

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

**Natália Satchiko Hojo de Souza**

**ASPECTOS DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA  
NA INFECCÃO POR *Plasmodium vivax***



**Belo Horizonte**  
**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

**Natália Satchiko Hojo de Souza**

**ASPECTOS DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA NA INFECÇÃO  
POR *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Parasitologia.

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara  
Coorientadora: Dra. Lilian Lacerda Bueno

Belo Horizonte  
2016

## Colaboradores

Dr. Dhelio Batista Pereira  
Centro de Pesquisa em Medicina Tropical  
Universidade Federal de Rondônia

Dr. Mauro Shugiro Tada  
Centro de Pesquisa em Medicina Tropical  
Universidade Federal de Rondônia

Dra. Graziela Maria Zanini  
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu  
Departamento de Parasitologia  
Universidade Federal de Minas Gerais

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu, por me receber no LIGP e pela agradável convivência.

À Dra. Maria de Fátima Leite, pelos conselhos e por compartilhar seu entusiasmo pela ciência.

Aos meus pais, Edina e Mauro, que sempre me incentivaram a cursar o doutorado, apoiaram, dedicaram e torceram para que eu atingisse meus objetivos.

À minha irmã Fernanda e meu cunhado Daniel, pelo apoio e conselhos durante esse percurso.

À tia Rô, tio It, tio Deco e tia Doce, pelo apoio, torcida, conselhos e paciência em ouvir todas as histórias boas e ruins desses últimos quatro anos.

Ao Tiago e Mari pela amizade e auxílio nos experimentos.

Aos meus amigos Miche, Lí, Sebastian, Gabi, Hugo, Carol, Fernando, Tatá, Anny, Thaisinha e Gui pela amizade, conselhos e conversas.

Aos demais amigos do Laboratório Imunologia e Genômica de Parasitos pela amizade e companheirismo ao longo desses três anos.

À Sibeles e Sumara pela amizade, apoio e disponibilidade a qualquer momento.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pela amizade.

Aos colegas da Comissão do V e VI Encontro de Pesquisa em Parasitologia.

Aos pacientes que disponibilizaram amostras para a execução dos experimentos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa ao longo deste período.

*"Quando um cientista distinto e experiente diz que algo é possível, é quase certo que tenha razão. Quando ele diz que é impossível, está muito provavelmente equivocado"*

(Arthur Charles Clarke)

## RESUMO

A malária é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo responsável por elevada taxa de morbidade (além dos casos de mortalidade principalmente entre crianças), gerando sério impacto sobre o desenvolvimento socioeconômico de regiões endêmicas. No Brasil, a principal espécie causadora de malária é o *Plasmodium vivax*. Estudos envolvendo a resposta imunológica de pacientes infectados por *P. vivax* podem revelar aspectos importantes para o entendimento da patogênese da doença e oferecer subsídios para o desenvolvimento de vacinas, bem como de drogas mais efetivas para tratamento. Com o objetivo de analisar a imunomodulação durante infecção por *P. vivax*, no presente estudo, os seguintes aspectos foram investigados: (i) verificar a ocorrência de apoptose em células T CD4<sup>+</sup> e as vias de sinalização envolvidas; (ii) determinar o perfil fenotípico de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e o possível papel dessas células na modulação da resposta imune; (iii) verificar a contribuição de células T $\gamma\delta$  como fonte de IL-17; (iv) caracterizar a rede de citocinas/quimiocinas plasmáticas durante a fase aguda e pós-tratamento na malária *P. vivax*. No estudo de apoptose, observou-se que indivíduos infectados por *P. vivax* apresentavam maior percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> tanto em início de apoptose quanto em apoptose tardia. Em relação às vias de sinalização de apoptose, foram observados aumento na expressão gênica de TNFRSF1B e Bid, e redução de Bcl-2 em células T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos infectados, sugerindo que a morte celular ocorre por via extrínseca, com posterior ativação da via intrínseca. A avaliação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> demonstrou que indivíduos infectados por *P. vivax* apresentavam números reduzidos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> naïve e de memória e redução no número de células T CD8<sup>+</sup> de memória central. Em relação à produção de citocinas, o número de células T CD8<sup>+</sup> naïve expressando IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 estava reduzido durante a infecção, enquanto que o número de células de memória expressando TNF- $\alpha$  e IL-10 estava aumentado. Correlações positivas entre o número de células expressando IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  e o número de células expressando IL-10 foram observadas nos indivíduos infectados independentemente da subpopulação de células CD8<sup>+</sup>, sugerindo um perfil imunomodulador. Em relação às células T $\gamma\delta$ , foi observado uma redução dessas células durante o estágio sanguíneo da malária *P. vivax*. Além disso, durante a infecção também foi observada redução da subpopulação TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> bem como das células T $\gamma\delta$  Th1-like. Outro achado importante foi a ausência de linfócitos T $\gamma\delta$  Th17-like tanto no grupo infectado quanto no grupo controle, demonstrando que essas células não constituem fonte principal de IL-17 durante a infecção. O estudo referente ao perfil de citocinas/quimiocinas demonstrou níveis mais elevados de mediadores inflamatórios, como IL-6, IL-17, CCL2 e CXCL10, bem como de anti-inflamatórios/imunomoduladores, como IL-10 e TGF- $\beta$  nos indivíduos infectados por *P. vivax*. Além disso, níveis reduzidos da citocina inflamatória IFN- $\gamma$  foram observados nos indivíduos infectados. Níveis de IL-6, IL-10, CCL2, CXCL10 e IFN- $\gamma$  foram restabelecidos após o tratamento antimalárico. Pacientes com alta parasitemia, bem como de indivíduos com mais de 5 episódios prévios de malária, apresentaram níveis plasmáticos elevados de IL-10. Em relação a análise da rede de correlação dos 11 mediadores avaliados, identificou-se uma forte correlação positiva entre IL-6 e CCL2, independente da parasitemia e número de infecções prévias. Além disso, pacientes com baixa parasitemia mostraram associação do eixo IL-6/CCL2 com IFN- $\gamma$ , enquanto que associação desse eixo com IL-10 foi observada em pacientes com alta parasitemia. As diferentes abordagens utilizadas evidenciam que durante infecção sintomática por *P. vivax* há redução significativa de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e T $\gamma\delta$ , bem como modulação da resposta pró-inflamatória.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium vivax*, resposta imune

## ABSTRACT

Malaria is a disease caused by a protozoa of the genus *Plasmodium*, accounting for high morbidity rate (besides the cases of mortality especially among children), resulting in serious impact on the socioeconomic development in endemic regions. In Brazil, the main species causing malaria is *Plasmodium vivax*. Studies involving immune response of patients infected with *P. vivax* can reveal important aspects for understanding the pathogenesis of disease and provide insight to the development of vaccines and more effective drugs for treatment. Aiming to analyze the immune modulation during *P. vivax* infection in the present study, the following aspects were investigated: (i) verify the occurrence of apoptosis in CD4<sup>+</sup> T cells and the signaling pathways involved; (ii) determine the phenotypic profile of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and the possible role of these cells in modulating the immune response; (iii) verify the contribution of  $\gamma\delta$  T cells as the cellular source of IL-17; (iv) characterize the network of plasma cytokines/chemokines during the acute phase and after-treatment in *P. vivax* malaria to identify potential biomarkers of active disease. In the study of apoptosis, it was observed that individuals infected with *P. vivax* showed a higher percentage of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in both early apoptosis and late apoptosis. Regarding to apoptosis signaling pathways it was observed an increase in TNFRSF1B and Bid gene expression and reduction in Bcl-2 in CD4<sup>+</sup> T cells from infected individuals, suggesting that cell death occurs by extrinsic pathway, with subsequent activation of the intrinsic pathway. The evaluation of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes demonstrated that individuals infected with *P. vivax* showed reduced numbers of naïve and memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and reduction in the number of central memory CD8<sup>+</sup> T cells. Concerning to cytokine expression, the number of naïve CD8<sup>+</sup> T cells expressing IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 was reduced during infection, whereas the number of memory cells expressing TNF- $\alpha$  and IL-10 was increased. Positive correlations between the number of cells expressing IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ , and the number of cells expressing IL-10 were observed in infected individuals regardless the CD8<sup>+</sup> subpopulation, suggesting an immunomodulatory profile. Regarding to  $\gamma\delta$  T cells it was observed a reduction of these cells during blood-stage of vivax malaria. Furthermore, during infection it was also observed a reduction in TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> subset as well as Th1-like  $\gamma\delta$  T cells. Another important finding was the absence of Th17-like  $\gamma\delta$  T lymphocytes in both groups, demonstrating that these cells do not constitute major source of IL-17 during infection. The study of the cytokine/chemokine profiles in *P. vivax* patients showed higher levels of inflammatory mediators such as IL-6, IL-17, CCL2 and CXCL10, as well as anti-inflammatory/immunomodulators mediators, such as IL-10 and TGF- $\beta$ . Furthermore, reduced levels of the inflammatory cytokine IFN- $\gamma$  were observed in infected individuals. The IL-6, IL-10, CCL2, CXCL10 and IFN- $\gamma$  levels were restored after antimalarial treatment. Patients with high parasitaemia, as well as, individuals with more than 5 previous malaria episodes, exhibited elevated plasma levels of IL-10. Concerning the analysis of 11-mediators correlation network, a strong positive correlation between IL-6 and CCL2 was revealed, regardless of parasitaemia

and number of previous infections. In addition, patients with low parasitaemia showed an association of IL-6/CCL2 axis with IFN- $\gamma$ , whereas the association of this axis with IL-10 was observed in patients with high parasitaemia. The different approaches used evidence the occurrence of significant reduction of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$ T cells, as well as, modulation of the pro-inflammatory response during *P. vivax* infection.

Keywords: malaria, *Plasmodium vivax*, immune response



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fatores que propiciam a ocorrência de malária humana_____	20
Figura 2: Interação de fatores que contribuem para a ocorrência de malária humana _____	20

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACAD – morte autônoma de célula T ativada  
AICD – morte celular induzida por ativação  
AIF – fator indutor de apoptose  
APC – célula apresentadora de antígenos  
Bcl-2 – *B cell lymphoma-2*  
Bid – *BH3 interacting-domain death agonist*  
BIRC – *Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing*  
BSA – *albumina* do soro bovino  
CBA – *Cytometric Bead Array*  
CCL2 – *chemokine (C-C motif) ligand 2*  
CCL5 – *chemokine (C-C motif) ligand 5*  
CCR7 – receptor de quimiocina tipo 7  
CD1c – cluster de diferenciação 1  
CD3 – cluster de diferenciação 3  
CD4 – cluster de diferenciação 4  
CD4<sup>+</sup> – linfócitos T auxiliares  
CD8 – cluster de diferenciação 8  
CD8<sup>+</sup> – linfócito T citotóxico  
CD25 – cluster de diferenciação 25  
CD27 – cluster de diferenciação 27  
CD28 – cluster de diferenciação 28  
CD45 – cluster de diferenciação 45  
CD62L – L-selectina  
CD80 – cluster de diferenciação 80  
CD86 – cluster de diferenciação 86  
CD95 – receptor de morte Fas  
CD95L – ligante do receptor de morte Fas  
cDNA – DNA complementar  
CMSP – células mononucleares do sangue periférico  
CSP – circumsporozoíto  
CTL – linfócito T citotóxico  
CTLA4 – *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

CXCL10 – *C-X-C motif chemokine 10*  
DC – célula dendrítica  
DISC – complexo de sinalização de indução de morte  
DMSO – dimetilsulfóxido  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*  
FADD – domínio de morte associado a Fas  
Fas (CD95) – receptor de morte Fas  
FasL (CD95L) – ligante do receptor de morte Fas  
FBS – soro fetal bovino  
FMO – *fluorescence minus one*  
Foxp3 – *forkhead box P3*  
GAPDH – *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*  
GATA-3 – *trans-acting T-cell-specific transcription factor*  
GITR – *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*  
GM-CSF – fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos  
GPI – glicosilfosfatidilinositol  
HLA-DR – *human leukocyte antigen*  
HSPG – proteoglicanas de heparan sulfato  
IAP – proteína inibidora de apoptose  
IFN- $\gamma$  – interferon gamma  
IL-1 $\beta$  – interleucina 1 beta  
IL-2 – interleucina 2  
IL-4 – interleucina 4  
IL-5 – interleucina 5  
IL-6 – interleucina 6  
IL-7R – receptor de interleucina 7  
IL-8 – interleucina 8  
IL-10 – interleucina 10  
IL-12 – interleucina 12  
IL-12p40 – interleucina 12-cadeia 40  
IL-13 – interleucina 13  
IL-17 – interleucina 17

IL-17A – interleucina 17A  
IL-17F – interleucina 17F  
IL-21 – interleucina 21  
IL-22 – interleucina 22  
IL-23 – interleucina 23  
IL-27 – interleucina 27  
IP-10 – *interferon gamma-induced protein 10*  
iTreg – linfócito T regulador induzido  
LT- $\alpha$  – linfotoxina- $\alpha$   
MCP-1 – *monocyte chemotactic protein 1*  
MHC – complexo principal de histocompatibilidade  
MIP-1 $\beta$  – *macrophage inflammatory proteins*  
mRNA – RNA mensageiro  
NF $\kappa$ B – *factor nuclear kappa B*  
NK – célula Natural Killer  
NKT – célula T Natural Killer  
NLR – receptor do tipo NOD  
NO – óxido nítrico  
nTreg – linfócito T regulador natural  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OPD – dicloridrato de o-fenilenodiamina  
PBS – *phosphate buffered saline*  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
PMA – forbol 12-miristato 13-acetato  
PMIF – fator inibidor de migração de macrófagos  
PRR – receptor de reconhecimento padrão  
qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa  
RANTES – *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*  
RNA – ácido ribonucleico  
ROR $\gamma$ t – *related orphan receptor gamma*  
sFas – Fas solúvel  
SMAC – *second mitochondria-derived activator of caspases*  
T-bet – *T-box transcription factor TBX2*

t-Bid – *truncated Bid*

T<sub>CM</sub> – linfócito T de memória central

TCR – receptor de célula T

T<sub>EM</sub> – linfócito T de memória efetora

TGF- $\beta$  – *transforming growth factor beta*

Th – célula T auxiliar

Th1 – linfócito T auxiliar do tipo 1

Th2 – linfócito T auxiliar do tipo 2

Th3 – linfócito T auxiliar do tipo 3

Th17 – linfócito T auxiliar do tipo 17

TLR – receptor do tipo *Toll*

TNFR – receptor de TNF

TNFR1 – receptor de TNF do tipo 1

TNF- $\alpha$  – *tumor necrosis factor alpha*

Tr1 – linfócito T regulatório do tipo 1

TRAIL – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TRAIL-R – *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*

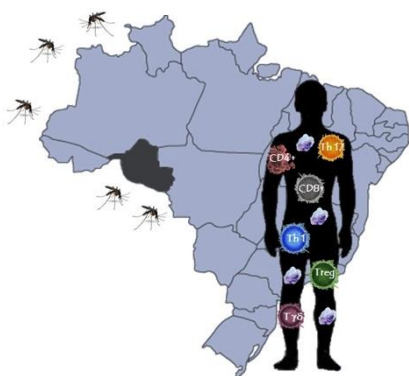
Treg – linfócito T regulador

T $\gamma\delta$  – linfócito T que apresenta um TCR $\gamma\delta$

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 Malária	17
1.2 Ciclo do parasito	21
1.3 Subpopulações de células T	21
1.3.1 Linfócitos T $\gamma\delta$	23
1.3.2 Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	25
1.4 Resposta imune na Malária	26
1.4.1 Perfil de citocinas/quimiocinas na infecção por <i>Plasmodium vivax</i>	30
1.5 Vias de sinalização celular	34
1.5.1 Via de sinalização intracelular de apoptose	34
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 População de estudo	42
4.2 Obtenção das amostras	42
4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	42
4.4 Obtenção das amostras de plasma	43
4.5 Avaliação da ocorrência de apoptose em linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	43
4.6 Caracterização da via envolvida na apoptose de linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	43
4.7 Fenotipagem das subpopulações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	44
4.8 Determinação dos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas	44
4.9 Caracterização dos linfócitos T $\gamma\delta$	45
4.10 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	48
5.1 Apoptose e vias de sinalização em linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	49
5.2 Perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	56
5.3 Caracterização dos linfócitos T $\gamma\delta$	65
5.4 Níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas	86
6 DISCUSSÃO	118

7 CONCLUSÕES _____	125
REFERÊNCIAS _____	127
APÊNDICE A – VIAS DE SINALIZAÇÃO _____	138
APÊNDICE B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA _____	145
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA _____	148



## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA



# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, que é transmitido ao hospedeiro humano pela picada do mosquito fêmea infectado pertencente ao gênero *Anopheles*. Cinco espécies podem causar malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (SABATANI et al., 2010). A espécie *P. falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença, sendo predominante no continente africano, enquanto que a espécie *P. vivax* é menos grave, porém mais amplamente espalhada no mundo (WHO, 2014). No Brasil, predominam as espécies *P. vivax* (84%) e *P. falciparum* (16%) (WHO, 2015). A região amazônica (composta pelos estados Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), abrangendo 807 municípios, é endêmica para a doença (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Infecção por *P. malariae* e *P. ovale* é rara, conforme apontam os dados epidemiológicos apresentados pelo Ministério da Saúde (SIVEP-Malária, 2014).

A malária constitui um sério problema de saúde pública em países do sudeste da Ásia, Ásia Central, África subsaariana e América Latina. Estimativas feitas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam a ocorrência 214 milhões de casos de malária no mundo em 2015, causando 438 mil mortes, representando uma queda de 18% e 48%, respectivamente, em relação a 2000. No Brasil, foram registrados 142.801 casos da doença na região amazônica em 2015, uma queda de cerca de 77% em relação a 2000, quando foram registrados 613.241 casos (SIVEP – Malária, 2015).

Apesar de todas as ações governamentais implementadas nos anos de 1960/1970, direcionadas para eliminação do mosquito transmissor usando o inseticida DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) nas habitações, em conjunto com tratamento dos casos com cloroquina, a malária continua sendo um sério problema de saúde na região amazônica.

A migração massiva de pessoas para a região amazônica e formação de assentamentos desorganizados, patrocinados pelo governo e visando a colonização dessa região nos anos de 1970/1980, concorreram para o aumento do número de casos de malária, que saltou de 52 mil casos em 1970 para 578 mil casos em 1989, conforme apontam Oliveira-Ferreira e colaboradores (2010).

Diante do número alarmante de casos e também por orientação da OMS, um Plano Nacional de Controle da Malária foi instituído, resultando numa significativa redução de casos

de malária *P. falciparum*, mas que, paradoxalmente, aumentou os casos de malária vivax. Em 1999, a ocorrência de malária vivax atingiu o pico de 637 mil casos, o maior número já registrado no Brasil (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). A redução do número de casos de malária *P. falciparum* ocorreu em função do rápido diagnóstico e tratamento dos indivíduos infectados, o que impediu o parecimento de gametócitos (após o 8º dia de sintomatologia) e a transmissão da malária *P. falciparum*. Já para o *P. vivax*, o aparecimento de gametócitos na corrente sanguínea ocorre à partir do 3º dia de infecção, possibilitando a transmissão para o inseto vetor antes mesmo do indivíduo apresentar sintomatologia, contribuindo para a disseminação da malária *P. vivax* (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011).

O Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária, instituído desde então, levou ao controle da doença, porém entre 2003-2005 verificou-se o recrudescimento do número de casos em algumas localidades da Amazônia, atribuído a possíveis fatores como: desflorestamentos visando a transformação das áreas para atividades agropecuárias, mudanças climáticas e ocupação humana desordenada das periferias das grandes cidades (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Iniciativas globais de combate à malária, orientadas pela OMS, tendo como eixos principais prevenção, diagnóstico rápido, e tratamento adequado baseado em derivados de artemisina, têm proporcionado significativa redução do número de casos.

Constituem medidas preventivas recomendadas: uso de mosquiteiros impregnados com inseticida, pulverização residual do interior das moradias com inseticida, uso de telas nas portas e janelas, uso de roupas que protejam as pernas e braços, drenagem de criadouros do vetor, melhoria da moradia e das condições de trabalho, além do uso racional da terra (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Quanto ao diagnóstico rápido, sem dúvida, este foi um importante fator que levou à redução dos casos de malária falciparum, conforme já discutido, contribuindo para a diminuição da taxa de mortalidade devido à doença.

Entretanto, essas medidas correm o risco de tornarem menos efetivas, visto que em cinco países da região sudeste da Ásia (Camboja, República Democrática Popular do Laos, Mianmar e Vietnã) foi detectada resistência à artemisina em malária *P. falciparum*. Resistência à artemisina em malária *P. vivax* também foi detectada em 10 países e sendo assim, atualmente são recomendadas terapias de combinação baseada em derivados de artemisina (pironaridina artesunato (Pyramax®); atovaquona + cloridrato de proguanil (Malarone®) + primaquina). Além disso, há relatos de resistência do mosquito a uma ou mais classes de inseticidas em diversos países (WHO, 2014).

Por se tratar de uma doença de origem complexa, em que múltiplos fatores se entrelaçam e concorrem para sua ocorrência, a erradicação da malária ainda parece estar longe de ser alcançada. De fato, o clima tropical e subtropical favorável à proliferação do mosquito vetor (no Brasil, as principais espécies de *Anopheles* envolvidas na transmissão da malária são: *An. darlingi*, *An. albitarsis* e *An. aquasalis*), as intervenções humanas nos ecossistemas (desmatamentos, ocupação desordenada do território, etc.) e as condições socioeconômicas desfavoráveis (condições de vida precárias, processos migratórios) aumentam a probabilidade de contato entre vetor e hospedeiro humano, provocando maior número de casos. Conforme dados da OMS (2014), dentre os países endêmicos para malária, aqueles economicamente mais pobres, com infraestrutura de sistemas de saúde mais precários, são mais afetados pela doença.

Na região das Américas, cerca de 120 milhões de pessoas em 21 países endêmicos para malária estão em risco de contaminar-se, apesar de 13 deles já terem alcançado o Objetivo de Desenvolvimento do Milênio, de reduzir em 75% o número de casos até 2015, comparativamente aos números de 2000. Para o Brasil, as projeções indicam que o país conseguirá atingir esse objetivo (WHO, 2014).

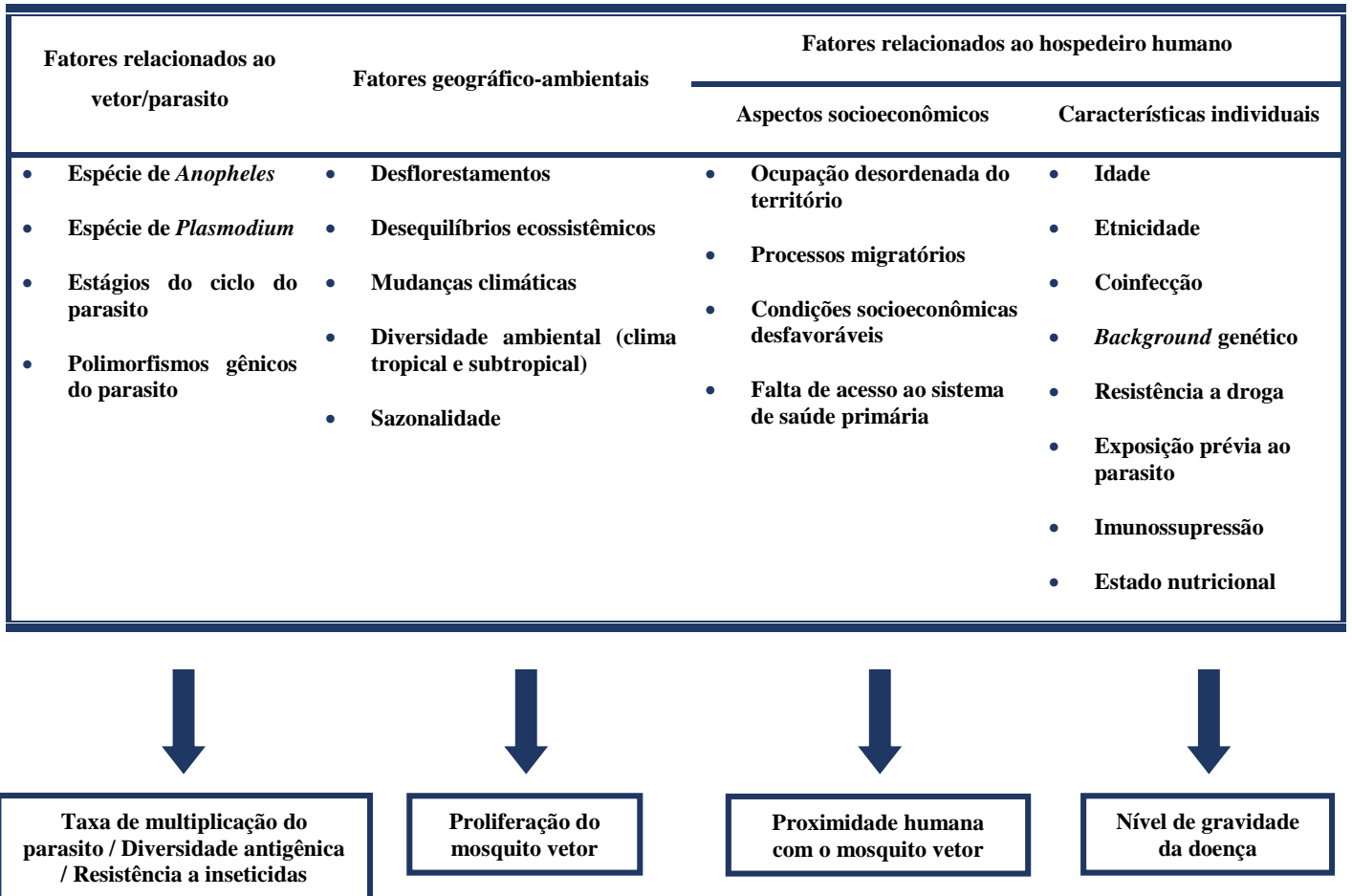
A malária é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. A elevada taxa de morbidade, além dos casos de mortalidade, principalmente de crianças abaixo de cinco anos de idade, que compromete a vida social e a capacidade produtiva dos indivíduos acometidos pela doença, gera sérios impactos sobre o desenvolvimento socioeconômico de regiões endêmicas.

Dentre os fatores inerentes à interação parasito-hospedeiro humano, que podem levar a diferentes níveis de gravidade da doença (assintomático, sintomático não-complicado e sintomático grave), há aqueles relacionados ao parasito e outros que são próprios do hospedeiro (STRUIK; RILEY, 2004). A espécie de parasito, seu potencial antigênico e capacidade de indução de resposta imune constituem aspectos relevantes relacionados ao parasito. Por outro lado, fatores relacionados ao hospedeiro, tais como idade, coinfeção, número de infecções e características genéticas, são determinantes que também podem influenciar o resultado da doença (STRUIK; RILEY, 2004; ANSTEY et al., 2009; ANDRADE; BARRAL NETO, 2011). Na Figura 1 são enumerados os principais fatores que favorecem a ocorrência de malária e a Figura 2 ilustra as interações entre estes fatores.

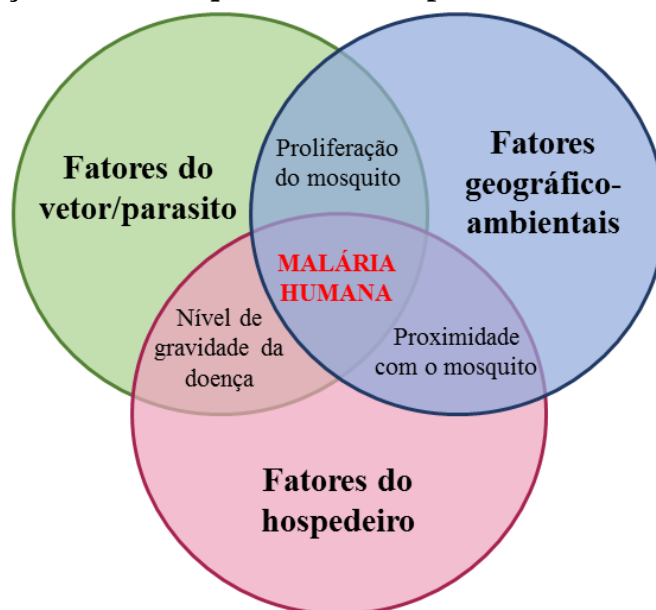
Levando em consideração a complexa rede de interações que culmina em diferentes níveis de gravidade da infecção causada pelo parasito da malária humana e a inexistência de vacina efetiva para proteção de longo prazo contra a doença, estudos da resposta imunológica

de indivíduos infectados podem revelar aspectos importantes para o entendimento da patogênese e oferecer subsídios para o desenvolvimento de vacinas eficazes, assim como para o desenvolvimento de drogas e abordagens terapêuticas mais efetivas.

**Figura 1: Fatores que propiciam a ocorrência de malária humana**



**Figura 2: Interação de fatores que contribuem para a ocorrência de malária humana**



## 1.2 Ciclo do parasito

O ciclo de vida do *Plasmodium* é complexo e envolve o mosquito vetor e o hospedeiro humano. Durante uma picada, o mosquito *Anopheles* fêmea infectado injeta esporozoítos na pele do hospedeiro humano, alguns deles atingem a corrente sanguínea e outros os vasos linfáticos (HAFALLA et al., 2011). Aqueles que atingem a corrente sanguínea são transportados até o fígado, onde são capazes de atravessar diversos hepatócitos até invadir um em definitivo (MOTA et al. 2001).

Dentro dos hepatócitos ocorre a replicação mitótica assexual, originando esquizontes exo-eritrocíticos num prazo de 5-7 dias, um processo que é assintomático. Posteriormente, o hepatócito infectado libera vesículas, denominadas merossomos, no interior dos vasos sanguíneos (STURM et al., 2006). Esses merossomos repletos de merozoítos se rompem liberando milhares de merozoítos para a corrente sanguínea que, por sua vez, invadem eritrócitos, onde se multiplicam por replicação mitótica assexual dando origem a esquizontes eritrocíticos contendo mais de 20 merozoítos. Após ruptura dos esquizontes, merozoítos podem invadir novos eritrócitos, onde se replicam e formam novos esquizontes, resultando num padrão cíclico síncrono de infecção de estágio sanguíneo (STRUIK; RILEY, 2004).

A ruptura de esquizontes é associada a sintomas clínicos, tais como febre, calafrios, dor de cabeça, dor nas articulações, que podem ser resultantes da resposta imune induzida pela infecção. Além disso, anemia, trombocitopenia, síndrome respiratória aguda e coma (malária cerebral) são complicações que caracterizam um quadro mais grave da doença (STRUIK; RILEY, 2004; ANSTEY et al., 2009; STANISIC et al., 2013).

Alguns merozoítos eritrocíticos se diferenciam em gametócitos macho e fêmea, que podem ser captados pelo mosquito durante a picada, transformando-se em gametas extracelulares. No tubo digestivo do mosquito, ocorre a fusão dos gametas macho e fêmea, formação do zigoto móvel (oocineto), penetração na parede do aparelho digestivo e formação de oocistos. Por divisão meiótica do oocisto, ocorre a formação de esporozoítos haplóides infectantes que migram para as glândulas salivares do mosquito, dando continuidade ao ciclo (STRUIK; RILEY, 2004; STANISIC et al., 2013).

## 1.3 Subpopulações de células T

As células T CD4<sup>+</sup> são essenciais para a proteção do hospedeiro contra inúmeros patógenos, entretanto são também responsáveis pela mediação de doenças autoimunes.

Ao entrar em contato com antígenos derivados de patógenos, células T CD4<sup>+</sup> naïve podem se diferenciar em subpopulações de células T auxiliares (Th), que secretam distintas

séries de citocinas. Estas subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> diferenciadas atuam em conjunto com as células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas e linfócitos B na defesa do hospedeiro. Porém, essas mesmas células podem, em determinadas circunstâncias, serem responsáveis pela patogênese da autoimunidade, asma, alergia e possivelmente câncer, exercendo papéis críticos ainda não completamente elucidados (O'SHEA et al., 2010).

As células Th1 expressam o fator de transcrição T-bet, produzem principalmente IFN- $\gamma$  e IL-2, e estão envolvidas na proteção do organismo contra patógenos intracelulares. A diferenciação destas células é induzida pela IL-12 e IFN- $\gamma$ , que são produzidos principalmente pelas células dendríticas. Por outro lado, as células Th2 expressam o fator de transcrição GATA-3 e produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, conferindo proteção contra patógenos extracelulares, incluindo helmintos. A diferenciação das células Th2 é induzida pela IL-4 (O'SHEA et al., 2010; AWASTHI; KUCHROO, 2009).

A contrarregulação da resposta imune é realizada pelas células T reguladoras (Treg), produtoras de IL-10, e requerem TGF- $\beta$  para sua diferenciação via expressão do fator de transcrição Foxp3. Além de controlar a resposta imune, a IL-10 limita, ao mesmo tempo, possíveis danos teciduais que podem resultar do efeito colateral de exuberante resposta de células T efectoras (BELKAID; TARBELL, 2009).

Dois tipos principais de subpopulações de células Treg foram identificados: i) células Treg Foxp3<sup>+</sup>, que se desenvolvem no timo e ocorrem naturalmente (nTreg); ii) células Treg induzíveis (iTreg), que se desenvolvem na periferia a partir de células T CD4<sup>+</sup> naïve, após exposição a citocinas reguladoras, drogas imunossupressoras ou células apresentadoras de antígeno (BELKAID; TARBELL, 2009).

Em síntese, durante infecções crônicas, as células Treg são extremamente importantes para monitorar a resposta imune do hospedeiro e evitar injúria tecidual prejudicial ao organismo. Um desbalanço de regulação pode resultar em patologia imunomediada.

O paradigma de polarização Th1/Th2 no processo de diferenciação das células T CD4<sup>+</sup>, proposto há aproximadamente 25 anos por Mosmann e Coffman (1989), tem sido repensado mediante a identificação de novas subpopulações de células Th, em especial as células Th17 (O'SHEA et al., 2010; AWASTHI; KUCHROO, 2009).

A diferenciação das células Th17 a partir de células T CD4<sup>+</sup> naïve é induzida pela ação concomitante de TGF- $\beta$  e IL-6, e possivelmente, IL-1 $\beta$ . A IL-23 é necessária para a amplificação (células T de memória) e estabilização de fenótipo Th17 das células efectoras, as quais passam a produzir principalmente IL-17, IL-21 e IL-22 (ROMAGNANI, 2008;

AWASTHI; KUCHROO, 2009; ONISHI; GAFFEN, 2010). A IL-17 é a principal citocina produzida, sua família é composta por seis membros (IL-17A a IL-17F) e, geralmente, a IL-17A é referida apenas como IL-17.

Cabe destacar, porém, que a IL-17A e IL-17F não são exclusivamente produzidas pelas células Th17. Vários tipos celulares da imunidade inata, tais como macrófagos, células dendríticas (DCs), células Natural Killer (NK), células T Natural Killer (NKT) e células T $\gamma\delta$  também secretam essas citocinas (ONISHI; GAFFEN, 2010).

### 1.3.1 Linfócitos T $\gamma\delta$

Linfócitos T apresentam em sua superfície um receptor denominado de TCR (receptor de célula T). Este receptor é composto por duas moléculas, formando um heterodímero, classificados como  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . A maioria dos linfócitos T presentes no sangue periférico dos indivíduos (90%) possui cadeia  $\alpha\beta$ , enquanto que a cadeia  $\gamma\delta$  está presente em aproximadamente 6-8% dos linfócitos T (WORKU et al., 1997).

O repertório dos linfócitos T  $\gamma\delta$  é bem limitado, existindo seis variações da cadeia  $\gamma$  (V $\gamma$ 1, 3, 4, 5, 8 e 9) e três variações da cadeia  $\delta$  (V $\delta$ 1, 2 e 3). Em humanos, os linfócitos T $\gamma\delta$  presentes no sangue periférico são principalmente do tipo V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2, representando 75% das células T $\gamma\delta$  circulantes (DIELI et al., 2001). Outra característica fenotípica marcante dos linfócitos T $\gamma\delta$  é a ausência de CD4 e CD8 (CIOFANI et al., 2010).

Linfócitos T naïve tornam-se ativados mediante o reconhecimento de um antígeno apresentado por uma célula apresentadora de antígenos (APC). Esse reconhecimento é realizado através da interação do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) presente na APC e o TCR presente no linfócito T. Posteriormente, ocorre o reconhecimento do segundo sinal através de moléculas co-estimuladoras (CD28 e CD80/CD86).

Células T $\gamma\delta$  possuem características próprias que as diferenciam dos demais linfócitos. Este tipo de linfócito é capaz de reconhecer ligantes de origem não peptídica em seu TCR independente de MHC. Além disso, essa subpopulação celular é capaz de detectar moléculas indutoras de estresse por via dependente ou não de TCR (BONNEVILLE et al., 2010). Por outro lado, estudos já demonstraram que células V $\delta$ 1 são capazes de reconhecer a proteína CD1c. Esta proteína faz parte de uma importante família composta por quatro membros (CD1a-d), que possui estrutura similar ao MHC de classe I, e representa uma terceira classe de moléculas especializadas na apresentação antígenos, compostos por lipídios e glicolipídios (DIELI et al., 2001; BONNEVILLE et al., 2010).

Alguns estudiosos consideram as células T $\gamma\delta$  como sendo célula de imunidade inata, visto que elas se apresentam como primeira linha de defesa contra infecções por patógenos e, além disso, possuem características semelhantes às aquelas apresentadas por células do sistema imune inato (INOUE et al., 2012; BONNEVILLE et al., 2010). Células T $\gamma\delta$  possuem diferentes funções efetoras que vão desde a produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-4, IL-5, IL-13, TGF- $\beta$  e IL-10) e moléculas efetoras (perforina e granzima), até a participação em morte celular pela indução de receptores como CD95 e TRAILR (BONNEVILLE et al., 2010).

Células T $\gamma\delta$  podem apresentar polaridade assim como os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. A interação do TCR e/ou CD27 das células T $\gamma\delta$  torna-as semelhante aos linfócitos Th1. Por outro lado, a ausência dessa interação leva ao desenvolvimento de células T $\gamma\delta$  com perfil de Th17, com ativação de ROR- $\gamma$ t (BONNEVILLE et al., 2010; RIBOT et al., 2009).

Em relação à infecção por *Plasmodium*, estudos realizados tanto com humanos quanto em modelos experimentais (camundongos) demonstraram um aumento significativo na população de linfócitos T $\gamma\delta$  (DIELI et al., 2001; LANGHORNE, 1996; WORKU et al., 1997; INOUE et al., 2012; LI et al., 2012).

Durante a fase aguda da malária, o percentual de células T $\gamma\delta$  pode atingir de 30-40% do total de linfócitos T circulantes no sangue periférico (DIELI et al., 2001; LANGHORNE, 1996) e essa população pode persistir por um período de 3-4 meses após a redução da parasitemia (LANGHORNE, 1996).

Estudo recente realizado com indivíduos chineses infectados por *Plasmodium vivax*, demonstrou um aumento do percentual de células T $\gamma\delta$  (V $\delta$ 2) em indivíduos na fase aguda da malária quando comparados com indivíduos não infectados (JANGPATARAPONGSA et al., 2012). Por outro lado, Worku e colaboradores (1997) não observaram diferença no percentual de células T $\gamma\delta$  em indivíduos infectados por *Plasmodium vivax*, mas verificaram aumento no percentual de células T $\gamma\delta$  expressando CD25, e também de células T $\gamma\delta$  expressando HLA-DR, quando comparados com indivíduos não infectados.

A expansão e a ativação de células T $\gamma\delta$  também foram observadas no sangue periférico de indivíduos não infectados quando estimulados *in vitro* com extrato bruto de *Plasmodium falciparum* (DIELI et al., 2001). Outros estudos *in vitro* demonstraram que a expansão das células T $\gamma\delta$ , na malária, é dependente da presença de células T CD4<sup>+</sup> (INOUE et al., 2012; DIELI et al., 2001).



Na malária, essa subpopulação celular pode produzir IFN- $\gamma$ , GM-CSF (fator estimulante de colônia monócito-granulócito), TNF- $\alpha$  e pequenas quantidades de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  após ativação (LANGHORNE, 1996).

### **1.3.2 Linfócitos T CD8<sup>+</sup>**

Linfócitos T CD8<sup>+</sup> são importantes células mediadoras da imunidade adaptativa e atuam contra patógenos virais e bacterianos, bem como protozoários. A ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ocorre por meio da interação entre TCR presente na superfície destas células e MHC de classe I, presente na superfície de uma célula apresentadora de antígenos (HARTY et al., 2000). Dessa forma, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são ativados em resposta a patógenos intracelulares.

Considerando que o TCR dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> interage com o MHC de classe I e, que todas as células nucleadas expressam MHC de classe I, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem responder contra patógenos intracelulares na maioria dos tecidos e controlar diversas infecções (HARTY et al., 2000).

Após o reconhecimento de um antígeno, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> tornam-se antígeno-específicos e sofrem expansão clonal, resultando numa subpopulação de linfócitos T citotóxicos efetores (CTLs) (WILLIAMS et al., 2006). Ao serem ativados, os CTLs são capazes de induzir a lise da célula infectada através de dois mecanismos: i) pela ação de grânulos contendo perforina que, ao ser liberada pelo CTL, irá formar poros na membrana da célula alvo; ii) pela expressão de FasL (CD95L), que pode interagir com a molécula Fas (CD95) e induzir apoptose da célula alvo (HARTY et al., 2000).

Os CTLs também são capazes de produzir citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e quimiocinas que auxiliam no recrutamento de células efectoras como macrófagos e neutrófilos. Além disso, as citocinas produzidas por CTLs podem interferir diretamente na expressão gênica do patógeno, bem como restringir sua replicação intracelular (HARTY et al., 2000).

Após a resolução da infecção, a maior parte das CTLs efectoras morrem, restando apenas algumas células de memória de longa duração. Normalmente, a população de memória representa 5-10% da população efetora (WILLIAMS et al., 2006).

De acordo com Sallusto e colaboradores (2004), os linfócitos de memória podem ser divididos em duas populações: linfócitos T de memória central (T<sub>CM</sub>) e linfócitos T de memória efetora (T<sub>EM</sub>). Os linfócitos T<sub>EM</sub> migram para o local da inflamação e, imediatamente executam sua ação efetora. Já os linfócitos T<sub>CM</sub> são encontrados em órgãos linfóides secundários e têm

pouca ou nenhuma ação efetora, mas rapidamente proliferam e se diferenciam em células efetoras em resposta à estimulação antigênica (SALLUSTO et al., 2004).

Em humanos, os linfócitos T<sub>CM</sub> expressam os receptores CD45RO, CCR7 e CD62L, sendo os dois últimos característicos de células naïve, conferindo-lhes a capacidade de extravasamento pelas vênulas endoteliais e migração para órgãos linfóides secundários. Já os linfócitos T<sub>EM</sub> perdem os receptores CCR7 e CD62L e passam a expressar receptores de quimiocinas e moléculas de adesão, que permitem a migração até o local da inflamação (SALLUSTO, 2004).

Em relação à infecção por *Plasmodium*, a maioria dos estudos envolvendo linfócitos T CD8<sup>+</sup> é relacionada à fase pré-eritrocítica da malária. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são capazes de eliminar hepatócitos infectados por ação direta (ação da perforina) ou indireta (ação de IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ ) (HAFALLA, 2011; RILEY; STEWART, 2013).

Na fase eritrocítica da malária, os parasitos invadem eritrócitos onde então se multiplicam. Por serem células anucleadas, os eritrócitos não expressam MHC e sendo assim, acreditava-se que linfócitos T CD8<sup>+</sup> não teriam ação durante essa fase (STRUIK; RILEY, 2004; HISAEDA, 2005). Entretanto, estudos recentes realizados em modelo murino sugerem que linfócitos T CD8<sup>+</sup> possuem ação durante a fase sanguínea da malária (IMAI et al., 2010; HORNE-DEBETS, 2013). Imai e colaboradores (2010) retiraram linfócitos T CD8<sup>+</sup> de animais previamente infectados com *P. yoelli* e transferiram essas células para camundongos não-infectados. Os camundongos receptores foram então transfectados com eritrócitos parasitados e observou-se que estes animais eram capazes de controlar a parasitemia, demonstrando a importância dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na fase sanguínea da malária.

#### **1.4 Resposta imune na Malária**

A malária é uma doença causada pelo parasito *Plasmodium*, que possui um ciclo multi-estágio extremamente complexo no hospedeiro humano, dificultando o desenvolvimento de imunidade protetiva efetiva e de longo prazo. Nos diferentes estágios do *Plasmodium*, ocorre ativação do sistema imune do hospedeiro humano que, de modo geral, é capaz de induzir proteção parcial, mas não imunidade estéril ao patógeno.

Durante repasto sanguíneo do mosquito fêmea, esporozoítos são injetados na pele do hospedeiro e são capazes de atingir os vasos sanguíneos ou linfáticos. Entretanto, estudos experimentais demonstraram que aproximadamente 60% dos parasitos permanecem no local da picada (MENÁRD et al., 2013). Em torno de 15% dos parasitos conseguem invadir os vasos

linfáticos (MENÁRD et al., 2013) e são drenados para linfonodos, onde são reconhecidos por DCs, ativando (*priming*) células T e B naïve ou reativando células de memória (RILEY; STEWART, 2013). Já os parasitos que invadem os vasos sanguíneos (~25%) conseguem alcançar o fígado, onde atravessam os capilares sinusóides e penetram nos hepatócitos. Essa penetração é mediada pela interação entre a proteína CSP do circun-esporozoíto e proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs) presente na superfície dos hepatócitos (HAFFALA et al., 2011; MENÁRD et al., 2013). Anticorpos anti-esporozoíto são produzidos, porém são necessários elevados títulos para imobilizar todos os esporozoítos, que rapidamente (algumas horas) invadem hepatócitos (STANISIC et al., 2013).

A invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos leva a formação de um vacúolo parasitóforo, onde ocorre a conversão de esporozoíto para merozoíto (estágio pré-eritrocítico). Estes, por sua vez, multiplicam-se por esquizogonia gerando milhares de merozoítos. Entretanto, durante a migração dos esporozoítos pelos hepatócitos, até a formação do vacúolo parasitóforo, ocorre a liberação de componentes citosólicos das células do hospedeiro, que são reconhecidos por receptores da imunidade inata (TLRs), contribuindo para a ativação da via NF $\kappa$ B e levando à produção de óxido nítrico (NO) e eliminação do parasito (HAFFALA et al., 2011). Além disso, células da imunidade adaptativa como os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, que foram ativadas nos linfonodos, são capazes de reconhecer antígenos apresentados por hepatócitos (via MHC de classe I) e eliminar os parasitos por ação direta (perforina) ou indireta (produção de IFN- $\gamma$ ) (HAFFALA et al., 2011; STANISIC et al., 2013). Entretanto, imunidade pré-eritrocítica mostra-se incompleta, já que indivíduos vivendo em área endêmica são continuamente reinfectados e desenvolvem novas infecções (STANISIC et al., 2013).

Após liberação dos merossomos e seu rompimento dentro dos vasos sanguíneos, os merozoítos liberados são capazes de invadir eritrócitos. Os eritrócitos parasitados são reconhecidos por DCs através de receptores de reconhecimento padrão (PRR) (RILEY; STEWART, 2013; STANISIC et al., 2013). A sinalização via esses receptores leva a secreção de citocinas inflamatórias, responsáveis pela diferenciação de linfócitos Th1 (IL-12) e também aquelas que contribuem para a patogênese da doença (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ). A apresentação de antígenos peptídicos ocorre via MHC, levando a ativação de linfócitos T e, de antígenos lipídicos (via CD1) que ativam células NKT. Uma vez ativadas, essas células passam a secretar a citocina inflamatória IFN- $\gamma$ , responsável por induzir macrófagos esplênicos a fagocitar eritrócitos infectados opsonizados e eliminar os parasitos através da produção de NO (RILEY; STEWART, 2013).

A produção de anticorpos por linfócitos B é dependente da ação dos linfócitos Th1 (RILEY; STEWART, 2013; STANISIC et al., 2013). Produção de anticorpos anti-merozoítos capazes de aglutinar e opsonizar o parasito, inibindo a invasão de eritrócitos, constitui também um importante mecanismo de imunidade protetiva, porém a indução e manutenção de resposta de célula B de memória de longo prazo ainda é um desafio. Uma vez ativados, macrófagos também passam a secretar citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Essa resposta inflamatória é responsável pela indução de moléculas de adesão no endotélio, que contribuem para o sequestro de eritrócitos infectados. Porém, a resposta inflamatória é controlada por citocinas moduladoras (IL-10 e TGF- $\beta$ ) produzidas tanto por Tregs quanto pelos macrófagos ativados (RILEY; STEWART, 2013).

Embora muitos dos aspectos da resposta imune ao parasito da malária sejam conhecidos, ainda há lacunas que desafiam o desenvolvimento de uma vacina segura e efetiva que possa conferir proteção de longo prazo. A diversidade genética e polimorfismos de genes codificadores de antígenos imunodominantes nas populações de parasitos, associados ao complexo ciclo multi-estágio (com replicação intracelular que protege o parasito de reconhecimento imune) constituem possíveis estratégias de evasão imune que conferem vantagens ao parasito (RILEY; STEWART, 2013).

Células da imunidade inata, tais como NK e T $\gamma\delta$ , parecem exercer importante papel na produção inicial de IFN- $\gamma$ . Indivíduos que não conseguem montar uma resposta inicial rápida (em 24 horas) e forte de IFN- $\gamma$  pelas células NK apresentam reduzida produção tardia desta citocina por células T $\gamma\delta$  ou T $\alpha\beta$  (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003).

Os efeitos benéficos do IFN- $\gamma$  na resolução da infecção malárica, entretanto, podem levar à excessiva ativação da cascata inflamatória, com produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1, citocinas estas associadas com malária *P. falciparum* grave (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003). Portanto, o IFN- $\gamma$  pode mediar tanto proteção quanto imunopatologia.

Estudos em modelos experimentais e também em humanos demonstram que altos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  estão associados com malária *P. falciparum* grave, sendo que níveis mais baixos desta citocina são vistos em pacientes assintomáticos (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003). Um estudo comparativo entre indivíduos infectados por *P. falciparum* e *P. vivax* demonstrou que o IFN- $\gamma$  plasmático estava elevado, com níveis similares na malária sintomática causada por ambas as espécies de parasito, enquanto que indivíduos assintomáticos para infecção *P. vivax* apresentaram níveis desta citocina semelhante aos de indivíduos não-infectados. Por outro lado, indivíduos infectados por *P. vivax* mostraram níveis muito mais

elevados de IL-10, sugerindo a ocorrência de imunomodulação da resposta inflamatória (GONÇALVES et al., 2012).

Atuando sinergicamente com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  induz a produção de NO e outros radicais livres que provocam a morte do parasito da malária. Na malária cerebral, a LT- $\alpha$  (linfotoxina- $\alpha$ ) parece ser a responsável pela indução da patologia, já que elevadas concentrações desta citocina em camundongos levaram ao desenvolvimento da doença, enquanto que camundongos deficientes de LT- $\alpha$  mostraram-se resistentes, embora tenham sucumbido devido à hiperparasitemia e anemia grave (ENGWERDA et al., 2002).

Quanto à participação das citocinas reguladoras TGF- $\beta$  e IL-10 na malária, a ativação precoce das células T produtoras destas citocinas na fase inicial da infecção pode inibir a resposta inflamatória necessária para remoção de eritrócitos parasitados, aumentando o risco de elevada parasitemia e patologia grave. Por outro lado, a ativação relativamente tardia dessas células pode permitir o controle da parasitemia e, ao mesmo tempo, evitar o início da imunopatologia. Nesse contexto, destaca-se o importante papel das citocinas moduladoras de resposta inflamatória induzida pela infecção que, se descontrolada, pode levar à patologia causada pela exacerbada resposta inflamatória (FINNEY et al., 2010; ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003).

A IL-10 pode ser produzida por células mielóides e linfóides, tais como células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> reguladoras naturais (nTreg), células T reguladoras induzidas (iTreg), células T produtoras de IL-10 (Tr1), bem como monócitos (COUPER, et al., 2008).

Estudos experimentais e mesmo clínicos sugerem que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> produtoras de IL-10 desempenham um importante papel no resultado da infecção por *Plasmodium*, ao controlar os efeitos das citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Possivelmente, as manifestações clínicas na malária grave representam efeitos colaterais da exuberante resposta inflamatória dirigida para eliminar o parasito (RILEY et al., 2006). Portanto, o balanço de citocinas pró- e anti-inflamatórias é de grande importância para a resolução bem sucedida da infecção.

Devido ao papel controverso das células T reguladoras na malária que, embora proteja o hospedeiro de patologia imunomediada também favorece a persistência do parasito, três artigos de revisão foram publicados no mesmo ano, com títulos sugestivos atribuídos às células T reguladoras: “heróis ou vilãs” (SCHOLZEN et al., 2010), “amigas ou inimigas” (FINNEY et al., 2010) e “aliada do hospedeiro ou do parasito” (HANSEN; SCHOLFIELD, 2010).

Em resumo, diversos estudos sugerem que a resolução bem-sucedida da infecção na malária depende da capacidade do hospedeiro em induzir sequencialmente níveis adequados de

citocinas pró-inflamatória e reguladora nos estágios chaves da infecção. Dessa forma, o delicado e coordenado balanço entre respostas inflamatórias e anti-inflamatórias parece ser o fator determinante no resultado da doença (FINNEY, et al., 2010; ARTAVANIS-TSAKONAS, et al., 2003; HANSEN; SCHOFIELD, 2010).

#### **1.4.1 Perfil de citocinas/quimiocinas na infecção por *Plasmodium vivax***

Embora a malária causada por *P. vivax* seja considerada menos grave do que a decorrente de infecção por *P. falciparum*, recentes evidências sugerem que o nível de gravidade tenha sido subestimado. Além disso, deve-se considerar as complicações causadas por comorbidades que resultam em maior gravidade do quadro clínico devido ao *P. vivax* (LACERDA et al., 2012).

Atualmente, tem-se verificado um crescente interesse em pesquisas relacionadas à malária *P. vivax* em seus diversos aspectos: epidemiologia, caracterização clínica dos pacientes, resistência a drogas, vacinas e patogênese da doença (LACERDA et al., 2012). O entendimento da patogênese da malária *P. vivax*, sobretudo da imunopatogênese, poderá trazer aportes importantes, oferecendo subsídios para pesquisa de vacinas, assim como de novos alvos para drogas imunoterapêuticas.

Da mesma forma que na malária *P. falciparum*, o resultado da infecção na malária *P. vivax* parece depender do repertório de citocinas induzidas durante a fase aguda da doença. Fatores do parasito como também do hospedeiro podem influenciar a complexa rede de citocinas que são ativadas ou suprimidas durante a infecção. Sendo assim, variações na manifestação clínica da doença e nível de gravidade podem estar associadas ao balanço final entre citocinas pró-inflamatórias e reguladoras. Nessa perspectiva, inúmeros estudos de associação entre perfil de citocinas e parâmetros clínicos alterados, tais como anemia, trombocitopenia, enzimas hepáticas, além do grau de parasitemia, têm sido realizados (PERKINS et al., 2011; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2011; ANSTEY et al., 2009).

Em relação à resposta imune de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax*, há poucos estudos. Ainda que existam alguns dados contraditórios, parece haver um consenso em relação à citocina IL-10, cujo nível plasmático mostra-se elevado na forma sintomática da malária *P. vivax*, em comparação com os de indivíduos não infectados (ZEYREK et al., 2006; FERNANDES et al., 2008; JAIN et al., 2010; ANDRADE et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; MEDINA et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012; MENDONÇA et al., 2013; COSTA et al., 2014; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014.).

Entretanto, uma questão em aberto refere-se à fonte celular da IL-10 e TGF- $\beta$ . Embora células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (nTreg) sejam importantes fontes produtoras de IL-10, estudos recentes têm ressaltado o papel potencial de outros tipos celulares produtores de IL-10 e TGF- $\beta$ : células Tr1 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>) produtoras de IL-10, células Th3 (produtoras de TGF- $\beta$ ) e células Th1 coexpressando IFN- $\gamma$ /IL-10 (FINNEY, et al., 2010).

Quanto à expansão de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, Gonçalves e colaboradores (2010) não observaram aumento no número dessas células em pacientes com malária *P. vivax* sintomática, embora dois outros estudos tenham demonstrado significativa expansão em pacientes com esta forma clínica da doença (BUENO et al., 2010; JANGPATARAPONGSA et al., 2008). Além disso, em pacientes sintomáticos infectados por *P. vivax*, foi também observada correlação positiva entre o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (GITR<sup>+</sup> e CTLA-4<sup>+</sup>) e o grau de parasitemia (BUENO et al., 2010). Correlação positiva entre níveis plasmáticos de IL-10 (MEDINA et al., 2011) ou expressão de IL-10 pelas Treg (BUENO et al., 2010) com o grau de parasitemia também foram observados.

Uma questão ainda não esclarecida é se o índice de parasitemia é determinante no desencadeamento de substancial produção de IL-10 ou, contrariamente, os elevados níveis de IL-10 é que propiciariam a multiplicação do parasito (GONÇALVES et al., 2010). Em outras palavras, os mecanismos envolvidos na produção de IL-10 seriam favoráveis ao hospedeiro, impedindo a ocorrência de imunopatologia ou, alternativamente, favoreceria o escape e sobrevivência do parasito (BUENO et al., 2010).

Estudos comparando o perfil de citocinas inflamatórias durante infecção aguda por *P. vivax* mostram resultados contraditórios. Embora níveis plasmáticos elevados de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  tenham sido observados em pacientes com malária *P. vivax*, quando comparados com indivíduos não infectados (FERNANDES et al., 2008; JAIN et al., 2010; ANDRADE et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012; MENDONÇA et al., 2013; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014), existem relatos na literatura demonstrando níveis reduzidos ou inalterados tanto de IFN- $\gamma$  (GONÇALVES et al., 2010; COX-SINGH et al., 2011) quanto de TNF- $\alpha$  (COSTA et al., 2014) durante a infecção.

Correlações interessantes também têm sido observadas em relação ao TNF- $\alpha$  nos casos de malária. Embora protetivo ao atuar contra o parasito, quando em níveis muito elevados pode levar à maior gravidade da doença e mesmo morte do hospedeiro (LANGHORNE et al., 2008). De fato, Mendonça e colaboradores (2013) observaram que pacientes com malária *P. vivax* sintomática ou grave apresentam elevados níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  em comparação àqueles

assintomáticos ou não infectados. Resultado semelhante foi encontrado por Gonçalves e colaboradores (2012) entre pacientes sintomáticos e assintomáticos infectados por *P. vivax*.

Em relação à IL-6, diversos estudos já demonstraram níveis plasmáticos aumentados durante a infecção por *P. vivax* (ZEYREK et al., 2006; MENDONÇA et al., 2013; COSTA et al., 2014; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014.). Além disso, houve forte associação entre produção de IL-6 e IL-10 e elevada carga parasitária (COSTA et al., 2014).

Os relatos referentes à IL-12 são controversos, uma vez que não há consenso na cadeia da citocina (p40 ou p70) que foi marcada ou, até mesmo não há menção à cadeia utilizada.

Outra citocina importante na malária, que pode estar envolvida na resposta imune inata e adaptativa, é a IL-17. Entretanto, praticamente não há relatos na literatura de estudos clínicos envolvendo esta citocina. Num estudo de malária *P. vivax* sintomática não complicada, foi observada expansão significativa de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17, que se correlacionou positivamente com o número de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  (BUENO et al., 2012). Em relação aos níveis plasmáticos de IL-17, enquanto Cox-Singh e colaboradores (2011) não detectaram esta citocina em amostras de indivíduos infectados, Rodrigues-da-Silva e colaboradores (2014) encontraram níveis elevados de IL-17 durante a infecção por *P. vivax* e *P. falciparum*. Ainda resta esclarecer se esta produção aumentada de IL-17 se origina da subpopulação Th17, Th17IL-17<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> ou se de TregIL-10<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>.

Até o presente momento, não existem relatos sobre o papel da IL-27 na infecção pelo *P. vivax*. Entretanto, já foi demonstrado que em crianças infectadas com *P. falciparum*, as concentrações plasmáticas de IL-27 estavam significativamente mais baixas do que em não infectadas (AYIMBA et al., 2011).

A IL-27 é uma citocina pleiotrófica, secretada por APCs ativadas por antígenos (AWASTHI et al., 2007), promovendo a expansão de células T naïve e também induzindo o fator de transcrição T-bet que, por sua vez, aumenta a diferenciação de células Th1 (BATTEN et al., 2008). Por outro lado, a sinalização da IL-27 é também necessária para evitar excessiva ativação de células T efectoras e limitar a produção de citocinas pró-inflamatórias. A IL-27 suprime a diferenciação de células Th17 produtoras de IL-17 (MURUGAIYAN et al., 2009) e induz a produção de IL-10 por células Th1 e Th2 diferenciadas, um efeito de retroalimentação negativa (imunossupressiva) sobre estas células (BATTEN et al., 2008), como também induz a produção de IL-10 por células T produtoras de IL-17 (STUMHOFER et al., 2008).

Em relação ao nível de gravidade da doença na malária *P. vivax*, Andrade e colaboradores (2010) observaram que os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  aumentam e de



IL-10 diminui conforme aumenta a gravidade clínica (assintomático-sintomático moderado-sintomático grave). Entretanto, resultado contrário para IL-10 foi observado por Gonçalves e colaboradores (2012) entre pacientes assintomáticos e sintomáticos não-complicados, com assintomáticos apresentando níveis muito baixos de IL-10. Comparação entre pacientes com malária *P. vivax* sem disfunção e com disfunção hepática (níveis elevados das enzimas hepáticas Aspartato aminotransferase e Alanina aminotransferase) revelaram níveis mais altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e também de IL-10 entre aqueles com disfunção hepática (YEOM et al., 2003).

Estudos comparativos do perfil de citocinas entre pacientes com malária na fase aguda e pós-tratamento (período de convalescência) são ainda escassos e controversos, apesar de sua importância para pesquisa de vacinas que visam a resposta imunológica como também de drogas imunoterapêuticas. Pacientes com malária *P. vivax* grave apresentaram redução significativa de TNF- $\alpha$  plasmático e da razão IFN- $\gamma$ /IL-10 no 7º dia pós-tratamento com medicamento antimalárico, sendo acompanhados de redução nos níveis de vários parâmetros sanguíneos como proteína C reativa, creatinina, alanina aminotransferase e bilirrubina total (ANDRADE et al., 2010). Outro estudo comparando níveis plasmáticos de citocinas em pacientes infectados por *P. vivax* na fase aguda e após tratamento quimioterápico (cloroquina/primaquina) demonstrou redução significativa de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 $\beta$  após o tratamento (LEORATTI et al., 2012). Contraditoriamente, na fase convalescente da infecção (15º dia) causada por *P. vivax*, Rodrigues-da-Silva e colaboradores (2014) observaram elevação nos níveis de IL-6, IL-8, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e G-CSF, sendo mais acentuada nos pacientes com malária *P. falciparum*.

Em relação às quimiocinas durante a infecção por *P. vivax*, os relatos da literatura são extremamente escassos. Já foi demonstrado aumento de CCL2 (MCP-1) (FERNANDES et al., 2008) ou níveis inalterados (MENDONÇA et al., 2013) durante a malária *P. vivax*. Em relação à CCL5 (RANTES), Mendonça e colaboradores (2013) encontraram resultado significativo, entretanto os dados não permitem concluir entre quais grupos (controle endêmico, assintomático, sintomático, grave) está a diferença. Além disso, estudo referente a infecção por *P. falciparum* demonstrou baixos níveis de CCL5 em crianças com malária cerebral (OCHIEL et al., 2005). Jain e colaboradores (2010) observaram níveis mais elevados de CXCL10 (IP-10) nos indivíduos infectados por *P. vivax* em relação ao grupo controle. Resultados significativos também foram observados por Mendonça e colaboradores (2013) em relação a esta quimiocina.

Em resumo, estudos relacionados ao perfil de citocinas/quimiocinas plasmáticas durante a fase aguda e período de convalescência da malária ainda requer investigações adicionais.

## **1.5 Vias de sinalização celular**

Células do sistema imune, ao entrarem em contato com um parasito ou antígeno, desencadeiam em seu interior uma série de alterações que culminam na ativação de vias de sinalização intracelulares que irão controlar a ativação/inativação de determinados genes.

Uma importante via que pode ser ativada nas células do sistema imune é a via da apoptose. Alguns patógenos podem induzir a morte de células do sistema imune como mecanismo de sobrevivência. Além disso, células do sistema imune podem sofrer apoptose após ativação e expansão celular induzida por determinados estímulos, visando a homeostase imune e supressão de autorreatividade.

### **1.5.1 Via de sinalização intracelular de apoptose**

A morte celular programada, também denominada de apoptose, é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas típicas, como retração celular, fragmentação do DNA nuclear e formação de vesículas na membrana. A apoptose é um processo celular altamente regulado que pode ser ativado por diferentes estímulos.

Dois mecanismos de morte de células T têm sido propostos: morte celular induzida por ativação (AICD) e morte autônoma de célula T ativada (ACAD) (HILDEMAN et al., 2002; BRENNER et al., 2008). AICD parece ser mais importante para suprimir linfócitos T cronicamente ativados e potencialmente auto-reativos, sendo mediado principalmente por receptores de morte (sistemas Fas/FasL e TNFR). Por outro lado, ACAD parece contribuir principalmente na redução do número de células T durante a fase de contração, sendo independente de sinalização por receptores de morte. ACAD é regulada pela via de morte intrínseca (mitocondrial) e envolve membros da família Bcl-2 (HILDEMAN et al., 2002; BRENNER et al., 2008).

Estímulos externos (TNF- $\alpha$ , FasL, TRAIL) podem ativar a cascata da apoptose por meio da ativação de receptores de morte presentes na membrana citoplasmática da célula (NIKOLETOPOULOU, 2013). Os receptores de morte mais bem caracterizados são TNFR1, Fas (CD95) e TRAIL-R que ativam a via extrínseca da apoptose (FULDA; DEBATIN, 2006). Após a interação entre o ligante e o receptor ocorre a trimerização do receptor e o agrupamento dos domínios de morte do receptor, culminando no recrutamento de FADD (domínio de morte associado a Fas), uma importante molécula adaptadora responsável pelo recrutamento da caspase-8. A ativação da caspase-8 ocorre através de auto-clivagem após sua oligomerização no complexo de sinalização de indução de morte (DISC) (FULDA; DEBATIN, 2006;

GAVRILESCU; DENKERS, 2003). Após a ativação da caspase-8 ocorre a ativação de outras caspases efetoras envolvidas na cascata de apoptose.

Por outro lado, a apoptose também pode ser ativada por estímulos intrínsecos causados por estresse oxidativo, provocando alterações na membrana mitocondrial e ativando a via intrínseca (FULDA; DEBATIN, 2006). A ativação da via intrínseca inicia pela permeabilização da membrana mitocondrial externa, que é provocada por proteínas da família Bcl. Em seguida, ocorre a liberação de fatores pró-apoptóticos (citocromo c, Smac/DIABLO, AIF) do espaço intermembrana da mitocôndria para o citoplasma, levando a ativação de caspases (FULDA; DEBATIN, 2006; JENDROSSEK, 2012).

Portanto, a integridade da membrana mitocondrial externa é regulada por interações complexas entre os membros da família de proteínas Bcl-2. A família Bcl-2 pode ser subdividida em três grupos, de acordo com suas funções (JENDROSSEK, 2012; NIKOLETOPOULOU, 2013). O primeiro grupo é composto por membros como BCL-X<sub>L</sub>, BCL-2, BCL-W e MCL-1, que possuem ação antiapoptótica, uma vez que, são capazes de interagir com outros membros da família Bcl-2 e regular negativamente a liberação de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria. Ou seja, esses membros da família Bcl-2 são extremamente importantes para a sobrevivência celular. O segundo grupo é formado por membros pró-apoptóticos como BAX, BAK e BOK, que são capazes de formar poros ou se associar com outras proteínas formadoras de poros na membrana mitocondrial externa. Já o terceiro grupo é formado por membros que podem interagir tanto com membros anti-apoptóticos quanto membros pró-apoptóticos e, desta forma, são capazes de induzir apoptose (NIKOLETOPOULOU, 2013).

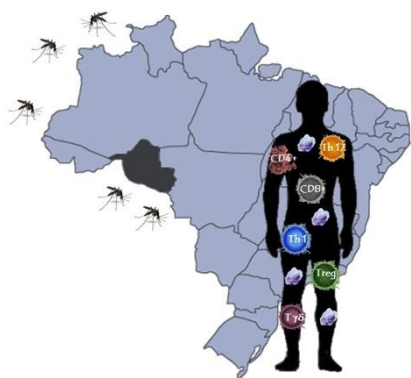
É importante destacar que em determinadas circunstâncias, as duas vias de apoptose podem ser ativadas. Caso a ativação direta de caspase-3 pela caspase-8 seja insuficiente, a caspase-8 pode ativar a via mitocondrial (intrínseca) através da clivagem de Bid (membro pró-apoptótico da família Bcl-2) em tBid, que leva à ativação da via intrínseca de apoptose (JENDROSSEK, 2012).

Além dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, a apoptose também pode ser impedida pela ação de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), uma vez que elas possuem um domínio de ligação/inibição de caspases. Essa família de proteínas é composta por oito membros (BIRC 1-8), sendo que as BIRCs 1-4, 7 e 8 atuam diretamente sobre as caspases e as BIRCs 5 e 6 sobre o ciclo celular (SALEEM, 2013).

Embora alguns estudos tenham associado a ocorrência de apoptose de linfócitos T com níveis elevados de sFasL (ligante de Fas solúvel) em malária humana, o envolvimento do sistema Fas/FasL não foi observado em modelo experimental de malária (XU et al. 2002; SUN et al., 2012). Nesses estudos experimentais, a apoptose de células T CD4<sup>+</sup> específicas para *Plasmodium* foi associada com IFN- $\gamma$ . De fato, a indução de morte de linfócitos T ativados parece depender de IFN- $\gamma$  (REFAELI et al., 2002).

Num modelo experimental de malária usando *P. berghei*, foi verificado que o ortólogo do fator inibidor de migração de macrófagos produzido pelo parasito (PMIF) induz regulação positiva de T-bet e IFN- $\gamma$ , e regulação negativa de IL-7R, CD62L, IL-2 e Bcl-2 em células T específicas para o parasito. Estas células T CD4<sup>+</sup> apresentaram maior suscetibilidade à apoptose, sendo associada com baixa expressão de Bcl-2, mas não com sinalização Fas/FasL. Importante, os autores verificaram também que pacientes com malária cerebral *P. falciparum* apresentavam níveis mais altos de PMIF no soro em comparação com pacientes portadores de malária não-complicada (SUN et al., 2012).

Em resumo, diversos estudos sugerem que subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e T $\gamma\delta$ ) podem estar envolvidas na resposta imune de malária, influenciando na expressão de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 e IL-27, bem como quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL10). Dessa forma, ao investigar essas subpopulações de células e também a via de sinalização de apoptose, será possível obter informações fundamentais sobre os mecanismos celulares e moleculares do controle da resposta imune na malária *P. vivax*.

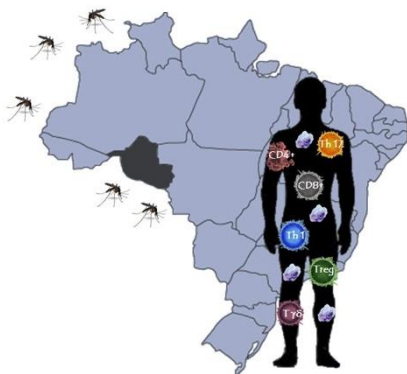


---

## 2 JUSTIFICATIVA

## 2 JUSTIFICATIVA

A malária é uma das doenças infecciosas que afeta milhões de pessoas no mundo, com regiões altamente endêmicas, como é o caso da África subsaariana. No Brasil, a região amazônica é endêmica para a malária, predominando a infecção por *P. vivax*. Embora seja considerada a forma mais benigna da doença, esta concepção já está sendo reformulada em função do número crescente de casos de malária *P. vivax* grave, que pode inclusive levar à morte. Outro fator relevante é a taxa de morbidade e internações de pacientes, fatores que comprometem a vida social e produtiva dos indivíduos afetados. Relatos existentes na literatura, em sua grande maioria se referem à malária *P. falciparum*, em detrimento à malária *P. vivax*, revelando certo grau de negligência em relação a esta última. Nesse contexto, investir em estudos que possam trazer aportes para melhor entendimento da malária causada por *P. vivax* revela-se de grande importância. Estudos realizados sugerem a existência de resposta imunomoduladora durante infecção de estágio sanguíneo da malária *P. vivax*, entretanto resultados controversos ainda persistem. A redução no número de células T CD4<sup>+</sup> observada na malária pode constituir um mecanismo importante de imunomodulação, assim como a participação de células T CD8<sup>+</sup> com perfil imunomodulador durante infecção de fase sanguínea. Esses aspectos podem contribuir para a persistência do parasito, ao mesmo tempo em que impede o desenvolvimento de imunopatologia. Considerando que os mecanismos envolvidos na resposta imune são determinantes na evolução clínica da malária humana, com espectro variável de resposta, que pode levar ao controle da doença ou pode evoluir para casos mais complicados, investir nesta área é uma opção que, potencialmente, poderá render resultados para subsidiar pesquisas de vacinas e de drogas imunoterapêuticas mais efetivas. Nessa perspectiva, buscou-se investigar a via de sinalização de apoptose de células T CD4<sup>+</sup>, o papel das células T CD8<sup>+</sup> e T $\gamma$  $\delta$ , assim como a identificação de citocinas e quimiocinas plasmáticas envolvidas na resposta imune durante a fase sanguínea da infecção por *P. vivax*. Considerando-se que os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas envolvidas na resposta a infecção por *P. vivax* podem alterar durante a fase aguda, análises comparativas entre a fase aguda e a fase de convalescência também foram realizadas visando identificar biomarcadores de doença ativa.



---

### 3 OBJETIVOS

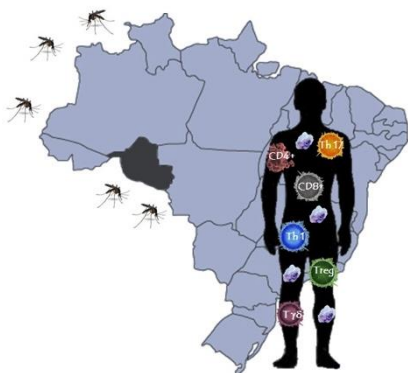
### 3 OBJETIVOS

**Geral:** Avaliar a modulação da resposta imune celular em indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax* durante a fase aguda.

#### Específicos

- ❖ Avaliar a ocorrência de apoptose em linfócitos T CD4<sup>+</sup> em amostras de indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax* na fase aguda da infecção;
- ❖ Caracterizar a via envolvida na apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em amostras de indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax* na fase aguda da infecção;
- ❖ Estabelecer as subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> envolvidos na resposta imune durante a fase sanguínea da malária em amostras de indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax*;
- ❖ Caracterizar o papel de linfócitos T $\gamma\delta$  (Th1-like e Th17-like) na modulação da resposta imune em amostras de indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax* na fase aguda da infecção;
- ❖ Determinar os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IL-27, CCL2, CCL5 e CXCL10 em indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax* na fase aguda e após tratamento;
- ❖ Estabelecer as possíveis associações entre níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas e parasitemia e número de infecções prévias de malária em indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax* na fase aguda.





---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 População de estudo**

A população de estudo foi composta por indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax* (antes e após o tratamento) provenientes da cidade de Porto Velho, Rondônia, uma importante área endêmica de malária.

O recrutamento destes indivíduos ocorreu no Centro de Pesquisas em Medicina Tropical (CEPEM) sob os cuidados dos doutores Dhelio Batista Pereira e Mauro Shugiro Tada. O diagnóstico foi realizado por meio da sintomatologia e visualização do parasito em amostras de sangue periférico do indivíduo (gota espessa corada por Giemsa). Posteriormente, a confirmação da monoinfecção por *P. vivax* foi realizada por meio da técnica de Nested-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), descrita por Snounou e colaboradores (1993).

Também foram recrutados em Porto Velho, Rondônia, alguns indivíduos com histórico prévio de malária, mas que não estavam infectados durante a coleta de amostras, para compor o grupo Controle Endêmico.

O grupo Controle Não-endêmico foi composto por indivíduos residentes na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, área não endêmica para malária. Nenhum indivíduo possuía histórico e exposição prévia a malária.

### **4.2 Obtenção das amostras**

Após os participantes do estudo assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, amostras de sangue venoso periférico foram coletadas em tubos contendo anticoagulante e um questionário foi aplicado para aquisição de informações como sintomatologia e histórico prévio de malária. Essas amostras de sangue foram coletadas durante a fase aguda (antes do início do tratamento com cloroquina e primaquina) e, em torno de 25 dias após o tratamento (período de convalescença da infecção).

A coleta de amostras de sangue venoso periférico para realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFMG (CAAE: 27466214.0.0000.5149) (Anexo A).

### **4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)**

As CMSPs foram isoladas do sangue venoso periférico coletado usando-se coluna de *Ficoll-Hypaque* (*Histopaque*<sup>®</sup> 1.077, *Sigma*), que permite a formação de um gradiente de densidade com diferentes camadas. As células mononucleares situadas entre o plasma e a

camada de *Ficoll* foram retiradas e lavadas com meio RPMI 1640 contendo 1% de antibiótico. Essas células foram congeladas (em nitrogênio líquido), em soro fetal bovino (FBS) inativado e DMSO na proporção 9:1, para posterior utilização. O número máximo de células congeladas por tubo foi de  $1 \times 10^7$  células.

#### **4.4 Obtenção das amostras de plasma**

As amostras de plasma foram obtidas por meio de centrifugação do sangue venoso periférico coletado em tubos de heparina. As amostras foram aliquotadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### **4.5 Avaliação da ocorrência de apoptose em linfócitos T CD4<sup>+</sup>**

Para verificar a possível ocorrência de apoptose em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, foram utilizadas amostras frescas de sangue venoso periférico. As hemácias foram lisadas utilizando-se cloreto de amônio (150mM), lavadas duas vezes com PBS-W (0,5% BSA e 0,1% de azida sódica) e marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD4 conjugado com PerCP (clone L200 – *BD Bioscience*) durante 30 minutos, à temperatura ambiente em câmara escura. Em seguida, as células foram incubadas com Anexina-V/FITC e iodeto de propidium (PI) de acordo com as informações do fabricante (*BD Bioscience*).

As amostras foram submetidas à técnica de citometria de fluxo utilizando o *FACScan* (*BD Bioscience*), para a visualização da população celular de interesse com aquisição de 100 mil eventos no *gate* de linfócitos. A análise fenotípica foi realizada utilizando-se o software *Flow Jo* (*Tree Star*).

#### **4.6 Caracterização da via envolvida na apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup>**

Para caracterização da via envolvida na apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as CMSP foram incubadas na presença de *microbeads* magnéticas conjugadas com anticorpos anti-CD4. As amostras assim preparadas foram passadas em coluna magnética, o que possibilitou a seleção positiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, conforme as instruções do fabricante (*Miltenyi Biotec*). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> obtidos foram ressuspensos em *TRIzol* (*Life Technologies*) e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O isolamento do RNA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (*Life Technologies*). O RNA obtido foi submetido ao tratamento com DNase (*Promega*) para eliminar qualquer resíduo de DNA e foi convertido em cDNA utilizando-se o kit *High-Capacity*

*cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* conforme instruções do fabricante. Para confirmar a síntese do cDNA, foi realizada PCR utilizando-se *primers* para o gene GAPDH humano.

A avaliação do perfil de expressão gênica associado à apoptose foi realizada por meio de PCR *array* (*RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array – Human Apoptosis*) (*SABioscience*) na *ABI7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem, EUA)*. A qPCR permitiu avaliar a expressão de 84 genes envolvidos em diferentes vias de apoptose utilizando-se 30ng de cDNA por poço. Os dados obtidos foram analisados por meio do método de  $\Delta\Delta CT$ .

#### **4.7 Fenotipagem das subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>**

Para a fenotipagem das subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, foram utilizadas amostras frescas de sangue venoso periférico. As amostras de sangue foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente na presença de anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície: CD8-FITC (clone HIT8a), CD45RA-APC (clone HI100), CD45RO-PE-Cy5 (clone UCHL1), CCR7-PE (clone 3D12) e CD62L-PE (clone DREG-56). As hemácias foram lisadas utilizando-se solução de cloreto de amônio (150mM) por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS-W (0,5% BSA e 0,1% azida sódica). As células foram então permeabilizadas com PBS-P (0,5% BSA; 0,1% azida sódica e 0,5% saponina) por 10 minutos e lavadas duas vezes com PBS-W. Em seguida, as células foram incubadas na presença de anticorpos monoclonais específicos para moléculas intracitoplasmáticas: IFN- $\gamma$ -PE (clone F12), TNF- $\alpha$ -PE (clone MAb11) e IL-10-PE (clone JES3-9D7) durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As células foram então lavadas com PBS-W e fixadas com *FACS fixation solution* (10g/L para formaldeído, 10,2g/L cacodilato de sódio, 6,65g/L cloreto de sódio) durante 15 minutos a 4°C.

As amostras foram submetidas à técnica de citometria de fluxo utilizando o *FACSCalibur (BD Bioscience)*, para visualização das populações celulares de interesse com aquisição de 100 mil eventos. A análise fenotípica foi realizada utilizando-se o software *Flow Jo (Tree Star)*.

#### **4.8 Determinação dos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas**

Amostras de plasma armazenadas a -80°C foram submetidas à técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - R&D Systems*) e CBA (*Cytometric Bead Array – BD Bioscience*) para detecção e quantificação das citocinas e quimiocinas.

As dosagens de IL-6, IL-10, IL-17, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) e CXCL10 (IP-10) foram realizadas por meio de CBA (*BD Bioscience*), de acordo com as instruções do fabricante. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo *FACSCan* (*BD Bioscience*) e os dados foram analisados no *software FCAP Array* (*Soft Flow*). De acordo com o fabricante, os limites de detecção dos testes são os seguintes: IL-6 = 2,4 pg/mL; IL-10 = 4,5 pg/mL; IL-17 = 18,9 pg/mL; CCL2 = 2,7 pg/mL; CCL5 = 1,0 pg/mL and CXCL10 = 2,8 pg/mL.

A técnica de ELISA foi utilizada na quantificação da IL-12p40, IL-27, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (*R&D Systems*), seguindo-se as instruções do fabricante. A reação foi realizada por meio de estreptavidina-HRP (*R&D Systems*) e o substrato dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) (*Sigma Aldrich*). A leitura da reação colorimétrica foi realizada em leitor de microplacas à 492nm. A concentração de cada citocina foi estabelecida utilizando-se curva padrão, no *software SOFTmax Pro 5.3* (*Molecular Devices*). De acordo com o fabricante, os limites de detecção dos testes são os seguintes: IL-12p40 = 62,5 pg/mL; IL-27 = 156,0 pg/mL; IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  = 15,6 pg/mL e TGF- $\beta$  = 31,2 pg/mL.

#### **4.9 Caracterização dos linfócitos T $\gamma\delta$**

Para o estudo dos linfócitos T $\gamma\delta$ , as CMSPs previamente coletadas e criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em meio RPMI 1640 (*Sigma Aldrich*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado (*Gibco*), 1% de antibiótico e antimicótico (*Gibco*) e DNase II S 2 $\mu$ g/mL (*Sigma Aldrich*). Em seguida, as células foram lavadas em meio RPMI 1640 (*Sigma Aldrich*) sem DNase, coradas com azul de Tripán, contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas para uma concentração final de 3,5x10<sup>5</sup> cells/mL. As CMSP ficaram em repouso durante 4 horas em estufa de CO<sub>2</sub>, à 37°C. Após esse período, as células foram estimuladas com Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA – *Sigma Aldrich*) e Ionomicina (*Sigma Aldrich*) na presença de *BD GolgiPlug* (*BD Biosciences*) durante 5 horas. Em seguida, as CMSP foram lavadas em PBS e incubadas com o corante de viabilidade celular *BD Horizon™ Fixable Viability Stain 450* (*BD Biosciences*) durante 15 minutos. Após esse período, as CMSP foram lavadas duas vezes com PBS-W (0,5% BSA e 0,1% azida sódica) e incubadas com anticorpos monoclonais: CD3 - APC-H7 (clone SK7), CD4 - APC (clone RPA-T4), CD8 - PE (clone HIT8a), TCR $\gamma\delta$  - FITC (clone B1) e CD27 - V500 (clone M-T271), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as CMSP foram lavadas novamente com PBS-W e incubadas com solução de Fixação/Permeabilização (*BD Biosciences*) durante 30 minutos à

4°C. As CMSP foram lavadas duas vezes com o tampão *Perm/Wash<sup>TM</sup>* (*BD Biosciences*) e marcadas intracitoplasmaticamente com anticorpos monoclonais da *BD Biosciences*: IFN- $\gamma$  - PE-Cy7 (clone B27) e IL-17A - Alexa Fluor 700 (clone N49-653) durante 30 minutos a 4°C. Por fim, as CMSP foram novamente lavadas com o tampão *BD Perm/Wash<sup>TM</sup>* (*BD Biosciences*).

A aquisição dos dados foi realizada por meio de citometria de fluxo, utilizando-se o *BD LSRFortessa<sup>TM</sup>* (*BD Biosciences*). Para a compensação do citômetro foram utilizadas *BD<sup>TM</sup> CompBeads* (*BD Biosciences*). Foram adquiridos 200.000 eventos utilizando-se o *software FACSDiva*. Após aquisição dos dados, a análise foi realizada através do *software Flow Jo (Tree Star)* e, os *gates* foram estabelecidos utilizando-se controles *Fluorescence Minus One* (FMO).

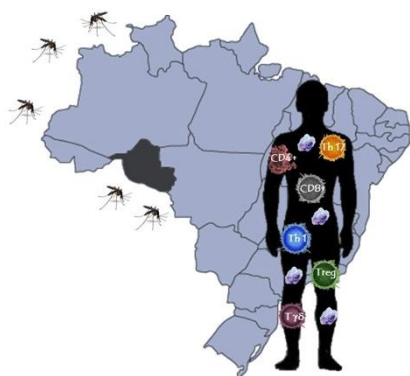
#### **4.10 Análise estatística**

A análise estatística dos dados coletados foi realizada utilizando-se o *software* estatístico *Prism for Windows* (versão 5.0).

Inicialmente foi utilizado o teste de *Grubbs* para verificar possíveis valores *outliers*. Em seguida o teste *Kolmogorov-Smirnoff* foi utilizado para verificar a distribuição dos dados. Para os dados com distribuição normal foram utilizados os seguintes testes: teste-t ou ANOVA *One-way* seguido de pós-teste de *Bonferroni*. Já para os dados que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn.

Nas análises de correlação foram utilizados o Coeficiente de Correlação de Pearson e Coeficiente de Correlação de Spearman, de acordo com a distribuição dos dados. Nos testes pareados foram utilizados o teste-t pareado e o Wilcoxon, de acordo com a distribuição dos dados.

A aplicação dos testes citados permitiu determinar possíveis associações entre aspectos imunológicos desencadeados pela infecção e parasitemia e episódios prévios de malária. Foram consideradas significativas as comparações em que  $P \leq 0,05$ .



---

## 5 RESULTADOS

## 5 RESULTADOS

Durante o desenvolvimento deste estudo, parte dos resultados foi publicada em revista científica. Uma outra parte encontra-se em fase de elaboração para submissão. Sendo assim, os resultados serão apresentados no formato de artigo científico.

### 5.1 Apoptose e vias de sinalização em linfócitos T CD4<sup>+</sup>

**HOJO-SOUZA, N.S.; PEREIRA, D.B.; MENDES, T.A.O.; PASSOS, L.S.A.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, A.C.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.H.; TADA, M.S.; ZANINI, G.M.; BARTHOLOMEU, D.C.; FUJIWARA, R.T.; BUENO, L.L.** CD4<sup>+</sup> T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. **Malaria Journal**, v. 14, p. 1-7, 2015.

### 5.2 Perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>

**HOJO-SOUZA, N.S.; PEREIRA, D.B.; PASSOS, L.S.A.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.H.; CARDOSO, M.S.; TADA, M.S.; ZANINI, G.M.; BARTHOLOMEU, D.C.; FUJIWARA, R.T.; BUENO, L.L.** Phenotypic profiling of CD8<sup>+</sup> T cells during *Plasmodium vivax* blood-stage infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p.1-9, 2015.

### 5.3 Caracterização dos linfócitos T $\gamma\delta$

**HOJO-SOUZA, N.S.; PEREIRA, D.B.; TADA, M.S.; ZANINI, G.M.; BARTHOLOMEU, D.C.; FUJIWARA, R.T.; BUENO, L.L.** Characterization of  $\gamma\delta$  T lymphocytes during *P. vivax* malaria: a preliminary study.

### 5.4 Níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas

**HOJO-SOUZA, N.S.; PEREIRA, D.B.; SOUZA, F.S.H.; MENDES, T.A.O.; TADA, M.S.; ZANINI, G.M.; BARTHOLOMEU, D.C.; FUJIWARA, R.T.; BUENO, L.L.** On the cytokine/chemokine network during *P. vivax* malaria: new insights to understand the disease.



RESEARCH

Open Access

# CD4<sup>+</sup> T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways

Natália S Hojo-Souza<sup>1†</sup>, Dhelio B Pereira<sup>2†</sup>, Tiago AO Mendes<sup>1</sup>, Lívia SA Passos<sup>1</sup>, Ana Clara Gazzinelli-Guimarães<sup>1</sup>, Pedro H Gazzinelli-Guimarães<sup>1</sup>, Mauro S Tada<sup>2</sup>, Graziela M Zanini<sup>3</sup>, Daniella C Bartholomeu<sup>1</sup>, Ricardo T Fujiwara<sup>1</sup> and Lilian L Bueno<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Reduction in the number of circulating blood lymphocytes (lymphocytopenia) has been reported during clinical episodes of malaria and is normalized after treatment with anti-malaria drugs. While this phenomenon is well established in malaria infection, the underlying mechanisms are still not fully elucidated. In the present study, the occurrence of apoptosis and its pathways in CD4<sup>+</sup> T cells was investigated in naturally *Plasmodium vivax*-infected individuals from a Brazilian endemic area (Porto Velho – RO).

**Methods:** Blood samples were collected from *P. vivax*-infected individuals and healthy donors. The apoptosis was characterized by cell staining with Annexin V/FITC and propidium iodide and the apoptosis-associated gene expression profile was carried out using RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array–Human Apoptosis. The plasma TNF level was determined by ELISA. The unpaired t-test or Mann–Whitney test was applied according to the data distribution.

**Results:** *Plasmodium vivax*-infected individuals present low number of leukocytes and lymphocytes with a higher percentage of CD4<sup>+</sup> T cells in early and/or late apoptosis. Increased gene expression was observed for TNFRSF1B and Bid, associated with a reduction of Bcl-2, in individuals with *P. vivax* malaria. Furthermore, these individuals showed increased plasma levels of TNF compared to malaria-naïve donors.

**Conclusions:** The results of the present study suggest that *P. vivax* infection induces apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells mediated by two types of signaling: by activation of the TNFR1 death receptor (extrinsic pathway), which is amplified by Bid, and by decreased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (intrinsic pathway). The T lymphocytes apoptosis could reflect a strategy of immune evasion triggered by the parasite, enabling their persistence but also limiting the occurrence of immunopathology.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium vivax*, Apoptosis

## Background

Malaria infection induces significant changes in the haematological parameters of the host. A decrease in the number of circulating blood lymphocytes (lymphocytopenia) is a well-documented phenomenon in naturally infected individuals during acute *Plasmodium falciparum* [1-6] and *Plasmodium vivax* [5,7-9].

Specific T cell depletion has been observed during infection with different species of *Plasmodium* (*Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vinckei* and *Plasmodium yoelii* YM) [10]. In human and experimental models of malaria, lymphocytopenia has been attributed to the apoptosis of T lymphocytes and has been associated with high plasma levels of sIL-2R (soluble IL-2 receptor) [7,11,12] or the Fas/FasL system [4,7,13]; however, the mechanisms of apoptosis during malaria, particularly during *P. vivax* infection, is not fully elucidated. On the other hand, some studies have suggested that lymphocytopenia during infection is caused by the reallocation of

\* Correspondence: lilacerdabueno@gmail.com

<sup>†</sup>Equal contributors

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



T cells at sites of inflammation, followed by reappearance of these cells in the blood during the treatment [3,14,15].

Considering the importance of CD4<sup>+</sup> T cells in the protective immune response in vivax malaria, the objective of the present study was to verify possible mechanisms involved in lymphocytopaenia.

## Methods

### Study population

This study was performed with blood samples collected from 20 subjects naturally infected with *Plasmodium vivax* (*P. vivax*-infected donors) with uncomplicated symptomatic malaria, recruited at the Research Centre in Tropical Medicine (Porto Velho, Rondônia–Brazil), a malaria-endemic area. The control group consisted of 11 healthy donors (malaria-naive donors) from a non-endemic area (Belo Horizonte, Minas Gerais–Brazil) (Table 1). Parasitaemia was determined by well-trained microscopists from the Research Centre in Tropical Medicine. *Plasmodium vivax* mono-infection was confirmed by PCR, as previously described [16]. Haematological parameters were measured using an automated blood cell counter (ABX Pentra 90; Horiba Diagnostics, Kyoto, Japan) (Table 1). HIV, dengue and hepatitis testing was performed in all samples in order to exclude coinfections or comorbidities.

### Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre in Tropical Medicine (CAAEs:

0008.0.046.000-11, 0449.0.203.000-09), and written informed consent was obtained from all participants.

### Blood samples

Peripheral venous blood was collected in tubes containing EDTA and heparin. The blood collected with EDTA was used to confirm the diagnosis (*P. vivax* mono-infection) by PCR, to determine parasitaemia by microscopy (thick smears), to evaluate the haematological parameters and for cell phenotyping. Heparinized blood was used to obtain plasma for the cytokine assay and to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for the isolation of CD4<sup>+</sup> T cells used to evaluate the apoptosis-associated gene expression profiles.

### Cell phenotyping

The apoptotic profile of the CD4<sup>+</sup> lymphocyte population from both groups was characterized by Annexin V/FITC and propidium iodide (PI) cell staining (BD Biosciences, USA) using fresh whole blood. Briefly, the erythrocytes were lysed with ammonium chloride (150 mM) and washed twice in PBS. The cells were then stained with PerCP-conjugated monoclonal antibodies specific for CD4 (clone L200) (Becton Dickinson, USA) for 30 minutes in the dark at room temperature and later stained with Annexin V/FITC and PI. Phenotypic analyses were performed by flow cytometry with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, USA). Data were collected on 1x10<sup>5</sup> lymphocytes (gated by forward and side scatter) and analysed using Flow Jo software (Tree Star Inc., USA).

**Table 1 Demographic and haematological parameters of malaria-naive donors and *P. vivax*-infected donors (Mean ± SD)**

Parameters	Value for group		P value*
	Malaria-naive donors (n = 11)	<i>P. vivax</i> -infected donors (n = 20)	
Age (years)	34.0 (22–37)	38.5 (19–61)	
Gender			
Male	3	14	
Female	8	6	
Haemoglobin (g/dL)	14.05 ± 0.35	13.52 ± 0.29	0.263
Haematocrit	41.27 ± 0.90	38.47 ± 0.78	<b>0.028</b>
RBCs (cells/mm <sup>3</sup> )	4741000 ± 109300	4724000 ± 78940	0.901
WBCs (cells/mm <sup>3</sup> )	8118 ± 517.30	5475 ± 358.1	<b>&lt;0.001</b>
Lymphocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	2650 ± 221.5	1511 ± 122.5	<b>&lt;0.0001</b>
Monocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	177.1 ± 16.18	351.4 ± 34.49	<b>0.001</b>
Granulocytes	5270 ± 396.7	3686 ± 258.0	<b>0.002</b>
Eosinophils (cells/mm <sup>3</sup> )	179.5 ± 18.31	121.4 ± 9.91	<b>0.006</b>
Platelets (cells/mm <sup>3</sup> )	246500 ± 21290	124100 ± 13470	<b>&lt;0.0001</b>

\*Statistical differences determined by unpaired t-test.



### Apoptosis pathways

Blood samples from eight *P. vivax*-infected donors and three malaria-naïve donors were used to evaluate the possible pathways involved in CD4<sup>+</sup> T cells apoptosis. PBMCs were obtained from heparinized blood samples using a Ficoll density gradient centrifugation method (Histopaque, Sigma, USA). The blood sample was added gently above the Histopaque solution and then was centrifuged at 400 g for 40 minutes. Next, the phase containing the PBMCs was transferred to another tube, and the cells were washed twice with RPMI 1640 medium supplemented with 1% antibiotic (Gibco) and centrifuged at 400 g for 10 minutes. CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMCs using a positive selection based by direct magnetic labelling using CD4 microBeads (Miltenyi Biotec, USA) following the manufacturer's instructions. The enriched CD4<sup>+</sup> T cells were re-suspended in TRIzol Reagent (Life Technologies) and stored at -80°C until further use. Cells were submitted to subsequent RNA isolation, which was performed following manufacturer's instructions (Life Technologies, USA). The total RNA was treated with DNase (Promega) and was then converted into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. PCR using primers for the human GAPDH gene was performed to confirm the cDNA synthesis.

The evaluation of apoptosis-associated gene expression profiles was carried out using RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array-Human Apoptosis (SABioscience), which determines 84 genes involved in different apoptosis pathways. The qPCR was performed using 30 ng of cDNA per well in an ABI7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem, USA). The obtained data were analysed using the  $\Delta\Delta CT$  method.

### Cytokine assay

The plasma TNF level was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Biotin-labeled antibodies were used for detection, then revealed with streptavidin-HRP (Amersham Biosciences, USA) and the OPD substrate system (Sigma). The colorimetric reaction was read in an automated ELISA microplate reader at 492 nm. The cytokine concentration was calculated from the standard curve using seven-parameter curve fitting software (SOFTmaxH Pro 5.3, Molecular Devices, USA), and the results were expressed in pg/mL. The limit of detection for the assay was 15.6 pg/mL.

### Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using Prism software 5.0 for Windows. Initially, the Kolmogorov-Smirnoff test was applied to verify whether the obtained data represent a normal distribution. The unpaired t-test or

Mann-Whitney test was applied according to the data distribution. Grubb's test was also used to verify outliers. A P-value < 0.05 was considered significant.

## Results

### *Plasmodium vivax* infection leads to leukopaenia, lymphocytopaenia and other haematological alterations

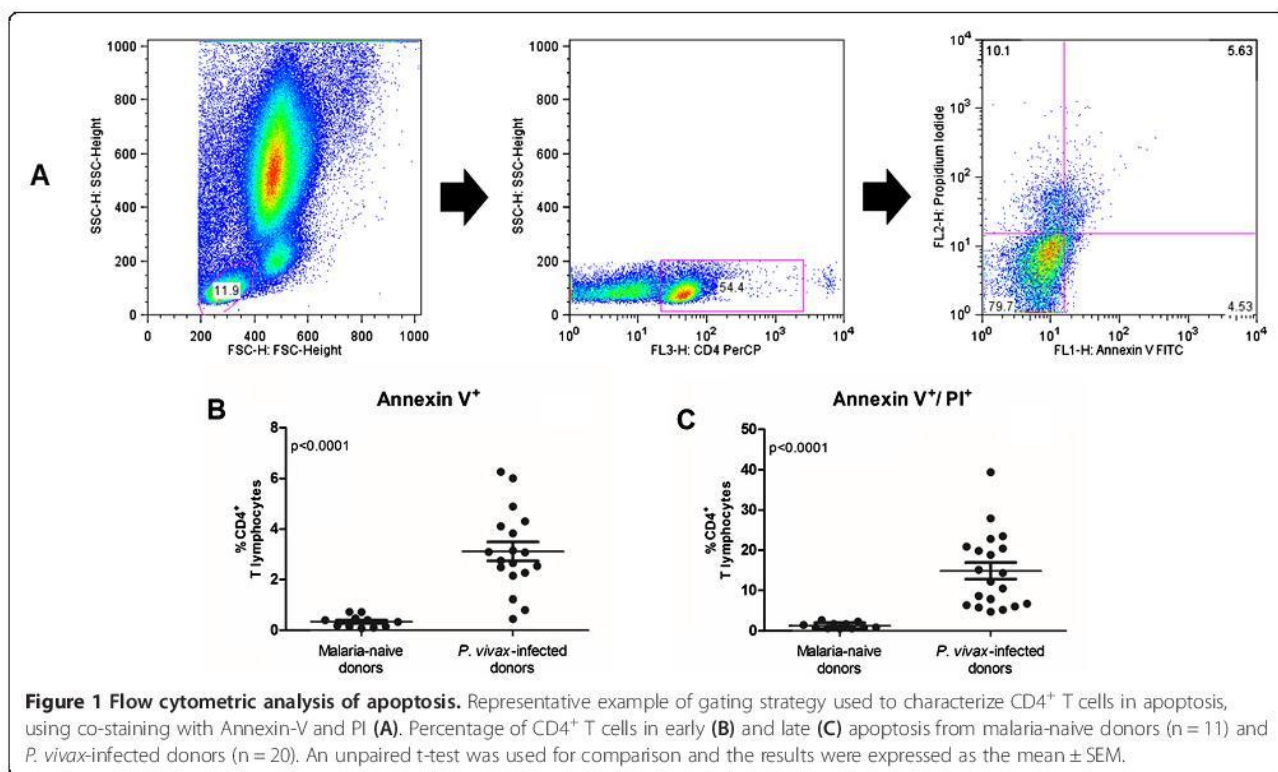
Previous reports have shown that malaria infection leads to alterations in haematological parameters during acute clinical episodes [5,7-9]. Consistent with these data, the analysis of haematological parameters revealed that *P. vivax*-infected donors had a significant reduction in the number of leukocytes ( $p = 0.0002$ ) and lymphocytes ( $p < 0.0001$ ) compared with malaria-naïve donors. Reductions in granulocytes ( $p = 0.002$ ), eosinophils ( $p = 0.006$ ), platelets ( $p < 0.0001$ ) and haematocrit ( $p = 0.028$ ), as well as an increase in monocytes ( $p = 0.001$ ), were also observed (Table 1).

### *Plasmodium vivax* infection induces apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells

To determine whether the reduction in the number of lymphocytes was due to apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells, whole blood samples of both *P. vivax*-infected donors and malaria-naïve donors were stained with Annexin-V, PI and anti-CD4 antibody (Figure 1A). The results showed an increase in the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells in early apoptosis (Annexin V<sup>+</sup>) in *P. vivax*-infected donors (3.11%) compared to malaria-naïve donors (0.34%) ( $p < 0.0001$ , Figure 1B). Analysis of CD4<sup>+</sup> T cells also demonstrated that *P. vivax*-infected donors had a higher percentage of circulating cells in late apoptosis (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) (14.86%) compared to malaria-naïve donors (1.29%) ( $p < 0.0001$ , Figure 1C). Flow cytometric analysis of non-CD4 T cells and monocytes demonstrated a significant increase in the percentage of cells in early apoptosis (Annexin V<sup>+</sup>) in *P. vivax*-infected donors (2.03% and 1.93%, respectively) compared to malaria-naïve donors (0.99% and 0.14%, respectively) ( $p < 0.0001$  for both, see Additional file 1). No differences were observed in the frequency of non-CD4 T cells and monocytes in late apoptosis for *P. vivax* infected individuals (0.50% and 0.72%, respectively) when compared to malaria-naïve donors (0.27% and 0.41%, respectively). On the other hand, further analysis focusing in granulocytes demonstrated a significant decrease of frequency of cells in late apoptosis in *P. vivax*-infected donors (1.99%) compared to malaria-naïve donors (7.85%) ( $p = 0.0009$  for both, see Additional file 1).

### Gene expression profiles indicate that *P. vivax* infection induces apoptosis in T CD4<sup>+</sup> cells by both extrinsic and intrinsic pathways

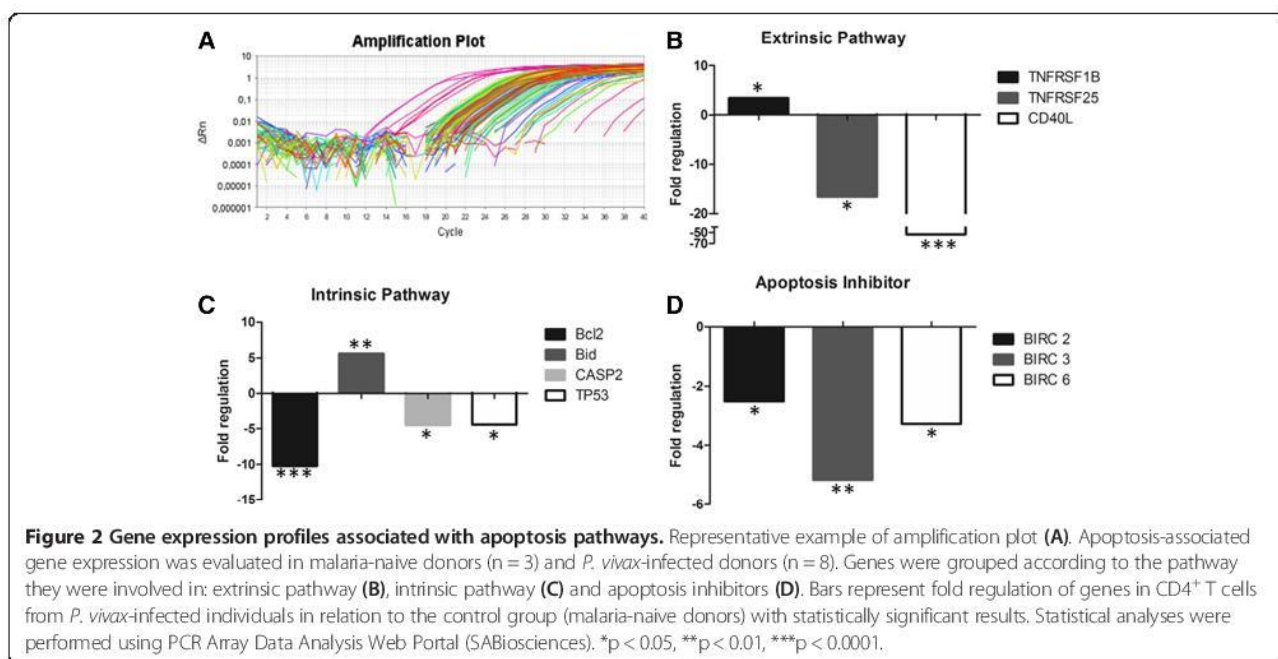
The observation that *P. vivax* infection induces apoptosis in CD4<sup>+</sup> T cells prompted us to examine the



possible pathways involved in this process. Thus, enriched CD4<sup>+</sup> T cells (average 99.5%, see Additional file 2) were evaluated for apoptosis-associated gene expression profiles (Figure 2A).

Analysis of 84 genes involved in different pathways of apoptosis showed differential expression of 10 genes in *P.*

*vivax*-infected patients in comparison to malaria-naive donors. These genes were separated into three groups based on extrinsic or intrinsic pathways and apoptosis inhibitors (Figure 2B, C and D, respectively). A significant increase was observed in the gene expression of TNFRSF1B (3.40; p = 0.026), an important death receptor expressed on the





T cell surface. On the other hand, CD40L gene, which interacts with the CD40 receptor, and TNFRSF25, both of which are expressed on the cell surface, were down-regulated ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.028$ , respectively). Considering that the Bcl-2 family contains pro and anti-apoptotic members, different levels of expression (up- and down-regulation) were observed. While Bid expression was increased 5-fold in *P. vivax*-infected individuals ( $p = 0.005$ ), Bcl-2 was 10-fold less expressed ( $p < 0.0001$ ) in the same donors. The genes involved in PIDDosome pathway (tp53 and caspase-2) were significantly down-regulated in *P. vivax* malaria ( $p = 0.042$  and  $p = 0.030$ ; respectively). Some genes encoding inhibitors of apoptotic proteins (IAPs), also called Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing (Birc), were also down-regulated.

#### Plasma levels of TNF are higher in *P. vivax*-infected donors

After observing a higher expression of TNFRSF1 in individuals infected with *P. vivax*, the plasma levels of tumour necrosis factor (TNF) was determined. The results indicate that *P. vivax*-infected individuals had higher levels of plasma TNF compared to malaria-naive donors ( $p < 0.001$ , Figure 3), suggesting that *P. vivax*-infected individuals have more probability in activating the apoptosis cascade.

#### Discussion

A better understanding in the apoptosis mechanisms induced by the *P. vivax* may be important to clarify the modulation of the human immune response. During vivax malaria, apoptosis is mostly found in CD4<sup>+</sup> T cells with a minor contribution of monocytes and non-CD4 T cells, which present significant frequency of cells in early apoptosis. These data suggest that the leukopaenia and

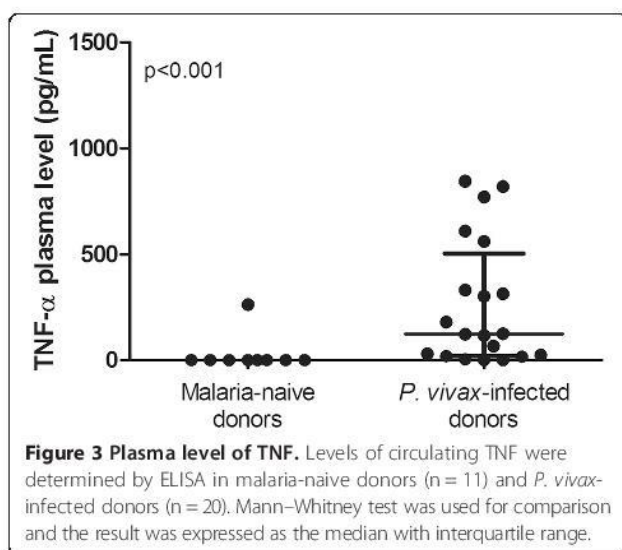
lymphocytopaenia observed in *P. vivax*-infected individuals is associated to apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells. Moreover, *P. vivax*-infected individuals had higher levels of plasma TNF and increased gene expression of TNFRSF1B (death receptor) and Bid (proapoptotic protein), and decreased gene expression of Bcl-2 (anti-apoptotic protein).

Apoptosis is a cell death process tightly regulated that may be triggered by different stimuli. Extrinsic stimuli (TNF, FasL, TRAIL) can activate the apoptosis cascade through death receptor expressed on the cell surface, such as TNFR, Fas and TRAIL-R (extrinsic pathway) [17].

On the other hand, apoptosis can also be activated by intrinsic stimuli caused by oxidative stress, leading to alterations on mitochondrial membrane (intrinsic pathway) [18]. The activation of intrinsic pathway initiated by permeabilization of the outer mitochondrial membrane provoked by pro-apoptotic proteins members of Bcl family followed by the release of pro-apoptotic factors (cytochrome C, Smac/DIABLO, AIF) from the mitochondrial intermembrane space in the cytoplasm, resulting in downstream activation of caspase-9 [18,19]. Regardless of the stimuli origin both pathways culminate in the activation of cysteine aspartyl protease 3 (caspase-3), caspase-6 and caspase-7, which results in chromatin condensation and DNA fragmentation.

Following the binding of TNF to its death receptor TNFR1, and subsequent recruitment of the TNF-associated death domain (TRADD) adapter protein, two events can occur: (i) activation of pro-inflammatory and potentially pro-tumor survival pathways through NF- $\kappa$ B, JNK and p38 or (ii) induction of apoptotic cell death via recruitment of Fas-associated death domain (FADD) and caspase-8 activation, culminating in the activation of caspase-3 [20,21]. Thus, death receptor signaling, despite its name, can either induce cell death by apoptosis or activate non-apoptotic cell signaling pathways.

Although some studies have linked the occurrence of T lymphocyte apoptosis with high levels of soluble Fas ligand (sFasL) in human malaria, the involvement of the Fas/FasL system has not been observed in experimental models of malaria [10,22]. Thus, unlike the studies that suggest the involvement of Fas/FasL in the lymphocytopaenia observed in patients with *P. falciparum* malaria, no increased expression of Fas and FasL genes in the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with *P. vivax* malaria was observed, similar to what had been found in malaria mouse models. In these experimental studies, apoptosis of *Plasmodium*-specific CD4<sup>+</sup> T cells was associated with IFN- $\gamma$ . In a mouse model of malaria using *P. berghei*, the parasite ortholog of macrophage migration inhibitory factor (PMIF) induced the upregulation of T-bet and IFN- $\gamma$  and the downregulation of IL-7R, IL-7, IL-2 and Bcl-2 in T cells specific for the parasite [22]. These CD4<sup>+</sup> T cells showed increased susceptibility to





apoptosis and were associated with low expression of Bcl-2, but not with Fas/FasL signaling. Importantly, patients with *P. falciparum* cerebral malaria also had higher levels of serum PMIF compared with patients with uncomplicated malaria [22].

The results demonstrate that CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from patients infected with *P. vivax* malaria have increased expression of TNFR1 and Bid and decreased expression of anti-apoptotic Bcl-2 mRNA. Bcl-2 is an anti-apoptotic protein that exerts its action through interaction with pro-apoptotic proteins such as Bcl-2 associated X-protein (Bax) and Bcl-2 homologous antagonist killer (Bak), inhibiting their activity. Moreover, Bid is a pro-apoptotic protein that exerts its action directly activating Bax/Bak, culminating in cell apoptosis. Therefore, the reduction in the expression of Bcl-2 and the increase in the expression of Bid may lead to increased pro-apoptotic signaling in activated CD4<sup>+</sup> T cells [23]. A signaling amplification loop is activated when caspase-8 levels are insufficient to activate caspase-3. Under these circumstances, caspase-8 cleaves Bid, yielding tBid (truncated Bid), which translocates to the mitochondria and directly activates Bax/Bad for pore formation, increasing the permeability of the mitochondrial outer membrane and culminating in apoptosis [20,21,23].

Apoptosis signaling pathways can be categorized into two types: (i) type I, mediated by TNFR1, with activation of caspase-3 by caspase-8 or by tBid, and (ii) type II, regulated by anti-apoptotic Bcl-2 proteins, which inhibit the function of pro-apoptotic proteins (such as Bax and Bad) to block apoptosis mediated by tBid or XIAP protein (inhibitor of caspase-9 activation – BIRC 4) [21]. Another important death receptor expressed on the cell surface is TNFRSF25 (also known as DR3), which is activated by TL1A [20].

The results showed that *P. vivax*-infected donors displayed decreased expression of TNFRSF25, suggesting that this gene is not involved in the apoptosis induced by *P. vivax*. Similar result was observed with CD40L, indicating no activation of CD40 signaling.

In addition to apoptosis activated by death receptors (extrinsic pathway) and mitochondria (intrinsic pathway), an alternative way to induce apoptosis has been proposed involving a protein called PIDD (p53-induced protein with death domain). This pathway, named PIDDosome, has been implicated in p53-dependent activation of caspase-2 in response to genotoxic stress [19]. The results showed a reduction in the gene expression of p53 and caspase-2 in malaria-infected individuals, suggesting that this pathway is not involved in *P. vivax*-induced apoptosis.

In the present study, it was observed a significant reduction in the gene expression of BIRC 2, 3 and 6 in *P. vivax*-infected donors, suggesting that these inhibitors of

apoptotic proteins are not inhibiting the caspase pathway, thus contributing to apoptosis. The IAPs are an important group composed of eight proteins (BIRC 1–8) with anti-apoptotic roles involved in the caspase pathway. The BIRC family can be divided into two groups: BIRCs that act directly on caspases (BIRC 1–4, 7 and 8) and BIRCs that act in mitotic spindle formation (BIRC 5 and 6) [24]. On the other hand, pro-apoptotic molecules released from mitochondria (Smac/DIABLO and Omi/HtrA2) are capable of neutralize IAPs binding in BIRC 2, 3, 4, 5 or 6 through IAP-binding motif presents in the their N-terminal region [18].

Finally, it was detected an increase in the plasma levels of TNF in *P. vivax*-infected donors in comparison with malaria-naive donors. This finding is consistent with prior studies that have shown higher levels of TNF in the plasma of individuals infected by *P. vivax* [9,25,26] and suggest that *P. vivax*-infected individuals, which present with elevated plasma levels of TNF and increased expression of TNFR1, might likely have increased activation of the apoptosis cascade via the TNF pathway. Taken together, the results indicate that increased CD4<sup>+</sup> T lymphocyte apoptosis during *P. vivax* malaria is mediated by either up-regulation of the TNFR1 pathway involving the Bid amplification loop (type I) and down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 signaling (type II). While T lymphocyte apoptosis might enable parasite persistence by limiting the occurrence of immunopathology, further studies are still required to determine whether this mechanism reflects a homeostatic host response against the presence of the parasite or whether it might reflect an immune evasion strategy triggered by the parasite.

## Additional files

### Additional file 1: Flow cytometric analysis of apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells.

Percentage of non-CD4 T cells (A), monocytes (B) and granulocytes (C) in early and late apoptosis from malaria-naive donors and *P. vivax*-infected donors. Mann-Whitney test was used for comparison. Bars represent the median.

### Additional file 2: Enrichment of T CD4<sup>+</sup> lymphocytes from PBMCs.

Representative example of gating strategy used to characterize CD4<sup>+</sup> T cells after enrichment by magnetic activated cell sorting. In the left panel, flow cytometry pattern (FSC x SSC) of PBMCs. In the right panel, proportion of T CD4<sup>+</sup> cell in regular PBMCs, after cell separation and in the CD4-depleted fraction. Data were collected on 1x10<sup>5</sup> lymphocytes (gated by forward and side scatter) and analysed using Flow Jo software (Tree Star Inc, USA).

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: NSHS DBP RTF LLB. Performed the experiments: NSHS DBP TAOM LSAP ACGG PHGG. Analyzed the data: NSHS DBP TAOM RTF LLB. Contributed reagents/materials/analysis tools: NSHS DBP GMZ DCB RTF LLB. Wrote the paper: NSHS DBP RTF LLB. Assisted with patient care and case identification: DBP MST. All authors read and approved the final manuscript.



### Acknowledgements

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Grant # 478379/2013-7). Lilian Lacerda Bueno is supported by Cordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior/CAPEs. Natália Hojo-Souza is supported by a Doctoral degree fellowship from CNPq/Brazil. Ricardo Fujiwara and Daniella Bartholomeu are supported by Brazilian National Research Council (CNPq) fellowships.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>2</sup>Research Centre in Tropical Medicine, Porto Velho, Rondônia, Brazil. <sup>3</sup>Clinical Research Institute Evandro Chagas, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 26 June 2014 Accepted: 16 December 2014  
Published: 5 January 2015

### References

1. Lisse IM, Aaby P, Whittle H, Knudsen K. A community study of T lymphocyte subsets and malaria parasitaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88:709–10.
2. Touré-Baldé A, Sarthou JL, Roussillon C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol Lett.* 1995;46:59–62.
3. Hviid L, Kurtzhals JAL, Goka BAQ, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Theander TG. Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 1997;65:4090–3.
4. Kern P, Dietrich M, Hemmer C, Wellinghausen N. Increased levels of soluble Fas ligand in serum in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2000;68:3061–3.
5. Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:376–9.
6. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, et al. Distinct roles for FOXP3+ and FOXP3-CD4+ T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000364.
7. Riccio EKP, Júnior IN, Riccio LRP, Alecrim MG, Corte-Real S, Morgado M, et al. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitol Res.* 2003;90:9–18.
8. Tangpukdee N, Yew HS, Krudsood S, Punyapradit N, Somwong W, Looareesuwan S, et al. Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. *Parasitol Int.* 2008;57:490–4.
9. Gonçalves RM, Salmazi KC, Santos BAN, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun.* 2010;78:4763–72.
10. Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO, Finkelman FD, et al. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4+ T cells in malaria infection. *J Exp Med.* 2002;195:881–92.
11. Riley EM, Rowe P, Allen SJ, Greenwood BM. Soluble plasma IL-2 receptors and malaria. *Clin Exp Immunol.* 1993;91:495–9.
12. Touré-Baldé A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, et al. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun.* 1996;64:744–50.
13. Matsumoto J, Kawai S, Terao K, Kirinoki M, Yasutomi Y, Aikawa M, et al. Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of *Macaca* monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection. *Infect Immun.* 2000;68:1183–8.
14. Hviid L, Kemp K. What is the cause of lymphopenia in malaria? *Infect Immun.* 2000;68:6087–9.
15. Kemp K, Akanmori BD, Adabayeri V, Goka BQ, Kurtzhals JAL, Behr C, et al. Cytokine production and apoptosis among T cells from patients under treatment for *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:151–7.
16. Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar J.* 2004;3:8.
17. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavemarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833 Suppl 12:3448–59.
18. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25:4798–811.
19. Jendrossek V. The intrinsic apoptosis pathways as a target in anticancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:1426–38.
20. Schneider-Brachert W, Heigl U, Ehrenschwender M. Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling. *Int J Mol Sci.* 2013;14:14475–503.
21. Tchikov V, Bertsch U, Fritsch J, Edelmann B, Schütze S. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *Eur J Cell Biol.* 2011;90:467–75.
22. Sun T, Holowka T, Song Y, Zierow S, Leng L, Chen Y, et al. A *Plasmodium*-encoded cytokine suppresses T-cell immunity during malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:2117–26.
23. Renault TT, Chipuk JE. Getting away with murder: how does the BCL-2 family of proteins kill with immunity? *Ann NY Acad Sci.* 2013;1285:59–79.
24. Saleem M, Qadir MI, Perveen N, Ahmad B, Saleem U, Irshad T, et al. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. *Chem Biol Drug Des.* 2012;82:243–51.
25. Gonçalves RM, Scopel KKG, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PLoS ONE.* 2012;7:e44394.
26. Mendonça VRR, Queiroz ATL, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Neto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2013;12:69.

doi:10.1186/1475-2875-14-5

**Cite this article as:** Hojo-Souza et al.: CD4<sup>+</sup> T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. *Malaria Journal* 2015 **14**:5.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Phenotypic profiling of CD8<sup>+</sup> T cells during *Plasmodium vivax* blood-stage infection

Natália Satchiko Hojo-Souza<sup>1</sup>, Dhelio Batista Pereira<sup>2</sup>, Livia Silva Araújo Passos<sup>1</sup>, Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães<sup>1</sup>, Mariana Santos Cardoso<sup>1</sup>, Mauro Shugiro Tada<sup>2</sup>, Graziela Maria Zanini<sup>3</sup>, Daniella Castanheira Bartholomeu<sup>1</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1</sup> and Lilian Lacerda Bueno<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** For a long time, the role of CD8<sup>+</sup> T cells in blood-stage malaria was not considered important because erythrocytes do not express major histocompatibility complex (MHC) class I proteins. While recent evidences suggest that CD8<sup>+</sup> T cells may play an important role during the erythrocytic phase of infection by eliminating parasites, CD8<sup>+</sup> T cells might also contribute to modulate the host response through production of regulatory cytokines. Thus, the role of CD8<sup>+</sup> T cells during blood-stage malaria is unclear. Here, we report the phenotypic profiling of CD8<sup>+</sup> T cells subsets from patients with uncomplicated symptomatic *P. vivax* malaria.

**Methods:** Blood samples were collected from 20 *Plasmodium vivax*-infected individuals and 12 healthy individuals. Immunophenotyping was conducted by flow cytometry. Plasma levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 were determined by ELISA/CBA. Unpaired t-test or Mann-Whitney test was used depending on the data distribution.

**Results:** *P. vivax*-infected subjects had lower percentages and absolute numbers of CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T cells when compared to uninfected individuals ( $p \leq 0.0002$ ). A significantly lower absolute number of circulating CD8<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> cells ( $p = 0.002$ ) was observed in *P. vivax*-infected individuals indicating that infection reduces the number of central memory T cells. Cytokine expression was significantly reduced in the naive T cells from infected individuals compared with negative controls, as shown by lower numbers of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ( $p = 0.001$ ), TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ) and IL-10<sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ) CD8<sup>+</sup> T cells. Despite the reduction in the number of CD8<sup>+</sup> memory T cells producing IFN- $\gamma$  ( $p < 0.0001$ ), *P. vivax*-infected individuals demonstrated a significant increase in memory CD8<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> ( $p = 0.016$ ) and CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> ( $p = 0.004$ ) cells. Positive correlations were observed between absolute numbers of CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> and numbers of CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ( $p < 0.001$ ) and CD8<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> T cells ( $p \leq 0.0001$ ). Finally, an increase in the plasma levels of TNF- $\alpha$  ( $p = 0.017$ ) and IL-10 ( $p = 0.006$ ) and a decrease in the IFN- $\gamma$  plasma level ( $p < 0.0001$ ) were observed in the *P. vivax*-infected individuals.

**Conclusions:** *P. vivax* infection reduces the numbers of different subsets of CD8<sup>+</sup> T cells, particularly the memory cells, during blood-stage of infection and enhances the number of CD8<sup>+</sup> memory T cells expressing IL-10, which positively correlates with the number of cells expressing TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ .

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, Malaria, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes

\* Correspondence: lilacerdabueno@gmail.com

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Hojo-Souza et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



## Background

Human malaria is caused by protozoa that belong to the genus *Plasmodium*, mainly *P. falciparum* and *P. vivax*. In Brazil, the Amazon region is endemic for malaria, and there is a high prevalence of *P. vivax* malaria (85% of cases), which has elevated the morbidity rate [1]. For malaria, naturally acquired protective immunity (lower risk of disease/lower parasitemia/asymptomatic disease) can be achieved only after repeated infections [2] and does not confer sterile immunity. For example, even though naturally acquired immunity protects against symptomatic malaria, a recent study on individuals living in the Mali endemic area found no evidence of acquired sterile immunity to *P. falciparum* infection [3].

B cells and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes play an important protective role during the blood stage of malaria infection [4], and CD8<sup>+</sup> T cells play a critical role in pre-erythrocytic immunity. Studies using experimental models have shown that these cells directly promote the lysis of infected hepatocytes and parasite death, and these events are mediated by IFN- $\gamma$ , perforin and granzyme B [5]. For a long time, the role of CD8<sup>+</sup> T cells in the blood stage of malaria was considered minor because erythrocytes do not express major histocompatibility complex (MHC) class I proteins [6,7]. Very few studies focusing on the function of CD8<sup>+</sup> T cells during blood-stage infection have been reported because there is some agreement among researchers that these cells only play an important role in the liver-stage of malaria. However, recent studies have suggested that CD8<sup>+</sup> T cells may play a role in eliminating parasites during the blood stage of infection [8,9]. An increase in the number of effector memory CD8<sup>+</sup> T cells in response to infection with lethal *P. yoelli* was observed in recipient mice that received CD8<sup>+</sup> T cells from immune mice [8]. Using animals genetically deficient for PD-1 (a molecule with particular importance in cell exhaustion), it was shown that there is a loss in the number and functional capacity of CD8<sup>+</sup> T cells during the acute phase of *P. chabaudi* malaria, which is mediated by PD-1 [9].

Several studies have shown that there is a reduction in the percentage and/or absolute number of CD8<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood during acute *P. falciparum* or *P. vivax* infection [10-14], and these reductions have been attributed to the apoptosis of these cells [15,16], the reallocation of T cells to sites of inflammation [12,17] or other factors such as the suppression of CD8<sup>+</sup> T cells induced by sporozoites or infected red blood cells [18]. In regard to *P. vivax* infection, however, reports have shown that there is no significant difference in the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells during an acute malaria infection compared with that in uninfected individuals [19,20].

Considering the existing controversy regarding the role of CD8<sup>+</sup> T cells during blood-stage infection, this study was conducted to quantify and evaluate the phenotypic

profiling of these cells during uncomplicated symptomatic *P. vivax* malaria infection. We show that there are reduced percentages and absolute numbers of CD8<sup>+</sup> naïve (CD45RA<sup>+</sup>), double-positive (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) and memory (CD45RO<sup>+</sup>) T cells. Additionally, statistically significant increases in the number of CD8<sup>+</sup> memory (CD45RO<sup>+</sup>) T cells expressing TNF- $\alpha$  and the number of CD8<sup>+</sup> memory (CD45RO<sup>+</sup>) T cells expressing IL-10 were observed in *P. vivax*-infected donors, and a reduced absolute number of these cells expressing IFN- $\gamma$  was also observed. Taken together our results suggest that *P. vivax* malaria infection reduce the number of circulating memory cells and elicit a profile of CD8<sup>+</sup> T cells expressing both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, which might contribute to the clearance of the parasite without the possible harmful effect of the immunopathology.

## Methods

### Study participants and blood samples

A total of 20 subjects naturally infected with *Plasmodium vivax* (*P. vivax*-infected donors) and with uncomplicated symptomatic malaria were recruited at the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (Porto Velho, Rondônia-Brazil). These subjects had at least one previous malaria episode. The control group consisted of 12 healthy individuals (malaria-naïve donors) with no previous malaria exposure recruited from a non-endemic area (Belo Horizonte, Minas Gerais-Brazil). The demographic and hematological characteristics of the subjects are shown in Table 1. The parasitological diagnosis of *P. vivax* infection was conducted by thick smears technique, which was analyzed by well-trained microscopists from the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical. The parasitemia was established in crosses and ranged from ½ + to 3+. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to confirm *P. vivax* mono-infection using a previously described protocol [21]. Hematological parameters were measured using an automated blood cell counter (ABX Pentra 90; Horiba Diagnostics, Kyoto, Japan).

Peripheral venous blood was collected in heparin tubes before beginning the antimalarial treatment. These blood samples were used for cell phenotyping and to obtain plasma for the cytokine assay.

### Ethics statement

The present study was approved by the Ethics Committee of the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CAAEs: 0008.0.046.000-11, 0449.0.203.000-09) and the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 27466214.0.0000.5149). Written informed consent was obtained from each participant.

### Flow cytometric analysis

The CD8<sup>+</sup> T cell analysis was conducted using four-color flow cytometry. Cell phenotyping was performed using



**Table 1 Demographic and hematological parameters of malaria-naïve donors and *P. vivax*-infected donors (mean ± SD)**

Parameters	Value for group		P value*
	Malaria-naïve donors (n = 11)	<i>P. vivax</i> -infected donors (n = 20)	
Age (years)	29.6 (23–36)	37.1 (19–72)	
Gender			
Male	9	15	
Female	3	5	
Hemoglobin (g/dL)	14.28 ± 1.76	13.52 ± 1.21	0.138
Hematocrit (%)	44.00 ± 4.67	38.39 ± 3.16	<b>0.0006</b>
RBCs (cells/mm <sup>3</sup> )	4980000 ± 580000	4630000 ± 510000	0.138
WBCs (cells/mm <sup>3</sup> )	7958 ± 2700	5900 ± 2235	<b>0.014</b>
Lymphocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	2306 ± 861.4	1583 ± 1558	<b>0.002</b>
CD8 <sup>+</sup>	842.4 ± 320.1	352.8 ± 205.2	<b>&lt;0.0001</b>
Monocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	154.3 ± 120.8	298.7 ± 183.3	<b>0.018</b>
Granulocytes	5293 ± 2409	3686 ± 1064	<b>0.049</b>
Eosinophils (cells/mm <sup>3</sup> )	225.7 ± 98.75	115.2 ± 80.76	<b>0.002</b>
Platelets (cells/mm <sup>3</sup> )	233300 ± 78170	124100 ± 55550	<b>0.0001</b>

\*Statistical differences determined by unpaired t-test. In bold significant P-values.

the following monoclonal antibodies: FITC anti-human CD8 (clone HIT8a); PE anti-human IFN- $\gamma$  (clone F12), TNF- $\alpha$  (clone MAb11), IL-10 (clone JES3-9D7), CCR7 (clone 3D12) and CD62L (clone DREG-56); PE-Cy5 anti-human CD45RO (clone UCHL1) and APC anti-human CD45RA (clone HI100). Briefly, 100  $\mu$ L of fresh whole blood samples were incubated with undiluted surface monoclonal antibodies for 30 minutes at room temperature under dark conditions. Next, the erythrocytes were lysed with ammonium chloride (150 mM) for 10 minutes and washed twice in PBS-W (0.5% BSA, 0.1% sodium azide). Cells were then permeabilized with PBS-P (0.5% BSA, 0.1% sodium azide, 0.5% saponin) for 10 minutes and washed twice with PBS-W. The cells were stained with undiluted intracellular monoclonal antibodies for 30 minutes at room temperature under dark conditions, washed with PBS-W and fixed with FACS fixation solution (10 g/L paraformaldehyde, 10.2 g/L sodium cacodylate, 6.65 g/L sodium chloride) for at least 15 minutes at 4°C. Phenotypic analyses were performed using flow cytometry in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). Data were collected on  $1 \times 10^5$  lymphocytes (gated by forward and side scatter) and analyzed using Flow Jo software (Tree Star Inc., USA). The gating strategy used to characterized CD8<sup>+</sup> T cells subsets was showed in Additional file 1.

#### Cytokine assay

The plasma levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Biotin-labeled antibodies were used for detection and

revealed with streptavidin-HRP (Amersham Biosciences, USA) and the OPD substrate system (Sigma). The colorimetric reaction was read using an automated ELISA microplate reader at 492 nm. The cytokine concentration was calculated from the standard curve using seven-parameter curve fitting software (SOFTmaxH Pro 5.3, Molecular Devices, USA), and the results were expressed in pg/mL. The limit of detection for the assay was 15.6 pg/mL for both cytokines. The IL-10 plasma level was determined using a cytometric bead array (CBA) (BD Bioscience) according to the manufacturer's instructions. The data was collected with a FACSCan flow cytometer (BD Biosciences, USA), and the results were expressed in pg/mL. The limit of detection of the assay was 4.5 pg/mL.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using the Prism software 5.0 for Windows. Initially, the Kolmogorov-Smirnoff test was applied to verify whether the obtained data represent a normal distribution. Grubb's test was used to verify the outliers. The unpaired t-test or Mann-Whitney test was used depending on the data distribution. A P-value < 0.05 was considered significant.

#### Results

##### Subsets of CD8<sup>+</sup> T cells are reduced during the blood stage of *P. vivax* malaria

During symptomatic *P. vivax* infection, the frequency and absolute number of CD8<sup>+</sup> naïve T cells (CD45RA<sup>+</sup>) are reduced (9.3%; median = 134.5 cells/mm<sup>3</sup>) compared with those in uninfected individuals (13.6%; median = 324.0

cells/mm<sup>3</sup>) ( $p = 0.0002$ ). A similar result was found for the CD8<sup>+</sup> memory T cells (CD45RO<sup>+</sup>) from *P. vivax*-infected donors (2.5%; median = 33.0 cells/mm<sup>3</sup>) compared with the malaria-naïve donors (11.8%; median = 212.5 cells/mm<sup>3</sup>) ( $p < 0.0001$ ). An analysis of the double-positive CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T cells also showed that the absolute number of these cells was significantly reduced in the *P. vivax*-infected donors (median = 59.5 vs. 146.0 cells/mm<sup>3</sup>) ( $p = 0.007$ ) (Figure 1).

#### Central memory CD8<sup>+</sup> T cells are reduced during *P. vivax* infection

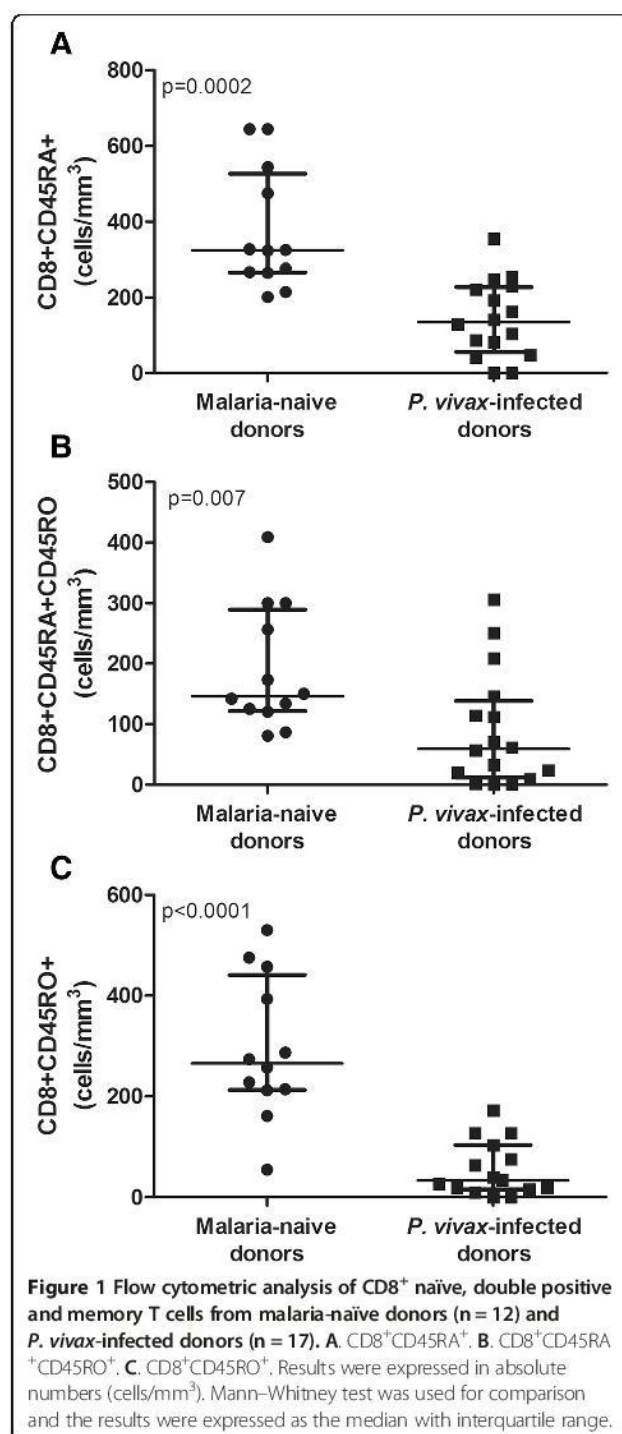
According to the expression patterns of the CCR7 and CD62L surface markers, the memory T cells can be separated into central memory (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>) and effector memory (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>) cells [22]. As shown in Figure 2, *P. vivax* infection reduced the number of CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> compared with those in malaria-naïve donors (median = 27.0 vs. 274.0 cells/mm<sup>3</sup>), whereas there were no significant differences in CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (median = 30.5 vs. 14.0 cells/mm<sup>3</sup>) central memory T cells ( $p = 0.002$  and  $p = 0.120$ , respectively). No difference was observed in the number of CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> ( $p = 0.137$ ) effector memory T cells. Despite the statistically significant result for the difference in the CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T cell number ( $p < 0.0001$ ) between *P. vivax*-infected donors and malaria-naïve donors, the number of these cells was too low for this result to be meaningful (median = 1.0 vs. 16.0 cells/mm<sup>3</sup>).

#### CD8<sup>+</sup> naïve T cells of *P. vivax* patients present a phenotypic cytokine profile similar to that of malaria-naïve donors

*P. vivax*-infected donors presented lower numbers of CD8<sup>+</sup> naïve T cells IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (median = 113.0) compared with the negative controls (median = 224.5 cells/mm<sup>3</sup>) ( $p = 0.001$ ). Similar results were observed for the CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (median = 87.0 vs. 255.0 cells/mm<sup>3</sup>) and CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cells (median = 91.0 vs. 280.5 cells/mm<sup>3</sup>) (Figure 3A). Although the absolute numbers of these naïve T cells were lower in the *P. vivax*-infected donors, the phenotypic profiles of cytokine expression were very similar.

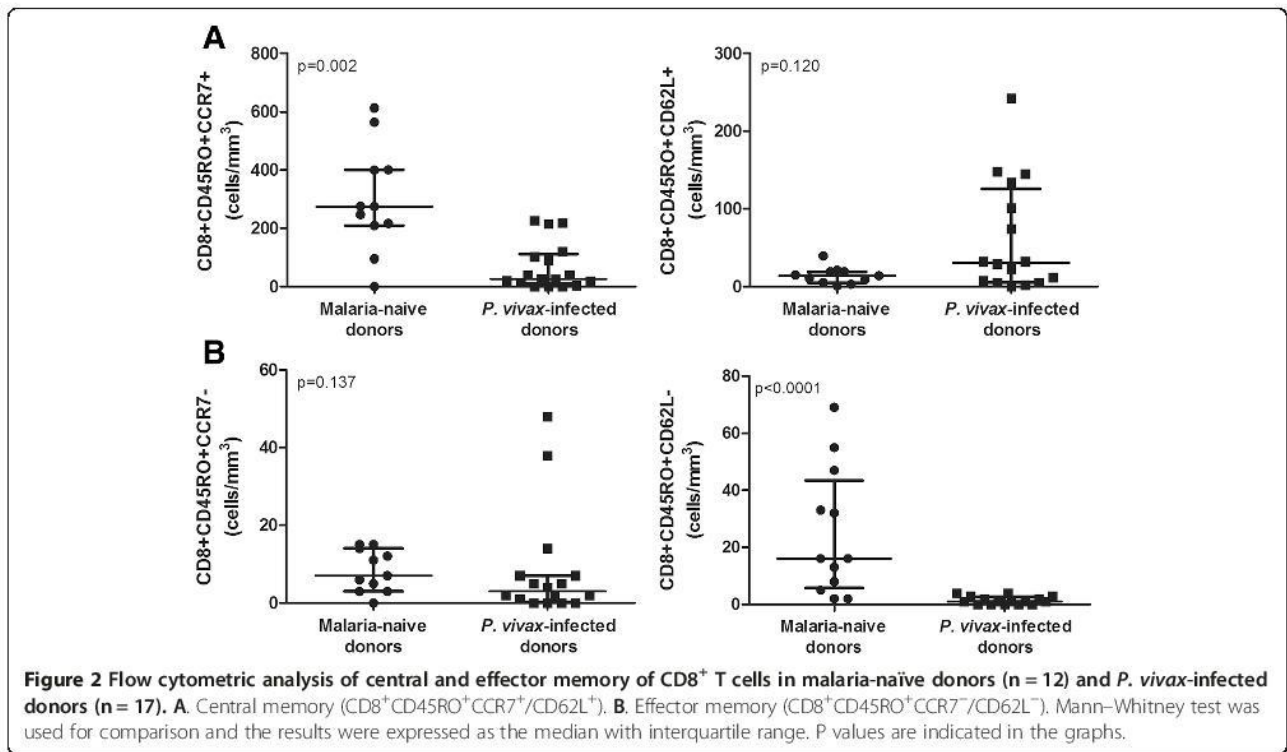
#### CD8<sup>+</sup> double-positive and memory T cells expressing TNF- $\alpha$ and IL-10 are enhanced during the blood stage of *P. vivax* malaria

In the *P. vivax*-infected donors, a reduced number of double-positive T cells (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) expressing IFN- $\gamma$  ( $p = 0.007$ ) was observed. On the other hand, the number of these CD8<sup>+</sup> T cells expressing either TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> or IL-10<sup>+</sup> tended to increase in the *P. vivax*-infected donors (Figure 3B). Despite the reduced number of CD8<sup>+</sup> memory



T cells (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) that expressed IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ), the *P. vivax*-infected donors presented a significant increase in the number of memory CD8<sup>+</sup> T cells expressing either TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> ( $p = 0.016$ ) or IL-10<sup>+</sup> ( $p = 0.004$ ) (Figure 3C), which suggests that a different immune response occurs during blood-stage malaria infection.





**Absolute number of IL-10-producing CD8<sup>+</sup> T cells correlates with the number of CD8<sup>+</sup> T cells expressing IFN-γ and CD8<sup>+</sup> T cells expressing TNF-α during *P. vivax* infection**

The naïve, double-positive and memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets expressed pro- and anti-inflammatory cytokines, such as IFN-γ, TNF-α and IL-10. Therefore, we assessed the correlation between the numbers of CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells with a pro-inflammatory phenotype among the different subsets of CD8<sup>+</sup> T cells. Positive correlations between the absolute number of CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> T cells and the numbers of CD8<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup> (p < 0.001) and CD8<sup>+</sup>TNF-α<sup>+</sup> T cells (p ≤ 0.0001) were found, and these correlations were independent of the subset type (naïve, double-positive and memory cells) (Figure 4A-C).

The analysis of ratio between production of pro-inflammatory (IFN-γ and TNF-α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines by T CD8<sup>+</sup> cells in the different subsets are showed in Figure 5. No significant differences between *P. vivax* patients and naïve donors were detected in the ratio of TNF-α and IL-10 for all CD8<sup>+</sup> T cell subsets. On the other hand, *P. vivax* malaria patients presented a significant decrease in the IFN-γ/IL-10 ratio in double-positive (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) and memory (CD45RO<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells when compared to control individuals, indicating a immunomodulatory profile during infection.

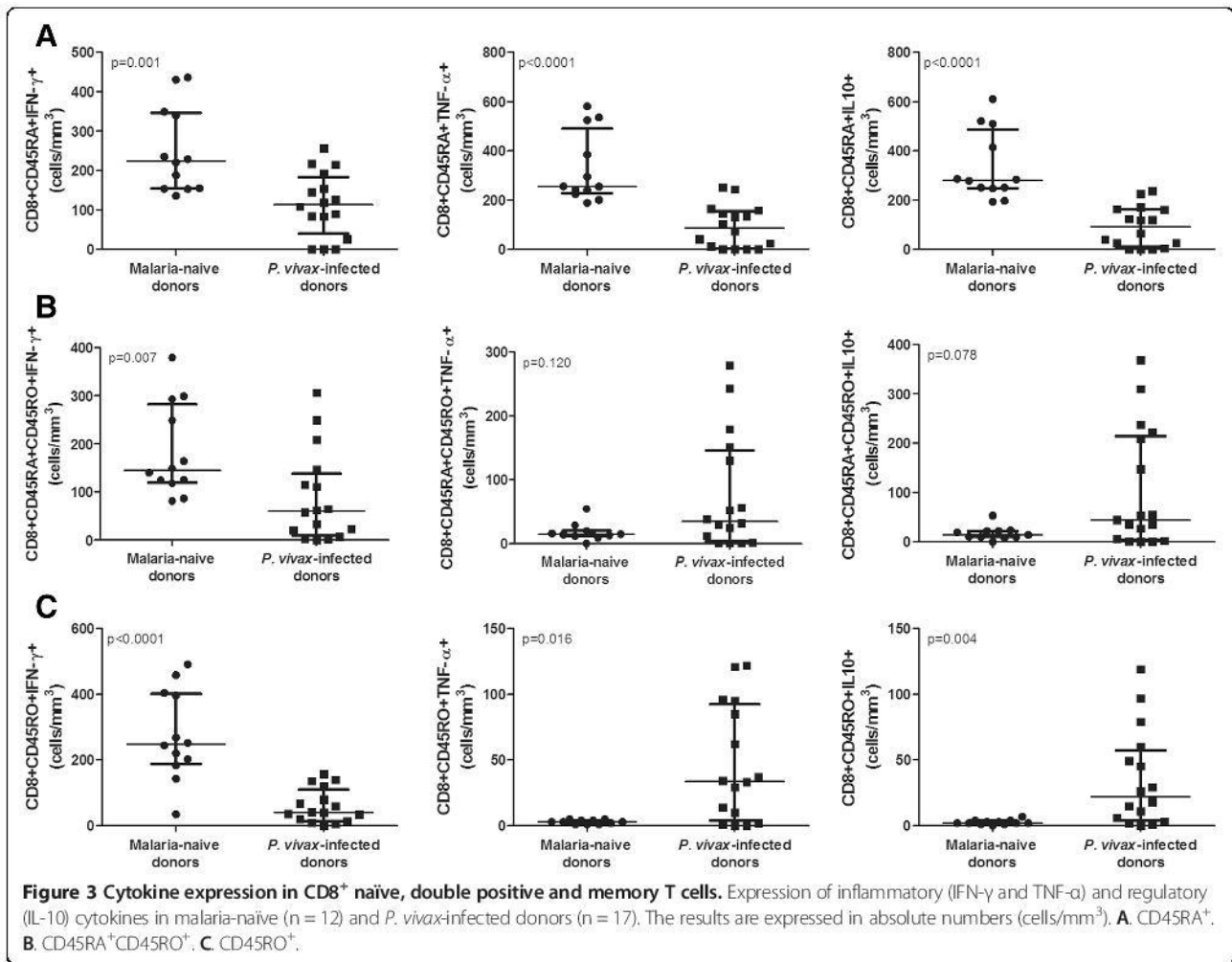
**Plasma levels of IFN-γ, TNF-α and IL-10 in *P. vivax*-infected donors**

After evaluating the cytokine expression patterns in CD8<sup>+</sup> naïve, double-positive and memory T cells, we investigated the plasma levels of IFN-γ, TNF-α and IL-10 in both donor groups. *P. vivax* infection promoted an increase in the plasma levels of TNF-α (p = 0.017) and IL-10 (p = 0.006) and a reduction in the plasma level of IFN-γ (p < 0.0001) (Figure 6). These results are consistent with the phenotype of the CD8<sup>+</sup> memory T cell population regarding the expression of these cytokines (Figure 3C).

**Discussion**

Although studies have shown that the percentage and/or absolute number of CD8<sup>+</sup> T cells are reduced during human malaria infection, the phenotypic and functional profile of these cells remain poorly characterized. Using cell surface and intracellular cytokine markers, this study aimed to identify the occurrence of different subsets of CD8<sup>+</sup> T cells in individuals naturally infected with *P. vivax* during an uncomplicated symptomatic infection. For this study, blood samples obtained from patients with a *P. vivax* malarial infection and malaria-naïve donors were stained with specific monoclonal antibodies.

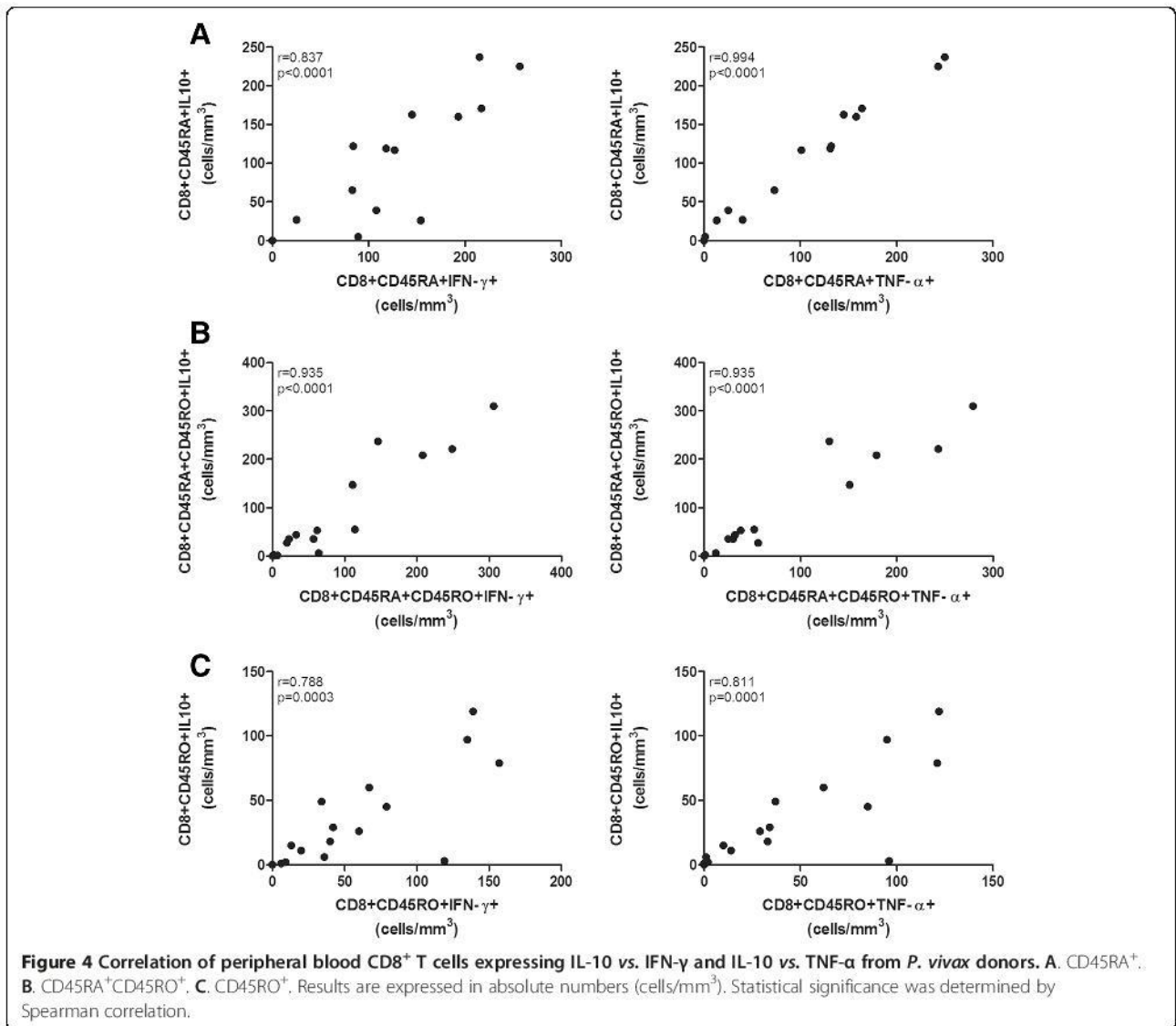
Our results demonstrate that during blood-stage *P. vivax* infection, there is a significant reduction in the percentages and absolute numbers of CD8<sup>+</sup> naïve (CD45RA<sup>+</sup>) and memory (CD45RO<sup>+</sup>) T cells (Figure 1A and 1C). As



previously discussed in the Introduction section, a number of reports have shown an overall reduction in the number of CD8<sup>+</sup> T cells during an acute malaria infection in humans [10-14]. Other studies, however, have reported conflicting findings [19,20]. Several hypotheses have been proposed to explain the reduction in CD8<sup>+</sup> T cell number. An interesting experimental study showed that the response of CD8<sup>+</sup> T cells induced by irradiated sporozoites of *P. yoelli* in Balb/c mice is abrogated by either the simultaneous injection of nonirradiated sporozoites or the direct inoculation of blood-stage forms of the parasite [18]. Therefore, it is possible that the low number of CD8<sup>+</sup> T cells observed during *P. vivax* malaria is caused by parasite-induced suppression. As an alternative possibility, Horne-Debets et al. (2013) proposed that this low number could be the result of exhaustion and a loss of CD8<sup>+</sup> T cells mediated by Programmed Cell Death-1 (PD-1). Apoptosis [15,16] and the temporary reallocation of these cells to the liver and other tissues are additional alternative mechanisms that should also be considered [12,17].

Furthermore, using the CCR7 and CD62L surface markers [22], the reduced number of CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T cells presented a central memory profile (Figure 2A). Effector memory cells migrate to tissues [22], and it is possible that the extremely low number of these cells circulating in the blood may reflect an earlier liver stage of infection. Importantly, despite the overall reduction in CD8<sup>+</sup> T cells during *P. vivax* malaria, significant relative increases in the numbers of CD8<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> in the memory (CD45RO<sup>+</sup>) cell subsets were observed (Figure 3C), which suggests that the functional response may be different during a malaria infection. Given that double-positive (CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) T cells may represent a transition to form memory (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) T cells, the increasing trend in the number of IL-10<sup>+</sup> cells observed in *P. vivax* malaria patients may indicate the induction of a mostly immunoregulatory profile during the blood stage of this disease, as also corroborated by the analysis of the ratio between pro- and anti-inflammatory cytokines. Indeed,



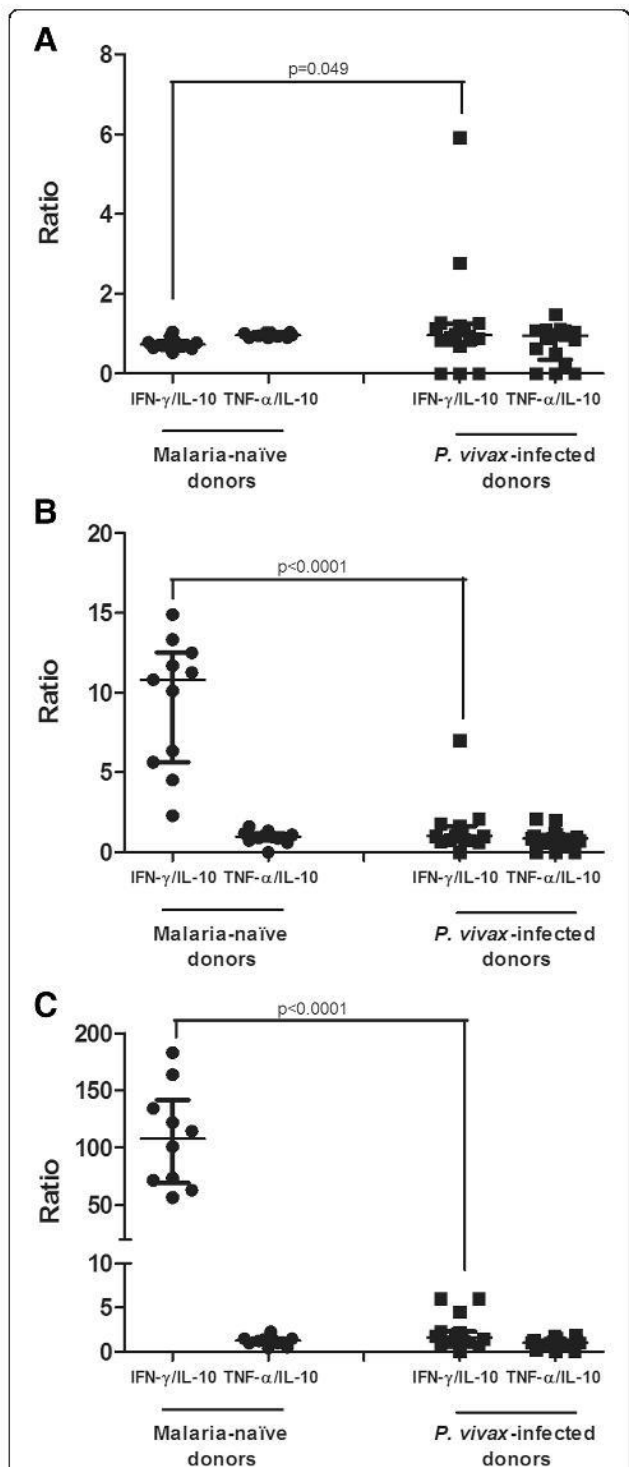


the number of these IL-10<sup>+</sup> cells was positively correlated with the number of cells expressing IFN- $\gamma$  and the number of cells expressing TNF- $\alpha$ . Moreover, these cell profiles are consistent with the plasma cytokine levels observed during blood-stage infection in these patients. The higher plasma levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 observed in the *P. vivax*-infected donors are consistent with the results reported in other previous studies [23-25]. While the results might suggest that CD8<sup>+</sup> T cells may contribute to the broad systemic changes during acute infection, it is not possible, however, to know whether these cells contribute to cytokine secretion at this stage because the number of effector cells was very low. Further studies using experimental models focusing in the depletion of specific cell populations should be carried out in order to support the importance of these cells to the broad systemic

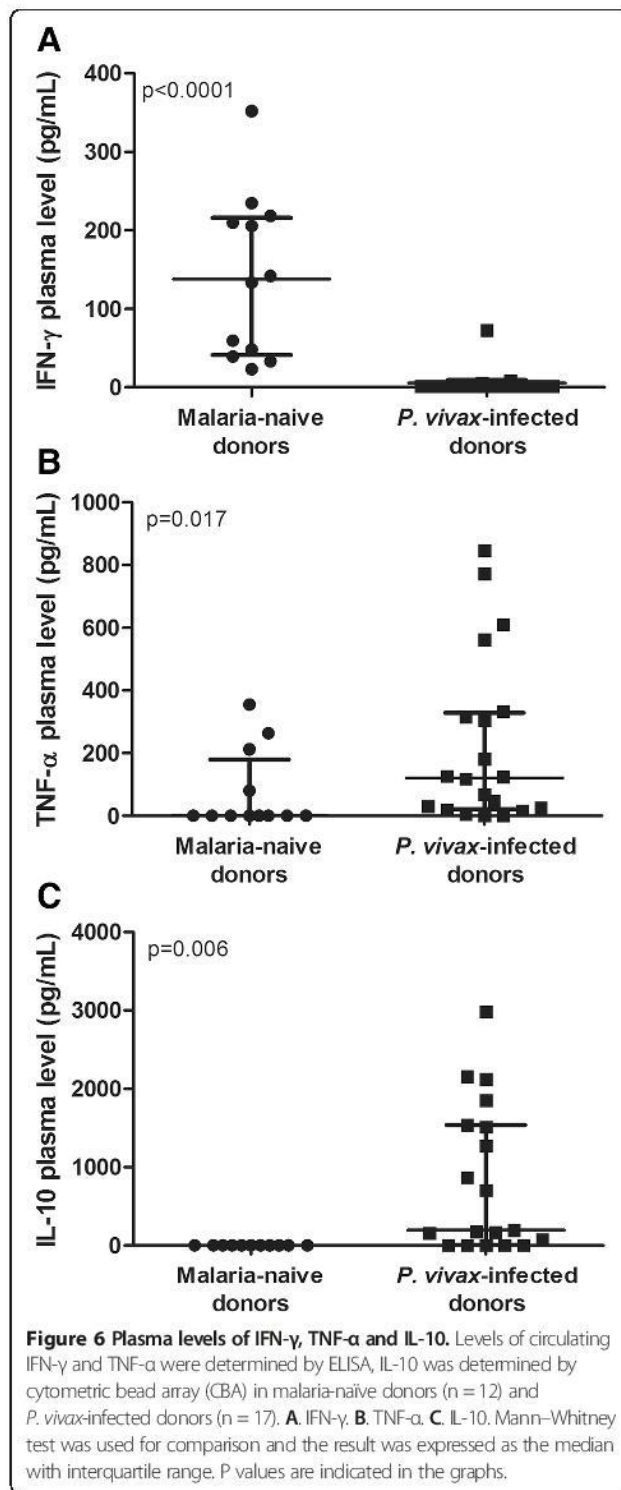
changes in the host. Conversely, the profile of the memory cells may reflect a previous exposure to the pre-erythrocytic stage antigen. From this perspective, a more immunoregulatory profile may explain the difficulty in achieving sterile immunity [3,6].

**Conclusion**

Taken together, our results highlight the following two important findings: i) there is a significant reduction in specific subsets of CD8<sup>+</sup> T cells, and particularly in memory cells, during the blood stage of a *P. vivax* infection; and ii) there are relatively high numbers of cells expressing IL-10 in the memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets, which positively correlates with the number of cells expressing TNF- $\alpha$  and the number of cells expressing IFN- $\gamma$ . The results suggest that these CD8<sup>+</sup> T cells co-expressing both pro-inflammatory and anti-



**Figure 5** Ratio between pro- and anti-inflammatory cytokines produced by CD8<sup>+</sup> T cells. Results represent the ratio between pro-inflammatory (IFN-γ or TNF-α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine production in malaria-naïve (n = 12) and *P. vivax*-infected donors (n = 17). **A.** naïve CD45RA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. **B.** double-positive CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. **C.** memory CD45RO<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. Mann-Whitney test was used for comparison and the result was expressed as the median with interquartile range.



**Figure 6** Plasma levels of IFN-γ, TNF-α and IL-10. Levels of circulating IFN-γ and TNF-α were determined by ELISA, IL-10 was determined by cytometric bead array (CBA) in malaria-naïve donors (n = 12) and *P. vivax*-infected donors (n = 17). **A.** IFN-γ. **B.** TNF-α. **C.** IL-10. Mann-Whitney test was used for comparison and the result was expressed as the median with interquartile range. P values are indicated in the graphs.

inflammatory cytokines might contribute to the clearance of the parasite and prevent the immunopathology conferred by the excessive pro-inflammatory response. Additional studies are required to determine whether the phenotypic profiles observed represent a homeostatic immune response that benefits the host, by preventing



immunopathology, or a response that is harmful due to the formation of immunomodulatory memory that would allow the persistent presence of the parasite.

## Additional file

**Additional file 1: Figure S1.** Gating strategy to determination of CD8<sup>+</sup> T cell subsets. Representative dot plots as example of gating strategy used to characterize CD8<sup>+</sup> T cells. (A) Flow cytometry pattern (FSC x SSC) of whole blood and gate on lymphocytes (B) Frequency of CD8<sup>+</sup> T cells. (C) Representative dot plots showing the frequency of naïve (CD45RA<sup>+</sup>), double-positive (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) and memory (CD45RO<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells. (D) Representative dot plots showing the frequency of memory cells with expression of CCR7. Data were collected on 1 × 10<sup>5</sup> lymphocytes (gated by forward and side scatter) and analyzed using Flow Jo software (Tree Star Inc., USA).

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

Conception and design of the experiments: NSHS, DBP, RTF and LLB. Performed the experiments: NSHS, DBP, LSAP, PHGG and MSC. Analyzed the data: NSHS, DBP, MSC, RTF and LLB. Contributed reagents/materials/analysis tools: NSHS, DBP, GMZ, DCB, RTF and LLB. Wrote the paper: NSHS, DBP, RTF and LLB. Assisted with patient care and case identification: DBP and MST. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Grant # 478379/2013-7) and FAPEMIG (Grant # APQ-02399-14). Lilian Lacerda Bueno is supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior/CAPES and FAPEMIG. Natália Satchiko Hojo de Souza is supported by a doctoral degree fellowship from CNPq/Brazil. Ricardo Fujiwara and Daniella Bartholomeu are supported by Brazilian National Research Council (CNPq) fellowships.

## Author details

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. <sup>2</sup>Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, Rondônia, Brazil. <sup>3</sup>Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 1 October 2014 Accepted: 15 January 2015

Published online: 31 January 2015

## References

- WHO. Country profile. In: World Malaria Report 2013. World Health Organization. 2013. [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/). Accessed 18 Set 2014
- Doolan DL, Doban C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):13–36.
- Tran TM, Li S, Doumbo S, Doumbo D, Huang CY, Dia S, et al. An intensive longitudinal cohort study of malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. *Clin Infect Dis.* 2013;57(1):40–7.
- Wipasa J, Elliott S, Xu H, Good MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunol Cell Biol.* 2002;80(5):401–14.
- Tse SW, Radtke AJ, Zavala F. Induction and maintenance of protective CD8<sup>+</sup> T cells against malaria liver stages: implications for vaccine development. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(1):172–8.
- Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev.* 2004;201:268–90.
- Hisaeda H, Yasutomo K, Himeno K. Malaria: immune evasion by parasites. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(4):700–6.
- Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, Tetsutani K, et al. Involvement of CD8<sup>+</sup> T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. *Eur J Immunol.* 2010;40(4):1053–61.
- Horne-Debets JM, Faleiro R, Karunaratne DS, Liu XQ, Lineburg KE, Poh CM, et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8<sup>+</sup> T cells drives chronic malaria. *Cell Reports.* 2013;5(5):1204–13.
- Lisse IM, Aaby P, Whittle H, Knudsen K. A community study of T lymphocyte subsets and malaria parasitemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88:709–10.
- Worku S, Björkman A, Troye-Blomberg M, Jemaneh L, Färnert A, Christenson B. Lymphocyte activation and subset redistribution in the peripheral blood in acute malaria illness: distinct γδ<sup>+</sup> T cell patterns in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections. *Clin Exp Immunol.* 1997;108(1):34–41.
- Hviid L, Kurtzhals JAL, Goka BAO, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Theander TH. Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 1997;65:4090–3.
- Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:376–9.
- Borges QI, Fontes CJF, Damazo AS. Analysis of lymphocytes in patients with *Plasmodium vivax* malaria and its relation to the annexin-A1 and IL-10. *Malar J.* 2013;12:455.
- Touré-Baldé A, Sarthou JL, Roussillon C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol Lett.* 1995;46:59–62.
- Riccio EKP, Júnior IN, Riccio LR, das Graças Alecrim M, Corte-Real S, Morgado M, et al. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. *Parasitol Res.* 2003;90:9–18.
- Hviid L, Kemp K. What is the cause of lymphopenia in malaria? *Infect Immun.* 2000;68:6087–9.
- Ocaña-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;197(2):143–51.
- Srisurapanon S, Wivattanakul S, Apibal S, Suwannuruk R, Sujimanaskul S, Petchsuwan B, et al. Lymphocyte subpopulations in malaria infected individuals living in an endemic area, Southeast Asian. *J Trop Med Public Health.* 2003;34:310–5.
- Jangpatarapongsa K, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Cui L, Montgomery SM, Looareesuwan S, et al. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microbes Infect.* 2006;8(3):680–6.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosário VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasit.* 1993;61:315–20.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745–63.
- Gonçalves RM, Salmazi KC, Santos BAN, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun.* 2010;78 Suppl 11:4763–72.
- Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarência J, Camargo LMA, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J.* 2010;9:13.
- Mendonça VRR, Queiroz ATL, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Neto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2013;12:69.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





## Characterization of $\gamma\delta$ T lymphocytes during *P. vivax* malaria: a preliminary study

Natália Satchiko Hojo-Souza<sup>1</sup>, Dhelio Batista Pereira<sup>2</sup>, Mauro Shugiro Tada<sup>2</sup>, Graziela Maria Zanini<sup>3</sup>, Daniella Castanheira Bartholomeu<sup>1</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1</sup>, Lilian Lacerda Bueno<sup>1</sup>

1 – Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil;

2 – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, Rondônia, Brasil;

3 – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Corresponding author:

Lilian Lacerda Bueno

Av. Antônio Carlos 6627,

31270-901 Belo Horizonte (MG) Brazil

Ph. +55 31 34092871/Fax. +55 31 34092970

E-mail: [lilacerdabueno@gmail.com](mailto:lilacerdabueno@gmail.com)

## ABSTRACT

**Background:**  $\gamma\delta$  T cells are subpopulation T lymphocytes that are able to recognize ligand in an MHC-independent manner. Similar to  $CD4^+$  T lymphocytes,  $\gamma\delta$  T cells can display a phenotypic plasticity with Th1-like and Th17-like phenotype. In humans,  $\gamma\delta$  T cells circulating in the peripheral blood have mainly V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 phenotype. In addition to  $\alpha\beta$  T cells, these  $\gamma\delta$  T subsets can be an important cellular source of pro-inflammatory cytokines during malaria infection. Studies involving  $\gamma\delta$  T cells during *P. vivax* infection are scarce and controversial. In the present study it was investigated the frequency and the phenotypic profile of  $\gamma\delta$  T cells in *P. vivax*-infected patients during blood-stage of malaria.

**Methods:** Eight-color flow cytometry analysis was performed to evaluate the Th1-like and Th17-like  $\gamma\delta$  T cells phenotypic profile. PBMCs and plasma samples were obtained from peripheral blood samples from *P. vivax*-infected (n=8) and malaria-naïve donors (n=7). The cytokine plasma levels were measured by CBA or ELISA.

**Results:** *P. vivax* malaria patients showed reduced absolute number of  $\gamma\delta$  T cells, especially in the TCR $\gamma\delta^+CD27^+$  subset during *P. vivax* infection. In addition, it was observed decreased absolute numbers of Th1-like  $\gamma\delta$  T cells (p=0.037) associated with lower IFN- $\gamma$  plasma levels in *P. vivax* donors. Despite the higher plasma levels of IL-17, Th17-like  $\gamma\delta$  T cells were not detected in peripheral blood of infected individuals.

**Conclusions:** *P. vivax* infection reduces the absolute number of  $\gamma\delta$  T cells and Th1-like  $\gamma\delta$  T cells phenotype. Despite the higher IL-17 plasma levels in *P. vivax* individuals, the results suggest that this cytokine cellular source is not from  $\gamma\delta$  T cells. The obtained data reinforce the idea that repeated malaria exposure contributes to the loss of pro-inflammatory response driven by  $\gamma\delta$  T cells.

## KEYWORDS

*Plasmodium vivax*, Malaria, T $\gamma\delta$  lymphocyte, IFN- $\gamma$ , IL-17

## BACKGROUND

The  $\gamma\delta$  T cells are a small subpopulation of CD3<sup>+</sup> cells (1-10%) in peripheral blood of healthy individuals, mainly V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 phenotype in adults (50-95%) [1]. These cells are double-negative (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) T lymphocytes, and are able to directly recognize non-peptide antigens and to respond to phosphorylated metabolic intermediates of bacteria and protozoa (phosphoantigens) without MHC class I or class II molecules presentation [2]. In response to phosphoantigen,  $\gamma\delta$  T cells proliferate and are able to produce cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [3].  $\gamma\delta$  T cells development are affected by thymic selection. During development in the thymus, if the  $\gamma\delta$  T cells experience TCR-ligand signals, they will produce IFN- $\gamma$  while  $\gamma\delta$  T cells that do not receive this signal can produce IL-17 [4]. The CD27 surface molecule could be used to identify Th17-like  $\gamma\delta$  T cells, since IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells are restricted to CD27<sup>-</sup> subset [4,5].

It should be noted that in healthy individuals, most of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells (50-80%) is Th1-like and produce IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , but fewer than 1% produce IL-17 [6]. It was shown that the frequency of IL-17-producing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells was significantly increased in the peripheral blood and at site of disease in children affected by bacterial meningitis, suggesting that these cells may play an important role in the pathogenesis and inflammatory response during the disease [7].

Previous studies have shown different results on  $\gamma\delta$  T cells responses during human malaria infection [8-11].

Different  $\gamma\delta$  T cell responses may be related to both host and parasite factors. Moreover, repeated clinical malaria episodes can lead to loss and dysfunction of V $\delta$ 2<sup>+</sup> T cells, as demonstrated in a recent study involving Uganda children with low and high previous malaria

episodes [12]. In fact, prior investigations had already found no increase in  $\gamma\delta$  T subset during *P. falciparum* malaria in patients with chronic exposure to disease, in contrast to higher  $\gamma\delta$  T cells frequencies observed in non immune individuals [13,14].

Brazilian Amazon region is endemic for malaria, with high prevalence of *P. vivax* infection (84% of cases) [15]. In our knowledge, there is no study of  $\gamma\delta$  T cells during *P. vivax* infection in this population. Therefore, in this pilot evaluation, we have analyzed the frequencies and phenotypic profile of  $\gamma\delta$  T cells during acute *P. vivax* infection in patients recruited in Porto Velho (Rondônia), an endemic malaria area of Amazon.

Considering the evidences that the number of CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> cells [16] and the plasma levels of IL-17 [17] were enhanced during *P. vivax* infection, we decided to investigate the frequency and characterize phenotypically  $\gamma\delta$  T cells during blood-stage of malaria vivax.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics Statement**

The present study was approved by the Ethics Committee of the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CAAEs: 0008.0.046.000-11, 0449.0.203.000-09) and the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 27466214.0.0000.5149). Written informed consent was obtained from each participant.

### **Study participants and blood samples collection**

Individuals naturally infected by *Plasmodium vivax* (*P. vivax*-infected donors, n=8) with uncomplicated symptomatic malaria were recruited at the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (Porto Velho, Rondônia – Brazil). In addition, individuals with no previous malaria exposure (Malaria-naïve donors, n=7) were also recruited, from a non-endemic area (Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil), composing the control group. The demographic,

parasitological and symptomatological parameters of the subjects are shown in Table 1. The parasitological diagnosis of *P. vivax* infection was performed by well-trained microscopists from the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical using thick smears stained with Giemsa and confirmed by nested Polymerase Chain Reaction (PCR) as previously described [18]. Peripheral venous blood was collected in tubes containing heparin before beginning the antimalarial treatment and the samples were used for isolation of peripheral blood mononuclear cells. The haematological parameters of the subjects were measured using an automated blood cell counter (ABX Pentra 90; Horiba Diagnostic, Kyoto, Japan) and are shown in Table 2.

### **Isolation of peripheral blood mononuclear cells**

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated from 30mL of blood using a density gradient centrifugation (Histopaque®, Sigma Aldrich). The PBMCs were recovered and washed twice with RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich) supplemented with 1% of antibiotic-antimycotic solution (Gibco). Then, the cells were resuspended in freezing solution, comprised of 90% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 10% of dimethylsulfoxide (DMSO), at a final concentration of  $1 \times 10^7$  cells/mL. The PBMCs were frozen at  $-80^\circ\text{C}$  and transported to Belo Horizonte (Minas Gerais – Brazil) in dry ice. The PBMCs samples were cryopreserved in liquid nitrogen until performing the assays.

### **Cell surface and intracytoplasmic staining**

The PBMCs were thawed in RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich) supplemented with 10% of FBS (Gibco), 1% of antibiotic-antimycotic solution (Gibco) and DNase II S  $2 \mu\text{g/mL}$  (SigmaAldrich) and washed one time in RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich) without DNase. The obtained cells were stained with trypan blue, counted in Neubauer chamber and resuspended at a final concentration of  $3,5 \times 10^5$  cells/mL. Cells were resting during four hours

at 37°C in CO<sup>2</sup> incubator and then, stimulated with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA – Sigma Aldrich) and Ionomycin (Sigma Aldrich) in the presence of BD GolgiPlug (BD Biosciences) during five hours. Following, the PBMCs were washed in PBS, stained with BD Horizon™ Fixable Viability Stain 450 (BD Biosciences) during 15 minutes and washed twice in PBS-W (0.5% BSA, 0.1% sodium azide) and cells surface were stained with monoclonal antibodies from BD Biosciences: APC-H7 anti-human CD3 (clone SK7), APC anti-human CD4 (clone RPA-T4), PE anti-human CD8 (clone HIT8a), FITC anti-human TCRγδ (clone B1) and V500 anti-human CD27 (clone M-T271), during 30 minutes at room temperature. The PBMCs were washed twice in PBS-W and incubated with Fixation/Permeabilization solution (BD Biosciences) during 30 minutes at 4°C and washed twice in BD Perm/Wash™ Buffer (BD Biosciences). Intracellular staining with monoclonal antibodies from BD Biosciences: PE-Cy7 anti-human IFN-γ (clone B27) and Alexa Fluor 700 anti-human IL-17A (clone N49-653) was performed during 30 minutes at 4°C. The PBMCs were washed again with BD Perm/Wash™ Buffer (BD Biosciences).

### **Flow cytometric acquisition and analysis**

Eight-color flow cytometric acquisition was performed using a BD LSRFortessa™ (BD Biosciences). Before data acquisition, the cytometer was calibrated with BD™ CompBeads (BD Biosciences) and the data were acquired using FACSDiva software. For each sample, data were acquired on total of 200.000 events. The data analyses were performed using Flow Jo software (Tree Star) and the gates were established using Fluorescence Minus One (FMO) controls. The gating strategy used to characterized γδ T lymphocytes was showed in Figure 1.

### **Cytokine plasma levels assays**

Plasma samples were obtained by centrifugation of venous blood samples and stored at -80 °C until performing the cytokine assays. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was performed for the measurement of IFN- $\gamma$  (R&D Systems, USA), according to the manufacturer's instructions. Biotin-labeled antibodies were used for detection and the assay was revealed with streptavidin-HRP (Amersham Biosciences, USA) using OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) substrate system (Sigma, USA). The colorimetric reaction was read using an automated ELISA microplate reader (Versamax, Molecular Devices, USA) at 492 nm. The cytokine concentration was calculated from the standard curve using seven-parameter curve fitting software (SOFTmax Pro 5.3, Molecular Devices). The limit of detection was 15.6 pg/mL. Measurement of IL-17 in the plasma samples was conducted using Cytometric Bead Assay (CBA) (BD Biosciences, USA) according to the manufacturer's instructions. The data were collected using a FACSCan flow cytometer (BD Biosciences, USA) and the results were analyzed in FCAP Array software (Soft Flow). The limit of detection was 18.9 pg/mL.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were conducted using the Prism software 5.0 for Windows. Initially, Grubbs test was applied to identify possible outliers and the Kolmogorov-Smirnoff test was used to verify the data distribution. The Unpaired t-test or Mann-Whitney test were used for comparisons between the groups according to data distribution. A P-value < 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### **Absolute number of double-negative T cells is not changed during *P. vivax* infection**

During *P. vivax* infection the absolute number of leukocytes ( $p=0.0003$ ), lymphocytes ( $p=0.0001$ ) and neutrophils ( $p=0.019$ ) were reduced (Table 2). Within the lymphocyte subset, it was observed a reduction in the absolute number of T lymphocytes ( $CD3^+$ ;  $p<0.0001$ ), especially in  $CD4^+$  T cells ( $p=0.0001$ ) and  $CD8^+$  T cells ( $p=0.0002$ ). Despite the lower numbers of T lymphocytes during the blood-stage of malaria, no significant differences were observed regarding to absolute number ( $p=0.867$ ) of double-negative T cells ( $CD3^+CD4^-CD8^-$ ).

### **$\gamma\delta$ T cells were reduced during the blood-stage of *P. vivax* malaria**

The percentage of  $\gamma\delta$  T lymphocytes ( $CD3^+CD4^-CD8^-TCR\gamma\delta^+$ ) were evaluated to *P. vivax* donors (2.82%) and malaria-naïve donors (2.59%) and no significant differences were observed (Figure 2A). However, when the absolute numbers of  $\gamma\delta$  T cells were analyzed it was observed a significant reduction in *P. vivax*-infected group (mean =  $32.3 \pm 23.5$  cells/mm<sup>3</sup>) in comparison with malaria-naïve group (mean =  $76.5 \pm 39.6$  cells/mm<sup>3</sup>) (Figure 2B).

### **Lower numbers of $TCR\gamma\delta^+CD27^+$ lymphocytes were observed in *P. vivax*-infected group**

$\gamma\delta$  T cells were separated into two subsets according to CD27 expression. The malaria-naïve and *P. vivax*-infected groups have similar percentage of  $\gamma\delta$  T cell expressing (52.0% vs. 51.2%) or not expressing (48.0% vs. 48.8%) CD27 (Figure 2C e 2D). Despite the similar percentage between the groups, the analysis of absolute numbers showed significant differences in  $TCR\gamma\delta^+CD27^+$  lymphocytes subset, with lower number in *P. vivax*-infected (mean =  $19.5 \pm 19.9$  cells/mm<sup>3</sup>) in comparison with malaria-naïve group (mean =  $46.4 \pm 25.3$  cells/mm<sup>3</sup>) (Figure 2E). However, no significant differences were observed in  $TCR\gamma\delta^+CD27^-$  lymphocytes ( $p=0.077$ ) (Figure 2F).



### **Absolute number of Th1-like $\gamma\delta$ T cells were reduced during *P. vivax* infection**

In the TCR $\gamma\delta^+$ CD27 $^+$  lymphocytes subset, approximately 50% of the cells has shown Th1-like profile (Figure 2G). In addition, it was observed lower number of these cells during infection ( $11.3 \pm 11.2$  cells/mm $^3$ ). Similar result was observed to TCR $\gamma\delta^+$ CD27 $^-$  lymphocytes subset ( $8.0 \pm 5.26$  cells/mm $^3$ )(Figure 2H).

### **Th17-like $\gamma\delta$ T cells were not detected during *P. vivax* infection**

In TCR $\gamma\delta^+$ CD27 $^-$  lymphocytes subset no cell expressed IL-17. Similar result was observed in control group. In other words, it was not observed  $\gamma\delta$  T cells with Th17-like profile (Figure 1).

### **Plasma levels of IFN- $\gamma$ and IL-17**

After evaluating the cytokine expression patterns in  $\gamma\delta$  T cells, it was investigated the plasma levels of IFN- $\gamma$  and IL-17. Lower plasma levels of IFN- $\gamma$  ( $p=0.001$ ) and higher levels of IL-17 ( $p=0.039$ ) were observed in *P. vivax* patients during blood stage of infection (Figure 3A and 3B).

## **DISCUSSION**

In the present study, the analyses of peripheral blood  $\gamma\delta$  T lymphocytes were shown no alteration in the percentage of these cells during blood-stage of *P. vivax* malaria. However, in a study conducted with Sri Lanka *P. vivax* patients of non endemic area (non immune individuals) it was shown a significant increase in  $\gamma\delta$  T cell subset, mainly during paroxysm episodes [8]. On the other hand, no increase in  $\gamma\delta$  T cells were observed during infection, convalescence, and even during paroxysm episodes in endemic patients; the percentage of  $\gamma\delta$  T cells was similar to malaria-naïve control individuals [8]. In another study realized in Ethiopia, no increase of percentage or absolute number of  $\gamma\delta$  T cells was detected during *P. vivax*

infection in comparison to endemic controls. However, this  $\gamma\delta$  T cells subset was significantly increased in both *P. falciparum* and *P. falciparum/P. vivax* double-infected patients, mainly because of an increase in  $V\delta 1^+$  T cells [9]. It is important to highlight that the patients enrolled in the present study were living in an endemic malaria region (Porto Velho, RO), which may explain the obtained data for percentage. On the other hand, these patients presented significant lower absolute numbers of  $\gamma\delta$  T cells ( $32.25 \pm 23.5$  cells/mm<sup>3</sup>) in comparison to malaria-naïve individuals ( $76.5 \pm 39.6$  cells/mm<sup>3</sup>). In addition, it was observed that this reduction was due to the decrease in the number of cells with phenotype  $CD27^+$  profile. On the contrary, Thailand malaria patients infected by *P. vivax* and endemic control individuals presented higher  $CD3^+\delta 2^+$  T and  $CD3^+CD27^+\delta 2^+$  T cells in comparison to malaria-naïve individuals [19]. Moreover, in another study with Thailand malaria patients infected by mixed *P. vivax/P. falciparum* parasites have shown higher  $CD3^+\delta 2^+$  T cells percentage, whereas lower percentage was observed in *P. falciparum* patients [11]. The percentage of  $CD3^+\delta 2^+$  T was also significantly higher in Chinese patients infected by *P. vivax* compared to malaria-naïve individuals, but similar to endemic control group [10].

Whereas absolute numbers of  $CD27^-$   $\gamma\delta$  T cells (effector cells) were shown no significant differences between *P. vivax*-infected and malaria-naïve groups, the possibility of redistribution of this subset to other tissues appears to be unlikely.

Upon stimulation with PMA/Ionomycin, although the percentage of cells showed no change, the absolute number of  $TCR\gamma\delta^+CD27^+IFN\gamma^+$  (Th1-like) was reduced in *P. vivax* patients. In fact, Jagannathan and collaborators (2014) have shown decline in both number and function of  $V\delta 2^+$  T cells in children following repeated malaria falciparum exposure, suggesting that loss of this pro-inflammatory response may be related with clinical tolerance to malaria.

The results showed that  $\gamma\delta$  T cells do not express IL-17 during *P. vivax* infection, nevertheless these patients exhibit elevated plasma levels of IL-17. Of note, in children infected with *P.*

*falciparum*, no appreciable production of IL-17 or IL-10 by  $\gamma\delta$  T cells was observed upon *in vitro* stimulation with *P. falciparum*-infected red blood cells [12]. Thus, although it has been observed significantly higher levels of IL-17, the cellular source of this cytokine production in *P. vivax* malaria remains unknown. It is important to highlight that besides CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  T cells, IL-17 can be produced by a variety of cells of the innate or adaptive immune system, such as macrophages, dendritic cells, NK and NKT, indicating that more research is needed [20,21].

## **CONCLUSION**

Taken together, the obtained data demonstrated that  $\gamma\delta$  T cells were decreased during *P. vivax* infection, with reduced number of Th1-like  $\gamma\delta$  T cells and lower levels of IFN- $\gamma$  plasma levels. In addition, it was demonstrated the absence of Th17-like  $\gamma\delta$  T cells in the blood-stage of infection, besides the higher IL-17 plasma levels. However, the cellular source of this IL-17 need further investigations. These results reinforce the idea that repeated malaria exposure contributes to the reduction of pro-inflammatory response.

## **COMPETING INTEREST**

The authors declare that they have no competing interest.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conception and design of the experiments: NSHS, DBP, RTF and LLB. Performed the experiments: NSHS and DBP. Analyzed the data: NSHS, DBP, RTF and LLB. Contributed reagents/materials/analysis tools: NSHS, DBP, GMZ, DCB, RTF and LLB. Wrote the paper: NSHS, RTF and LLB. Assisted with patient care and case identification: DBP and MST.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Grant #478379/2013-7). Lilian Lacerda Bueno is supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES. Natália Satchiko Hojo de Souza is supported by a doctoral degree fellowship from CNPq/Brazil. Ricardo Fujiwara and Daniella Bartholomeu are supported by Brazilian National Research Council (CNPq) fellowships.

## REFERENCES

1. Beetz S, Wesch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. Innate immune functions of human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunobiology*. 2008;213:173-82.
2. Bank I, Marcu-Malina V. Quantitative peripheral blood perturbations of  $\gamma\delta$  T cells in human disease and their clinical implications. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2014;47:311–33.
3. Born WK, Aydintug MK, O'Brien RL. Diversity of  $\gamma\delta$  T-cell antigens. *Cell Mol Immunol*. 2013;10:13-20.
4. Paul S, Singh AK, Shilpi, Lal G. Phenotypic and functional plasticity of gamma–delta ( $\gamma\delta$ ) T Cells in inflammation and tolerance. *Int Ver Immunol*. 2014;33:537-58.
5. Fahl SP, Coffey F, Wiest DL. Origins of  $\gamma\delta$  T cell effector subsets: a riddle wrapped in an enigma. *J Immunol*. 2014;193:4289-94.

6. Caccamo N, Todaro M, Sireci G, Meraviglia S, Stassi G, Dieli Francesco. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of human  $\gamma\delta$  T cells. *Cell Mol Immunol*. 2013;10:30-4.
7. Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17–producing human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *Blood*. 2011;118:129-38.
8. Perera MK, Carter R, Goonewardene R, Mendis KN. Transient increase in circulating  $\gamma\delta$  T cells during *Plasmodium vivax* malarial paroxysms. *J Exp Med*. 1994;179:311-5.
9. Worku S, Björkman A, Troye-Blomberg M, Jemaneh L, Färnert A, Christensson B. Lymphocyte activation and subset redistribution in the peripheral blood in acute malaria illness: distinct  $\gamma\delta^+$  T cell patterns in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections. *Clin Exp Immunol*. 1997;108:34-41.
10. Jangpatarapongsa K., Xia H, Fang Q, Hu K, Yuan Y, Peng M, et al. Immunity to malaria in *Plasmodium vivax* infection: a study in central China. *PLoS One*. 2012;7:e45971.
11. Chuangchaiya S, Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Pattanapanyasat K, et al. Immune response to *Plasmodium vivax* has a potential to reduce malaria severity. *Clin Exp Immunol*. 2010;160:233-9.

12. Jagannathan P, Kim CC, Greenhouse B, Nankya F, Bowen K, Eccles-James I, et al. Loss and dysfunction of V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$  $\delta$  T cells is associated with clinical tolerance to malaria. *Sci Transl Med.* 2014;6:251.
13. Goodier M, Krause-Jauer M, Sanni A, Massougbodji A, Sadeler BC, Mitchell GH, et al.  $\gamma$  $\delta$  T cells in the peripheral blood of individuals from an area of holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87:692-6.
14. Hviid L, Kurtzhals JAL, Doodoo D, Rodrigues O, Ronn A, Commey JOO, et al. The  $\gamma$ / $\delta$  T-cell response to *Plasmodium falciparum* malaria in a population in which malaria is endemic. *Infect Immun.* 1996;64:4359-62.
15. WHO. Country profile. In: **World malaria report 2015**. World Health Organization. 2014. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>. Accessed 20 Jan 2016.
16. Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Trop.* 2012; 123:53– 7.
17. Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior JC, Fonseca BPF, Antas PRZ, Baldez A, Storer FL, et al. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem I Oswaldo Cruz.* 2014; 109:154-62.

18. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosário VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 61:315–20.
19. Jangpatarapongsa K, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Cui L, Montgomery SM, Looareesuwan S, et al. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microbes Infect.* 2006; 8:680-6.
20. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunol.* 2010; 129:311–21.
21. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol.* 2010; 7:164-174.

**TABLE****Table 1. Demographic, parasitological and clinical parameters of the study population**

Parameters	Value for group	
	Malaria-naïve donors (n=7)	<i>P. vivax</i> -infected donors (n=8)
Age [median (range)]	31 (23-37)	47 (21-80)
Gender [n (%)]		
Male	3 (42.9)	4 (50.0)
Female	4 (57.1)	4 (50.0)
Parasitaemia (parasites/mm <sup>3</sup> ), [n (%)]		
≤ 500	-	4 (50.0)
501 – 10,000	-	4 (50.0)
N° of previous malaria episodes [n (%)]		
≤ 5	-	2 (25.0)
>5	-	6 (75.0)
Symptoms [n (%)]		
Fever	-	7 (100.0)
Headache	-	7 (100.0)
Chills	-	7 (100.0)
Myalgia	-	7 (100.0)
Sweating	-	5 (62.5)
Arthralgia	-	5 (62.5)
Nausea	-	5 (62.5)
Vomiting	-	2 (25.0)

**Note:** The symptoms were described by seven *P. vivax*-infected donors (n=7)



**Table 2. Haematological parameters of malaria-naïve donors and *P. vivax*-infected donors (mean ± SD)**

Parameters	Value for group		
	Malaria-naïve donors (n=7)	<i>P. vivax</i> -infected donors (n=8)	P-value
<b>Erythrogram</b>			
RBCs (million/mm <sup>3</sup> )	4.8 ± 0.49	4.5 ± 0.51	0.183
Haematocrit (%)	42.8 ± 4.40	40.9 ± 4.61	0.421
MCV (fL)	88.7 ± 2.67	91.7 ± 3.82	0.108
MCH (pg)	28.6 ± 1.16	29.1 ± 3.17	0.724
MCHC (%)	32.3 ± 0.77	32.5 ± 1.30	0.759
Haemoglobin (g/dL)	13.8 ± 1.27	13.3 ± 1.77	0.557
<b>Leucogram (cells/mm<sup>3</sup>)</b>			
WBCs	8,057 ± 1,146	4,763 ± 1,448	<b>0.0003</b>
Lymphocytes	2,785 ± 584.20	1,187 ± 556.90	<b>0.0001</b>
CD3 <sup>+</sup>	2,237 ± 554.30	843.0 ± 411.80	<b>&lt;0.0001</b>
CD4 <sup>+</sup>	1,141 ± 355.20	344.6 ± 151.20	<b>0.0001</b>
CD8 <sup>+</sup>	841.4 ± 315.40	224.3 ± 119.8	<b>0.0002</b>
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	176 ± 51.20	166.9 ± 121.8	0.867
Eosinophils	199.1 ± 31.58	158.1 ± 168.40	0.538
Immature neutrophils	118.0 ± 85.57	171.0 ± 97.36	0.318
Neutrophils	4,711 ± 577.60	3,059 ± 1,545	<b>0.019</b>
Monocytes	236.7 ± 101.30	204.8 ± 109.30	0.569
Platelets	262,100 ± 27,440	142,900 ± 70,970	<b>0.001</b>

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Flow cytometric gating strategy.** Representative example of gating strategy used to characterize  $\gamma\delta$  T cells subsets using an eight-color co-staining.

**Figure 2.  $\gamma\delta$  T cells subsets.** Comparisons between *P. vivax*-infected donors (n=8) and malaria-naïve donors (n=7). Percentage (A) and absolute numbers (B) of  $\gamma\delta$  T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>). Percentage of  $\gamma\delta$  T cells CD27<sup>+</sup> (C) and CD27<sup>-</sup> (D). Absolute numbers of  $\gamma\delta$  T cells CD27<sup>+</sup> (E) and CD27<sup>-</sup> (F). Absolute numbers of IFN- $\gamma$ -producing  $\gamma\delta$  T cells; TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> and TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (G and H, respectively). Unpaired t-test or Mann-Whitney test were used according to data distribution. A P-value <0.05 was considered significant. \*p<0.05.

**Figure 3. IFN- $\gamma$  and IL-17 plasma levels.** Comparisons between *P. vivax*-infected donors (n=8) and malaria-naïve donors (n=7). Plasma levels of IFN- $\gamma$  (A) and IL-17 (B). Unpaired t-test was used and a P-value <0.05 was considered significant. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Figure 1

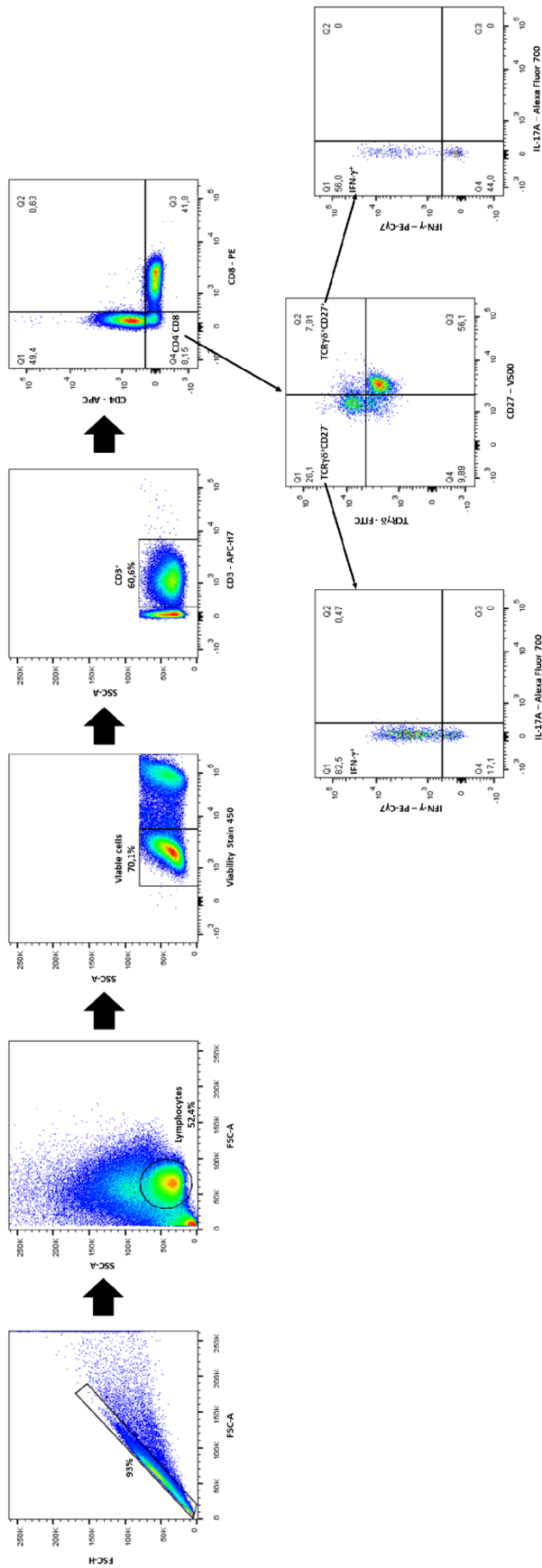
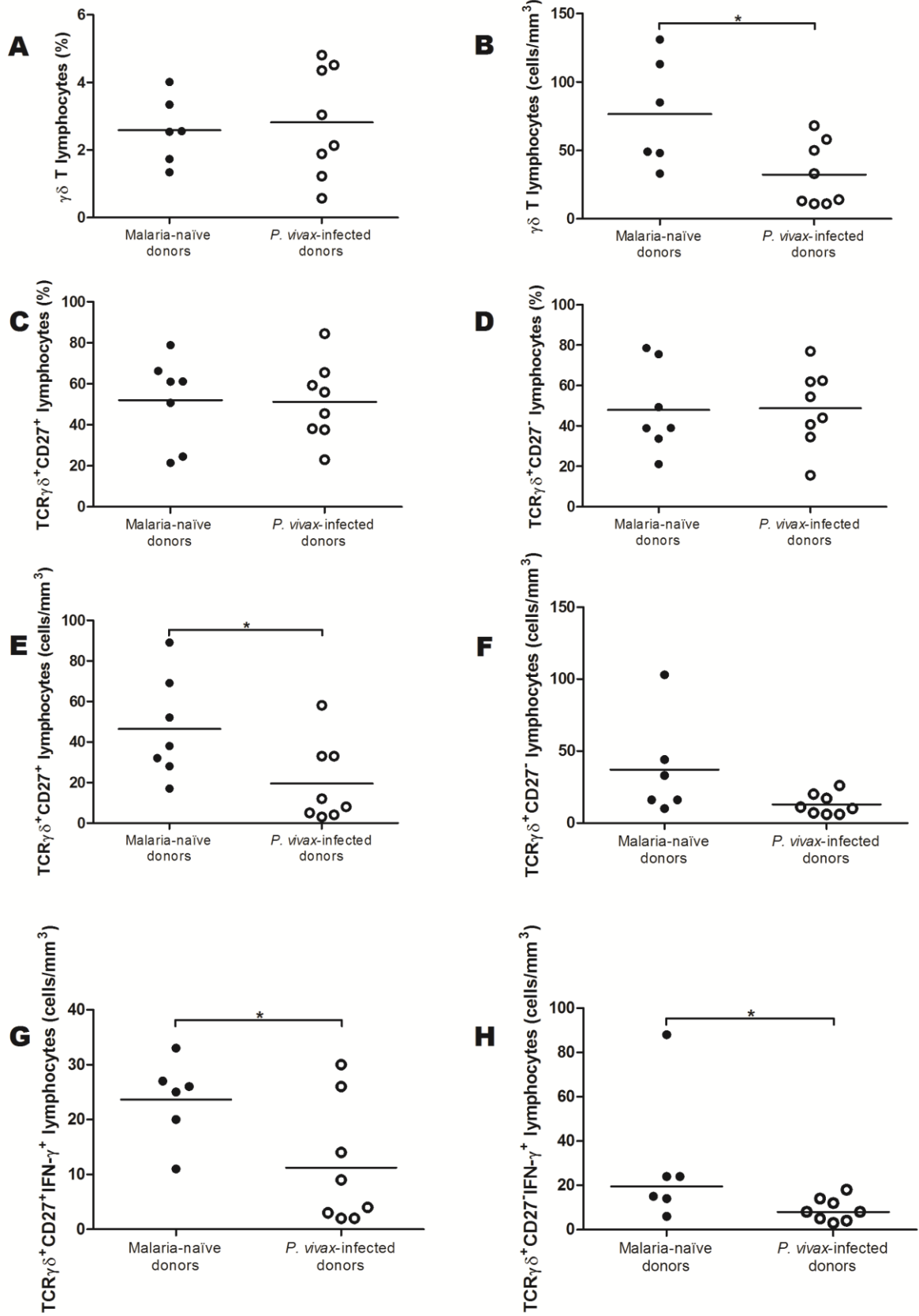
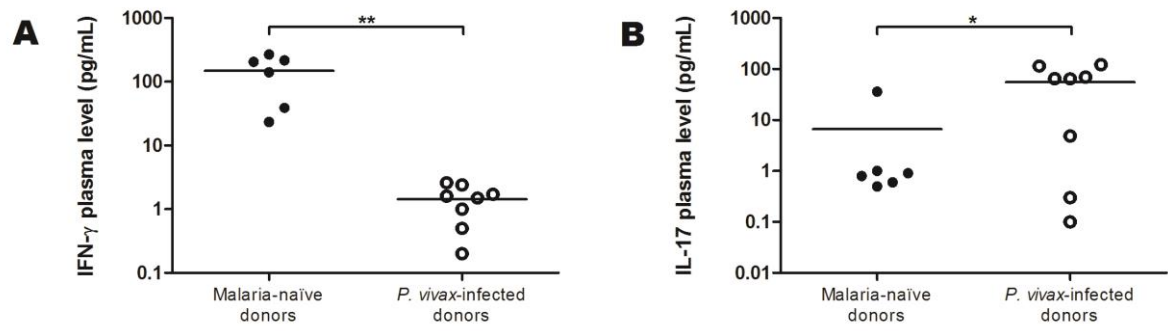


Figure 2



**Figure 3**



**On the cytokine/chemokine network during *P. vivax* malaria: new insights to understand the disease**

Natália Satchiko Hojo-Souza<sup>1#</sup>, Dhelio Batista Pereira<sup>2#</sup>, Fernanda Sumika Hojo de Souza<sup>3</sup>,  
Tiago Antônio de Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Mauro Shugiro Tada<sup>2</sup>, Graziela Maria Zanini<sup>4</sup>, Daniella  
Castanheira Bartholomeu<sup>1</sup>, Ricardo Toshio Fujiwara<sup>1</sup>, Lilian Lacerda Bueno<sup>1</sup>

1 – Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil;

2 – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, Rondônia, Brasil;

3 – Departamento de Ciência da Computação, Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, Minas Gerais, Brasil

4 – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

Corresponding author:

Lilian Lacerda Bueno

Av. Antônio Carlos 6627,

31270-901 Belo Horizonte (MG) Brazil

Ph. +55 31 34092871/Fax. +55 31 34092970

E-mail: [lilacerdabueno@gmail.com](mailto:lilacerdabueno@gmail.com)

## ABSTRACT

**Background:** The clinical outcome of malaria depends on the delicate balance between pro-inflammatory and immunomodulatory cytokines response triggered during infection. Despite the numerous reports on characterization of plasma levels of cytokines/chemokines, there is no consensus on the profile of these mediators during the blood stage malaria. The identification of acute phase biomarkers could contribute to a better understanding of the disease allowing the use of more effective therapeutic approaches to prevent the progression towards severe disease. Thus, in the present study, the plasma levels of cytokines and chemokines and their association with parasitaemia and number of previous malaria episodes were evaluated in *P. vivax*-infected patients during acute and convalescence phase as well as in healthy donors.

**Methods:** Samples of plasma were obtained from peripheral blood samples from four different groups: *P. vivax*-infected, *P. vivax*-treated, endemic control and malaria-naïve control. The cytokine and chemokine plasma levels were measured by CBA or ELISA. The network analysis was performed using Spearman correlation coefficient.

**Results:** *P. vivax* infection induced a pro-inflammatory response driven by IL-6 and IL-17 associated with an immunomodulatory profile mediated by IL-10 and TGF- $\beta$ . In addition, it was observed a reduction of IFN- $\gamma$  plasma levels in *P. vivax*-infected group. A lower level of IL-27 was observed in endemic control group in comparison to malaria-naïve control group. No significant results were found for IL-12p40 and TNF- $\alpha$ . It was also observed that *P. vivax* infection promoted higher levels of CCL2 and CXCL10 and lower levels of CCL5. The plasma levels of IL-10 were elevated in patients with high parasitaemia and with more than five previous malaria episodes. Furthermore, strong and moderate correlations were observed in the network analysis.

**Conclusions:** The *P. vivax* infection triggers a balanced immune response, mediated by IL-6 and CCL2, which is modulated by IL-10. In addition, the results indicated that IL-10 plasma levels are influenced by parasitaemia and number of previous malaria episodes.

## **KEYWORDS**

*Plasmodium vivax*, Malaria, Cytokines, Chemokines

## **BACKGROUND**

Malaria is caused by a protozoan of the genus *Plasmodium* and is responsible for high morbidity rates (besides the cases of mortality especially among children), resulting in serious impact on the socioeconomic development in endemic regions. In the Brazilian Amazon region, *Plasmodium vivax* is the main species causing malaria, being responsible to 82% of the cases [1]. Malaria is a complex disease involving genetic factors inherent to the parasite and to the host, geographical and environmental aspects that favor its occurrence and difficult its eradication [2].

During infection, both the antibody-mediated and the cell-mediated immunity play an important role for achieving clinical immunity [3]. Several studies suggest that successful resolution of malaria infection depends on the ability of host in inducing adequate levels of pro-inflammatory and regulatory cytokines during key stages of the infection. Thus, the fine-tuning between inflammatory and anti-inflammatory response appears to be a determinant factor in the clinical outcome of the disease [3-5].

Although the mechanisms involved in host immunological response during human malaria are still poorly understood, accumulating data suggest that malaria infection induces pro-inflammatory cytokines that eliminate the parasite or promote the removal of red blood cells infected by the parasite [6]. This response is suppressed in turn by anti-inflammatory cytokines,



and the clearance of remaining parasites as well as the prevention of recrudescence or reinfection are mediated by anti-parasite antibodies [6]. However, depending on factors such as genetic variability of host and parasite, age, number of infections and co-infections, the inflammatory response may be unregulated and, if excessive, it can lead to immunopathology. Several studies have focused on the profile of plasma cytokines and chemokines in *P. vivax* malaria infection, comparing the repertoire of cytokines/chemokines elicited between *P. vivax* and *P. falciparum* infection [7-11] and further association with disease severity, determined by clinical symptoms, or immunological profile after treatment with anti-malarial drugs [8-15]. Overall the profile of cytokine/chemokine production is still contradictory and can be due to differences in study population, degree of endemicity in the region, among other factors, requiring further investigations.

The characterization of immune responses elicited during *P. vivax* malaria and correlations with the clinical symptoms can reveal important aspects for understanding the pathogenesis of the disease and provide insights for the development of more effective vaccines and even new therapeutic approaches. Because of this, the plasma levels of pro- and anti-inflammatory cytokines and some chemokines were measured in this work during the acute phase of *P. vivax*-naturally infected individuals. Samples were also obtained of some patients after anti-malarial drugs treatment to detect the changes in the host immunological response after treatment and to identify biomarkers of active infection. Moreover, analyses of correlation among cytokines/chemokines levels, degree of parasitaemia and number of infections were performed to evaluate whether variations in clinical manifestations are associated with activated or suppressed cytokine/chemokine networks.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study participants and blood samples collection**

*Plasmodium vivax*-naturally infected individuals with uncomplicated symptomatic malaria (*P. vivax* group, n = 75), *Plasmodium vivax*-naturally infected individuals after 25 days of treatment with chloroquine and primaquine (*P. vivax*-treated group, n = 10) and non-infected subjects with previous episodes of malaria (endemic control group, n = 10) were recruited at the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (Porto Velho, Rondônia – Brazil). In addition, 15 healthy donors (malaria-naïve control group) with no previous malaria exposure were recruited from a non-endemic area (Belo Horizonte, Minas Gerais–Brazil). The demographic, parasitological and clinical parameters of the subjects are shown in Table 1. The parasitological demonstration of *P. vivax* infection was performed by well-trained microscopists from the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical using thick smears and it was further confirmed by nested Polymerase Chain Reaction (PCR) as previously described [16]. Peripheral venous blood was collected in heparin containing tubes and centrifuged to obtain plasma. Samples were stored at -80 °C until performing the cytokine and chemokine assays.

### **Ethics statement**

The present study was approved by the Ethics Committee of the Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CAAEs: 0008.0.046.000-11, 0449.0.203.000-09) and the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 27466214.0.0000.5149). Written informed consent was obtained from each participant.

### **Cytokine and chemokine plasma levels assays**

Measurements of IL-6, IL-10, IL-17, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) and CXCL10 (IP-10) in the plasma samples were conducted using Cytometric Bead Assay (CBA) (BD Biosciences,

USA) according to the manufacturer's instructions. The data were collected using a FACSCan flow cytometer (BD Biosciences, USA) and the results were analyzed in FCAP Array software (Soft Flow). The limit of detection for each assay was: IL-6 = 2.4 pg/mL, IL-10 = 4.5 pg/mL, IL-17 = 18.9 pg/mL, CCL2 = 2.7 pg/mL, CCL5 = 1.0 pg/mL and CXCL10 = 2.8 pg/mL.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was performed for the measurement of IL-12p40, IL-27, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  (R&D Systems, USA), according to the manufacturer's instructions. Biotin-labeled antibodies were used for detection and the assay was revealed with streptavidin-HRP (Amersham Biosciences, USA) using OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) substrate system (Sigma, USA). The colorimetric reaction was read using an automated ELISA microplate reader (Versamax, Molecular Devices, USA) at 492 nm. The cytokine concentration was calculated from the standard curve using seven-parameter curve fitting software (SOFTmax Pro 5.3, Molecular Devices). The limit of detection for each assay was 156.0 pg/mL for IL-27, 62.5 pg/mL for IL-12p40, 31.2 pg/mL for TGF- $\beta$ , and 15.6 pg/mL for IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were conducted using the Prism software 5.0 for Windows (GraphPad Inc., USA). Initially, Grubb's test was applied to detect possible outliers and the Kolmogorov-Smirnoff test was used to verify the data distribution. Comparisons among groups were performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Post-hoc test or Mann-Whitney U test. The paired t-test and Wilcoxon test were also applied, according to data distribution. Statistical differences were considered significant when P-value were less or equal to 0.05.

Correlation networks were generated by the analysis of relationship among cytokine and chemokine plasma level datasets. Initially, pair-wise spearman correlation coefficients were calculated using a scientific computing library named SciPy ([www.scipy.org](http://www.scipy.org)) and python

programming language. Along with the Spearman rank-order correlation coefficient, the P-value to test for non-correlation was evaluated using  $p \leq 0.05$  as a cutoff. The correlation strength was separated into three ranges: weak ( $0.2 \leq r < 0.5$ ), moderate ( $0.5 \leq r < 0.7$ ) and strong ( $0.7 \leq r \leq 1.0$ ).

## RESULTS

### ***P. vivax* infection triggers a marked pro-inflammatory cytokine response**

The circulating levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-17, IL-12p40 and TNF- $\alpha$  were prominent in *P. vivax*-naturally infected individuals when compared to plasma levels observed in other groups (malaria-naïve, endemic and *P. vivax*-treated) (Figures 1A-D), although significant differences to control groups were observed only for IL-6 and IL-17 ( $p < 0.01$ ) (Figures 1A and 1B, respectively). Conversely, the *P. vivax* infection resulted in a significant reduction of IFN- $\gamma$  plasma levels when compared to control groups ( $p < 0.001$ ) (Figure 1E), with circulating levels of IFN- $\gamma$  detected in only 20% of the samples from *P. vivax* group.

After treatment, production of IL-6, IL-12p40, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were restored to baseline levels ( $p < 0.001$  for IL-6 and  $p < 0.05$  for IFN- $\gamma$ , only), in contrast to plasma levels of IL-17, which were similar to those presented by infected individuals before treatment. In addition, it was also observed a significant individual patient decrease of IL-6 after treatment through the paired analysis (Figure 3A).

### **Higher levels of IL-10 and TGF- $\beta$ were also induced during *P. vivax* infection**

Production of IL-10 was only observed in the *P. vivax* group, being present in 94.4% of the plasma samples (median = 186.1 pg/mL). After treatment, the IL-10 level returned to basal levels, equivalent to levels observed in control groups ( $p < 0.001$ ) (Figure 1F). Similar result was

observed for the paired analysis comparing the cytokine levels before and after treatment (Figure 3B). Moreover, samples from *P. vivax* group presented significant higher levels of TGF- $\beta$  (median = 42.8 pg/mL) when compared to malaria-naïve control group (median = 10.3 pg/mL) ( $p < 0.05$ ) but similar production of this cytokine when compared to endemic control (median = 48.9 pg/mL) and *P. vivax*-treated (median = 43.7 pg/mL) groups (Figure 1G).

### **IL-27 in *P. vivax* malaria**

IL-27 is a pleiotropic cytokine that can induce either a pro-inflammatory or immunoregulatory response. The production of IL-27 was reduced in individuals living in endemic areas (endemic control, *P. vivax*-infected and *P. vivax*-treated individuals). However, significant differences were observed only between the malaria-naïve control (median = 1,257.0 pg/mL) and endemic control (median = 105.3 pg/mL) groups (Figure 1H).

### ***P. vivax* infection induced higher levels of CCL2 and CXCL10 and lower levels of CCL5**

The plasma levels of CCL2 were increased in *P. vivax*-infected individuals (median = 770.6 pg/mL) when compared to malaria-naïve control group (median = 97.3 pg/mL) and endemic control group (median = 76.0 pg/mL) (Figure 2A), with further reestablishment to basal levels after treatment (median = 104.5 pg/mL) ( $p < 0.001$ ). Plasma samples from *P. vivax*-infected donors also presented higher levels of CXCL10 in comparison to control groups ( $p < 0.01$ ). Similarly to CCL2, the CXCL10 plasma level was restored to baseline after treatment ( $p < 0.001$ ) (Figure 2B). The comparison between plasma levels for both CCL2 and CXCL10, before and after treatment (paired analysis), also showed significant results (Figure 3C and 3D). On the other hand, lower CCL5 plasma levels were observed in individuals with *P. vivax* infection when compared to endemic control group ( $p < 0.01$ ) (Figure 2C). Despite the absence of significant result between *P. vivax* group and *P. vivax*-treated group due probably to high

variability of chemokine levels and differences of sample number, it was observed a significant individual patient increase in the plasma level of CCL5 in the paired t-test after the treatment (Figure 3E).

### **IL-10 plasma levels was associated with parasitaemia and number of previous malaria episodes**

*P. vivax*-infected patients were separated into two groups according to parasitaemia:  $\leq 500$  parasites/mm<sup>3</sup> denominated low parasitaemia and  $> 500$  parasites/mm<sup>3</sup> named high parasitaemia (Figure 4A). Patients with low parasitaemia presented reduced levels of IL-10 (median=56.2 pg/mL) in comparison to patients with high parasitaemia (median=366.1 pg/mL) ( $p < 0.05$ ). Furthermore, higher number of previous malaria episodes was associated with higher IL-10 plasma levels ( $p < 0.05$ ) (Figure 4B).

### **Immune response mediators established a complex network during *P. vivax* infection**

During *P. vivax* infection, the triggering of several plasma mediators might result in a complex interaction network, which may render a weak, moderate or strongly correlation among themselves. The network profiles observed in the *P. vivax* group, as well as the subgroups classified according to the parasite load, are shown in Figure 5. The correlation network between plasma mediators is more connected in high (Figure 5C) than low parasitaemia (Figure 5B) and the high parasitaemia networks includes practically all correlation observed in the network of all infected patients (Figure 5A) highlighting the importance of parasites number to host immune stimulation.

*P. vivax*-infected patients presented a strong correlation between IL-6 and CCL2 ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.0001$ ). Furthermore, moderate correlations were observed between IL-6 and IL-10 ( $r = 0.60$ ,  $p < 0.0001$ ) and between IL-12p40 and TNF- $\alpha$  ( $r = 0.54$ ,  $p < 0.0001$ ). Several weak correlations

were observed among other cytokines and chemokines (Figure 5A). *P. vivax* patients were further separated into two subgroups according to parasitaemia: low ( $\leq 500$  parasites/mm<sup>3</sup>) and high ( $> 500$  parasites/mm<sup>3</sup>). Patients with low parasitaemia presented moderate/strong correlations among inflammatory mediators (IL-6/IFN- $\gamma$ /CCL2). On the other hand, only a weak correlation between IL-6/IL-10 and IL-12p40/TNF- $\alpha$  was observed in this subpopulation (Figure 5B). Furthermore, patients with high parasitaemia presented moderate correlations between IL-6/CXCL10 ( $r=0.56$ ,  $p<0.001$ ), IL-10/CCL2 ( $r=0.62$ ,  $p<0.001$ ), CCL2/CXCL10 ( $r=0.55$ ,  $p<0.001$ ) and IL-6/TNF- $\alpha$  ( $r=0.55$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 5C).

## DISCUSSION

While some studies have investigated cytokines/chemokines plasma levels during *P. vivax* infection [7-15,17-19], there is still no agreement regarding the production of cytokines/chemokines and protection. It is well established that a pro-inflammatory response is required for parasite elimination, but an immunomodulatory response is also needed to prevent immunopathology [6]. In the present study, it was shown that *P. vivax* infection induced increased levels of IL-6 and, after the treatment, the plasma levels were restored. These findings were in agreement with previous studies during acute phase [11,15,17,18]. Regarding to convalescence period, the literature data showed different results, with reduction [10,14] or increase [11] of IL-6 after the treatment. Contradictory results can be attributed to convalescence period range (7 to 45 days) in the different studies [8,10,11,13,14].

Higher levels of some pro-inflammatory mediators such as, IL-6, CCL2 and CXCL10 were observed in *P. vivax*-infected patients, which were reestablished after anti-malarial treatment, suggesting that the parasite infection triggered an inflammatory response. Concomitantly, it seems to be a consensus that *P. vivax* infection induces higher levels of IL-10 during acute phase of vivax malaria [7,8,10-13,15,17-19] and that the cytokine levels were restored to



baseline after treatment [8,10,11,14]. Studies have suggesting that T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) producing IL-10 play a significant role during *Plasmodium* infection, since they are capable of control the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [6]. Previous studies demonstrated the increased number of circulating Treg cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) during *P. vivax* infection [20,21], but not all studies [8]. Regarding the association between IL-10 plasma levels with parasitemia and number of previous malaria episodes, in the present study, it was observed higher IL-10 plasma levels in patients with high parasitaemia (>500 parasites/mm<sup>3</sup>) and with more than five previous malaria episodes. Similar result was observed for the association with parasitaemia, but not with number of previous malaria episodes [18]. The significance of IL-6 and IL-10 has been highlighted during *P. vivax* malaria. High levels of these cytokines were observed in uncomplicated cases [18,22], while low IL-6 levels were observed in patients with complicated malaria [22]. In addition, a positive correlation between IL-6 and IL-10 has also been observed in *P. vivax* infection [10,18,22]. Likewise, in the present study correlation analysis between IL-6 and IL-10 demonstrated a positive correlation (r=0.60) in *P. vivax* group, suggesting the acquisition of a more immunomodulatory profile. The association between IL-10 plasma levels and high parasitemia could reflect a self-regulation mechanism to protect the excessive inflammatory response because of high antigen stimulation.

During acute episode of *P. vivax* malaria, studies have reported high plasma levels of IFN- $\gamma$  [7,10,12,15,19], but not all [8,9]. In the present study, IFN- $\gamma$  plasma levels were only observed in 20% of *P. vivax* patient samples. On the other hand, the majority of patients of this group have shown high IL-17 levels. However, IL-17 reports in the human malarial infection are poorly described [9,11] and further investigations are still required. It is important to highlight that IL-17 may be produced by macrophages, dendritic cells, NK, NKT,  $\gamma\delta$ T cells, CD8<sup>+</sup> and Th17 [23,24] and, the source of this cytokine during *P. vivax* infection need more investigation. A previous study showed that CD4<sup>+</sup> T cells producing IL-17 were increased during *P. vivax*

malaria [25]. The higher plasma levels of TGF- $\beta$  and IL-6 in the acute phase could suggest the induction of IL-17, since naïve CD4<sup>+</sup> T cells require stimulation by IL-6 and TGF- $\beta$ , and possibly IL-1 $\beta$ , to differentiate in Th17 and to secrete IL-17 [23,26,27]. Th17 cells induced by IL-6 and TGF- $\beta$  also produce IL-10, presenting a regulatory function [28]. It is important to highlight that the low levels of IFN- $\gamma$  observed in *P. vivax* group could contribute to high levels of IL-17 once IFN- $\gamma$  negatively regulates the generation of IL-17-producing cells [29].

Despite the high TGF- $\beta$  plasma levels observed during *P. vivax* infection, there was no consensus about these findings [8,10,15]. TGF- $\beta$  is a potent inducer of Treg cells [30], which may have contributed to the high IL-10 plasma levels observed. Although high IL-17 plasma levels were observed in *P. vivax* group, only a weak negative correlation was detected between IL-17 and TGF- $\beta$  by the network analysis approach. This connection was also found in low parasite load subgroup. Therefore, the IL-17 and TGF- $\beta$  roles during *P. vivax* infection require additional investigations.

Regarding to IL-12p40 and TNF- $\alpha$ , no significant result were observed in the present study. However, differences in the literature findings occur for both cytokines, in acute phase [7,8,10-13,15,17-19] and convalescence period [8,10,11,13,14].

IL-27 is a pleiotropic cytokine with both pro- and anti-inflammatory actions. This cytokine is a potent inhibitor of Th17 cell development and of IL-17 induction [31,32]. In the present study, low IL-27 levels were observed in endemic control group compared to malaria-naïve control group. However, no difference was observed regarding to IL-17 between the control groups. In children infected with *P. falciparum*, IL-27 plasma levels were decreased during uncomplicated malaria in comparison to endemic control group. This reduction was more accentuated in severe cases [33]. Thus, the IL-27 role in *P. vivax* malaria still needs further investigation.

CCL2, also known as MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) is a powerful attractant of monocytes, T cells and dendritic cells to inflammatory sites. This chemokine is produced by several cell types, such as epithelial, endothelial, smooth muscle, fibroblasts, astrocytes, monocytes and microglial cells, and can be induced by TNF, IL-1 and endotoxins [34]. In the present study, high plasma levels of CCL2 were observed during *P. vivax* infection. Similar result was previously described during *P. vivax* infection [7]. The pro-inflammatory IL-6 cytokine induced the mRNA expression and MCP-1 secretion by peripheral blood mononuclear cells [35]. During blood stage of *P. vivax* infection both IL-6 and CCL2 were significantly elevated. The network analysis revealed a strong correlation between IL-6 and CCL2, regardless parasite load, suggesting that these mediators were induced by the infection itself. These findings support the hypothesis that IL-6/CCL2 pathway plays a central role in response to *P. vivax* infection.

Interestingly, the network analyses for the high and low parasitaemia groups have shown that individuals with high parasitaemia exhibit moderate/strong correlation between IL-6/IL-10/CCL2. However, patients with low parasitaemia exhibited weak correlation between IL-6 and IL-10, losing the interaction between IL-10 and CCL2. These data associated with the positive correlation between IL-6/IFN- $\gamma$  reinforce the significance of the IL-6/CCL2/IFN- $\gamma$  axis in controlling parasitaemia, which could contribute for the lower parasite load observed.

CXCL10 (IFN-inducible protein 10; IP-10) is another chemokine that is induced by IFN- $\gamma$  [36] as well as by IL-17 [37] in different cell types. This chemokine is involved in inflammatory processes, being capable of attracting macrophages, dendritic cells, NK cells and activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells toward inflamed tissues [36]. In the present study, *P. vivax* infected patients presented elevated CXCL10 plasma levels, but only weak positive correlation with IFN- $\gamma$ . No correlation was observed between CXCL10 and IL-17, although both mediators were elevated during *P. vivax* infection. However, when patients were separated according to the

parasite load, this connection was lost, and moderate correlation was established between CXCL10 and IL-6, only in patients with high parasitaemia. In *P. falciparum* infection, CXCL10 has been identified as biomarker (in serum and cerebrospinal fluid) associated with elevated risk of fatal cerebral malaria [38]. On the other hand, higher CXCL10 plasma levels, as well as IFN- $\gamma$  and IL-10, were observed in *P. vivax* malaria patients with mild anemia in comparison to no anemia [12].

CCL5, also known as Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES), is an inflammatory chemokine attractant of T cells, basophils, eosinophils, and dendritic cells to inflammatory site [39]. CCL5 is produced predominantly by CD8<sup>+</sup> T cells, epithelial cells, fibroblasts and platelets [40]. In children infected by *P. falciparum* malaria low mRNA and RANTES protein levels were associated with severe malaria [41]. Lower RANTES levels were also found in children with cerebral malaria and a strong positive correlation was verified between RANTES levels and platelets count [42]. In the present study, *P. vivax* malaria patients have shown significant low CCL5 (RANTES) levels, but just weakly associated with IL-6, IL-12p40, IFN- $\gamma$  or CCL2. The lower levels of CCL5 could be explained by the CD8<sup>+</sup> T cells reduction [43-45] and thrombocytopenia [8,10,11,44-46] observed during *P. vivax* malaria. A study carried out with children infected with *P. falciparum* observed an association between thrombocytopenia and lower RANTES plasma levels [47].

## **CONCLUSION**

Taken together, the multiple analyses performed in the present study allowed the identification of an immunological signature from plasma mediators associated with *P. vivax* acute infection. Considering that patients enrolled in the study presented uncomplicated malaria it is possible to suggest that IL-6 and CCL2 are important proinflammatory mediators involved in parasitaemia control, while the immunomodulatory cytokine IL-10 operates controlling the

inflammation. The plasma levels of these three mediators returned to baseline levels (similar to control groups) after antimalarial therapy, indicating that they could be recognized as biomarkers of acute phase of *P. vivax* infection. These results provide new insights into the complex relationship among mediators that are triggered during *P. vivax* clinical malaria.

### **COMPETING INTEREST**

The authors declare that they have no competing interest.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conception and design of the experiments: NSHS, DBP, FSHS, TAOM, RTF and LLB. Performed the experiments: NSHS and DBP. Analysed the data: NSHS, DBP, FSHS, TAOM, RTF and LLB. Contributed reagents/materials/analysis tools: NSHS, DBP, FSHS, TAOM, GMZ, DCB, RTF and LLB. Wrote the paper: NSHS, DBP, FSHS, TAOM, RTF and LLB. Assisted with patient care and case identification: DBP and MST.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Grant #478379/2013-7). Lilian Lacerda Bueno is supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES. Natália Satchiko Hojo de Souza is supported by a doctoral degree fellowship from CNPq/Brazil. Ricardo Fujiwara and Daniella Bartholomeu are supported by Brazilian National Research Council (CNPq) fellowships.

## REFERENCES

1. WHO. Country profile. In: **World malaria report 2014**. World Health Organization. 2014. [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/). Accessed 15 Nov 2014.
2. Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev.* 2004; 201:268–90.
3. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol.* 2003; 133:145-52.
4. Finney OC, Riley EM, Walther M. Regulatory T cells in malaria – friend or foe? *Trends Immunol.* 2010; 31:63–70.
5. Hansen DS, Schofield L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? *PLoS Pathog.* 2010; 6:e1000771.
6. Riley EM. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol.* 2006; 28:35–49.
7. Fernandes AAM, Carvalho LJM, Zanini GM, Ventura AMRS, Souza JM, Cotias PM, et al. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15:650-8.

8. Gonçalves RM, Salmazi KC, Santos BAN, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun*. 2010; 78:4763–72.
9. Cox-Singh J, Singh B, Daneshvar C, Planche T, Parker-Williams J, Krishna S. Anti-inflammatory cytokines predominate in acute human *Plasmodium knowlesi* infections. *PLoS ONE*. 2011; 6: e20541.
10. Gonçalves RM, Scopel KKG, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PLoS ONE*. 2012; 7(9): e44394.
11. Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior JC, Fonseca BPF, Antas PRZ, Baldez A, Storer FL, et al. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Mem I Oswaldo Cruz*. 2014; 109:154-62.
12. Jain V, Singh PP, Silawat N, Patel R, Saxena A, Bharti PK, et al. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. *Acta Trop*. 2010; 113:263-8.
13. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. 2010; 9:13.

14. Leoratti FMS, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PAC, Gravina HD, et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* Malaria. PLoS Negl Tro Dis. 2012; 6:e1710.
15. Mendonça VRR, Queiroz ATL, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Neto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. Malar J. 2013; 12:69.
16. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosário VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. 1993; 61:315–20.
17. Zeyrek FY, Kurcer MA, Zeyrek D, Simsek Z. Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey. Parasite Immunol. 2006; 28:201-7.
18. Costa AG, Antonelli LRV, Costa PAC, Pimentel JPD, Garcia NP, Tarragô AM, et al. 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; 2014:318250.
19. Medina TS, Costa SPT, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon- $\gamma$  levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. Malar J. 2011; 10:264.



20. Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2008; 38:2697–705.
21. Bueno LL, Morais CG, Araújo FF, Gomes JAS, Corrêa-Oliveira R, Soares IS, et al.. *Plasmodium vivax*: Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS ONE.* 2010; 5(3): e9623.
22. Raza A, Ghanchi NK, Sarwar Zubairi Ab, Raheem A, Nizami S, Beg MA. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-10, intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated *Plasmodium vivax* isolates from Pakistan. *PLoS One.* 2013; 8:e81363.
23. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunol.* 2010; 129:311–21.
24. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol.* 2010; 7:164-174.
25. Bueno LL, Morais CG, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. *Acta Trop.* 2012; 123:53– 7.
26. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10:206.

27. Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol*. 2009; 21:489–98.
28. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. 2007; 8(12):1390-7.
29. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurjeva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005; 6:1133-41.
30. Betelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441:235-8.
31. Stumhofer SJ, Hunter CA. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunol Lett*. 2008; 117:123–130.
32. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by Human CD4<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol*. 2009; 183:2435-43.
33. Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with

- uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. Clin Exp Immunol. 2011; 166(2):218-26.
34. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. Clin Chim Acta. 2010; 411:1570-9.
35. Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, Mengozzi M, Cota M, Polentarutti N, et al. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells in the U937 cellline. Blood. 1998; 91:258-65.
36. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK. CXCL10/IP-10 in infectious disease pathogenesis and potential therapeutic implications. Cytokine Growth Factor Rev. 2011; 22:121-30.
37. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annu Rev Immunol. 2007; 25:821-52.
38. Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, Powell MD, Bond VC, Anderson W, et al. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. Malar J. 2007; 6:147.
39. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious disease. Front Immunol. 2014; 5:491.

40. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001; 22:83-7.
41. Ochiel DO, Awandare GA, Keller CC, Hittner JB, Kremsner PG, Weinberg JB, et al. Differential regulation of beta-chemokines in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2005; 73:4190-7
42. John CC, Opika-Opoka R, Byarugaba J, Idro R, Boivin MJ. Low levels of RANTES are associated with mortality in children with cerebral malaria. *J Infect Dis.* 2006; 194:837-45.
43. Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13:376–9.
44. Borges QI, Fontes CJF, Damazo AS. Analysis of lymphocytes in patients with *Plasmodium vivax* malaria and its relation to the annexin-A1 and IL-10. *Malar J.* 2013; 12:455.
45. Hojo-Souza NS, Pereira DB, Passos LS, Gazzinelli-Guimarães PH, Cardoso MS, Tada MS, et al. Phenotypic profiling of CD8<sup>+</sup> T cells during *Plasmodium vivax* blood-stage infection. *BMC Infect Dis.* 2015; 15:35.

46. Hojo-Souza NS, Pereira DB, Mendes TA, Passos LS, Gazzinelli-Guimarães AC, Gazzinelli-Guimarães PH, et al. CD4<sup>+</sup> T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. *Malar J.* 2015; 14:5.
47. Were T, Hittner JB, Ouma C, Otieno RO, Orago AS, Ong'echa JM, et al. Suppression of RANTES in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Haematologica.* 2006; 91:1396-9.

**TABLE**

**Table 1. Demographic, parasitological and clinical parameters of the study population**

Parameters	Value for group			
	Malaria-naïve control (n=15)	Endemic Control (n=10)	<i>P. vivax</i> (n=75)	<i>P. vivax</i> -treated (n=10)
Age [median(range)]	27 (19-35)	38 (21-49)	37 (20-80)	42 (21-59)
Gender [n(%)]				
Male	10 (66.7)	6 (60.0)	57 (76.0)	6 (60.0)
Female	5 (33.3)	4 (40.0)	18 (24.0)	4 (40.0)
Parasitaemia (parasites/mm <sup>3</sup> ), [n(%)]				
≤ 500	-	-	34 (45.3)	-
501 – 10,000	-	-	26 (34.7)	-
10,001 – 100,000	-	-	8 (10.7)	-
without information	-	-	7 (9.3)	-
N° of previous malaria episodes [n(%)]				
First malaria	-	0 (0.0)	10 (13.3)	1 (10.0)
≤ 5	-	5 (50.0)	24 (32)	2 (20.0)
>5	-	5 (50.0)	33 (44.0)	6 (60.0)
without information	-	0 (0.0)	8 (10.7)	1 (10.0)
Symptoms [n(%)]				
Fever	-	-	66 (97.1)	-
Headache	-	-	66 (97.1)	-
Myalgia	-	-	61 (89.7)	-
Chills	-	-	60 (88.2)	-
Sweating	-	-	51 (75.0)	-
Arthralgia	-	-	49 (72.1)	-
Nausea	-	-	36 (52.9)	-
Vomiting	-	-	20 (29.4)	-

**Note:** The clinical parameters described in *P. vivax* group refer to 68 patients.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Cytokine plasma levels.** Comparisons among malaria-naïve control group (n=15), endemic control group (n=10), *P. vivax* group (n=75) and *P. vivax*-treated group (n=10) were performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn Post-hoc. A P-value <0.05 was considered significant. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. The dotted lines (---) represent the detection limit of the assay.

**Figure 2. Chemokine plasma levels.** Comparisons among malaria-naïve control group (n=15), endemic control group (n=10), *P. vivax* group (n=75) and *P. vivax*-treated group (n=10) were performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn Post-hoc. A P-value <0.05 was considered significant. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. The dotted lines (---) represent the detection limit of the assay.

**Figure 3. Cytokine/Chemokine levels in acute-phase and convalescence period from *P. vivax* infected patients.** A paired analysis was performed between *P. vivax* group (n=10) and *P. vivax*-treated group using Paired t-test or Wilcoxon test, according to data distribution. A P-value <0.05 was considered significant. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

**Figure 4. IL-10 plasma levels and their associations. (A) Parasitaemia: high vs. low number of parasites.** Comparison between high (>500 parasites/mm<sup>3</sup>, n=34) and low (≤500 parasites/mm<sup>3</sup>, n=32) number of parasites was performed using Mann-Whitney test. **(B) Number of previous malaria episodes.** Comparisons among First malaria (n=10), ≤5 episodes (n=24) and >5 episodes (n=31) were performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn

Post-hoc. A P-value <0.05 was considered significant. \*p<0.05. The dotted lines (--) represent the detection limit of the assay.

**Figure 5. Plasma mediators network.** Correlations among 11 mediators during *P. vivax* infection were plotted in network graphs. Each circle represents a cytokine or chemokine and the connecting lines represent significant correlations between two mediators. Solid and dotted lines, respectively represented positive and negative correlations. The line thickness represents the significance degree. **(A)** *P. vivax* group (n=73). **(B)** *P. vivax* subgroup with low parasitaemia ( $\leq 500$  parasites/mm<sup>3</sup>) (n=32). **(C)** *P. vivax* subgroup with high parasitaemia ( $>500$  parasites/mm<sup>3</sup>) (n=34). The correlation analyses were evaluated by Spearman correlation test. A P-value < 0.05 was considered significant.



Figure 1

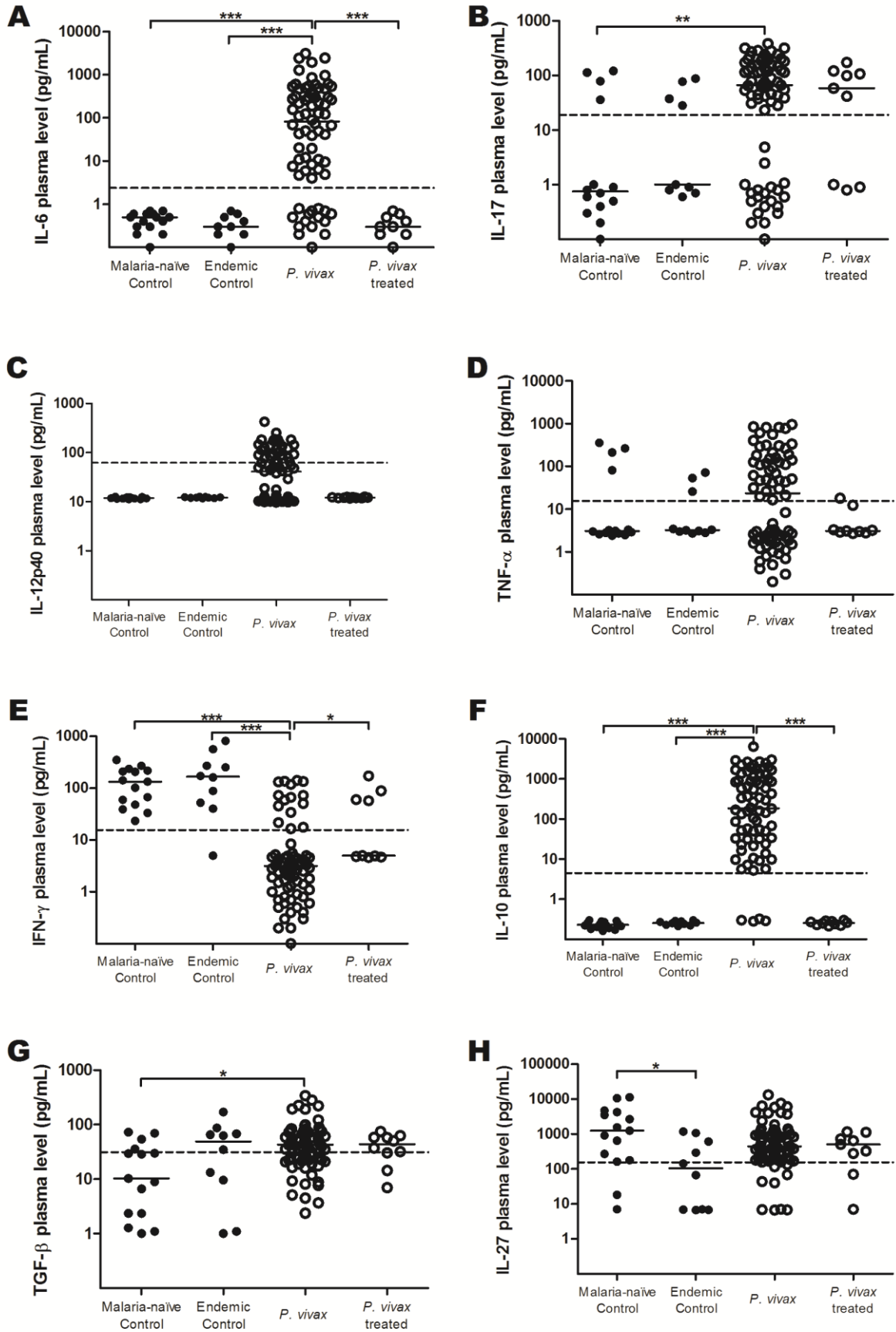
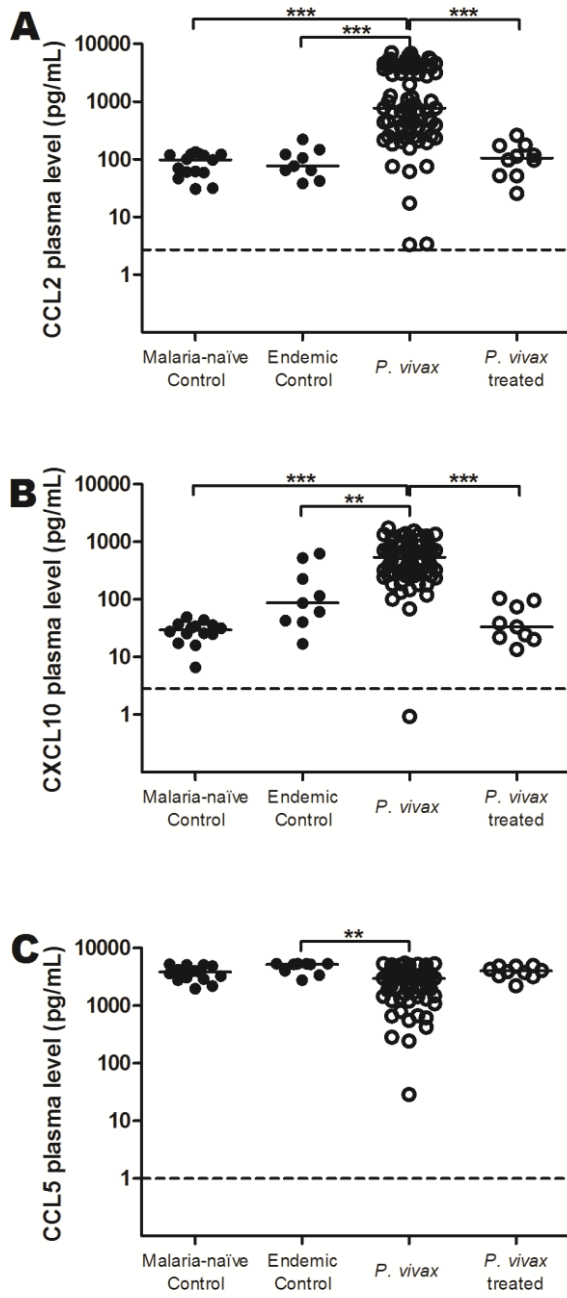
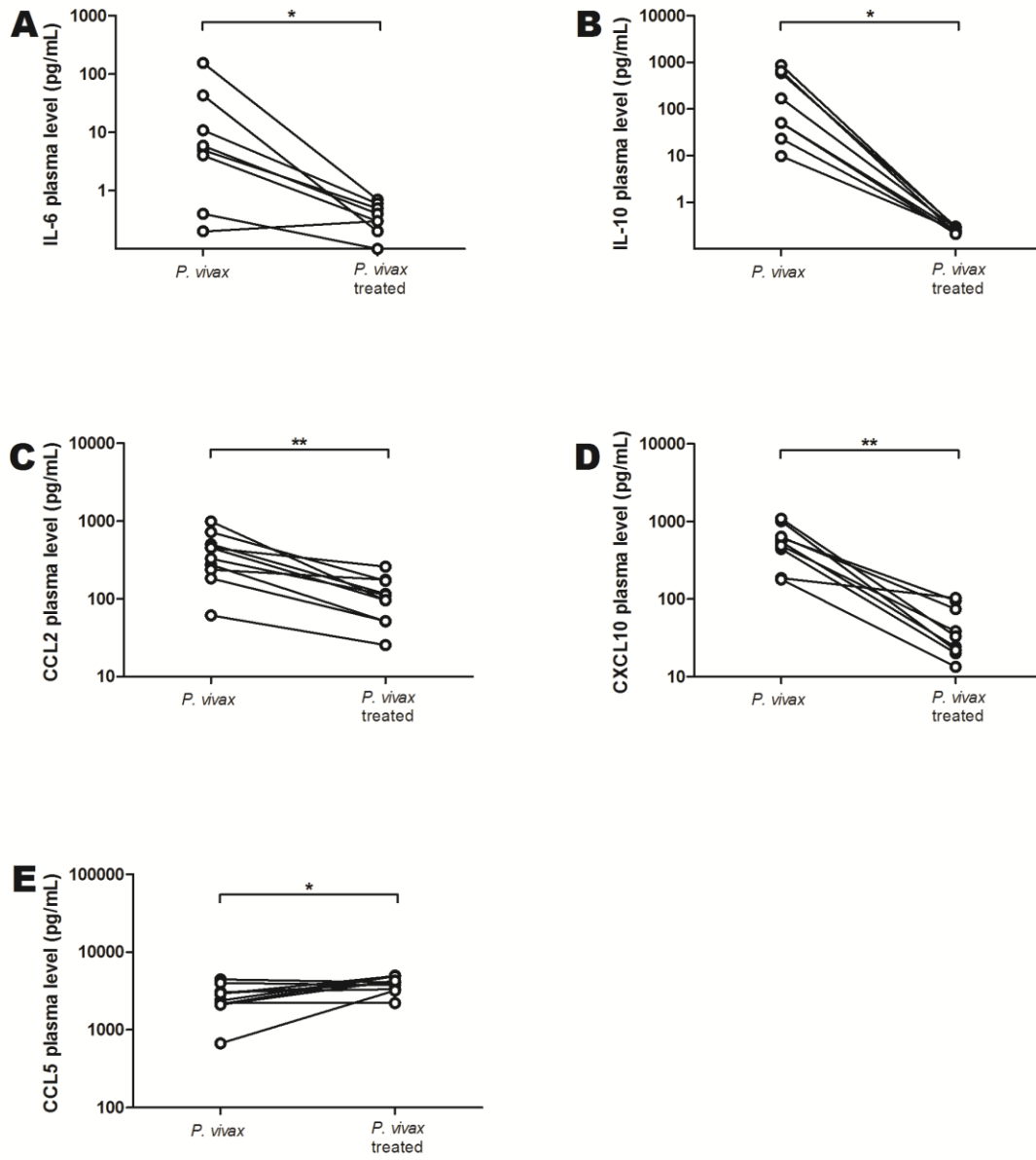


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

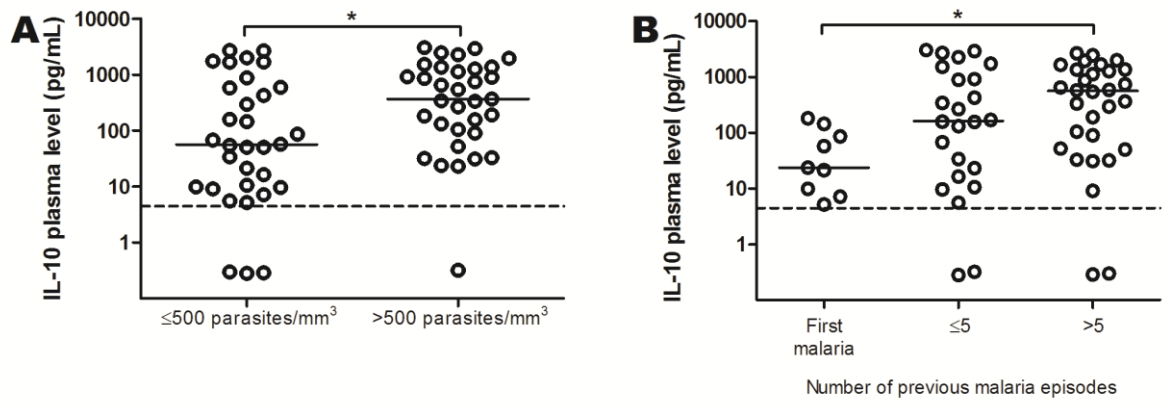
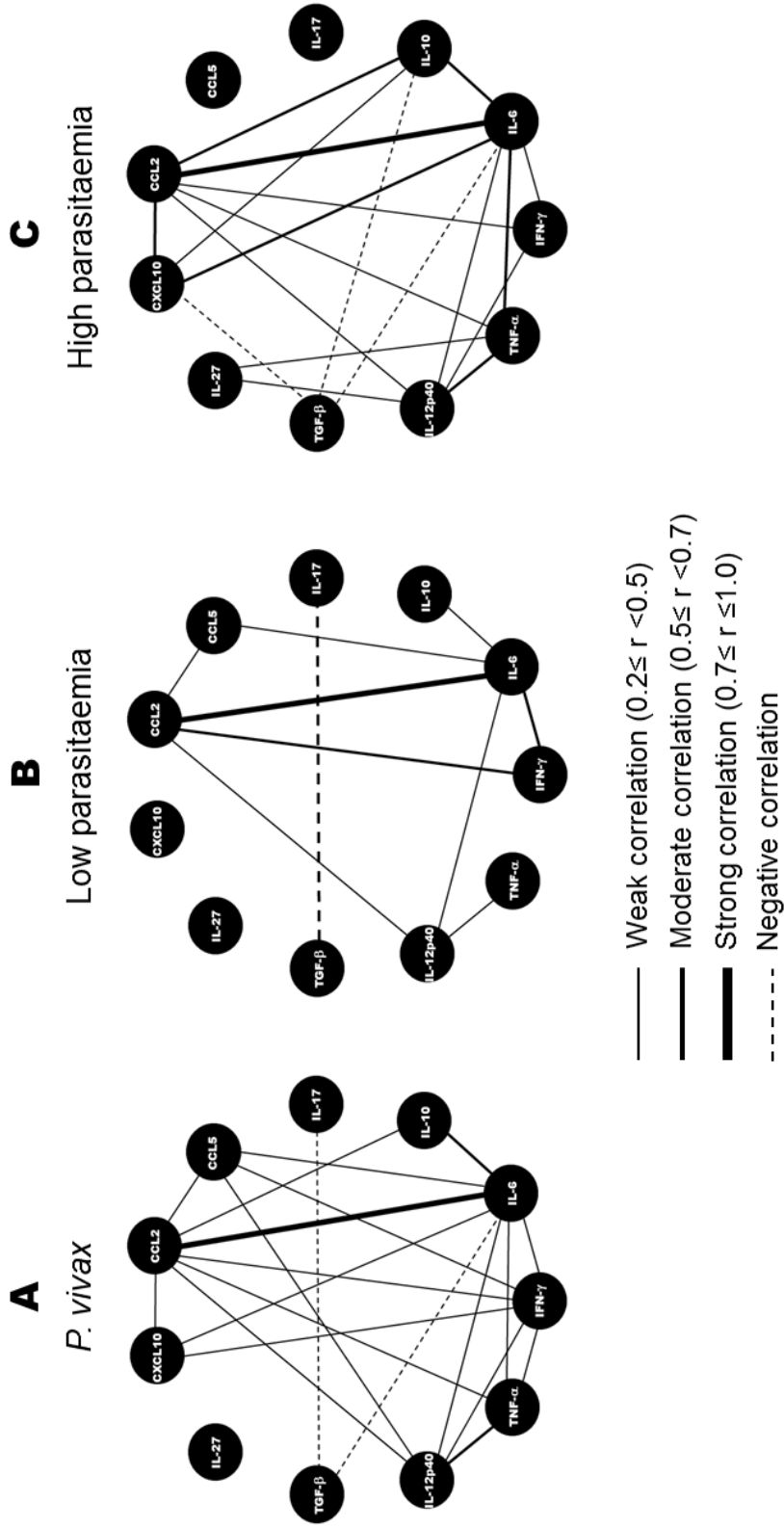
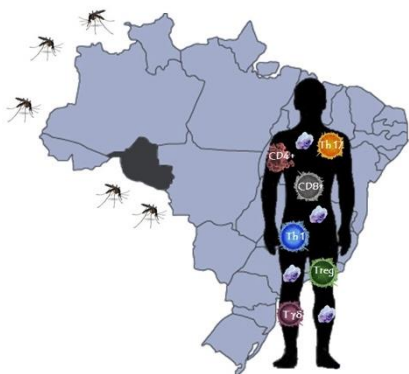


Figure 5





---

## 6 DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

A modulação da resposta imune durante infecção de estágio sanguíneo por *Plasmodium* é uma característica naturalmente adquirida pela maioria das pessoas vivendo em área endêmica e que estão constantemente expostas ao parasito. A imunomodulação pode ser considerada um processo homeostático normal, que é fundamental para a resolução da inflamação sem causar imunopatologia. Mas, por outro lado, pode representar um mecanismo de evasão imune induzida pelo parasito, garantindo a sobrevivência do hospedeiro e do próprio parasito, perpetuando sua transmissão (STRUICK; RILEY, 2004; STANISIC et al., 2013).

Com o objetivo de contribuir para melhor compreensão da modulação da resposta imune durante infecção malárica, foram realizados estudos com amostras sanguíneas obtidas de pacientes naturalmente infectados por *P. vivax*, com doença sintomática, porém não-complicada. Esse perfil de pacientes poderia revelar aspectos importantes da resposta imune adquirida que impede evolução para quadros mais graves, mas que ainda não atingiu um patamar de ausência total de sintomatologia clínica.

Os pacientes infectados por *P. vivax* foram recrutados no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) de Porto Velho (Rondônia) e, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, doaram amostras de sangue para os estudos realizados.

Os resultados obtidos apontam para aspectos importantes que elucidam alguns dos mecanismos que contribuem para imunidade clínica, com sintomatologia mais branda, porém sem conferir imunidade estéril.

Uma característica frequentemente observada em infecção por *Plasmodium*, em humanos ou em modelos experimentais, é a redução do número de linfócitos no sangue periférico (linfocitopenia). Embora essa redução tenha sido atribuída a apoptose de linfócitos T (KERN et al., 2000; MATSUMOTO et al., 2000; RICCIO et al., 2003), outra hipótese também aventada é a realocação dessas células em sítios de inflamação, seguida de reaparecimento no sangue circulante após tratamento (HVIID et al., 1997; HVIID; KEMP, 2000).

No presente estudo, pacientes naturalmente infectados por *P. vivax* apresentaram alterações significativas nos parâmetros hematológicos, caracterizadas principalmente por redução nos números absolutos de leucócitos, linfócitos e plaquetas, entretanto, nenhum dos pacientes apresentou quadro de anemia.

Considerando a importância das células T CD4<sup>+</sup> na resposta imune adaptativa em infecção malárica, foi investigada a possibilidade de apoptose dessas células e possíveis mecanismos envolvidos.

Dois mecanismos de morte celular de células T têm sido propostos: (i) morte celular induzida por ativação (AICD); (ii) morte autônoma de célula T ativada (ACAD) (HILDEMAN et al., 2002; BRENNER et al., 2008).

AICD parece ser mais importante para suprimir células T cronicamente ativadas e potencialmente auto-reativas, sendo mediada principalmente por receptores de morte (sistema Fas/FasL e TNFR). Por outro lado, ACAD parece contribuir principalmente na redução do número de células T durante a fase de contração, sendo mediada pela via de morte intrínseca envolvendo membros da família Bcl-2. No pico de ativação, há redução de Bcl-2 nas células T, indicando que esta regulação negativa (*downregulation*) favorece a sinalização de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (HILDEMAN et al., 2002).

Os resultados obtidos mostraram a ocorrência de apoptose mediada por dois tipos de sinalização: ativação de receptor de morte TNFR1 (via extrínseca), cujo sinal é amplificado por Bid, e redução da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (via intrínseca). Tais resultados sugerem que apoptose de células T CD4<sup>+</sup> contribui para linfocitopenia observada durante infecção aguda por *P. vivax*. Além disso, é possível que AICD represente um mecanismo para restabelecer a homeostase imunológica na medida em que a infecção é controlada (STRUIK; RILEY, 2004). Entretanto não se pode descartar a hipótese de que aumentada apoptose de células T ativadas possa contribuir para remoção inadequada do parasito viabilizando sua permanência. Por outro lado, ACAD, mediada por redução na expressão de Bcl-2, poderia influenciar negativamente sobre a indução e manutenção de memória imunológica. Sendo assim, os dados obtidos sugerem que deleção de células T CD4<sup>+</sup> pode ser induzida pelo parasito como estratégia de evasão imune, permitindo sua persistência e transmissão para novos hospedeiros.

Um segundo aspecto considerado relevante foi o possível envolvimento de células T CD8<sup>+</sup> durante estágio sanguíneo da infecção por *P. vivax*, visto que inúmeros estudos mostram que há redução na porcentagem e/ou números absolutos dessas células no sangue periférico durante infecção por *P. falciparum* ou *P. vivax* (LISSE et al., 1994; WORKU et al., 1997; HVIID et al., 1997; KASSA et al., 2006, BORGES et al., 2013). Tal redução tem sido atribuída a apoptose de células T (TOURÉ-BALDÉ et al., 1995; RICCIO et al., 2003), realocação dessas células nos sítios de inflamação (HVIID et al., 1997; HVIID; KEMP, 2000) ou a outros fatores como supressão de células T CD8<sup>+</sup> induzida por esporozoítos ou eritrócitos infectados pelo parasito (OCAÑA-MORGNER et al., 2003). Entretanto, em relação à infecção por *P. vivax* há também relatos indicando que não há diferenças significativas na porcentagem de células T



CD8<sup>+</sup> no sangue periférico durante infecção aguda comparativamente a indivíduos não infectados (SRISURAPANON et al., 2003; JANGPATARAPONGSA et al., 2006).

Durante muito tempo as células T CD8<sup>+</sup> não eram consideradas importantes na fase eritrocítica da malária, uma vez que eritrócitos não expressam o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I (STRUIK;RILEY, 2004; STANISIC et al., 2013). Entretanto, estudos recentes utilizando modelos experimentais sugerem que células T CD8<sup>+</sup> podem exercer um papel na eliminação de parasitos durante o estágio sanguíneo da infecção (IMAI et al., 2010; HORNE-DEBETS et al., 2013).

No presente estudo, foi observada redução na porcentagem e números absolutos de células T CD8<sup>+</sup> naïve, de memória e duplo-positivas (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) de pacientes infectados por *P. vivax* comparativamente a indivíduos malária-naïve (controle). Esses resultados apontam para algumas possibilidades: supressão imune induzida pelo parasito (OCAÑA-MORGNER et al., 2003), exaustão e perda de células T CD8<sup>+</sup> mediada por morte celular programada (HORNE-DEBETS et al., 2013), apoptose (TOURÉ-BALDÉ et al., 1995; RICCIO et al., 2003) ou realocação temporária dessas células em outros tecidos (HVIID et al., 1997; HVIID; KEMP, 2000). Dentre as células de memória, números mais baixos foram observados no compartimento de memória central em pacientes infectados por *P. vivax*.

Além disso, o número de células T CD8<sup>+</sup> naïve expressando IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 estavam diminuídas, possivelmente refletindo a redução no número dessas células em pacientes infectados. Entretanto, observou-se um aumento no número de células de memória produtoras de TNF- $\alpha$  e IL-10, sugerindo um perfil imunomodulador durante a fase sanguínea da infecção.

Embora ocorra redução no número de células T CD8<sup>+</sup> durante infecção por *P. vivax*, especialmente de células de memória, correlações positivas entre o número de células expressando citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e IL-10 foram observadas, sugerindo um mecanismo de auto-regulação entre citocinas com ações opostas. Isso poderia contribuir para a remoção do parasito e, ao mesmo tempo, impedir patologia mediada por inflamação exacerbada.

Análises da razão entre o número de células expressando citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e células expressando a citocina anti-inflamatória IL-10 revelaram um perfil anti-inflamatório nas células T CD8<sup>+</sup> duplo-positivas (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) e de memória (CD45RO<sup>+</sup>), indicativo de um perfil imunomodulador durante infecção por *P. vivax*.

Certamente mais estudos são necessários para verificar se os perfis fenotípicos observados representam uma resposta imunológica homeostática que beneficia o hospedeiro

impedindo a ocorrência de imunopatologia ou, alternativamente, se a formação de memória imunomoduladora viabilizaria a persistência do parasito perpetuando sua propagação. Outro aspecto considerado importante é se a formação de memória com perfil imunomodulador em células T CD8<sup>+</sup> teria algum impacto sobre a fase hepática da infecção.

Citocinas e quimiocinas plasmáticas, durante estágio sanguíneo de infecção por *Plasmodium*, contituem importantes mediadores que podem determinar o curso da doença. Nessa perspectiva, vários estudos têm focado sobre o repertório de citocinas/quimiocinas eliciadas durante a infecção, investigando possíveis associações com a gravidade da doença e sintomas clínicos (FERNANDES et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; JAIN et al., 2010; COX-SINGH et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012; MENDONÇA et al., 2013; RAZA et al., 2013), parasitemia (ZEYREK et al., 2006; MEDINA et al., 2011; COSTA et al., 2014; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014) e número de infecções prévias (MEDINA et al., 2011; COSTA et al., 2014). Além disso, o perfil desses mediadores antes e após tratamento quimioterápico (ANDRADE et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012; LEORATTI et al., 2012; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014) e comparação entre infecção com *P. falciparum* e *P. vivax* (FERNANDES et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010; COX-SINGH et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014) também são analisados com o objetivo de melhorar a compreensão da resposta imunológica.

Outra estratégia metodológica usada visando melhor entendimento da participação de citocinas/quimiocinas durante infecção malárica por *P. vivax* é a análise da rede de interações entre mediadores plasmáticos (MENDONÇA et al., 2013; COSTA et al., 2014). Ainda assim, os resultados até agora alcançados são contraditórios e podem ser atribuídos, entre outros fatores, à diferenças na população de estudo e grau de endemicidade da doença, requerendo investigações adicionais.

Nessa perspectiva, foram avaliados os níveis plasmáticos de 11 mediadores durante infecção aguda de pacientes infectados por *P. vivax*. Embora todos os pacientes apresentassem malária sintomática não-complicada, verificou-se ampla variação nos níveis plasmáticos dos mediadores avaliados, possivelmente devido a variações no número de infecções prévias e grau de parasitemia.

Na análise global, infecção por *P. vivax* induziu, na maioria dos pacientes, resposta inflamatória caracterizada por níveis plasmáticos mais elevados de IL-6 e IL-17 associada com um perfil imunomodulador mediado por IL-10 e TGF- $\beta$ . Além disso, baixos níveis de IFN- $\gamma$  foram observados na maioria dos pacientes durante infecção aguda por *P. vivax*. Resultados

similares já foram descritos na literatura entretanto, parece haver consenso apenas para o aumento de IL-10 (ZEYREK et al., 2006; FERNANDES et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; JAIN et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; MEDINA et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012; MENDONÇA et al., 2013; COSTA et al., 2014; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014).

Em relação às quimiocinas avaliadas, pacientes infectados por *P. vivax* apresentaram níveis plasmáticos elevados de CCL2 (MCP-1) e CXCL10 (IP-10) e reduzidos de CCL5 (RANTES). Os dados da literatura referentes aos níveis plasmáticos de quimiocinas durante a infecção por *P. vivax* são extremamente escassos (FERNANDES et al., 2008; MENDONÇA et al., 2013).

A comparação de mediadores plasmáticos entre os grupos controles (malaria-naïve e endêmico) indicou baixos níveis de IL-27 e tendência de altos níveis de TGF- $\beta$  nos indivíduos de área endêmica. Tais resultados sugerem que indivíduos expostos à malária podem apresentar um perfil de resposta mais imunomodulador, mas este aspecto, sem dúvida, requer investigação adicional. Não foram encontrados relatos na literatura referentes aos níveis plasmáticos de IL-27 durante a infecção por *P. vivax*.

Com o objetivo de detectar biomarcadores de doença ativa, os 11 mediadores plasmáticos foram avaliados em análise pareada num subgrupo de pacientes infectados por *P. vivax*, antes e após tratamento com medicamento antimalárico (cloroquina e primaquina). Níveis elevados de IL-6, IL-10, CCL2 e CXCL10 foram restaurados a níveis basais após tratamento, ressaltando o papel desses mediadores na infecção de fase aguda. Resultados similares já foram observados para IL-6 e IL-10 (GONÇALVES et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012; LEORATTI et al., 2012).

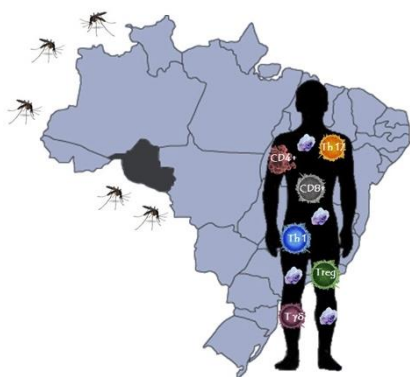
A separação em subgrupos, considerando o grau de parasitemia ( $\leq 500$  ou  $> 500$  parasitos/mm<sup>3</sup>) ou o número de infecções prévias (primeira infecção,  $\leq 5$  infecções ou  $> 5$  infecções prévias), permitiu uma análise mais detalhada. Níveis plasmáticos mais elevados de IL-10 foram observados em pacientes apresentando alta parasitemia e naqueles com mais do que 5 infecções prévias. Relatos na literatura também indicam elevados níveis de IL-10 em indivíduos com mais alta parasitemia (MEDINA et al., 2011; COSTA et al., 2014; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014). Esses dados sugerem que a aquisição de um perfil imunomodulador é alcançada após várias infecções prévias, o que leva a resposta inflamatória mais branda (e menor sintomatologia), embora com parasitemia mais elevada.

Os resultados de citocinas/quimiocinas plasmáticas durante infecção aguda por *P. vivax* indicam produção aumentada/diminuída de vários mediadores, os quais podem resultar numa

complexa rede de interações com forças de correlação que podem ser fracas ( $0.2 \leq r < 0.5$ ), moderadas ( $0.5 \leq r < 0.7$ ) ou fortes ( $0.7 \leq r \leq 1.0$ ) entre os diferentes mediadores. As análises das redes mostraram mais alta conexão de mediadores plasmáticos em pacientes com mais alta parasitemia do que em pacientes com baixa parasitemia, assemelhando-se à rede que inclui todos os pacientes infectados, ressaltando a importância do número de parasitos na estimulação da resposta imune.

As múltiplas análises realizadas permitiram identificar pelo menos dois importantes mediadores plasmáticos inflamatórios, IL-6 e CCL2, envolvidos no controle da infecção. A forte correlação positiva entre IL-6 e CCL2 mostrou-se importante, independentemente da parasitemia ou do número de infecções prévias. Por outro lado, elevada parasitemia vista num subgrupo de pacientes parece ser devida a correlação positiva do eixo IL-6-CCL-2 com a IL-10, enquanto que pacientes com mais baixa parasitemia mostraram mais forte correlação desse eixo com IFN- $\gamma$ . Costa e colaboradores (2014) já haviam verificado uma forte correlação positiva entre IL-6 e IL-10, independentemente da parasitemia observada.

Em conclusão, os aspectos abordados no presente estudo apontam para a existência de mecanismos imunomoduladores em pacientes infectados por *P. vivax*, sintomáticos, mas que não apresentam complicações decorrentes da doença. Se, por um lado, esses mecanismos conferem imunidade clínica ou quadro sintomático mais brando, por outro, não conferem imunidade estéril. Tais resultados poderão contribuir para melhor entendimento da malária causada por *P. vivax* e auxiliar em pesquisas que visam o desenvolvimento de novos fármacos e mesmo de vacinas mais efetivas para a erradicação da doença.



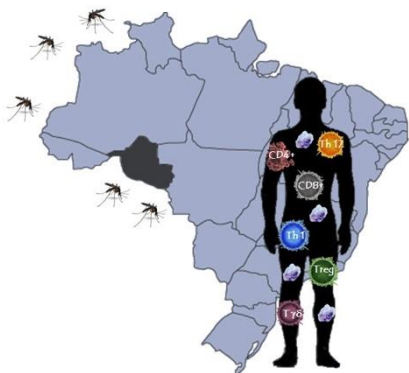
---

## 7 CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que os indivíduos infectados por malária *P. vivax* sintomática não complicada desenvolvem uma resposta imune com perfil imunomodulador. Esse perfil pode ser evidenciado pelos seguintes achados:

- ❖ Apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, com ativação tanto da via intrínseca quanto extrínseca;
- ❖ Redução do número absoluto de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, principalmente das células de memória central;
- ❖ Redução do número absoluto de células T CD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$ ;
- ❖ Aumento do número absoluto de células T CD8<sup>+</sup> de memória TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup>;
- ❖ Redução da razão IFN- $\gamma$ /IL-10 em células T CD8<sup>+</sup> duplo positivas e de memória;
- ❖ Redução do número absoluto de linfócitos T $\gamma\delta$ ;
- ❖ Redução do número absoluto de linfócitos T $\gamma\delta$  Th1-like;
- ❖ Elevados níveis plasmáticos de mediadores inflamatório (IL-6, IL-17, CCL2, CXCL10) associado com níveis plasmáticos aumentados de citocinas imunomoduladoras (IL-10 e TGF- $\beta$ );
- ❖ Elevados níveis plasmáticos de IL-10 em indivíduos com alta parasitemia e maior número de infecções prévias;
- ❖ Associação do eixo IL-6/CCL2 com IL-10 em indivíduos com alta parasitemia;



---

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, B. B. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9:13, 2010.
- ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETO, M. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 70-78, 2011.
- ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 220-227, 2009.
- APPAY, V.; ROWLAND-JONES, S.L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. **Trends in Immunology**, v. 22, p. 83-87, 2001.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 491, 2014.
- ARMAH, H.B., et al. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. **Malaria Journal**, v. 6, p. 147, 2007.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J.E., RILEY, E.M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clinical Experimental Immunology**, v. 133: 145-152, 2003.
- AWASTHI A., et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. **Nature Immunology**, 8:1380–1389, 2007.
- AWASTHI, A.; KUCHROO, V. K. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. **International Immunology**, v. 21, p. 489–498, 2009.
- AYIMBA, E. et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, 166(2):218-26, 2011.
- BANK, I.; MARCU-MALINA, V. Quantitative peripheral blood perturbations of  $\gamma\delta$  T cells in human disease and their clinical implications. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 47, p. 311–333, 2014.
- BATTEN, M. et al. Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not Foxp3 in murine T cells. **The Journal of Immunology**, 180: 2752-2756, 2008.
- BEETZ, S., et al. Innate immune functions of human  $\gamma\delta$  T cells. **Immunobiology**, v. 213, p. 173-182, 2008.
- BELKAID, Y.; TARSELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 551-589, 2009.
- BETELLI, E., et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235-238, 2006.



- BISWAS, P., et al. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells in the U937 cellline. **Blood**, v. 91, p. 258-265, 1998.
- BONNEVILLE, M.; O'BRIE, R. L.; BORN, W. K.  $\gamma\delta$  T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 467-478, 2010.
- BORGES, Q.I.; FONTES, C.J.F.; DAMAZO, A.S. Analysis of lymphocytes in patients with *Plasmodium vivax* malaria and its relation to the annexin-A1 and IL-10. **Malaria Journal**, v.12, p. 455, 2013.
- BORN, W.K.; AYDINTUG, M.K.; O'BRIEN, R.L. Diversity of  $\gamma\delta$  T-cell antigens. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 10, p. 13-20, 2013.
- BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malária control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 377-410, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 6 ed. Brasília, 2005.
- BRENNER, D.; KRAMMER, P. H.; ARNOLD, R. Concepts of activated T cell death. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 66, p. 52–64, 2008.
- BUENO, L. L. et al. *Plasmodium vivax*: Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. **PLoS ONE**, 5(3): e9623, 2010.
- BUENO, L. L. et al. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural *Plasmodium vivax* infection. **Acta Tropica**, v. 123, p. 53– 57, 2012.
- CACCAMO, N., et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17–producing human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. **Blood**, v. 118, p. 129-138, 2011.
- CACCAMO, N., et al Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of human  $\gamma\delta$  T cells. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 10, p. 30-34, 2013.
- CHUANGCHAIYA, S., et al. Immune response to *Plasmodium vivax* has a potential to reduce malaria severity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, p. 233-239, 2010.
- CIOFANI, M. et al. Determining gammadelta versus alphabeta T cell development. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p.657-663, 2010.
- COSTA, A. G. et al. 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**, v. 2014, p. 1-11, 2014.
- COUPER, K.N.; BOUNT, D.G.; RILEY. E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 5771-5777, 2008.

COX-SINGH, J. et al. Anti-inflammatory cytokines predominate in acute human *Plasmodium knowlesi* infections. **PLoS ONE**, v. 6, e20541, 2011.

DIELI, F. et al. Biology of  $\gamma\delta$  T Cells in tuberculosis and malaria. **Current Molecular Medicine**, v. 1, p. 437-446, 2001.

DOOLAN, D.L.; DOBAN. C.; BAIRD, J.K. Acquired immunity to malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 13–36, 2009.

ENGEWERDA, C.R. et al. Locally up-regulated Lymphotoxin- $\alpha$  not systemic Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  is the principle mediator of murine cerebral malaria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195: 1371-1377, 2002.

FAHL, S.P.; COFFEY, F.; WIEST, D.L. Origins of  $\gamma\delta$  T cell effector subsets: a riddle wrapped in an enigma. **Journal of Immunology**, v. 193, p. 4289-4294, 2014.

FERNANDES, A.A.M. et al. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.15, 650-658, 2008.

FINNEY, O.C.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. Regulatory T cells in malaria – friend or foe? **Trends in Immunology**, v. 31, p. 63–70, 2010.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798–4811, 2006.

GAVRILESCU, C. G.; DENKERS, E. Y. Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic responses to protozoan infection. **Infection and Immunity**, v.71, p. 6109–6115, 2003.

GONÇALVES, R. M. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? **Infection and Immunity**, v. 78, p. 4763–4772, 2010.

GONÇALVES, R. M. et al. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? **PLoS ONE**, 7(9): e44394, 2012.

GOODIER, M., et al.  $\gamma\delta$  T cells in the peripheral blood of individuals from an area of holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 692-696, 1993.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of Malaria. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 297–316, 2011.

HANSEN, D.S.; SCHOFIELD, L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? **PLoS Pathogen**, v. 6: e1000771, 2010.

HARTY, J. H.; TVINNEREIM, A. R.; WHITE, D. W. CD8<sup>+</sup> T cell effector mechanisms in resistance to infection. **Annual Reviews of Immunology**, v. 18, p. 275–308, 2000.

- HILDEMAN, D. A. Molecular mechanisms of activated T cell death *in vivo*. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 354–359, 2002.
- HISAEDA, H.; YASUTOMO, K.; HIMENO, K. Malaria: immune evasion by parasites. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p.700–706, 2005.
- HOJO-SOUZA, N.S., et al. Phenotypic profiling of CD8<sup>+</sup> T cells during *Plasmodium vivax* blood-stage infection. **BMC Infectious Disease**, v. 15, p. 35, 2015.
- HOJO-SOUZA, N.S., CD4<sup>+</sup> T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways. **Malaria Journal**, v. 14, p. 5, 2015.
- HORNE-DEBETS, J.M. et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8<sup>+</sup> T cells drives chronic malaria. **Cell Reports**, v. 5, p. 1204–1213, 2013.
- HVIID, L., et al. The  $\gamma/\delta$  T-cell response to *Plasmodium falciparum* malaria in a population in which malaria is endemic. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4359–4362, 1996.
- HVIID, L. et al. Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 4090–4093, 1997.
- HVIID, L., KEMP, K. What is the cause of lymphopenia in malaria? **Infection and Immunity**, v. 68, p. 6087–6089, 2000.
- IMAI, T. et al. Involvement of CD8<sup>+</sup> T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 1053–1061, 2010.
- INOUE, S. I. et al. Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing  $\gamma/\delta$  T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. **PNAS**, v. 109, p. 2129–2134, 2012.
- JAIN, V. et al. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. **Acta Tropica**, v. 113, p. 263–268, 2010.
- JAGANNATHAN, P., et al. Loss and dysfunction of V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma/\delta$  T cells is associated with clinical tolerance to malaria. **Science Translational Medicine**, v. 6, p. 251, 2014.
- JANGPATARAPONGSA, K., et al. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 680–686, 2006.
- JANGPATARAPONGSA, K. et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. **Europe Journal of Immunology**, v. 38, p. 2697–2705, 2008.
- JANGPATARAPONGSA, K. et al. Immunity to malaria in *Plasmodium vivax* infection: a study in central China. **PLoS ONE**, v. 7, p. e45971, 2012.

- JENDROSSEK, V. The intrinsic apoptosis pathways as a target in anticancer therapy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 1426–1438, 2012.
- JOHN, C.C., et al. Low levels of RANTES are associated with mortality in children with cerebral malaria. **Journal of Infectious Disease**, v. 194, p. 837-845, 2006.
- KASSA, D., et al. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, p. 376–379, 2006.
- KEMP, K., et al. Cytokine production and apoptosis among T cells from patients under treatment for *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 127, p. 151–157, 2002.
- KERN, P., et al. Increased levels of soluble Fas ligand in serum in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3061–3063, 2000.
- LACERDA, M. V. G. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, 11:123, 2012.
- LANGHORNE, J.  $\gamma\delta$  T cells in malaria infections. **Parasitology Today**, v. 12, p. 200-2003, 1996.
- LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, v. 9, p. 725-732, 2008.
- LEORATTI, F. M. S. et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* Malaria. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, e1710, 2012.
- LI, C. et al. Protective function of an unconventional  $\gamma\delta$  T cell subset against malaria infection in apoptosis inhibitor deficient mice. **Cellular Immunology**, v. 279, p. 151–159, 2012.
- LISSE, I.M., et al. A community study of T lymphocyte subsets and malaria parasitaemia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 709-710, 1994.
- LIU, M., et al. CXCL10/IP-10 in infectious disease pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine Growth Factor Review**, v. 22, p. 121-130, 2011.
- MATSUMOTO, J., et al. Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of *Macaca* monkeys to *Plasmodium coatneyi* infection. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1183–1188, 2000.
- MCGEACHY, M.J., et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T<sub>H</sub>-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, p. 1390-1397, 2007.

- MEDINA, T. S. et al. Increased interleukin-10 and interferon- $\gamma$  levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. **Malaria Journal**, 10:264, 2011.
- MÉNARD, R. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nature Reviews**, v. 11, p. 701-713, 2013.
- MENDONÇA, V. R. R. et al. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, 12(1):69, 2013.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.
- MOTA, M.M. et al. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, p. 141-144, 2001.
- MURUGAIYAN, G et al. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by Human CD4<sup>+</sup> T Cells. **Journal of Immunology**, 183: 2435-2443, 2009.
- NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, p. 3448–3459, 2013.
- O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. **Science**, v. 327, p. 1098-1102, 2010.
- OCAÑA-MORGNER, C.; MOTA, M.M.; RODRIGUEZ, A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 143-151, 2003.
- OCHIEL, D.O., et al. Differential regulation of beta-chemokines in children with *Plasmodium falciparum* malaria. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4190-4197, 2005.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, 9:115, 2010.
- ONISHI, R. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. **Immunology**, v. 129, p. 311–321, 2010.
- PARK, H., et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1133-1141, 2005.
- PAUL, S., et al. Phenotypic and functional plasticity of gamma–delta ( $\gamma\delta$ ) T Cells in inflammation and tolerance. **International Reviews in Immunology**, v. 33, p. 537-558, 2014.
- PERERA, M.K., et al. Transient increase in circulating  $\gamma\delta$  T cells during *Plasmodium vivax* malarial paroxysms. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 311-315, 1994.
- PERKINS, D. J. et al. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 1427-1442, 2011.

RAZA, A., et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-10, intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated *Plasmodium vivax* isolates from Pakistan. **PLoS One**, v. 8, p. e81363, 2013.

REFAELI, Y.; et al. Interferon- $\gamma$  is required for activation-induced death of T lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 999–1005, 2002.

RENAULT, T.T.; CHIPUK, J.E. Getting away with murder: how does the BCL-2 family of proteins kill with immunity? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1285, p. 59–79, 2013.

RIBOT, J. C. et al. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17- producing gamma-delta T cell subsets. **Nature Immunology**, v. 10, p. 427–436, 2009.

RICCIO, E.K.P., et al. Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks. **Parasitology Research**, v. 90, p. 9–18, 2003.

RILEY, E.M., et al. Soluble plasma IL-2 receptors and malaria. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 91, p. 495–499, 1993.

RILEY, E. M. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 35–49, 2006.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nature Medicine**, v. 19, p. 168-178, 2013.

RODRIGUES-DA-SILVA, R. N. et al. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 154-162, 2014.

ROMAGNANI, S. Human Th17 cells. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, p. 1-8, 2008.

SABATANI, S.; FIORINO, S.; MANFREDI, R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern? **The Journal of Infectious Disease**, v. 14, p. 299-309, 2010.

SALEEM, M. et al. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 82, p. 243–251, 2012.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation and maintenance. **Annual Reviews of Immunology**, v. 22, p. 745–763, 2004.

SCHNEIDER-BRACHERT, W.; HEIGL U.; EHRENSCHWENDER, M. Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 14475-14503, 2013.

SCHOLZEN, A.; MINIGO, G.; PLEBANSKI, M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 16-23, 2010.

SCOPEL, K.K.G., et al. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. **Malaria Journal**, v. 3, 2004.

SIVEP – MALÁRIA. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Notificação de Casos. Disponível em:

<http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEE C8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convidado&pwd=datusus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer>. Acesso em 10 fev 2015.

SNOUNOU, G. et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 61, p. 315–320, 1993.

SRISURAPANON, S., et al. Lymphocyte subpopulations in malaria infected individuals living in an endemic area, Southeast Asian. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 34, p. 310-315, 2003.

STANISIC, D.I.; BARRY, A.E.; GOOD, M.F. Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. **Trends in Parasitology**, v. 29, p. 612-622, 2013.

STRUIK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 268–290, 2004.

STUMHOFER, S.J.; HUNTER, C.A. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. **Immunology Letter** 15; 117: 123–130, 2008.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, 1287-1290, 2006.

SUN, T., et al. A *Plasmodium*-encoded cytokine suppresses T-cell immunity during malaria. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 109, p. 2117–2126, 2012.

TANGPUKDEE, N., et al. Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. **Parasitology International**, v. 57, p. 490–494, 2008.

TCHIKOV, V., et al. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, p. 467–475, 2011.

TOURÉ-BALDÉ, A.; SARTHOU, J.L.; ROUSSILHON, C. Acute *Plasmodium falciparum* infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. **Immunology Letters**, v. 46, p. 59-62, 1995.

TOURÉ-BALDÉ, A., et al. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 744–750, 1996.

TRAN, T.M., et al. An intensive longitudinal cohort study of malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 57, p. 40–47, 2013.

TSE, S.W.; RADTKE, A.J.; ZAVALA, F. Induction and maintenance of protective CD8<sup>+</sup> T cells against malaria liver stages: implications for vaccine development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 172-178, 2011.

WALTHER, M., et al. Distinct roles for FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. e1000364, 2009.

WEAVER, C.T., et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annual Review of Immunology**, v.25, p. 821-852, 2007.

WERE, T., et al. Suppression of RANTES in children with *Plasmodium falciparum* malaria. **Haematologica**, v. 91, p. 1396-1399, 2006.

WIPASA, J., et al. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunology Cell Biology**, v. 80, p. 401-414, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - **World malaria report**. Switzerland, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Country profile. In: **World malaria report 2015**.

WILLIAMS, M. A. et al. Developing and maintaining protective CD8<sup>+</sup> memory T cells. **Immunological Reviews**, v. 211, p. 146–153, 2006.

WORKU, S. et al. Lymphocyte activation and subset redistribution in the peripheral blood in the malaria illness: distinct  $\gamma\delta^+$  T cell patterns in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 108, p. 34-41, 1997.

XU, H.; et al. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4<sup>+</sup> T cells in malaria infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 881–892, 2002.

XU, S.; CAO, X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 7, p. 164-174, 2010.

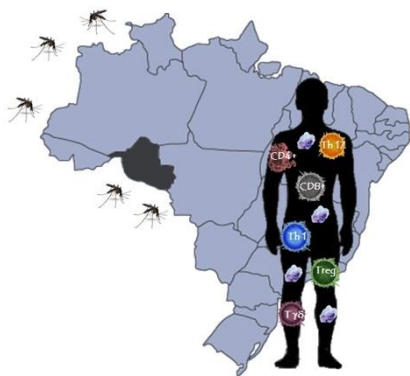
YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1570-1579, 2010.

YEOM, J. et al. Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without hepatic dysfunction. **Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.97, p. 687-691, 2003



YU, Z., et al. The RAF-MEK-ERK pathway: targeting ERK to overcome obstacles of effective cancer therapy. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 269–289, 2015.

ZEYREK, F.Y., et al. Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 201-207, 2006.



---

## APÊNDICE

## APÊNDICE A – VIAS DE SINALIZAÇÃO

### Vias de sinalização JAK-STAT e MAPK

As análises das vias de sinalização de JAK-STAT e MAPK envolveram a investigação de 84 genes em cada uma das vias. Para tanto, foram utilizados RNA (convertido em cDNA) proveniente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax*, bem como indivíduos controle (malaria-naïve). Os dados obtidos referem-se ao grupo *P. vivax* comparativamente ao grupo controle.

### Via de JAK-STAT

A via de JAK-STAT foi avaliada em amostras de indivíduos infectados por *P. vivax* (n=8) e não infectados (n=3). Dos 84 genes investigados, houve redução significativa da expressão de oito genes codificadores de proteínas envolvidas nessa via de sinalização, PIAS 1 (-2,18), SP1 (-2,20), SOCS4 (-2,30), IL6ST (-2,36), NR3C1 (-2,56), IL20 (-2,57), SOCS5 (-2,65) e SMAD4 (-2,79). Além disso, foi possível observar aumentada expressão gênica de JUN (2,15), SOCS1 (2,48), JUNB (4,76), OSM (5,90), sendo este aumento mais pronunciado para SOCS3 (13,31) conforme pode ser observado na Figura 3. Os dados obtidos sugerem uma modulação da via de JAK-STAT durante a infecção por *P. vivax*, evidenciada principalmente pelos níveis elevados de expressão de SOCS3 e SOCS1, dois importantes genes codificadores de proteínas supressoras de citocinas.

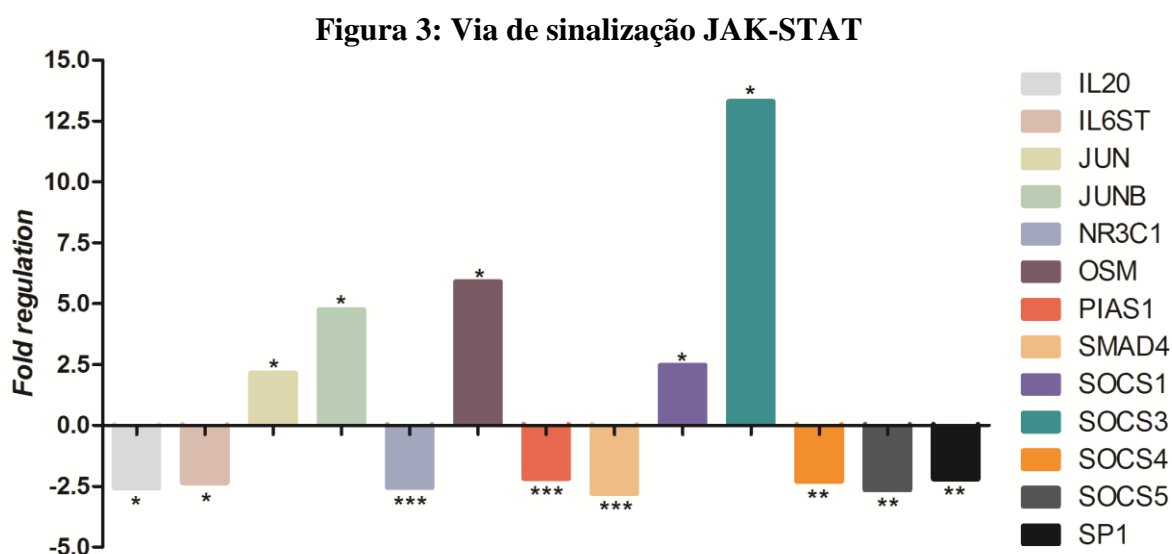
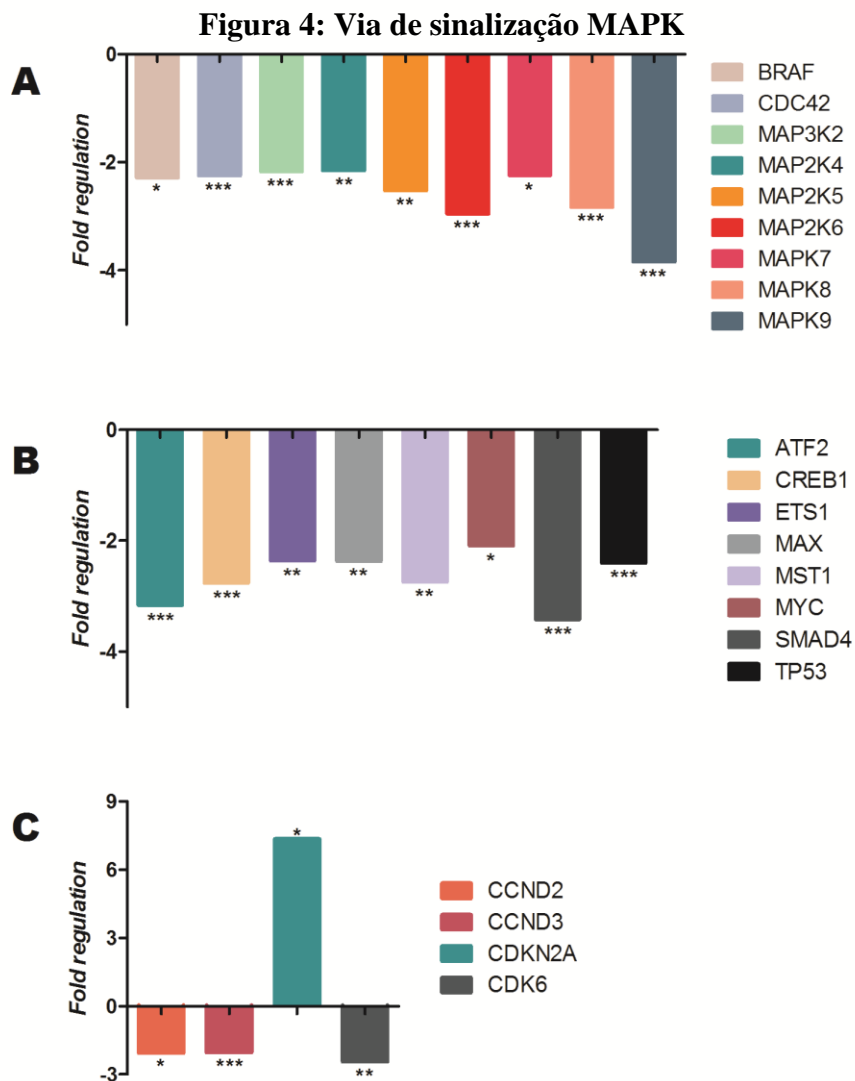


Gráfico representativo da expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas na via de sinalização JAK-STAT. \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,0001.

## Via de MAPK

A via de MAPK foi investigada em amostras de indivíduos infectados por *P. vivax* (n=9) e não infectados (n=3). Dos 84 genes investigados, houve redução significativa da expressão de 20 genes codificadores de proteínas envolvidas nas quatro cascatas de MAPK, variando de -2,03 até -3,84. Além disso, foi possível observar que a regulação da via de MAPK ocorreu em diferentes níveis da cascata de sinalização. Foi observado aumento da expressão gênica apenas para o gene *CDKN2A* (7,34; p=0,027), conforme pode ser observado na Figura 4 (A-C). Os dados obtidos evidenciam uma *downmodulation* da via de MAPK de uma forma global.



Gráficos representativos da expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas na via de sinalização MAPK. (A) Proteínas da cascata de ativação. (B) Fatores de transcrição. (C) Proteínas envolvidas no ciclo celular. \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,0001.

Em células mielóides e linfóides, a via JAK-STAT pode ser ativada por interleucinas, interferons e fatores de crescimento hematopoiéticos (TAMIYA et al., 2011). Aumentada expressão gênica de *Junb* (4,76 vezes) foi observada em células T CD4<sup>+</sup> de pacientes *P. vivax*, o que pode estar relacionado com proliferação celular. Em experimento realizado com fibroblastos foi verificado que o gene p16 é alvo direto da ação de *Junb*, regulando negativamente a proliferação celular (PASSEGUÉ, 2000). Certamente a expressão aumentada de *Junb* durante malária *P. vivax* requer investigações adicionais.

Em relação às SOCS, destacam-se a aumentada expressão gênica de SOCS3 (13,31 vezes) e SOCS1 (2,65 vezes), e reduzida expressão de SOCS4 (-2,30 vezes) e SOCS5 (-2,65 vezes) em células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados por *P. vivax*. Enquanto SOCS1 e SOCS3 são muito estudadas, há poucos relatos na literatura sobre as ações de SOCS4 e SOCS5 (TRENGOVE; WARD, 2013). Sendo assim, as discussões focarão especialmente as ações da SOCS1 e SOCS3, ambas com expressão aumentada durante estágio sanguíneo de infecção por *P. vivax*.

A família de proteínas citoplasmáticas SOCS (*Suppressor of Cytokine Signaling*) é formada por 8 membros (SOCS1-7 e CIS), tendo como função principal inibir a ativação das STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Em células do sistema imune, essas proteínas supressoras atuam por meio de retroalimentação negativa, atenuando a transdução de sinais de citocinas que ativam a via JAK-STAT (WORMALD; HILTON, 2004).

Além da família de proteínas SOCS, mais duas famílias de proteínas - SHP2 (*SH2-containing phosphatases*) e PIAS (*protein inhibitors of activated STATs*) também atuam inibindo por vias distintas a transdução do sinal desencadeado por citocinas (WORMALD; HILTON, 2004). Em outras palavras, a via JAK-STAT em células do sistema imune é firmemente regulada em vários pontos, através de diferentes mecanismos que buscam garantir uma resposta adequada modulando a resposta inflamatória (CAROW; ROTTENBERG, 2014).

É importante destacar que as proteínas SOCS são reguladoras negativas da sinalização de citocinas inflamatórias, as quais induzem as SOCS, formando uma alça de retroalimentação negativa (WORMALD; HILTON, 2004). Sendo assim, é sugerido que a ativação das STATs por citocinas inflamatórias, também promovem a *upregulação* da transcrição de proteínas SOCS, estabelecendo uma alça de retroalimentação negativa que inibe a cascata de sinalização. Esse mecanismo impede a sinalização prolongada de citocinas que poderiam levar a inflamação crônica ou promover proliferação celular anormal e tumorigênese (KERSHAW, 2013). Esta pode ser uma das possíveis explicações para níveis elevados da proteína supressora SOCS3

durante infecção por *P. vivax*, cujos pacientes apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de IL-17 durante o estágio sanguíneo do processo infeccioso.

SOCS3 regula a ativação de STAT3 em resposta a citocinas que utilizam o receptor gp130. Esse receptor constitui parte do complexo receptor para citocinas pertencentes à família IL-6, tais como IL-6, IL-11, LIF (fator inibidor de leucemia) e OSM (oncostatina M), entre outros. SOCS3 é de importância crítica para restringir inflamação, regulando respostas imunes protetivas durante processos infecciosos (CAROW; ROTTENBERG, 2014).

Interessantemente, em células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados por *P. vivax*, a expressão gênica de *IL-6ST*, que codifica a proteína gp130 estava reduzida (-2,36 vezes), enquanto que o gene *OSM*, codificador da proteína Oncostatina M, apresentou expressão significativamente aumentada (5,9 vezes). Num estudo de avaliação de expressão gênica durante *P. falciparum*, também foi constatada aumentada expressão do gene OSM, um indutor de resposta Th17 (HU, 2013).

A proteína supressora SOCS3, além de promover a inibição da fosforilação de STAT3 mediada por IL-23 (impede a geração de células Th17 patogênicas), promove inibição da ativação de STAT4 induzida por IL-12, por se ligar à subunidade IL12Rβ2, que não é compartilhada pelo receptor IL-23R (CAROW; ROTTENBERG, 2014). Por outro lado, elevados níveis de SOCS3 também promovem forte polarização para células Th2 (TAMIYA et al., 2011).

Em relação à SOCS1, células Th17 requerem esta proteína supressora para inibir a ativação de STAT1 mediada por IFN-γ. Além disso, SOCS1 também regula negativamente STAT4. Ambas, STAT1 e STAT4, são fatores de transcrição necessários para a produção de IFN-γ (CAROW; ROTTENBERG, 2014). Além disso, SOCS1 pode ser considerada uma proteína supressora “guardiã” de Tregs, pois inibe STAT1 e impede a expressão de IFN-γ nessa subpopulação de células (TAMIYA et al., 2011). Sendo assim, a expressão gênica aumentada de SOCS1 pode estar relacionada com mais baixa produção de IFN-γ e mais elevados níveis de IL-10 observados pacientes *P. vivax* durante a fase aguda da infecção.

Embora não se tenha observado mudanças significativas na expressão de genes que codificam as diferentes STATs, é possível que as diferenças estejam no grau de ativação/fosforilação dessas moléculas. Na análise global de expressão gênica dos diferentes componentes da via JAK-STAT durante infecção por *P. vivax*, destaca-se a pronunciada expressão de SOCS3 (aproximadamente 13 vezes), uma proteína supressora de STAT1 e

STAT4, e ativadora/moduladora da ação de STAT3. Certamente, esses resultados requerem mais pesquisas, tal como avaliar o nível de fosforilação das STATs envolvidas no processo.

A via das MAPKs, em mamíferos, pode ser subdividida em 4 cascatas: JNK, p38, ERK1/2 e ERK5. A cascata JNK é ativada em resposta a estímulos de estresse induzido por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e estresse ambiental (radiação UV). A sinalização via receptores de membrana ativa pequenas GTPases da família Rho (Rac, Rho e CDC42) presentes na membrana celular. Uma vez ativadas, as GTPases ativam MAP3Ks, que irão fosforilar MAP2K4 e MAP2K7. Estas, por sua vez, irão fosforilar a proteína JNK (KUMAR et al., 2015).

Os resultados obtidos demonstraram reduzida expressão gênica da GTPase CDC42 (-2,25;  $p < 0,0001$ ), bem como da MAP2K4 (-2,15;  $p < 0,001$ ). Estes dados sugerem uma menor ativação da cascata de JNK em linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante infecção por *P. vivax*.

A cascata p38 também é ativada por fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e vários tipos de estresse ambiental, por meio da ação de TRAFs (*TNF receptor-associated factor*) ou de GTPases da família Rho (CUADRADO; NEBREDA, 2010). Ocorre então a ativação de MAP3Ks que irão fosforilar MAP2K3 e MAP2K6, responsáveis por transferir o grupamento fosfato para p38. A p38 também pode ser ativada pela MAP2K4 (CUADRADO; NEBREDA, 2010; RINCÓN; PEDRAZA-ALVA, 2003). Estudos experimentais demonstraram que a cascata p38 de MAPK não está envolvida na morte de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Entretanto, a inibição de p38 em camundongos resultou na diminuição da produção da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  por células Th1, bem como linfócitos T CD8<sup>+</sup> (RINCÓN; PEDRAZA-ALVA, 2003).

No presente estudo, além de reduzida expressão gênica da GTPase CDC42 e da MAP2K4, também foi observado redução na expressão gênica de MAP2K6 (-2,95;  $p < 0,0001$ ), o que poderia resultar em menor ativação da cascata p38 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Essa menor ativação da cascata p38 poderia contribuir para níveis plasmáticos reduzidos de IFN- $\gamma$  observados nos indivíduos infectados por *P. vivax*.

A ativação da RAS (proteína G), por meio de receptores de membrana, levam a ativação da quinase RAF que irá fosforilar MEK, ativando a cascata ERK1/2 (YU et al., 2015). Em linfócitos T, a ativação do TCR (receptor de célula T) causa aumento da ativação da cascata ERK, enquanto que a co-estimulação via CD28 é necessária para a ativação da cascata JNK (RINCÓN et al., 2001). Além disso, estudos sugerem que a cascata ERK não parece ser essencial para a produção de IL-2 ou proliferação de células T CD4<sup>+</sup>, entretanto, é necessária

para a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em perfil Th2, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (RINCÓN et al., 2001)

Em linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos infectados por *P. vivax*, foi observada redução na expressão gênica do gene BRAF (-2,28; p<0,01), responsável pela codificação da proteína RAF, sugerindo uma menor ativação de cascata ERK durante a infecção.

A cascata de ERK5 pode ser ativada por estresse oxidativo e hiperosmolaridade, entretanto não pode ser ativada por PDGF (*platelet-derived growth factor*) que é um forte estímulo para a cascata ERK1/2. ERK5 também é capaz de fosforilar os substratos da cascata ERK1/2, como Sap1a, c-Myc e RSK (NISHIMOTO; NISHIDA, 2006). Os substratos que podem ser fosforilados pela cascata ERK5 são: MEF2A, MEF2C, c-Fos, Fra-1, sapla, CREB, Ets-1 e Myc (PLOTNIKOV et al., 2011).

No presente estudo, não foi observada alterações na expressão gênica da cascata de sinalização de ERK5, entretanto a expressão de genes que codificam substratos dessa cascata, tais como CREB (-2,76; p<0,0001), Ets-1 (-2,36; p<0,001) e Myc (-2,09; p<0,01), estava reduzida. Esses três genes codificam proteínas que atuam como fatores de transcrição.

Durante a infecção por *P. vivax*, também foi observada redução na expressão gênica referente a genes codificadores de outros substratos da cascata JNK (ATF-2, p53 e Smad4), p38 (ATF-2, p53, Max e Myc) e ERK1/2 (p53 e Smad4).

Na análise da via de MAPK, apenas o gene *CDKN2A* estava com a expressão aumentada. Este gene codifica as proteínas p16 (INK4a) e p14 (ARF) que são potentes reguladoras do ciclo celular. A proteína p16 liga a duas outras proteínas (*cyclin-dependent kinases* - CDKs), CDK4 e CDK6, estimuladoras do ciclo para continuação da divisão celular (KRUG et al., 2002). A ligação da p16 a essas proteínas bloqueia a continuidade e progressão do ciclo celular. Já a proteína p14 impede que a p53 seja degradada.

A p53 é uma importante proteína reguladora de divisão celular, apoptose e também essencial para supressão de tumor, prevenindo sua formação. Os relatos existentes na literatura sobre o gene *CDKN2A* concentram em estudos relacionados a diversos tipos de câncer, inclusive leucemia linfoblástica (DE KEERSMAECKER et al., 2005).

Embora não existam relatos sobre a participação desse gene em apoptose de linfócitos, é possível sugerir que a aumentada expressão do gene *CDKN2A* em células T CD4<sup>+</sup> pode estar relacionada com esse fenômeno observado em pacientes infectados por *P. vivax* (HOJO-SOUZA et al., 2015).



Em resumo, a análise global da via de sinalização MAPK mostra que durante infecção por *P. vivax* ocorre uma supressão dessa via. A supressão de resposta proliferativa e de produção de IFN- $\gamma$  durante episódio de malária clínica em indivíduos de área endêmica sugere que repetidas infecções levam a uma adaptação benéfica para o hospedeiro, impedindo a ocorrência de imunopatologia. Entretanto, pode também representar uma estratégia induzida pelo parasito, permitindo sua sobrevivência e transmissão para outros indivíduos.

## APÊNDICE B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### Resumos em Anais de Congresso

❖ **XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul (2013) – Apresentação de Pôster**

**Título:** Infecção por *Plasmodium vivax* induz apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup>

**Autores:** HOJO-SOUZA, Natália Satchiko; PEREIRA, Dhelio Batista; MENDES, Tiago Antônio de Oliveira; PASSOS, Lívia Silva Araújo; GAZZINELLI-GUIMARÃES, Ana Clara; SOUTO, Élisson Carvalho; TADA, Mauro Shugiro; ZANINI, Graziela Maria; FUJIWARA, Ricardo Toshio; BUENO, Lilian Lacerda.

❖ **IV Encontro de Pesquisa em Parasitologia – Uma releitura do cenário atual (2013) – Apresentação de Pôster**

**Título:** Alteração na expressão de genes envolvidos na apoptose e indução de morte celular programada de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos naturalmente infectados por *Plasmodium vivax*

**Autores:** HOJO-SOUZA, Natália Satchiko; PEREIRA, Dhelio Batista; MENDES, Tiago Antônio de Oliveira; PASSOS, Lívia Silva Araújo; GAZZINELLI-GUIMARÃES, Ana Clara; GAZZINELLI-GUIMARÃES, Pedro Henrique; SOUTO, Élisson Carvalho; TADA, Mauro Shugiro; ZANINI, Graziela Maria; GAZE, Soraya Torres; BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira; FUJIWARA, Ricardo Toshio; BUENO, Lilian Lacerda.

❖ **13th International Congress of Parasitology (2014) – Apresentação Oral**

**Título:** CD4<sup>+</sup> T cells apoptosis in *Plasmodium vivax* infection is mediated by activation of both intrinsic and extrinsic pathways.

**Autores:** HOJO-SOUZA, Natália Satchiko; PEREIRA, Dhelio Batista; MENDES, Tiago Antônio de Oliveira; PASSOS, Lívia Silva Araújo; GAZZINELLI-GUIMARÃES, Ana Clara; GAZZINELLI-GUIMARÃES, Pedro Henrique; TADA, Mauro Shugiro; ZANINI, Graziela Maria; BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira; FUJIWARA, Ricardo Toshio; BUENO, Lilian Lacerda.

❖ **XXX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/XLI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease (2014) – Apresentação Oral**

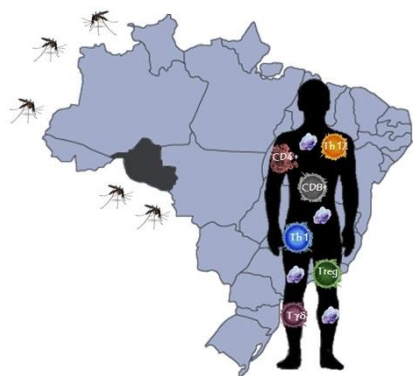
**Título:** *Plasmodium vivax*: profile of memory and naïve CD8 T Cell during infection.

**Autores:** HOJO-SOUZA, Natália Satchiko; PEREIRA, Dhelio Batista; PASSOS, Livia Silva Araújo; TADA, Mauro Shugiro; ZANINI, Graziela Maria; FUJIWARA, Ricardo Toshio; BUENO, Lilian Lacerda.

❖ **V Encontro de Pesquisa em Parasitologia: Novas Abordagens para Antigos Problemas (2014) – Apresentação de Pôster**

**Título:** Perfil de células T CD8<sup>+</sup> naïve e de memória durante infecção por *Plasmodium vivax*.

**Autores:** HOJO-SOUZA, Natália Satchiko; SANTOS, Jéssica Alves; PEREIRA, Dhelio Batista; PASSOS, Livia Silva Araújo; CARDOSO, Mariana Santos; TADA, Mauro Shugiro; ZANINI, Graziela Maria; FUJIWARA, Ricardo Toshio; BUENO, Lilian Lacerda.



---

**ANEXO**

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 27466214.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Ricardo Toshio Fujiwara  
Departamento de Parasitologia  
ICB- UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 09 de setembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "Aspectos da modulação da resposta imune induzida na infecção por *Plasmodium vivax*" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG