

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Avaliação de parâmetros reológicos e imunológicos na infecção
por *Plasmodium vivax***

Edson Fredulin Scherer

Belo Horizonte-MG

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Avaliação de parâmetros reológicos e imunológicos na infecção
por *Plasmodium vivax***

Edson Fredulin Scherer

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Grau Acadêmico de doutor em Ciências: Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Dr. Eduardo Luzia França

Co-orientadora: Dr^a. Érika Martins Braga

Belo Horizonte - MG

2015

“Ter um objetivo que valha a pena e cumpri-lo com firmeza é um dos segredos de uma vida digna de ser vivida”

(Herbert Casson, 1869-1951)

AGRADECIMENTOS

A Deus, grande arquiteto do universo, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que ele me destina.

À minha esposa, Angela Ziebell Scherer, pela constante ajuda e dedicação me incentivando sempre para alcançar meus objetos.

Aos meus filhos, Lucas Ziebell Scherer e Gabriela Ziebell Scherer, pela inspiração e entusiasmo que me proporcionam sendo minha principal motivação na busca da qualificação.

Ao meu orientador Dr. Eduardo Luzia França, que me acompanha desde o mestrado, pela sua dedicação, empenho, paciência e orientação ao longo de todos este tempo.

À Prof. Dr^a. Adenilda Cristina Honório França, pela colaboração para a realização dos experimentos práticos de citometria e auxílio na elaboração dos artigos.

À minha co-orientadora Érika Martins Braga, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG, por ter aceitado o desafio de criar o doutorado DINTER da UFMG com a UFMT em parasitologia, o que me proporcionou a oportunidade de me qualificar no doutorado.

Ao colega Me. Renan Siqueira pela constante ajuda na coleta das amostras, por ter trabalhado nos experimentos do laboratório e pela dedicação para a confecção dos artigos.

Ao colega de doutorado Robson Lopes da Silva pela ajuda na área de informática.

Aos colegas de laboratório Dr^a. Dani Laura G. Fagundes, Doutoranda Cristiane de Castro P. Hara, Doutoranda Tassiane Moraes, Doutoranda Mahmi Fugimori, Doutorando Rafael e Mestranda Débora pela colaboração para a realização dos experimentos.

Aos Professores Dr. Gustavo Volpato (UFMT) e Dr. Stefan Michael Geiger (UFMG) pelas sugestões no exame de qualificação do doutorado que muito contribuíram para a melhora da minha tese.

Ao Programa de Pós-Graduação Interinstitucional de Doutorado DINTER UFMG/UFMT do Departamento de Parasitologia/UFMG, pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho, e em especial a todos os docentes e colaboradores.

À Prof. Dr^a. Marly Augusta Lopes de Magalhães, coordenadora da Comissão de Ética da UFMT Campus do Araguaia, pelo empenho e esforço dedicados para a liberação do meu projeto do doutorado.

Aos funcionários do posto de malária Capuchú e funcionários do hospital Juruá de Cruzeiro do Sul/AC pela ajuda, colaboração e disponibilidade para a coleta das amostras de malária.

À Secretaria de Saúde do município de Porto Velho/RO pela autorização da coleta de amostras de malária no posto de saúde Adelaide.

À Sumara Aparecida, secretária do curso de Pós-Graduação em Parasitologia, pelo exemplo de competência e honestidade e ainda pelo carinho que nos acolhe quando estamos em Belo Horizonte na UFMG.

A todos os meus colegas de doutorado pelo companheirismo e amizade ao longo desta longa jornada.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

O meu muito OBRIGADO!!!!

COLABORADORES

Laboratório de Imunomodulação e Cronobiologia, ICBS/CUA/UFMT, Barra do Garças - MT

Prof. Dr. Eduardo Luzia França
Prof^a. Dr^a. Adenilda Cristina Honório-França
Prof. Msc. Elton Brito Ribeiro

Laboratório de Malária, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, Belo Horizonte - MG

Prof^a Dr^a Érika Martins Braga

SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Mato Grosso (FAPEMAT), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (DINTER em Parasitologia UFMT/UFMG).

Sumário

| | |
|--|-------------|
| <i>Lista de Tabelas</i> | viii |
| <i>Lista de Figuras</i> | ix |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xi |
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 1.1 Epidemiologia da malária | 5 |
| 1.2- Ciclo biológico do Parasito..... | 6 |
| 1.3- Patogenia da malária | 8 |
| 1.4-Diagnóstico da malária..... | 9 |
| 1.5-Malária e eritrócitos | 11 |
| 1.6- Resposta imune na malária | 12 |
| 1.7- Imunoglobulina A (IgA) e Imunoglobulina G (IgG) na Malaria | 13 |
| 1.8- As citocinas na malária | 15 |
| 1.9- Parâmetros reológicos do sangue de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> | 18 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 21 |
| 3- OBJETIVOS | 23 |
| 3.1- GERAL | 24 |
| 3.2- ESPECÍFICOS..... | 24 |
| 4- MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 4.1-Sujeitos Amostrais | 26 |
| 4.2-Procedimentos da coleta das amostras | 26 |
| 4.3- Análise parasitológica de sangue | 27 |
| 4.4- Obtenção do soro | 27 |
| 4.5- Quantificação da concentração de IgA e IgG total | 27 |
| 4.6- Quantificação das citocinas | 28 |
| 4.7- Quantificação da citocina TGF- β | 29 |
| 4.8- Obtenção dos eritrócitos | 29 |
| 4.9- Expressão dos receptores Fc α RI (CD89), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16) em células de sangue de indivíduos com malária | 29 |
| 4.10- Alterações do fluxo sanguíneo nas análises reológicas com <i>P. vivax</i> | 30 |

| | |
|---|------------|
| 4.11- Análise estatística..... | 31 |
| 5. RESULTADOS | 32 |
| 5.1- Caracterização dos indivíduos | 33 |
| 5.2- Concentração de IgA e IgG (mg/dl) no soro de indivíduos infectados e não infectados por <i>P. vivax</i> | 35 |
| 5.3- Concentração (pg/mL) das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ e IL-17, no soro de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> | 37 |
| 5.4- Expressão dos receptores Fc γ RIII (CD16), Fc γ RII (CD32), Fc α RI (CD89) em eritrócitos de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> | 39 |
| 5.5- Parâmetros reológicos do sangue de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> | 42 |
| 5.6- Modulação por citocinas da Curva de viscosidade de sangue de indivíduos infectados.. | 45 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 60 |
| 7- CONCLUSÕES..... | 77 |
| 8. REFERÊNCIAS | 80 |
| ANEXOS..... | 99 |
| Anexo 1 - Parecer do comite de ética | 100 |
| Anexo 2 – Artigo Científico..... | 102 |

Lista de Tabelas

Tabela 1- Características gerais de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* 34

Tabela 2. Concentração (pg/mL) de citocinas em soro de indivíduos infectados por *P. vivax*. 38

Lista de Figuras

- Figura 1.** Ciclo biológico do *Plasmodium* spp no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Figura modificada de Greenwood *et al* (2008) 7
- Figura 2-** Concentração de IgA total nos indivíduos infectados e não infectados com *P. vivax*. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão de soro de oito indivíduos em cada grupo. 35
- Figura 3-** Concentração de IgG total nos indivíduos infectados e não infectados com *P. vivax*. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão no soro de oito indivíduos em cada grupo. 36
- Figura 4-** Expressão do receptor FcγRIII (CD16) em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax*. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão do receptor em eritrócitos de sete indivíduos em cada grupo. 39
- Figura 5-** Expressão do receptor FcγRII (CD32) em hemácias de indivíduos infectados e não infectados com *P. vivax*. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão do receptor em eritrócitos de sete indivíduos em cada grupo. *p<0.05 40
- Figura 6-** Expressão de receptor FcαRI (CD89) em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax*. Os resultados foram representados pela média e erro padrão de eritrócitos de 7 indivíduos de cada grupo 41
- Figura 7-** Curva de fluxo do sangue de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*. Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. Vivax*. 42
- Figura 8 -** Curva de viscosidade de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* em diferentes temperaturas (25 a 45 ° C). Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*. 43
- Figura 9 -** Curva de viscosidade em relação às taxas de cisalhamento do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P.vivax*. Os dados foram expressos em média e erro padrão. Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*. 44
- Figura 10 –** Correlação entre os índices de viscosidade e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. 45
- Figura 11 -** Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados por *P. vivax* e de não infectados na presença de IL-4 (p<0,05). Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*. 46
- Figura 12 –** Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IL-4 e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. 47
- Figura 13 -** Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de TGF-β. Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P.vivax*. 48
- Figura 14 –** Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina TGF-β e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. 49
- Figura 15 -** Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IFN-γ. Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*. 50
- Figura 16 –** Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IFN-γ e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax* 51
- Figura 17 -** Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*

na presença de IL-17. Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*. 52

Figura 18 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. 53

Figura 19 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IFN- γ e TGF- β . Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*. 54

Figura 20 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IFN- γ e TGF- β e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. 55

Figura 21 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IL-17 e TGF- β . Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*. 56

Figura 22 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 e TGF- β e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. 57

Figura 23 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IL-17 e IFN- γ . Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*. 58

Figura 24 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 e IFN- γ e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. 59

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS: Organização Mundial de Saúde

IFN- γ : Interferon gama

Th1: Células T Helper 1

NK: Células Natural Killer

TCD8⁺: Células TCD8

TGF- β : Fator de Transformação do Crescimento beta

IL-17: Interleucina 17

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

CM: Malária cerebral

MS: Ministério da Saúde

MSP: Proteína da Superfície do Merozoíto

KC: Células de Kupffer

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

Ig: Imunoglobulinas

Fc γ Rs: Receptor para o fragmento Fc da imunoglobulina G

Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16): Tipos de receptores

IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4: Subclasses de imunoglobulinas

Fc α RI ou CD89: Receptor para o fragmento Fc da imunoglobulina A

FcR: Receptores na superfície das células

IgM: Imunoglobulina M

IgE: Imunoglobulina E

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IL-12: Interleucina 12

IL-10: Interleucina 10

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

Th2: Células T Helper 2

DC: Dendritic cell

TLRs: Receptores Toll-Like

Th17: T helper 17

T CD4⁺: Células TCD4⁺

PFEMP1: Proteína 1 de Membrana do Eritrócito do *Plasmodium Falciparum*

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

PBS: Tampão Fosfato Salino

Rpm: Rotações por minuto

PMN: Células polimorfonucleares

MN: Células mononucleares

G: Rotação

µl: Microlitros

CBA: Cytometric Bead Array

PE: Ficoeritrina

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

pg/ml: Picogramas por mililitros

pg/dL: Picograms por decilitros

Nm: Nanômetro

v/v: Volume a volume

µl: Microlitro

g/L: Gramas por litro

PEG: Polietilenoglicol

pH: Potencial Hidrogeniônico

Mg/dl: Miligramas por decilitros

BSA: Soro Albumina Bovino

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

DP: Desvio Padrão

EP: Erro Padrão

IgA1: Imunoglobulina A1

IgA2: Imunoglobulina A2

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RESUMO

A malária é uma das principais doenças infecciosas, sendo considerada re-emergente em vários países e é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* spp. O objetivo deste estudo foi verificar a concentração sérica de citocinas e imunoglobulinas - expressão de receptores para imunoglobulinas em eritrócitos e os parâmetros reológicos em sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*. Foram avaliados 69 indivíduos sendo 37 não infectados (controle) e 32 infectados por *P. vivax* provenientes de áreas endêmicas dos Estados do Acre e Rondônia. A concentração de IgA e IgG no soro foi realizada pelo método de imunoturbidimetria. A expressão de receptores (CD16⁺, CD32⁺, CD89⁺) nas membranas dos eritrócitos e as concentrações das citocinas INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 no soro foram avaliadas por cimetria de fluxo. A concentração de TGF- β foi avaliada por ELISA. As análises reológicas foram realizadas em Modular Compact Rheometer e os dados analisados pelo software Rheoplus. Observou-se que houve aumento de IgA no soro de indivíduos infectados por *P. vivax*. A concentração de IgG não alterou-se no soro destes indivíduos. Não houve alteração na expressão do receptor Fc α RI (CD89⁺) em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax*. A expressão do receptor CD32⁺ foi menor enquanto que a expressão de CD16⁺ aumentou em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax*. O sangue de indivíduos infectados *P. vivax* apresenta alteração reológica na viscosidade. Quando utilizou citocinas para melhorar os parâmetros reológicos observou-se que a IL-17 diminuiu a viscosidade do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*, restaurando a viscosidade sanguínea com valores similares aos encontrados em indivíduos não infectados. Estes dados sugerem que as alterações na viscosidade sanguínea podem ser relevantes para auxiliar no diagnóstico clínico de pacientes infectados por *P. vivax*, e que a IL-17 pode ser um imunomodulador alternativo para futuras aplicações clínicas na malária.

Palavras chave: Malária, *Plasmodium vivax*, Citocina, Imunoglobulina e Reologia.

ABSTRACT

Malaria is a major infectious disease being considered reemerging in many countries and is caused by protozoa of the genus *Plasmodium*. Thus, the present study was to determine the serum concentration of cytokines and immunoglobulins - receptor expression for immunoglobulins in erythrocytes and rheological parameters in blood of people infected with *P. vivax*. We evaluated 69 subjects with 37 uninfected (control) and 32 infected with *P. vivax* from endemic areas in the states of Acre and Rondonia. The concentrations of IgA and IgG in the serum was performed by immunoturbidimetric method. The expression of receptors (CD16 +, CD32 +, CD89 +) in the membranes of erythrocytes and the concentrations of the INF- γ cytokines, TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IL-17 in serum citometry assessed by flow. The concentration of TGF- β was measured by ELISA. The rheological analyzes were performed in Modular Compact Rheometer and analyzed by Rheoplus software. It was observed that there was an increase of IgA in the serum of patients infected with *P. vivax*. The IgG concentration was not altered in the serum from these individuals. There was no change in the expression of the Fc α RI receptor (CD89 +) in erythrocytes of individuals infected with *P. vivax*. Expression of the CD32 + receptor was smaller while the increased expression of CD16 in individuals infected erythrocytes by *P. vivax*. The blood of infected individuals *P. vivax* has rheological change in viscosity. When used cytokines to enhance rheological parameters was observed that IL-17 decreased the viscosity of the blood of individuals infected with *P. vivax*, restoring blood viscosity values similar to those found in non-infected individuals. These data suggest that changes in the viscosity of blood may be relevant to help the clinical diagnosis of patients infected with *P. vivax*, and that IL-17 can be an alternate for future clinical applications immunomodulatory malaria.

Keywords: Malaria, *Plasmodium vivax*, Cytokines, Immunoglobulin, Rheology.

A malária, uma das principais doenças infecciosas e re-emergente em vários países, é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* spp. A área mais afetada pela malária é a África sub-saariana (Park et al, 2009; Santos & Torres, 2013). O *Plasmodium falciparum* é o principal causador de casos de mortes por malária. No entanto, o *P. vivax* é o responsável pela maioria dos casos de malária em todo o mundo (Gething et al, 2012). Segundo a literatura observou-se que a malária é endêmica em vários países (Sagaki et al, 2013). No Brasil, a malária é causada por três espécies de *Plasmodium*: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae* (uma pequena porção dos casos). Não havendo até o momento transmissão de *P. ovale* e *P. knowlesi* (Alexandre et al, 2010). Na região da Amazônia Legal, estudos revelaram que ocorre uma maior prevalência de positividade para as espécies de *P. vivax* em esfregaços sanguíneos em comparação ao *P. falciparum* (Honório-França et al, 2011; Aguiar et al, 2014).

Em relação à malária grave, os eritrócitos tornam-se rígidos, levando a processos inflamatórios, resultando alterações no fluxo sanguíneo (Cromer et al, 2013; Mohandas & An, 2012). Estudos citam que a trombocitopenia (Lacerda et al, 2011; Cox & Mcconkey, 2010) e a ativação e/ou apoptose das plaquetas, podem alterar o sistema imunológico (Coelho et al, 2013). A expressão de proteínas na superfície de eritrócitos provoca um sequestro celular levando a um processo inflamatório, com ativação do sistema de coagulação (Prasat & Sucharit, 2012).

O processo inflamatório provocado pela malária pode levar à liberação de citocinas. Elas permitem que o organismo responda rapidamente a um desafio imunológico através da coordenação de uma resposta imune adequada (Chen & Liu, 2009). Estudos com *Plasmodium* spp sugerem que há necessidade de um equilíbrio entre a resposta imune anti e pró-inflamatória (Sortica et al, 2012). A citocina IFN- γ é a principal envolvida no tipo de resposta imune mediada por células T *helper* 1 (Th1) (Gajewski & Fitch, 1988). Essa citocina é uma

glicoproteína homodimérica secretada por células Th1, células *natural killer* (NK) e linfócitos TCD8⁺ (Lammas et al, 2000). Possui potente efeito imunomodulador em diferentes células do sistema imunológico *in vivo* e *in vitro* (Young e Hardy, 1995; Billiau, 1996). Outros estudos com *P. vivax* têm avaliado o nível de citocinas séricas no soro de indivíduos infectados (Andrade et al, 2010; Gonçalves et al, 2010). O TGF- β em alguns estudos mostrou ser importante nas respostas inflamatórias associadas com a patologia das formas infectantes por *P. falciparum* (Noone et al, 2013). Tanto na malária humana quanto na murina, pouco se conhece sobre as ações do TGF- β , porém sua capacidade de estimular a produção de quimiocinas importantes para o recrutamento de neutrófilos e linfócitos T CD8⁺ para o tecido, a faz um importante alvo de estudo, já que estas células parecem estar envolvidas na suscetibilidade e resistência à forma cerebral (Campanella et al, 2008; Miu et al, 2008). Estudos realizados em pacientes infectados por *P. vivax*, apresentaram aumento da expressão da célula produtora de IL-17 (Bueno et al, 2012). As células Th17 também podem estar envolvidas na resposta de defesa para infecção por bactérias, fungos e protozoários (Matsuzaki & Umemura, 2007). No entanto, o papel da citocina IL-17 nos mecanismos reológicos em processos infecciosos de indivíduos infectados com *P. vivax* constituem um campo aberto para novos estudos.

Alterações imunorreológicas podem ser verificadas por deformação em eritrócitos no fluxo e na constituição do sangue. Os ensaios reológicos baseiam-se no estudo do fluxo e da deformação de fluidos em movimento, tais como a viscosidade, tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento. (Schramm, 2006; Santos, 2009; Verdier et al, 2009). Sabe-se que os parâmetros reológicos do sangue podem ser influenciados pela viscosidade do plasma, pela deformação dos eritrócitos e pela agregação eritrocitária (Piagnerelli et al, 2003).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Epidemiologia da malária

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp transmitida aos seres humanos por mosquitos do gênero *Anopheles*. Classicamente quatro espécies são conhecidas por causar doenças em humanos, a saber: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Tem sido descrito em países do sudeste asiático uma nova espécie, *P. knowlesi*. Esta espécie ocorre naturalmente em macacos do sudeste asiático e, atualmente, é reconhecida como a quinta espécie de *Plasmodium* spp causadora de malária em humanos (Singh & Daneshvar, 2013; Mouatcho & Goldring, 2013; Sen et al, 2013). Dentre os tipos de *Plasmodium* spp existentes, a espécie *P. vivax* é a segunda causa mais comum de malária no mundo (Price et al, 2007; Park et al, 2009).

A literatura tem reportado que a malária é uma doença endêmica, com prevalência na África sub-saariana, América do Sul na Região Amazônica, as ilhas do Pacífico e no Sudeste Asiático (Tauil, 2006, Neves & Pilippis, 2010; Liu et al, 2014). Na América Latina, o Brasil é responsável por quase metade de todos os casos de malária, sendo relatado, no ano de 2010, no Brasil 334.618 casos (Lacerda et al, 2012).

A transmissão da malária no Brasil está restringida à região da Amazônia em que se estabelece 99,8% dos casos notificados (Costa et al, 2012). *P. vivax* é responsável por 83,7% dos casos registrados, enquanto *P. falciparum* é responsável por 16,3%, sendo raramente observado casos de malária por *P. malariae* (<1,0%) (Oliveira-Ferreira et al, 2010).

Embora a morbidade e mortalidade global tenha diminuído substancialmente, a malária ainda é a doença parasitária com elevadas taxas de mortalidade no mundo, levando ao óbito diariamente cerca de 2 mil pessoas, sendo a maioria crianças (White, et al, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013), a malária está presente em cerca de 100

países, a grande maioria em desenvolvimento, sendo responsável por cerca de 660 mil mortes por ano e quase a metade da população mundial está em risco de contrair a infecção.

Sendo que os indivíduos que residem em regiões não endêmicas, são considerados 100 vezes mais susceptíveis em contrair a doença quando estes visitam as áreas endêmicas (Marcondes & Marchi, 2010).

1.2- Ciclo biológico do Parasito

O parasito da malária em seu ciclo biológico requer uma fase assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado bem como uma fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado (Fig. 1). A infecção ocorre no homem quando fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* inoculam esporozoítos infectantes, acumulados nas glândulas salivares do inseto vetor, na sua derme durante o repasto sanguíneo. Na picada são inoculados até 200 esporozoítos que podem permanecer na derme por um longo período de tempo (Yamauchi *et al*, 2007). Os esporozoítos podem ser degradados nos linfônodos para onde são drenados, ou podem invadir os vasos sanguíneos e chegar ao fígado onde infectam os hepatócitos. O processo de invasão dos hepatócitos é complexo e depende de várias interações do tipo ligante-receptor. Os esporozoítos invadem vários hepatócitos, migrando através deles, antes de finalmente desenvolverem-se em seu interior. Esse processo resulta na formação de um vacúolo parasitóforo bem delimitado onde os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após sofrerem várias divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Após alguns dias, os esquizontes maduros liberam os merozoítos por um processo de brotamento de vesículas denominados merossomos (Amino *et al.*, 2006). Os merossomos, repletos de parasitos, despreendem-se dos hepatócitos infectados para o lúmen dos capilares sinusóides do fígado, onde finalmente os merozoítos são liberados. Os merozoítos teciduais invadem os eritrócitos iniciando, portanto, a fase sanguínea da doença.

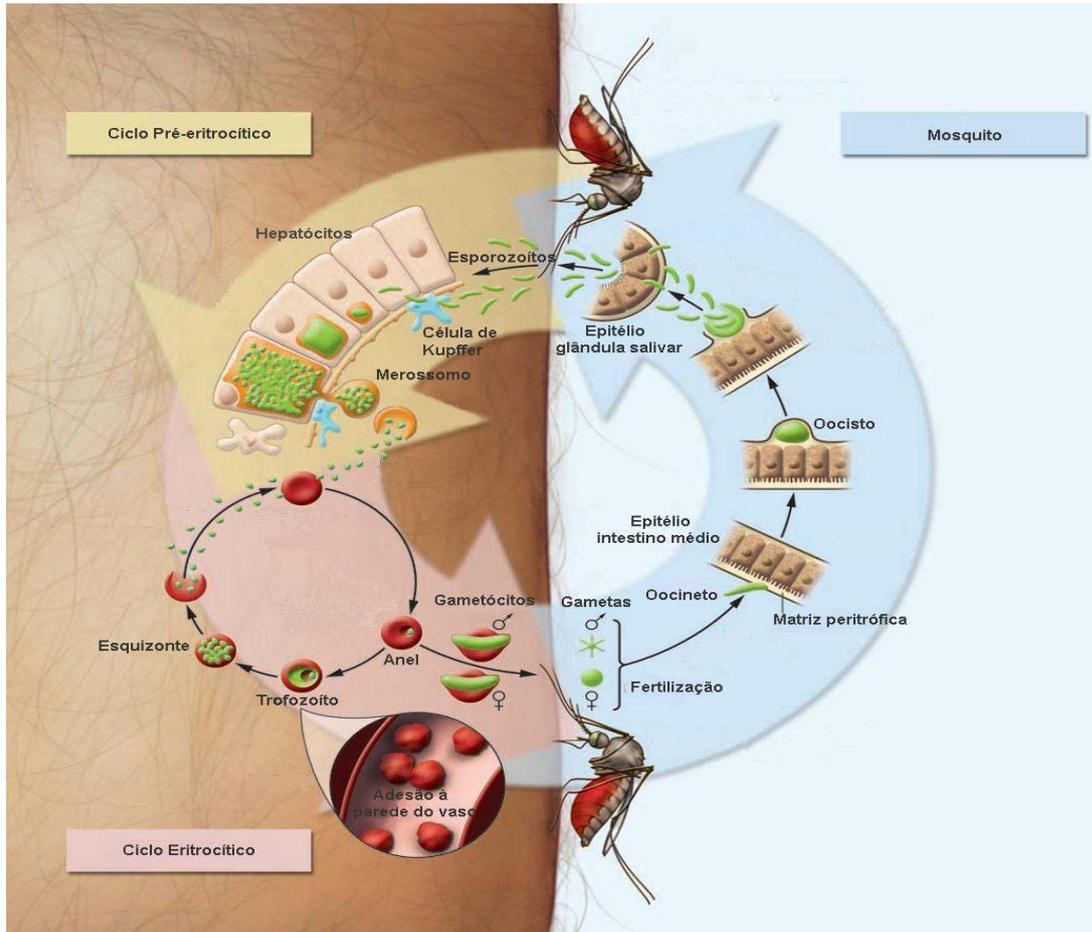


Figura 1. Ciclo biológico do *Plasmodium* spp no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Figura modificada de Greenwood *et al* (2008)

Para que ocorra a invasão do merozoíto no eritrócito são necessárias interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores presentes na superfície da célula parasitada (Gaur *et al.*, 2004). Depois de algumas gerações de desenvolvimento de merozoítos sanguíneos, alguns parasitos se diferenciam em estágios sexuais - gametócitos masculinos e femininos - que, ao serem ingeridos por mosquitos do gênero *Anopheles*, continuam o ciclo biológico do parasito com a formação de gametas. No interior do estômago do inseto ocorre à fusão dos gametas masculino e feminino que origina um zigoto móvel denominado oocineto, que depois de atravessar a parede intestinal do mosquito (Barillas-Mury & Kumar, 2005), aloja-se na membrana basal onde se desenvolve em oocisto. No interior do oocisto ocorre a diferenciação e divisão nuclear que leva à produção de esporozoítos (esporogonia). Alguns esporozoítos liberados migram para as glândulas salivares do mosquito para que esse, ao exercer o repasto sanguíneo, reinicie um novo ciclo no hospedeiro vertebrado, levando a um processo patológico.

1.3- Patogenia da malária

Estudos têm demonstrado aumento na gravidade dos casos de malária por *Plasmodium vivax* resultando em morbidade e mortalidade (Braga et al, 2012).

Na última década, o número de casos de malária no mundo tem aumentado. Um fato que tem chamado atenção é a mudança no perfil dos indivíduos infectados. Há uma tendência no aumento do número de homens adultos parasitados e uma redução no número de casos de mulheres e crianças (Cotter et al, 2013).

A espécie mais virulenta é o *P. falciparum*. A gravidade da infecção por esta espécie deve-se ao fato dela poder gerar um quadro clínico com manifestações cerebrais conhecidos

como malária cerebral (CM). A patogênese da CM não é bem compreendida, porém a citoaderência das células parasitadas ao endotélio vascular e a resposta imunológica do indivíduo parecem estar envolvidas (Jain et al, 2013).

No entanto, a infecção por *P. vivax* tem claramente emergido como uma condição potencialmente letal (Anstey et al, 2009; Lacerda et al, 2012). *P. vivax* é mais difundido que *P. falciparum* e possui potencial para causar morbidade e mortalidade em pessoas que vivem em situação de risco de infecção (Guerra et al, 2010).

1.4-Diagnóstico da malária

As espécies de *Plasmodium* spp produzem um pigmento malárico, denominado hemozoína, que é gerado durante a degradação da hemoglobina. Estudos têm relatado o interesse sobre essa molécula, visto que a hemozoína é considerada importante no diagnóstico, no desenvolvimento de fármacos antimaláricos e modulação do sistema imunológico (Hänscheid et al, 2007).

O diagnóstico da malária é feito pela demonstração da presença do parasito em amostras de sangue, a qual é analisada por microscopia (Mouatcho e Goldring, 2013). A microscopia é rápida, barata e relativamente sensível, por isso tem sido usada há mais de 100 anos e é considerada “padrão ouro” para o diagnóstico da malária segundo a Organização Mundial de Saúde (Brasil, et al , 2013; Mello et al, 2014). Os exames de microscopia pela técnica gota espessa dependem da qualidade da coloração, da técnica de preparação das lâminas, bem como da concentração, experiência e motivação do microscopista (Killian et al, 2000).

Segundo o grau de parasitemia existente no paciente, há um limiar de detecção, e depende do número de campos lidos (Thellier, et al, 2002). Um microscopista, em condições

ideais, é capaz de detectar densidades parasitárias tão baixas como 10 a 20 parasitas por cada microlitro de sangue.

O diagnóstico parasitológico utilizando a microscopia requer supervisão e treinamento continuado do pessoal que realiza exames nessas áreas de risco para malária, por isso o exame da gota espessa é utilizado ainda hoje no Brasil.

O exame de gota espessa é o principal método para o diagnóstico da malária no Brasil. Porém, o método apresenta limitações quanto à distinção entre as espécies de *Plasmodium* spp, quando a parasitemia é baixa e quando não há profissionais experientes no diagnóstico de malária, principalmente em regiões onde a malária não é endêmica (Brasil et al, 2013; Mouatcho e Goldring, 2013).

Em condições de campo, o que ocorre normalmente na maior parte das áreas malarígenas do mundo, a capacidade de detecção necessita de até 100 parasitos por cada microlitro (Suárez-Mutis & Coura, 2006).

As manifestações mais graves da infecção na malária, em geral, correlacionam-se com o nível de parasitemia. Pode se considerar hiperparasitemia quando mais de 2% das hemácias do hospedeiro na primeira infecção estão parasitadas ou mais de 5% nos indivíduos re-infectados (BRASIL, 2005).

Além da hematoscopia, existem outros métodos de detecção da doença, como os testes rápidos imunocromatográficos, que são baseados na detecção de antígenos parasitários. Estes testes são mais utilizados em situações de campo, onde os recursos são escassos e faltam profissionais (Talundzci et al, 2014). Outros métodos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real também estão disponíveis para o diagnóstico de malária (Mekonnen et al, 2014).

1.5-Malária e eritrócitos

A malária causada por *P. vivax* é caracterizada por um período de incubação longo e os sintomas iniciais apresentam-se mais leves. O parasito infecta aproximadamente 2 a 5% de eritrócitos (Sortica et al, 2012). As membranas dos eritrócitos infectados tornam-se gradualmente rígidas conforme os estágios de maturação do parasito e reduzem sua capacidade de deformação. A presença dos parasitos dentro da célula promove um aumento na viscosidade do sangue (Antia et al, 2008; Handayani et al, 2009; Fedosov et al, 2011).

A ligação de eritrócitos infectados ao endotélio vascular consiste em um processo de proteção ao parasito, ao impedir a destruição da célula infectada pelo baço evita-se também, a eliminação do parasito. Esse mecanismo chamado de “sequestro” pode ocorrer em vários órgãos, incluindo coração, pulmão, cérebro, fígado, rins, tecidos subcutâneos e placenta (Miller et al, 2002). Além disso, as proteínas de superfície do merozoíto (MSP) são conhecidas por ser uma grande família de proteínas que possuem a função de interagir inicialmente entre os parasitos e os eritrócitos. Nove MSPs têm sido caracterizadas em *P. vivax*, sendo as principais proteínas envolvidas nesta interação à MSP1 e MSP3- α (Brito & Ferreira, 2011).

Os processos fisiopatológicos envolvidos na interação parasito/eritrócito, são a citoaderência de células infectadas e não-infectadas com formação de rosetas que podem ocasionar obstrução do fluxo sanguíneo, produção sistêmica ou deposição local de citocinas pró-inflamatórias e perfusão tecidual em pacientes portadores de malária grave (Dondorp et al, 2004).

A deformação dos eritrócitos é aumentada em infecções por *P. vivax*, no entanto é acompanhado de maior fragilidade tanto de eritrócitos infectados como não-infectados, por

isso esta malária está associada a anemias severas por hemólise (Anstey et al, 2009; Handayani et al, 2009). A ocorrência de citoaderência na infecção por *P. vivax* ainda é parcialmente compreendida. No entanto, estudos têm relatado a citoaderência por *P. vivax* no pulmão e conseqüentemente esse mecanismo pode ser responsável pela insuficiência respiratória, uma das principais causas de letalidade na infecção por *P. vivax* (Costa et al, 2012).

A invasão do protozoário nas células sanguíneas do hospedeiro acontece, progressivamente, com mudanças na estrutura da membrana celular, com alterações das propriedades de transporte, exposição aos antígenos de superfície e inserção de proteínas derivadas dos microrganismos. As hemácias infectadas pelo protozoário apresentam alterações em sua estrutura, o que facilita a aderência às células endoteliais de diversos órgãos, tais como cérebro, pulmão e rins. Além disso, a presença de adesinas do *Plasmodium* spp, propicia maior gravidade da doença, através do fenômeno conhecido por citoaderência (Finney et al, 2010; Francischetti et al, 2008). A trombocitopenia causada por remoção de plaquetas por fagócitos MN também tem sido relatada em pacientes com malária (Coelho et al, 2013).

1.6- Resposta imune na malária

O desenvolvimento da imunidade na malária inicia-se logo após o mosquito infectado inocular no hospedeiro. Os esporozoítos que apresentam tropismo pelos hepatócitos migram para o fígado. Alguns destes esporozoítos são reconhecidos e fagocitados pelas células de Kupffer (KC), que irão logo após se dirigir para o linfonodo mais próximo onde apresentarão fragmentos de antígeno para células T “naive” pela ligação ao MHC Classe II (Schwenk & Richie, 2011).

A resposta imune inata, principalmente a fagocitose, representa a primeira linha de defesa para o plasmódio, seguida pela resposta adquirida (Muniz-Junqueira et al, 2001; Muniz-Junqueira & Tosta, 2009).

A imunidade protetora é gradualmente adquirida pela exposição natural de indivíduos que residem em áreas endêmicas, mas é rapidamente perdida no momento em que a exposição do indivíduo ao parasito deixa de existir, indicando que a memória imunológica provocada pela malária é de curta duração e o paciente infectado deve estar continuamente exposto ao parasito (Todryk et al, 2008; Roestenberg et al, 2009, Keegan & Dushoff, 2013).

Por outro lado, em áreas endêmicas para a malária, os indivíduos são continuamente expostos ao parasito e apresentam níveis elevados de anticorpos específicos (Mutis et al, 2005). Nessas áreas, as infecções por *P. falciparum* e/ou *P. vivax* são geralmente acompanhadas de sintomas clínicos com grau variável de intensidade (Tauil, 2006). Contudo, relatos nessas áreas têm descrito a presença de pessoas com exame parasitológico positivo e ausência de sintomas clínicos. No Brasil, há casos de malária assintomática em indivíduos que apresentam história de longa exposição à doença (Fontes, 2001).

1.7- Imunoglobulina A (IgA) e Imunoglobulina G (IgG) na Malaria

As imunoglobulinas desempenham importante papel como mediador de proteção para malária. Vários trabalhos relatam a busca por vacinas (Bueno et al, 2011), bem como, o uso de terapias baseadas em imunoglobulinas (Ig) (Pleass & Holder, 2005; Shi et al, 2011). Dentre as classes de imunoglobulinas a IgG é a mais abundante no soro humano, seguida por IgA. As IgGs são glicoproteínas multifuncionais encontradas no sangue e em outros fluidos do organismo capazes de conferir proteção para malária devido sua capacidade de ligação e neutralização no parasito (Pleass & Holder, 2005).

A IgA é uma glicoproteína presente no soro e em maior concentração nas mucosas, tem a capacidade de se ligar aos micro-organismos e desta maneira, impedir a aderência destes à superfície das células (Carneiro-Sampaio et al, 1996). A ação da IgA da qual é relativamente resistente à degradação enzimática, é atuar localmente, principalmente em mucosas (Hanson, 2007). A IgA está envolvida principalmente na proteção das superfícies da mucosas. Elas atuam em diversos mecanismos efetores, entre estes, neutralização, opsonização, fagocitose e liberação de diversas citocinas (Roger et al, 2008; Bakema e Egmond, 2011).

A literatura mostra a importância da IgG na infecção por malária, enquanto que para IgA os resultados ainda são controversos. Estudos sugerem um papel importante da IgA em camundongos infectados por *P. yoelii* (Mkaddem et al, 2012), porém devido a limitação de métodos empregados, alguns autores acreditam que a IgA não tem uma função relevante na malária (Shi et al, 2011). Sabe-se que existe associação de nefropatia mediada por IgA em pacientes infectados por *P. falciparum* (Yoo et al, 2012, Rafieian-Kopaei et al, 2013).

A interação de imunoglobulinas e células é realizada através de receptores. Receptores para o fragmento Fc da imunoglobulina G (FcγR), pertencentes ao grupo da superfamília de imunoglobulinas, são moléculas importantes capazes de mediar e controlar as funções efetoras da IgG. Em humanos, há três tipos diferentes de FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16). Estudos têm mostrado que os receptores FcγRs estão envolvidos na internalização de imunoglobulinas e constituem um dos principais mecanismos efetores das imunoglobulinas (Lisi et al, 2011).

Receptores para o fragmento Fc da IgA também têm sido relatados na superfície de macrófagos e neutrófilos (Monteiro et al, 1992; Honorio-França et al, 2001; Monteiro & Van de Winkel, 2003; França et al, 2011), podendo estar envolvidos no processo de fagocitose.

O receptor Fc α RI (CD89) é um importante imunomodulador com funções anti e pró-inflamatórias (Pasquier et al, 2005, Bakema & Egmond, 2011). A ligação da IgA ao receptor Fc α RI pode ativar os mecanismos intracelulares de macrófagos (Van Egmond et al, 2000). A expressão do receptor Fc α RI pode desempenhar um papel importante na defesa de várias infecções (Honorio-França et al, 1997; Honorio-França et al, 2001; França et al, 2011). No entanto, o papel destes receptores, bem como as interações com IgA durante as infecções por *P. vivax*, ainda é parcialmente compreendido.

A presença de IgA e IgG específicas para *Plasmodium* spp têm sido detectadas em soro humano (Biswas et al, 1995; Kassim et al, 2000; Dechant & Valerius, 2001; Corthésy, 2003). As imunoglobulinas podem proteger o indivíduo de uma re-infecção ou de manifestação clínica da doença, a duração desta imunidade é dependente de novo contato com o parasito (Hill et al, 2013; Muellenbeck et al, 2013; Leoratti et al, 2008). Em áreas endêmicas para a malária, indivíduos continuamente expostos têm produção gradual de anticorpos específicos que atingem níveis elevados e estáveis, na fase tardia da vida (Gomes et al, 2011).

1.8- As citocinas na malária

As complicações decorrentes de infecções por *P. vivax* podem levar a processos inflamatórios crônicos. A inflamação pode ser sistemicamente controlada por diversos sinais bioquímicos. Um importante mediador desses sinais são as citocinas (Chen & Liu, 2009).

As citocinas são uma família de mediadores proteicos ou glicoproteicos solúveis, de baixo peso molecular (geralmente de 15–30 kDa), sintetizadas por diferentes linhagens celulares, incluindo os leucócitos, em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos (Radford-Smith & Jewell, 1994; Mann & Young, 1994). Atuam localmente de maneira autócrina ou, parácrina, pela ligação à receptores de alta afinidade em células alvo (Mann & Young, 1994). Algumas citocinas podem ser produzidas em quantidade suficiente e alcançar a circulação periférica podendo exercer ações endócrinas (Sherry & Cerami, 1988; Mann & Young, 1994; Bozkurt, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado a importância da interação do *P. falciparum* e *P. vivax* em células humanas, nos quadros clínicos graves associados ao controle da parasitemia, com produção de citocinas inflamatórias, entre estas, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e INF- γ (Jide et al, 2009; Underhill, 2003). A participação de células dendríticas (CD) e de receptores do tipo Toll-Like (TLRs) na fisiopatogenia do *Plasmodium* spp também tem sido reportado (Stevenson & Urban, 2006).

A literatura relata a importância do padrão de citocinas e de suas interações na resposta imune do hospedeiro durante infecção por *P. vivax* (Zeyrek et al, 2006, Sortica et al, 2012). *P. vivax* induz uma maior produção de citocinas em relação a *P. falciparum* mesmo com biomassa parasitária semelhante (Anstey et al, 2009). O aumento da parasitemia, bem como a resposta imunológica durante o percurso da doença são fatores que determinam sua gravidade (Sortida et al, 2012). Os níveis elevados de citocinas do tipo Th1 e Th2 como IFN- γ e IL-4, respectivamente, têm sido associados à gravidade da doença, no entanto existem muitas dúvidas sobre o papel imunológico destas citocinas na patogênese da doença (Tangteerawatana et al, 2007).

Na malária ocorre ativação tanto de células Th1 quanto de células Th2, sendo necessário para a proteção do indivíduo um equilíbrio entre as citocinas produzidas por ambos os perfis celulares (Mbugi et al, 2010). Na infecção por *P. vivax*, estudos vêm evidenciando o papel protetor da citocina IL-4 como regulador negativo dos efeitos pró-inflamatórios ocasionada por *P. vivax*. Apesar de possuir baixos níveis sistêmicos, IL-4 parece ser um mediador central com várias interações significativas em indivíduos assintomáticos (Mendonça et al, 2013). Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 nas fases iniciais da infecção correlacionam-se a elevadas parasitemias, porém em fases tardias da infecção parecem prevenir sintomas mais graves (Walther et al, 2009).

As citocinas promovem modulações durante a infecção por *Plasmodium* spp que podem resultar na modificação dos componentes celulares e bioquímicos do sangue, melhorando ou agravando a fisiopatologia do paciente. Citocinas inflamatórias possuem um papel importante na evolução da infecção do *Plasmodium* spp. Alguns trabalhos têm avaliado o nível de citocinas em pacientes infectados por *P. vivax* (Andrade et al, 2010; Gonçalves et al, 2010), contudo, os dados sobre suas funções durante o curso da infecção ainda são controversos. Durante a infecção, as citocinas desempenham um papel duplo, controlando o crescimento do parasito, por um lado, e exacerbando a patologia por outro lado (Kabyemela et al, 2013). Os efeitos antagônicos são atribuídos ao tempo de expressão e ao equilíbrio das citocinas anti e pró-inflamatórias (Doodoo et al, 2002). A citocina IFN- γ , por exemplo, possui um papel importante na proteção do hospedeiro para infecção por *Plasmodium* spp, no entanto também é um fator de patogenicidade nos sintomas da malária grave (Inoue et al, 2013).

Também se devem considerar outras citocinas com atividade pró-inflamatórias. A IL-17, é produzida principalmente por linfócitos T CD4, está envolvida na indução de respostas

inflamatórias. Estudos com a IL-17 evidenciaram o seu papel relacionado com a imunidade em indivíduos co-infectados com o *P. falciparum* e com a *Wuchereria bancrofti* (Metenou et al, 2011). No entanto, o papel da citocina IL-17 nos mecanismos imunopatológicos da malária ainda não foram totalmente elucidados (Braga et al, 2012; Hu, 2013), constituindo-se um campo aberto para novos estudos.

1.9- Parâmetros reológicos do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*

Os ensaios reométricos baseiam-se no estudo do fluxo e da deformação de materiais biológicos sob influência de restrições aplicadas às propriedades físicas, no transporte, no movimento, tais como a viscosidade, tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento. Assim aplicam-se aos estudos reológicos a mecânica dos meios contínuos, os fenômenos de transporte e a mecânica dos fluídos (Verdier et al, 2009; Santos, 2009). Um fluido newtoniano caracteriza-se por possuir viscosidade absoluta constante, independente da variação da taxa de deformação (Schramm, 2006). Por outro lado, um fluido não newtoniano não segue a lei da viscosidade de Newton, a sua viscosidade não é constante, isto é, pode apresentar taxa de deformação (Rao, 1999).

Sabe-se que a reologia do sangue pode ser influenciada pelo valor do hematócrito, viscosidade do plasma, deformação dos eritrócitos e agregação eritrocitária. Os leucócitos também podem ser reologicamente importantes para o fluxo ao nível da microcirculação (Ernst & Bergmann, 1989; Piagnerelli et al, 2003).

Alterações hemorreológicas podem ser verificadas por deformação em eritrócitos, no fluxo e na constituição do sangue. Trabalhos na literatura incluem investigações sobre o estudo das propriedades macroscópicas do sangue usando ensaios reométricos e também propriedades microscópicas (Robertson et al, 2008).

A viscosidade do sangue associada à baixa velocidade de fluxo depende fundamentalmente da agregabilidade eritrocitária, da participação de proteínas plasmáticas e de características de interação célula-célula (Foresto et al, 2005). O desenvolvimento intracelular do parasito é acompanhado por uma série de mudanças estruturais, biológicas, químicas e funcionais dos eritrócitos, evidenciadas por alterações na membrana celular, que são responsáveis pelos sintomas clínicos e patológicos.

Alterações das propriedades de adesão e reológicas de eritrócitos são de extrema importância, uma vez que esses traços estão diretamente ligados ao aumento da destruição dessas células levando a um quadro de anemia e ao sequestro de células (Mohandas & An, 2012). As infecções por *Plasmodium* spp, devido ao tropismo por eritrócitos e as suas modificações na estrutura das células parasitadas, desempenham um papel importante no fluxo sanguíneo, em particular no sistema microvascular. Dentre estas modificações destacam-se a citoaderência, a formação de “rosetas” devido a aderência de células infectadas às células não-infectadas, levando ao aparecimento de agregados celulares que interferem na microcirculação. Na malária grave, os eritrócitos tornam-se rígidos, o que resulta em alterações no fluxo sanguíneo (Dondorp et al, 2008).

O sangue de indivíduos não infectados apresenta comportamento reológico com presença de eritrócitos com baixas taxas de deformação, capazes de formar aglomerados tornando-o fluido. O comportamento reológico varia de indivíduo para indivíduo, de acordo com a temperatura e pode ser afetado por várias patologias (Santos, 2009). Estudos realizados em outras patologias relatam variação de taxas de viscosidade (França et al, 2014). Também em infecções por *P. knowlesi*, ocorre alterações nas propriedades reológicas, como o aumento da viscosidade do sangue e menor fluidez dos eritrócitos nos vasos sanguíneos (Martínez-Salazar et al, 2012).

Visto que os eritrócitos são os principais componentes sanguíneos, as variações nas taxas de deformação dessas células estão diretamente relacionadas às alterações reológicas do fluxo sanguíneo (Simmonds et al, 2003). Supõe-se que a viscosidade sanguínea em patologias como a malária pode estar modificada (Puig-de-Morales-Marinkovic et al, 2007; Veerapaneni et al, 2011).

Estudos realizados com *P. falciparum* relatam que os merozoítas invadem as células dos eritrócitos modificam o seu citoesqueleto e inserem suas proteínas parasitadas nas membranas dos mesmos. Estas proteínas apresentam um importante fator na virulência da malária. A proteína PFEMP1 é a principal variante presente no *P. falciparum* e tem um importante papel na resposta imune do hospedeiro, porque provoca a ligação destes receptores de membrana ao eritrócito infectado (Grau & Craig, 2012). Acredita-se que a ruptura dos eritrócitos com aumento da taxa de agregação do sangue, possa ser importante nestes processos (Baskurt et al, 1997; Baskurt & Meiselmam, 2003; Cloutier et al, 2008). O sangue de indivíduos infectados por *P. falciparum* provoca alterações reológicas e conformacionais nas células sanguíneas resultando em obstruções de vasos capilares provocando a dificuldade dos eritrócitos circularem (Fedosov et al, 2014).

É possível que fatores hemodinâmicos durante as infecções por *Plasmodium* spp possam estar associados a alterações em parâmetros reológicos e na liberação de citocinas inflamatórias.

2. JUSTIFICATIVA

A malária é uma das principais doenças infecciosas, sendo considerada re-emergente em vários países e causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* spp. Evidências indicam que as respostas mediadas por células e suas interações com os receptores também resultam em um processo de inflamação e isso contribui para a evolução da patogênese na malária. Assim, o equilíbrio adequado entre a regulação de citocinas, a concentração de imunoglobulinas IgA e IgG, e expressão desses receptores nas respostas imunológicas poderá contribuir no esclarecimento imunopatológico das infecções pelo *P. vivax*.

Além disso, este trabalho irá procurar estabelecer uma relação das alterações do fluxo sanguíneo de amostras positivas para o *P. vivax*, através de análises reológicas. Essas alterações das propriedades reológicas em termos celulares são de extrema importância na malária. O desenvolvimento intracelular do parasito da malária é acompanhado por uma série de mudanças estruturais, biológicas, químicas e funcionais dos eritrócitos, evidenciadas por alterações na membrana celular. É possível que fatores hemodinâmicos durante as infecções por *Plasmodium* spp possam estar associados a alterações desses parâmetros reológicos, contribuindo para a modulação e liberação de citocinas.

3- OBJETIVOS

3.1- GERAL

O objetivo deste estudo foi verificar a concentração sérica de imunoglobulinas e citocinas séricas, a expressão de receptores para imunoglobulinas em eritrócitos e os parâmetros reológicos de sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* comparando com os indivíduos não infectados.

3.2- ESPECÍFICOS

- Dosar a concentração de IgA e IgG em soro de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*;
- Avaliar a expressão dos receptores Fc α RI (CD89), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16) em eritrócitos de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*;
- Quantificar a concentração das citocinas IL-2, IL4, IL6, IL10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-17 em soro de pacientes infectados e não infectados por *P. vivax*;
- Analisar os parâmetros reológicos e a imunomodulação pelas citocinas IL4, TGF- β , IFN- γ e IL-17 em sangue de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-Sujeitos Amostrais

As amostras de sangue foram coletadas de 69 indivíduos, sendo 37 controle e 32 infectados por *P. vivax*, nas áreas endêmicas da Amazônia Legal nos municípios de Cruzeiro do Sul-AC no ambulatório do hospital do vale do Juruá, e no posto de malária Capuchu, em Porto Velho-RO, no posto de saúde Adelaide. As amostras de sangue de indivíduos não infectados que se dispuseram a participar da pesquisa foram coletadas no laboratório de imunomodulação situado no campus do Araguaia da UFMT na cidade de Barra do Garças, considerada uma região não endêmica para malária e todos com diagnóstico negativo. Os indivíduos não infectados eram alunos de graduação e pós-graduação da UFMT e profissionais de nível superior.

Em indivíduos infectados por *P. vivax* a coleta foi realizada antes de iniciar o tratamento para malária. As amostras foram trazidas sob condições de transporte e armazenamento adequados para serem analisadas no laboratório de imunomodulação no campus Araguaia/UFMT em Barra do Garças-MT sendo armazenadas em freezer -80°C para posterior análise. Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa receberam informações sobre os objetivos, os riscos e os benefícios do trabalho, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Campus Araguaia/UFMT conforme o parecer consubstanciado do CEP nº 440.602 de 30/10/2013 (Anexo 1).

4.2-Procedimentos da coleta das amostras

Foram coletados 8 mL de sangue venoso em tubos BD Vacutainer® com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) para realização das análises reológicas e de receptores

Ig em eritrócitos. Também foram coletados 8 mL de sangue em tubos sem anti-coagulante para obtenção do soro, para posterior dosagem de imunoglobulina e citocinas.

4.3- Análise parasitológica de sangue

Para avaliação da parasitemia foram confeccionadas lâminas de esfregaços sanguíneos de pacientes infectados por *P. vivax*. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa sem anticoagulante (EDTA). Logo após a coleta foi preparada a lâmina pela técnica da gota espessa corada com Giemsa (Herera et al, 2014). As lâminas foram analisada em microscopia óptica (Nikon, Japão), contagem de 200 campos, e o número de parasitos encontrados foram multiplicados por 5 (Bueno et al, 2012).

4.4- Obtenção do soro

Para obtenção do soro, amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas por 15 minutos a 300 g. O soro foi separado e armazenado a -80°C para posterior dosagens de imunoglobulinas e citocinas.

4.5- Quantificação da concentração de IgA e IgG total

Foram analisadas 16 amostras, sendo 8 de indivíduos não infectados e 8 de infectados por *P. vivax*. A determinação da concentração de IgA e IgG no soro foi realizada pelo método de imunoturbidimétrico usando um kit específico comercializado pela Biotécnica. Amostras de soro e o calibrador foram diluídos a 1:5 (v/v) com uma solução salina (9g/L). Uma curva de calibração foi obtida usando um calibrador MultiCal (Biotécnica) para determinar a curva padrão. 10 µl de soro e calibrador (previamente diluídas) foram colocados em 1 ml de solução tampão contendo: Anticorpos anti-IgA; anti IgG. As suspensões foram misturadas e

incubadas durante 10 min a 37°C em banho-maria. A absorbância das amostras e calibrador foi lida em comprimento de onda 340 nm no aparelho de espectrofotômetro Bioplus Bio-2000. Para o cálculo da concentração de IgA total e IgG total foi dividido a absorbância da amostra pela absorbância do calibrador e multiplicado pela concentração do calibrador (Biotécnica). Os resultados foram expressos em miligramas por decilitros (mg/dl).

4.6- Quantificação das citocinas

Para a quantificação das citocinas foi utilizado um total de 25 amostras, sendo 13 de indivíduos não infectados e 12 infectados por *P. vivax*. O ensaio da detecção de citometria foi realizado no laboratório de imunomodulação da Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Universitário do Araguaia, Barra do Garças-MT. As concentrações de citocinas presentes nas amostras foram avaliadas pelo Kit “Cytometric Bead Array” (CBA, BD Bioscience, USA). Nesse estudo foram usadas para a quantificação as citocinas, INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 nas amostras. Sete populações de *beads* com distintos tamanhos foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo. (FACS Calibur, BD Bioscience, USA). As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com os respectivos tamanhos, da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, os *beads* de captura das citocinas foram misturados com anticorpos de detecção conjugado com o fluorocromo ficoeretrina (PE), e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio “em sanduiche”. Os tubos para a detecção das citocinas das amostras de soro de indivíduos infectados por *P. vivax*, e os soros de indivíduos não infectados, foram preparados com: 50 μ l do reagente das amostras da mistura de *beads* e 50 μ l do reagente de detecção Th1/Th2PE. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e

incubados por três horas, em temperatura ambiente no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o Software Cell Quest (BD) FCAP array.

4.7- Quantificação da citocina TGF- β

Foi analisado um total de 25 amostras, sendo 13 de indivíduos não infectados e 12 de infectados por *P. vivax*. As concentrações da citocina TGF- β presente nas amostras de soro foram avaliadas pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). As concentrações de TGF- β foram determinados utilizando um kit da Enzo life science (UK). As análises foram realizadas em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. Os resultados foram calculados utilizando curva padrão e os resultados foram expressos em pg/dL.

4.8- Obtenção dos eritrócitos

As amostras coletadas de sangue com EDTA de indivíduos infectados e não infectados com *P. vivax*, foram centrifugadas por 15 minutos a 160 G. O plasma foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina. A seguir as células foram contadas em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/ml. Esta preparação foi utilizada para as análises dos receptores de imunoglobulinas.

4.9- Expressão dos receptores Fc α RI (CD89), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16) em células de sangue de indivíduos com malária

Foram analisadas 14 amostras, sendo 7 de indivíduos não infectados e 7 de infectados por *P. vivax*. Após a separação as células foram lavadas com Tampão Fosfato (PBS) acrescido de BSA (soro albumina bovino) por 10 minutos a 4° C. A seguir as células foram pré-incubadas com 10ul com anticorpos monoclonais anti-Fc γ RI (CD89)-FITC, anti-Fc γ RII (CD32)-PE, Fc α RIII (CD16)-FITC. Também utilizou como controle um anticorpo

monoclonal IgG1k (0.1mg/ml) por 30 minutos. Logo após as amostras foram lavadas e ressuspendidas com PBS-BSA (5mg/ml) e analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Bioscience, USAca) e os resultados foram avaliados utilizando o software Cell Quest.

4.10- Alterações do fluxo sanguíneo nas análises reológicas com *P. vivax*

Foram analisados de 69 amostras, sendo 32 de indivíduos infectados e 37 de não infectados por *P. vivax*. Para a realização dos exames reológicos foram coletados 2mL de sangue de cada paciente infectado com *P. vivax* em tubos a vácuo com anticoagulante. As análises reológicas foram realizadas em Modular Compact Rheometer (Anton Paar[®]GermanyGmbH – MCR 102) acoplado ao Software Rheoplus V3.61, com controle permanente do gap de medição com suporte TruGap[™] em 0,099 mm, célula de medição Toolmaster[™] CP 50 e controle preciso da temperatura com recurso T-Ready[™]. Todos os experimentos, 600 µL de sangue positivo para *P. vivax* foram adicionados sobre a superfície da placa de leitura. As amostras de sangue total de pacientes infectados com *P. vivax* e não infectados foram moduladas com 20 µl de citocinas IL-4, IFN- γ , TGF- β e IL-17 (Sigma, St. Louis, USA) com concentração igual a 100 pg/ml para cada 580 µl de sangue total. Nos grupos que tiveram citocinas associadas, foram utilizados 20 µl de cada citocina para 560 µl de sangue total de pacientes positivos para *P. vivax* e os controles utilizados. Escolheu-se a temperatura de 37°C por 30 minutos e em seguidas foram lidas no reômetro para análise dos padrões imunorreológicos. Os gráficos reológicos foram todos tratados sob o Software Rheoplus. Para as curvas de fluxo e viscosidade os parâmetros estabelecidos foram baseados no controle da tensão de cisalhamento (τ) de 0 a 5 Pascal (Pa) para curva ascendente e de 5 a 0 Pa para a curva descendente. Estes ensaios foram realizados em condições isotérmicas a 37°C, para a curva de viscosidade sob varredura de temperatura os parâmetros estabelecidos foram baseados no controle fixo da tensão de cisalhamento (τ) em 1Pa, com variação de

temperatura de $25 \pm 0,1$ a $45 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e taxa de aquecimento de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Foram registrados parâmetros a cada $0,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ totalizando 41 leituras por análise de cada am ostra (França et al, 2014).

4.11- Análise estatística

Para a análise da concentração de citocinas e de imunoglobulinas (IgA e IgG) foi utilizado o teste t student. Para a expressão dos receptores $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ (CD89), CD16 e CD32 em eritrócitos e os parâmetros reológicos foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Também foi realizada a análise da relação de viscosidade e parasitemia em presença de citocinas através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. As estatísticas foram consideradas significantes quando o valor de P foi menor que 0.05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1- Caracterização dos indivíduos

A população avaliada neste trabalho foi composta em sua maior parte por indivíduos jovens, do sexo masculino, que viviam em área endêmica e que apresentaram baixa parasitemia. Na Tabela 1 estão apresentadas as características gerais de indivíduos infectados por *P. vivax* e indivíduos não infectados. A média de idade dos indivíduos infectados com *P. vivax* foi de 30,5 anos e não infectados 28,7 anos, sendo predominante o sexo masculino (78,12%) em indivíduos infectados. Nos indivíduos do grupo controle houve predomínio de indivíduos do sexo feminino (51,36%). O tempo médio de sintomas foi de 3,1 dias e a grande maioria dos indivíduos apresentavam um baixo nível de escolaridade (84,87%). Todos os indivíduos infectados não faziam uso de medicamentos nos últimos 60 dias e não apresentaram episódios de malária neste período com média de parasitemia foi de $1746,87 \pm 728,22$ ul/sangue. O sangue dos indivíduos infectados foi coletado em Cruzeiro do Sul-AC e Porto Velho-RO e o sangue dos indivíduos não infectados foi coletado em Barra do Garças-MT.

Tabela 1- Características gerais de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*

| Características | | Não infectados | Infectados |
|-----------------------------------|-------------|----------------|-----------------|
| Nº indivíduos | | 37 | 32 |
| Idade (Média±DP) | | 28,7±8,12 | 30,5 ± 10,52 |
| Sexo (%) | M | 18/37 (48,64) | 26/32 (78,12) |
| | F | 19/37 (51,36) | 6/32 (21,87) |
| Sintomas (Dias) (Média±DP) | | 0 | 3,10 ± 1,40 |
| Escolaridade (%) | Fundamental | 2/37 (5,40) | 27/32 (84,87) |
| | Médio | 15/37 (40,54) | 4/32 (12,50) |
| | Superior | 20/37 (54,05) | 1/32 (3,12) |
| Tratamento (%) | Não | 100 | 100 |
| | Sim | 0 | 0 |
| Parasitemia (Média±DP) | | 0 | 1746,87± 728,22 |
| Área endêmica (%) | Não | 100 | 0 |
| | Sim | 0 | 100 |

DP = Desvio Padrão

% = Percentagem

5.2- Concentração de IgA e IgG (mg/dl) no soro de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*

Na figura 2 está apresentado a concentração de IgA em soro de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observou-se que os níveis de IgA foram maiores no soro de indivíduos infectados por *P. vivax*, ($265,20 \pm 40,78$ mg/dl), quando da comparação com indivíduos não infectados ($152,20 \pm 17,39$ mg/dl).

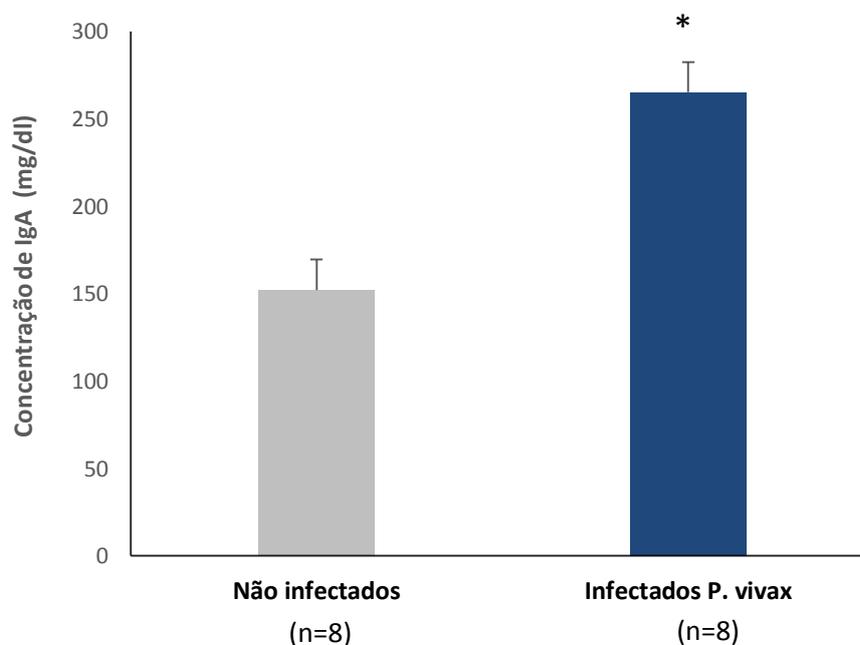


Figura 2- Concentração de IgA nos indivíduos infectados e não infectados com *P. vivax*. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão de soro de oito indivíduos em cada grupo. * $p < 0,05$.

Na figura 3 está apresentada a concentração de IgG no soro de indivíduos infectados por *P. vivax*. Houve aumento na concentração de IgG no soro de indivíduos infectados por *P. vivax* ($1341,0 \pm 41,33$ mg/dl) quando comparado aos valores encontrados no soro de indivíduos controle ($991,0 \pm 95,49$ mg/dl).

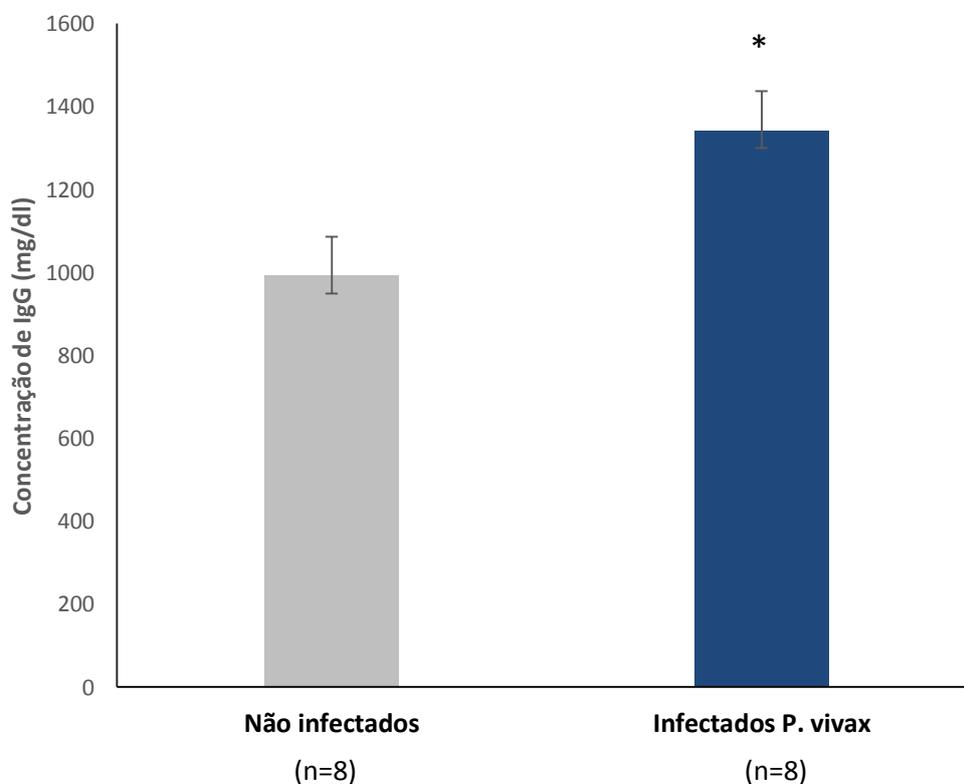


Figura 3- Concentração de IgG nos indivíduos infectados e não infectados com *P. vivax*. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão no soro de oito indivíduos em cada grupo. * $p < 0,05$.

5.3- Concentração (pg/mL) das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ e IL-17, no soro de indivíduos infectados por *P. vivax*

Na tabela 2 estão apresentados as concentrações (pg/ml) das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-17 no soro de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observa-se que houve aumento das concentrações de IFN- γ e IL-17 em soro de indivíduos infectados por *P. vivax*. As concentrações das citocinas IL-4, IL-2, IL-10 e IL-6 em soro de indivíduos infectados por *P. vivax* foram similares às concentrações encontradas em soro de indivíduos infectados por *P. vivax* foram similares às concentrações encontradas em soro de indivíduos controle. A concentração de TNF- α não alterou em soro de indivíduos infectados quando da comparação às concentrações observadas em indivíduos não infectados.

As concentrações do TGF- β foram menores no soro de indivíduos infectados quando comparada as concentrações encontradas em soro de indivíduos controles. (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração (pg/mL) de citocinas em soro de indivíduos infectados por *P. vivax*.

| Citocinas | Não infectados (n=13) | Infectados (n=12) |
|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| IL-2 | 5.46±1.25 | 5.84±0.80 |
| IL-4 | 5.70±2.80 | 5.82±1.26 |
| IL-6 | 3.97±2.48 | 3.76±2.97 |
| IL-10 | 3.13±0.80 | 8.10±7.75 |
| TNF-α | 2.35±1.14 | 1.33±0.11 |
| TGF-β | 32,20±8,90 | 7,60±6,60* |
| IFN-γ | 3.8±0.93 | 4.86±0.34* |
| IL-17 | 3.62±0.83 | 4.44±0.60* |

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão.*Diferença estatística entre os indivíduos infectados e não infectados. * p<0,05

5.4- Expressão dos receptores Fc γ RIII (CD16), Fc γ RII (CD32), Fc α RI (CD89) em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax*

A expressão do receptor Fc γ RIII (CD16) em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax* está apresentada na figura 4. A expressão do receptor CD16 foi maior em eritrócitos de indivíduos infectados pelo *P. vivax*.

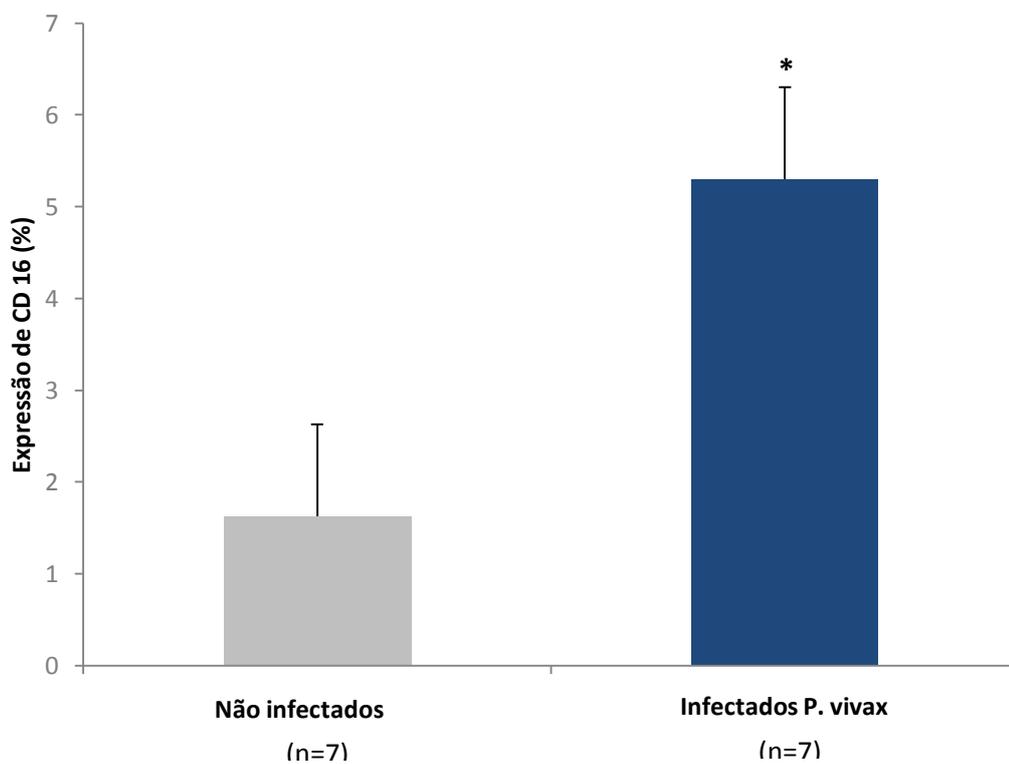


Figura 4- Expressão do receptor Fc γ RIII (CD16) em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax*. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão de eritrócitos de sete indivíduos em cada grupo. * $p < 0.05$.

Na figura 5 estão apresentados os resultados da expressão do receptor Fc γ RII (CD32) em eritrócitos de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*. Observa-se que a expressão deste receptor CD32 foi menor em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax* quando comparado a expressão em eritrócitos do grupo controle.

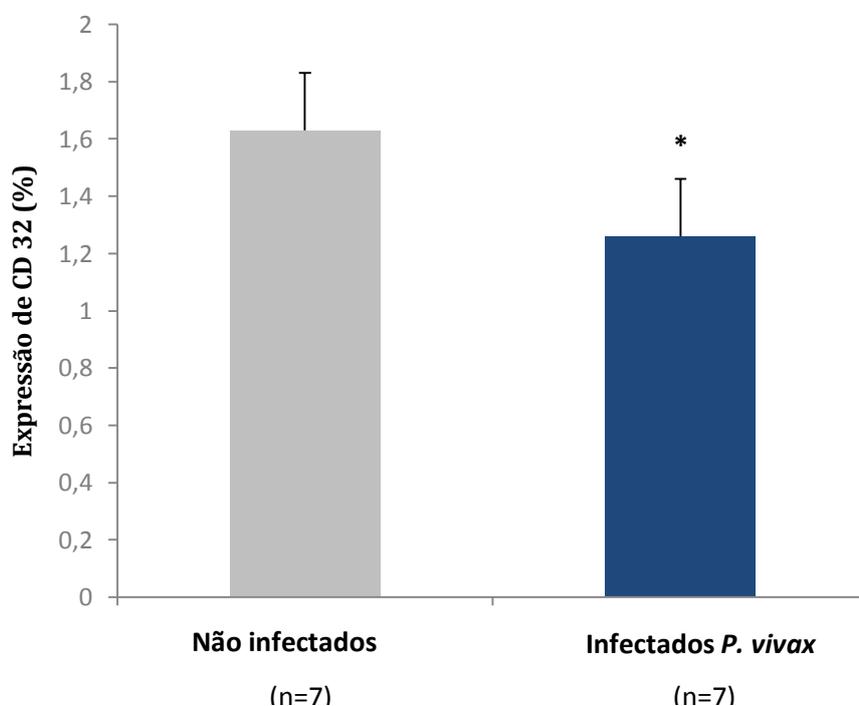


Figura 5- Expressão do receptor Fc γ RII (CD32) em eritrócitos de indivíduos infectados e não infectados com *P. vivax*. Os resultados foram expressos pela média e erro padrão de eritrócitos de sete indivíduos em cada grupo. * $p < 0,05$.

Os resultados da expressão do receptor CD89 estão apresentados na figura 6. A expressão do receptor CD89 em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax* foi similar a expressão encontrada em eritrócitos de indivíduos não infectados.

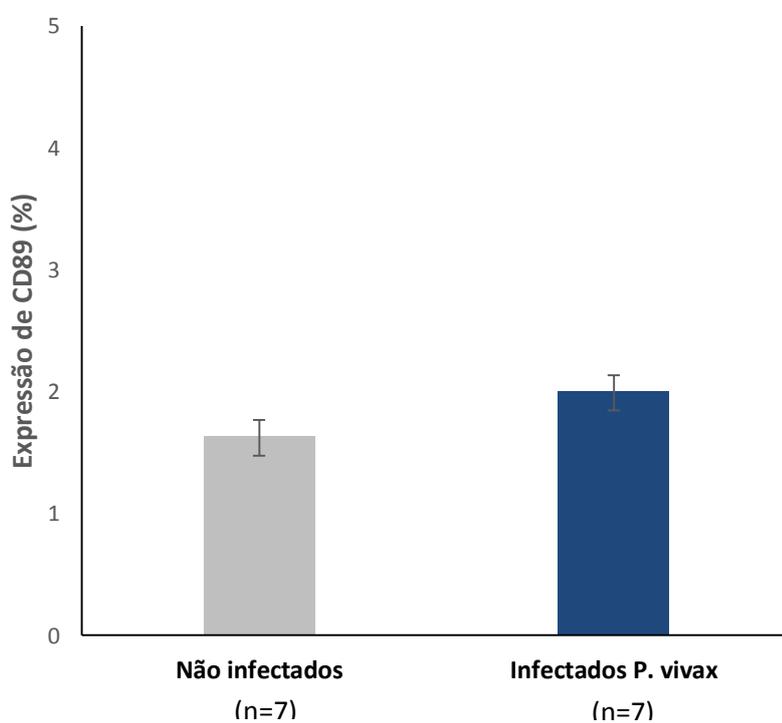


Figura 6- Expressão de receptor Fc α RI (CD89) em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax*. Os resultados foram representados pela média e erro padrão de eritrócitos de 7 indivíduos de cada grupo. * $p > 0.05$.

5.5- Parâmetros reológicos do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*

Na figura 7 estão apresentados os resultados da curva de fluxo do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observa-se que tanto o sangue de indivíduos infectados como os não infectados por *P. vivax* apresentam curva em forma de parábola, ascendente não linear, característica de fluidos não newtonianos.

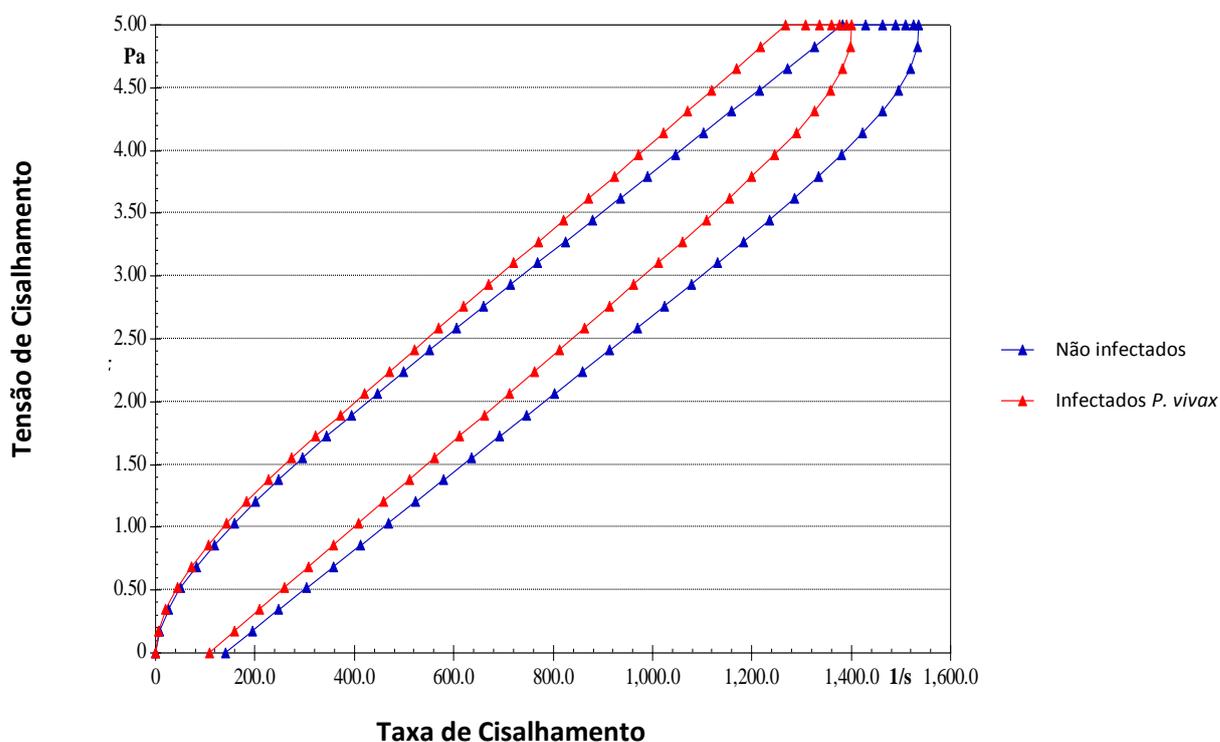


Figura 7- Curva de fluxo do sangue de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*.

Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos não infectados e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*.

Na figura 8 estão representados os resultados da curva de viscosidade do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*, analisados na faixa de temperatura de 25 a 45 °C. O sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*, ao longo da curva, independente da temperatura, apresentou aumento de viscosidade ($p < 0,0001$) quando da comparação a viscosidade do sangue de indivíduos não infectados.

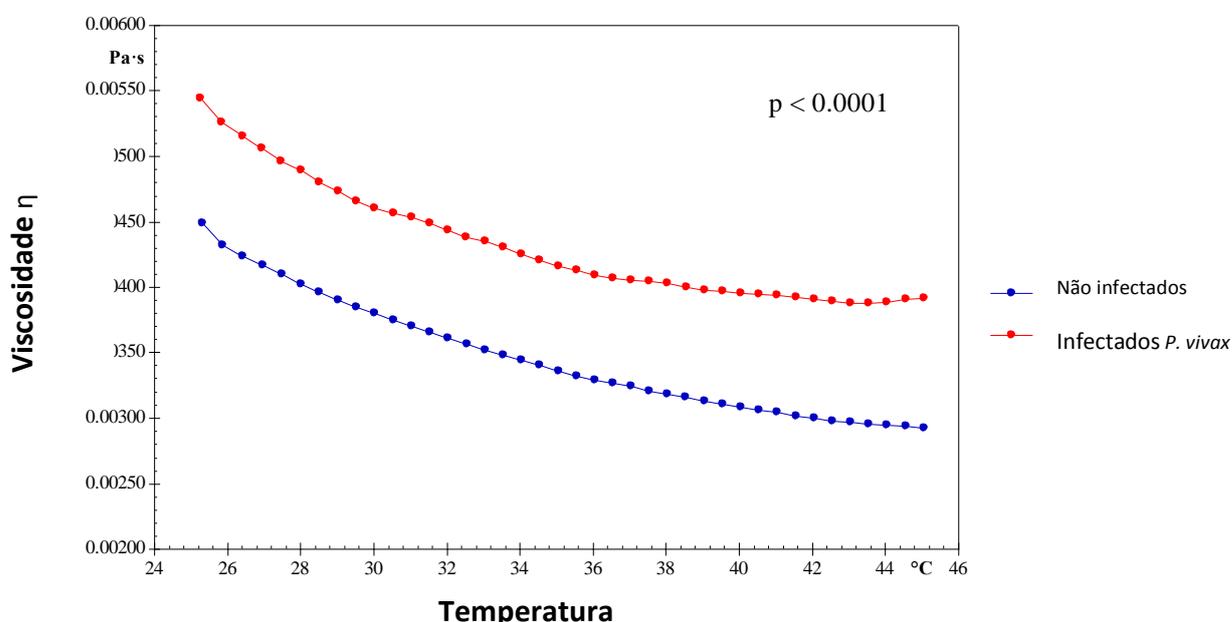


Figura 8 - Curva de viscosidade de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* em diferentes temperaturas (25 a 45 °C). Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 9 mostra os resultados da curva de viscosidade em relação as taxas de cisalhamento do sangue de indivíduos infectados e não infectados por *P.vivax*, sob temperatura de 37° C. Observou-se aumento da viscosidade (Pa.s x 10⁻³) no sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* (4,43±1,93).

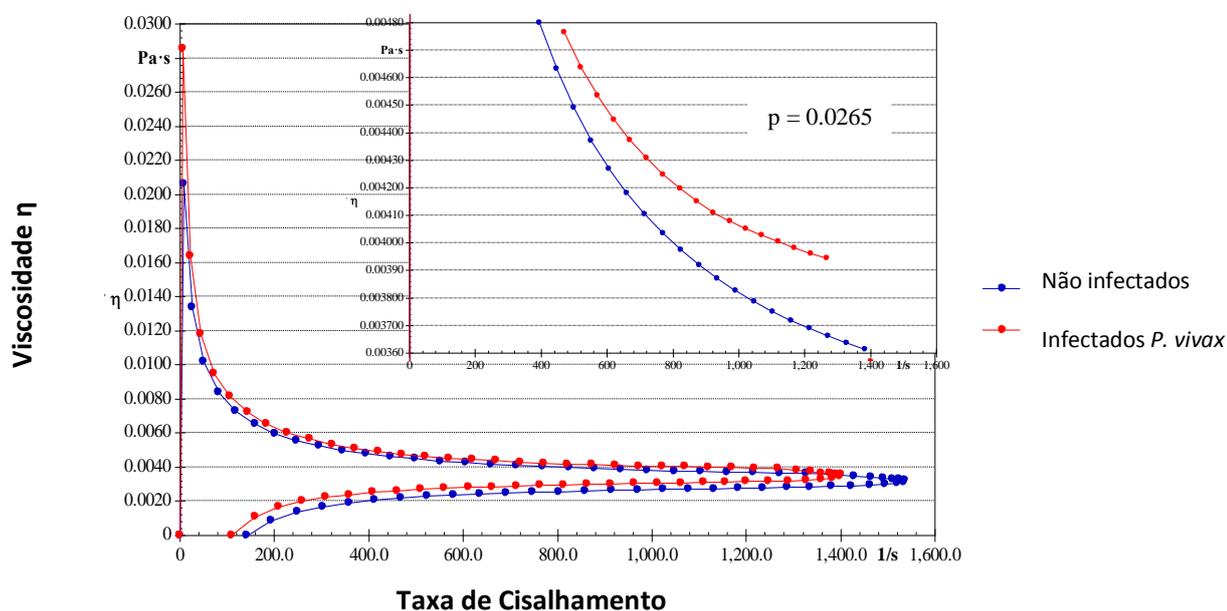


Figura 9 - Curva de viscosidade em relação às taxas de cisalhamento do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P.vivax*. Os dados representam a média obtida do sangue de 37 indivíduos controle e 32 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 10 demonstra a correlação dos índices de viscosidade em relação aos os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. Observou-se que não houve diferença significativa na correlação dos índices de viscosidade com os níveis de parasitemia.

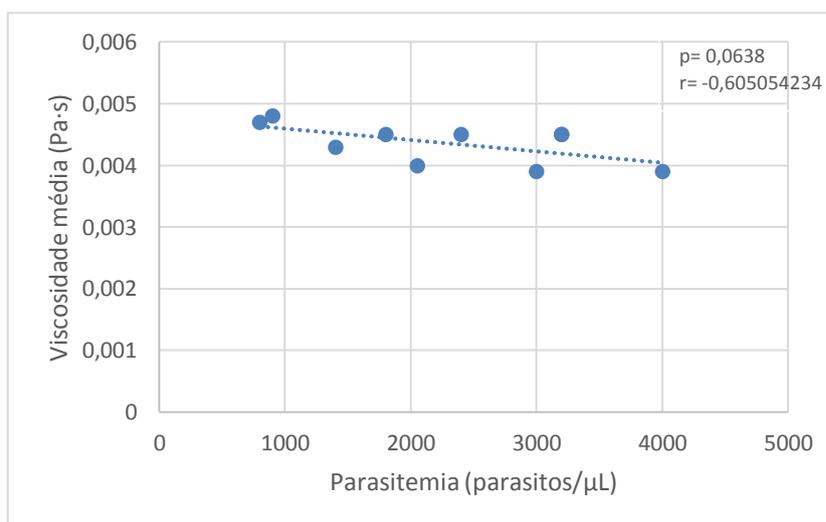


Figura 10 – Correlação entre os índices de viscosidade e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*.

5.6- Modulação por citocinas da Curva de viscosidade de sangue de indivíduos infectados

A Figura 11 mostra curva de viscosidade em relação a tensão de cisalhamento do sangue de indivíduos infectados e por *P. vivax* na presença da IL-4. Independente da presença da citocina houve aumento da viscosidade do sangue de indivíduos infectados ($4,85 \times 10^{-3} \pm 2,36 \times 10^{-3}$) comparado a viscosidade do sangue de indivíduos não infectados ($3,78 \times 10^{-3} \pm 1,77 \times 10^{-3}$).

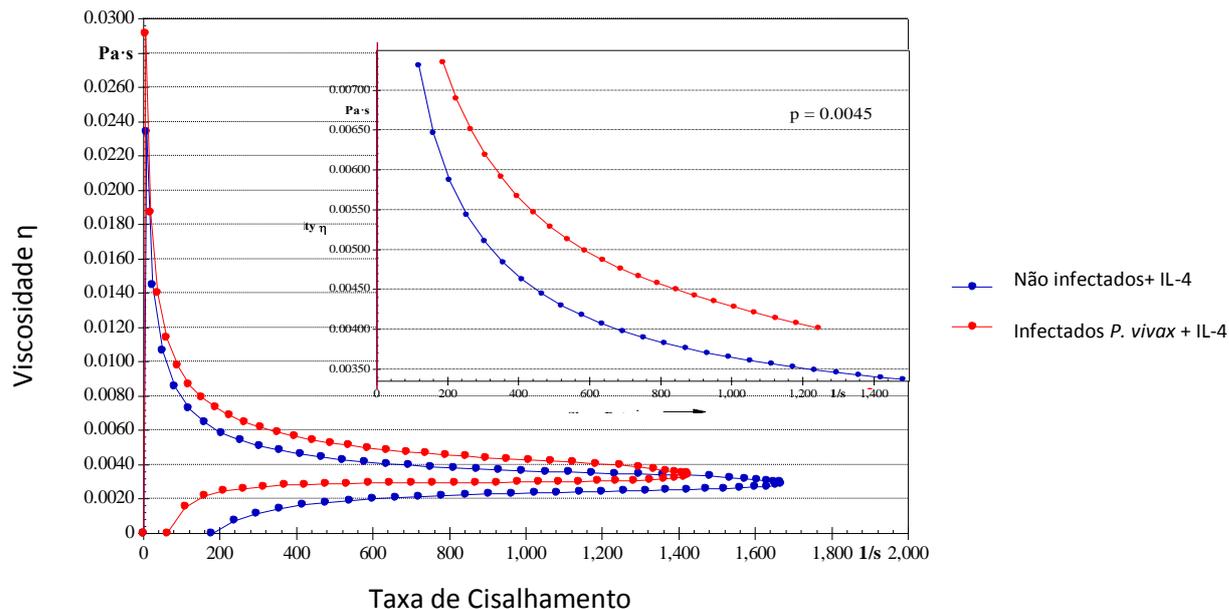


Figura 11 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados por *P. vivax* e de não infectados na presença de IL-4 ($p < 0,05$). Os dados representam a média obtida do sangue de 10 indivíduos controle e 10 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 12 demonstra a correlação dos índices de viscosidade na presença da citocina IL-4 em relação aos os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observou-se que não houve diferença significativa na correlação dos índices de viscosidade com os níveis de parasitemia.

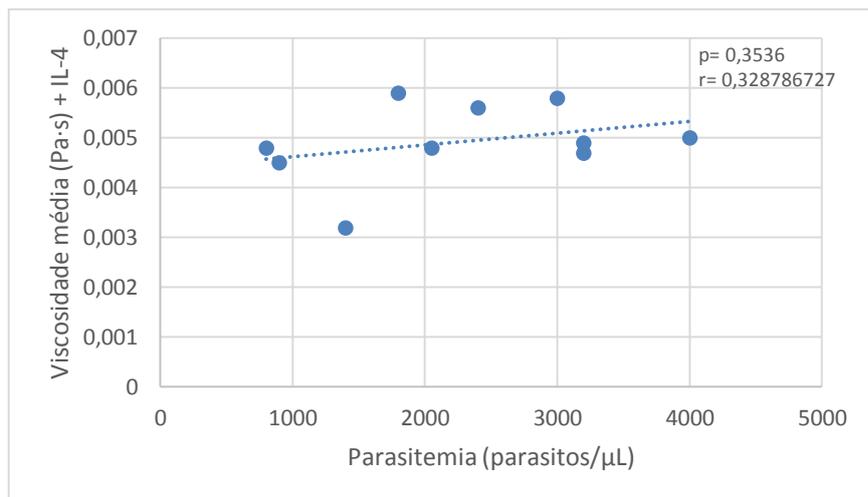


Figura 12 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IL-4 e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*.

Os resultados da curva de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* na presença de TGF- β estão na figura 13. Na presença de TGF- β observou-se que houve aumento da viscosidade do sangue ($p < 0,05$) de indivíduos infectados por *P. vivax* em relação a viscosidade observada no sangue de indivíduos não infectados.

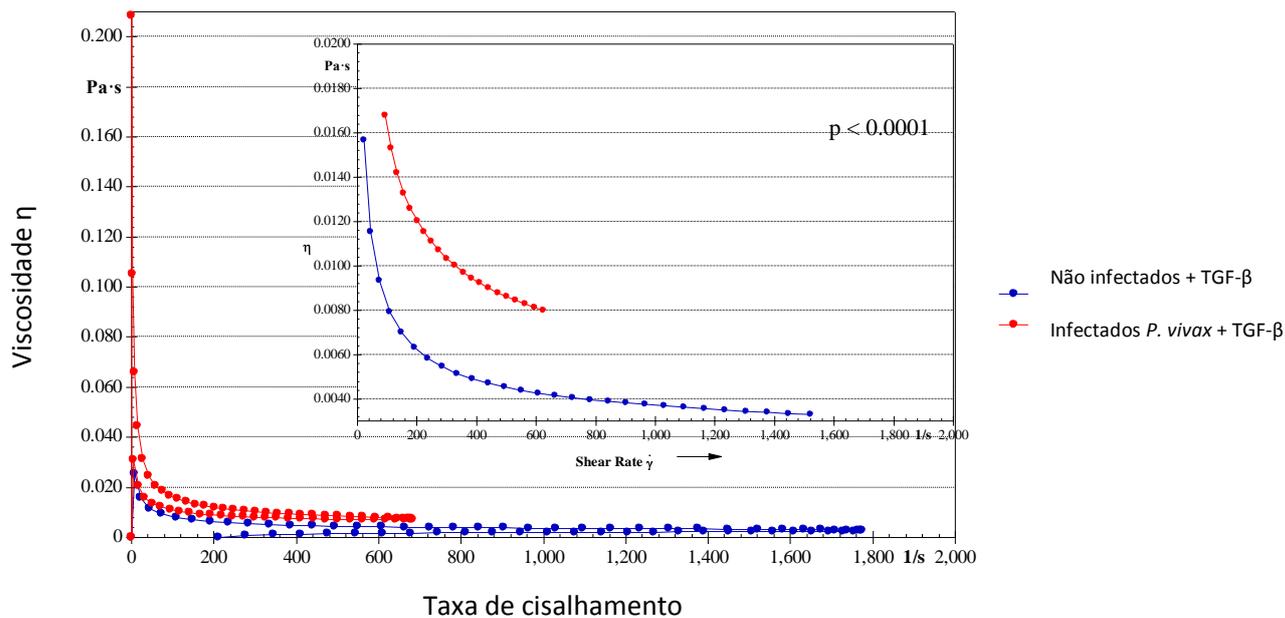


Figura 13 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de TGF- β . Os dados representam a média obtida do sangue de 10 indivíduos controle e 10 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 14 demonstra a correlação dos índices de viscosidade na presença da citocina TGF- β em relação aos os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P.vivax*. Observou-se que não houve diferença significativa na correlação dos índices de viscosidade com os níveis de parasitemia.

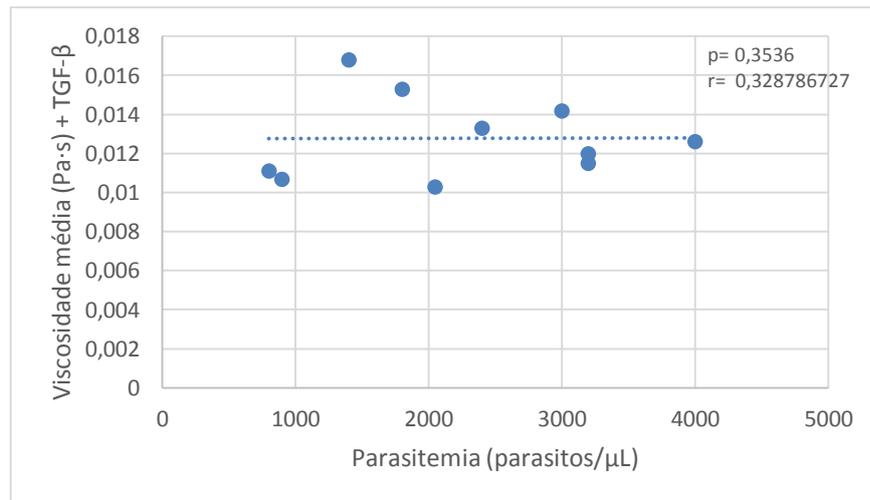


Figura 14 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina TGF- β e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*.

O comportamento das curvas de viscosidade e as taxas de cisalhamento do sangue de indivíduos infectados e por *P. vivax* na presença de IFN- γ estão apresentados na Figura 15. Observou-se aumento na viscosidade do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* ($p < 0,05$).

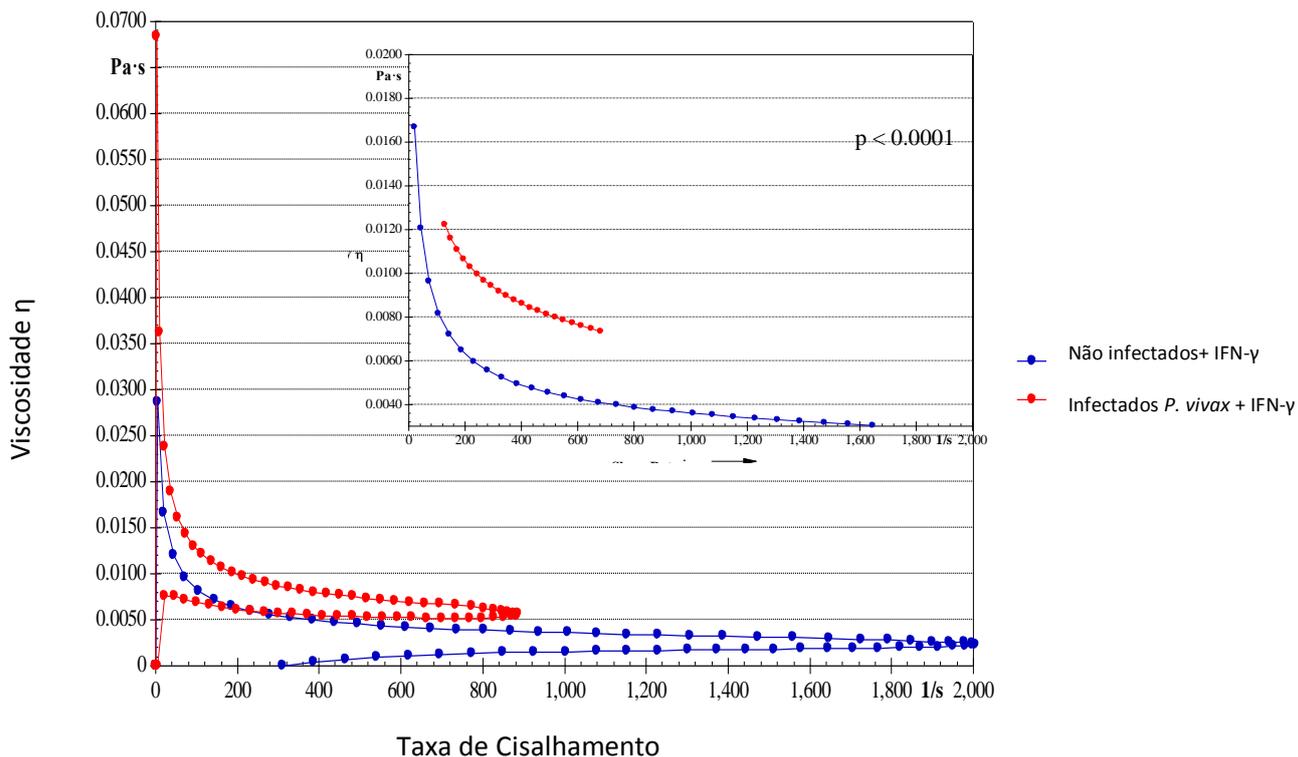


Figura 15 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IFN- γ . Os dados representam a média obtida do sangue de 10 indivíduos controle e 10 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 16 demonstra a correlação dos índices de viscosidade na presença da citocina IFN- γ em relação aos os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observou-se que não houve diferença significativa na correlação dos índices de viscosidade com os níveis de parasitemia.

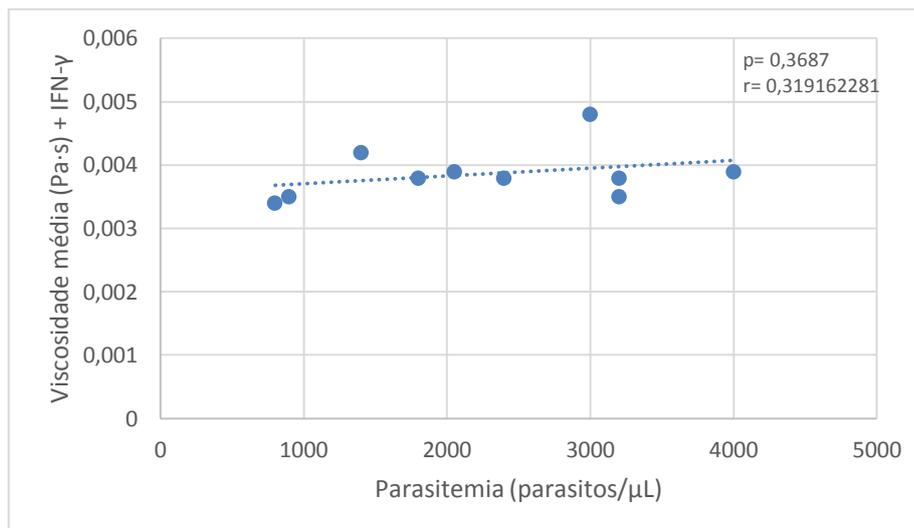


Figura 16 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IFN- γ e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*.

Na figura 17 estão apresentadas as curvas de viscosidade em relação às taxas de cisalhamento do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* na presença da citocina IL-17. Observou-se que a viscosidade, na presença de IL-17, do sangue dos indivíduos infectados por *P. vivax* foi similar a viscosidade encontrada em sangue de não infectados.

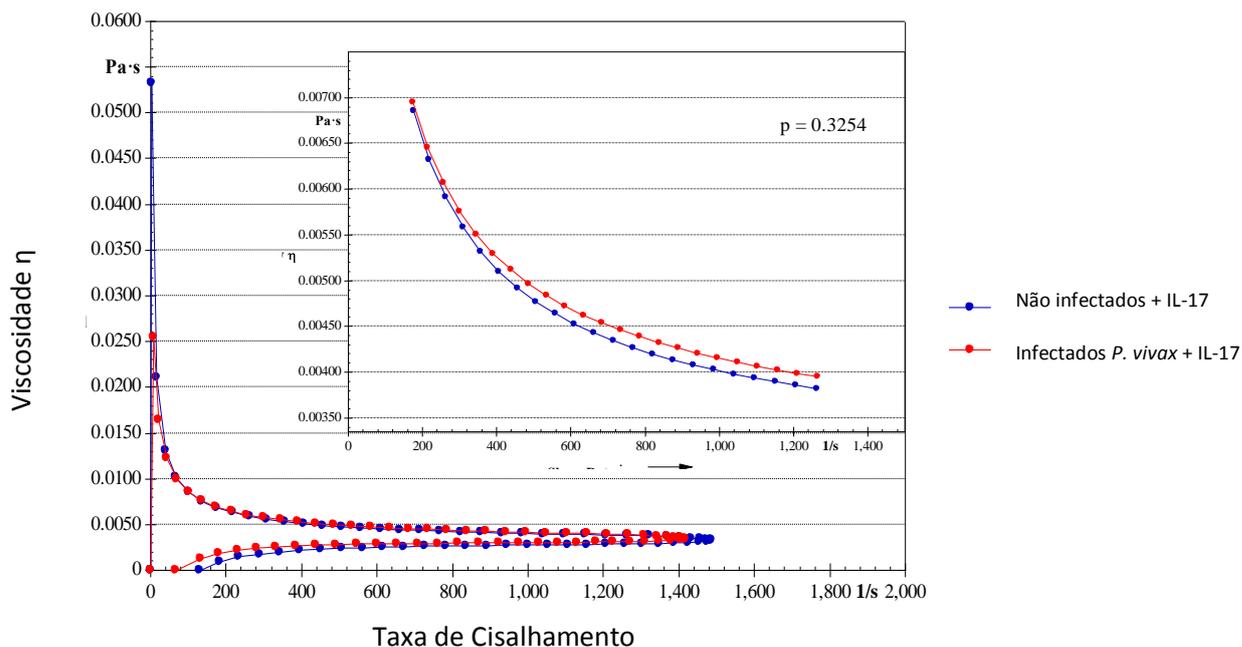


Figura 17 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IL-17. Os dados representam a média obtida do sangue de 10 indivíduos controle e 10 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 18 demonstra a correlação dos índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 em relação aos os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observou-se que não houve diferença significativa na correlação dos índices de viscosidade com os níveis de parasitemia.

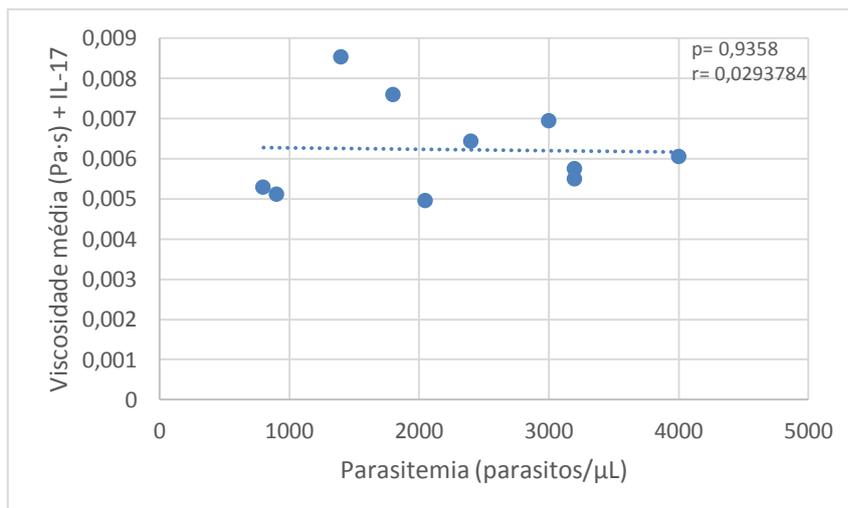


Figura 18 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*.

Na figura 19 estão representadas as curva de viscosidade em relação às taxas de cisalhamento do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* na presença de IFN- γ e TGF- β . Observa-se que a associação de IFN- γ e TGF- β aumentou a viscosidade no sangue ($p < 0,05$) de indivíduos infectados por *P. vivax* quando comparados à viscosidade do sangue de indivíduos controle.

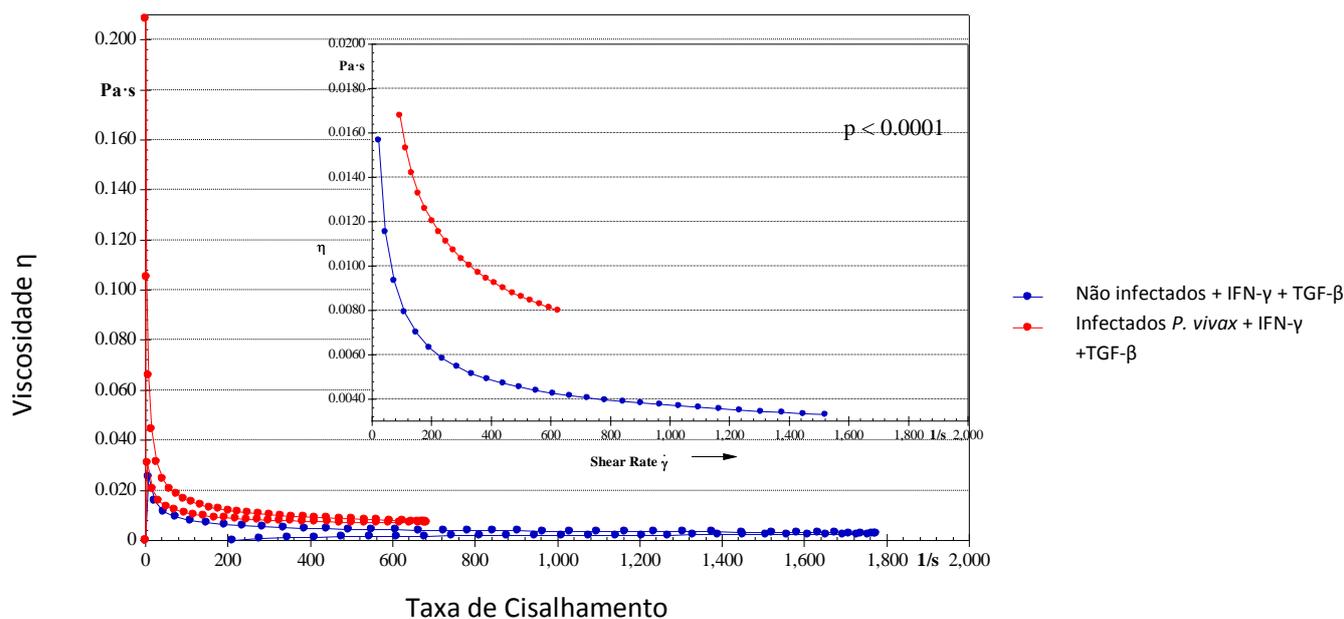


Figura 19 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IFN- γ e TGF- β . Os dados representam a média obtida do sangue de 10 indivíduos controle e 10 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 20 demonstra a correlação dos índices de viscosidade na presença da citocina IFN- γ e TGF- β em relação aos os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observou-se que não houve diferença significativa na correlação dos índices de viscosidade com os níveis de parasitemia.

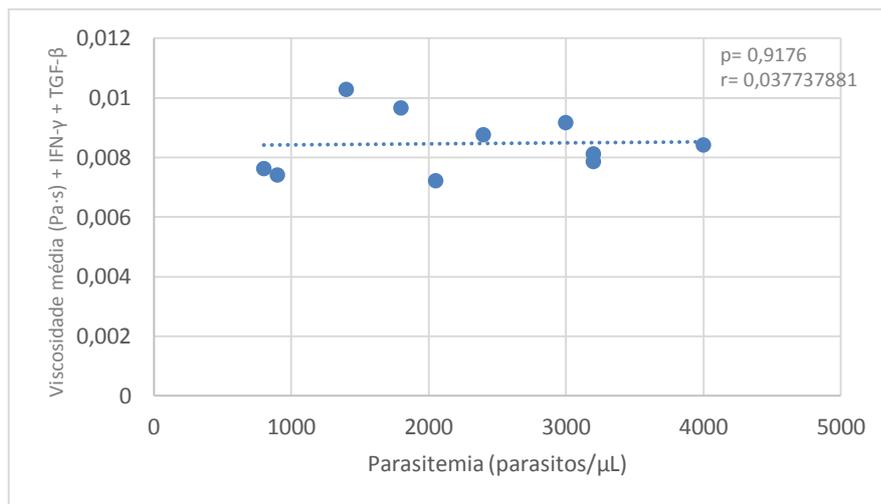


Figura 20 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IFN- γ e TGF- β e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*.

Na figura 21 estão representadas os resultados da curva de viscosidade em relação às taxas de cisalhamento do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* na presença de IL-17 e TGF- β . Observa-se que a associação destas citocinas aumentou a viscosidade do sangue de indivíduos infectados com *P. vivax* ($p < 0.05$) em relação ao sangue de indivíduos não infectados.

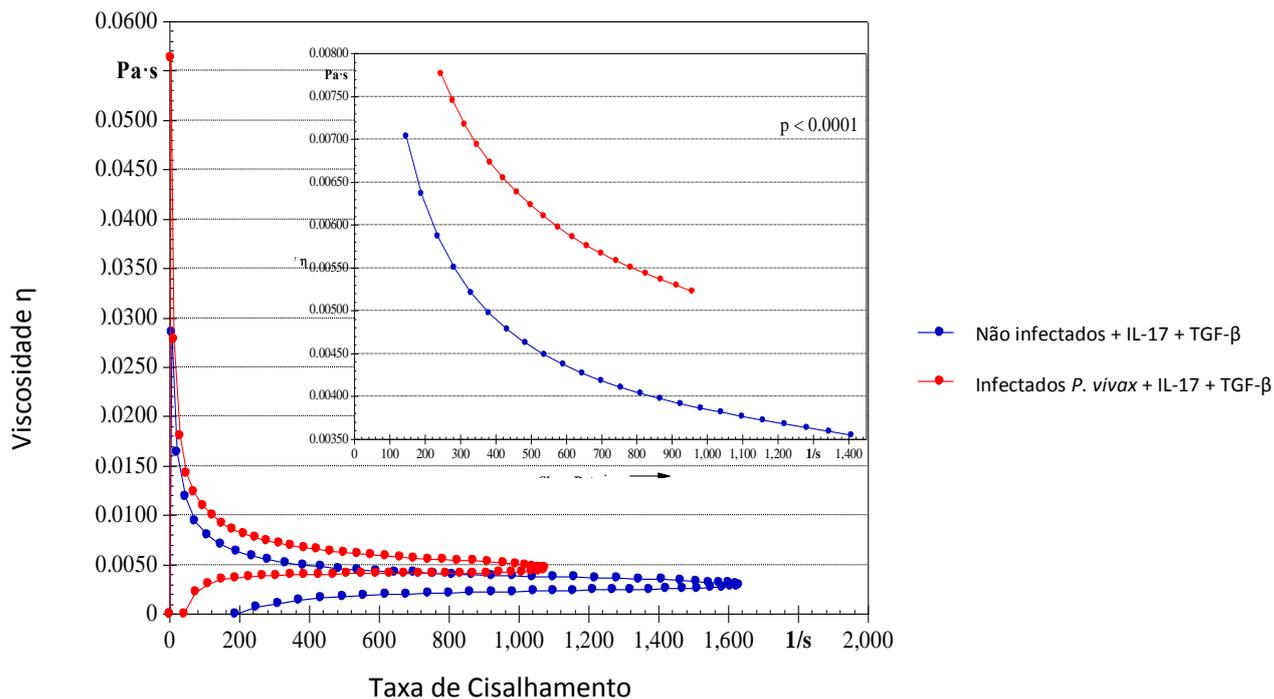


Figura 21 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IL-17 e TGF- β . Os dados representam a média obtida do sangue de 10 indivíduos controle e 10 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 22 demonstra a correlação dos índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 e TGF- β em relação aos os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observou-se que não houve diferença significativa na correlação dos índices de viscosidade com os níveis de parasitemia.

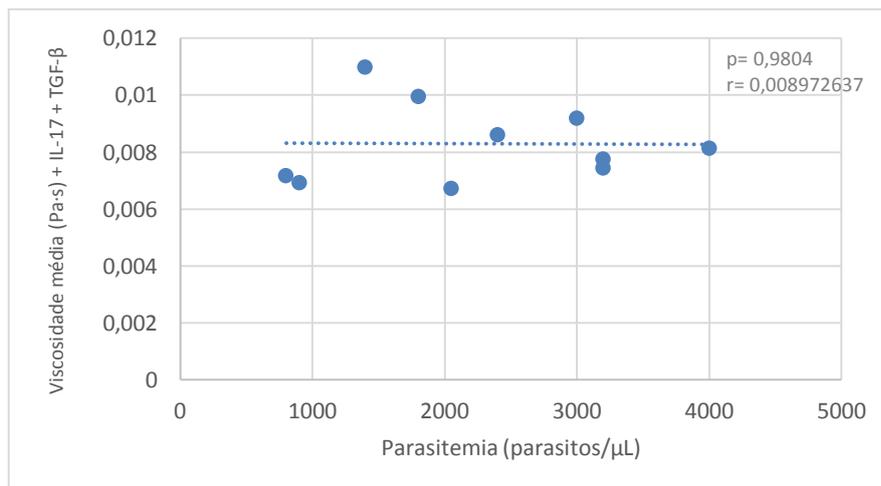


Figura 22 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 e TGF- β e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*.

As curvas de viscosidade em relação às taxas de cisalhamento do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax* na presença de IL-17 e IFN- γ estão apresentados na figura 23. Observa-se que a associação de IL-17 e IFN- γ determina valores similares a viscosidade do sangue dos indivíduos infectados quando na comparação da viscosidade observada em sangue de indivíduos não infectados com *P. vivax* ($p > 0.05$).

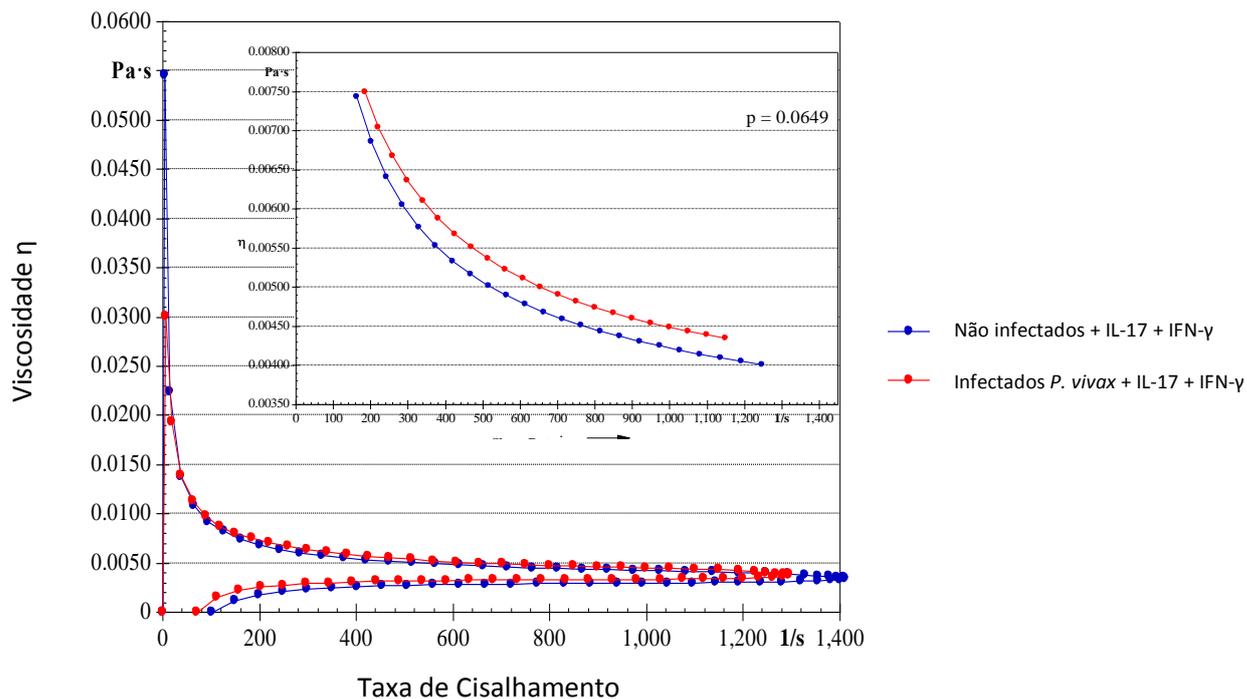


Figura 23 - Curva de viscosidade do sangue total de indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* na presença de IL-17 e IFN- γ . Os dados representam a média obtida do sangue de 10 indivíduos controle e 10 indivíduos infectados por *P. vivax*.

A figura 24 demonstra a correlação dos índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 e IFN- γ em relação aos os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*. Observou-se que não houve diferença significativa na correlação dos índices de viscosidade com os níveis de parasitemia.

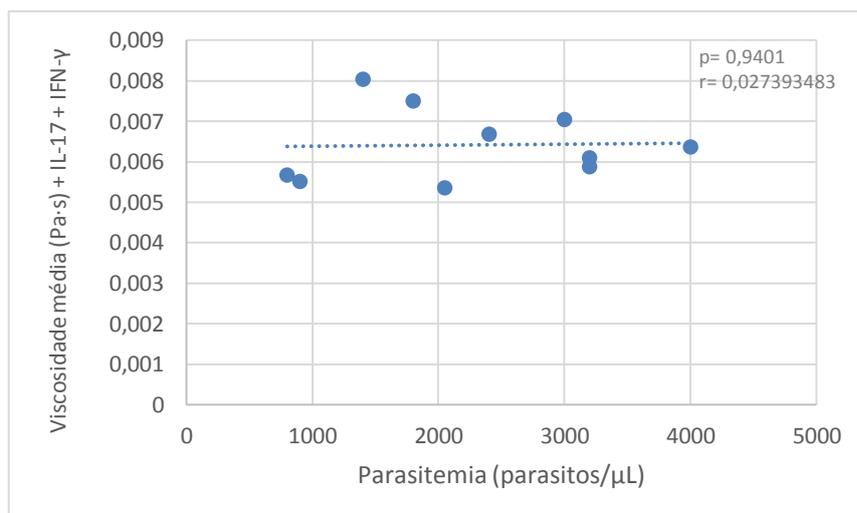


Figura 24 – Correlação entre os índices de viscosidade na presença da citocina IL-17 e IFN- γ e os níveis de parasitemia do sangue de indivíduos infectados por *P. vivax*.

6. DISCUSSÃO

Este estudo descreve os níveis de citocinas no sangue de indivíduos infectados com *P. vivax*, sendo pioneiro em avaliar os efeitos destas proteínas sobre os parâmetros reológicos.

No Brasil a transmissão da malária concentra-se na Região Amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, compreendendo 807 municípios. Este trabalho foi realizado em Cruzeiro do Sul no Acre e Porto Velho Rondônia. Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que o Brasil é responsável por 55% dos casos da doença notificados nas Américas (Braz et al, 2013). No presente estudo observou-se que a média de idade dos pacientes com malária foi de 30.5 anos. Resultados similares foram encontrados em estudos realizados na Colômbia (Buitrago et al, 2013, Herrera et al, 2014).

Em relação ao gênero ocorreu um predomínio de indivíduos do sexo masculino infectados por *P. vivax*. A malária é uma doença que apresenta maior frequência de casos em indivíduos do sexo masculino e menor em mulheres e crianças (Cotter et al, 2013). O número de casos de malária em indivíduos do sexo masculino é predominante em regiões da Amazônia Brasileira (Suárez-Mutis & Coura, 2007). Este fato parece estar associado ao maior risco de exposição dos homens em função do trabalho em matas e florestas.

Os fatores como baixo nível educacional e migrações são determinantes para a presença de malária (Carrasquilla, 2001). O nível educacional encontrado no presente estudo foi baixo em todos os indivíduos infectados. Na região da Amazônia a doença é mais prevalente em trabalhadores rurais e de baixa escolaridade (Oliveira-Ferreira et al, 2010).

Os indivíduos infectados apresentaram baixa parasitemia, não estavam hospitalizados e em tratamento para *P. vivax*, pois maioria tinham poucos dias de sintomas e quadro clínico não grave. Estudo realizado em Porto Velho-RO com 47 indivíduos infectados por *P. vivax*

também evidenciou baixa parasitemia (Rodrigues-da-Silva et al, 2014), o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho.

O *P.vivax* invade preferencialmente reticulócitos (Furuya et al, 2014), possui uma menor patogenicidade, por isso não alcança níveis elevados de parasitemia, não sofrendo sequestro nos capilares e vasos sanguíneos (Pukrittayakamee et al, 2000).

A resposta imunológica do hospedeiro na malária não é totalmente compreendida, pois a presença das imunoglobulinas no soro de indivíduos de regiões onde a malária é endêmica indica o desenvolvimento de resposta humoral para o parasito (Pradhan & Ghosh, 2013). A ligação IgA ao receptor pode gerar uma resposta imunológica eficiente (Wines et al, 2011). Os anticorpos podem se ligar aos merozoítos realizando a opsonização e aumentando a fagocitose (Osier et al, 2014).

Estudos citam que o receptor Fc α RI tem capacidade de interagir com os dois isotópos da imunoglobulina A, sendo capaz de se ligar tanto a IgA1 quanto a IgA2 (Bakema & Egmond, 2011). A resposta produzida, nessa interação, é baseada na ativação de células efetoras, sendo que os mecanismos que podem ser ativados incluem: fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e produção e liberação de citocinas e quimiocinas (Wines et al, 2011). No presente estudo, apesar da malária não alterar a expressão dos receptores Fc α RI em células de indivíduos infectados, houve aumento na concentração de IgA no soro.

Na literatura há relato que a concentração de IgA não altera em infecções causadas por *Plasmodium spp* (Leoratti et al, 2008), apesar de poder estar aumentada em outras doenças parasitárias (Zarebavani et al, 2012). Também estudos sugerem associação entre nefropatia mediada por IgA e a malária causada por *P. falciparum* (Yoo de Kim et al, 2012 & Rafieian-kopaei et al, 2013).

Estudo experimental sugere importante papel protetor da IgA na infecção por *Plasmodium yoelii* (Ben Mkaddem et al, 2013), por outro lado outros trabalhos relatam que a IgA não tem papel relevante na infecção por malária, porém atribuem esta menor capacidade protetora da IgA ao modelo experimental utilizado em camundongos (Shi et al, 2011).

Em outras patologias, como na imunodeficiência humana, houve diminuição da expressão receptores em pessoas infectadas e aumento dos níveis IgA séricos (Grossetête et al, 1995). Por outro lado, em uma pesquisa em pacientes com bacteremia provocada por bactérias gram-negativas, observou-se aumento na expressão de Fc α RI, porém não houve correlação com os níveis de IgA (Chiamolera et al, 2001).

Trabalhos envolvendo parâmetros reológicos têm sido desenvolvidos usando principalmente anticorpos da classe IgA (Nunes et al, 2015). Proteínas plasmáticas, como as imunoglobulinas, presentes em algumas patologias, são agentes potentes na alteração da superfície do eritrócito e afetam a sua agregação (Burton et al, 1977). Em várias espécies de animais, assim como humanos, os eritrócitos que são normalmente dispersos tendem a agregar na presença de determinadas imunoglobulinas (Schimid- Schobein et al, 1990).

A Imunoglobulina A é reconhecida por possuir dupla função no sistema imunológico. Ela pode ter um efeito pró-inflamatório, estimulando a fagocitose. Além disso, pode ter efeito na neutralização, como também pode desencadear um efeito anti-inflamatório por inibir a ativação celular e induzir a síntese e liberação de citocinas como IL-10. Estudos citam que para a IgA exerce grande parte de suas funções necessitando de interação com seu receptor específico, o Fc α RI/CD89 (Balu et al, 2011; Boross et al, 2013). O Fc α RI/CD89 é um receptor de membrana expresso em diferentes tipos celulares, sendo que se localiza principalmente em células da linhagem mielóide (monócitos, macrófagos, neutrófilos,

eosinófilo), mas também pode ser expresso em células dendríticas e plaquetas (Qian et al, 2008).

A literatura tem reportado a importância de outros anticorpos na malária, como as imunoglobulinas do tipo G. Esta é uma glicoproteína multifuncional encontrada no sangue e outros fluídos dos organismos capazes de conferir proteção para malária devido sua capacidade de ligação e neutralização do parasito (Pleass & Holder, 2005). No presente estudo, evidenciou-se aumento na concentração de IgG em soro de indivíduos infectados com *P. Vivax* em relação aos indivíduos não infectados. No entanto, os mecanismos pelos quais a IgG confere proteção ainda não estão totalmente elucidados, pois pode depender de muitos fatores, incluindo variação antigênica, diferentes níveis de endemicidade da malária (Pitabut et al, 2007).

Estudos soroepidemiológicos em áreas hiperendêmicas da África têm mostrado que subclasses de IgG (IgG1 e IgG3) estão associadas à proteção por *P. falciparum* (Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que os anticorpos podem mediar efeito antiparasitário por estarem ligados a receptores Fc γ R na superfície dos monócitos, neste estudo não houve alteração na concentração de IgG em soro dos pacientes avaliados (Bouharoun-Tayoun et al, 1995). Em relação aos receptores Fc γ R observou-se diminuição na expressão do receptor CD32 e aumento de CD16 em indivíduos infectados por *P. vivax*. Estes dados sugerem que a alteração nos receptores para IgG não influencia os níveis de IgG presentes no soro destes pacientes. O CD16 (Fc γ RIII) é encontrado em macrófagos, monócitos, células NK e neutrófilos, sendo receptor de baixa afinidade, apresentando as isoformas Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb. Este receptor pode ocorrer também na síntese e secreção de citocinas, como IFN- γ pela célula Natural Killer (NK) (Zhou & Brown, 1994).

Em relação aos receptores Fc γ RII (CD32) humanos são expressos em vários tipos celulares, entre estes os monócitos, são capazes de ligar-se com alta afinidade à IgG (Jefferis & Lund, 2002, Martinez, 2009). Os receptores Fc γ RII (CD32) humanos são expressos em vários tipos celulares, entre estes os monócitos, são capazes de ligar-se com alta afinidade as subclasses de IgG1 e IgG2 (Jefferis & Lund, 2002). O receptor Fc γ RIII (CD16) é um receptor de menor afinidade para IgG, sendo atribuído como um dos responsáveis pela eliminação de complexos imunológicos (Martinez, 2009). Além disso, estudos relatam que a citotoxicidade mediada por anticorpo (ADCC) pelas células NK ocorre mediante a ligação da porção Fc do anticorpo específicos ao receptor de membrana Fc γ RIII (CD16), estudos mostram que essa ativação de células NK parece ser mais eficaz quando está na presença de anticorpos (Mavoungou et al, 2003).

A resposta inflamatória na malária resulta em modificações de eritrócitos e pode ocasionar mudanças no fluxo sanguíneo (Cromer et al, 2013; Mohandas & An, 2012). Neste estudo verificou-se alterações da viscosidade sanguínea em infecções por *P. vivax* e demonstrou que há diferença na viscosidade mesmo nos estágios iniciais da doença.

O fluxo macro e microvascular é determinado pela viscosidade do sangue total, esta por sua vez, é influenciada principalmente por processos inflamatórios, além da temperatura (Pop et al, 2013). O aumento da viscosidade está diretamente associado ao aumento da resistência ao fluxo sanguíneo e a tensão das taxas de cisalhamento na parede vascular (Yeom et al, 2014). Na malária grave, as hemácias infectadas e as não infectadas tornam-se rígidas, promovendo um impedimento do fluxo sanguíneo (Dondorp et al, 2008).

No presente estudo, foram realizadas as análises dos indivíduos infectados ou não infectados por *P. vivax* em relação às variações de suas taxas de viscosidade no sangue. Os

resultados entre os indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* não apresentaram diferenças em termos de fluxo sanguíneo. Observou-se também que o comportamento reológico do fluxo sanguíneo não apresentou características de líquidos ideais, porque em vez de assumir uma linha reta, apresenta uma curva de fluxo em forma de parábola a partir da origem. O comportamento ascendente e não-linear a partir da origem caracteriza-se como um fluido não-newtoniano (Rosencranz & Bogen, 2006; Verdier et al, 2009).

As variações do fluxo ascendente e descendente no comportamento reológico de um fluido, evidenciando uma curva superior sobreposta sobre a parte inferior, apresentando uma área de histerese, entre eles, definem a propriedade tixotrópica (Pipe & Mckinley, 2009). As curvas não-sobrepostas ascendentes e descendentes, com a presença de uma área de histerese, também foram observadas no presente estudo o que demonstra que há variações dos níveis de fluxo sanguíneo nos indivíduos infectados pelo *P. vivax*.

A recuperação conformacional do tecido sanguíneo, durante o fluxo de sangue na microcirculação, depende da sua integridade estrutural e funcional, além da temperatura corpórea sanguínea (Verdier et al, 2009). Essas alterações reológicas no tecido sanguíneo podem ser explicadas devido à presença de eritrócitos infectados que provocam alterações nas deformidades das células desempenhando um papel importante na patogenia da malária (Bow et al, 2011). Estas células corpusculares ficam suspensas na forma fluída e mudam ao longo do sistema da micro e da macrocirculação, porque existe entre elas uma variação nas suas taxas de cisalhamento em diferentes regiões do sistema circulatório (Piagnerelli et al, 2003).

O endotélio desempenha um importante papel em infecções causadas por *Plasmodium spp.* Eritrócitos parasitados por malária aderem ao endotélio através de diversos receptores endoteliais para escaparem da remoção pelo baço (Fedosov et al, 2011). A ativação do

endotélio é um recurso inicial na malária, sendo susceptível no favorecimento da captação dos eritrócitos parasitados. Uma ativação excessiva pode contribuir para a perda da função da barreira do endotélio e dos órgãos (Miller et al, 2002). A adesão celular na malária depende fortemente das condições do microfluxo sanguíneo no local da parede celular, devido as diferentes taxas de tensão de cisalhamento (Antia et al, 2007).

A adesão de eritrócitos infectados é considerada a principal causa de complicações hemorrágicas, devido ao bloqueio de pequenos vasos (Adams et al, 2002). O sequestro de eritrócitos parasitados dentro do vaso sanguíneo, também contribui para complicações hemorrágicas na malária (Kim et al, 2014).

Estudos realizados com o *P. falciparum* afirmam que apenas eritrócitos infectados na fase de anel intra-eritrocitário são encontrados na circulação, logo após são removidas pelo baço ou aderem ao endotélio vascular. O aumento da deformabilidade dos eritrócitos infectados nessa fase e sua capacidade de passar através do baço dificultam a sobrevivência do parasito no hospedeiro infectado (Bow et al, 2011).

Na malária grave, causada por *P. Falciparum*, as hemácias infectadas e as não-infectadas tornam-se rígidas, o que promove um impedimento adicional ao fluxo sanguíneo (Dondorp et al, 2008). Os eritrócitos infectados na superfície dos antígenos apresentaram efeito sobre as propriedades dinâmicas e biofísicas durante o desenvolvimento do anel intra-eritrocitário no *P. falciparum* (Diez-Silva et al, 2012).

Neste estudo também foi avaliada a influência da temperatura sobre a variação da viscosidade dinâmica do tecido sanguíneo e observou-se que o sangue de indivíduos infectados com *P. vivax* teve um aumento na viscosidade ao longo de uma ampla variação de temperatura. Observou-se também que, independente da temperatura, os indivíduos infectados

P. vivax apresentaram o mesmo comportamento reológico descendente das taxas de viscosidade ao longo de diferentes temperaturas. A temperatura do corpo pode ter um impacto significativo sobre as alterações na deformabilidade dos eritrócitos e associada a outros fatores podem causar alterações na sua viscosidade (Piagnerelli et al, 2003).

O aumento da viscosidade do sangue nos indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax* demonstrou ser proporcional em função da temperatura permitindo a análise de viscosidade a 37°C. A ampliação da curva de viscosidade a 37°C confirmou que a viscosidade do sangue total de indivíduos infectados por *P. vivax* é maior que a do sangue de não infectados.

De acordo com a literatura, a não deformação e integridade estrutural das células é importante durante o fluxo sanguíneo em relação às taxas de viscosidade. A deformação das células sanguíneas é um fenômeno complexo, o qual depende de inúmeras características celulares, incluindo propriedades da membrana celular (Mohandas & Chasis, 1993).

O mecanismo da invasão dos eritrócitos pelas formas merozoítas na malária foi estudado por diversos grupos de pesquisa e todos relatam que esse mecanismo apresenta diversas etapas na modificação e deformação da membrana do eritrócito e leva a célula a um processo de invaginação o que altera sua conformação celular (Saraiva et al, 2011).

Estudos realizados com outras patologias, como anemia falciforme, também provocam mudanças estruturais na forma e tamanho dos eritrócitos, combinado com o aumento da viscosidade (Higgins et al, 2007). Em indivíduos com diabetes foi observado aumento de viscosidade (França et al, 2014). É possível que fatores hemodinâmicos que podem ocorrer nas infecções por *P. vivax* possam estar associados às alterações nos parâmetros reológicos da viscosidade.

Adicionalmente, o uso de agentes imunomoduladores tem sido relatado na recuperação da estrutura e função celulares (França et al, 2014; Scherer et al, 2011; Fagundes et al, 2012), também no aumento na viscosidade sanguínea (França et al, 2014), pode melhorar as características de fluxo.

Neste trabalho verifica-se que a modulação por IFN- γ modifica o fluxo sanguíneo. Diferentes fatores podem ocasionar aumento na viscosidade do sangue em diversas patologias (Connes et al, 2014; Fedosov et al, 2014; Franco et al, 2013; Berra et al, 2005), inclusive na malária provocada por *P. falciparum* (Fedosov et al, 2014; Fedosov et al, 2011a; Fedosov et al, 2011b; Imai et al, 2010).

Infecções por *P. vivax* foram negligenciadas por muitos anos, pelo fato de ser considerada uma doença benigna. A maior parte dos estudos com malária teve enfoque nas infecções por *P. falciparum* por estas provocar um maior número de casos de mortalidade no mundo (Gething et al, 2012; Carlton et al, 2011; Mueller et al, 2009; Lacerda et al, 2007; Mendis et al, 2001). Os poucos estudos hemorreológicos encontrados na literatura são relacionados às infecções com *P. falciparum* (Fedosov et al, 2014; Fedosov et al, 2011a; Fedosov et al, 2011b; Imai et al, 2010) que demonstram o enrijecimento da membrana dos eritrócitos infectados (Fedosov et al, 2011a; Fedosov et al, 2011b), aumento da parasitemia (Fedosov et al, 2011b), diferentes fases da maturação do parasito (Imai et al, 2010). Todos estes fatores podem estar envolvidos no aumento da viscosidade e na resistência ao escoamento do sangue (Fedosov et al, 2014).

Na malária ocorre aumento de citocinas como INF- γ , TNF- α e IL-2 (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002; Pradhan e Ghosh, 2013), e ocorre maior liberação de mediadores pró-inflamatórios nas infecções por *P. vivax* do que em *P. falciparum* (Hemmer et al, 2006;

Yeo et al, 2010). Parece que ocorre interação da parasitemia com a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Jide et al, 2009).

Alguns estudos têm verificado a importância do padrão de citocinas e de suas interações na resposta imune na malária por *P. vivax*. O aumento da parasitemia, bem como a resposta imunológica durante o percurso da doença são fatores que determinam sua gravidade (Zeyrek et al, 2006; Sortica et al, 2012). O *P. vivax* induz uma maior produção de citocinas em relação a *P. falciparum* (Anstey et al, 2009). Os padrões inflamatórios são raros e poucos estudos avaliaram as diversas citocinas existentes usando a mesma metodologia e o mesmo grupo de pacientes infectados por malária (Rodrigues-da-Silva et al, 2014).

No presente estudo não houve alteração na concentração de IL-2 entre os indivíduos infectados e não infectados por *P. vivax*. A IL-2 tem sido evidenciada como uma citocina importante nas respostas imunológicas causadas por *Plasmodium spp*, porque induz a ativação de células NK, produzindo a IFN- γ (Horowitz et al, 2012).

Os indivíduos infectados por *P. falciparum* apresentaram uma maior concentração de IL-4, sugerindo-se a hipótese de que esta citocina pode contribuir para o agravamento da doença (Cabantous et al, 2009). Também ocorre correlação entre os níveis séricos de INF- γ e IL-4 e a gravidade da doença causada por *P. falciparum*. O INF- γ foi elevado durante os estágios iniciais da doença, enquanto a IL-4 as fases tardias e intermediárias na malária (Tangteerawatana et al, 2007).

No presente estudo não houve alteração de IL-4 entre os indivíduos infectados e por *P. vivax* na fase inicial da doença. Na literatura a concentração de IL-4 é controversa. Alguns estudos citam baixas concentrações de IL-4 (Medina et al, 2011), outros autores relatam que

os valores são similares (Rodrigues da Silva et al, 2014) enquanto outros mostram que a concentração de IL-4 pode ser dependente dos níveis de parasitemia (Sarangi et al, 2014).

Os níveis da citocina IL-6 em pacientes com malária complicada apresentam-se elevados, sendo este aumento associado aos efeitos protetores devido à indução da produção de IL-1 β e TNF- α (Perkins et al, 2011). Estudos, tem sugerido que essa citocina esteja relacionada a regulação de uma resposta imune a malária (Costa et al, 2014). No presente estudo a IL-6 não apresentou alteração sérica em indivíduos infectados com *P. vivax*.

A IL-10 é uma citocina que apresenta um importante papel na imunidade para os plasmódios na malária. No presente estudo, não houve diferença desta citocina entre os indivíduos infectados.

Os níveis de IL-10 foram observados menores em pacientes com presença de formas mais complicadas da doença (Day et al, 1999). O efeito protetor da IL-10 é sugerido como sendo devido à sua atividade anti-inflamatória desempenhada pela citocina (Golenser et al, 2006), porém outros estudos sugerem que os níveis elevados de IL-10 durante a malária podem ser prejudiciais (Huang et al, 2014). Além disso, vários estudos com foco na IL-10 mostraram que esta citocina desempenha um papel importante no controle da resposta antiparasitária e no dano tecidual causado por esta resposta, mostrando ser importante na regulação da resposta imune (Freitas do Rosário & Langhorne, 2012). Além disso, estudos de Costa et al (2014) evidenciaram que a interação entre as citocinas IL-6 e IL-10 se correlacionam a carga parasitária.

Outra citocina que apresenta um papel controverso é a TNF- α . Alguns estudos afirmam que essa citocina pode apresentar um papel relevante por reduzir a parasitemia na

malária e contribuir com a fagocitose de diversos eritrócitos infectados pelos macrófagos via receptores Fc.

Por outro lado, segue-se associação entre níveis elevados de TNF- α e complicações na malária. Estes dados foram reforçados pelo fato que nos indivíduos com malária não complicada, onde os níveis de TNF- α não apresentam diferenças, enquanto que em casos de malária grave ocorrem diferenças entre os níveis de TNF- α (Raza et al, 2013). No presente estudo observou-se que não houve alteração de TNF- α em indivíduos infectados com *P. vivax*.

O INF- γ é uma citocina pro-inflamatória envolvida na imunidade e patogenezidade na malária. No presente estudo, os níveis desta citocina apresentaram um aumento na concentração entre os indivíduos infectados. Esta citocina parece desempenhar efeitos protetores durante a infecção na malária, pois pode diminuir a parasitemia (Mccall e Sauerwein, 2010). Os efeitos patológicos da INF- γ em indivíduos com malária, em especial a cerebral, parecem estar associados à produção de quimiocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão em células epiteliais (Khaw et al, 2013).

Na malária, o IFN- γ tem ação antiparasitária direta e, pode atuar em sinergismo com o TNF- α . A ação do IFN- γ , assim como de outras citocinas pro-inflamatórias, deve ser controlada e capaz de eliminar a infecção sem causar danos para o hospedeiro (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002). Neste trabalho, apesar dos indivíduos infectados com *P. vivax* estarem na fase aguda da doença, altos níveis séricos de IFN- γ foram evidenciados.

Outra citocina que parece desempenhar importante função em doenças infecciosas é a IL-17. Esta citocina pertence a uma família de proteínas que contem seis membros, cujo mais importante é a IL-17a (Farahani et al, 2014). Esta citocina pro-inflamatória desempenha um

importante papel na defesa do hospedeiro para fungos e bactérias extracelulares (Bedoya et al, 2013). Estudos citam também que ela pode estar associada à patogênese em diversas doenças inflamatórias (Wu et al, 2013).

Na malária foi evidenciado aumento de células Th17 produtoras de IL-17 (Bueno et al, 2012). Na presente pesquisa, a concentração de IL17 aumentou em indivíduos infectados com *P. vivax*. Esses resultados indicam o papel promissor que esta citocina apresenta nas infecções por *P. vivax*.

Estudos mostram que a IL-17 é produzida juntamente com o IFN- γ , promovendo infiltrado de célula T com indução de resposta pró-inflamatória (Eid et al, 2009). No presente estudo também evidenciou-se um aumento da INF- γ , sugerindo também o papel promissor desta citocina associada a IL-17.

Observando-se os efeitos aumentados de IL-17 e IFN- γ , diminuídos TGF- β e não alterados de IL-4 em pacientes infectados por *P. vivax*, foram verificados os efeitos imunomoduladores destas citocinas sobre a viscosidade.

O comportamento reológico em sangue de pacientes infectados por *P. vivax* na presença de IL-4 aumentou em relação aos dos indivíduos não infectados. A IL-4 tem sido apontada como um importante mediador anti-inflamatório capaz de atuar em respostas pró-inflamatórias induzidas inicialmente em infecções por *P. vivax*. Assim, a inflamação pode ser controlada evitando o aparecimento de sintomas mais graves (Mendonça et al, 2013).

Na análise de taxas de viscosidade e do perfil do fluxo sanguíneo na presença da INF- γ foi observado aumento da viscosidade do sangue de indivíduos portadores de *P. vivax*, além de uma grande alteração no comportamento do fluido sanguíneo. Os níveis reológicos aumentados podem estar associados a quadros graves por malária (Andrade et al, 2010;

Wroczynska et al, 2005). No presente estudo observou-se uma elevação da viscosidade sanguínea e uma diminuição do escoamento do sangue total, podendo esta citocina estar de fato envolvida com os quadros clínicos graves por *P. vivax*.

Em relação à TGF- β houve um aumento na viscosidade dos indivíduos infectados com *P. vivax*. A citocina TGF- β é constituída por uma superfamília de citocinas com mais de 40 membros. Esta citocina apresenta um caráter pleiotrópico, podendo ter um efeito anti e pró-inflamatório, o qual depende do ambiente e da sua concentração (Andrade et al, 2010). Além disso, têm como papel regular diferentes funções celulares, como a proliferação, apoptose, diferenciação e migração (Bergamaschini et al, 2007). O TGF- β está envolvido em várias patologias humanas.

Na malária as plaquetas ativadas liberam TGF- β que podem estimular a apoptose no endotélio, provocando graves complicações (Wassmer et al, 2006). Estudos mostraram que o polimorfismo genético dessa citocina pode contribuir para um aumento do risco de desenvolvimento da malária cerebral provocado por *P. falciparum* em crianças de países como Angola (Sambo et al, 2010). Com outros parasitos como a *Leishmania spp* essa citocina desenvolve um papel regulatório aumentando a replicação e virulência parasitária em macrófagos, permitindo sobrevida no hospedeiro (Barral et al, 1993).

Estudos citam que indivíduos com malária grave apresentaram produção de IFN- γ , pelas células NK, maior do que em indivíduos com malária não grave e em indivíduos não infectados (Agudelo et al, 2012). Por outro lado, estudos de Mendonça et al (2013) em pacientes com malária grave por *P. vivax*, sugeriram que o nível da parasitemia tinha diversas interações positivas com mediadores inflamatórios, tais como, TNF- α , IFN- γ e IL-10. Em

nosso estudo nenhum dos indivíduos infectados por *P. vivax* tinha níveis altos de parasitemia e não apresentavam quadro clínico grave por malária.

A modulação de uma resposta imune efetiva a essa infecção na malária indica que as células dendríticas irão produzir IL-12 que direciona para um perfil de resposta imune Th1, culminando nas secreções de IL-2 e IFN- γ , que promovem a proliferação e a ativação de linfócitos T citotóxicos que migrarão para os locais infeccionados (Belnoue et al, 2008). Outros estudos também demonstraram o aumento de IFN- γ em infecções por *P. vivax* com maior elevação em indivíduos em primo-infecção e elevação proporcional ao aumento da parasitemia e gravidade da doença (Medina et al, 2011; Andrade et al, 2010). Outro trabalho verificou que IFN- γ está aumentado na fase aguda da doença em infecções por *P. vivax* e infecções por *P. falciparum* e que os níveis plasmáticos encontraram-se mais elevados na fase de convalescença da doença em ambas as espécies (Rodrigues-da-Silva et al, 2014).

Outros estudos citam que as citocinas TGF- β e IL-10 inibem efeitos patológicos que podem ser manifestados pela exacerbação das respostas pró-inflamatórias, como acontece na malária cerebral e em casos de anemia grave (Omer et al, 2003; Yazdani et al, 2006). Além disso, a produção de IL-10 e TGF- β , por células T-reguladoras possui papel relevante no desenvolvimento e controle da parasitemia (Bueno et al, 2010). Estudos citam que a alta produção de citocinas regulatórias também pode ser prejudicial na eliminação do parasito (Andrade et al, 2010). Estudos na infecção aguda experimental pelo *T. cruzi* demonstraram que a inibição de células regulatórias resulta no aumento da miocardite e da mortalidade, além de acarretar uma diminuição nos níveis de IL-10 e TGF- β alguns dias após a infecção (Mariano et al, 2008).

Em relação à associação reológica de TGF- β e IFN- γ observou-se uma diminuição da viscosidade no sangue dos indivíduos infectados por *P. vivax*, quando comparados à viscosidade das citocinas isoladas, porém com valores ainda superiores à viscosidade apresentada no sangue de indivíduos não infectados.

Por outro lado, a associação TGF- β e IL-17, bem como a IL-17 com a IFN- γ resultaram em aumento na viscosidade, o que sugere o efeito imunomodulador isolado da IL-17. O aumento da viscosidade pode ocasionar diversas alterações celulares e imunológicas nesses indivíduos, o que dificulta a melhora do quadro clínico dos indivíduos infectados com *P. vivax*.

A IL-17 pode ser promissora como agente imunomodulador. Em termos reológicos a IL-17 teve um papel relevante na restauração das taxas de viscosidade, restaurando a valores similares aos de indivíduos não infectados. Com isso, novos estudos são necessários na busca de procedimentos clínicos mais promissores podendo ser desenvolvidos no futuro, para o tratamento das infecções por *P. vivax*.

7- CONCLUSÕES

Houve um aumento da concentração de IgA e IgG no soro de indivíduos infectados por *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados.

Em relação à expressão do receptor CD16 ocorreu um aumento e houve uma diminuição da expressão do receptor CD32 em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados.

Não houve alteração na expressão do receptor Fc α RI (CD89) em eritrócitos de indivíduos infectados por *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados, demonstrando que o aumento da concentração de IgA no soro não foi proporcional ao aumento da expressão em eritrócitos, caracterizando que há muita IgA e pouca ligação a este receptor.

A temperatura não influenciou o comportamento reológico do sangue de indivíduos infectados com *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados, evidenciando que a temperatura não é um fator muito importante no comportamento reológico de indivíduos infectados com *P. vivax*.

A análise da viscosidade sanguínea pode ser relevante para auxiliar no diagnóstico e tratamento de indivíduos infectados por *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados. Sendo que as alterações reológicas que ocorreram nestes indivíduos infectados poderão ser úteis para aplicações clínicas.

Não houve correlação entre os índices de viscosidade com as concentrações das citocinas imunomoduladoras IL-4, TGF- β , IFN- γ e IL-17. No entanto, a viscosidade apresentou uma tendência de aumento sem o acréscimo de citocinas em relação ao aumento da parasitemia ($p=0,0638$).

Houve redução da concentração de TGF- β e um aumento dos níveis de IFN- γ e IL-17 em soros de indivíduos infectados com *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados, verificando que estas citocinas apresentam um papel importante na infecção por *P. vivax*.

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α não alteraram a concentração no soro de indivíduos infectados com o *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados.

Ocorreu uma alteração do fluxo sanguíneo ocasionada pela presença das citocinas IFN- γ , TGF- β e IL-4 aumentando a viscosidade em indivíduos infectados com *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados.

A associação das citocinas TGF- β e IL-17, bem como a associação das citocinas IL-17 com a IFN- γ , também resultaram em aumento da viscosidade em indivíduos infectados com *P. vivax* em relação aos indivíduos não infectados.

Dentre as citocinas avaliadas a IL-17 apresentou-se como um importante imunomodulador com capacidade promissora de restaurar os parâmetros reológicos de indivíduos infectados por *P. vivax*, favorecendo a melhora do quadro clínico, sugerindo o seu uso como um futuro imunomodulador exógeno para aplicações clínicas e farmacológicas no tratamento da malária.

8. REFERÊNCIAS

- Adams S, Brown H, Turner G. 2002. Breaking down the blood brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends Parasitol.* 18: 360-366.
- Agudelo O, Bueno J, Villa A, Maestre A. 2012. High IFN- γ and TNF production by peripheral NK cells of Colombian patients with different clinical presentation of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 11(38): 2-7.
- Aguiar ACC, Pereira DB, Amaral NS, Marco L, Krettli AU. 2014. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* ex vivo susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia West Amazon, Brazil,” *Malar J.* 13(73): 2-7.
- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, Alecrim MGC. 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 16(10):1611-1614.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 12: 220-224.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarencio J, Camargo LMA, Barral A, Barral-Neto M. 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J.* 9: 13.
- Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. 2009. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol.* 25(5): 220-227.
- Antia M, Herricks T, Rathod PK. 2007. Microfluidic modeling of cell-cell interactions in malaria pathogenesis. *PLoS Pathogens.* 3:e99. 0939-0948.
- Antia M, Herricks T, Rathod PK. 2008. Microfluidic approaches to malaria pathogenesis. *Cell Microbiol.* 10(10): 1-11.
- Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. 2002. Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- γ from Human NK Cells by Live *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *J Immunol.* 169: 2956-2963.
- Bakema JE, Van Egmond M. 2011. The human immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 4(6): 612-624.
- Balu S, Reljic R, Lewis MJ, Pleass RJ, McIntosh R, Van Kooten C, Van Egmond M, Challacombe S, Woolf JM, Ivanyi J. 2011. A Novel Human IgA Monoclonal Antibody Protects against Tuberculosis. *J. Immunol.* 186:3113-3119.
- Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. 1992. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science.* 257: 545-548.

- Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed CG. 1993. Transforming growth factor- β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci*. 90: 3442.
- Barillas-Mury C, Kumar S. 2005. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol*. 7(1): 539-1.345.
- Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. 1997. Red blood cell aggregation in experimental sepsis. *J Lab Clin Med*. 130: 183–190.
- Baskurt OK, Meiselman HJ. 2003. The hyperviscosity syndromes. *Semin Thromb Hemostasis*. 29: 435–450.
- Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J. 2013. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol*. 2013(986789):1-16.
- Belnoue E, Potter SM, Rosa DS, Mauduit M, Gruner AC, Kayibanda M, Mitchell AJ, Hunt NH, Renia L. 2008. Control of pathogenic CD8⁺ T cell migration to the brain by IFN- γ during experimental cerebral malaria. *Parasite Immunol*. 30(10): 544-553.
- Ben Mkaddem S, Rossato E, Heming N, Monteiro RC. 2013. Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): From autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmunity Rev*. 12: 666-669.
- Berra HH, Piaggio E, Revelli SS, Luquita A. 2005. Blood viscosity changes in experimentally *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Clin Hemorheol Microcirc*. 32(3): 175-182.
- Bergamaschini AB, Galimberti L, La Porta L, Zanetti C, Calabresi M, Scarpini C, Annoni E, Vergani G. 2007. Polymorphisms in the gene of transforming growth factor- β 1 are associated with neuro degeneration and its clinical evolution. *Mech Ageing Dev*. 128(10): 553-557.
- Billiau A. 1996. Interferon- γ : biology and role in pathogenesis. *Adva Immunol*. 62: 61-130.
- Biswas S, Saxena QB, Roy A, Kabilan L. 1995. Naturally-Occurring Plasmodium-Specific IgA Antibody in Humans from a Malaria Endemic Area. *J Biosc*. 20:453-460.
- Boross P, Lohse S, Nederend M, Jansen JH, Van Tetering G, Dechant M, Peipp M, Royle L, Liew LP, Boon L, Van Rooijen N, Bleeker WK, Parren PW, Van de Winkel JG, Valerius T, Leusen JH. 2013. IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo. *EMBO Mol Med*. 5: 1213-1226.
- Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. 1992. Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immunol*. 60: 1473-1481.
- Bouharoun-Tayoun H, Ouevray C, Lunel F, Druilhe P. 1995. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 182: 409-418.

- Bow H, Pivkin IV, Diez-Silva M, Goldfless S J, Dao M, Niles JC, Suresh S, Han J. 2011. A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria. *Lab Chip*. 11: 1065-1073.
- Bozkurt B. 2000. Activation of cytokines as a mechanism of disease progression in heart failure. *Ann Rheum Dis*. 59: i90-i93.
- Braga WSM, Souza RAB, Silva EB, Fonseca JCF, Tosta CE. 2006. Coinfection between hepatitis B virus and malaria: clinical, serologic and immunologic aspects. *Rev Soc Bras Med Trop*. 39(1): 27-31.
- Braga ÉM, Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT. 2012. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Trop*. 123: 53- 57.
- Brasil P, Costa AP, Longo CL, Silva S, Ferreira-da-Cruz MF, Ribeiro CTD. 2013. Malaria, a difficult diagnosis in a febrile patient with sub-microscopic parasitaemia and polyclonal lymphocyte activation outside the endemic region, in Brazil. *Malar J*. 12(402).
- BRASIL. 2005. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Ministério da Saúde. 112.
- Braz RM, Duarte EC, Tauil PL. 2013. Caracterização das epidemias de malária nos municípios da Amazônia Brasileira em 2010. *Cad Saúde Pública*. 29(5):935-944.
- Brito CF, Ferreira MU. 2011. Molecular markers and genetic diversity of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106(1):12-26.
- Bueno LL, Morais CG, Araujo F.F, Gomes JA, Correa-Oliveira R, Soares IS, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. 2010. *Plasmodium vivax*: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One*. 5(3): e9623.
- Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourão LC, Machado de Ávila RA, Soares IS, Fontes CJ, Lacerda MV, Olórtogui CC, Bartholomeu DC, Fujiwara RT, Braga EM. 2011. Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). *PLoS One* 6(6): e 21289.
- Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. 2012. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Trop*. 123: 53-57.
- Buitrago LS, Brochero HL, Mckeon SN, Lainhart W, Conn JE. 2013. First published record of urban malaria in Puerto Gaitán, Meta, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108(8): 1045-1050.

- Burton AC. 1977. Sangue, o fluido circulante. In: Burton AC. Fisiologia e biofísica da circulação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 2. 5p 15-56.
- Cabantous S, Poudiougou B, Oumar AA, Traore A, Barry A, Vitte J, Bongrand P, Marquet S, Doumbo O, Dessein AJ. 2009. Genetic evidence for the aggravation of *Plasmodium falciparum* malaria by Interleukin 4. *J Infect Dis.* 200(10): 1530-1539.
- Camargo LM, Ferreira UM, Krieger H, de Camargo EP. 1994. Unstable hypoendemic malária in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. *Am J Trop Med Hyg.* 51: 16-25.
- Campanella GS, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA, Colvin RA, Luster AD. 2008. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 105(12): 4814-4819.
- Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. 2011. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis.* 5(6):e1160.
- Carneiro-Sampaio MMS, Silva MLM, Carbonare SB, Palmeira P, Delneri MC, Honorio-França AC, Trabulsi LR. 1996. Breast-feeding protection against Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol* 26: 151–154.
- Carrasquilla, G. 2001. An ecosystem approach to malaria control in an urban setting. *Caderno Saúde Pública.* 17: 171-179.
- Chen J, Liu XS. 2009. Development and function of IL-10 IFN- α -secreting CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol.* 86:1-5.
- Chen J, Liu XS. 2009. CD4⁺ T cells development and function of IL-10 IFN- α -secreting. *J Leukoc Biol.* 86: 1-5.
- Chiamolera M, Launay P, Montenegro V, Rivero MC, Velasco IT, Monteiro RC. 2001. Enhanced expression of Fc alpha receptor I on blood phagocytes of patients with gram-negative bacteremia is associated with tyrosine phosphorylation of the FcR-gamma subunit. *Shock.* 16:344-348.
- Cloutier G, Zimmer A, Yu FTH, Chiasson JL. 2008. Increased shear rate resistance and fastest kinetics of erythrocyte aggregation in diabetes measured with ultrasound. *Diab Care.* 31: 1400–1402.
- Coelho HCC, Lopes SCP, Pimentel JPD, Nogueira PA, Costa FTM, Siqueira AM, Melo GC, Monteiro WM, Malheiro A, Lacerda MVG. 2013. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. *PLoS One.* 8(5): 1-7.
- Connes P, Lamarre Y, Waltz X, Ballas SK, Lemonne N, Etienne-Julan M, Hue O, Hardy-Dessources MD, Romana M. 2014. Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 165(4): 564-572.
- Corthésy B. 2003. Recombinant secretory immunoglobulin A in passive immunotherapy: linking immunology and biotechnology. *Curr Pharm Biotec.* 4:51-67.

Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, Russell B, Renia L, Marinho CR, Lacerda MV. 2012. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: Perspectives from the Brazilian field. *Inter J Parasitol.* 42(12):1099-10105.

Costa AG, Antonelli LRV, Costa PAC, Pimentel JPD, Garcia NP, Tarragô AM, Lopes dos Santos MPS, Nogueira PA, Hekcmann MIO, Sadahiro A, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO, Malheiro A. 2014. The Robust and Modulated Biomarker Network Elicited by the *Plasmodium vivax* Infection Is Mainly Mediated by the IL-6/IL-10 Axis and Is Associated with the Parasite Load. *J Immunol Res.* 2014: 1-11.

Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, Gueye, CS, Fullman N, Gosling RD, Feachem RG. 2013. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet.* 382: 900-911.

Cox D, Mcconkey S. 2010. The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci.* 67: 557–568.

Cromer D, Best SE, Engwerda C, Haque A, Davenport M. 2013. Where Have All the Parasites Gone? Modelling Early Malaria Parasite Sequestration Dynamics. *PLoS One.* 8(2): e55961.

Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, Mai NT, Phu NH, Sinh DX, White NJ, Ho M. 1999. The Prognostic and pathophysiologic role of pro-and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.* 180(4): 1288-1297.

Dechant M, Valerius T. 2001. IgA antibodies for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 39:69-77.

Diez-Silva M, Park Y, Huang S, Bow H, Mercereau-Puijalon O, Deplaine G, Lavazec C, Perrot S, Bonnefoy S, Feld MS, Han J, Dao M, Suresh S. 2012. Pfl55/RESA protein influences the dynamic microcirculatory behavior of ring-stage *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Sci Rep.* 2(614): 1-7.

Dodoo, D.; Omer, F. M.; Todd, J.; Akanmori, B. D.; Koram, K. A.; Riley, E. M. 2002. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 185(7): 971-979.

Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ. 2004. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop.* 89(3): 309-317.

Dondorp AM, Ince C, Charunwatthana P, Hanson J, Van Kuijen A, Faiz MA. 2008. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *J Infect Dis.* 197(1):79-84.

Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo SF, Ranjbaran H, Gallo A. 2009. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle. *Cells Circulation.* 119:1424-1432.

- Ernst E, Bergmann H. 1989. Influence of Cilazapril on Blood Rheology in Healthy Subjects: A Pilot Study. *Am J Med.* 87: 70 –71.
- Fagundes DLG, França EL, Hara CCP, Honorio-França AC. 2012. Immunomodulatory Effects of Poly (Ethylene Glycol) Microspheres Adsorbed with Cortisol on Activity of Colostrum Phagocytes. *Int J Pharmacol.* 8:510-518.
- Farahani R, Sherkat R, Hakemi MG, Eskandari N, Yazdani R. 2014. Cytokines (interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and asthma. *Adv Biomed. Res.* 3(127):1-17.
- Fedosov DA, Caswell B, Suresh S, Karniadakis G E. 2011a. Quantifying the biophysical characteristics of *Plasmodium-falciparum*-parasitized red blood cells in microcirculation. *Proc Natl Acad Sci.* 108(1): 35-39.
- Fedosov DA, Lei H, Caswell B, Suresh S, Karniadakis GE. 2011b. Multiscale modeling of red blood cell mechanics and blood flow in malaria. *PLoS Comput Biol.* 7(12):e1002270.
- Fedosov DA, Caswell B, Karniadakis GE. 2011. Wall shear stress-based model for adhesive dynamics of red blood cells in malaria. *Bioph J.* 100: 2084-2093.
- Fedosov DA, Dao M, Karniadakis G, Suresh S. 2014. Computational biorheology of human blood flow in health and disease. *Ann Biomed Eng.* 42: 368-387.
- Finney CA, Lu Z, Hawkes M, Yeh WC, Liles WC, Kain KC. 2010. Divergent roles of IRAK4-mediated innate immune responses in two experimental models of severe malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 83(1):69-74.
- Fontes CJ. 2001. Epidemiologia da malária e fatores associados à infecção assintomática por Plasmodium em uma população de garimpeiros da Amazônia brasileira (Mato Grosso, 1996). *Clínica Médica Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.* 1-178.
- Foresto P, D'Arrigo M, Filipini F, Gallo R, Barberena L, Racca L, Valverde J, Rasia RJ. 2005. Evaluacion de Alteraciones Hemorreologicas em Pacientes Hipertensos. *Medicina (Buenos Aires).* 65: 121-125.
- Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. 2008. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev.* 226: 87-102.
- França EL, Morceli G, Fagundes DLG, Rudge MVC, Calderon IMP, Honorio-França AC. 2011. Secretory IgA Fcα receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. *APMIS. Acta Patho Microb et Immun Scandin.* 119: 710-719.
- França EL, Ribeiro EB, Scherer EF, Cantarini DG, Pessoa RS, Franca FL, Honorio-França AC. 2014. Effects of Momordica charantia L. on the blood rheological properties in diabetic patients. *Bio Med Resea Intern.* 2014: 8.

- Francischetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ. 2008. Blood coagulation, inflammation and malaria. *Microcirculation*. 15(2): 81-107.
- Franco M, Collec E, Connes P, van den Akker E, Billette deVillemeur T, Belmatoug N, von Lindern M, Ameziane N, Hermine O, Colin Y, Le Van Kim C, Mignot C. 2013. Abnormal properties of red blood cells suggest a role in the pathophysiology of Gaucher disease. *Blood*. 121(3): 546–555.
- Freitas do Rosario AP, Langhorne J. 2012. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. *J Parasitol*. 42: 549-555.
- Furuya T, Sá JM, Chitnis CE, Wellems TE, Stedman TT. 2014. Reticulocytes from cryopreserved erythroblasts support *Plasmodium vivax* infection in vitro. *Parasitol Int*. 63(2): 278-84.
- Gajewski TF, Fitch FW. 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol*. 140: 4245-4252.
- Gaur D, Mayer DC, Miller LH. 2004. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol*. 34: 1.413-1.429.
- Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL. 2012. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dise*. 6(9): e1814.
- Golenser J, Domb A, Mordechai-Daniel T, Leshem B, Luty A, Kremsner P. 2006. Iron chelators: correlation between effects on *Plasmodium* spp. and immune functions. *J Parasitol*. 92(1): 170-177.
- Gomes AP, Vitorino RR, Costa AP, Mendonça EG, Oliveira MGA, Siqueira-Batista R. 2011. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Rev Bras Ter Inten*. 23(3): 358-369.
- Gonçalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, Silber AM, Kallas EG, Ferreira UM, Scopel KK. 2010. CD4 + CD25 + foxp3 + regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines uncomplicated malária: do diferente parasite species elicit similar host responses? *Infect Immunity*. 78: 4763-4772.
- Gowda NM, Wu X, Gowda DC. 2012. TLR9 and MyD88 are crucial for the development of protective immunity to malaria. *J Immunol*. 188: 5073–5085.
- Grau GER, Craig AG. 2012. Cerebral malária pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Fut Microbiol*. 7(2): 291-302.
- Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*. 118(4):1266-76.
- Grossetête B, Viard JP, Lehuen A, Bach JF, Monteiro RC. 1995. Impaired Fc alpha receptor expression is linked to increased immunoglobulin A levels and disease progression in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 9:229-234.

- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, Kabaria CW, Tatem AJ, Manh BH, Elyazar IRF, Baird JK, Snow RW, Hay SI. 2010. The International Limits and Population at Risk of *Plasmodium vivax* Transmission in 2009. *Plos Negl Trop Disea.* 4(8): 1-11.
- Handayani S, Chiu DT, Tjitra E, Kuo JS, Lampah D, Kenangalem E, Renia L, Snounou G, Price RN, Anstey NM, Russell B. 2009. High deformability of *Plasmodium vivax* infected red blood cells under microfluidic conditions. *J Infec Disea.* 199: 445-450.
- Hanson LA. 2007. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc Nutrit Soc.* 66(3): 384-396.
- Hänscheid T, Egan TJ, Grobusch MP. 2007. Haemozoin: from melatonin pigment to drug target, diagnostic tool, and immune modulator. *Lancet Infect Dis.* 7(10): 675-685.
- Healer J, Thompson JK, Riglar DT, Wilson DW, Chiu YH, Miura K, Chen L, Hodder AN, Long CA, Hansen DS, Baum J, Cowman AF. 2013. Vaccination with Conserved Regions of Erythrocyte-Binding Antigens Induces Neutralizing Antibodies against multiple strains of *Plasmodium falciparum*. *PLoS One.* 8(9):1-12.
- Hemmer CJ, Holst FG, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC. 2006. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health.* 2(6): 817-823.
- Herrera S, Vallejo AF, Quintero JP, Arévalo-Herrera M, Cancino M, Ferro S. 2014. Field evaluation of an automated RDT reader and data management device for *Plasmodium falciparum/Plasmodium vivax* malaria in endemic areas of Colombia. *Malar J.* 13: 1-10.
- Higgins J, Eddington D, Bhata S, Mahadevan L. 2007. Sickle cell vasoocclusion and rescue in a microfluidic device. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 104: 20496-20500.
- Hill DL, Eriksson EM, Li Wai Suen CS, Chiu CY, Ryg-Cornejo V, Robinson LJ, Siba PM, Mueller I, Hansen DS, Schofield L. 2013. Oponising antibodies to *P. falciparum* merozoites related to clinical immunity to malária. *PLoS One.* 8(9):e74627.
- Honorio-França AC, Carvalho MPSM, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS. 1997. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) opsonized by colostral IgA. *Scand J Immunol.* 46: 59-66.
- Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MMS, Monteiro RC. 2001. Colostral neutrophils express IgA Fc receptors (CD89) lacking y chain association that mediate non-inflammatory properties of secretory IgA. *J Leuk Biol.* 69(2): 289-296.
- Honorio-França AC, Ferrari CKB, Costa CG, França EL. 2011. Malaria epidemiology in a legal Amazonian population, Brazil. *Int J Pharm Biomed Res.* 2(2):115-118.

Horowitz A, Hafalla JC, King E, Lusingu J, Dekker D, Leach A, Moris P, Cohen J, Vekemans J, Villafana T, Corran PH, Bejon P, Drakeley CJ, von Seidlein L, Riley EM. “Antigen-specific IL-2 secretion correlates with NK cell responses after immunization of Tanzanian children with the RTS, S/AS01 malaria vaccine,” *J Immunol.* 188: 5054-5062.

Hu WC. 2013. Human immune responses to *Plasmodium falciparum* infection: molecular evidence for a suboptimal TH1 and TH17 bias over ideal and effective traditional TH1 immune response. *Malar J.* 12:392.

Huang H, Lamikanra AA, Alkaitis MS, Thézénas ML, Ramaprasad A, Moussa E, Roberts DJ, Casals-Pascual C. 2014. Interleukin-10 regulates hepcidin in *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One.* 9(2):1-7.

Imai Y, Kondo H, Yamaguchi T. 2010. Modeling of hemodynamics arising from malaria infection. *J Biomech.* 43: 1386-1393.

Inoue S, Niikura M, Mineo S, Kobayashi F. 2013. Roles of IFN- γ and $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against blood-stage malaria. *Front Immunol.* 4: 1-9.

Jain K, Sood S, Gowthamarajan K. 2013. Modulation of cerebral malaria by curcumin as an adjunctive therapy. *Braz J Infect Dis.* 17(5): 579-591.

Jefferis R, Lund J. 2002. Interaction sites on human IgG-Fc for Fc γ R: current models. *Immunol Lett.* 82: 57-65.

Jide C, Ying H, Wenyue X, Fusheng H. 2009. Toll-like receptors, a double-edged sword in immunity to malaria. *J Med Coll PLA.* 24(2): 118-124.

Kabyemela E, Gonçalves BP, Prevots DR, Morrison R, Harrington W, Gwamaka M, Kurtis JD, Fried M, Duffy PE. 2013. Cytokine profiles at birth predict malaria severity during infancy. *PLoS One.* 8(10): 1-8.

Kassim OO, Ako-Anai KA, Torimiro SE, Hollowell GP, Okoye VC, Martin SK. 2000. Inhibitory factors in breastmilk, maternal and infant sera against in vitro growth of *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *J Trop Pediatr.* 46: 92-96.

Keegan LT, Dushoff J. 2013. Population-level effects of clinical immunity to Malaria. *BMC Infect Dis.* 13(428):1-11.

Khaw LT, Ball HJ, Golenser J, Combes V, Grau GE, Wheway J, Mitchell AJ, Hunt NH. 2013. Endothelial cells potentiate Interferon- γ production in a novel tripartite culture model of human cerebral malaria. *PLoS One.* 8(7): e69521.

Killian AHD, Metzger WG, Mutshelknauss EJ, Kagambe G, Langi P, Korte R, Sonnengurg FV. 2000. Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. *Trop Med Int Health.* 5: 3-8.

Kim H, Lu LK, Erdman Z, Serghides L, Zhong K, Dhabangi A, Musoke C, Gerard C, Cserti-Gazdewich C, Liles WC, Kain KC. 2014. Functional roles for C5a and C5Ar, but not C5I2, in the pathogenesis of human and experimental cerebral malaria. *Infect Immunity*. 82: 371-379.

Lacerda MVG, Zackiewicz C, Alecrim WD, Alecrim MGC. 2007. The neglected *Plasmodium vivax*: are researchers from endemic areas really concerned about new treatment options? *Rev Soc Bras Med Trop*. 40(4): 489-490.

Lacerda MV, Mourao MP, Coelho HC, Santos JB. 2011. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106(1): 52-63.

Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, Filho FS, Brasil P, Ventura AM, Tada MS, Couto VS, Silva AR, Silva RS, Alecrim MG. 2012. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J*. 11:12.

Lammas DA, Casanova JL, Kumararatne DS. 2000. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon-gamma (IFN-g) Pathway. *Clin Exp Immunol*. 121: 417-425.

Leoratti FMS, Durlacher RR, Lacerda MVG, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MCA, Moraes SL. 2008. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malária. *Malar J*. 7(186):1-11.

Lisi S, Sisto M, Lofrumento DD, D'Amore S, D'Amore M. 2011. Advances in the understanding of the Fc gamma receptors-mediated autoantibodies uptake. *Clin Exp Med*. 11:1-10.

Liu Y, Hsiang MS, Zhou H, Wang W, Cao Y, Gosling RD, Cao J, Gao Q. 2014. Malaria in overseas labourers returning to China: an analysis of imported malaria in Jiangsu Province, 2001-2011. *Malar J*. 13(29): 1-9.

Mann D L, Young JB. 1994. Basic Mechanisms in Congestive Heart Failure. *Chest*. 105: 897-904.

Marcondes CB, Marchi MJ. 2010. Are extra-Amazonian physicians prepared to diagnose and treat malaria? *Rev. Soc. Bras. Med Trop*. 43(4).

Martinez, F.O. 2009. The transcriptome of human monocyte subsets begins to emerge. *J Biol*. 8: 99.

Martínez-Salazar E, Tobón-Castaño A, Blair S. 2012. Malaria en humanos por infección natural con *Plasmodium knowlesi*. *Biomed*. 32:121-130.

Matsuzaki G, Umemura M. 2007. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol*. 51: 1139–1147.

- Mavoungou E, Luty AJ, Kremsner PG. 2003. Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. *Eur Cytokine Netw.* 14(3): 134-142.
- Mariano FS, Gutierrez FRS, Pawanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AN. 2008. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of 21 *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 10(7): 825-833.
- Mbugi EV, Meijerink M, Veenemans J, Jeurink PV, Mccall M, Olomi RM, Shao JF, Chilongola JO, Verhoef H, Savelkoul HFJ. 2010. Effect of nutrient deficiencies on in vitro Th1 and Th2 cytokine response of peripheral blood mononuclear cells to *Plasmodium falciparum* infection. *Malar J.* 9(162): 1-14.
- Mccall MBB, Sauerwein RW. 2010. Interferon- γ —central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malária. *J Leukoc Biol.* 88: 1131-1143.
- Mcintosh RS, Shi J, Jennings RM, Chappel JC, de Koning-Ward TF, Smith T, Green J, Van Egmond M, Leusen JH, Lazarou M, Van de Winkel J, Jones TS, Crabb BS, Holder AA, Pleass RJ. 2007. The importance of human Fc γ RI in mediating protection to malaria. *PLoS Pathog.* 3(5):647-648.
- Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, Vallinoto AC, Póvoa MM, Silva JS, Cunha MG. 2011. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J.* 10(264).
- Mekonnen SK, Aseffa A, Medhin G, Berhe N, Velavan TP. 2014. Reevaluation of microscopy confirmed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria by nested PCR detection in southern Ethiopia. *Malar J.* 13(48): 1-8.
- Mello MBC, Luz FC, Leal-Santos FA, Alves ER, Gasquez TM, Fontes CJF. 2014. Standardization of blood smears prepared in transparent acetate: an alternative method for the microscopic diagnosis of malaria. *Malar J.* 213:238.
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malária. *Am J Trop Med Hyg.* 64(1): 97-106.
- Mendonça VRR, Queiroz ATL, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. 2013. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 12(69): 1-10.
- Metenou S, Dembele B, Konate S, Dolo H, Coulibaly YI, Diallo AA, Soumaoro L, Coulibaly ME, Coulibaly SY, Sanogo D, Doumbia SS, Traore SF, Mahanty S, Klion A, Nutman TB. 2011. Filarial Infection Suppresses Malaria-Specific Multifunctional Th1 and Th17 Responses in Malaria and Filarial Coinfections. *J Immunol.* 186: 4725-4733.
- Miller LH, Baruch DI, Doumbo OK. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 415: 673–679.

- Miu J, Mitchell AJ, Muller M, Carter SL, Manders PM, Mcquillan JA, Saunders BM, Ball HJ, Lu B, Campbell IL, Hunt NH. 2008. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol.* 180: 1217-1230.
- Mkaddem SB, Rossato E, Heming N, Monteiro RC. 2012. Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): From autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmun Rev.* 12: 666-669.
- Mohandas N, Chasis JA. 1993. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol.* 30: 171-192.
- Mohandas N, An X. 2012. Malaria and human red blood cells. *Med Microb Immun.* 201:593-598.
- Monteiro RC, Cooper MD, Kubagawa H. 1992. Molecular heterogeneity of fca receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. *J Immunol.* 148:1764-1770.
- Monteiro RC, Van de Winkel JG. 2003. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 21:177-204.
- Mouatcho JC, Goldring JPD. 2013. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and perspectives. *J Med Microbiol.* 62(10): 1.491-1.505.
- Muellenbeck MF, Ueberheide B, Amulic B, Epp A, Fenyo D, Busse CE, Esen M, Theisen M, Mordmüller B, Wardemann H. 2013. Atypical and classical memory B cells produce *Plasmodium falciparum* neutralizing antibodies. *J Exp Med.* 210(2): 389- 399.
- Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA. 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 9: 555-566.
- Muniz-Junqueira MI, dos Santos-Neto LL, Tosta CE. 2001. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Cell Immunol.* 208: 73-79.
- Muniz-Junqueira MI, Tosta CE. 2009. Stepwise observations of *in vitro* phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes by human monocytes. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42: 1-4.
- Mutis MCS, Martinez-Espinosa FE, Albuquerque BC. Malária In: Coura JR. 2005. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.833-858.
- Neves DP, de Filipis T. 2010. *Parasitologia Básica*. São Paulo: 2ª ed. Atheneu.
- Noone C, Parkinson M, Dowling DJ, Aldridge A, Kirwan P, Molloy SF, Asaolu SO, Holland C, O'Neill SM. 2013. Plasma cytokines, chemokines and cellular immune responses in pre-school Nigerian children infected with *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 12(5): 1-9.

- Nunes GT, Fagundes DLG, Nunes PJS, Mesquita JLF, Souto PCS, Honório-França AC, França EL. 2015. Desenvolvimento e caracterização de um agente imunomodulador a base de adsorção de sIgA à microesfera de plietilenoglicol (PEG). *Rev Sodebras*. 10(110).
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 9(115): 1-15.
- Omer FM, de Souza JB, Corran PH, Sultan AA, Riley EM. 2003. Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. *J Exp Med*. 198(12): 1817-1827.
- Osier FH, Feng G, Boyle MJ, Langer C, Zhou J, Richards JS, Mccallum FJ, Reiling L, Jaworowski A, Anders RF, Marsh K, Beeson JG. 2014. Opsonic Phagocytosis of Plasmodium falciparum merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med*. 12(108): 1-32.
- Park JW, Jun G, Yeom JS. 2009. Plasmodium vivax malaria: status in the republic of Korea following reemergence. *Korean J Parasitol*. 47:39-50.
- Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffié C, Hénin D, Benhamou M, Pretolani M, Blank U, Monteiro RC. 2005. Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM. *Immunity*. 22: 31-42.
- Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ongecha JM. 2011. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci*. 7(9):1427-1442.
- Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. 2003. Red blood cell rheology in sepsis. *J Intens Care Med*. 29: 1052-1061.
- Pipe CJ, & Mckinley GH. 2009. Microfluidic rheometry. *Mec Res Commun*. 36: 110-120.
- Pitabut N, Panichakorn J, Mahakunkijcharoen Y, Hirunpetcharat C, Looareesuwan S, Khusmith S. 2007. IgG antibody profile to c-terminal region of Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 in Thai individuals exposed to malaria. *Mahidol University, Bangkok, Thailand*. 38: 1.
- Pleass RJ, Holder AA. 2005. Opinion: antibody-based therapies for malaria. *Nat Rev Microbiol*. 3: 893-899.
- Pop GAM, Bisschops LLA, Iliev B, Struijk PC, Van der Hoeven JG, Hoedemaekers CWE. 2013. On-line blood viscosity monitoring in vivo with a central venous catheter, using electrical impedance technique. *Biosens Bioelectron*. 41: 595-601.
- Praddhan V, Ghosh K. 2013. Immunological disturbances associated with malarial infection. *J Parasitol Dis*. 37(1): 11-15.
- Prasat D, Sucharit B. 2012. Pathogenesis of malaria revisited. *Med Microbiol Immunol*. 201: 599-604.

- Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. 2007. *Vivax* malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg.* 77(6): 79-87.
- Puig-de-Morales-Marinkovic M, Turner KT, Butler JP, Fredberg JJ, Suresh S. 2007. Viscoelasticity of the human red blood cell. *Amer J Physiol - Cell Physiol.* 293: C597-C605.
- Pukrittayakamee S, Chantira A, Simpson JA, Vanijanonta S, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ. 2000. Therapeutic Responses to Different Antimalarial Drugs in *Vivax* Malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 1680-1685.
- Qian K, Xie F, Gibson A W, Edberg JC, Kimberly RP, Wu J. 2008. Functional expression of IgA receptor Fc α RI on human platelets. *J Leukoc Biol.* 84:1492-1500.
- Radford-Smith G, Jewell DP. 1994. The Role of Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *Mediators Inflamm.* 3(1): 3-9.
- Rafieian-Kopaei M, Nasri H, Alisadeh F, Ataei B, Baradaran A. 2013. Immunoglobulin A nephropathy and *malária falciparum* infection: a rare association. *Iran J Public Health.* 42(5):529-533.
- Rao MA. 1999. Rheology of fluid and semisolid food: principles and application. A Chapman & Hall food science book. Food engineering series. *Aspen publishers.* 433 p.
- Raza A, Ghanchi NK, Sarwar Zubairi AB, Raheem A, Nizami S, Beg MA. 2013. Tumor necrosis factor- α , interleukin-10 intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated *Plasmodium vivax* isolates from Pakistan. *PLoS One.* 8(12):1-9.
- Robertson AM, Sequeira A, Kameneva MV. 2008. Hemodynamical Flows. *Modeling, Analysis and Simulation; Oberwolfach Seminars.* 37: 63-120. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior Jda C, Fonseca Bde P, Antas PR, Baldez A, Storer FL, Santos F, Banic DM, de Oliveira-Ferreira J. 2014. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109: 154-162.
- Roestenberg M, Mccall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJF, Van Gemert GJ, Van de Vegte-Bolmer M, Van Schaijk B, Teelen K, Arens T, Spaarman L, de Mast Q, Roeffen W, Snounou G, Renia L, Van der Ven A, Hermsen CC, Sauerwein R. 2009. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med.* 361: 468-477.
- Roger SKA, Jayashankar L, Scinicariello F, Attanasio R. 2008. Nonhuman primate IgA: genetic heterogeneity and interactions with CD89. *J Immunol.* 180(7): 4816-4824.
- Rosencranz R, Bogen SA. 2006. Clinical Laboratory Measurement of Serum, Plasma, and Blood Viscosity. *Am J Clin Pathol.* 125: 78-86.

- Sagaki P, Thanachartwet V, Desakorn V, Sahassananda D, Chamnanchanunt S, Chierakul W, Pitisuttithum P, Ruangkanhasetr P. 2013. Clinical Factors for Severity of *Plasmodium falciparum* Malaria in Hospitalized Adults in Thailand. *PLoS One*. 8(8): e71503.
- Santos NAA. 2009. *Estudo da Reologia de Flúidos Análogos do Sangue*. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia) Universidade de Porto, Portugal.
- Santos G, Torres NV. 2013. New targets for drug Discovery against malária. *PLoS One*. 8(3): e59968.
- Saraiva VB, Silva LS, Ferreira-da-Silva CT, Silva-Filho JL, Teixeira-Ferreira A, Perales J, Souza MC, Henriques MG, Caruso-Neves C, de Sá Pinheiro AA. 2011. Impairment of the *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Cycle Induced by Angiotensin Peptides. *PLoS One*. 6: e171174. 1-9.
- Sarangi A, Mohapatra PC, Dalai RK, Sarangi AK. 2014. Serum IL-4, IL-12 and TNF-alpha in malaria: a comparative study associating cytokine responses with severity of disease from the Coastal Districts of Odisha. *J Parasit Dis*. 38(2):143-147.
- Sarmay G, Lund J, Rozsnyay Z, Gergely J, Jefferis R. 1992. Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fcγ receptor. *Molec immunol*. 99(5): 633-639.
- Sambo MR, Trovoadá MJ, Benchimol C, Quinhentos V, Gonçalves L, Velosa R, Marques MI, Sepúlveda N, Clark TG, Mustafa S, Wagner O, Coutinho A, Penha-Gonçalves C. 2010. Transforming growth factor beta 2 and heme oxygenase 1 genes are risk factors for the cerebral malaria syndrome in Angolan children. *PLoS One*. 5(6):e11141.
- Scherer EF, Honorio-França AC, Hara CCP, Reinaque APB, Cortês MA, França EL. 2011. Immunomodulatory Effects of Poly(ethylene glycol) Microspheres Adsorbed with Nanofractions of *Momordica charantia L.* on Diabetic Human Blood Phagocytes. *Sci Adv Mater*. 3: 687-694.
- Sherry B, Cerami A. 1988. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of Inflammatory responses. *J Cell biol*. 107.
- Schramm G. 2006. *Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos. Tradução e adaptação:* Mothé CG, Correia DZ, Petri HM, Gonçalves M, Carestiano T. 2ed. São Paulo: Artliber Editora.
- Schwenk RJ, Richie TL. 2011. Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. *Trends Parasitol*. 27(7): 306-314.
- Sen P, Vial HJ, Radulescu O. 2013. Kinetic modelling of phospholipid synthesis in *Plasmodium knowlesi* unravels crucial steps and relative importance of multiple pathways. *BMC Syst Biol*. 7: 123.

Seidlein LV, Bejon P. 2013. Malaria vaccines: past, present and future. *Arch Dis Child*. 98: 981-985.

Shi J, McIntosh RS, Adame-Gallegos J, Dehal PK, Van Egmond M, Van de Winkel J, Draper SJ, Forbes EK, Corran PH, Holder AA, Woof JM, Pleass RJ. 2011. The generation and evaluation of recombinant human IgA specific for *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1-19 (PfMSP1₁₉). *BMC Biotechnol*. 11: 77.

Simmonds MJ, Meiselman HJ, Baskurt OK. 2003. Blood rheology and aging. *J Geriatr Cardiol*. 10: 291-301.

Singh B, Daneshvar C. 2013. Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*. 26(2): 165-184.

Sortica VA, Cunha MG, Ohnishi MD, Souza JM, Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos NPC, Callegari-Jacques SM, Santos SEB, Hutz MH. 2012. IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil. *Malar J*. 11: 409.

Stevenson MM, Urban BC. 2006. Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. *Parasite Immunol*. 28: 5-14.

Suárez-Mutis MC & Coura JR. 2006. Evaluation of the thick smear in a field condition in a malaria endemic area in the Middle Region of Rio Negro, Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 39: 5.

Suárez-Mutis, M.C. & Coura, J. R. 2007. Changes in the epidemiological pattern of malaria in a rural area of the middle Rio Negro, Brazilian Amazon: a retrospective analysis. *Cad Saúde Pública*. 23: 795-804.

Tangteerawatana P, Pichyangkul S, Hayano M, Kalambaheti T, Looareesuwan S, Troye-Blomberg M, Khusmith S. 2007. Relative levels of IL4 and IFN- γ in complicated malaria: Association with IL4 polymorphism and peripheral parasitemia. *Acta Trop*. 101(3): 258-265.

Talundzic E, Maganga M, Masanja IM, Peterson DS, Udhayakumar V, Lucchi NW. 2014. Field evaluation of the photo-induced electron transfer fluorogenic primers (PET) real-time PCR for the detection of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Malar J*. 13(31): 1-6.

Tauil PL. 2006. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 39(3): 275-277.

Theulier M, Datry A, Alfa Cissé O, San C, Biligui S, Silvie O, Danis M. 2002. Diagnosis of malaria using thick blood smears: definition and evaluation of a faster protocol with improvement readability. *Ann Trop Med Parasitol*. 96: 11-124.

Todryk SM, Bejon P, Mwangi T, Plebanski M, Urban B, Marsh K, Hill AVS, Flanagan KL. 2008. Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4⁺CD25^{high} T cells with susceptibility in Kenyans. *PLoS One*. 3: e2027.

- Underhill DM. 2003. Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol.* 33(7): 1767-1775.
- Van Egmond M, Van Garderen E, Van Spriel AB, Damen CA, Van Amersfoort ES, Van Zandbergen G, Van Hattum J, Kuiper J, de Van Winkel JG. 2000. FcγRI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med.* 6(6): 680–685.
- Veerapaneni SK, Young YN, Vlahovska PM, Bławzdziejewicz J. 2011. Dynamics of a compound vesicle in shear flow. *Phys Rev Lett.* 106(15).
- Verdier C, Etienne J, Duperray A, Preziosi L. 2009. Review: Rheological properties of biological materials. *C R Phys.* 10: 790-811.
- Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinni P. 2007. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol.* 9: 1.215-1.222.
- Yazdani SS, Mukherjee P, Chauhan VS, Chitnis CE. 2006. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Curr Mol Med.* 6(2): 187-203.
- Yeo TW, Lampah DA, Tjitra E, Piera K, Gitawati R, Kenangalem E, Price RN, Anstey NM. 2010. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *J Infect Dis.* 202(1): 109-112.
- Yeom E, Kang YJ, Lee S. 2014. Changes in velocity profile according to blood viscosity in a microchannel. *Biomicrofluidics.* 8: 1-11.
- Yoo de Kim JHO, Kie JH, Park Y, Chang TIK, Oh HJ, Kim SJ, Yoo TH, Choi KH, Kang SW, Han SH. 2012. Immunoglobulin A nephropathy associated with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Korean Med Sci.* 27(4): 446-449.
- Young HA, Hardy KJ. 1995. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol.* 58: 373-381.
- Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, Lawrence E, Ngwa-Amambua A, Jayasooriya S, Cheeseman IH, Gomez-Escobar N, Okebe J, Conway DJ, Riley EM. 2009. Distinct Roles for FOXP3 + and FOXP3 – CD4 + T Cells in Regulating Cellular Immunity to Uncomplicated and Severe *Plasmodium falciparum* Malaria. *PLoS Pathog.* 4(5): 1-14.
- Wassmer SC, Souza JBD, Frère C, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE. 2006. TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *J Immunol.* 176(2):1180-4.
- Wines BD, Ramsland PA, Trist HM, Gardam S, Brink R, Fraser JD, Hogarth PM. 2011. Interaction of Human, Rat, and Mouse Immunoglobulin A (IgA) with Staphylococcal

Superantigen-like 7 (SSL7) Decoy Protein and Leukocyte IgA Receptor. *J Biol Chem.* 286:33118-33124.

White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. 2014. Malaria. *Lancet.* 383(9918):723-735.

Wroczyńska A, Nahorski W, Bakowska A, Pietkiewicz H. 2005. Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease. *Int Marit Health.* 56: 1-4.

Wu D, Wu P, Huang Q, Liu Y, Ye J, Huang J. 2013. Interleukin-17: a promoter in colorectal cancer progression. *Clin Dev Immunol.* 2013(436307): 1-7.

Zarebavani M, Dargah D, Einollahi N, Dashti N, Mohebbi M, Rezaeian M. 2012. Serum Levels of Zinc, Copper, Vitamin B12, Folate and Immunoglobulins in Individuals with Giardiasis. *Iran J Public Health.* 41:47-53.

Zeyrek FY, Kurcer MA, Zeyrek D, Simsek Z. 2006. Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey. *Parasite Immunol.* 28:201–207.

Zhou MJ, Brown EJ. 1994. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fcγ RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fcγ RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol.* 125(6):1407-16.

Anexo 1 - Parecer do comite de ética

| | | |
|---|--|---|
| UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - CAMPUS DO ARAGUAIA | |  |
| PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP | | |
| DADOS DO PROJETO DE PESQUISA | | |
| Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS REOLÓGICOS E MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA MÁLARIA HUMANA | | |
| Pesquisador: Edson Fredulin Scherer | | |
| Área Temática: Novos procedimentos terapêuticos invasivos; | | |
| Versão: 3 | | |
| CAAE: 14793413.2.0000.5587 | | |
| Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso | | |
| Patrocinador Principal: Financiamento Próprio | | |
| DADOS DO PARECER | | |
| Número do Parecer: 440.602 | | |
| Data da Relatoria: 30/10/2013 | | |
| Apresentação do Projeto: O projeto atende aos elementos gerais de proposição exigida. | | |
| Objetivo da Pesquisa: Os objetivos primários e secundários atendem os pressupostos da pesquisa. | | |
| Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos e os benefícios estão dispostos no projeto com a clareza necessária aos objetivos a serem atendidos pelo projeto | | |
| Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto é muito importante para o entendimento da pesquisa básica em imunologia e também de relevância para a saúde tanto materna como infantil. É bastante importante a pesquisa para o contexto regional, pois é pioneira no sentido de colocar em evidência o UFMT/CUA/ICBS na busca de soluções a fim de enfrentar os problemas locais relativos à saúde. | | |
| Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todas as indicações obrigatórias foram atendidas, levando em consideração toda a dinâmica metodológica oferecida para o desenvolvimento da pesquisa. | | |
| Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS Bairro: Campus do Araguaia | | CEP: 78.698-000 |
| UF: MT | Município: PONTAL DO ARAGUAIA | |
| Telefone: (66)3402-1121 | E-mail: mariyaugusta@yahoo.com.br | |

Página 01 de 02

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MATO GROSSO - CAMPUS DO
ARAGUAIA



Continuação do Parecer: 440.602

Recomendações:

O texto não precisa de recomendações, pois atendeu todas as especificidades elencadas para a apresentação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não anotei pendências no projeto apresentado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

aprovado.

PONTAL DO ARAGUAIA, 30 de Outubro de 2013

Assinador por:
Marly Augusta Lopes de Magalhães
(Coordenador)

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS
Bairro: Campus do Araguaia CEP: 78.698-000
UF: MT Município: PONTAL DO ARAGUAIA
Telefone: (66)3402-1121 E-mail: marlyaugusta@yahoo.com.br

Página 02 de 02

Anexo 2 – Artigo Científico

Cytokine is source of immunoengineering to restore human blood flow of individuals with *Plasmodium vivax* infection

***Edson Fredulin Scherer** - Post-Graduate Program of Parasitology of Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. edsonschere1@hotmail.com

***Déborah Giovanna Cantarini** - Post- Graduate Program in Basic and Applications of Immunology and Parasitology of Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil. deborah_giovanna@hotmail.com

Renan Siqueira - Post- Graduate Program in Basic and Applications of Immunology and Parasitology of Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil. rennansiqueira@hotmail.com

Elton Brito Ribeiro – Institute of Biological Sciences – University of Brasília – Brasília – DF, Brazil. eltonbr8@hotmail.com

Érika Martins Braga Post-Graduate Program of Parasitology of Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. embraga@icb.ufmg.br

Adenilda Cristina Honório-França - Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil. denifran@terra.com.br

Eduardo Luzía França - Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil. dr.eduardo.franca@gmail.com

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Eduardo L. França

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde –UFMT – Barra do Garças– MT Rodo via

B R070, K m 5 s/ n^o, Ba rra do Garça s– M T, B ra zil.

e-mail: dr.eduardo.franca@gmail.com

ABSTRACT

Malaria is a major infectious disease in several countries and is caused by protozoa of the genus *Plasmodium*. In severe malaria, the erythrocytes become rigid, leading to inflammatory processes and resulting in changes in blood flow. Thus, the present study analyzed the blood of individuals infected by *P. vivax* to determine 1) the cytokines profile and 2) modulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines on human blood flow. Blood samples were collected from 37 non-infected individuals (control group) and 32 individuals infected by *P. vivax*. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , TGF- β and IL-17 cytokines levels and the modulation of rheological were determined. The serum from individuals with *P. vivax* infections exhibited higher IFN- γ and IL-17 concentrations and lower TGF- β levels. There were no significant differences in blood flow between the groups. According to the generated curve, the viscosity of the blood was greater in the infected individuals than in the non-infected subjects, regardless of temperature. The analysis of blood viscosity regarding shear rates at 37°C revealed that the blood viscosity of the infected patients was significantly greater than that of the noninfected individuals. Incubation of the blood from infected individuals with IL-17 or IFN- γ plus IL-17 reduced the viscosity rates those of the non-infected individuals. These data suggest that the effects of malaria on the viscosity of blood should be considered. In malaria the erythrocytes are more sensitive to osmotic shock and the reduction of viscosity by cytokines can also be related to a possible hemorheology restoration.

Key words: Cytokines, IL-17, blood viscosity, *P. vivax*, malaria.

1- INTRODUCTION

Malaria is a major infectious disease and constitutes a serious health problem worldwide, with approximately 300-500 million cases annually and almost one million deaths [1]. Malaria, caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, is endemic [2] and considered to be re-emerging in several countries. *Plasmodium vivax* is the most prevalent species and is responsible for most cases of malaria [3,4]. In the Legal Amazon region, studies have shown a higher prevalence of *P. vivax* [5, 6].

An inflammatory process occurs in malaria that can lead to cytokine release [7].

It is known an overproduction of pro-inflammatory cytokines during infection by *Plasmodium spp.* [8]. These cytokines in infection, can control the growth of the parasite, as well as exacerbate the pathology [9].

Some studies have verified the importance of cytokine profile and their interactions in the immune response of the malaria *P. vivax* [10,11]. Parasitemia as well as the immune response during the course of the disease are factors that determine its severity [10]. High levels of Th1 and Th2 cytokine profiles such as IFN- γ and IL-4 respectively associated with disease severity, as well as the immunomodulatory cytokine TGF- β play a key role in limiting the pathology of malaria [12]. However, the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines is not fully understood, and some studies suggest the participation of both anti- and proinflammatory cytokines [11].

Another cytokines, the IL-17 is produced mainly by CD4+ T lymphocytes and is involved in the induction of other inflammatory cytokines. IL-17 may play an important role in immunity in individuals infected with *Plasmodium falciparum* [13]. It is also reported that there is an increase in cells producing IL-17 upon *P. vivax* infection [14], which suggests that this cytokine may be involved in host defense mechanisms.

Additionally, studies also report that in cases of severe malaria, erythrocyte modifications that may enhance the inflammatory response occur, resulting in changes in blood flow [15,16], thrombocytopenia [17,18], and activation and/or apoptosis of platelets [19].

In malaria, the development of the intracellular parasites is accompanied by a series of structural, biological, chemical, and functional changes in erythrocytes, as evidenced by changes in the cell membrane, which are responsible for the clinical and pathological symptoms. Changes in the adhesion and rheological properties of erythrocytes are very important because these traits are directly linked to the increased destruction of these cells, leading to anemia and the sequestration of cells [16]. Due to erythrocyte tropism and their modifications to the structure of the infected cells, *Plasmodium spp.* infections can play an important role in blood flow, particularly in the vascular system.

It is known that blood rheology can be influenced by the viscosity of the plasma, the erythrocytes, and the deformation of erythrocyte aggregation [20], which are largely the blood alterations caused by infections such as malaria. The blood from individuals infected with *P. falciparum* shows changes in the conformational and rheological properties of blood cells, resulting in the obstruction of capillary vessels and hampering the flow of erythrocytes [21].

However, the effect of cytokines modulation on rheological mechanisms during *P. vivax* infection has not yet been elucidated. Hemodynamic factors in malaria infections may be associated with changes in human blood flow and cytokine production. The present study analyzed the blood of individuals infected with *P. vivax* to determine 1) the cytokines profile and 2) modulation of pro-inflammatory and antiinflammatory cytokines on human blood flow.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The levels of cytokines and human blood flow were evaluated in a cross-sectional study. The study was carried out in endemic area of Legal Amazon at the Health System Program of Porto Velho, Rondônia State, Brazil, and Hospital Juruá - Malaria Center, Acre State, Brazil. Symptomatic patients diagnosed with malaria infection by a thick blood smear were asked to participate in the study. The samples were collected prior to starting treatment for malaria. The control group was composed of apparently healthy individuals, but were negative for malaria parasites as determined thick blood smear and had not reported any malaria episodes for at least one year [22].

Blood samples were collected from 32 individuals with *P. vivax* and 37 individuals with negative for *P. vivax*. The volunteers signed an informed consent form that was approved by the local Ethics Committee before entering the study.

Determination of parasitaemia

Parasitaemia was evaluated by a semiquantitative analysis of blood smear microscopy. Thick and thin blood films were stained with Giemsa and the *Plasmodium* species were identified and parasitaemia was determined by microscopic examination. Parasitaemia levels were estimated by counting the number of parasites (all species and stages) per 200 white blood cells (WBC) on blood films. If fewer than nine parasites were detected, 300 additional leucocytes were counted to obtain more precise results. All slides were examined by two well-trained microscopists from Brazilian Ministry of Health.

Serum sampling

We collected 8 mL of blood from each individuals in tubes without anticoagulant. We centrifuged the blood samples at 160 G for 15 min, until serum separation. Serum samples were stored individually at -80°C for further cytokines determination.

Quantification of cytokines

The serum samples were thawed, and cytokines IL-2,IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-17 were measured using a cytometric bead array [CBA, BD Biosciences] according to the manufacturer's procedures. A flow cytometer was used for these analyses [FACSCalibur, BD Biosciences, USA]. The data were analyses using the software FCAP Array 1.0.

The TGF- β concentrations were analyzed using an ELISA kit from Enzo® Life Sciences (United Kingdom). The reaction rates were measured by absorbance in a spectrophotometer with a 450 nm filter. The results were calculated using the standard curve and shown in pg/dL.

Treatment of blood with cytokines

Samples of 8 mL of blood from each individual in tubes with anticoagulant were collected for rheological analysis. To assess the effect of cytokines on human blood flow, a 580 μ L sample of blood were incubated with 20 μ L of cytokine [Sigma St Louis, USA; final concentration 100 pg/ml] for 1 hour at 37°C. This concentration was previously determined by dose response curve. The blood were used immediately for the rheological analysis.

Blood rheological parameters

The rheological parameters were measured using the Modular Compact Rheometer – MCR 102 [Anton Paar® GmbH, Ostfildern, Germany] according to França et al. [23]. In all experiments, 600 μ L of blood treated or not with cytokines were applied to the surface of a plate reader, followed by the removal of excess sample. The readings were obtained with a permanent control of gap measurements with TruGap™ in 0.099-mm increments and the measuring cell Toolmaster™ CP 50; precise temperature control was

achieved using T-Ready™ and the software Rheoplus V3.61. The graphics were obtained using Rheoplus. For the flow curves and viscosity, established parameters were based on the control of shear stress [τ] to 0 – 5 Pa for the upsweep and 5 – 0 Pa for downward curves. The tests were conducted under isothermal conditions at 37°C, with 75 readings analyzed.

For the viscosity curve under a temperature scan, established parameters were based on the fixed control shear stress [τ] to 1 Pa with a variation of temperature from 25 ± 0.1 to 45 ± 0.1 °C and a heating rate of 1°C/min. The parameters were recorded every 0.5 ± 0.1 °C, with 41 readings analyzed.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm standard deviation [SD]. Statistically significant differences were evaluated using t Student test. Differences were compared at the statistical significance of $p < 0.05$.

3- RESULTS

The mean and standard deviation for age were 28.7 ± 8.1 years in control group (non-infected) and 30.5 ± 10.5 years in infectious group. None of the infected individuals had been subjected to any specific malaria treatment. The parasitemia and cytokines profile were showed in Table 1.

Cytokines levels were assessed in the serum from individuals with *P. vivax* infection [Table 1]. Compared to the control group, the serum of the *P. vivax*-infected individuals exhibited higher IFN- γ and IL-17 concentrations and lower TGF- β levels.

The levels of IL2, IL4, IL-6, IL-10 and TNF were similar in both groups [Table 1]

The rheological profiles of the blood from individuals with or without *P. vivax* infections are shown in Figure 1A. There were no significant differences in blood flow

between the groups; the curve of blood flow for both groups began at the origin, ascended, and was nonlinear [Figure 1A].

Figure 1B presents the blood viscosity data for the individuals with or with *P.*

vivax infection. As shown by the curve, the viscosity of the blood was greater in the infected individuals than in the non-infected subjects regardless of temperature.

The analysis of blood viscosity with regard to shear rates at 37°C revealed that the viscosity of the blood from the infected patients was significantly greater than that of the non-infected individuals [Figure 1C].

For modulation of human blood flow were used only cytokine that showed abnormal serum. The effects of TGF- β , IFN- γ and IL-17 on blood viscosity in the experimental groups are described in Figure 2. The TGF- β and IFN- γ did not altered the viscosity of blood from the infected patients. The viscosity of the blood from the infected patients in the presence of both cytokines has remained significantly greater than that of the non-infected individuals [Figure 2A and 2B]. When the blood from both groups were treated with IL-17, the blood viscosity with regard to shear rates was similar between the groups. Incubation of the blood from infected individuals with IL17 reduced the viscosity to rates equivalent to the blood from the non-infected individuals [Figure 2C].

The viscosity of blood from individuals infected to *P. vivax* that were simultaneous incubated both TGF- β and IFN- γ is significantly greater than in noninfected individuals [Figure 3A]. The viscosity of the blood from the infected patients in the presence of IL-17 and TGF- β has remained significantly greater than that of the non-infected individuals [Figure 3 B], whereas the association of IL-17- IFN- γ reduced the viscosity to rates equivalent to the blood from the non-infected individuals [Figure 3C].

4- DISCUSSION

This study describes the cytokines levels in blood of individuals infected with *Plasmodium vivax* and the effects of cytokines on human blood flow.

P. vivax infections are characterized by low levels of parasitemia and are associated with a lower pathogenicity [24]. In this study, most of the individuals were in the early stage of infection, were not receiving any medication, and had moderate clinical symptoms and a low parasite load.

In malaria, the importance of the interaction between the concentrations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines to parasitemia has been reported [25]. Both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines are produced during *P. vivax* infection, though the correlation between the levels of parasitemia and cytokines remains controversial. Some studies report no correlation [22], whereas others show a dependency on the parasite load [26].

The role of cytokine signalling during malaria episodes is still far from being understood. Study showed that during the acute phase, *P. vivax* and *P. falciparum* patients had significantly higher interleukin (IL)-6, IL-8, IL-17, IFN- γ , tumour necrosis factor (TNF)- α , macrophage inflammatory protein-1 β and granulocyte-colony stimulating factor levels [22]. Here, although the subjects had a low parasite load, higher levels of IFN- γ and IL-17 and lower concentration of TGF- β were found in the serum of individuals infected with *P. vivax*.

Study showed that the highest IFN- γ *P. vivax* infection [27,28] was linked to increased in parasitaemia and the severity of the disease [28], whereas TGF- β have been correlated with acute malaria [29, 30]. TGF- β production is associated with reduced risk of clinical malaria in humans and symptomatic *P. falciparum* patients have lower than normal levels of circulating TGF- β [31,32] and the risk of febrile illness is associated with high ratios

of IFN- γ [33]. In this study, the lower concentrations of TGF- β in symptomatic *P. vivax* patients can be associated with acute phase of disease and these alterations may be associated with outcome of infection.

On the other hand, the importance of IL-17 and Th17 cells in serum has also been reported in infections by *Trypanosoma cruzi*, [34] and leishmaniasis [35] and coinfections of filariasis and malaria [13], suggesting the involvement of this cytokine in the pathogenesis of these infections.

The proinflammatory cytokine IL-17 was shown to induce the expression of several mediators of inflammation. However, the inflammatory response to malaria results in erythrocyte modifications that may enhance changes in blood flow [15,16]. In the present study, the rheological profile of the blood flow, independent of infection, did not show the characteristic behavior of ideal liquids. Instead of a straight line, there was a flow curve starting from the origin. This ascending and non-linear behavior starting at the origin characterizes non-Newtonian and pseudoplastic fluids under these shear conditions [36,37].

In the ascending and descending flows, the top curve is not superimposed on the lower; between them is an area of hysteresis, which defines the magnitude of the property of thixotropy [23]. The presence of a hysteresis area was observed in our study, suggesting that thixotropic properties are present in the blood stream of patients infected with *P. vivax*. The integrity of this property is important because it shows that the blood has the potential for reversible deformation under the various shear conditions that blood flow undergoes [38].

Rheological and immunological alterations play an important role in the pathogenesis of malaria [39], and changes in the cell and micro- and macrocirculation systems vary according to their shear rates [20].

The endothelium plays an important role in the pathophysiology of malaria. Parasitized erythrocytes adhere to the endothelium via several endothelial receptors to escape

removal by the spleen [21], and the presence of parasitized erythrocytes in the blood vessel contributes to the complications of malaria [40]. Endothelial activation is an early response in malaria and promotes the uptake of parasitized erythrocytes. However, excessive activation may contribute to the loss of the barrier function of the endothelium and organs [41], and cell adhesion depends strongly on the conditions of the blood microflow and the local cell walls due to the different rates of shear stress [42].

Body temperature also contributes to changes in the deformability of red blood cells, causing changes in the viscosity of blood flow [20]. Thus, the recovery of blood flow in a tissue depends on its structural and functional integrity and body temperature [43].

In this work evaluating the influence of temperature on the dynamic variation of the viscosity of blood, the blood from patients with malaria showed a greater viscosity over a wide temperature range and at physiological temperatures, which can trigger adaptation and deformation difficulties.

Structural changes in erythrocytes and increased viscosity have been reported in other diseases [44, 45]. In addition, the use of immunomodulatory agents has been related to the structural and functional recovery of cells [23,45,46] and enhanced blood viscosity [23], which may improve flow characteristics.

Considering that IL-17, IFN- γ and TGF- β levels showed altered in symptomatic *P. vivax* patients we verified the effects of these cytokines on viscosity. Only the treatment with IL-17 was associated with a reduction in the viscosity of the blood from individuals infected with *P. vivax*. Moreover, the clinical potential for the use of cytokines [47] and other agents [48,49] has been reported for a variety of diseases. This study is the first to demonstrate the effects of IL-17 on the viscosity of blood from patients with malaria.

Rheological parameters are used in cardiovascular research, reporting the detection of patients who are prone to cardiovascular disease, assessing hydration status in patients prior

to surgery or catheterization, and monitoring blood viscosity at low temperatures, such as in bypass surgery. In addition, the use of cytokines will facilitate the development of new therapies able to specifically reduce whole blood viscosity by influencing factors such as red blood cell deformability [50]. The immunomodulating effects of IL-17 on the viscosity of the blood of individuals infected with *P. vivax* may also extend to other malaria-causing parasites.

However, the simulation of disease chronicity demonstrated that the addition of IFN- γ , and a possible increase of TGF that plays an essential role in down-regulating the production of potentially pathogenic proinflammatory cytokines in the blood of symptomatic *P. vivax* patients caused a significant increase in the viscosity of the blood of these individuals, plus a major change in the behavior of the blood fluid. Interestingly, the addition of IL-17 and IFN γ reduction in the viscosity in the blood of symptomatic *P. vivax* patients at levels similar at the blood from asymptomatic individuals.

The biological significance of differences in serum cytokine levels and restoration of viscosity by IL-17 or by addition IL-17- IFN- γ in blood of symptomatic *P. vivax* patients noted in our study yet is unclear. More studies should be conducted in order to verify the mechanisms involved in changes of cytokines and their modulatory role during malaria infections. It is possible that cytokines by acting on blood cells reduce blood viscosity and determine the outcome of infection by *P. vivax*.

5- CONCLUSION

These data suggest that the effects of malaria on the viscosity of blood should be considered. From the clinical point of view, the increased levels of IL-17 in the serum of patients with malaria may be an adaptation of the organism itself to control changes in blood flow. In malaria the erythrocytes are more sensitive to osmotic shock and the reduction of

viscosity by cytokines can also be related to a possible mechanism immunoengineering to restore human blood flow of individuals with *Plasmodium vivax* infection.

6- ACKNOWLEDGMENTS

This research received grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Mato Grosso [FAPEMAT N°299032/2010], Conselho Nacional de Pesquisa [CNPq] and DINTER Program in Parasitology UFMT/UFMG - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Brazil.

The authors declare no conflict of interest and non-financial competing interests.

7- REFERENCE

- [1] C.J. Murray, L.C. Rosenfeld, S.S. Lim, K.G. Andrews, K.J. Foreman, D. Hargrett-Neef, N. Fullman, M. Naghavi, R. Lozano and A.D. Lopez, “Global malaria mortality between 1980 and 2010 a systematic analysis,” *The Lancet*, vol. 379, pp. 413-431, 2012.
- [2] P. Sagaki, V. Thanachartwet, V. Desakorn, D. Sahassananda, S. Chamnanchanunt, W. Chierakul, P. Pitisuttithum and P. Ruangkanchanasetr, “Clinical Factors for Severity of *Plasmodium falciparum* Malaria in Hospitalized Adults in Thailand,” *PLoS ONE*, vol. 8, e71503, pp. 1-8, 2013.
- [3] P. W. Gething, I. R. Elyazar and C. L. Moyes, “A long neglected world malaria map: *plasmodium vivax* endemicity in 2010,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, e1814, pp. 1-12, 2012.
- [4] T. Li, S. He, H. Zhao, G. Zhao and X.Q. Zhu, “Major trends in human parasitic diseases in China” *Trends Parasitology*, vol. 26, pp. 264–270, 2010.

-
- [5] A.C. Honorio-França, C.K.B. Ferrari, C.G Costa and E.L. França, “Malaria epidemiology in a legal Amazonian population, Brazil,” *International Journal Pharmaceutical and Biomedical Research*, vol. 2, pp. 115-118, 2011.
- [6] A.C.C. Aguiar, D.B. Pereira, N.S. Amaral, L. MARCO and A.U. Krettli, “*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* ex vivo susceptibility to antimalarials and gene characterization in Rondônia West Amazon, Brazil,” *Malaria Journal*, vol. 13, no. 73, pp. 2-7, 2014.
- [7] J. Chen, and X.S. Liu, “Development and function of IL-10 IFN- α -secreting CD4⁺ T cells,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 86, no. 6, pp. 1305-1310, 2009.
- [8] B.S. Franklin, P. Parrocheb, M.A. Ataídea, F. Lauwb, C. Ropert, R.B. Oliveira, D. Pereira, M.S. Tadaç, P. Nogueira, L.H.P. Silva, H. Bjorkbackad, D.T. Golenbocka and R.T. Gazzinellia, “Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of toll-like receptor expression and function”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, pp. 5789-5794, 2009.
- [9] E. Kabyemela, B.P. Gonçalves, D.R. Prevots, R. Morrison, W. Harrington, M. Gwamaka, J.D. Kurtis, M. Fried and P.E. Duffy, “Cytokine profiles at birth predict malaria severity during infancy”, *PLoS One*, vol. 8, pp.e77214, 2013.
- [10] F.Y. Zeyrek, M.A. Kurcer, D. Zeyrek and Z. Simsek, “Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey”, *Parasite Immunology*, vol. 28, pp.201–207, 2006.
- [11] V. A. Sortica, M. G. Cunha, M. D. Ohnishi, J. M. Souza, A. K. C. Ribeiro-DosSantos, N. P. C. Santos, S. M. Callegari-Jacques, S. E. B. Santos and M. H. Hutz, “IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with *Plasmodium vivax* malaria in Brazil,” *Malaria Journal*, vol. 11, pp. 1-7, 2012.
-

-
- [12] F.M. Omer, J.A.L. Kurtzhals and E.M. Riley, “Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF- β ?” *Parasitology Today*, vol. 16, pp.18– 23, 2000.
- [13] S. Metenou, B. Dembele, S. Konate, H. Dolo, Y.I. Coulibaly, A.A. Diallo, L. Soumaoro, M.E. Coulibaly, S.Y. Coulibaly, D. Sanogo, S.S. Doumbia, S.F. Traore, S. Mahanty, A. Klion and T.B. Nutman, “Filarial Infection Suppresses Malaria-Specific Multifunctional Th1 and Th17 Responses in Malaria and Filarial Coinfections,” *Journal of Immunology*, vol. 186, pp. 4725-4733, 2011.
- [14] L.L. Bueno, C.G. Morais, M.V. Lacerda, R.T. Fujiwara and E.M. Braga, “Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection,” *Acta Tropica*, vol. 123, pp. 53-57, 2012.
- [15] D. Cromer, S.E. Best, C. Engwerda, A. Haque and M. Davenport, “Where Have All the Parasites Gone? Modelling Early Malaria Parasite Sequestration Dynamics,” *PLoS One*, vol. 8, e55961, pp. 1-11, 2013.
- [16] N. Mohandas, and X. An, “Malaria and human red blood cells,” *Medical Microbiology and Immunology*, vol, 201, pp. 593–598, 2012.
- [17] M.V. Lacerda, M.P. Mourao, H.C. Coelho and J.B. Santos, “Thrombocytopenia in malaria: who cares?” *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, vol.106, pp.52–63, 2011.
- [18] D. Cox, and S. Mcconkey, “The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 67, pp. 557–568, 2010.
- [19] H.C.C. Coelho, S.C.P. Lopes, J.P.D. Pimentel, P.A. Nogueira, F.T.M. Costa, A.M. Siqueira, G.C. Melo, W.M. Monteiro, A. Malheiro and M.V.G. Lacerda, “Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* Malaria Is Related to Platelets Phagocytosis,” *PLoS One*, vol. 8, e63410, pp. 1-7, 2013.
-

-
- [20] M. Piagnerelli, K.Z. Boudjeltia, M. Vanhaeverbeek and J.L. Vincent, “Red blood cell rheology in sepsis,” *Intensive Care Medicine*, vol. 29, pp. 1052–1061, 2003.
- [21] D.A. Fedosov, B. Caswell and G.E. Karniadakis, “Wall Shear Stress-Based Model for Adhesive Dynamics of Red Blood Cells in Malaria,” *Biophysical Journal*, vol. 100, pp. 2084–2093, 2011.
- [22] R.N. Rodrigues-Da-Silva, J.C. Lima-Junior, B.P.F. Fonseca, P.R.Z. Antas, A. Baldez, F.L. Storer, F. Santos, D.M. Banic and J. Oliveira-Ferreira, “Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections,” *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 109, pp.154-162, 2014.
- [23] E.L. França, E.B. Ribeiro, E.F. Scherer, D.G. Cantarini, R.S. Pessoa, F.L. Franca and A.C. Honorio-França, “Effects of *Momordica charantia* L. on the blood rheological properties in diabetic patients,” *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 840379, 8 pages, 2014.
- [24] S. Pukrittayakamee, A. Chantra, J.A. Simpson, S. Vanijanonta, R. Clemens, S. Looareesuwan and N.J. White, “Therapeutic Responses to Different Antimalarial Drugs in Vivax Malaria,” *Antimicrobiology Agents Chemother*, vol. 44, pp. 1680-1685, 2000.
- [25] C. Jide, H. Ying, X. Wenyue and H. Fusheng, “Toll-like receptors, a double-edged sword in immunity to malaria” *Journal of Medical Colleges of PLA*, vol. 24, pp. 118124, 2009.
- [26] A.G. Costa, L.R.V. Antonelli, P.A.C. Costa, J.P.D. Pimentel, N.P. Garcia, A.M. Tarragô, M.P.S. Lopes dos Santos, P.A. Nogueira, M.I. O. Hekcmann, A. Sadahiro, A. Teixeira-Carvalho, O.A. Martins-Filho and A. Malheiro, “The Robust and Modulated Biomarker Network Elicited by the *Plasmodium vivax* Infection Is Mainly Mediated by the

IL-6/IL-10 Axis and Is Associated with the Parasite Load,” *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, pp. 1-11, 2014.

[27] T.S. Medina, S.P.T. Costa, M.D. Oliveira, A.M. Ventura, J.M. Souza, T.F. Gomes, A.C.R. Vallinoto, M.M. Póvoa, J.S. Silva and M.G. Cunha, “Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism”, *Malaria Journal*, vol.10, pp.e264, 2011.

[28] B.B. Andrade, A. Reis-Filho, S.M. Souza-Neto, J. Clarêncio, L.M. Camargo, A. Barral and M. Barral-Netto, “Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance”, *Malaria Journal*, vol. 9,pp.e13, 2010.

[29] F. Peyron, N. Burdin, P. Ringwald, J.P. Vuillez, F. Rousset and J. Banchereau, “High levels of circulating IL-10 in human malaria”, *Clinical Experimental Immunology*, vol. 95, pp.300-303, 1994.

[30] D.S. Hansen and L. Schofield, „Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?” *PLoS Pathogens*, vol.6, pp. e1000771, 2010.

[31] C. Wenisch, B. Parschalk, H. Burgmann, S. Looareesuwan and W. Graninger, “Decreased serum levels of TGFbeta in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria”, *Journal Clinical Immunology*, vol. 15, pp.69–73, 1995.

[32] D. Perkins, J. Weinberg and P. Kremsner, “Reduced interleukin-12 and transforming growth factor- β 1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity”, *The Journal of Infections Diseases*, vol.182, pp.988– 992, 2000.

[33] D. Dodo, F. Omer, J. Todd, B. Akanmori, K. Koram and E.M. Riley, “Absolute levels and ratios of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *P. falciparum* malaria”, *The Journal of Infections Diseases*, vol.185, pp.971–979, 2002.

-
- [34] Y. Miyazaki, S. Hamano, S. Wang, Y. Shimanoe, Y. Iwakura, H. Yoshida, "IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection," *Journal of Immunology*, vol. 185, pp. 1150-1157, 2010.
- [35] O. Bacellar, D. Faria, M. Nascimento, T.M. Cardoso, K.J. Gollob, W.O. Dutra, P. Scott and E.M. Carvalho, "Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 200, pp. 75-78, 2009. [36] C. Verdier, J. Etienne, A. Duperray and L. Preziosi, "Review: Rheological properties of biological materials" by C. Verdier, J. Etienne, A. Duperray, L. Preziosi. Venue: C.R. *Physique*, vol. 10, pp.790–811, 2009.
- [37] R. Rosencranz and S.A. Bogen, "Clinical Laboratory Measurement of Serum , Plasma , and Blood Viscosity", *American Journal of Clinical Pathology*, vol.125, pp.78–86, 2006.
- [38] C.J. Pipe and G.H. Mckinley, "Microfluidic rheometry", *Mechanics Research Communications*, vol. 36, pp.110–120, 2009.
- [39] H. Bow, I.V. Pivkin, M. Diez-Silva, S. J. Goldfless, M. Dao, J.C. Niles, S. Suresh and J. Han, "A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria," *Lab on a Chip*, vol. 11, pp. 1065-1073, 2011.
- [40] H. Kim, L.K. LU, Z. Erdman, L. Serghides, K. Zhong, A. Dhabangi, C. Musoke, C. Gerard, C. Cserti-Gazdewich, W.C. Liles and K.C. Kain, "Functional roles for C5a and C5Ar, but not C5I2, in the pathogenesis of human and experimental cerebral malaria, *Infection and Immunity*, vol. 82, pp. 371–379, 2014.
- [41] L.H. Miller, D.I. Baruch and O.K. Doumbo, "The pathogenic basis of malaria," *Nature*, vol. 415, pp. 673–679, 2002.
-

-
- [42] M. Antia, T. Herricks and P.K. Rathod, "Microfluidic modeling of cell-cell interactions in malaria pathogenesis," *PLoS Pathogens*, vol. 3, e99, pp. 0939-0948, 2007.
- [43] J.C. Bischof and X. HE, "Thermal stability of proteins", *The New York Academy of Sciences*, vol.1066, pp.12–33, 2005.
- [44] J. Higgins, D. Eddington, S. Bhata and Mahadevan, L. "Sickle cell vasoocclusion and rescue in a microfluidic device," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, pp. 20496-20500, 2007.
- [45] E.F. Scherer, A.C. Honorio-França, C.CP. Hara, A.P.B. Reinaque, M.A. Cortês and E.L. França, "Immunomodulatory Effects of Poly(ethylene glycol) Microspheres Adsorbed with Nanofractions of *Momordica charantia L.* on Diabetic Human Blood Phagocytes", *Science Advance Material*, vol. 3, pp. 687–694, 2011.
- [46] D.L.G. Fagundes, E.L. França, C.CP. Hara and A.C. Honorio-França, "Immunomodulatory Effects of Poly (Ethylene Glycol) Microspheres Adsorbed with Cortisol on Activity of Colostrum Phagocytes", *International Journal of Pharmacology*, vol. 8, pp.510–518, 2012.
- [47] D.L.G. Fagundes, E.L. França, G. Morceli, M.V.C. Rudge, I.M.P. Calderon and A. C. Honorio-França, "The Role of Cytokines in the Functional Activity of Phagocytes in Blood and Colostrum of Diabetic Mothers", *Clinical and Developmental Immunology* vol. 2013, Article ID 590190, 8 pages, 2013.
- [48] M.M. Possamai, A.C. Honorio-França, A.P..B. Reinaque, E.L. França and P.C.S. Souto, "Brazilian Propolis: A Natural Product that Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes", *BioMed Research International*, vol. 2013, pp.1–9, 2013.
- [49] A.P..B. Reinaque, E.L. França, E.F. Scherer, M.A. Cortês and A.C. HonorioFrança, "Natural material adsorbed onto a polymer to enhance immune function", *Drug Design Development and Therapy*, vol. 6, pp.209–216, 2012.
-

[50] A.Q. Cowan, D.J. Cho and R.S. Rosenson, "Importance of Blood Rheology in the Pathophysiology of Atherothrombosis", *Cardiovascular Drugs Therapy*, vol.26, pp. 339–348, 2012.

Table 1- Parasitaemia and cytokines concentrations (pg/mL) in blood of individuals infected with *Plasmodium vivax*.

| Parameters | Non- infected | Infected |
|--------------------------------|---------------|------------------|
| Parasitaemia | Absent | 1746.90 ± 728.20 |
| IL-2 | 5.46 ± 1.25 | 5.84 ± 0.80 |
| IL-4 | 5.70 ± 1.80 | 5.82 ± 1.26 |
| IL-6 | 3.97 ± 2.48 | 3.76 ± 2.97 |
| IL-10 | 3.13 ± 0.80 | 8.10 ± 7.75 |
| TNF-α | 2.35 ± 1.14 | 1.33 ± 0.11 |
| IFN-γ | 3.88 ± 0.93 | 4.86 ± 0.34* |
| IL-17 | 3.62 ± 0.83 | 4.44 ± 0.60* |
| TGF-β | 32.20 ± 8.90 | 7.60 ± 6.60* |

The results represent the mean and SD. *p<0.05 indicates intergroup differences.

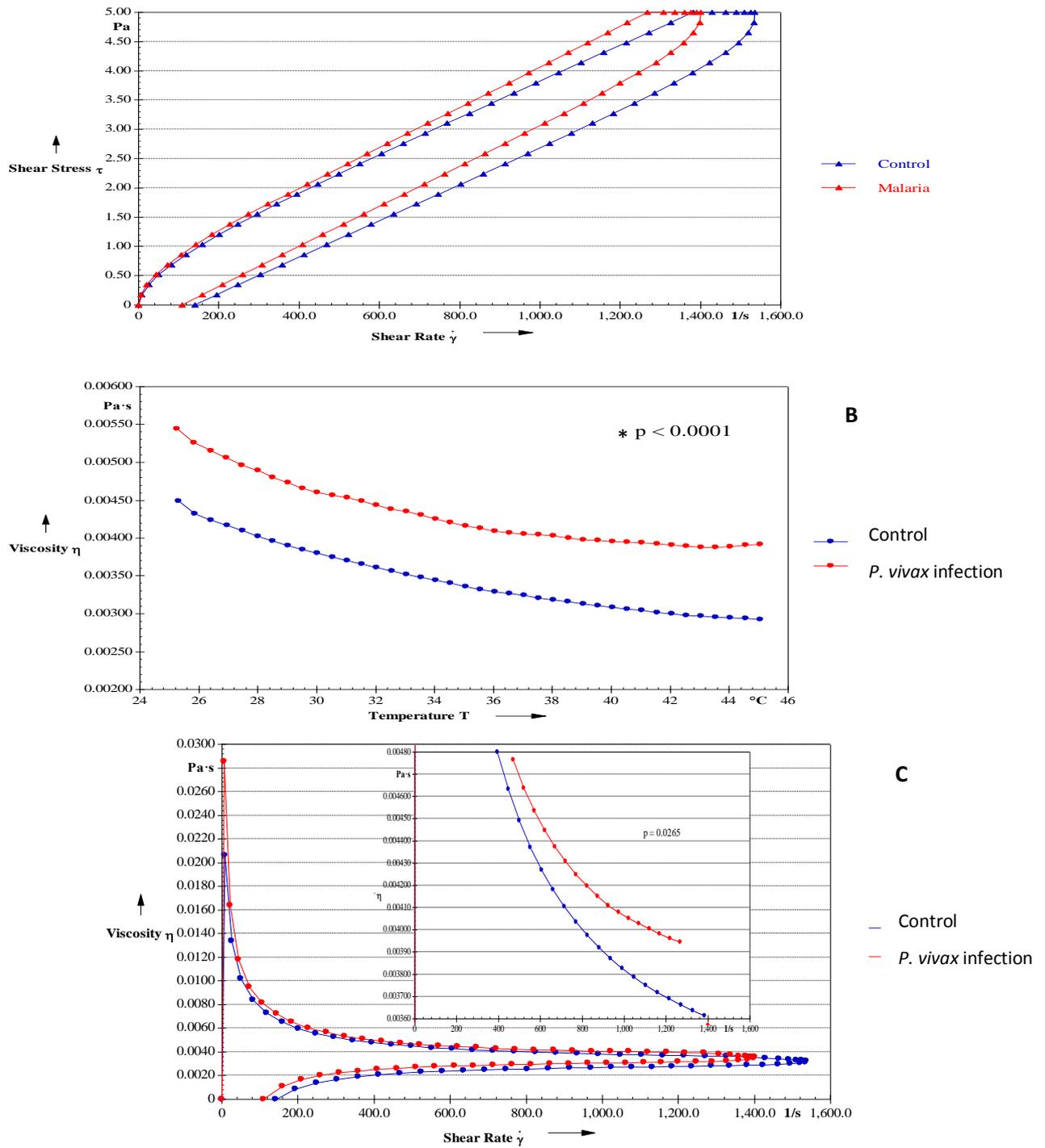


Figure 1. Flow curve of whole blood from individuals infected or not with *P. vivax* (A). Viscosity curve (B) of whole blood from individuals infected or not with *P. vivax* under a temperature scan [25 at 45°C]. Viscosity curve of whole blood from individuals infected or not with *P. vivax* (C). *amplification of the region with statistical values.

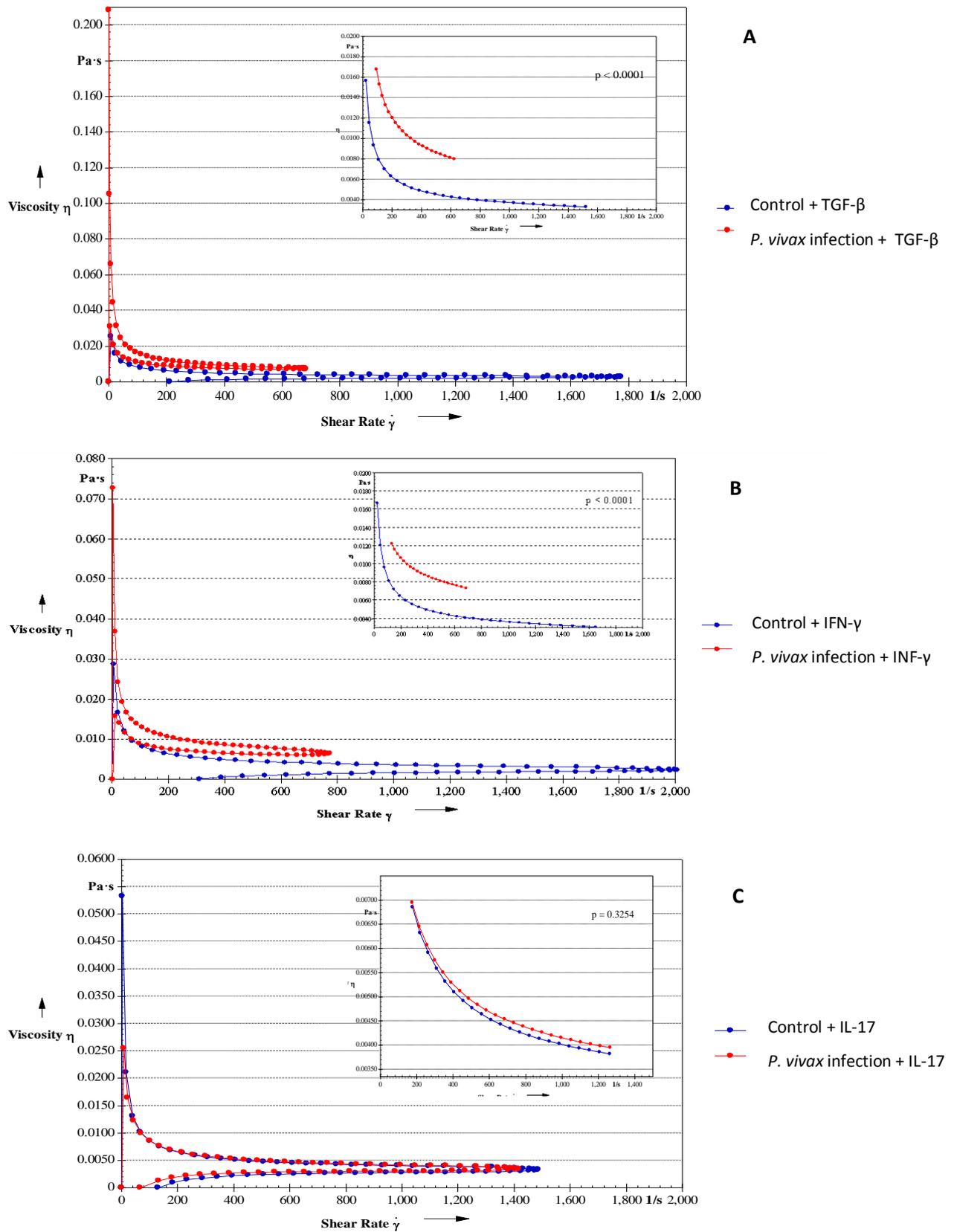


Figure 2 .Viscosity curve of whole blood from individuals infected or not with *P. vivax* after treatment with TGF- β (A), IFN- γ (B) and IL-17 (C). Amplification of the region with statistical values.

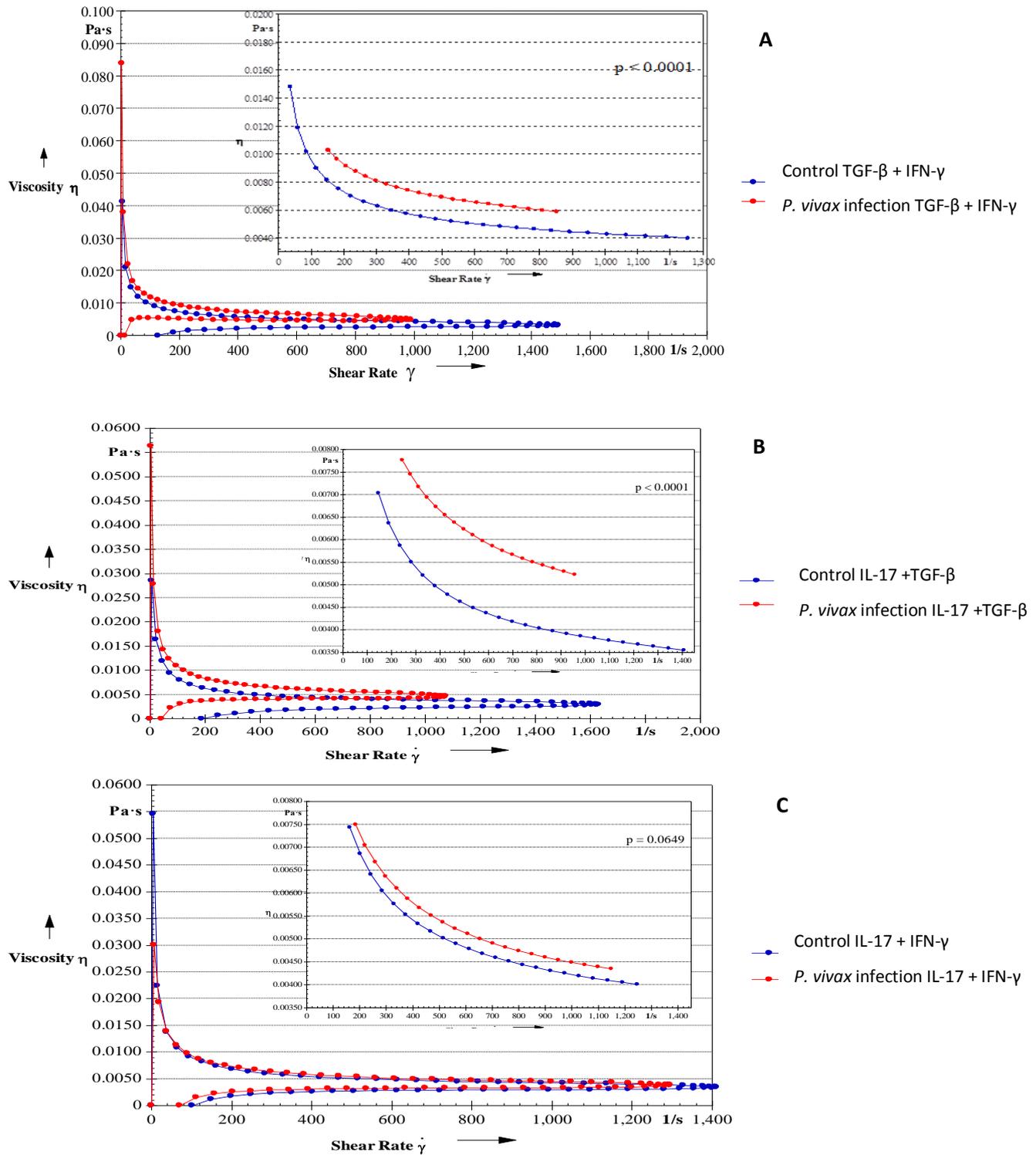


Figure 3. Viscosity curve of whole blood from individuals infected or not with *P. vivax* after treatment with TGF- β plus IFN- γ (A), IL-17 plus TGF- β (B) and IL-17 plus IFN- γ (C). Amplification of the region with statistical values.