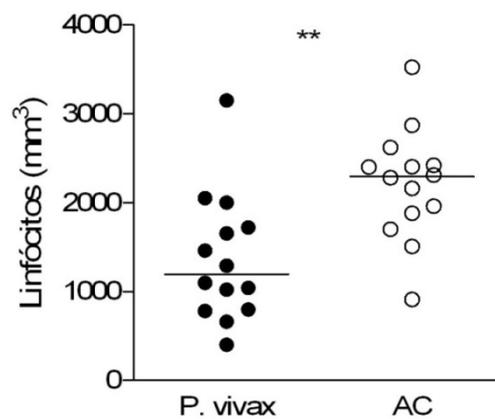


Figura 5: Pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam diminuição do número absoluto de linfócitos. O número absoluto de linfócitos foi avaliado em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, antes (●) e após a cura (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon. ** $0,01 < p < 0,05$.

5.3 Avaliação dos níveis de citocinas em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*

Para avaliação das citocinas foi utilizada a técnica de CBA, que apresenta limites de detecção diferentes para cada citocina. IL-6, IL-10 e TNF- α apresentam respectivamente um limite de detecção de 2,4 pg/mL, 4,5 pg/mL e 3,8 pg/mL. Já foi descrito na literatura que a infecção pelo *P. vivax* causa um aumento importante nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (28). Altos níveis de IL-6 e IL-10 foram encontrados no plasma dos pacientes infectados em relação aos mesmos pacientes após o tratamento. Não foi encontrada diferença significativa nos níveis de TNF- α entre os pacientes na fase aguda da malária e após cura da doença.

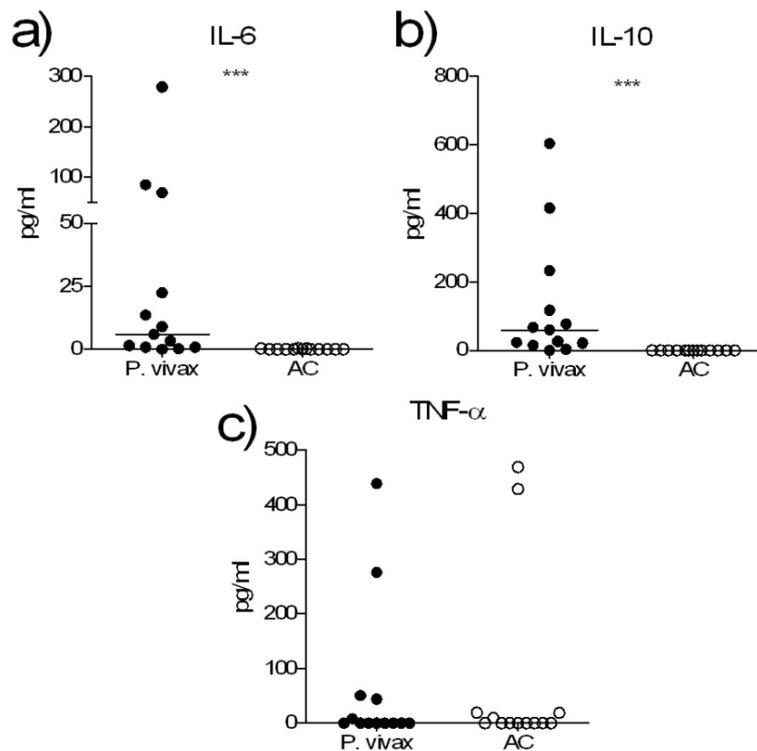


Figura 6: Pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam níveis aumentados de IL-6 e IL-10 circulantes. (a) Níveis de IL-6, (b) IL-10 e (c) TNF- α foram avaliados por CBA em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*, antes (●) e após a cura (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. Análise estatística foi realizada utilizando o teste de *Wilcoxon*. *** p-valor < 0,01.

5.4 Padronização do painel

Uma padronização minuciosa foi realizada para minimizar a interferência entre os fluoróforos utilizados num mesmo painel para a avaliação de antígenos expressos pelas populações celulares de interesse. Após a titulação dos anticorpos, várias combinações de fluorocromos foram realizadas, adicionando-se anticorpo por anticorpo. Como mostrado na figura 7, o primeiro reagente adicionado para as marcações, foi o corante de viabilidade celular utilizado para a exclusão de células mortas em função da infecção e do estresse térmico. O segundo passo consistiu na adição de anticorpo marcador de linfócitos T, CD3, conjugado com o fluoróforo QD655. Em seguida, foi adicionado o anticorpo anti-CD4. Em outra marcação, além dos reagentes anteriores foi adicionado o anticorpo anti-CD8, sendo possível assim a identificação das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 viáveis. Em sequência, cada anticorpo utilizado para a avaliação de marcadores de ativação, moléculas reguladoras foram avaliadas nas subpopulações de células T CD4 e CD8 foram adicionados passo a passo. As figuras 7 e 8 representam respectivamente as subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 expressando as moléculas de interesse. Cada linha dessas figuras representam a combinação dos anticorpos adicionados em um único poço.

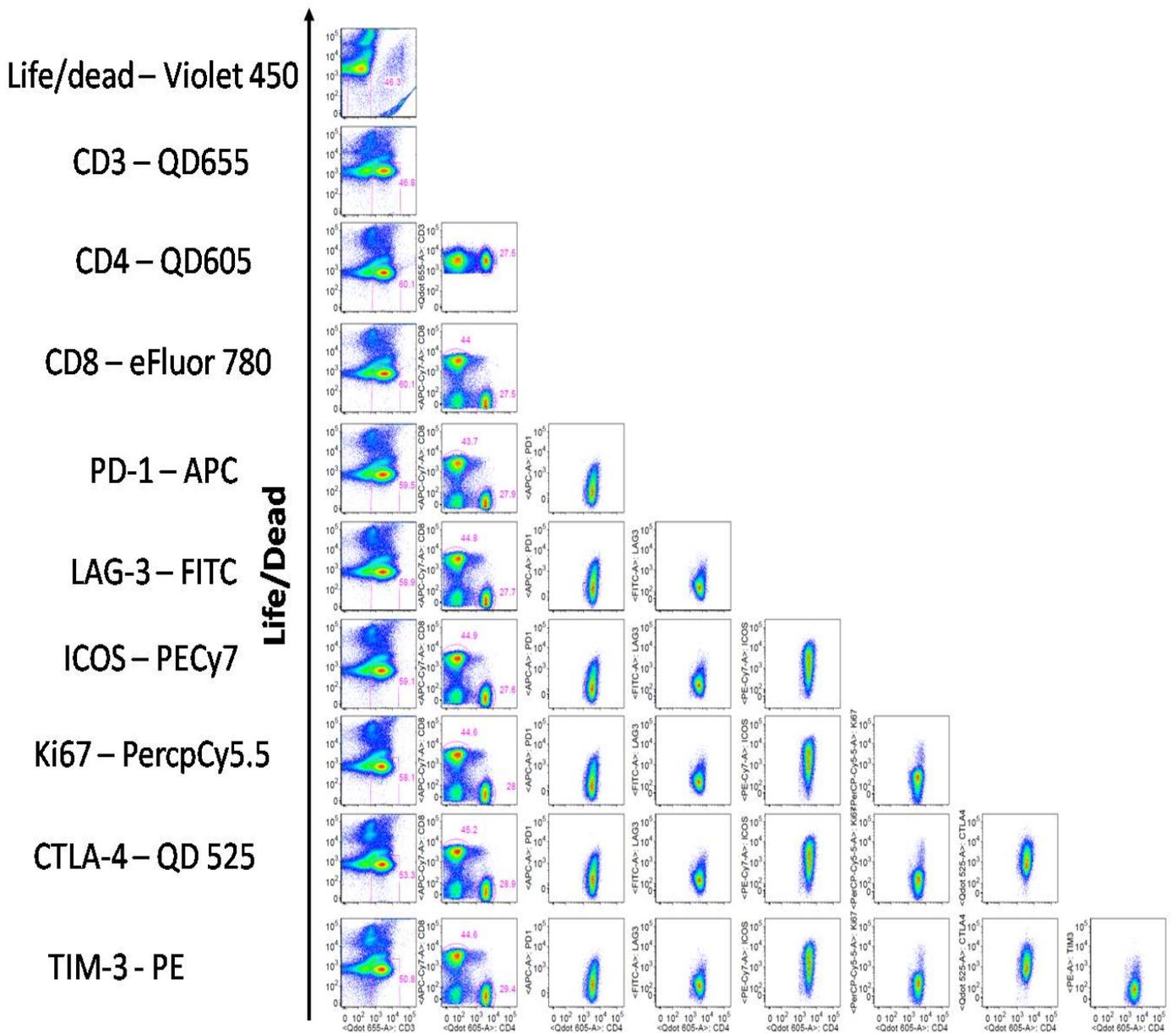


Figura 7: Construção progressiva de painel multicolor em células T CD4. Para determinar uma possível interferência de algum fluoróforo no painel multicolor, uma série de amostras foram marcadas com diferentes anticorpos para determinar o painel. A primeira amostra contém o marcador de morte celular e em cada amostra subsequente foi adicionado outro anticorpo. Cada linha representa um poço e a adição de cada anticorpo como indicado ao lado das linhas. Para cada *dot plot* foi criada a correta estratégia de *gate* para análise. Isto permite avaliar possíveis interferências causadas por outros anticorpos.

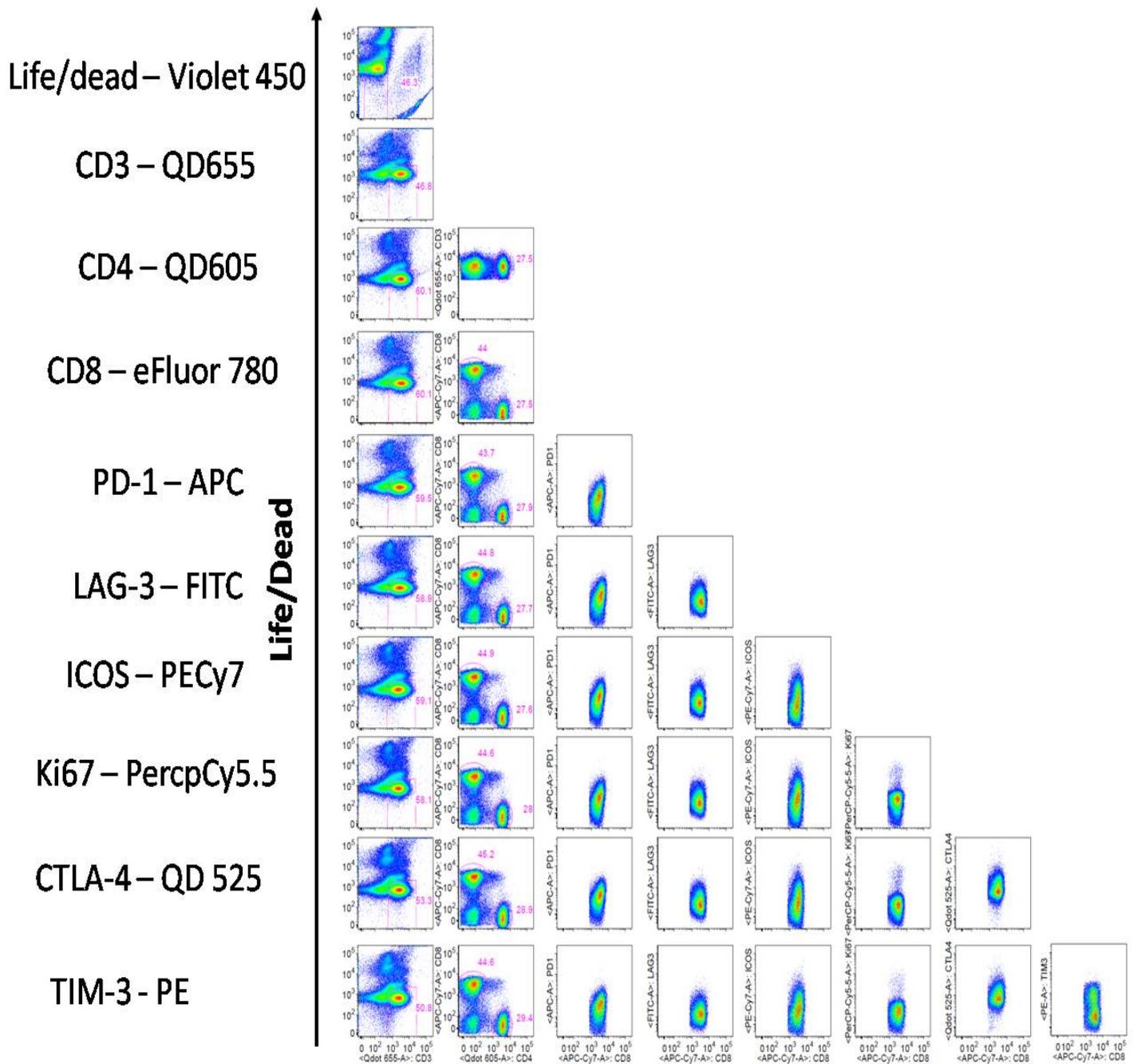


Figura 8: Construção progressiva de painel multicolor em células T CD8. Para determinar uma possível interferência de algum fluoróforo no painel multicolor, uma série de amostras foram marcadas com diferentes anticorpos para determinar o painel. A primeira amostra contém o marcador de morte celular e em cada amostra subsequente foi adicionado outro anticorpo. Cada linha representa um poço e a adição de cada anticorpo como indicado ao lado das linhas. Para cada *dot plot* foi criada a correta estratégia de *gate* para análise. Isto permite avaliar possíveis interferências causadas por outros anticorpos.

Além da avaliação da expressão de cada marcador individualmente, várias combinações foram analisadas em cada subpopulação de células T CD4 (Figura 9) e T CD8 (Figura 10). Para certificarmos a ausência da influencia da adição de um novo anticorpo/fluoróforo na avaliação das populações expressando os outros marcadores de interesse, foram avaliadas populações duplo positivas (Figura 9 e Figura 10).

Cada coluna das Figuras 9 e 10 representam um poço de placa de marcação. Nas diferentes colunas foram adicionados anticorpos gradativamente da esquerda para a direita. Cada *dot plot* representa a combinação da marcação de dois fluorocromos e a possível interferência na marcação pela adição de um outro anticorpo. O anticorpo adicionado está sempre representado acima da coluna.

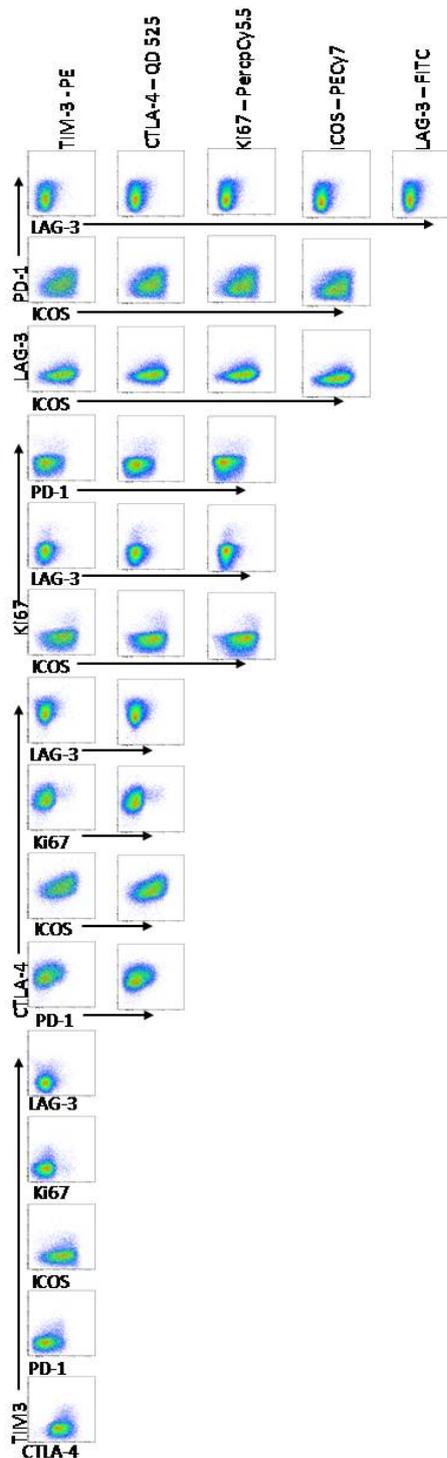


Figura 9: Construção progressiva de painel multicolor em populações T CD4 duplo-positivas. Avaliação da influência de acordo com a adição dos anticorpos nas populações duplo-positivas. Para determinar uma possível interferência de algum fluoróforo no painel multicolor, uma série de amostras foram marcadas com diferentes anticorpos para determinar o painel. A primeira amostra contém o marcador de morte celular e em cada amostra subsequente foi adicionado outro anticorpo. Cada linha representa um poço e a adição de cada anticorpo como indicado acima das colunas. Para cada *dot plot* foi criada a correta estratégia de *gate* para análise. Isto permite avaliar possíveis interferências causadas por outros anticorpos.

5.5 Estratégias de *gate* adotada para caracterização das populações

A fim de caracterizar as populações de interesse foram realizados *gates* utilizando todas as combinações possíveis de fluoróforos para exclusão de *debris* celulares (Figura 11a-e), exclusão de células mortas (Figura 11f), seleção de linfócitos T viáveis (Figura 11g), e exclusão de grumos celulares (Figura 11h). Finalmente, a aquisição foi visualizada em função do tempo para que possíveis bolhas de ar presentes durante a aquisição da amostra fossem excluídas da análise (Figura 11i). Após a criação de todos os *gates* foi realizada uma ferramenta do programa de análise que consiste na interseção de todos os *gates* citados acima a fim de se obter um conjunto de células livres de qualquer interferências. Esta ferramenta é denominada *boolean* (Figura 11j). Foi definida uma matrix de compensação através do uso de *beads* de compensação utilizando uma *bead* não marcada e *beads* marcadas com todos fluoróforos individualmente. A matrix de compensação é feita para impedir que haja interferência entre os diferentes fluoróforos utilizados no painel de anticorpos, desse modo é possível minimizar manualmente a influência entre todos os fluoróforos dos anticorpos. Em conjunto da compensação manual foram realizadas transformações bioexponenciais necessária para que os eventos se afastem dos eixos X e Y, e para a confirmação de que a compensação foi realizada de maneira correta. O programa utilizado para análise foi o *Flow Jo 9.4.1*.

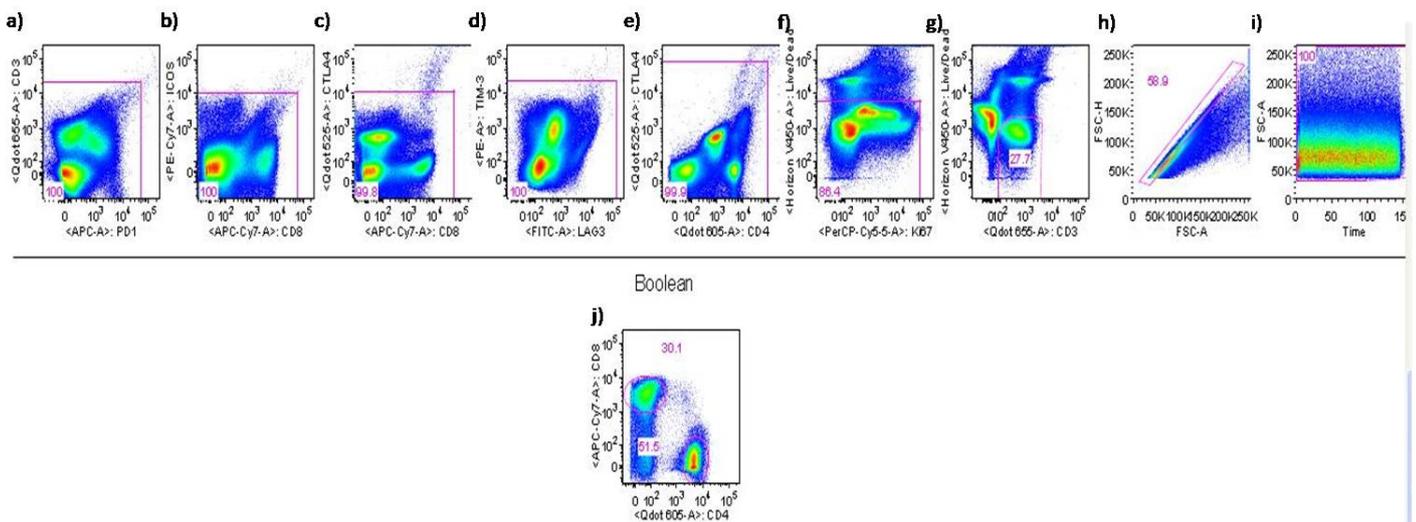


Figura 11: Estratégia de combinação de *gates* para seleção de populações a serem analisadas. *Gates* realizados utilizando as combinações de fluoróforos (a-e), células

viáveis (f), linfócitos T (g), *singlets* (h), aquisição em função do tempo (i) e resultado da interseção dos *gates* acima (j).

5.6 Caracterização fenotípica de células T

Após identificação das populações das células T CD4 e CD8, como descrito acima, foram avaliadas as moléculas reguladoras expressos por células T. Os níveis de expressão de ICOS por células de pacientes infectados pelo *P. vivax* e dos mesmos após tratamento com antimaláricos foram avaliados. Foi observado um aumento da frequência tanto de células T CD4⁺ICOS⁺ (Figura 12a, c) quanto de células T CD8⁺ICOS⁺ (Figura 12b, d) durante a malária aguda em comparação com os mesmos pacientes após a cura da doença (Figura 12).

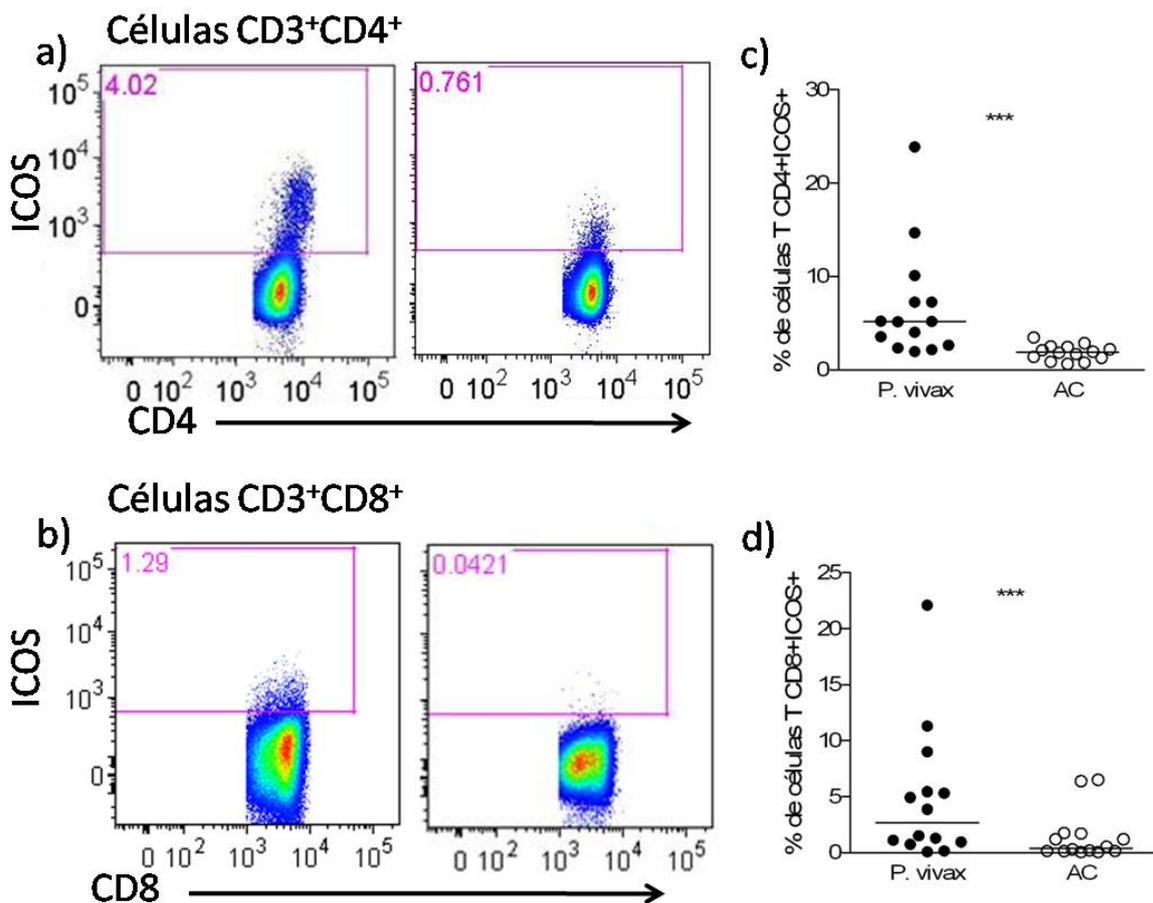


Figura 12: Expressão de ICOS é induzida em células T CD4 e CD8 de pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*. Dot plots representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4 (a) e CD8 (b) expressando ICOS de pacientes infectados pelo *P. vivax* antes (painéis a esquerda) e após o tratamento (painéis a direita). As frequências de linfócitos T CD4 (c) e CD8 (d) expressando ICOS foram avaliadas em paciente

infectados pelo *P. vivax* antes (●) e após o tratamento (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. *** $p < 0,01$, pelo teste de *Wilcoxon*.

Os níveis de expressão de CTLA-4 por células T CD4 (Figura 11a) e células T CD8 (Figura 11b) encontram-se aumentados nos pacientes infectados pelo *P. vivax* quando comparado aos mesmos pacientes após tratamento com antimaláricos.

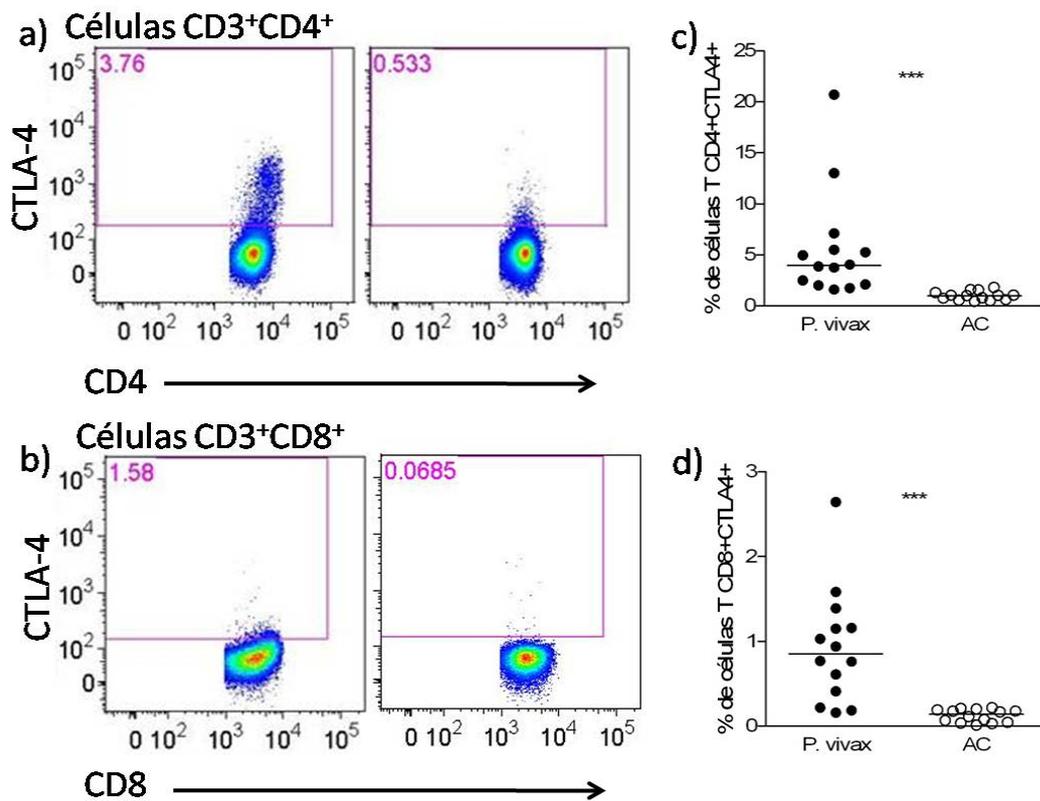


Figura 13: Expressão de CTLA-4 por células T CD4 e CD8 é induzida em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*. Dot plots representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4 (a) e CD8 (b) expressando CTLA-4 de pacientes infectados pelo *P. vivax* antes (painéis a esquerda) e após o tratamento (painéis a direita). As frequências de linfócitos T CD4 (c) e CD8 (d) expressando CTLA-4 foram avaliadas em paciente infectados pelo *P. vivax* antes (●) e após a cura (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. *** $p < 0,01$, pelo teste de *Wilcoxon*.

Os níveis de expressão de PD-1 em células T CD4 e células T CD8 de pacientes infectados pelo *P. vivax* e dos mesmos após tratamento com antimaláricos foram avaliados (Figura 12). Foi observado um aumento da frequência de células T CD4⁺PD-

1⁺ (Figura 14a) e células T CD8⁺PD-1⁺ (Figura 14b) nos pacientes infectados em relação aos mesmos pacientes após a cura da doença.

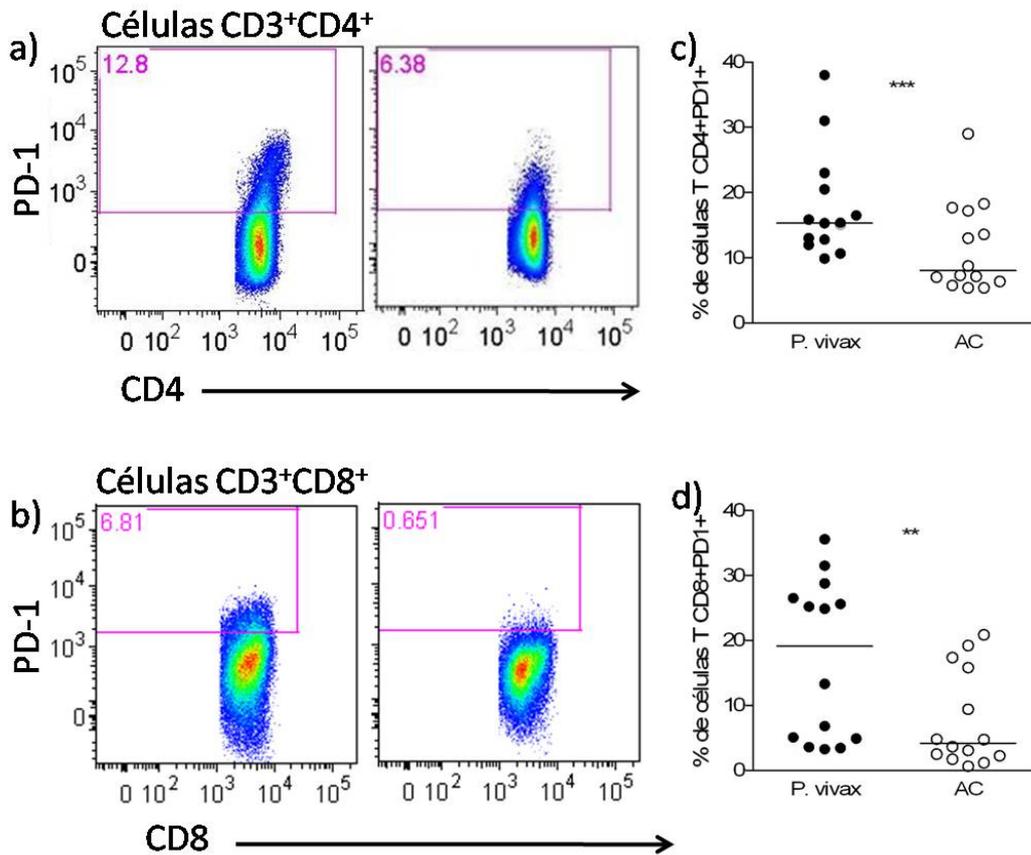


Figura 14: Expressão de PD-1 por células T CD4 e CD8 é induzida em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*. Dot plots representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4 (a) e CD8 (b) expressando PD-1 de pacientes infectados pelo *P. vivax* antes (painéis a esquerda) e após o tratamento (painéis a direita). As frequências de linfócitos T CD4 (c) e CD8 (d) expressando PD-1 foram avaliadas em paciente infectados pelo *P. vivax* antes (●) e após a cura (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. ** 0,01 < p < 0,05, *** p < 0,01, pelo teste de Wilcoxon.

Os níveis de expressão de TIM-3 em células T CD4 e células T CD8 de pacientes infectados pelo *P. vivax* e dos mesmos após tratamento com antimaláricos foram avaliados (Figura 15). Foi observado um aumento da frequência de células T CD4⁺TIM-3⁺ (Figura 15a) e células T CD8⁺TIM-3⁺ (Figura 15b) nos pacientes infectados em relação aos mesmos pacientes após a cura da doença.

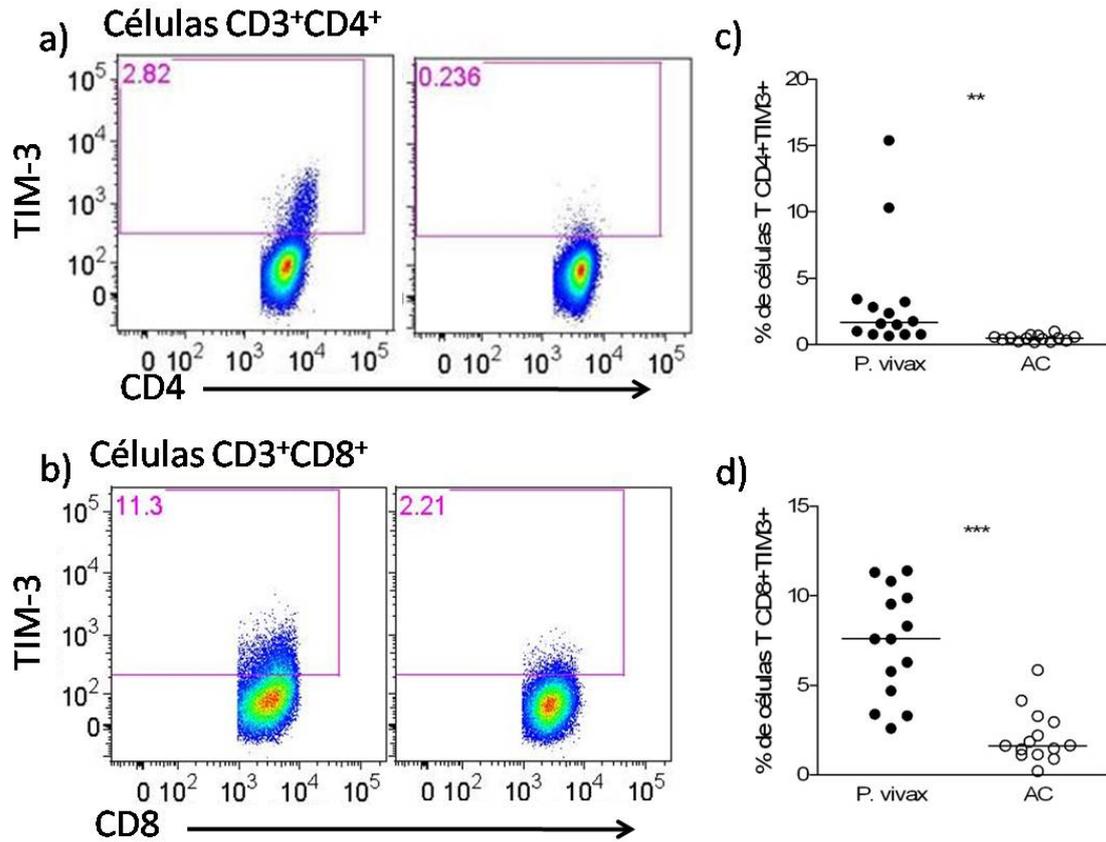


Figura 15: Expressão de TIM-3 por células T CD4 e CD8 é induzida em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*. *Dot plots* representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4 (a) e CD8 (b) expressando TIM-3 de pacientes infectados pelo *P. vivax* antes (painéis a esquerda) e após o tratamento (painéis a direita). As frequências de linfócitos T CD4 (c) e CD8 (d) expressando TIM-3 foram avaliadas em paciente infectados pelo *P. vivax* antes (●) e após a cura (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. ** 0,01 < p < 0,05, *** p < 0,01, pelo teste de *Wilcoxon*.

Além do aumento dos receptores inibidores descritos acima, a infecção pelo *P. vivax* induziu um aumento da frequência de células T CD4 e CD8 expressando LAG-3 (Figura 16). Após o tratamento, as frequências de células expressando LAG-3 retornaram aos níveis basais (Figura 16a, b).

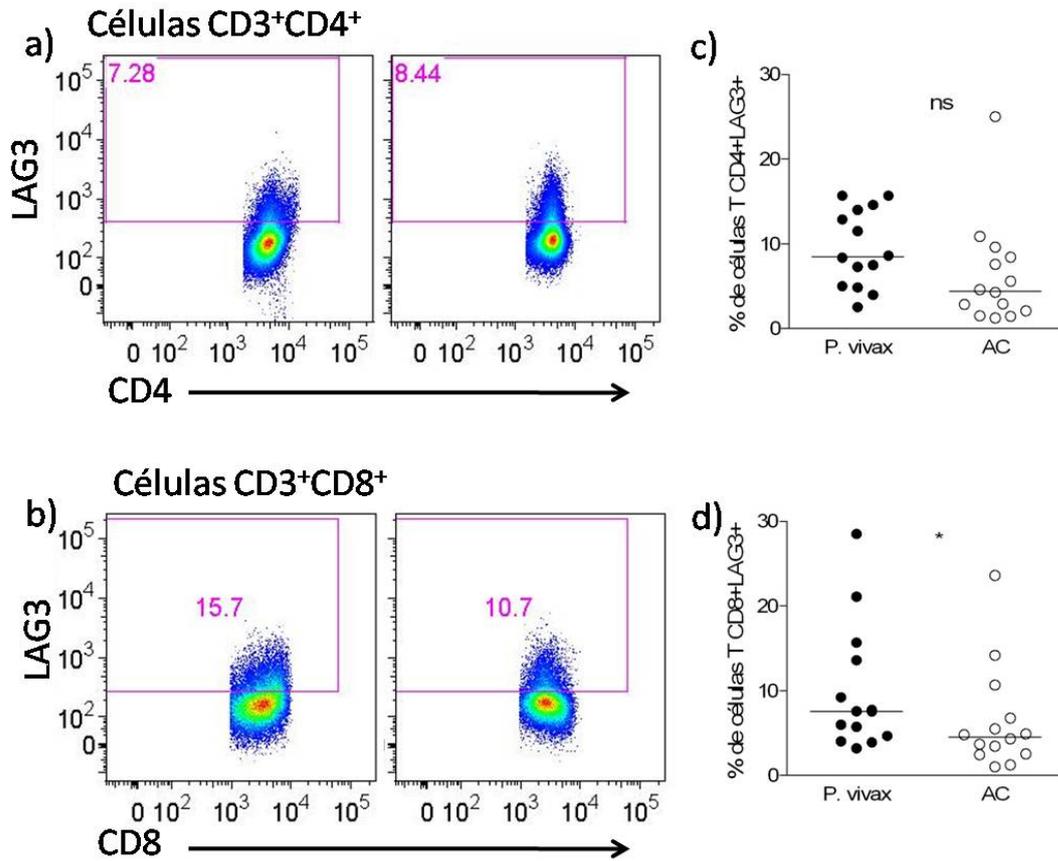


Figura 16: Expressão de LAG-3 por células T CD8 é induzida pela infecção pelo *Plasmodium vivax*. Dot plots representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4 (a) e CD8 (b) expressando LAG-3 de pacientes infectados pelo *P. vivax* antes (painéis a esquerda) e após o tratamento (painéis a direita). As frequências de linfócitos T CD4 (c) e CD8 (d) expressando LAG-3 foram avaliadas em paciente infectados pelo *P. vivax* antes (●) e após tratamento (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. * $p < 0,05$, pelo teste de *Wilcoxon*.

Outra molécula avaliada durante a caracterização fenotípica foi o Ki67. Ki67 foi utilizado como um marcador de proliferação celular das células T CD4 e CD8. Os níveis de expressão de Ki67 em células T CD4 e células T CD8 foram induzidos pela infecção pelo *P. vivax* (Figura 17). Foi observado um aumento da frequência de células T CD4⁺LAG-3⁺ (Figura 17a) e células T CD8⁺LAG-3⁺ (Figura 17b) nos pacientes infectados em relação aos mesmos pacientes após a cura da doença.

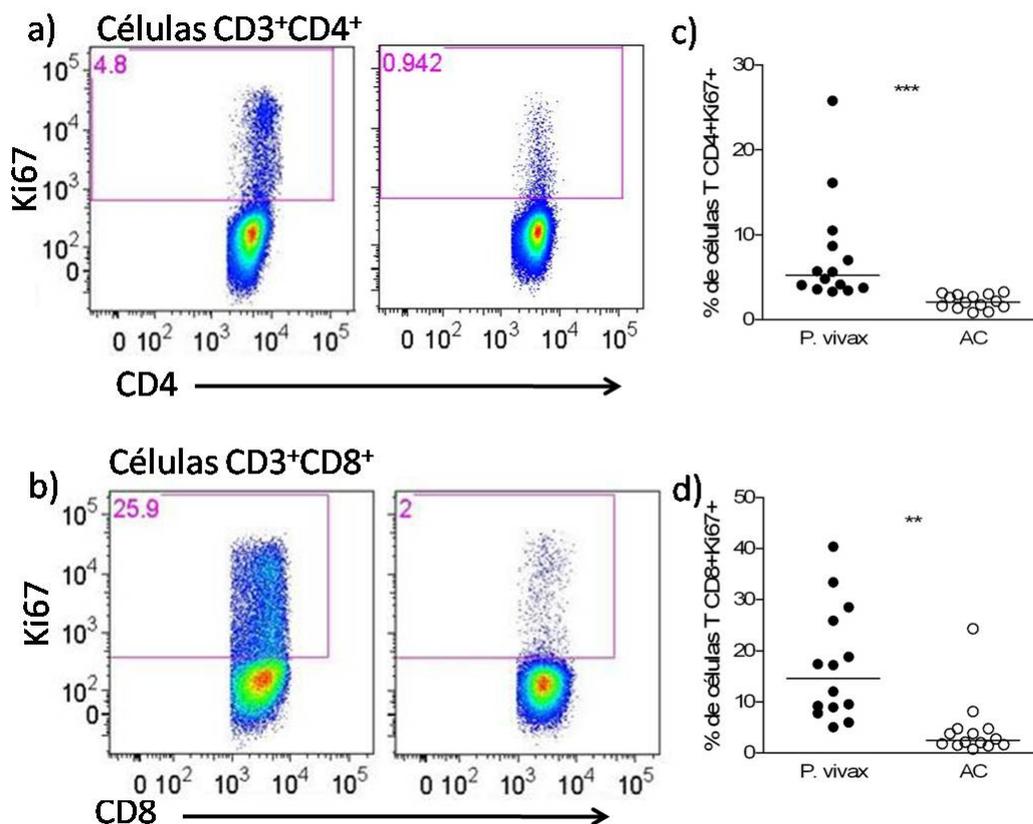


Figura 17: Expressão de Ki67 é induzida em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*. Dot plots representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4 (a) e CD8 (b) expressando Ki67 de pacientes infectados pelo *P. vivax* antes (painéis a esquerda) e após o tratamento (painéis a direita). As frequências de linfócitos T CD4 (c) e CD8 (d) expressando Ki67 foram avaliadas em paciente infectados pelo *P. vivax* antes (●) e após a cura (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. ** 0,01 < p < 0,05, *** p < 0,01, pelo teste de Wilcoxon.

5.7 Co-expressão dos marcadores avaliados

Após caracterização individual da expressão dos marcadores de interesse, como demonstrado no item acima, foi avaliada a co-expressão destas moléculas nas populações de linfócitos T CD4 e CD8. Todas as possíveis combinações entre a expressão de moléculas co-estimulatórias, receptores inibidores e do Ki67 foram avaliadas.

A primeira combinação utilizada foi a expressão de CTLA-4 em células T CD4 e CD8 associada a todos os outros marcadores (Figura 18). Como pode ser observado, houve um aumento na frequência de células T CD4 (Figura 18a, c) e T CD8 (Figura 18d, f) co-expressando CTLA-4 e ICOS, Ki67, LAG-3, PD-1, TIM-3 (painéis e gráficos representados da direita para a esquerda) em pacientes infectados pelo *P. vivax* em comparação com os mesmos pacientes quanto avaliados depois da cura (Figura 18b, e).

Como pode ser observado na Figura 7, a infecção pelo *P. vivax* também leva ao aumento da frequência de células T CD4 (Figura 19a, c) e T CD8 (Figura 19d, f) co-expressando PD-1 e ICOS, Ki67, LAG-3, TIM-3 (painéis e gráficos representados da direita para a esquerda) quando comparado com os mesmos pacientes avaliados depois da cura (Figura 19b, e).

Adicionalmente, a expressão de TIM-3 em células T CD4 e CD8 também foi avaliada em associação aos demais marcadores (Figura 20). A infecção pelo *P. vivax* leva ao aumento da frequência de células T CD4 (Figura 20a, c) e T CD8 (Figura 20d, f) co-expressando TIM-3 e ICOS, Ki67, LAG-3, (painéis e gráficos representados da direita para a esquerda) quando comparado com os mesmos pacientes quanto avaliados depois da cura (Figura 20b, e).

Pacientes na fase aguda da malária apresentam aumento na expressão de LAG-3 em células T CD4 (Figura 21a, c) e T CD8 (Figura 21d, f) em associação com a molécula co-estimulatória ICOS e o marcador de proliferação Ki67 (painéis e gráficos representados da direita para a esquerda) quando comparado com os mesmos pacientes quanto avaliados depois da cura (Figura 21b, e).

Por fim, também foi observado o aumento da co-expressão de ICOS e Ki67 em células T CD4 (Figura 22a, c) e T CD8 (Figura 22d, f) em pacientes infectados pelo *P. vivax* em comparação com os mesmos pacientes quanto avaliados depois da cura (Figura 22b, e).

Assim, durante a infecção aguda pelo *P. vivax*, podemos observar não somente o aumento da expressão de cada marcador de interesse neste estudo, mas também o aumento da frequência de células T CD4 e T CD8 co-expressão a combinação de cada duas moléculas avaliadas.

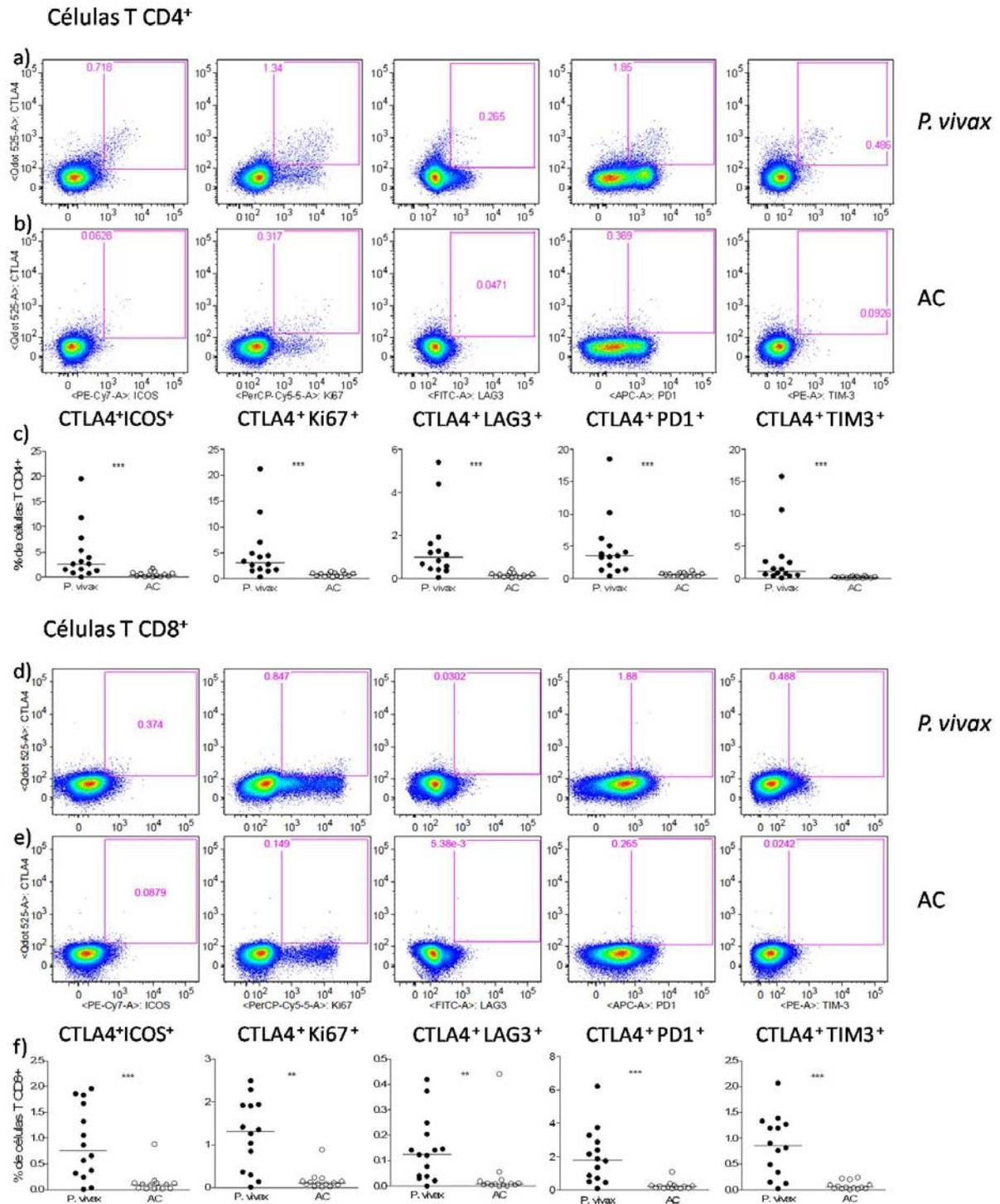


Figura 18: A infecção pelo *P. vivax* induz a co-expressão de moléculas reguladoras em células T CD4 e CD8. *Dot plots* representativos mostram a co-expressão de CTLA-4 em células T CD4 (a, b) e células T CD8 (d, f) de pacientes infectados pelo *P. vivax* (a, d) e dos mesmos pacientes após a cura da doença (b, f), com os outros marcadores avaliados. Porcentagens de células T CD4 (c) e CD8 (f) co-expressando CTLA-4 e os outros marcadores avaliados durante a infecção (●) e após o tratamento (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. **0,05 < p < 0,01; *** p < 0,01, pelo teste de Wilcoxon.

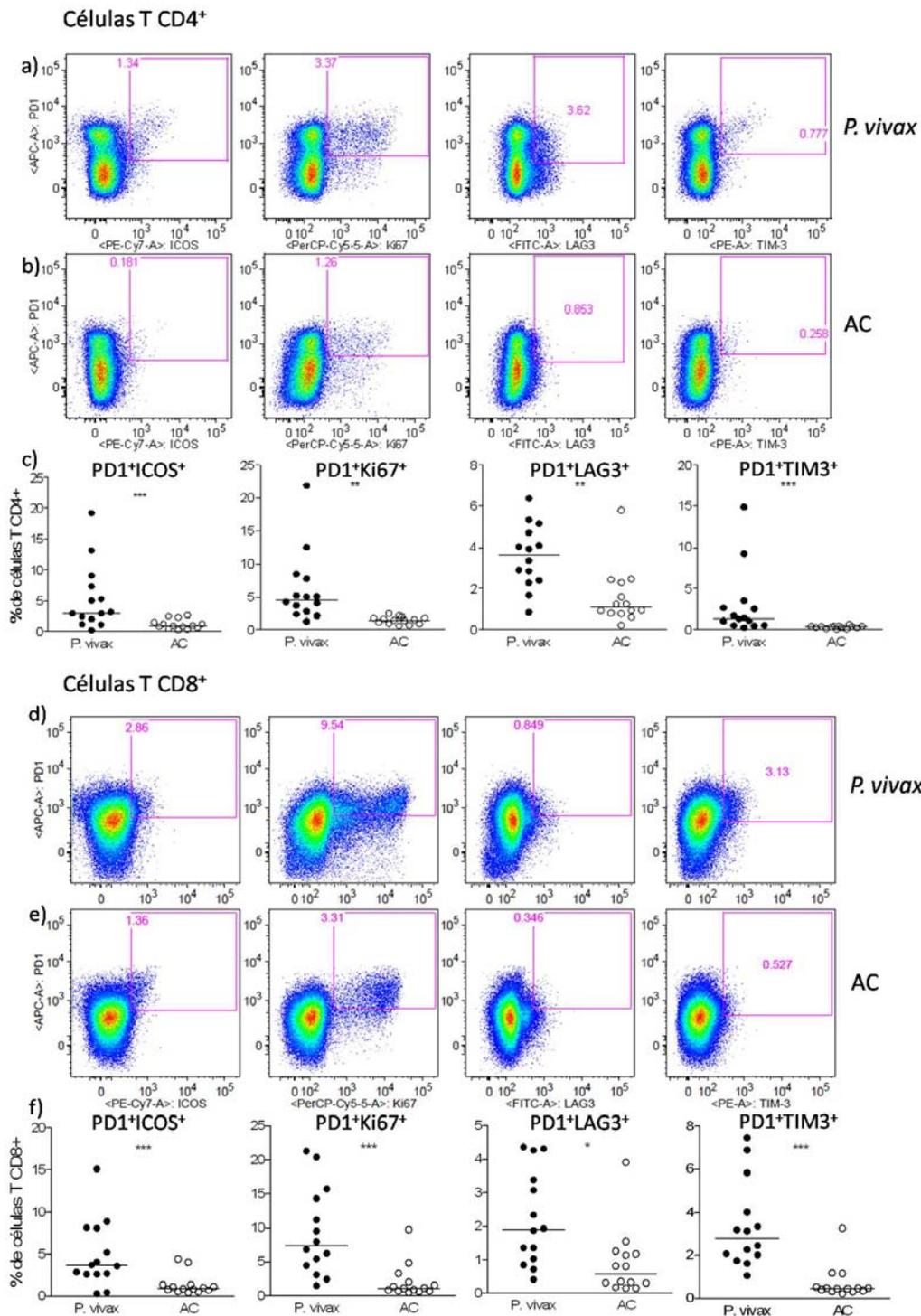


Figura 19: A infecção pelo *P. vivax* induz a co-expressão de moléculas reguladoras em células T CD4 e CD8. Dot plots representativos mostram a co-expressão de PD-1 em células T CD4 (a, b) e células T CD8 (d, f) de pacientes infectados pelo *P. vivax* (a, d) e dos mesmos pacientes após a cura da doença (b, f), com os outros marcadores avaliados. Porcentagens de células T CD4 (c) e CD8 (f) co-expressando PD-1 e os outros marcadores avaliados durante a infecção (●) e após o tratamento (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. * $p < 0,05$; ** $0,05 < p < 0,01$; *** $p < 0,01$, pelo teste de Wilcoxon.

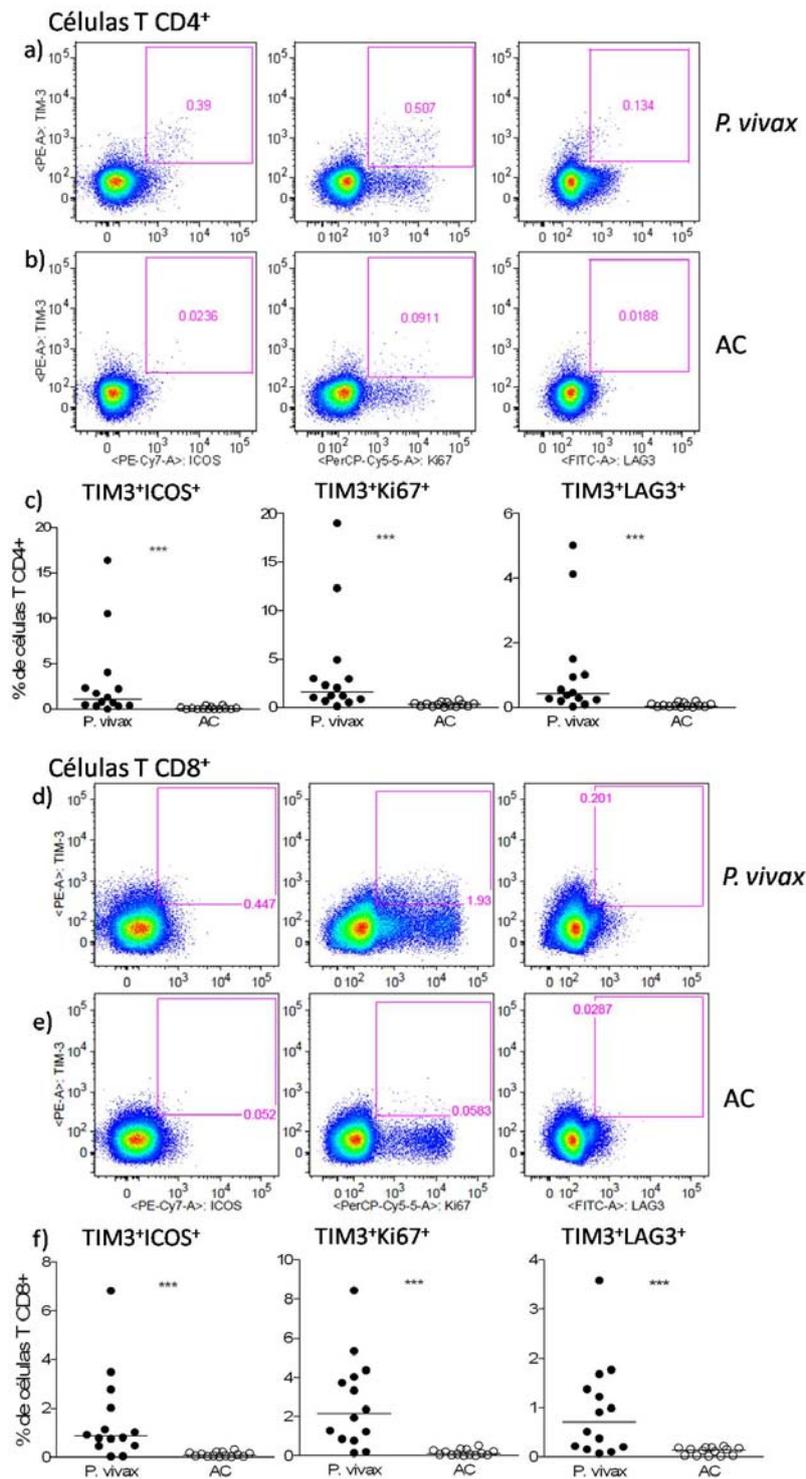


Figura 20: A infecção pelo *P. vivax* induz a co-expressão de moléculas reguladoras em células T CD4 e CD8. Dot plots representativos mostram a co-expressão de TIM-3, em células T CD4 (a, b) e células T CD8 (d, f) de pacientes infectados pelo *P. vivax* (a, d) e dos mesmos pacientes após a cura da doença (b, f), com os outros marcadores avaliados. Porcentagens de células T CD4 (c) e CD8 (f) co-expressando TIM-3e os outros marcadores avaliados durante a infecção (●) e após o tratamento (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. * p < 0,01, pelo teste de Wilcoxon.**

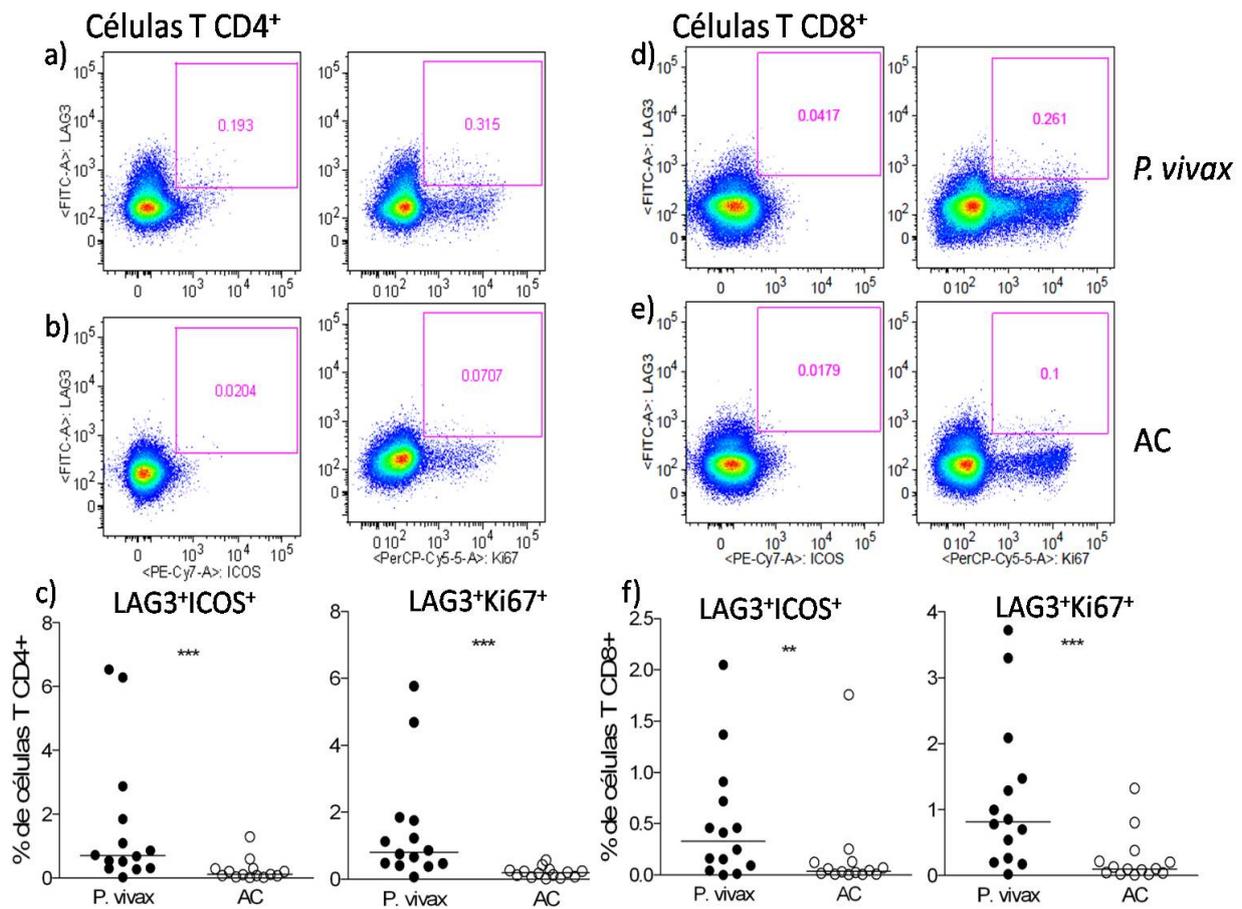


Figura 21: A infecção pelo *P. vivax* induz a co-expressão de moléculas reguladoras. *Dot plots* representativos mostrando a co-expressão de LAG-3, em células T CD4 (a, b) e células T CD8 (d, f) de pacientes infectados pelo *P. vivax* (a, d) e dos mesmos pacientes após a cura da doença (b, f), com os outros marcadores avaliados. Porcentagens de células T CD4 (c) e CD8 (f) co-expressando LAG-3e os outros marcadores avaliados durante a infecção (●) e após o tratamento (○).As linhas representam as medianas de cada grupo. ** $0,05 < p < 0,01$; *** $p < 0,01$, pelo teste de Wilcoxon.

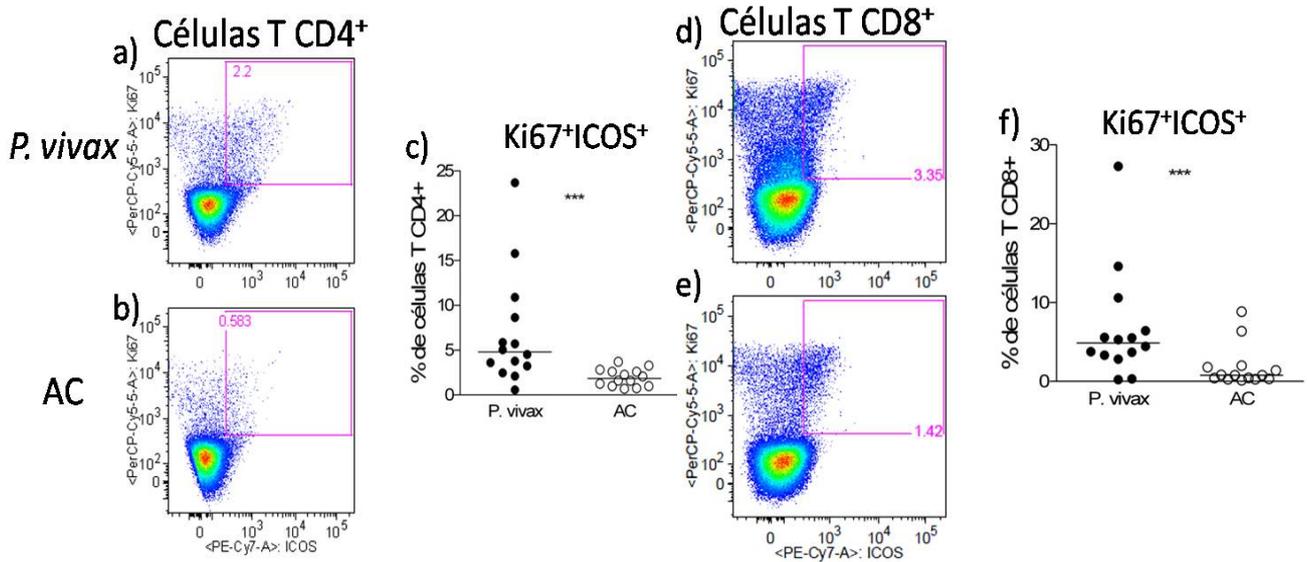


Figura 22: A infecção pelo *P. vivax* induz a co-expressão de moléculas reguladoras em células T CD4 e CD8. *Dot plots* representativos mostram a co-expressão de Ki67, em células T CD4 (a, b) e células T CD8 (d, f) de pacientes infectados pelo *P. vivax* (a, d) e dos mesmos pacientes após a cura da doença (b, f), com os outros marcadores avaliados. Porcentagens de células T CD4 (c) e CD8 (f) co-expressando Ki67 e os outros marcadores avaliados durante a infecção (●) e após o tratamento (○). As linhas representam as medianas de cada grupo. *** $p < 0,01$, pelo teste de *Wilcoxon*.

5.8 Co-expressão exclusiva dos marcadores avaliados

Com a finalidade de avaliarmos simultaneamente a co-expressão dos marcadores nas subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 foi utilizada uma ferramenta do *FlowJo* 9.4.1 denominada *boolean gate*. Esta ferramenta nos permite avaliar todas as possíveis combinações dos marcadores de interesse. A primeira análise mostrada é a co-expressão de todos os marcadores abordados no estudo. A Figura 23 mostra a frequência de células T CD4 (a) e CD8 (d) expressando CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, PD-1, TIM-3, representada por C+I+K+L+P+T+. Em função da infecção pelo *P. vivax* houve um aumento significativo das populações de CD4 e CD8 que co-expressam todos os marcadores quando comparado aos mesmos pacientes após cura da doença.

Outras duas combinações são mostradas na figura 23. A segunda combinação mostra a co-expressão de células T CD4 (b) e CD8 (e) que expressam CTLA-4, PD-1, TIM-3 e LAG-3, todos bem caracterizados na literatura como receptores inibidores, mas que não expressam Ki67 e ICOS, relacionados respectivamente com proliferação e estimulação celular. Interessante observar que as proporções de células T CD4 e T CD8 C+I-K-L+P+T+ também estão aumentadas em pacientes infectados pelo *P. vivax* quando comparado com pacientes após a cura. No entanto, as frequências de células expressando exclusivamente os receptores inibidores parecem bem menores do que as proporções das células expressando simultaneamente todos os marcadores avaliados no estudo. A terceira combinação mostra a expressão exclusiva dos marcadores de proliferação e co-estimulação (C-I+K+L-P-T-). Da mesma maneira, os pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam uma frequência maior de células T CD4 (c) e T CD8 (f) co-expressando estes marcadores, na ausência dos receptores inibidores do que os pacientes recrutados após a cura da malária.

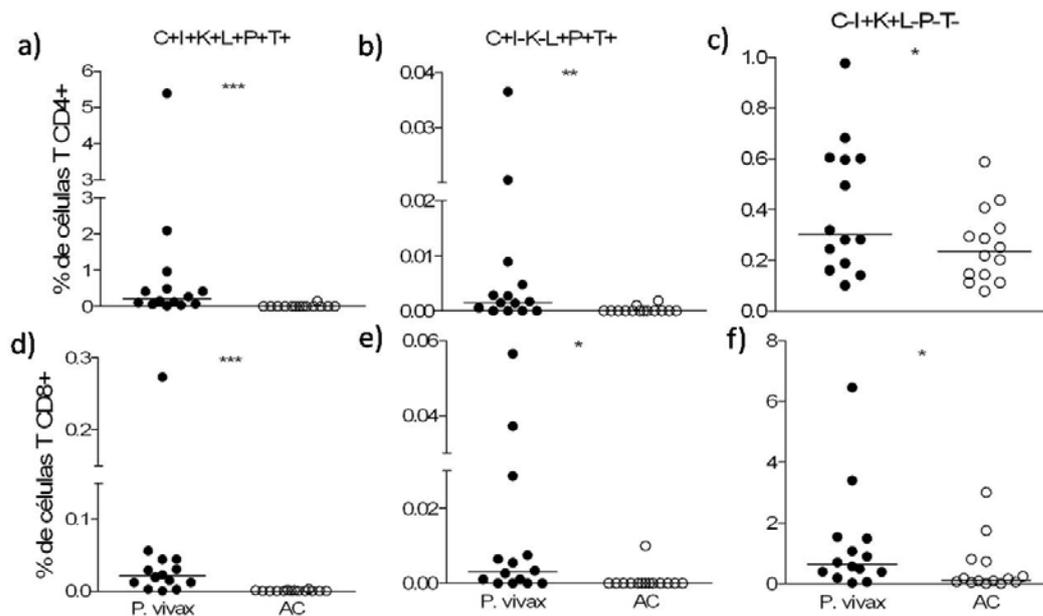


Figura 23: Aumento da co-expressão de receptores em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*. Populações de linfócitos T CD4 (a, b, c) e CD8 (c, d, e) co-expressando CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, PD-1 e TIM-3 (C⁺I⁺K⁺L⁺P⁺T⁺) (a, d), Combinações apenas com os receptores inibidores C⁺I⁻K⁻L⁺P⁺T⁺ (b, e). Por fim as combinações de C⁺I⁻K⁺L⁻P⁻T⁻ (c, f). Os círculos escuros representam os pacientes infectados pelo *P. vivax* e os círculos abertos representam os pacientes após cura da doença. As linhas representam as medianas de cada grupo. * p < 0,05; ** 0,05 < p < 0,01; *** p < 0,01, pelo teste de *Wilcoxon*.

Além disso, foi avaliada a porcentagem de células expressando todos os marcadores, cinco, quatro, três, dois, apenas um marcador ou nenhum marcador. Foram avaliadas todas as possíveis combinações dentro destas populações, com a utilização de uma ferramenta do *FlowJo 9.4.1*.

Como pode ser observado, pacientes infectados com o *P. vivax* possuem células T CD4 que expressam seis, cinco e quatro marcadores de ativação (Figura 24a). Estas populações deixam de existir nos mesmos pacientes após a cura (Figura 24b). Tanto pacientes na fase aguda quanto após a cura apresentam células T CD4 expressando três, dois ou apenas um marcador (Figura 24a). No entanto, com a cura da infecção, estas porcentagens diminuem (Figura 24b).

Já entre os linfócitos T CD8, não foi observado a presença de células expressando seis ou cinco marcadores. Na presença do parasito, as células T CD8 podem expressar quatro, três, dois ou um marcador (Figura 24c), sendo que as proporções diminuem na ausência do parasito no hospedeiro (Figura 24d).

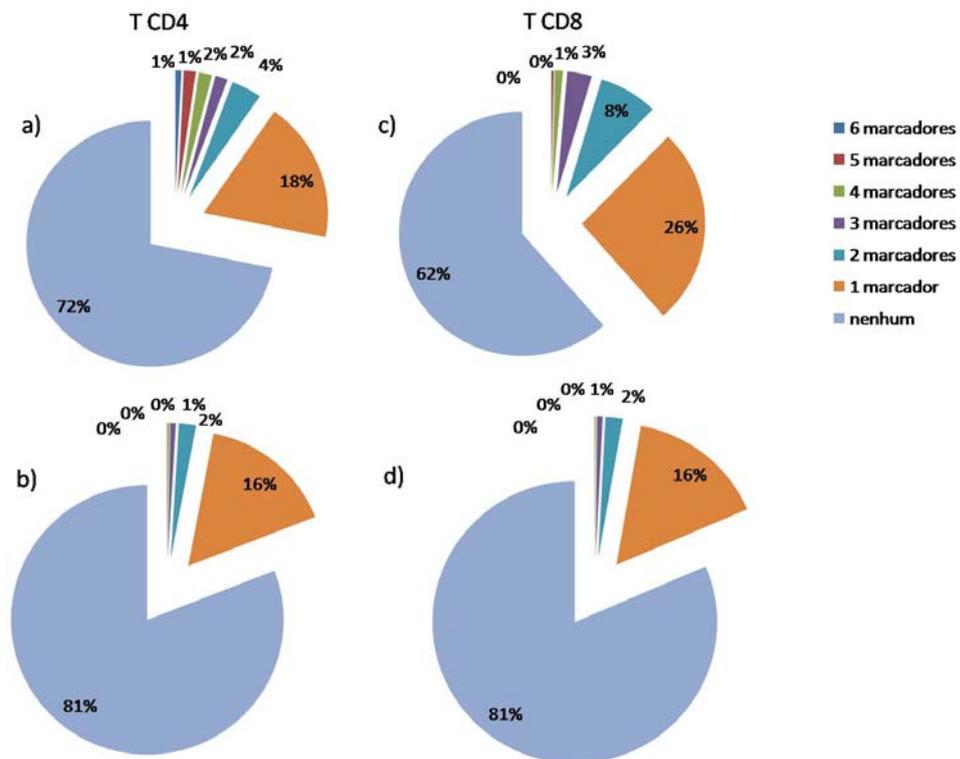


Figura 24: Aumento de populações que co-expressam receptores em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*. Frequências de células T CD4(a) e T CD8 (c) de pacientes infectados pelo *P. vivax* e após a cura da doença (b e d, respectivamente). As pizzas representam as proporções das populações de células T CD4 e CD8 expressando 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou nenhum marcador, representados em cores diferentes e distribuídas no sentido horário.

5.9 Avaliação das correlações

5.9.1 Correlação entre marcadores

Análises de correlação foram realizadas com a finalidade de demonstrar relações entre a expressão dos marcadores avaliados. Para isso, utilizando-se o teste de *Spearman*, foram correlacionadas as frequências de células T CD4 (Quadro 3) e CD8 (Quadro 4) expressando cada um dos marcadores de ativação avaliados. Após a cura com drogas antimaláricas não houveram correlações significativas e portanto os dados não foram mostrados.

As análises de correlação realizadas neste estudo mostram que quanto maior as frequências de células T CD4 expressando TIM-3, maiores as frequências de células T

CD4 expressando CTLA-4 ($\rho = 0,7714$), ICOS ($\rho = 0,6571$) e Ki67 ($\rho = 0,7714$). Adicionalmente, observamos correlações positivas entre as frequências de células T CD4 expressando CTLA-4 e as frequências de células T expressando ICOS ($\rho = 0,8637$) e Ki67 ($\rho = 0,9473$). Por fim, quando maior as proporções de células T CD4 expressando ICOS, maior a capacidade proliferativa destas células, indicada pelo Ki67 ($\rho = 0,9473$). Os valores em vermelho representam significância estatística (Quadro 3).

Quadro 3: Correlações entre expressão de marcadores de ativação pelas populações de células T CD4 em pacientes infectados pelo *P. vivax*

| CD4 | TIM-3 | PD-1 | CTLA-4 | LAG-3 | ICOS | Ki67 |
|--------|---------|--------|--------|---------|--------|------|
| TIM-3 | | | | | | |
| PD-1 | 0,03297 | | | | | |
| CTLA-4 | 0,7714 | 0,1736 | | | | |
| LAG-3 | -0,3894 | 0,1848 | -0,143 | | | |
| ICOS | 0,6571 | 0,4198 | 0,8637 | -0,3102 | | |
| Ki67 | 0,7714 | 0,2923 | 0,9473 | -0,286 | 0,9473 | |

Por outro lado, quando avaliamos as relações entre os marcadores de interesse expressos em linfócitos T CD8, observamos correlações negativas entre as proporções de células expressando LAG-3 e PD-1 ($\rho = -0,6352$) ou LAG-3 e ICOS ($\rho = -0,7187$). Os valores em vermelho representam significância estatística (Quadro 4).

Quadro 4: Correlações entre expressão de marcadores de ativação pelas populações de células T CD8 em pacientes infectados pelo *P. vivax*

| CD8 | TIM-3 | PD-1 | CTLA-4 | LAG-3 | ICOS | Ki67 |
|--------|--------|---------|---------|---------|--------|------|
| TIM-3 | | | | | | |
| PD-1 | 0,367 | | | | | |
| CTLA-4 | 0,2264 | 0,0022 | | | | |
| LAG-3 | 0,0989 | -0,6352 | -0,0901 | | | |
| ICOS | 0,178 | 0,4418 | 0,2747 | -0,7187 | | |
| Ki67 | 0,4813 | 0,05055 | 0,4286 | -0,1121 | 0,4374 | |

5.9.2 Correlação entre dados laboratoriais laboratoriais

Na malária é bem característica a diminuição no número de plaquetas e alterações de enzimas indicadores de dano hepático, e.g., TGO. Os níveis de plaquetas e TGO variam em função da gravidade da doença. Os nossos dados mostram que quanto maior os níveis de TGO menor o número de plaquetas em um mesmo paciente (Figura 25).

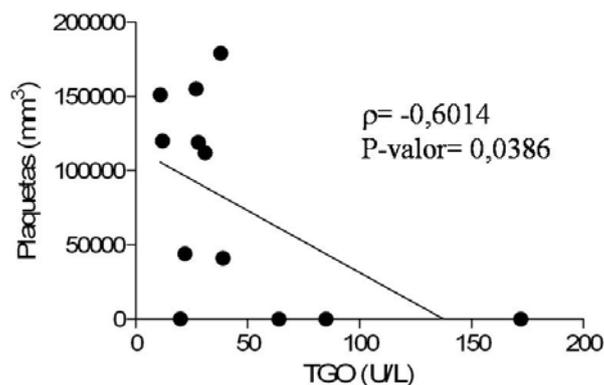


Figura 25: Correlação negativa entre plaquetas (mm^3) e TGO (U/L) de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Os níveis de TGO (U/L), representados no eixo X, e números de plaquetas (mm^3), representados no eixo Y de pacientes infectados pelo *P. vivax*. O gráfico mostra reta representativa da regressão linear.

5.9.3 Correlação entre dados laboratoriais e marcadores imunológicos

A fim de demonstrar que os marcadores avaliados apresentavam importância clínica na doença foram realizadas correlações entre as frequências de células T expressando os marcadores de interesse e os dados clínicos dos pacientes infectados pelo *P. vivax*.

Foi observado na Figura 26 que a indução da expressão de TIM-3 em células T CD4 ($\rho = 0,7473$) e ICOS em células T CD8 ($\rho = 0,5714$) correlacionam com aumento dos níveis circulantes de TGO.

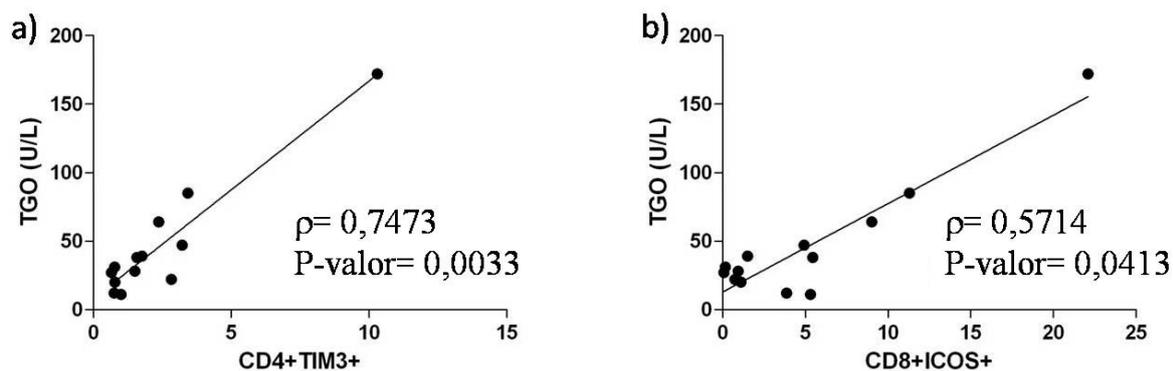


Figura 26: Níveis de TGO correlacionam com expressão de marcadores imunológicos em pacientes infectados pelo *P. vivax*. Proporções de células T CD4 expressando TIM-3 (a) e células T CD8 expressando ICOS (b), representadas no eixo X, e níveis de TGO(U/L), representados no eixo Y, de pacientes infectados pelo *P. vivax*. O gráfico mostra reta representativa da regressão linear.

Além disso, em pacientes infectados pelo *P. vivax*, foram observadas fortes correlações entre a diminuição do número de plaquetas e o aumento das populações de células T CD4 e T CD8 expressando os receptores inibidores TIM3 ($\rho = -0,7253$, $\rho = -0,6648$, respectivamente) (a, e) e CTLA4 ($\rho = -0,6099$, $\rho = -0,5934$, respectivamente) (b, f). Quanto menos o número de plaquetas, maior é a proporção de célula expressando os marcadores de ativação Ki67 ($\rho = -0,6099$) (c) e ICOS ($\rho = -0,5989$) (d). A expressão de Ki67 também correlaciona-se negativamente com o número de plaquetas nos indivíduos infectados pelo *P. vivax* ($\rho = -0,5659$) (g) (Figura 27).

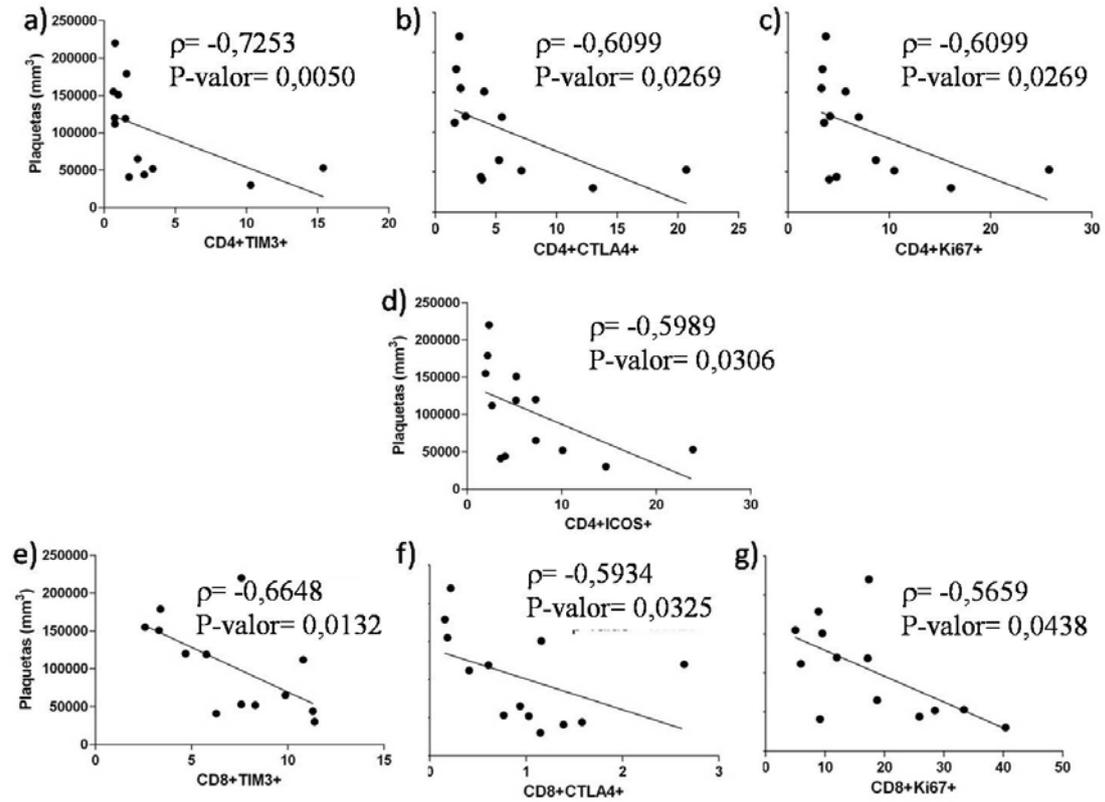


Figura 27: Número de plaquetas correlacionam com a expressão de marcadores imunológicos por células T em pacientes infectados pelo *P. vivax*. Proporções de células T CD4 expressando TIM-3 (a), CTLA-4 (b), Ki67 (c) e ICOS (d) e de células T CD8 expressando TIM-3 (e), CTLA-4 (f), Ki67 (g), representadas no eixo X, e número de plaquetas (mm³), representados no eixo Y, de pacientes infectados pelo *P. vivax*. O gráfico mostra reta representativa da regressão linear.

6 Discussão

Apesar da diminuição do número de casos da malária *falciparum* no Brasil, ainda hoje ela apresenta números alarmantes em nosso país. Mas a principal malária encontrada no Brasil é a causada pelo *P. vivax*, cerca de 90% (4). Foi sugerida a classificação da incidência parasitária anual (IPA) em baixo, médio ou alto risco de acordo com os seguintes critérios: baixo risco: IPA = 0 a 9.9, médio risco: IPA = 10 a 49.9 e alto risco: IPA = 50 ou mais. A IPA expressa o número de exames positivos de malária, por mil habitantes, em um determinado local e período, e estima o risco de se adoecer por malária. Em Porto Velho, local de estudo do nosso trabalho, no ano de 2011, o IPA foi de 44,22, considerado de médio risco pelo Ministério da Saúde (4).

Dos quatorze pacientes incluídos neste estudo, doze são do sexo masculino. A maior incidência de homens infectados pelo *P. vivax* se deve provavelmente aos hábitos de trabalho da população, que tornam os homens mais susceptíveis às picadas dos anofelinos. Diante da infecção aguda pelo *P. vivax*, foram observadas importantes alterações nos níveis de TGO e números de plaquetas. Os pacientes com malária apresentam um aumento significativo nos níveis de TGO em relação aos mesmos após a cura da doença. O aumento dos níveis de TGO circulantes podem ocorrer em função de dano hepático causado pela *Plasmodium vivax*, ou pela inflamação induzida pelo parasito. A plaquetopenia, embora sua etiologia ainda não seja confirmada, também é uma característica de pacientes infectados com *P. vivax*. Sugere-se que ela ocorra devido ao aumento do sequestro esplênico, ou ainda da possível presença do parasito em células da linhagem vermelha na medula, levando a diminuição da repopulação de plaquetas na circulação (99) (Quadro 1). Outra população celular que sofre alterações durante a malária são os linfócitos. Embora a grande maioria não apresente uma redução importante, os números de linfócitos em pacientes infectados são significativamente menores do que os mesmos pacientes após a cura. Essa redução pode ocorrer devido a apoptose de linfócitos (100) (Figura 1). Embora alterações de parâmetros clínicos e laboratoriais foram observadas, nenhum dos pacientes incluídos no estudo foi diagnosticado com malária grave, que dentre outras alterações, apresentam em média TGO acima de 200 U/L (68;101).

Além disto, na malária é descrito um aumento de citocinas pró-inflamatórias (28;68;102). Nesse trabalho foi observado um aumento de IL-6 circulante em pacientes infectados pelo *P. vivax* em relação aos mesmos após cura. Este aumento dos níveis de

citocinas eram esperados, pois foi anteriormente descrito em pacientes da mesma área endêmica com características clínicas semelhantes (28). A IL-6 tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e iniciar a síntese de prostaglandina E2 no hipotálamo, mudando assim a temperatura corporal causando a febre (103). Corroborando com os nossos resultados, pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam níveis aumentados de IL-10 (28). O Aumento dos níveis desta citocina está relacionada a gravidade da doença. Assim, pacientes com maior gravidade apresentam menores níveis de IL-10 (68) (Figura 2). Além disso, os níveis de IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-17 não foram detectados pelos métodos utilizados.

O aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias pode desencadear o aumento da expressão de moléculas reguladoras (69-71). Apesar de não ser uma citocina pró-inflamatória, a IL-10 já foi descrita como tendo importante papel na indução da expressão de receptores inibidores (71). Trabalhos anteriores mostram que há um aumento da expressão dessas moléculas em infecções crônicas (2;58;75). Recentemente, estudos demonstraram a expressão desses receptores em modelos murinos da malária e na infecção pelo *P.falciparum* (55;56;81). Desse modo esse trabalho visa caracterizar o fenótipo de ativação e inibição de células T em pacientes infectados com o *P.vivax*.

A utilização da citometria de fluxo digital multiparamétrica para a imunofenotipagem e imunomonitoramento tem se tornado essencial em múltiplas aplicações. Atualmente, laboratórios clínicos e de pesquisa tem contado de maneira intensa com a citometria multiparamétrica para a caracterização fenotípica e funcional de diferentes componentes do sistema imunológico em indivíduos saudáveis e na presença de diversas condições (104). No entanto, com o aumento da complexidade da composição dos painéis a serem empregados para a caracterização de um determinado fenômeno, aumenta-se a necessidade de uma criteriosa padronização dos reagentes utilizados. Portanto, uma etapa essencial para o desenvolvimento deste projeto foi a padronização do painel contendo os anticorpos necessários para a caracterização do problema abordado neste trabalho (Figura 3). A criação de um único painel para realização do objetivo deste projeto só foi possível devido à citometria multiparamétrica. A utilização desta abordagem foi importante para a realização deste projeto primeiramente porque nos possibilitou a caracterização de vários fenótipos na mesma população celular indicativos de sua função. Uma preocupação que foi levada em conta foi a aquisição de um número grande de eventos para que subpopulações raras fossem apropriadamente caracterizadas. Assim, apesar do elevado número de células, a

utilização de um único painel possibilitou a avaliação de todos os marcadores de interesse. Além disto, minimizou a quantidade de reagentes empregados e conseqüentemente o viabilizou economicamente. Para a avaliação dos parâmetros abordados foi adotando estratégias de *gate* a fim de evitar interferências entre os fluoróforos, excluir agregados e outras populações mononucleares e finalmente incluindo apenas células T vivas. Após o enriquecimento das populações de interesse, foi realizada a compensação manual, com a utilização do *FlowJo 9.4.1*, uma vez que devido a complexidade da interferência entre os fluoróforos, a compensação automática ainda podem mascarar possíveis erros de interpretação.

Foram avaliadas cinco moléculas de ativação em células T e observou-se que a infecção pelo *P. vivax* leva a indução de ICOS, PD-1, CTLA-4 e TIM-3 em linfócitos T CD4 (Figuras 7-10). Além disto, o aumento da frequência de células expressando ICOS, PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3 também foi observado em linfócitos T CD8 (Figuras 7-11). Foi anteriormente descrito que elas são induzidas pela sinalização via TCR e pelo aumento de citocinas (59;60), dois fatores presentes no microambiente criado pela infecção pelo *P. vivax* (28;64;69;71). Apesar da presença de altos níveis de citocinas circulantes, este estudo não detectou aumento de uma citocina inflamatória característica de linfócitos T, o IFN- γ . A ausência desta citocina pode sugerir a presença de células T disfuncionais nos pacientes infectados pelo *P. vivax*.

Apesar de serem induzidas pela ativação, a co-expressão destas moléculas em uma mesma célula tem sido relacionada a perda de função celular (1;2;57;58;75). A perda de função celular, denominada por vários grupos de pesquisa de “exaustão celular” é caracterizada pela expressão de receptores reguladores como ICOS, CTLA-4, PD-1, TIM-3 e LAG-3, pela falha na produção de citocinas e baixa capacidade proliferativa de células antígeno-específicas (65).

Como descrito na literatura, a co-expressão dessas moléculas de ativação relacionada de maneira negativa à proliferação celular (58). Porém, um fato intrigante é o aumento da expressão de Ki67 em células expressando mais de uma molécula de ativação em pacientes infectados. Esse aumento foi encontrado tanto em linfócitos T CD4 quanto T CD8 (Figura 12). O Ki67 é um marcador que indica que as células entraram na fase de interfase da divisão celular e podem proliferar. Desse modo, as células T presentes no sangue podem estar em sua fase de intérfase, mas para comprovar isso, seria interessante a avaliação de moléculas que indiquem a característica da intérfase, por exemplo, a ciclina B, uma molécula presente durante a intérfase que

diminui bruscamente no início da mitose celular. Durante a mitose celular há um aumento da ciclina A. Além disto, embora seja observado aumento de células expressando Ki67, pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam número absoluto de linfócitos diminuído. Assim, fica a ser determinado se, durante a malária *vivax*, as células T realmente proliferam ou se após completarem o ciclo de proliferação, estas entram em apoptose resultando na linfopenia.

Além do aumento individual dos marcadores avaliados neste estudo, observou-se o aumento da proporção de células T CD4 e T CD8 expressando simultaneamente duas ou todas as moléculas de interesse (ICOS, CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3 e Ki67). Como Ki67 e ICOS são moléculas consideradas marcadoras de proliferação e ativação, respectivamente (1;83;84;105), estas foram excluídas das análises. No entanto, o aumento da proporção destas células se manteve. O mesmo foi observado quando a expressão de Ki67 e ICOS foi avaliada na ausência da expressão dos receptores inibidores. Apesar das diferenças ocorrerem em linfócitos T CD4 e CD8, estas subpopulações apresentam características individuais. Assim, maiores frequências de células T CD4 expressando simultaneamente todos os marcadores são observadas durante a malária quando comparado com a expressão exclusiva de marcadores de ativação e proliferação ou a expressão exclusiva de receptores inibidores. Já entre as células T CD8, maiores frequências são observadas quando a expressão exclusiva de marcadores de ativação e proliferação são comparadas a expressão exclusiva de receptores inibidores ou a expressão simultânea todos os marcadores. Estes dados indicam uma forte ativação de células T dos pacientes infectados pelo *P. vivax*, e um possível estado de exaustão, principalmente de células T CD4.

O bloqueio de um ou mais receptores inibidores leva a restauração da resposta imune em vários modelos de infecções virais e em tumores (75;77;106;107). Na malária murina também foi demonstrada que o bloqueio de combinações de receptores inibidores altera o prognóstico da infecção (55;56). No modelo de infecção pelo PA, o bloqueio de CTLA-4 e PD-1 leva ao agravamento da patologia com o desenvolvimento da malária cerebral e conseqüentemente morte dos camundongos infectados (55). Por outro lado, o bloqueio de CTLA-4 e PD-1 no modelo da infecção pelo *P. berghei* ANKA, leva ao desenvolvimento de resposta imune efetora (55). Apesar do papel de células T CD4 ser reconhecido como um componente crítico da resposta imune protetora durante a fase sanguínea da malária, ainda pouco se sabe sobre como as células *Plasmodium-*

específicas influenciam no balanço entre a erradicação do parasito e sua persistência no hospedeiro.

O *P. vivax* pode permanecer na circulação por longos períodos de tempo ou no fígado em sua forma hipnozoíta (19;108). Da mesma maneira que a persistência do vírus LCMV em camundongos leva ao aumento de células T CD8 antígeno-específicas expressando PD-1 e LAG-3, caracterizando a exaustão celular, a persistência do *Plasmodium vivax* no hospedeiro poderia causar este fenômeno.

Por fim, foi avaliada a frequência de células que expressam as diferentes combinações com seis, cinco, quatro, três, dois ou um marcador. O que se pode observar é que pacientes infectados pelo *P. vivax* possuem células T CD4 que expressam diferentes combinações de marcadores. Células T CD4 destes pacientes são compostas de subpopulações expressando seis, cinco ou quatro marcadores. Após a cura, essas populações deixam de existir. As subpopulações de células T CD4 que expressam três ou dois marcadores diminuem sua frequência pela metade e a subpopulação que apresenta exclusivamente um único marcador não sofre alterações na ausência da infecção. Já dentre as células T CD8, as subpopulações expressando simultaneamente seis ou cinco marcadores não foram encontradas. Em pacientes infectados com o *P. vivax* foram encontradas subpopulações de células T CD8 expressando quatro marcadores. Estas células desaparecem após cura da doença. As subpopulações expressando três marcadores diminuem pouco sua frequência. Porém as frequências das subpopulações de células T CD8 expressando dois marcadores ou exclusivamente um único marcador diminuem bruscamente.

A ativação inicial de células B *naïve* pela sinalização via receptor de célula B necessita do contato com células T CD4. A dinâmica do contato entre os antígenos de membrana dessas células determina a intensidade da resposta das células B (109). Já foi demonstrado que pacientes que apresentam co-infecção pelo HIV e plasmódio apresentam resposta humoral diminuída, demonstrando a importância de células T CD4 na produção de anticorpos para a malária (37). Em nosso modelo, as células T CD4 apresentam uma alta frequência de receptores inibidores, que podem induzir falha na ativação de células B e consequentemente prejuízo no desenvolvimento da reposta de memória dessas células, além da produção de anticorpos em níveis subótimos para eliminar o parasito.

Foi demonstrada anteriormente correlação positiva entre diferentes receptores inibidores durante infecções virais. Este estudo caracteriza apenas no nível gênico a expressão destes receptores, mas não os caracteriza no nível de proteína (57).

Desse modo, avaliou-se neste estudo a relação entre a expressão destes receptores inibidores. Assim, quanto maior a frequência de células T CD4 expressando TIM-3, maiores as frequências de células T CD4 expressando CTLA-4, ICOS e Ki67. A expressão de CTLA-4 em células T CD4 também se correlaciona positivamente com ICOS e Ki67. Por fim, quanto maiores as proporções de células T CD4 expressando ICOS, maiores as proporções de células T CD4 expressando Ki67. É interessante observar o grande número de correlações positivas encontradas entre os receptores inibidores e entre os receptores inibidores e os marcadores de ativação e proliferação.

Além das subpopulações de células T CD8 expressando simultaneamente seis ou cinco marcadores não estarem presentes em pacientes infectados pelo *P. vivax*, correlações positivas entre a expressão individual destes marcadores não são observadas nestas células. Por outro lado, correlação negativa foi observada entre as frequências de células T CD8 expressando LAG-3 e PD-1 ou ICOS.

Estes achados corroboram a sugestão acima de que a co-expressão destas moléculas desempenham um papel mais importante em células T CD4 do que em CD8.

Uma vez que a expressão individual ou simultânea dos marcadores avaliados encontrou-se elevada em pacientes com *P. vivax*, foi objetivo deste estudo avalia-as como biomarcadores durante a doença. Trabalhos têm sido realizados com o intuito da caracterização de biomarcadores. Assim, Andrade e colaboradores descreveram a enzima superóxido-dismutase Cu/ Zn (SOD-1) como indicadora de gravidade da malária *vivax* (101). Durante a infecção da malária, espécies reativas de oxigênio, principalmente superóxido, são produzidas em níveis elevados, induzindo a morte do parasito e dano tecidual (110). SOD-1 converte estes radicais livres instáveis em água oxigenada, que pode ser removido pela catalase (111). Adicionalmente, níveis aumentados de ácidos nucléicos circulantes foram sugeridos como biomarcador (27). Nesse trabalho é observado que quanto maior a gravidade da malária, maiores os níveis de ácidos nucléicos circulantes (27). Além disto, os níveis de TGO e o número de plaquetas estão frequentemente alterados em função da infecção pelo *P. vivax*. Maiores níveis de TGO e menores números de plaquetas caracterizam maior gravidade do quadro clínico do paciente durante a malária. A correlação negativa observada neste estudo entre níveis de TGO e números de plaquetas validam estes marcadores neste estudo (Figura 18).

O aumento dos níveis de TGO foi correlacionado positivamente com as frequências de células T CD4 expressando TIM-3 e frequências de células T CD8 expressando ICOS. Foi observado também que quanto menor o número de plaquetas, maiores as frequências de células T CD4 e CD8 expressando TIM-3, CTLA-4 e Ki67. Adicionalmente, baixos números de plaquetas correlacionam-se com altos níveis da frequência de células T CD4 expressando ICOS. É importante ressaltar que essas correlações não foram encontradas nesses mesmos pacientes após a cura da doença. Portanto, estas análises sugerem que pacientes que expressam altas frequências de moléculas de ativação possuem maior probabilidade de apresentarem pior prognóstico, caso o paciente não obtiver tratamento adequado.

7 Conclusões

- Os pacientes incluídos neste trabalho não apresentam malária grave sintomas, confirmado pelos sintomas clínicos, níveis de TGO e número de plaquetas;
- A infecção pelo *P. vivax* induz aumento da expressão de moléculas reguladoras em células T;
- A infecção pelo *P. vivax* induz aumento da expressão de Ki67 em células T, um marcador de proliferação celular;
- Os marcadores avaliados são co-expressos em células T CD4 e CD8 de pacientes infectados pelo *P. vivax* e essa co-expressão deixa de existir após o tratamento com drogas antimaláricas;
- Alguns dos marcadores avaliados no trabalho correlacionam diretamente com parâmetros laboratoriais da malária;
- A infecção pelo *P. vivax* pode levar a exaustão celular devido a indução da expressão de moléculas reguladoras em células T.

8 Referencias bibliográficas

- (1) Antonelli LR, Mahnke Y, Hodge JN, Porter BO, Barber DL, Dersimonian R, et al. Elevated frequencies of highly activated CD4+ T cells in HIV+ patients developing immune reconstitution inflammatory syndrome. *Blood* 2010 Nov 11;116(19):3818-27.
- (2) Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006 Sep 21;443(7109):350-4.
- (3) WHO. World Malaria Report 2011. 2011.
- (4) MS. Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, janeiro a dezembro de 2010 e 2011. 2012.
- (5) MS. Malária. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 6 ed. Brasília: 2006. p. 210-8.
- (6) Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 2008 Jan 15;46(2):165-71.
- (7) Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007 Dec;77(6 Suppl):79-87.
- (8) Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1988 Mar;38(2):223-30.
- (9) Deane L. Os grandes marcos na história do controle da malária. *RevSocBras Med Trop* 1992;25(Suppl II):12-22.
- (10) SILVA LHP, ENGRACIA V. The malaria challenge: the Brazilian case and what can be expected from progress in genomics. *Ciência & Saúde Coletiva* 2002;7(1):49-63.
- (11) Barros-Barreto J. Malaria: doutrina e prática. Rio de Janeiro: 1940.
- (12) Loiola CC, da Silva CJ, Tauil PL. [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. *Rev Panam Salud Publica* 2002 Apr;11(4):235-44.
- (13) Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol* 2012 Nov;42(12):1099-105.
- (14) Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 2006 Feb;12(2):220-4.

- (15) Good MF, Doolan DL. Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity* 2010 Oct 29;33(4):555-66.
- (16) Pollitt LC, Colegrave N, Khan SM, Sajid M, Reece SE. Investigating the evolution of apoptosis in malaria parasites: the importance of ecology. *Parasit Vectors* 2010;3:105.
- (17) Cowman AF, Berry D, Baum J. The cell biology of disease: The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol* 2012 Sep 17;198(6):961-71.
- (18) Snow RW, Trape JF, Marsh K. The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa. *Trends Parasitol* 2001 Dec;17(12):593-7.
- (19) Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol* 2005 Sep;42(5):777-9.
- (20) Baird JK, Masbar S, Basri H, Tirtokusumo S, Subianto B, Hoffman SL. Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 1998 Aug;178(2):592-5.
- (21) Zevering Y, Khamboonruang C, Rungruengthanakit K, Tungviboonchai L, Ruengpipattanapan J, Bathurst I, et al. Life-spans of human T-cell responses to determinants from the circumsporozoite proteins of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jun 21;91(13):6118-22.
- (22) Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, et al. 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* 2005 Mar 4;280(9):8606-16.
- (23) Zhu J, Krishnegowda G, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. *J Biol Chem* 2005 Mar 4;280(9):8617-27.
- (24) Francis SE, Sullivan DJ, Jr., Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:97-123.
- (25) Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Feb 6;104(6):1919-24.

- (26) Franklin BS, Ishizaka ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, Rose J, et al. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Mar 1;108(9):3689-94.
- (27) Franklin BS, Vitorino BL, Coelho HC, Menezes-Neto A, Santos ML, Campos FM, et al. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS One* 2011;6(5):e19842.
- (28) Leoratti FM, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PA, Gravina HD, et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(6):e1710.
- (29) McCall MB, Netea MG, Hermsen CC, Jansen T, Jacobs L, Golenbock D, et al. *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *J Immunol* 2007 Jul 1;179(1):162-71.
- (30) Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990 Nov 17;336(8725):1201-4.
- (31) Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 2008 Jul;9(7):725-32.
- (32) Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* 1999 Mar;5(3):340-3.
- (33) Zeeshan M, Bora H, Sharma YD. Presence of Memory T Cells and Naturally Acquired Antibodies in *Plasmodium vivax* Malaria-Exposed Individuals Against a Group of Tryptophan-Rich Antigens With Conserved Sequences. *J Infect Dis* 2013 Jan;207(1):175-85.
- (34) 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* 2005;23:69-99.
- (35) Suss G, Eichmann K, Kury E, Linke A, Langhorne J. Roles of CD4- and CD8-bearing T lymphocytes in the immune response to the erythrocytic stages of *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun* 1988 Dec;56(12):3081-8.
- (36) Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD, et al. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. *J Exp Med* 2002 Apr 1;195(7):881-92.
- (37) Mount AM, Mwapasa V, Elliott SR, Beeson JG, Tadesse E, Lema VM, et al. Impairment of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy by HIV infection. *Lancet* 2004 Jun 5;363(9424):1860-7.
- (38) Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, et al. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria

parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog* 2010 Feb;6(2):e1000770.

- (39) Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* 1995 Aug 1;182(2):409-18.
- (40) Cockburn IA, Chen YC, Overstreet MG, Lees JR, Van RN, Farber DL, et al. Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8+ T cell responses against malaria liver stage parasites. *PLoS Pathog* 2010 May;6(5):e1000877.
- (41) Goncalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun* 2010 Nov;78(11):4763-72.
- (42) Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 17;98(15):8750-5.
- (43) Elliott SR, Spurck TP, Dodin JM, Maier AG, Voss TS, Yosaatmadja F, et al. Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun* 2007 Jul;75(7):3621-32.
- (44) Bueno LL, Morais CG, Soares IS, Bouillet LE, Bruna-Romero O, Fontes CJ, et al. *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. *Vaccine* 2009 Sep 18;27(41):5581-8.
- (45) Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 1999 Jul 1;400(6739):73-7.
- (46) Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004 Oct 1;173(7):4433-42.
- (47) Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2008 Oct;38(10):2697-705.
- (48) Bueno LL, Morais CG, Araujo FF, Gomes JA, Correa-Oliveira R, Soares IS, et al. *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One* 2010;5(3):e9623.
- (49) Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, et al. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular

immunity to uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. PLoS Pathog 2009 Apr;5(4):e1000364.

- (50) Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. Immunology 2006 Apr;117(4):433-42.**
- (51) Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol 2005 Apr;6(4):345-52.**
- (52) Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nat Rev Immunol 2004 Nov;4(11):841-55.**
- (53) Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. J Immunol 2010 Apr 1;184(7):3433-41.**
- (54) Finney OC, Lawrence E, Gray AP, Njie M, Riley EM, Walther M. Freeze-thaw lysates of Plasmodium falciparum-infected red blood cells induce differentiation of functionally competent regulatory T cells from memory T cells. Eur J Immunol 2012 Jul;42(7):1767-77.**
- (55) Hafalla JC, Claser C, Couper KN, Grau GE, Renia L, de Souza JB, et al. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitory Pathways Independently Regulate Host Resistance to Plasmodium-induced Acute Immune Pathology. PLoS Pathog 2012 Feb;8(2):e1002504.**
- (56) Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. Nat Immunol 2012 Feb;13(2):188-95.**
- (57) Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. Nat Immunol 2009 Jan;10(1):29-37.**
- (58) Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature 2006 Feb 9;439(7077):682-7.**
- (59) June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. Immunol Today 1994 Jul;15(7):321-31.**
- (60) Liu Y, Linsley PS. Costimulation of T-cell growth. Curr Opin Immunol 1992 Jun;4(3):265-70.**
- (61) Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annu Rev Immunol 1993;11:191-212.**

- (62) Turka LA, Ledbetter JA, Lee K, June CH, Thompson CB. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J Immunol* 1990 Mar 1;144(5):1646-53.
- (63) Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 1987 Jul 16;328(6127):267-70.
- (64) Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994 Aug;1(5):405-13.
- (65) Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998 Dec 21;188(12):2205-13.
- (66) Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Pluckthun A, Elliott T, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* 1998 May 4;187(9):1383-93.
- (67) Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* 2004 May;20(5):529-38.
- (68) Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarencio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 2010;9:13.
- (69) Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 2008 Nov 15;181(10):6738-46.
- (70) Cho HY, Lee SW, Seo SK, Choi IW, Choi I, Lee SW. Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-alpha-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2008 Dec;1779(12):811-9.
- (71) Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y, et al. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun* 1996 Mar;64(3):913-8.
- (72) Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, et al. Early commitment of naive human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol* 2009 Nov;87(8):590-600.
- (73) Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 2007 Oct;27(4):670-84.

- (74) Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* 2003 Apr 1;101(7):2711-20.
- (75) Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* 2010 Sep 27;207(10):2175-86.
- (76) Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23:515-48.
- (77) Grosso JF, Goldberg MV, Getnet D, Bruno TC, Yen HR, Pyle KJ, et al. Functionally distinct LAG-3 and PD-1 subsets on activated and chronically stimulated CD8 T cells. *J Immunol* 2009 Jun 1;182(11):6659-69.
- (78) Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 2008 Nov 24;205(12):2763-79.
- (79) Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, et al. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 2009 Feb;5(2):e1000313.
- (80) Lepenies B, Gaworski I, Tartz S, Langhorne J, Fleischer B, Jacobs T. CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal *Plasmodium yoelii* infections. *Microbes Infect* 2007 May;9(6):687-94.
- (81) Illingworth J, Butler NS, Roetynck S, Mwacharo J, Pierce SK, Bejon P, et al. Chronic Exposure to *Plasmodium falciparum* Is Associated with Phenotypic Evidence of B and T Cell Exhaustion. *J Immunol* 2012 Dec 21.
- (82) McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, et al. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2000 Nov 1;165(9):5035-40.
- (83) Burmeister Y, Lischke T, Dahler AC, Mages HW, Lam KP, Coyle AJ, et al. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008 Jan 15;180(2):774-82.
- (84) Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, et al. The role of ICOS in the CXCR5⁺ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol* 2005 Aug 15;175(4):2340-8.
- (85) Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 2007 May;81(5):1258-68.

- (86) Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, Marengere LE, Wakeham AC, Bouchard D, et al. The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 1998 Jan;8(1):115-24.
- (87) Paterson AM, Sharpe AH. Taming tissue-specific T cells: CTLA-4 reins in self-reactive T cells. *Nat Immunol* 2010 Feb;11(2):109-11.
- (88) van der Merwe PA, Davis SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 2003;21:659-84.
- (89) Folkl A, Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 2010 Mar 15;134(1-2):33-8.
- (90) Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005 Nov;25(21):9543-53.
- (91) Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008 Aug;224:166-82.
- (92) Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2003 Jun;3(6):454-62.
- (93) Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002 Jan 31;415(6871):536-41.
- (94) Mariat C, Sanchez-Fueyo A, Alexopoulos SP, Kenny J, Strom TB, Zheng XX. Regulation of T cell dependent immune responses by TIM family members. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005 Sep 29;360(1461):1681-5.
- (95) Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 1990 May 1;171(5):1393-405.
- (96) Triebel F. LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination. *Trends Immunol* 2003 Dec;24(12):619-22.
- (97) Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, Kurschner C, Vignali DA. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur J Immunol* 2002 Aug;32(8):2255-63.
- (98) Workman CJ, Cauley LS, Kim IJ, Blackman MA, Woodland DL, Vignali DA. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *J Immunol* 2004 May 1;172(9):5450-5.

- (99) Lacerda MV, Hipolito JR, Passos LN. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008 Sep;41(5):522-3.
- (100) Riccio EKP, Maria de Fátima Ferreira da Cruz. Lymphocyte apoptosis in human malaria by *P. Falciparum* E. *P. Vivax* relation with the immune response to parasite Instituto Oswaldo Cruz; 2008.
- (101) Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Raffaele-Netto I, Camargo LM, Barral A, et al. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(4):e650.
- (102) Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. 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* 2004 Oct;72(10):5630-7.
- (103) Banks WA, Kastin AJ, Gutierrez EG. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 1994 Sep 26;179(1-2):53-6.
- (104) Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004 Aug;4(8):648-55.
- (105) Bullwinkel J, Baron-Luhr B, Ludemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2006 Mar;206(3):624-35.
- (106) Jin HT, Anderson AC, Tan WG, West EE, Ha SJ, Araki K, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Aug 17;107(33):14733-8.
- (107) Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010 Sep 27;207(10):2187-94.
- (108) White NJ, Imwong M. Relapse. *Adv Parasitol* 2012;80:113-50.
- (109) Fleire SJ, Goldman JP, Carrasco YR, Weber M, Bray D, Batista FD. B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science* 2006 May 5;312(5774):738-41.
- (110) mas-Beauvieux MC, Peuchant E, Dumon MF, Receveur MC, Le BM, Clerc M. Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin Biochem* 1995 Apr;28(2):163-9.
- (111) Dive D, Gratepanche S, Yera H, Becuwe P, Daher W, Delplace P, et al. Superoxide dismutase in *Plasmodium*: a current survey. *Redox Rep* 2003;8(5):265-7.

