

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ANA LUIZA TEIXEIRA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T DE  
MEMÓRIA NA INFECÇÃO POR *Plasmodium vivax***

BELO HORIZONTE – MG

2013

ANA LUIZA TEIXEIRA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T DE  
MEMÓRIA NA INFECÇÃO POR *Plasmodium vivax***

Dissertação de Mestrado apresentado  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Parasitologia do Departamento de  
Parasitologia da Universidade Federal  
de Minas Gerais como pré-requisito  
para obtenção do grau de Mestre em

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. D<sup>ra</sup>. Érika Martins Braga

Co-Orientadora: D<sup>ra</sup>. Lilian Lacerda Bueno

BELO HORIZONTE – MG

2013

---

Trabalho realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) (Bolsa de Mestrado/2011-2012) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), processo número CBB 625/06, Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa (CNPq), processo número 471156/2010-8 e PronexMalaria, DECIT/MS (555646/2009-2).

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG em 10 de abril de 2007 (Parecer número ETIC 060/07).

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira.”

Rui Barbosa.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por seu amor infinito. Por ter me iluminado na realização deste projeto. Por ter me inspirado durante toda a trajetória e me dado forças para concluir. Por ter me amparado e jamais me deixado desistir. E por tudo que me proporciona na vida.

Aos meus pais que me ensinaram a dar os primeiros passos na estrada da vida e me incentivaram a perseguir meus próprios sonhos com afinho e dedicação. Aqueles que sempre acreditaram e confiaram em mim.

A Prof<sup>a</sup> Érika, minha orientadora, pelo exemplo profissional. Pela oportunidade no laboratório de malária, me abrindo os caminhos para o mundo da ciência.

Agradeço a Lilian, minha co-orientadora, de forma especial. Sua confiança, apoio, incentivo e orientação, me renderam um rico conhecimento e aprendizado científico, profissional e pessoal em todo esse tempo de convivência que levarei sempre comigo. Por todas as horas dedicadas, pelo carinho e paciência. Por acreditar na minha capacidade.

Ao Prof<sup>o</sup> Ricardo Fujiwara, pela colaboração, por ter me recebido no laboratório e ter me proporcionado um aprendizado rico e sólido. Por todas as discussões e sugestões.

Aos colegas do laboratório, pelo aprendizado através das reuniões científicas, do trabalho de bancada, pelo apoio ou simplesmente pela conversa informal e convivência prazerosa. Em especial a Patrícia Silveira e a Nayara que tornaram grandes amigas que levarei para a vida. Pela parceria de trabalho, por serem exemplo de profissional e pelo incentivo.

A turma do pepino por todos os momentos compartilhados, de conhecimento e diversão.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pelos ensinamentos.

A Sumara e Sibebe que sempre estiveram prontas a ajudar, a resolver sempre tudo da melhor forma.

A Fernanda pela acolhida, pelo apoio nos momentos difíceis e inquietantes decisões.

A Linsley e sua família, que tenho como minha de coração. Por estarem presentes sempre. Por cada gesto de carinho, atenção e de compreensão. Em especial a Helena, que veio nos alegrar ainda mais.

Aos amigos da célula com quem dividi momentos de angústia, aflição e também momentos de felicidade.

A Alessandra por todos os momentos da vida. Pela dedicação, apoio, carinho. Por tantas vezes ter me amparado, me ouvido e me aguentado.

A Ju que nos últimos anos tornou-se uma verdadeira amiga, irmã e confidente.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
1.INTRODUÇÃO.....	15
<b>1.1.Situação atual da malária</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2.Ciclo biológico dos plasmódios</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3.Plasmodium vivax</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4.Resposta imune inata e adaptativa na malária</b> .....	<b>24</b>
<b>1.5.1A heterogeneidade dos linfócitos de memória</b> .....	<b>29</b>
<b>1.5.2Linfócitos de memória na malária</b> .....	<b>33</b>
2.JUSTIFICATIVA.....	35
3.OBJETIVOS.....	37
<b>3.1.Objetivo geral</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2.Objetivos específicos</b> .....	<b>37</b>
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	38
<b>4.1.Área e população de estudo</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2.Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)</b> .....	<b>39</b>
<b>4.3.Congelamento descongelamento células mononucleares do sangue periférico</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4.Marcação celular de superfície com anticorpos monoclonais</b> .....	<b>40</b>
<b>4.5.Aquisição e análise por citometria de fluxo</b> .....	<b>41</b>
<b>4.6.Análise estatística</b> .....	<b>43</b>
5.RESULTADOS.....	44
<b>5.1.Caracterização dos indivíduos do estudo</b> .....	<b>44</b>
<b>5.2.Expressão de citocinas IFN-<math>\gamma</math> e IL-10 pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup></b> .....	<b>45</b>
<b>5.3.Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T</b> .....	<b>46</b>
<b>5.4.Subpopulações de CD45 produtoras de IFN-<math>\gamma</math> e IL-10</b> .....	<b>47</b>
<b>5.5.Correlação entre a expressão de citocinas, IFN-<math>\gamma</math> e IL-10 e o número absoluto de células de diferentes subpopulações de linfócitos T</b> .....	<b>49</b>
<b>5.6.A infecção por P. vivax induz o desenvolvimento de células de memória centrais ...</b>	<b>50</b>
<b>5.7.Associações entre células de memória e parâmetros clínicos associados morbidade</b>	<b>50</b>
6.DISSCUSSÃO.....	53
7.CONCLUSÕES.....	60
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9.ANEXO.....	79

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial da malária em 2010 (Adaptado de WHO, 2012)..... 16
- Figura 2.** Mapa de risco da malária no Brasil em 2009 indicando o número de municípios em cada uma delas (SIVEP, 2009). ..... 18
- Figura 3.** Ciclo Biológico do *Plasmodium vivax* (Adaptado de MUELLER et al., 2009)... 23
- Figura 4.** Índices populacionais de imunidade à malária por *P. falciparum*. Dados representativos de uma série de estudos em Kilifi, no Quênia. O padrão de idade e prevalência parasitária tanto malária clínica grave como em infecções assintomáticas. (Adaptado de Marsh & Kinyanjui, 2006). ..... 26
- Figura 5.** Resposta imune na malária: A célula dendrítica (CD) processa e apresenta epitopos do parasito. A produção de IL-12 pela CD ativa células NK, que produzem IFN-  $\gamma$  e induzem a diferenciação de linfócito T CD4<sup>+</sup>. A expansão clonal dos linfócitos específicos induz a ativação de NK, CD e macrófagos, amplificando a resposta imune adaptativa. Os macrófagos secretam NO e TNF. A ativação de linfócitos B específicos estimula a produção de anticorpos IgG. A regulação negativa da resposta imune inata e adaptativa envolve a participação das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ . (Adaptado de STEVENSON & RILEY, 2004.) 27
- Figura 6.** Mapa do Brasil evidenciando a localização da região de estudo no estado do Amazonas. .... 39
- Figura 7.** Estratégias de análise para fenotipagem celular. Células previamente presentes em gate de linfócitos (distribuição pontual de forward scatter x side scatter) foram analisadas em relação a sua fluorescência tipo I (CD4 FITC) e tipo III (CD45RO PE-Cy5). A frequência de linfócitos duplo positivos (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, gate retangular) que expressam CCR7 (A) ou CD62L (B) foram determinados por citometria de fluxo. .... 42
- Figura 8.** Perfil fenotípico da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 em células T CD4<sup>+</sup> em malária-naïve e pacientes infectados por *P. vivax*. Resultados foram expressos em números absolutos (células/mm<sup>3</sup>) de células T CD4<sup>+</sup> expressando (A) IFN-  $\gamma$  e (B) IL-10. .... 46
- Figura 9.** Análise de células T CD4<sup>+</sup> naïve e de memória por citometria de fluxo. Resultados expressos em número absoluto (células/mm<sup>3</sup>) de (A) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> e (B) CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup> de indivíduos negativos e infectados por *P. vivax*..... 47
- Figura 10.** Expressão de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 por células T CD 4<sup>+</sup> que expressam diferentes isoformas de CD45, naïve e de memória em indivíduos saudáveis não expostos à malária e pacientes infectados por *P. vivax*. Resultados foram expressos em números absolutos (cel/mm<sup>3</sup>) e as linhas representam a média de (A) CD45RA<sup>+</sup>IFN-  $\gamma$ , (B) CD45RO<sup>+</sup>IFN-  $\gamma$ , (C) CD45RA<sup>+</sup>IL-10 e (D) CD45RO<sup>+</sup>IL-10 em células T CD4<sup>+</sup>. .... 48
- Figura 11.** Correlação do número absoluto de IL-10 e IFN- $\gamma$  circulantes produzidas por T auxiliares em 64 pacientes com malária vivax. A análise estatística foi determinada por correlação de Pearson. .... 49
- Figura 12.** Análise por citometria de fluxo de células T CD4<sup>+</sup> central e efetora em malária-naïve e infectados por *P. vivax*. Expressão de CCR7 e/ou CD62L distingue dois subtipos de

células T: memória central ( $CD45RO^+CCR7^+/CD45RO^+CD62L^+$ ) ou memória efetora ( $CD45RO^+CCR7^-/CD45RO^+CD62L^-$ ). ..... 50

**Figura 13.** Correlação do número absoluto de  $CD4^+CD45RO^+CCR7^{+/-}$ ,  $CD4^+CD45RO^+CD62L^{+/-}$  (A e B) e  $CD4^+CD45RO^+IFN-\gamma$  e  $CD4^+CD45RO^+IL-10$  (C e D) e o número de parasitos no sangue periférico (parasitemia) nos pacientes com malária vivax. A análise estatística foi determinada por correlação de Pearson.....57

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Combinação dos anticorpos para a marcação de superfície celular e citocinas intracitoplasmáticas. .... 41

**Tabela 2:** Características epidemiológicas da população de estudo. Os pacientes incluídos neste estudo foram atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM), no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008. .... 44

**Tabela 3:** Valores médios dos parâmetros hematológicos (Média  $\pm$  SD) em indivíduos infectados por *P. vivax* e indivíduos controles não expostos à malária..... 45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AM - Amazonas

AMA-1 – Antígeno 1 da membrana apical

APCs – Células apresentadoras de antígenos

CCL – “Chemokine (C motif) ligand”/ ligante de quimiocinas com motivo C

CCR – “Chemokine (R motif) ligand”/ ligante de quimiocinas com motivo R

CD – “Cluster of differentiation”/grupamento de diferenciação

CSP – “Circumsporozoite Protein” / Proteína circum-esporozoíto

CXCL – “Chemokine (C-X-C motif) ligand”/ ligante de quimiocinas com motivo CXC

DC – Célula dendrítica

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

EBA 175 –

EBA 140 –

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FcγR – Receptor de IgG

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

Fsc – Forward Scatter/ Tamanho Relativo da Célula

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

HEV – “High Endothelial Venules” / Vênulas endoteliais altas

HGF – “Hepatocyte Growth Factor” / Fator de crescimento dos hepatócitos

HIV – “Human Immunodeficiency Vírus” / Vírus da imunodeficiência humana

HLA-DR – “Histocompatibility leukocyte antigen – Molecule DR”/ Molécula do complexo de histocompatibilidade principal de classe II

IFN-  $\gamma$  – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MFI – “Median Fluorescence Intensities” / Intensidade média de fluorescência

MSP – “Merozoite Surface Protein” / Proteína de superfície de merozoíto

NK – “Natural Killer”  
NO – Óxido nítrico  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OPAS – Organização Panamericana da Saúde  
PBMC – “Peripheral blood mononuclear cells” / Células mononucleares do sangue periférico  
PBS – Tampão fosfato salina  
PBS-P – Solução de PBS 1X, BSA, azida sódica e saponina utilizada para permeabilizar células em ensaios de imunofenotipagem  
PBS-W – Solução de PBS 1X, BSA e azida sódica utilizada para lavar células em ensaios de imunofenotipagem  
PCR – Reação da cadeia de polimerase  
PE – Ficoeritrina  
PE-Cy5 – Ficoeritrina conjugada com a molécula “cychrome 5”  
PfEMP-1 – “*P. falciparum* encoded erythrocyte membrane protein 1” / Proteína de membrana eritrocítica de *P. falciparum*  
PIACM - Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária  
RPMI – “Roswell Park Memorial Institute” / Meio de cultura celular  
SIVEP – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica  
Ssc – Side Scatter  
Th17 – Células auxiliaadoras produtoras de IL-17  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
TRAP – “Transmembrane Protein” / Proteína Adesiva relacionada a Trombospondina  
Treg – Células T reguladoras  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
WHO – “World Health Organization”/ Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

Há indicativos que a imunidade induzida durante a primeira infecção por *Plasmodium vivax*, espécie amplamente distribuída no mundo e prevalente no Brasil, leva a ativação de células T. Entretanto, a compreensão dos mecanismos imunes envolvidos na imunorregulação e imunopatologia na malária por esta espécie permanecem incompletas.

As células de memória são células de vida longa que surgem na resposta imune antígeno específica durante a expansão clonal e diferenciação dos linfócitos em resposta a uma estimulação antigênica.

Neste estudo avaliamos o perfil fenotípico de memória de linfócitos T de pacientes infectados naturalmente por *P. vivax* na Amazônia brasileira. Foram avaliados 65 pacientes residentes na área endêmica que apresentavam número variável de episódios prévios de malária por *P. vivax*. Como controles negativos, foram incluídos 22 indivíduos nunca expostos à malária oriundos de área não endêmica para a doença. Nossos resultados revelaram que indivíduos com malária vivax apresentaram aumento significativo das células T CD4<sup>+</sup> de memória (CD45RO<sup>+</sup>). Células de memória de pacientes infectados apresentaram um padrão de memória central, demonstrado pela expressão significativa de CCR7 e CD62L pelas células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>.

Nossos resultados mostraram que infecção por *P. vivax* induz a expressão significativa das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> bem como o aumento das concentrações das subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> e que a infecção por *P. vivax* induz a proliferação de células de memória centrais. Estes resultados apontam para a necessidade gerar informações básicas acerca dos mecanismos imunológicos na malária vivax que poderão subsidiar o desenvolvimento de futuras medidas de intervenção.

## ABSTRACT

There are indications that immunity induced during primary infection by *Plasmodium vivax*, a species widely distributed in the world and most prevalent in Brazil, leads to activation of T cells. However, the understanding of the immune mechanisms involved in immunoregulation and immunopathology of vivax still remains incomplete.

Memory cells are long lived and recruited during clonal expansion and differentiation of lymphocytes in response to antigenic stimulation.

In this study, we evaluate the phenotypic profile of memory T lymphocytes from *P. vivax* naturally infected patients from Brazilian Amazon. Sixty five patients living in endemic areas with variable number of previous episodes of malaria by *P. vivax* were assessed. As negative controls, 22 individuals from a non-endemic area were also evaluated. Our results demonstrated that individuals with vivax malaria showed a significant increase of circulating memory CD4<sup>+</sup> (CD45RO<sup>+</sup>) lymphocytes. Memory cells from infected patients showed a pattern of central memory, as demonstrated by differential expression of CCR7 and CD62L.

Our results showed that infection with *P. vivax* significantly induces expression of cytokines IFN- $\gamma$  and IL-10 by CD4 and increasing concentrations of cellular subpopulations CD4 CD45RA<sup>+</sup> and CD4 CD45RO<sup>+</sup> and that infection by *P. vivax* induces proliferation of central memory cells. These results point to the need to generate basic information about the immunological mechanisms in vivax malaria that may inform the development of future intervention measures.

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por um protozoário do filo Apicomplexa, família Plasmodidae, gênero *Plasmodium* que inclui várias espécies que parasitam diferentes hospedeiros vertebrados. Apenas cinco espécies parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* (de transmissão natural apenas na África) e, recentemente, *Plasmodium knowlesi*, uma espécie de *Plasmodium* que infecta naturalmente símios em regiões de florestas no sudoeste asiático. Diferente da malária causada pelas quatro espécies primeiramente citadas, a infecção pelo *P. knowlesi* possui caráter zoonótico. A infecção por essas espécies de *Plasmodium* tem suas características próprias, bem como diferença nas suas áreas de distribuição (COX-SINGH, 2012; SUBBARAO, 2011).

Embora tenha sido descrita há cerca de cento e vinte anos, a malária tem resistido a todas as formas de controle empregadas até hoje (WHO, 2004; GOOD *et al.*, 2005). A malária continua como um dos principais problemas de saúde nos países tropicais e subtropicais. É uma doença que pode acometer pessoas de todas as idades e é transmitida através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Se a doença não for tratada rapidamente com medicamentos eficazes, a malária muitas vezes pode ser fatal.

Dentre as cinco espécies, *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes no mundo, sendo o *P. falciparum* considerado a espécie de maior impacto global devido ao grande número de cepas resistentes a antimaláricos e aos altos níveis de mortalidade registrados principalmente no continente africano (WHO 2004). Apesar das infecções por *P. vivax* raramente resultarem em óbito, esta espécie não pode ser negligenciada, uma vez que, o número de casos de malária grave por *P. vivax* vem aumentando consideravelmente, bem como os relatos de cepas resistentes aos antimaláricos em diferentes partes do mundo (BAIRD *et al.*, 2004 e 2007; ANSTEY, 2009).

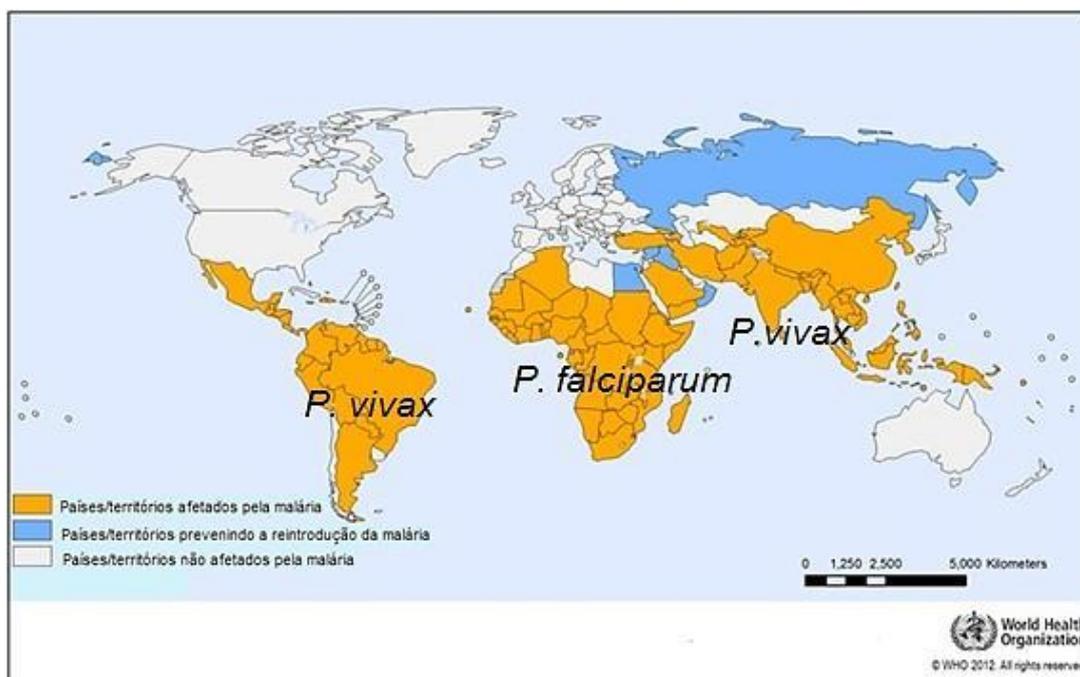
No Brasil, o maior número de casos é registrado na região Amazônica, cujas condições ambientais e socioculturais favorecem a expansão de sua transmissão. A grande extensão geográfica da área endêmica e as condições climáticas favorecem o desenvolvimento dos transmissores e agentes causais da malária pelas espécies de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (este último com menor frequência). A transmissão é

instável e geralmente focal, alcançando picos principalmente após o período chuvoso do ano (OMS, 2009).

A OMS recomenda que o diagnóstico precoce e tratamento rápido devam ser os primeiros elementos básicos estabelecidos em qualquer programa de controle da malária no mundo. Tratamento precoce e efetivo da malária pode evitar complicações posteriores, incluindo a maioria das mortes.

### ***1.1. Situação atual da malária***

A malária está presente em 99 países, dentre os quais a maioria se localiza em áreas tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais propiciam o desenvolvimento do parasito em insetos do gênero *Anopheles* (WHO 2013). Apenas cinco países (Nigéria, República Democrática do Congo, Uganda, Etiópia e Tanzânia) representam 50% das mortes e 47% dos casos de malária (WHO 2013).



**Figura 1. Distribuição mundial da malária em 2010 (Adaptado de WHO, 2012).**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 3,3 bilhões de pessoas estão em risco de contrair malária. A cada ano, cerca de 216 milhões de casos reportados da doença e quase um milhão de pessoas morrem. Os habitantes dos países mais pobres são os mais vulneráveis. Aproximadamente 86% das mortes por malária ocorrem nas crianças menores de cinco anos de idade e a maioria são da África Sub-

Saariana, sendo registrada nesta área, uma morte a cada 30 segundos (WHO, 2013). Representa, ainda, risco elevado para viajantes e migrantes, com casos importados em áreas não endêmicas. Perante esta situação, no final de 1990, a OMS propôs uma meta de controle da doença e alcançar a eliminação, até 2015, em áreas de baixa transmissão. Políticas, iniciativas internacionais e nacionais têm proliferado para ajudar os mais necessitados.

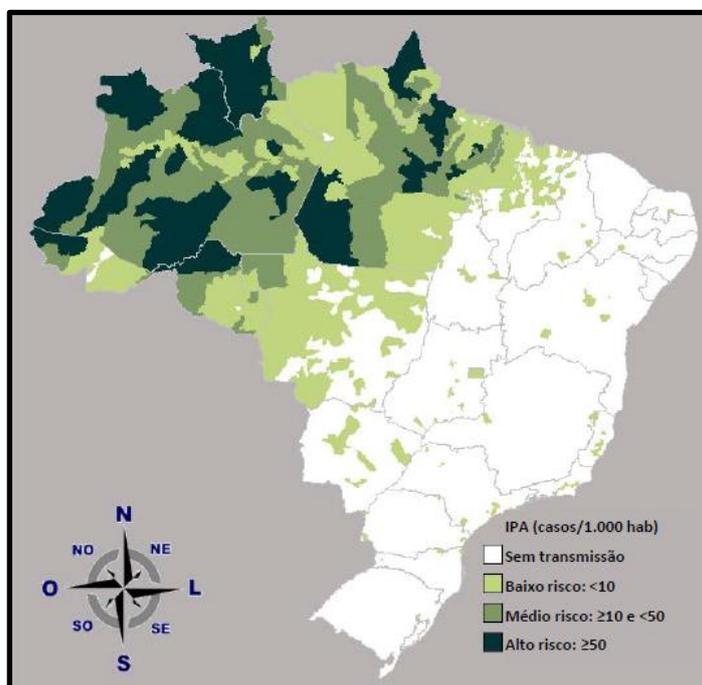
A maioria dos casos ocorre na África (86%), seguida pelo Sudeste Asiático (9%) e o leste do Mar Mediterrâneo (3%). Nas Américas, estima-se que aproximadamente 16% da população residem em áreas onde há algum risco de transmissão da doença (WHO 2010).

A malária causa uma perda média de 1,3% de crescimento econômico anual em países com transmissão intensa. Afeta desproporcionalmente marginalizados e pessoas pobres que tem acesso limitado a cuidados de saúde. Logo, existe uma associação entre a malária e a pobreza. O fardo financeiro da malária na África, por exemplo, tem sido estimado em cerca de US\$ 12 bilhões por ano. Esses custos estão relacionados à perda de produtividade devido à doença, redução na produtividade após retorno ao trabalho, tempo perdido com o cuidado dado ao paciente e custo desse cuidado, efeitos físicos da doença em longo prazo, entre outros (SACHS & MALANEY, 2002). Porém, uma vez que muitos pacientes não procuram e/ou não recebem ajuda médica, ou mesmo porque seu caso não é confirmado em laboratório, ou, ainda, porque não é incluído nas estatísticas dos governos (GREENWOOD *et al.*, 2008), torna-se complicado determinar este fardo mundial da malária. Entretanto, vários esforços têm sido desenvolvidos nesse sentido (SNOW *et al.*, 2001; GUERRA *et al.*, 2010).

No Brasil, embora tenha havido uma queda no número de casos de malária nos últimos anos conforme enfatizado anteriormente, o quadro epidemiológico desta doença ainda é preocupante na Amazônia Legal (Amazônia, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), área na qual se concentram 99,8% dos casos e 40 milhões de pessoas expostas à transmissão (Figura 1) foram notificados. Em toda a Amazônia, as infecções causadas pelo *P. vivax* (87%) prevaleceram sobre as do *P. falciparum* (12%) (SIVEP/ Ministério da Saúde, 2011).

No Brasil, onde a transmissão da malária não é completamente estável, de acordo com a incidência parasitaria anual (IPA) costuma-se classificar as áreas endêmicas como de alto risco (IPA>50/1.000 hab.), médio risco (IPA entre 10-49/1.000 hab.) e baixo risco (IPA<10/1.000 hab.). Mesmo nas áreas sem registro de casos de

malária, a existência do vetor torna-a vulnerável a transmissão quando da presença de um homem infectado e portador de gametócitos – o que explica o significativo número de novos focos de transmissão de malária em área extra-amazônica registrados nos últimos anos (Ministério da Saúde/SIVEP, 2009).



**Figura 2. Mapa de risco da malária no Brasil em 2009 indicando o número de municípios em cada uma delas (SIVEP, 2009).**

O programa de controle em operação atualmente no Brasil é o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM). Este programa tem como principal objetivo a redução da incidência e da taxa de mortalidade, além de eliminar a transmissão dentro de áreas urbanas das capitais brasileiras, e manter a ausência de transmissão em localidades onde a transmissão foi eliminada (COURA *et al.*, 2006; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Dados do Programa Nacional de Controle da Malária revelaram que, em 2009, apenas três estados, Amazonas, Pará e Rondônia, registraram, aproximadamente, 253 mil casos, valor esse que equivale a 78% das ocorrências (Ministério da Saúde/ SIVEP, 2010).

Entretanto, é na região extra-amazônica que se observa a maior letalidade da malária, seja devido ao diagnóstico tardio, seja devido ao manejo inadequado dos casos esporádicos importados de áreas endêmicas ou mesmo autóctone em poucos estados (Ministério da Saúde/ SIVEP, 2010).

A transmissão da malária está condicionada a fatores que permitem não só o surgimento de novas infecções como também a perpetuação do agente causal. Os fatores principais ou primários, cuja presença é essencial para a existência da infecção, consistindo da interação dos três seguintes fatores: o parasito, o hospedeiro humano e o vetor. E os fatores secundários atuam favorecendo ou dificultando a transmissão.

Apesar dos esforços a malária ainda é um grave problema de saúde pública no Brasil e o governo federal lançou no dia 05/09/2011 a campanha “Mobilização contra a malária” que tem por objetivo estimular o uso correto de mosquiteiros e conscientizar a população sobre a doença, a sintomatologia e o tratamento. Segundo a OMS, o controle da malária requer experiência e desenvolvimento de bases de dados contendo informações sobre os parasitos encontrados no local e informações sobre as mudanças nos níveis de transmissão e do estado de resistência aos antimaláricos.

### ***1.2. Ciclo biológico dos plasmódios***

O ciclo de vida do *Plasmodium sp.* é complexo e envolve dois hospedeiros: o mosquito (vetor e hospedeiro definitivo) e o vertebrado (hospedeiro intermediário) e pode variar dependendo da espécie do parasito e do tipo de hospedeiro, mas mantém um padrão básico em todos eles. Todos os plasmódios que parasitam o homem realizam o ciclo sexuado de desenvolvimento em fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*.

A infecção no homem tem início quando o anofelino infectado ao exercer seu repasto sanguíneo, juntamente com a saliva, inocula esporozoítos na circulação sanguínea e/ou no tecido subcutâneo do hospedeiro. Foi observado que a maioria dos esporozoítos permanece na derme por uma hora após a inoculação. Redução significativa no número de esporozoítos na derme foi observada três horas após a infecção, sugerindo duas possibilidades: a migração dos esporozoítos do sítio de inoculação e/ou a destruição dos parasitos pelas células de defesa do hospedeiro (YAMAUCHI *et al.*, 2007). Os esporozoítos podem atingir os linfonodos e se desenvolver em formas exo-eritrocíticas, porém, essas formas são posteriormente degradadas por leucócitos. (AMINO *et al.*, 2006).

Imagem intravital de esporozoítos de *P. berghei* confirmou que os esporozoítos que foram injetados na pele de camundongos exibem motilidade vigorosa (VANDERBERG *et al.*, 2004). Dos esporozoítos que deixaram o local da picada de mosquito, aproximadamente 70% foram encontrados em percurso sanguíneo e

aproximadamente 30% na via linfática (AMINO *et al.*, 2006). Estes últimos cessaram a sua jornada no primeiro linfonodo de drenagem, em que a maioria morre dentro de algumas horas, embora alguns tenham desenvolvido, pelo menos parcialmente, (AMINO *et al.*, 2006).

GUEIRARD e colaboradores (2010) mostraram que roedores infectados *P. berghei* e *P. yoelii*, os parasitos podem sofrer esquizogonia exoeritrocítica completa, não apenas dentro de hepatócitos, mas também dentro de células da derme. No entanto, embora merozoítos infectantes de *P. berghei* liberados e em movimento na derme possam, ocasionalmente, invadir eritrócitos de roedores, e, portanto, constituir um reservatório potencial secundário de merozoítos infecciosos, merozoítos derivados da pele não contribuem significativamente para a infecção dos eritrócitos em condições normais.

No fígado, antes de invadirem um hepatócito, os esporozoítos migram por várias células. Algumas células são capazes de reparar o dano enquanto outras morrem por necrose em poucos minutos (MOTA *et al.*, 2001). O processo de transmigração dos esporozoítos parece ser um evento primordial para o ciclo de vida dos plasmódios, pois induz a secreção de fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), que torna tais células mais susceptíveis à infecção (CARROLO *et al.*, 2003). Várias proteínas de *Plasmodium* parecem desempenhar um papel crucial nessa interação entre parasito e célula hospedeira. A proteína circum-esporozoíto (CS), por exemplo, abundante na superfície do esporozoíto e presente em todas as fases do parasito, parece interagir com os proteoglicanos de heparan-sulfato presentes no hepatócito, facilitando a internalização do parasito (PRUDÊNCIO *et al.*, 2006; EJIGIRI & SINNIS, 2009). Outras proteínas, como o antígeno 1 da membrana apical (AMA-1) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP), também presentes em todas as fases, ambas localizadas nos micronemas, também merecem destaque. A AMA-1 participa na reorientação do parasito, permitindo o estabelecimento de um contato íntimo entre o polo apical e a célula hospedeira, evento esse que culmina na formação da junção móvel (MITCHELL *et al.*, 2004). A TRAP, por sua vez, é liberada na superfície do parasito durante a invasão e se associa a receptores do hospedeiro, de forma a facilitar a motilidade e a invasão (SOLDATI *et al.*, 2004).

Após a invasão dos hepatócitos, os esporozoítos se multiplicam por reprodução assexuada dando origem a milhares de merozoítos (ciclo exo-eritrocítico). O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P.*

*falciparum* e *P. vivax*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, ocorrem formas que ficam em estado de latência no hepatócito, os chamados hipnozoítos, responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação.

Os merozoítos formados durante a fase exo-eritrocítica são liberados do fígado para a corrente sanguínea por meio de estruturas vesiculares denominadas merossomos (STURM *et al.*, 2006). Estes merossomos deslocam-se pelos sinusóides hepáticos garantindo que a liberação de merozoítos vivos ocorra diretamente na circulação sanguínea.

Foi demonstrado que os hepatócitos parasitados entram em processo de morte celular, mas, no entanto, não são fagocitados pelas células de Kupffer e/ou outras células fagocíticas presentes nos sinusóides hepáticos. A capacidade dos fagócitos de reconhecerem distintamente células viáveis de células apoptóticas depende, pelo menos em parte, da exposição de resíduos de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática de células em apoptose (FADOK *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2003). STURN e colaboradores em 2006 demonstraram que as membranas dos hepatócitos infectados, da mesma forma que observado em hepatócitos não infectados, não apresentam resíduos de fosfatidilserina em suas camadas externas, evitando, portanto que as células hepáticas infectadas sejam reconhecidas pelas células do sistema imune. Um dos sinais necessários para a inversão dos resíduos de fosfatidilserina é o aumento da concentração de cálcio no citoplasma da célula a partir da liberação de íons de  $Ca^{2+}$  presente em estoques internos (STURM *et al.*, 2006). Os merozoítos intra-hepáticos consomem o cálcio intracelular e previnem desta forma, a exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática de hepatócitos parasitados, protegendo-os assim da fagocitose por células de Kupffer e outras células fagocíticas presentes nos sinusóides hepáticos (STURM *et al.*, 2006). Dessa forma, não há ruptura do hepatócito para a liberação dos merozoítos, estes escapam do sistema imune, evitam a fagocitose pelos macrófagos residuais e asseguram a entrada direta na circulação.

Estima-se que cada hepatócito parasitado libera até 40.000 merozoítos (NARDIN *et al.*, 1993; GOOD *et al.*, 2005), que infectarão eritrócitos e começarão um novo ciclo de reprodução assexuada, levando a uma lise das células vermelhas a cada 48 a 72 horas (ciclo eritrocítico) de acordo com a espécie de plasmódio envolvida. Esse sincronismo é o que causa o cenário de febres cíclicas em infecções estabelecidas.

O ciclo eritrocítico inicia quando os merozoítos tissulares invadem os eritrócitos. O primeiro contato é um passo crucial, uma vez que o parasito precisa distinguir, dentre

os eritrócitos, aqueles competentes para a invasão. Essa interação envolve o reconhecimento de receptores específicos. O *P. vivax* invade reticulócitos e depende da interação com o antígeno/receptor Duffy para quimiocinas, ao passo que, *P. falciparum* invade hemácias de todas as idades e essa interação envolve proteínas da superfície de merozoíto que se ligam às sialoglicoproteínas da membrana do eritrócito, bem como às glicoforinas A e C (HANS *et al.*, 2005; MILLER *et al* 2002).

O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito segue duas vias distintas: multiplicação assexuada por esquizogonia originando merozoítos sanguíneos que invadirão novos eritrócitos ou diferenciarão em estágios sexuais, denominados gametócitos, que irão evoluir no mosquito vetor dando origem aos esporozoítos.

O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, conduzindo à lise de eritrócitos e sendo responsável pelas manifestações clínicas e processos patogênicos associados à doença. A ruptura de esquizontes eritrocitários é normalmente acompanhada por episódios de febre, náuseas, dores de cabeça e outros sintomas em resposta às citocinas pró-inflamatórias sistêmicas. Desta maneira, pode-se dizer que durante o ciclo de desenvolvimento no hospedeiro vertebrado, o parasito pode, portanto, ser alvo da resposta imune em maior ou menor grau em função do seu estágio de desenvolvimento. Mas é durante o ciclo eritrocítico que, fundamentalmente, o sistema imune do hospedeiro responde aos antígenos parasitários levando à resposta imune efetiva contra o parasito ou à imunopatologia.

Os gametócitos ao serem ingeridos por anofelinos durante o repasto sanguíneo iniciam o ciclo sexuado do parasito (esporogônico) no estômago do mosquito, que inclui a liberação de gametas masculinos e femininos e a sua fusão, com formação do ovo (zigoto). Este se transforma em uma forma móvel (ocineto) que migra até a parede do intestino médio do inseto, atravessa o epitélio intestinal, diferencia-se em oocisto, do qual se desenvolverão os esporozoítos. O tempo requerido para que se complete o ciclo esporogônico nos insetos varia com a espécie de *Plasmodium* e com a temperatura, situando-se geralmente em torno de 10 a 12 dias. Os esporozoítos produzidos nos oocistos são liberados na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares, de onde são transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo.

### 1.3. *Plasmodium vivax*

O *P. vivax* é a espécie mais amplamente distribuída no mundo (GUERRA *et al.*, 2010) com 2,6 bilhões de pessoas em situação de risco no Sul da Ásia, Sudeste Asiático, América do Sul e Central (HAY *et al.*, 2004). É o parasito da malária mais comum e foi até meados do século 20 em quase todo o mundo habitado, com exceção da África Ocidental e Central (MENDIS *et al.*, 2001).

Durante o seu desenvolvimento, o *P. vivax* apresenta um estágio dormente no fígado chamado hipnozoíto. Após os esporozoítos entrarem nos hepatócitos nem todos irão desenvolver-se em esquizontes, alguns permanecerão como formas dormentes (MUELLER *et al.*, 2009) (Figura 3). Os hipnozoítos podem permanecer dormentes por meses ou mesmo anos, e o mecanismo responsável pela dormência ou ativação não são conhecidos. *P. falciparum* e *P. malariae* não apresentam tal estágio dormente no fígado. Entretanto, cabe ressaltar que os gametócitos de *P. falciparum* podem sobreviver no sangue por meses (SMALLEY & SINDEN, 1977) e *P. malariae* pode causar infecções crônicas de longa duração, que podem reaparecer décadas após a exposição inicial (MUELLER *et al.*, 2009).

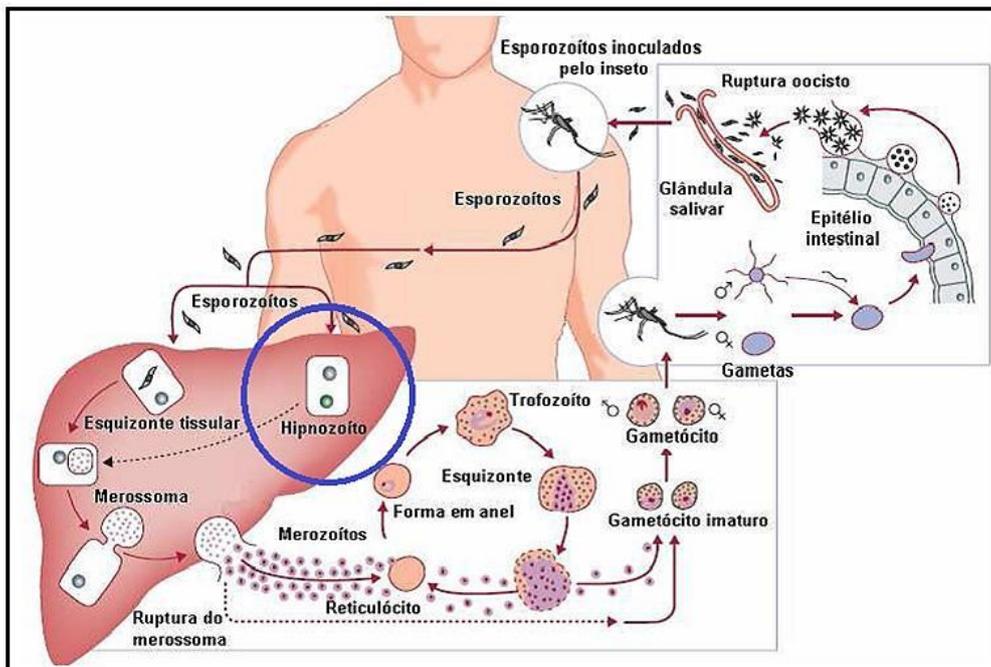


Figura 3. Ciclo Biológico do *Plasmodium vivax* (Adaptado de MUELLER *et al.*, 2009).

Estudos realizados em diferentes locais do mundo têm mostrado que a infecção por *P. vivax* pode causar manifestações graves, incluindo falência renal, síndrome

respiratória e anemia grave, mostrando que a malária vivax não é tão benigna como se considerava (KOCHAR *et al.*, 2005; ANSTEY *et al.*, 2009).

Para agravar a situação, tem sido relatada em vários países a ocorrência de cepas resistentes às principais drogas utilizadas no tratamento, e o desenvolvimento de novos fármacos se torna um obstáculo diante da ausência de um sistema de cultivo *in vitro* para *P. vivax* (BAIRD *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, tem sido observado no Brasil um crescimento expressivo no número de pacientes com essa infecção que necessitam de admissão hospitalar, sugerindo que essa tendência pode ser devido ao aumento na gravidade das infecções provocadas por esse parasito (ALEXANDRE *et al.*, 2009).

#### ***1.4. Resposta imune inata e adaptativa na malária***

A resposta imune inata é essencial não somente para limitar a fase inicial de multiplicação do parasito como também a primeira onda de parasitemia, controlando a infecção até que a imunidade adaptativa seja estabelecida (STEVENSON *et al.*, 2004). Dentre os componentes envolvidos na imunidade inata se encontram as células “Natural Killer” (NK), os macrófagos e as células dendríticas. Na resposta imune inata, as células NK representam uma importante fonte inicial de IFN- $\gamma$  e são responsáveis pela eliminação do parasito devido aos processos de citotoxicidade desencadeados em resposta ao parasito (OJO-AMAIZE *et al.*, 1984; DOOLAN *et al.*, 1999; ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2002). Durante a infecção por *Plasmodium*, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos, os macrófagos apresentam um importante papel devido a sua habilidade de fagocitar eritrócitos infectados na ausência de anticorpos específicos citofílicos e/ou opsonizantes, em uma interação envolvendo o receptor de superfície CD36 e a proteína PfEMP-1 (*P. falciparum* encoded erythrocyte membrane protein 1) (SERGHIDES *et al.*, 2003).

O papel protetor das células NK na infecção de malária é suportado pela descoberta de que estas células destroem eritrócitos infectados com *P. falciparum* através do contato direto (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2002; MAVOUNGOU *et al.*, 2003).

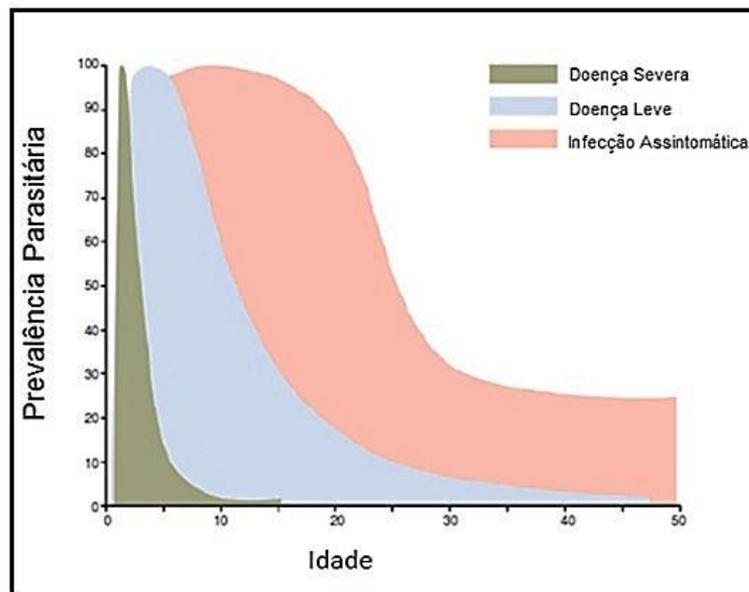
As células dendríticas iniciam a resposta imune adaptativa promovendo o estímulo de células T e B. Além disso, apresentam papel essencial na ligação da resposta imune inata e adaptativa. BUENO e colaboradores em 2009, demonstraram que

indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax* apresentaram uma modulação negativa de moléculas apresentadoras de antígenos (CD1a, HLA-DR e HLA-ABC). Essa modulação pode estar diretamente relacionada com a presença do eritrócito infectado (URBAN *et al.*, 1999; URBAN *et al.*, 2001; OCANA-MORGNER *et al.*, 2003). Ao contrário do descrito para *P. falciparum*, em que o cultivo *in vitro* do parasito já se apresenta bem estabelecido, nenhuma conclusão específica sobre os fatores ou moléculas de *P. vivax* responsáveis por desencadear esse estado de modulação das células dendríticas pode ser definido.

Em regiões de transmissão intensa e estável, onde o *P. falciparum* é espécie predominante, os recém-nascidos são resistentes à infecção durante os primeiros três meses de vida. Essa resistência tem sido atribuída principalmente à transferência passiva de anticorpos protetores IgG da mãe imune para o feto durante a gestação (SEHGAL *et al.*, 1989; CHIZZOLINI *et al.*, 1991; HOGH *et al.*, 1995). Com o passar da idade, os sintomas clínicos da doença são menos pronunciados, embora os indivíduos possam apresentar altas parasitemias sanguíneas (EGAN *et al.*, 1996). Em adultos, observa-se parasitemia baixa, mostrando um equilíbrio da relação parasito-hospedeiro e refletindo um estado de premunicação que pode ser bem observado em áreas onde a malária é holo-hiperendêmica (DRUILHE & KHUSMITH, 1987) (Figura 4).

Semelhantes padrões de doença, dependentes da idade, são também observados para *P. vivax*. Em áreas de alta endemicidade, como Nova Guiné, o risco de doença grave por *P. vivax* é maior entre crianças com menos de 2 anos de idade (GENTON *et al.*, 2008; TJITRA *et al.*, 2008), enquanto doença não complicada por *P. vivax* é raro entre crianças com mais de 5 anos (MICHON *et al.*, 2007; GENTON *et al.*, 2008). É interessante notar que em comparação com *P. falciparum*, a prevalência de infecção por *P. vivax* apresenta picos nas idades mais jovens (GENTON *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2001; KASEHAGEN *et al.*, 2006), contribuindo proporcionalmente menos para a carga de doença febril (COX *et al.*, 1994), em crianças mais velhas, adolescentes e adultos o risco de complicações graves diminui com a idade (GENTON *et al.*, 2008; TJITRA *et al.*, 2008).

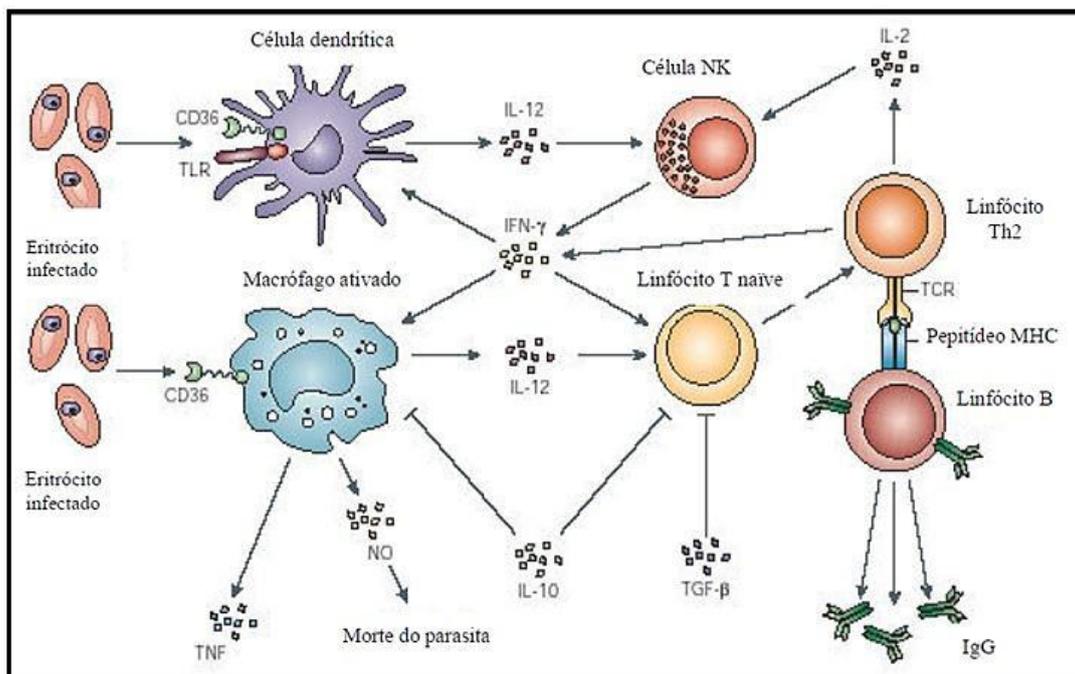
De uma maneira geral, a imunidade naturalmente adquirida é parcialmente cepa-específica e leva primeiramente a uma redução da taxa de mortalidade e da incidência de complicações e, mais tarde, a um decréscimo da incidência da doença. Por último, essa imunidade naturalmente adquirida leva a uma queda da parasitemia a níveis baixos ou mesmo níveis indetectáveis (WEBSTER & HILL, 2003).



**Figura 4. Índices populacionais de imunidade à malária por *P. falciparum*. Dados representativos de uma série de estudos em Kilifi, no Quênia. O padrão de idade e prevalência parasitária tanto malária clínica grave como em infecções assintomáticas. (Adaptado de Marsh & Kinyanjui, 2006).**

A resposta imune contra *Plasmodium* ainda pode ser desenvolvida especificamente contra cada um dos estágios do parasito (GOOD *et al.*, 2005). As formas sanguíneas dos plasmódios são as responsáveis pelas manifestações patológicas da doença, uma vez que os sintomas são decorrentes do desenvolvimento parasitário durante o ciclo assexuado sanguíneo. No estágio eritrocítico, potenciais alvos de uma resposta imune são os merozoítos livres ou parasitos intra-eritrocitários. Neste estágio, a eliminação do parasito parece ocorrer após desenvolvimento de uma resposta específica de anticorpos a antígenos variantes de superfície (GOOD *et al.*, 2005). Evidências mostraram que pelo menos dois mecanismos estão envolvidos; a participação de anticorpos opsonizantes que promovem a fagocitose de eritrócitos infectados (GARRAUD *et al.*, 1989; GARRAUD *et al.*, 1994) e a presença de anticorpos citofílicos (subclasses IgG1 e IgG3, em humanos) que promovem a inibição do crescimento do parasito intra-eritrocítico em associação com monócitos (DRUILHE & KHUSMITH, 1987; LUNEL & DRUILHE, 1989). Entretanto, apesar dos anticorpos contra as formas sanguíneas serem um importante fator na eliminação do parasito, a imunidade mediada por células contribui fortemente nesse processo (GOOD *et al.*, 2005).

POMBO e colaboradores (2002) descreveram a resposta celular obtida em voluntários não imunes após inóculo de doses ultrabaixas de formas sanguíneas do parasito, observando resposta proliferativa de células T envolvendo células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e, ainda, uma produção de citocinas, primariamente de IFN- $\gamma$ , consistindo em uma resposta imunológica do tipo Th1. De fato, IFN- $\gamma$  e células T CD4<sup>+</sup> são capazes de ativar macrófagos que fagocitariam eritrócitos infectados e merozoítos livres (Figura 5) (revisto por STEVENSON & RILEY, 2004).



**Figura 5. Resposta imune na malária:** A célula dendrítica (CD) processa e apresenta epítopos do parasito. A produção de IL-12 pela CD ativa células NK, que produzem IFN- $\gamma$  e induzem a diferenciação de linfócito T CD4<sup>+</sup>. A expansão clonal dos linfócitos específicos induz a ativação de NK, CD e macrófagos, amplificando a resposta imune adaptativa. Os macrófagos secretam NO e TNF. A ativação de linfócitos B específicos estimula a produção de anticorpos IgG. A regulação negativa da resposta imune inata e adaptativa envolve a participação das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ . (Adaptado de STEVENSON & RILEY, 2004.)

As células T, durante o reconhecimento de antígenos, podem estimular a ativação de células B e de macrófagos. Em estudo realizado com camundongos infectados por *P. berghei*, a depleção de células T resultou na recrudescência da doença em poucos dias, mostrando que estas células são cruciais para a manutenção da subpatência. Além disso, a afinidade e a efetividade das células T aumentaram durante a infecção por *P. berghei* (BROWN *et al.*, 1976).

Estudos recentes aprimorados mostram populações de células T efectoras durante infecção por *P. vivax* (SALWATI *et al.*, 2011). No entanto, as células T citotóxicas foram mostradas a desempenhar um papel menor nos casos de malária murina, especialmente na fase pré-eritrocítica (TSUJI 2010). Portanto, espera-se que a exposição regular ao *P. vivax* possa manter células T citotóxicas em controle nos indivíduos não infectados expostos à malária.

Todos os clones de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produziram IFN- $\gamma$  após estimulação antigênica, o que sugere que estas células estão envolvidas na proteção contra a malária, pois o IFN- $\gamma$  pode ativar macrófagos capazes de eliminar o *Plasmodium*. Todos os clones responderam aos antígenos na presença da célula apresentadora de antígeno apropriada, mostrando que as respostas foram restritas ao MHC (SINIGAGLIA *et al.*, 1985).

Existem evidências de que a imunidade protetora na malária seja mediada pela ativação de citocinas do tipo Th1, tais como IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ . A produção de IFN- $\gamma$  esta relacionada com a maior proteção da maioria dos modelos animais expostos ao parasito, visto que esta citocina tem a capacidade de ativar macrófagos, os quais produzem reativos de oxigênio e intermediários de nitrogênio, substâncias tóxicas necessárias para a eliminação dos estágios sanguíneos dos parasitos da malária. O IFN- $\gamma$  inicia a resposta imune celular, contribuindo para a eliminação de patógenos intracelulares (TORRE *et al.*, 2002).

A citocina IL-10 é importantes na regulação das respostas imunes do tipo Th1, porém é responsável pela diminuição da síntese de IFN- $\gamma$ . Existem evidências de que a ausência de IFN- $\gamma$  e a presença de IL-10 medeiam à inibição da resposta Th1 em neonatos cujas mães tiveram malária (BRUSTOSKI *et al.*, 2005). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida tardiamente por células Th2, células T CD8<sup>+</sup>, monócitos e células B ativadas. Em processos infecciosos causados por *P. falciparum*, ocorre um aumento na produção de IL-10 quando a parasitemia está elevada (NUSSENBLATT *et al.*, 2001).

A presença de IL-10 também atua prevenindo os danos teciduais desencadeados pela inflamação, devido à participação dos macrófagos na malária cerebral (MALAGUARNERA & MUSUMECI, 2002). A presença de IL-10 suprime a geração de uma resposta do tipo Th1 por meio da inibição da expressão de MHC de classe I e II,

diminuindo a participação das células apresentadoras de antígeno (BRUSTOSKI *et al.*, 2005).

Em indivíduos infectados por *P. vivax* ou por *P. falciparum* que foram submetidos a tratamento com drogas antimaláricas, observou-se rápida diminuição de citocinas Th2 e aumento concomitante da expressão de citocinas Th1, estas últimas necessárias para a eliminação do parasito intracelular (PERKMANN *et al.*, 2005).

Estudos indicam que diferentes perfis de citocinas específicas estão associados a diferentes síndromes clínicas (PRAKASH *et al.*, 2006): anemia grave tem sido associada à resposta relativamente baixa de IL-10 (KURTZHALS *et al.*, 1998), enquanto a dificuldade respiratória tem sido associada à uma quantidade anormal de IL-10 (AWANDARE *et al.*, 2006). Além disso, foi observada também uma alta concentração da atividade da enzima óxido nítrico sintase em células mononucleares do sangue periférico em indivíduos subsequentemente desafiados com o parasito (POMBO *et al.*, 2002). Sendo assim, a imunidade adquirida contra os estágios sanguíneos pode reduzir ou eliminar os parasitos e, conseqüentemente, as manifestações clínicas da doença.

Alguns dos maiores obstáculos para indução de uma resposta imune protetora incluem o polimorfismo antigênico, o reconhecimento limitado de antígenos, a inibição da função de células dendríticas e a apoptose de células T e B efetoras ou de memória.

Embora vários avanços tenham sido alcançados permitindo a compreensão de muitos aspectos da resposta do hospedeiro ao *Plasmodium*, o entendimento do processo de desenvolvimento da imunorregulação e imunopatologia na malária permanece incompleto, principalmente nas infecções por *P. vivax*. As células dendríticas, células T, e a própria produção de citocinas imunossupressoras podem ter papel fundamental nessa regulação da resposta imune pró-inflamatória exacerbada que ocorre em indivíduos que desenvolvem malária grave (RILEY *et al.*, 2006; BEJON *et al.*, 2007; WYKES *et al.*, 2007a; WALTHER *et al.*, 2009; HANSEN *et al.*, 2010). Portanto, para aumentar as chances de desenvolver vacinas eficazes e outras imunoterapias potenciais é preciso compreender como estes mecanismos ocorrem e as pessoas se tornam imunes à malária.

### ***1.5.1 A heterogeneidade dos linfócitos de memória***

As células de memória são células de vida longa que surgem na resposta imune antígeno específica, após estímulo por uma dado antígeno, durante a expansão clonal e

diferenciação dos linfócitos em resposta a uma estimulação (AHMED & GRAY, 1996). Os linfócitos de memória conferem proteção imediata em casos de reexposição ao antígeno gerando uma resposta qualitativa e quantitativamente aumentada comparada àquela oriunda das células *naive* (AHMED & GRAY, 1996).

Embora os mecanismos de geração e manutenção das células de memória ainda não estejam completamente esclarecidos, a importância destas células para a resposta imune advém do fato delas persistirem por tempo prolongado no hospedeiro e serem prontamente ativada nos casos de reestimulação pelo patógeno, resultando em intensa proliferação e levando à ativação de outras células da resposta imune. Disto resultam respostas efetivas mediadas por estas células, as quais são capazes de secretar citocinas rapidamente em resposta ao estímulo antigênico previamente conhecido (BUTCHER & PICKER, 1996; revisado por DUTTON *et al.*, 1998; APPAY *et al.*, 2002; WHERRY *et al.*, 2003).

De particular interesse, as células T de memória e *naive* apresentam diferenças entre si quanto à expressão do antígeno leucocitário comum, o CD45. O CD45 é uma tirosina fosfatase envolvida na transmissão de sinais entre células T e B (TROWBRIDGE & THOMAS, 1994). Diferentes isoformas desse antígeno são expressas na superfície dos linfócitos T durante o processo de diferenciação celular. A isoforma CD45RA é típica de linfócitos T *naive* e a isoforma CD45RO está associada aos linfócitos T de memória (MICHIE *et al.*, 1992). Além do CD45, duas outras moléculas de superfície são também capazes de distinguir linfócitos T *naive* e de memória: o CD62L e o CCR7. Estas moléculas são necessárias para a entrada das células T nos linfonodos através das vênulas endoteliais altas (HEV). O CD62L é uma selectina responsável pela interação dos linfócitos com outros leucócitos com endotélio das HEV (CAMPBELL *et al.*, 1998). O CCR7 é o receptor de quimiocinas CCL19 e CCL21 expressas nas HEV nos locais de entrada dos linfócitos para os linfonodos (FORSTER *et al.*, 1999). A totalidade dos linfócitos T *naive* apresenta altos níveis de ambas as moléculas, enquanto alguns linfócitos de memória perdem a expressão do CD62L e/ou do CCR7 (SALLUSTO *et al.*, 1999).

Estas moléculas têm recebido considerável atenção a partir de estudos mostrando que células T humanas poderiam ser divididas, com base na expressão do CD62L e do CCR7, em duas subpopulações: CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> e CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> (SALLUSTO *et al.*, 1999). Estas subpopulações foram respectivamente denominadas de células de memória central (T<sub>CM</sub>) e células de memória efetora (T<sub>EM</sub>) (SALLUSTO *et*

*al.*, 1999).  $T_{CM}$  e  $T_{EM}$  foram inicialmente definidos no sistema humano com base em dois critérios distintos: (a) a presença ou ausência de função efetora imediata e (b) a expressão dos receptores de “homing” que permitem que as células migrem para órgãos linfóides secundários contra os tecidos não linfóides (SALLUSTO *et al.*, 1999).  $T_{CM}$  são células de memória  $CD45RO^+$  que expressam constitutivamente CCR7 e CD62L, dois receptores, que são também características das células T *naive*, que são necessários para o extravasamento de células através das HEV e da migração de áreas de células T dos órgãos linfóides secundários (CAMPBELL *et al.*, 1998; FORSTER *et al.*, 1999). Quando comparado com as células T *naive*, as  $T_{CM}$  têm maior sensibilidade à estimulação antigénica, são menos dependentes de co-estimulação, e regulam a CD40L, em maior medida, assim fornecendo realimentação estimuladora mais eficaz para as células dendríticas (DC) e células B. As  $T_{CM}$  produzem principalmente IL-2, mas depois da eficiente proliferação se diferenciam em células efectoras e produzem grandes quantidades de IFN- $\gamma$  ou IL-4.  $T_{EM}$  são células de memória, que perderam a expressão constitutiva de CCR7, são heterogêneas para a expressão CD62L, e exibem conjuntos característicos de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão que são necessários para “homing” para os tecidos inflamados. Quando comparado com  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$  são caracterizadas por função efetora rápida.  $T_{EM}$  CD8 transportam grandes quantidades de perforina e tanto  $CD4^+$  quanto  $CD8^+$  produzem IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 dentro de horas após a estimulação antigénica.

GEGINAT e colaboradores (2003) identificaram uma terceira subpopulação de linfócitos T  $CD8^+$  de memória efetora humana. Essa subpopulação possui alta expressão da molécula CD57 que é um marcador de células terminalmente diferenciadas (BETTS *et al.*, 2003), sendo designada de células de memória efetora altamente diferenciadas ( $T_{EMRA}$ ) (GEGINAT *et al.*, 2003). Uma população com este mesmo fenótipo foi identificada (HARARI *et al.*, 2004) no pool de células de memória T  $CD4^+$ , através de estudos do padrão das respostas de células T  $CD4^+$  de memória sob diferentes condições de persistência e carga do antígeno utilizando lisados de Citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus Herpes Simplex (HSV), além de toxóide tetânico e Gag p55 do HIV-1.

As proporções relativas de  $T_{CM}$  e  $T_{EM}$  no sangue variam nos compartimentos das células  $CD4^+$  e  $CD8^+$ ;  $T_{CM}$  é predominante nas células  $CD4^+$  e  $T_{EM}$  em  $CD8^+$ . Dentro dos tecidos, no entanto,  $T_{CM}$  e  $T_{EM}$  mostram padrões característicos de distribuições.

T<sub>CM</sub> são ricas nos nódulos linfáticos e nas amígdalas, enquanto pulmão, fígado, intestino contêm proporções maiores de T<sub>EM</sub> (CAMPBELL *et al.*, 2001).

Célula T CD4<sup>+</sup> de memória central estão associadas com proteção após a depuração de antígenos virais ou imunização (HELLER *et al.*, 2007). Além disso, estas células parecem possuir importância fundamental para o estabelecimento de células T CD8<sup>+</sup> de memória funcionais (BOURGEOIS & TANCHOT, 2003).

Atualmente existem várias hipóteses a respeito da origem das subpopulações de células de memória. Uma das hipóteses mais difundida e aceita defende que estas células constituam subtipos celulares distintos, ocorrendo uma diferenciação linear das T<sub>CM</sub> em T<sub>EM</sub> (SALLUSTO *et al.*, 1999; GEGINAT *et al.*, 2001). Tem sido proposto que as subpopulações de células T de memória representariam estágios de um processo contínuo de diferenciação cujos principais fatores envolvidos seriam a força do sinal de ativação via receptor de célula T (TCR), a concentração do antígeno bem como das moléculas co-estimulatórias e a duração da interação entre linfócitos e APCs. Ou seja, durante a estimulação antigênica, fraca ativação via TCR, escassez de antígeno e curta interação com APCs privariam os linfócitos T de adquirir função efetora imediata dando origem aos linfócitos T de memória central. Devido à estimulação subótima, estas células seriam mantidas em um estágio intermediário de diferenciação celular sem perder os receptores de migração para os órgãos linfóides secundários e adquirindo alto potencial de diferenciação e reabastecimento do pool de memória sob estimulação secundária. Por outro lado, ativação adequada dos linfócitos T *naive* levaria, a fase da resposta imune adaptativa, a manutenção de um pool de memória com capacidade efetora imediata (revisto por SALLUSTO *et al.*, 2004).

Uma análise detalhada do repertório de TCR foi realizada por espectros de tipagem em células T CD8<sup>+</sup> de memória CD45RO<sup>+</sup> usando CD62L para discriminar entre T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub> (BARON *et al.*, 2003). A análise de seis clones de células T específicas de influenza mostrou que dois tipos de clones foram partilhados entre T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub>, enquanto quatro foram detectados apenas no T<sub>CM</sub>. Um quadro semelhante foi obtido após um período de nove meses. Estes resultados indicam que o mesmo clone expandido pode estar presente em ambos os subconjuntos, T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub>, e que, dentro do pool das células T CD8<sup>+</sup> de memória específica da gripe, a distribuição clonotipo é notavelmente estável, sem evidência de conversão de memória a partir de CD62L<sup>+</sup> e CD62L<sup>-</sup> ou vice-versa.

A presença de células T de memória com capacidade de migração diferente e função efetora também foi documentada em camundongos. Duas populações de células T CD4<sup>+</sup> de memória sobreviveram por meses após a imunização com o antigénio em adjuvante: um, encontra-se primariamente nos nódulos linfáticos, produz IL-2, a outra população maior encontrada em tecidos não linfóides produz IFN- $\gamma$  (REINHARDT *et al.*, 2001). Da mesma forma, duas populações de antigénio-específicas células memória T CD8 estão presentes nas infecções virais ou bacterianas (MASOPUST *et al.*, 2001).

Em resumo, há agora evidência convincente de que células T CD 4<sup>+</sup> e CD 8<sup>+</sup> de memória antigénio-específicas persistem como populações de T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub>. No entanto, desde a primeira descrição de T<sub>CM</sub> e T<sub>EM</sub>, tornou-se evidente que estes dois subconjuntos eram heterogéneos na expressão de receptores de quimioquinas, adesão, e moléculas co-estimuladoras (SALLUSTO *et al.*, 1999).

Outros marcadores fenotípicos podem auxiliar na caracterização destas subpopulações celulares de memória já foram identificados. Dentre estas moléculas podemos ressaltar a cadeia  $\alpha$  do receptor da interleucina 7 (IL-7R $\alpha$ ), o CD127 (KAECH *et al.*, 2003) e as moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28 (TOMIYAMA *et al.*, 2002; APPAY *et al.*, 2002).

### ***1.5.2 Linfócitos de memória na malária***

O fato de que os indivíduos não desenvolvem imunidade esterilizante a malária e que a imunidade que se desenvolve é rapidamente perdida se um indivíduo se afasta de uma área endémica, levou à sugestão de que a células T CD4<sup>+</sup> de memória para malária são de curta duração (URBAN & ROBERTS 2003). Em uma abrangente revisão da literatura, (STRUICK & RILEY, 2004), no entanto, propõem uma explicação diferente: imunidade a doença sintomática pode ser perdida, mas a memória imunológica de ambas as células T e B é mantida (STRUICK & RILEY 2004). É por isso que os indivíduos que foram previamente expostos rapidamente recuperam imunidade em re-exposição ao parasito. Estas idéias, no entanto, permanecem como hipóteses até que tenhamos as melhores ferramentas para analisar a resposta de células T em humanos.

A indução e manutenção da memória imunológica para malária têm sido um tema de debate durante muitos anos (revisto em GOOD & BILSBOROUGH, 1994; STRUIK & RILEY, 2004; LANGHORNE *et al.*, 2008;), mas há notavelmente poucos estudos que tentaram analisar as respostas de memória ao longo do tempo.

Recentemente observou-se que as respostas de células B de memória são estavelmente mantidas durante pelo menos seis anos em uma população rural tailandesa em uma área onde *P. falciparum* e *P. vivax* são endêmicos, mas onde a transmissão é mantida em níveis extremamente baixos (WIPASA *et al.*, 2010). Em uma extensão deste estudo, examinou-se tanto em curto prazo (12 meses de estudo) e em longo prazo (história de infecção nos últimos 6 anos) a estabilidade da resposta das células T CD4<sup>+</sup> de memória para os antígenos da malária. Foi observado que, embora a resposta imediata Th1 pelas células de memória (24 hr secreção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) decaía, com uma meia vida de aproximadamente três anos, respostas de memória centrais reguladoras (seis dias acumulação de IL-10 em sobrenadantes de cultura) são estavelmente mantidas durante, pelo menos, seis anos após a última infecção documentada.

## 2. JUSTIFICATIVA

A malária vivax apresenta menor grau de mortalidade quando comparada com a malária falciparum, porém, é responsável por grande parte da morbidade e de danos consideráveis sobre a prosperidade das comunidades endêmicas. Nos últimos anos um padrão incomum de complicações clínicas como falência renal, síndrome respiratória e anemia grave, com casos fatais, anteriormente relatadas apenas em infecções por *P. falciparum*, também tem ocorrido na infecção por *P. vivax* no mundo e no Brasil (MARSH & KLNYANJUI, 2006; OLIVEIRA-FERREIRA, 2010). Embora a ênfase em *P. falciparum* seja apropriada, o fardo da malária vivax não pode ser desconsiderado, uma vez que *P. vivax* exerce sua função parasitária com relativo sucesso, sendo a espécie de malária humana mais amplamente distribuída no mundo, e uma causa potencial de morbidade entre os 2,85 bilhões de pessoas que residem em áreas de risco. No Brasil, a malária é endêmica na Amazônia brasileira, com a ocorrência de transmissão simultânea do *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, sendo *P. vivax* a espécie prevalente, responsável por 87% dos casos registrados, enquanto que o *P. falciparum* responde por 12%, (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Ao contrário do que ocorre para o *P. falciparum*, que pode ser facilmente cultivado *in vitro*, o cultivo de *P. vivax* ainda é restrito a poucos laboratórios (GOLEND *et al.*, 1997), o que limita os estudos sobre os mecanismos imunológicos que operam durante a infecção por esta espécie.

Para agravar ainda mais esse cenário, cepas de *P. vivax* resistentes às principais drogas utilizadas no tratamento têm sido descritas. Portanto, a infecção debilitante por *P. vivax* tem causado um profundo impacto na saúde pública (MENDIS *et al.*, 2001; MUELLER *et al.*, 2009), na longevidade e na prosperidade da população humana.

Considerando que populações brasileiras residentes em áreas de transmissão instável podem adquirir proteção contra manifestações clínicas da doença e, que o *P. vivax* é a espécie prevalente em nosso país, torna-se evidente a necessidade de ampliar os estudos sobre a resposta imune adquirida em infecções por esta espécie, a fim de se compreender os mecanismos envolvidos na aquisição da imunidade protetora ou aqueles envolvidos nos processos patogênicos associados à infecção. Muitos estudos de imunidade empenham em medir as concentrações de anticorpos contra antígenos candidatos à vacina. Relativamente pouca atenção tem sido dada às abordagens alternativas ou complementares visando definir importantes mecanismos imunes bem

como os possíveis antígenos indutores de respostas imunes associadas à proteção ou patogênese da malária vivax. A identificação e mensuração de tais mecanismos podem fornecer subsídio científico para a validação de vacinas antimaláricas eficazes.

A imunidade à malária é adquirida de forma relativamente lenta, e o que sugere que a exposição contínua aos antígenos da malária é necessária não só para a geração de células de memória e células efetoras, mas também para sua persistência. Um rápido aumento da resposta de anticorpos a vários antígenos após a reinfeção indica a presença de células de memória. Portanto, parece provável que as pessoas expostas à malária acumulem células B de memória específicas para antígenos do parasito ao qual foram expostas. No entanto, apenas poucos estudos investigaram as células de memória específicas em pessoas expostas à malária (LANGHORNE *et al.*, 2008).

No presente trabalho investigamos a resposta imune celular de pacientes infectados por *P. vivax* frente à associação da indução de memória na infecção, na tentativa de responder algumas perguntas que poderiam estar associadas à imunidade protetora e a patogenia da infecção. Pretendemos, assim, responder a duas questões: (i) Seria o *P. vivax* capaz de induzir uma resposta eficiente de células T de memória? (ii) Podem as células T de memória proteger contra a infecção da malária?

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. *Objetivo geral*

Avaliar o perfil fenotípico de memória e a expressão do endereçamento celular de linfócitos T entre as células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados naturalmente por *P. vivax* na Amazônia Brasileira.

#### 3.2. *Objetivos específicos*

- Caracterizar fenotipicamente, pela avaliação da expressão de moléculas de superfície, as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> não primadas e de memória (CD45RA/CD45RO) em indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax*;
- Caracterizar o perfil de migração celular, determinando o padrão de resposta celular central (CD62L<sup>+</sup> e CCR7<sup>+</sup>) ou efetora (CD62L<sup>-</sup> e CCR7<sup>-</sup>);
- Caracterizar as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória em resposta à infecção, baseado na detecção intracitoplasmática de citocinas anti e pró-inflamatórias (IL-10, INF- $\gamma$ );
- Correlacionar parâmetros clínicos que medem morbidade na malária vivax (anemia, plaquetopenia e número de infecções maláricas prévias) à presença das células de memória em pacientes infectados por *P. vivax*;
- Correlacionar parasitemia à presença das células de memória em pacientes infectados por *P. vivax*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área e população de estudo

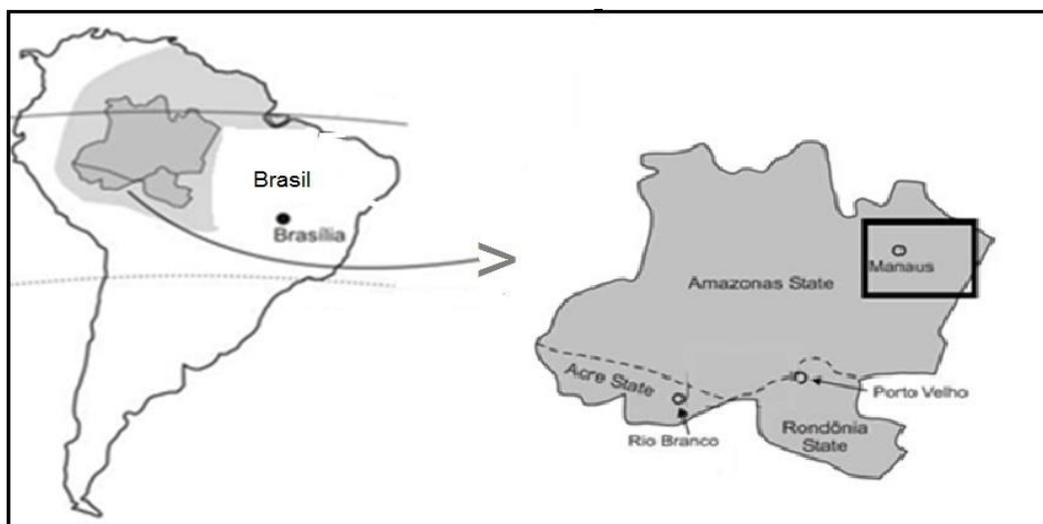
Os indivíduos recrutados para este estudo, em sua maioria, provêm da região pertencente ao município de Manaus (AM). Foram avaliados 64 pacientes de ambos os sexos residentes na área endêmica que apresentam número variável de episódios prévios de malária por *P. vivax*. Todos apresentavam infecção patente por *P. vivax*, e o diagnóstico foi realizado por meio de exame microscópico de gota espessa e confirmado por PCR (SCOPEL *et al.*, 2004), que excluiu infecções simples provocadas por outras espécies de *Plasmodium*, bem como infecções mistas. O diagnóstico molecular, foi realizado com o objetivo de se confirmar o diagnóstico obtido por meio do exame microscópico de gota espessa.

Esses pacientes procuraram pela unidade de saúde a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM), em busca de atendimento médico, no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008. Essa etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda (Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado).

Todos os pacientes foram examinados e entrevistados, aplicou-se um questionário padrão previamente testado e elaborado, contendo informações sobre dados demográficos, história migracional, medidas de exposição à malária (tempo de residência na área endêmica, número de episódios prévios de malária, etc.), bem como hemograma completo e descrição dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes. A partir de então, o sangue destes pacientes foi colhido, por punção venosa, em tubos Vacutainer contendo EDTA ou heparina, e utilizado para a extração de DNA, para os exames laboratoriais de contagem de células sanguíneas, bem como para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico. É importante ressaltar que os indivíduos incluídos neste trabalho não apresentavam dengue, hepatites e nem HIV, estas infecções foram descartadas após a realização de outros exames laboratoriais. Para a determinação da parasitemia, foram examinados 200 campos microscópicos, com um aumento de 1000x sob imersão em óleo. Após a coleta de sangue, todos os pacientes foram tratados de acordo com a política nacional de tratamento da malária no Brasil, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde no Manual de Terapêutica da Malária.

Como controles negativos, foram incluídos no estudo 22 indivíduos, do sexo feminino ou masculino, nunca expostos à malária, residentes em Belo Horizonte, área

não endêmica para a doença. De todos os indivíduos avaliados foi obtido o consentimento para participação no estudo conforme normatiza o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais em 10 de Abril de 2007/ ETIC 060/07).



**Figura 6. Mapa do Brasil evidenciando a localização da região de estudo no estado do Amazonas.**

#### **4.2. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

Para separação dos PBMCs, aproximadamente 35 mL de sangue periférico de cada indivíduo, coletados em tubos heparinizados, foram aplicados lentamente sobre 10 mL de solução de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1.077, Sigma, EUA) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA), e foram centrifugados a 1200 g por 40 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o soro, que corresponde à primeira camada no tubo falcon, foi retirado e congelado. O anel formado na interface entre plasma e eritrócitos, que corresponde ao PBMC, foi coletado e lavado com RPMI. Ao final, as células foram ressuspensas para 1 mL e foi realizada a contagem das mesmas. Para contagem celular foi utilizada a câmara hemocitométrica de Neubauer estando as células diluídas (1:20) em Solução de Turcks. O volume final foi ajustado para  $1 \times 10^7$  células/mL. As células obtidas dos pacientes da cidade de Manaus foram congeladas em nitrogênio conforme descrito no item “4.3 Congelamento e descongelamento das células mononucleares do sangue”.

#### ***4.3. Congelamento e descongelamento das células mononucleares do sangue periférico***

Após a separação e criopreservação das PBMCs, elas foram utilizadas em ensaios biológicos de imunofluorescência por citometria de fluxo. Para o congelamento celular, inicialmente foi preparada e mantida até o momento do uso a 4 °C, a solução de congelamento. Esta solução é constituída de 90% de soro fetal bovino inativado e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma). Após a contagem, as células obtidas por separação com gradiente de Ficoll Hypaque foram centrifugadas por 8 minutos a 800 g e ressuspensas em 1 mL de solução de congelamento para cada 10-15 X 10<sup>6</sup> células. Os criotubos, devidamente identificados, foram deixados a – 80 °C por 18 horas em recipiente próprio para congelamento contendo álcool isopropílico e posteriormente foram transferidos para o nitrogênio líquido.

No momento do descongelamento celular os tubos de criopreservação foram retirados do nitrogênio líquido e PBS foi adicionado para o descongelamento e ressuspensão das células, sendo centrifugadas a 1400 g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado por inversão dos tubos.

#### ***4.4. Marcação celular de superfície com anticorpos monoclonais***

As frequências das populações celulares de células T e B foram definidas com base em moléculas de superfície marcadas com fluorocromos específicos. Os marcadores utilizados para determinação dessas populações são apresentados na Tabela 1.

As células ressuspensas, para 2 mL, foram distribuídas nos tubos de polipropileno de 5 mL (Becton Dickinson, USA) e a marcação celular foi realizada com a incubação destas células com 2 µL dos respectivos anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (as combinações dos anticorpos monoclonais utilizados são mostrados na Tabela 1), em temperatura ambiente por 30 minutos. Para a marcação extracelular, inicialmente as células foram incubadas com os anticorpos de marcação de superfície, 2 µL, por 30 min e em seguida foi feita a lavagem das células com 2 mL de PBS-W e centrifugação por 10 min a 1400g. Em seguida, 2 mL de PBS-P foi adicionado para o rompimento celular e fizemos a marcação intracelular. Após incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS-W e centrifugadas por 10

minutos a 1400 g. Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, EUA), sendo adquiridos dados de 50.000 células.

**Tabela 1:** Combinação dos anticorpos para a marcação de superfície celular e citocinas intracitoplasmáticas.

TUBO	FITC*	PE**	PE-Cy5***
1	IgG1	IgG1	IgG1/2 <sup>a</sup>
2	CD45RA	CCR7	CD4
3	CD4	CCR7	CD45RO
4	CD45RA	CD62L	CD4
5	CD4	CD62L	CD45RO
6	CD45RA	IFN- $\gamma$	CD4
7	CD4	IFN- $\gamma$	CD45RO
8	CD45RA	IL-10	CD4
9	CD4	IL-10	CD45RO

\*FITC: isotiocianato de fluoresceína; \*\*PE ficoeritrina; \*\*\*PECy5: ficoeritrinacianina

#### 4.5. Aquisição e análise por citometria de fluxo

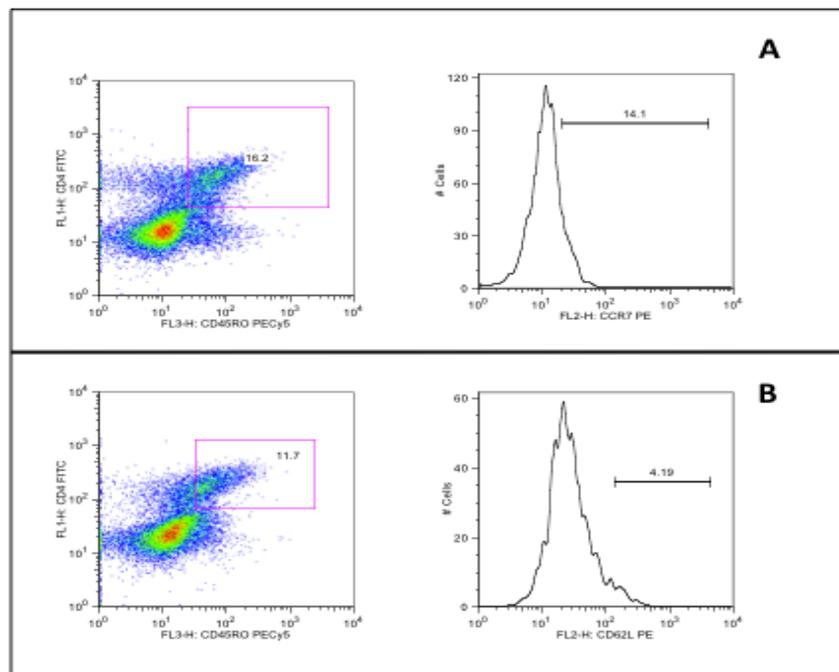
A citometria de fluxo permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão. As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (ROITT *et al.*, 1999).

A avaliação do tamanho relativo da célula (“Forward scatter – FSC”) e da granulosidade ou complexidade interna da célula (“Side Scatter – SSC”) permite a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos (GRINDEM, 1996). A imunofenotipagem consiste no isolamento de populações de células distintas com diferentes marcadores de superfície marcados com anticorpos fluorescentes específicos (ROITT *et al.*, 1999). A avaliação da intensidade de fluorescência ocorre para detecção dos marcadores de superfície diferentes, marcados com anticorpos monoclonais específicos ligados a compostos químicos fluorescentes ou fluorocromos (GRINDEM, 1996).

Os anticorpos monoclonais são os reagentes de escolha devido à sua especificidade, reação cruzada mínima e reprodutibilidade (KEREN, 1994). O termo CD (Cluster Designation = denominação de grupamento) é utilizado para denominar os

anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios de todo o mundo contra antígenos leucocitários humanos (ROITT, 1999).

A aquisição das amostras e controles, marcadas com os três anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos, é feita através de citometria multiparamétrica em um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA). O FACScan é um citômetro equipado com um laser de argônio e outro de hélio neônio, com potencial para analisar até 3 cores, além de possuir a capacidade de separação de células. As voltagens das fluorescências e os valores de compensação serão definidos utilizando um conjunto de partículas de compensação (beads) (BD Biosciences) sem marcação fluorescente como controle negativo ou marcadas com cada uma das fluorescências utilizadas no experimento isoladamente: FITC, PE ou PECy5. Após a compensação automática do citômetro, foram adquiridos, aproximadamente, 50.000 eventos de cada amostra na região de linfócitos, definida pelos parâmetros de tamanho e granulosidade no gráfico FSC (forward scatter) versus SSC (side scatter), respectivamente.



**Figura 7. Estratégias de análise para fenotipagem celular. Células previamente presentes em gate de linfócitos (forward scatter x side scatter) foram analisadas em relação a sua fluorescência tipo I (CD4 FITC) e tipo III (CD45RO PE-Cy5). A frequência de linfócitos duplo positivos (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, gate retangular) que expressam CCR7 (A) ou CD62L (B) foram determinados por citometria de fluxo.**

A estratégia de análise empregada teve como objetivo caracterizar fenotípica e funcionalmente as subpopulações T CD4<sup>+</sup> naive e de memória incluindo moléculas de

diferentes isoformas de diferenciação celular (CD45RA/CD45RO), moléculas de migração celular que definem memória (CCR7 e CD62L) e secreção de citocinas (IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) (Figura 7).

#### ***4.6. Análise estatística***

Inicialmente foi construído um banco de dados no MICROSOFT EXCEL, contendo todas as informações referentes às características demográficas e clinico-epidemiológicas dos pacientes incluídos no presente trabalho. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism version 5.0*. Em todos os modelos, significância estatística foi definida como  $P < 0,05$ . O teste Kolmogorov-Smirnoff foi utilizado para analisar se as amostras possuem distribuição normal. Em seguida foi feito o teste t student para detectar diferenças significativas entre as médias para cada grupo. A análise estatística da correlação entre as células de memória e a expressão das citocinas, parasitemia e parâmetros hematológicos foram determinados por correlação de Pearson.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização dos indivíduos do estudo

Foram incluídos 64 pacientes na fase aguda da infecção por *P. vivax*. Além dos pacientes infectados, fizeram parte deste estudo 22 voluntários, não infectados pelo *P. vivax*, residentes em área não endêmica e que nunca tiveram contato com o parasito. A maioria dos indivíduos infectados pertence ao gênero masculino (53; 82,8%), e uma minoria, ao feminino (11; 17,2%). A faixa etária do grupo oscilou entre 12 e 68 anos (média 37,9 anos). Em relação à exposição, avaliada por meio da variável número de episódios prévios de malária, verificou-se que esses pacientes apresentaram, em média, cerca de  $4,27 \pm 11,2$  episódios prévios de malária. (Tabela 2).

**Tabela 2:** Características epidemiológicas da população de estudo. Os pacientes incluídos neste estudo foram atendidos na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM), no período compreendido entre os meses de fevereiro de 2006 a janeiro de 2008.

Características epidemiológicas	
Gênero	
Masculino (n/%)	53; 82,8%
Feminino (n/%)	11; 17,2%
Total	64
Idade (Média $\pm$ DP)	39,4 $\pm$ 14,9
(Mediana)	37,0
Numero de episódios prévios de malária	
(Média $\pm$ DP)	4,2 $\pm$ 11,1
(Mediana)	2,0

Todas as gotas espessas provenientes dos pacientes infectados foram examinadas por microscopistas bem treinados da FMTHVD. As mono infecções por *P. vivax* foram confirmadas por PCR como descrito em Material e Métodos. Níveis de hemoglobina, plaquetas e linfócitos foram mensurados usando um contador de células sanguíneas, automático (ABX Pentra 90; Horiba Diagnostics, Kyoto, Japan). O exame de gota espessa revelou que a densidade parasitaria média encontrada nessa população foi  $5.027 \pm 5.170$  parasitos/ $\mu$ L de sangue. A avaliação dos hemogramas mostrou que, quanto à dosagem de hemoglobina, os pacientes em questão apresentaram, em média,  $12,8 \pm 1,6$

g/dL. Em relação à contagem de plaquetas, verificou-se que essa população apresentou, em média,  $115.393 \pm 45.300$  plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangue. Quanto à contagem dos linfócitos, detectou-se um valor médio de  $11.212 \pm 5.675$  linfócitos/mm<sup>3</sup>. Esses parâmetros foram avaliados para ambos os grupos e encontram-se detalhados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Valores médios dos parâmetros hematológicos (Média  $\pm$  SD) em indivíduos infectados por *P. vivax* e indivíduos controles não expostos à malária.

	Indivíduos	
	Infetados <sup>+</sup> (n = 64)	Controles (n = 22)
Hemoglobina (g/dL)	12,8 $\pm$ 1,6*	13,3 $\pm$ 1,1
Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	115.393 $\pm$ 45.300*	184.400 $\pm$ 20.300
Linfócitos (células/mm <sup>3</sup> )	11.212 $\pm$ 5.675	12.476 $\pm$ 2.316
Parasitemia(parasitos/ $\mu$ L)	5.027 $\pm$ 5.170	0

<sup>+</sup> Infecção por *P. vivax* detectada pela observação de gotas espessas e confirmada por PCR

\* P<0.0001

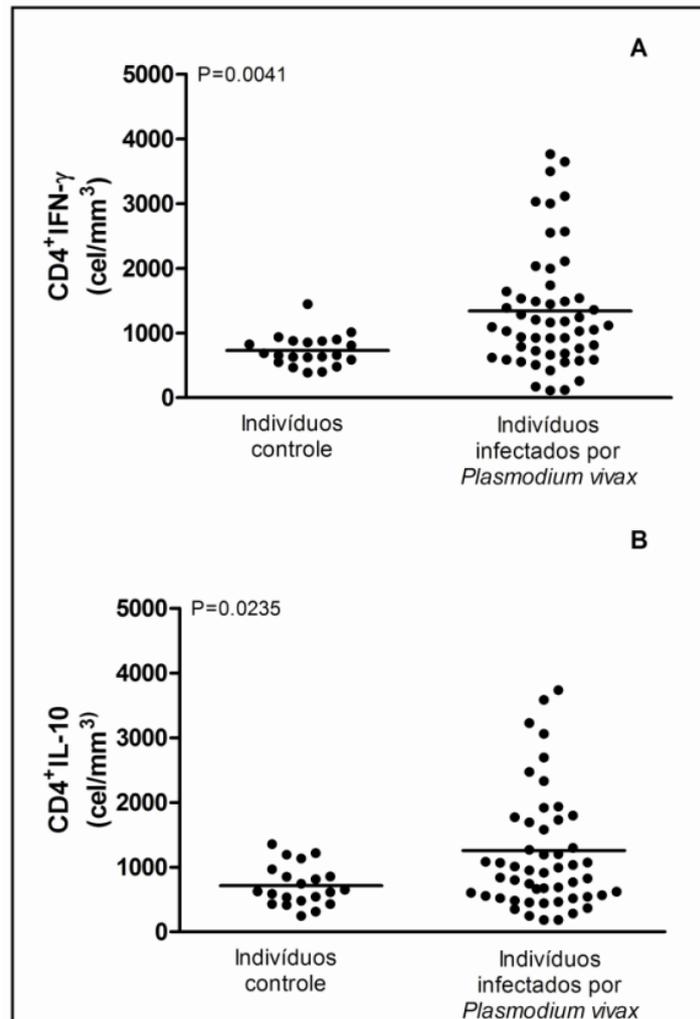
### 5.2. Expressão de citocinas IFN- $\gamma$ e IL-10 pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>

Com a finalidade de avaliar a participação de citocinas que caracterizam a ativação de células e a regulação da resposta imune de diferentes subpopulações de linfócitos, analisamos a expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 em amostras de células (PBMCs) de indivíduos infectados por *P. vivax* e indivíduos saudáveis não expostos à malária.

Inicialmente foi feita uma contagem absoluta de células T CD4<sup>+</sup> e foi visto que elas estão aumentadas nos indivíduos infectados com *P. vivax*. Seguindo o aumento no número absoluto da população de células T CD4<sup>+</sup>, os pacientes infectados apresentam uma expressão significativamente maior de ambos os marcadores de citocinas testados (IFN- $\gamma$  e IL-10) nas células T CD4<sup>+</sup> quando comparados com aquelas observadas nos pacientes não infectados (P = 0.0041 Figura 8A e P = 0.0235 Figura 8B).

A média da expressão de IFN- $\gamma$  foi 1.339 células/mm<sup>3</sup> no grupo infectado, enquanto que no grupo controle foi de 730,7 células/mm<sup>3</sup>. A diferença observada foi estatisticamente significativa (P=0,0041). No grupo de indivíduos infectados, a média das concentrações de IL-10 foi 1.258 células/mm<sup>3</sup>, enquanto no grupo controle foi de

715, 2 células/mm<sup>3</sup>. Esta diferença também foi estatisticamente significativa (P=0,0235).

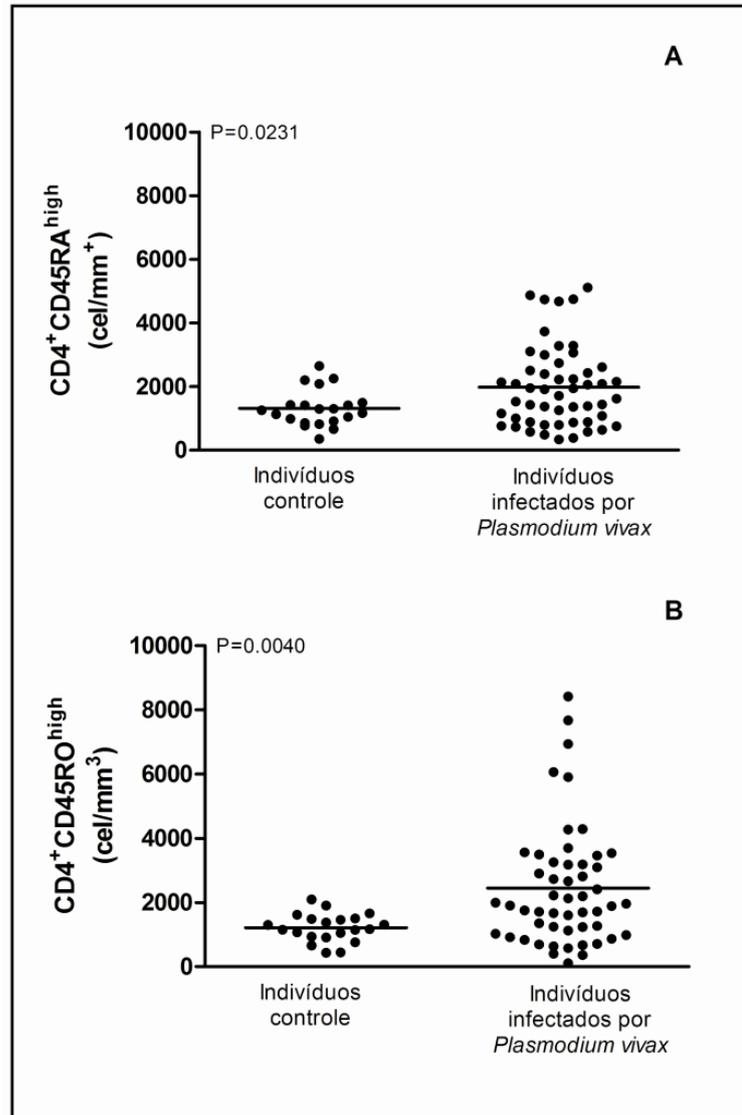


**Figura 8.** Perfil fenotípico da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 em células T CD4<sup>+</sup> em malária-naïve e pacientes infectados por *P. vivax*. Resultados foram expressos em números absolutos (células/mm<sup>3</sup>) de células T CD4<sup>+</sup> expressando (A) IFN-  $\gamma$  e (B) IL-10.

### 5.3. Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T

Com base no elevado número de células T CD4<sup>+</sup> presente no sangue periférico de indivíduos infectados, procedeu-se a caracterização da expressão de moléculas associadas ao amadurecimento celular, CD45RA e CD45RO. A fim de determinar o fenótipo das células T CD4<sup>+</sup> presentes no sangue periférico, realizou-se a análise comparativa das diferentes subpopulações de linfócitos T *naive* (CD45RA) e de memória (CD45RO). Nossos dados mostram que o número absoluto de células T *naive* (Figura 9A) e de memória (Figura 9B) foram significativamente maiores em indivíduos

infectados (média =  $1.979 \pm 175,5$  células/mm<sup>3</sup> e  $2.443 \pm 258,3$  células/mm<sup>3</sup>, respectivamente) quando comparados àqueles do grupo controle (média =  $1.309 \pm 125,5$  células/mm<sup>3</sup> e  $1.214 \pm 95,2$  células/mm<sup>3</sup>, respectivamente) ( $P = 0,0231$  e  $P = 0,0040$ , respectivamente).

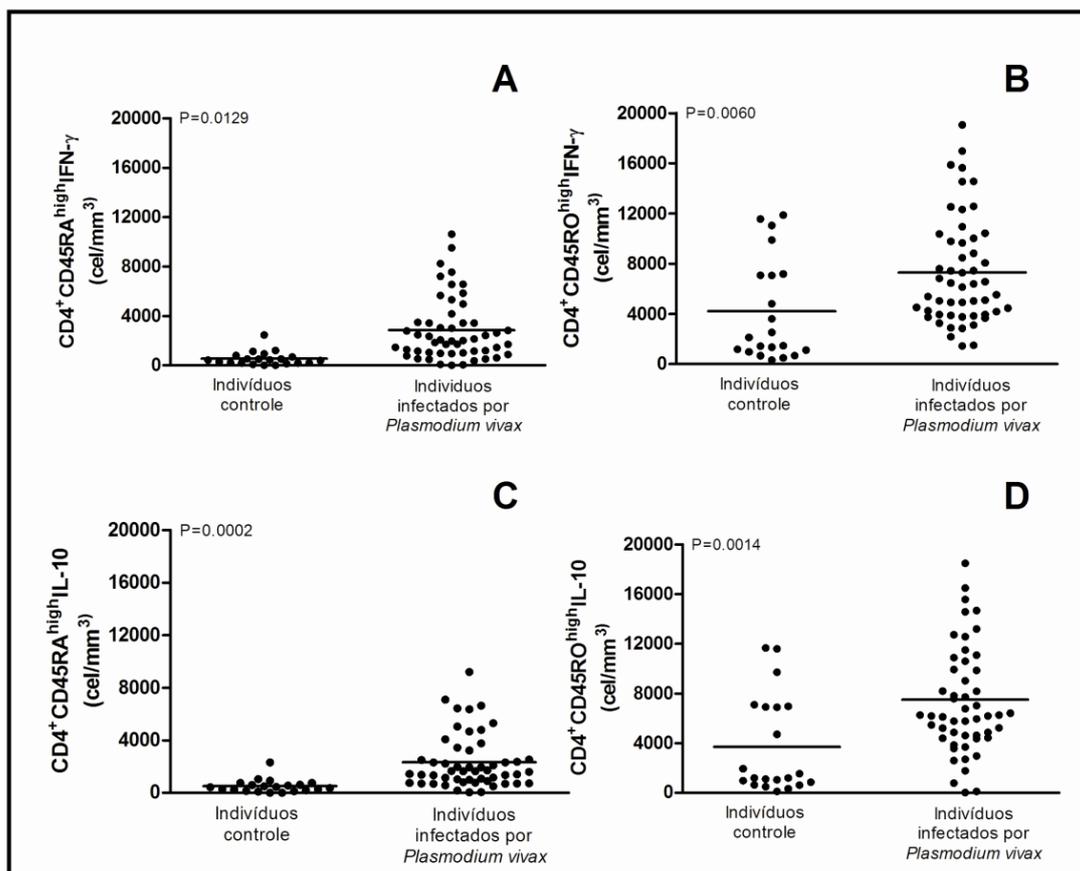


**Figura 9. Análise de células T CD4<sup>+</sup> naïve e de memória por citometria de fluxo.** Resultados expressos em número absoluto (células/mm<sup>3</sup>) de (A) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> e (B) CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> de indivíduos negativos e infectados por *P. vivax*

#### 5.4. Subpopulações de CD45 produtoras de IFN- $\gamma$ e IL-10

Uma vez observada a grande quantidade de células T expressando isoformas de CD45 no sangue periférico de pacientes infectados, realizou-se a caracterização desta população celular por meio da avaliação da expressão de moléculas associadas à citocinas inflamatórias e regulatórias, IFN- $\gamma$  e IL-10 respectivamente. Indivíduos

infectados por *P. vivax*, mostraram aumento significativo de células que co-expressam marcadores de superfície de células T *naïve* e de memória (CD45RA e CD45RO, respectivamente) ou de regulação de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-10, respectivamente) quando comparado com indivíduos não expostos. (Figura 10).



**Figura 10. Expressão de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 por células T CD 4<sup>+</sup> que expressam diferentes isoformas de CD45, *naïve* e de memória em indivíduos saudáveis não expostos à malária e pacientes infectados por *P. vivax*. Resultados foram expressos em números absolutos (células/mm<sup>3</sup>) e as linhas representam a média de (A) CD45RA<sup>+</sup>IFN-  $\gamma$ , (B) CD45RO<sup>+</sup>IFN-  $\gamma$ , (C) CD45RA<sup>+</sup>IL-10 e (D) CD45RO<sup>+</sup>IL-10 em células T CD4<sup>+</sup>.**

O número médio de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  foi 7.308 células/mm<sup>3</sup> para o grupo infectado e 4.207 células/mm<sup>3</sup> para o grupo controle. A diferença observada foi estatisticamente significativa (P=0,0060 Figura 10A). No grupo de indivíduos infectados, o número médio de células expressando IL-10 por células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> foi de 7.492 células/mm<sup>3</sup>, e 3.689 células/mm<sup>3</sup> para o grupo controle. Esta diferença também foi estatisticamente significativa (P=0,0014 Figura 10B). Para as células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, o número médio de células expressando IFN- $\gamma$  foi de 2.856 células/mm<sup>3</sup> para os indivíduos infectados e de 536,6 células/mm<sup>3</sup> para os do grupo

controle. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $P=0,0129$  Figura 10C). O número médio de células expressando IL-10 foi de 2.323 células/mm<sup>3</sup> para os indivíduos infectados e 503,7 células/mm<sup>3</sup> para aqueles do grupo controle. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $P=0,0002$  Figura 10D).

### 5.5. Correlação entre a expressão de citocinas, IFN- $\gamma$ e IL-10 e o número absoluto de células de diferentes subpopulações de linfócitos T

No grupo dos pacientes infectados, o número absoluto de células T de memória e *naïve* produzindo IFN- $\gamma$  apresentou-se diretamente relacionado à produção de IL-10 pelos mesmos pacientes infectados ( $r = 0,9034$  e  $r = 0,7223$ , respectivamente,  $P < 0,0001$  para ambos) (Figura 11A e 11B).

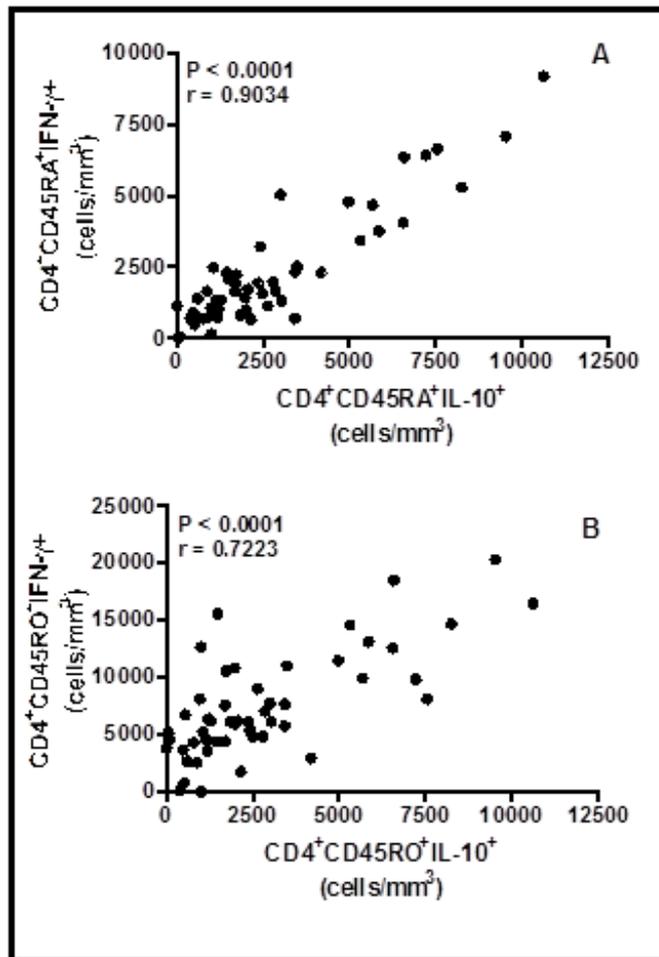
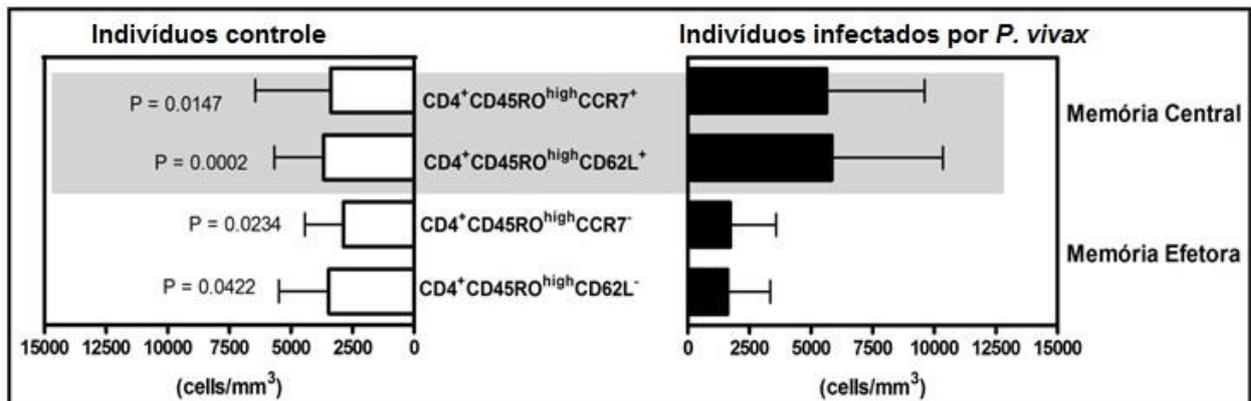


Figura 11. Correlação do número absoluto de IL-10 e IFN- $\gamma$  circulantes produzidas por T auxiliares em 64 pacientes com malária vivax.

### 5.6.A infecção por *P. vivax* induz o desenvolvimento de células de memória centrais

Partindo-se da população total de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> selecionada por meio de análise fenotípica em citômetro de fluxo, foi possível observar dois tipos de células T de memória com diferentes preferências de migração. A expressão de CD45RO<sup>+</sup> e CCR7 e/ou CD62L distingue subconjuntos de células T: células T de memória centrais (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>) e células T de memória efetoras (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>).

Os dados mostram que os pacientes infectados por *P. vivax* apresentaram um aumento significativo do número de células T CD4<sup>+</sup> de memória circulantes expressando CCR7 e CD62L ( $P = 0,0147$  e  $P = 0,0002$ , respectivamente) (Figura 12), indicando um perfil de células de memória central. Além disso, as contagens absolutas de células T CD4<sup>+</sup> de memória que não expressam CCR7 e CD62L foram significativamente reduzidas em indivíduos infectados ( $P = 0,0234$  e  $P = 0,0422$ , respectivamente), resultados estes, consistentes com os dados observados anteriormente.



**Figura 12. Análise por citometria de fluxo de células T CD4<sup>+</sup> central e efetora em malária-naïve e infectados por *P. vivax*.** Expressão de CCR7 e/ou CD62L distingue dois subtipos de células T: memória central (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) ou memória efetora (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>).

### 5.7. Associações entre as células de memória e os parâmetros clínicos associados à morbidade

Considerando-se que as alterações hematológicas, como a anemia e plaquetopenia são as complicações mais relatadas na malária grave, neste estudo, avaliaram-se as possíveis associações entre os parâmetros hematológicos como nível de hemoglobina e contagem de plaquetas à presença de células T de memória. Sabe-se que a anemia é diretamente relacionada ao tempo decorrente da infecção, isso pode explicar

as reduzidas taxas de anemia entre os pacientes infectados já que no Brasil, o diagnóstico e tratamento da malária são realizados logo após o surgimento dos primeiros sintomas clínicos. Portanto, a presença das células de memória não se associa com a este padrão de morbidade.

Nenhuma associação positiva ou negativa foi detectada para esses parâmetros hematológicos e o número de células T de memória.

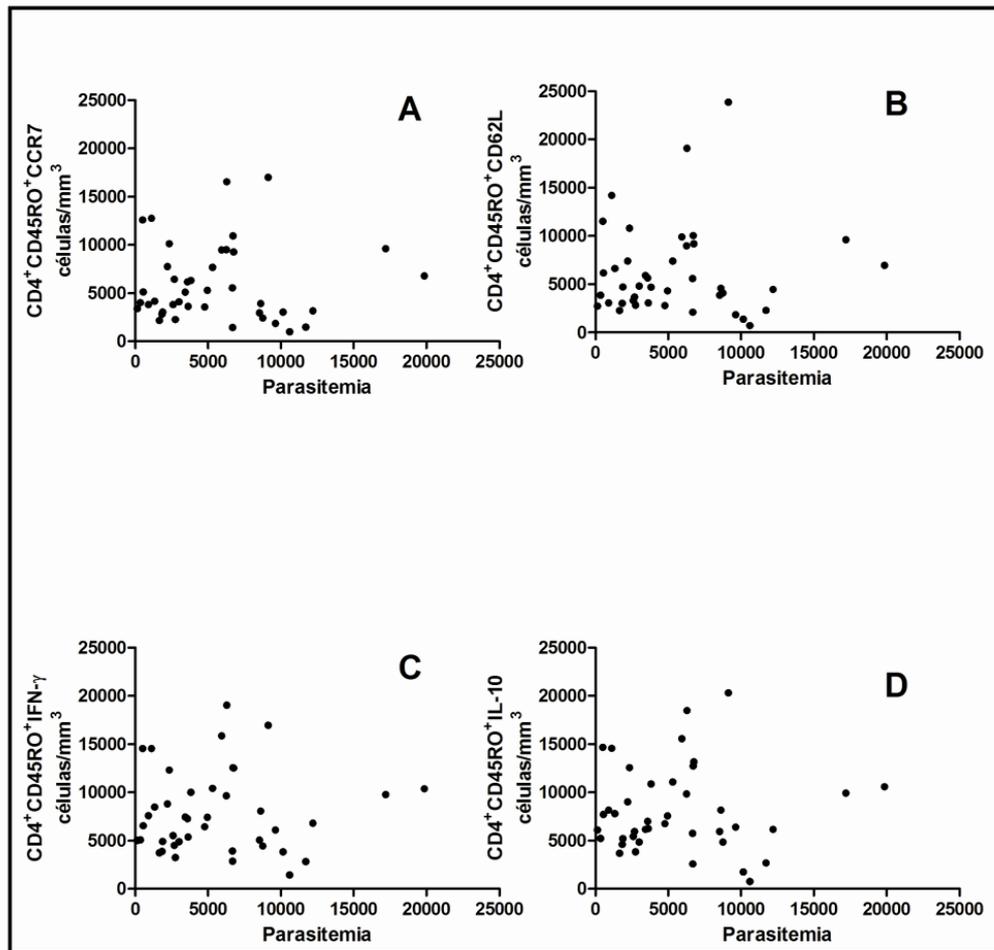
A concentração das células de memória também foi analisada em indivíduos infectados por *P. vivax*, distribuídos de acordo com o número de episódios prévios de malária. Tanto nos indivíduos primoinfectados quanto nos indivíduos que foram reexpostos não houve relação com a presença das células de memória.

### **5.8. Associações entre as células de memória e parasitemia**

Outra relação investigada no presente trabalho foi a influência das células de memória e a carga parasitária. Com o intuito de verificar se a presença das células de memória poderia contribuir para o controle da parasitemia, avaliamos se pacientes com números elevados de células de memória seriam aqueles que apresentariam menores parasitemias.

Os resultados referentes a essa análise mostraram que nenhuma correlação foi verificada entre o número de células  $CD4^+CD45RO^+CCR7^{+/-}$ ,  $CD4^+CD45RO^+CD62L^{+/-}$  e o número de parasitos no sangue periférico (Figura 13 A e B).

Para avaliar se as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 poderiam regular os mecanismos efetores que atuam no controle do número de parasitos, analisamos o número de células T  $CD4^+CD45RO^+$  expressando estas citocinas ( $CD4^+CD45RO^+IFN-\gamma$  e  $CD4^+CD45RO^+IL-10$ ) em relação à parasitemia. Não foi verificada qualquer relação entre o aumento de células T  $CD4^+CD45RO^+IFN-\gamma$ ,  $CD4^+CD45RO^+IL-10$  e o nível de parasitos detectados na gota espessa (Figura 13 C e D).



**Figura 13.** Correlação do número absoluto de CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+/-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+/-</sup> (A e B) e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>IFN-γ e CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> IL-10 (C e D) e o número de parasitos no sangue periférico (parasitemia) nos pacientes com malária vivax.

## 6. DISCUSSÃO

O desencadeamento da resposta imune protetora durante a infecção malárica é um processo complexo que vem sendo caracterizado ao longo das últimas décadas. Apesar dos avanços realizados serem consideráveis, sobretudo aqueles relacionados à infecção por *P. falciparum*, ainda não foi possível definir o balanço ideal entre os mecanismos que definem a imunidade e os mecanismos que regulam a doença. Outra questão intrigante refere-se ao fato de que a imunidade adquirida contra a infecção por diferentes espécies de *Plasmodium* ser aparentemente de curta duração.

Cabe ressaltar que os trabalhos focados no entendimento da resposta imune contra a infecção por *P. vivax* são ainda mais escassos, e estudos adicionais são necessários para elucidar o padrão de resposta protetora bem como os fatores associados à imunopatologia. Ainda que a resposta imunológica contra as diferentes espécies de *Plasmodium* possa apresentar mecanismos efetores comuns, é importante ressaltar que o ciclo biológico do *P. vivax* apresenta diferenças importantes a serem consideradas como, por exemplo, a ocorrência de hipnozoítos e a invasão exclusiva de reticulócitos por merozoítos sanguíneos.

O nosso grupo tem obtido resultados importantes que podem ser considerados avanços na caracterização de diferentes aspectos da resposta imune celular em pacientes infectados por *P. vivax*, sem malárias graves e provenientes de área de baixa endemicidade (BUENO *et al.*, 2009; BUENO *et al.*, 2010; BUENO *et al.*, 2012). Em nosso trabalho atual, demonstramos, pela primeira vez, que indivíduos com malária vivax apresentaram aumento da expressão de IFN- $\gamma$  e de IL-10 em células T CD4<sup>+</sup>. Além disso, demonstramos uma correlação direta entre o número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> circulantes e a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10. Estes resultados interessantes permite a discussão do possível efeito do aumento da produção de citocinas anti (IL-10) e pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ ) por células T de memória circulantes em indivíduos infectados por *P. vivax* e expostos em regiões de baixa transmissão de malária. Entretanto, a falta de correlação do perfil de resposta celular observado em nosso trabalho e variáveis como parasitemia, número de episódios prévios de malária e status clínico nos impede de fazer quaisquer associações que possam sugerir marcadores celulares de proteção/suscetibilidade à malária. Portanto, é inquestionável a necessidade de se conduzir estudos adicionais a fim de se determinar os possíveis mecanismos envolvidos na imunopatogênese desta importante infecção.

Várias hipóteses já foram testadas com o objetivo de se definir condições fundamentais para o estabelecimento de imunidade em populações vivendo em diversas regiões endêmicas do mundo (LANGHORNE *et al.*, 2008). Embora os fatores demográficos associados à doença pareçam determinar a rapidez com que a imunidade se estabelece em áreas endêmicas, os fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro que modulam a resposta imunológica são certamente determinantes da proteção. Neste contexto, pode ser incluído o papel imunológico desempenhado pelas células T de memória.

O estudo das células T de memória que representam um repositório dinâmico de linfócitos T que se acumula ao longo do tempo de vida dos indivíduos (SALLUSTO *et al.*, 2004), constitui um tema atual e relevante. Na malária, a exposição contínua aos antígenos parasitários é requerida para o desenvolvimento de respostas imunes de memória eficazes (LANGHORNE *et al.*, 2008). Embora o papel das células T CD4<sup>+</sup> de memória dirigida contra as formas sanguíneas do parasito tenha sido estudado em infecções murina e humana, a caracterização da resposta das células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora é ainda pouco compreendida, em particular para a infecção por *P. vivax*.

É conhecido que a imunidade para a fase eritrocítica do *Plasmodium* é dependente de células T CD4<sup>+</sup> e células B (MEDING & LANGHORNE, 1991). Além disso, tem-se evidenciado que a presença de células T CD4<sup>+</sup> *Plasmodium* específicas, em alguns casos, se correlaciona à imunidade clínica (REECE *et al.*, 2004). Em modelos murinos, *P. yoelii* e *P. berghei*, foi demonstrado que a infecção pode levar à eliminação de células T CD4<sup>+</sup> específicas geradas pela vacinação prévia com antígenos de formas sanguíneas (HIRUNPETCHARAT & GOOD, 1998). Outro estudo demonstrou que a proteção por células T CD4<sup>+</sup> de memória diminui após 5, 6 meses em infecções por *P. chabaudi* (FREITAS DO ROSARIO *et al.*, 2008), sugerindo certo comprometimento da memória imunológica de longa duração durante a fase sanguínea da infecção. Estes resultados justificam a condução de mais estudos sobre a geração e manutenção das células de memória na malária para melhorar a capacidade de gerar proteção de vida longa através de vacinação.

Células T periféricas maduras estão em repouso e podem ser classificadas em células *naive* e de memória com base: (i) na sua resposta a antígenos durante uma exposição secundária, (ii) na presença de RNAs pré-formados e (iii) na expressão de marcadores de superfície específicos das células (LINTON *et al.*, 1997). De acordo com

um modelo proposto, os linfócitos T de memória poderiam ser classificados como células de memória central (tipo clássico) e células efetoras com base na capacidade distinta de deslocamento e função (SALLUSTO *et al.*, 2004). Além da atividade funcional, vários marcadores têm sido identificados para permitir a distinção destas subpopulações celulares. De fato, vários estudos têm demonstrado que a alteração da combinação de isoformas de CD45 afeta dramaticamente a função imunitária e a gravidade da doença em modelos de doenças autoimunes.

No presente estudo, o aumento significativo do número absoluto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> e CD45RO<sup>+</sup> pode refletir uma possível co-expressão de duas isoformas de CD45, fato este esperado durante a hiperativação de células T ou, mais provavelmente, durante a transição natural do fenótipo *naive* para fenótipo de memória (PEAKMAN *et al.*, 1994). Com base na caracterização da expressão de moléculas associadas ao amadurecimento celular (CD45RA<sup>+</sup> e CD45RO<sup>+</sup>), demonstramos que os pacientes infectados apresentam uma expressão significativamente maior do marcador CD45RO<sup>+</sup> corroborando dois diferentes estudos, um realizado na China, em que pacientes infectados por *P. vivax* apresentaram aumento do número de células T CD4<sup>+</sup> de memória (JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2012), e outro realizado na Tailândia (JANGPATARAPONGSA *et al.*, 2006), onde foi demonstrado que durante a infecção aguda e também na fase de convalescência, níveis elevados de células T CD4<sup>+</sup> de memória estavam presentes.

A presença das células de memória e sua associação à proteção antimalárica foram demonstradas por BERGMANN e colaboradores (1997). Os autores observaram aumento do número de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> em culturas de células de voluntários humanos imunizados com esporozoítos atenuados de *P. falciparum* em comparação às culturas de células de voluntários não protegidos.

Em nosso estudo, foi descrito pela primeira vez que pacientes com infecção aguda por *P. vivax* e com ausência de demais infecções bacterianas, virais ou parasitárias, apresentaram um aumento significativo do número de células T CD4<sup>+</sup> que expressam CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup> e CD62L<sup>+</sup> com uma redução significativa de células T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> que são negativas para ambos os marcadores. Tais resultados sugerem um perfil predominante de células de memória central em detrimento ao de células efetoras durante a infecção por *P. vivax*. Certamente este é um resultado intrigante e merece avaliações posteriores em indivíduos protegidos (tanto por aquisição de uma

resposta imune adaptativa protetora após exposição em áreas de transmissão como por vacinação com diferentes antígenos parasitários), não avaliados em nosso estudo.

LANGHORNE e colaboradores (2010) mostraram um nítido predomínio de células de memória efetoras  $CD4^+CD62L^-$  remanescentes após infecção aguda por *P. chabaudi*, que permaneceram em um estado relativamente ativado. Neste estudo foi possível correlacionar, durante a fase crônica da infecção no modelo murino, as células de memória com a redução da parasitemia e efeitos patológicos. Estas observações foram também evidenciadas em infecções por *Leishmania* (UZONNA *et al.*, 2001), onde as células de memória apresentaram-se em grandes proporções e produziram IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , o que pode ter contribuído para a maior proteção. Células de memória também têm sido demonstradas na fase de hepática de malária (BERENZON *et al.*, 2003; KRZYCH & SCHWENK, 2005) e são predominantes em humanos protegidos contra a malária após desafio por esporozoítos de *P. falciparum* (ROESTENBERG *et al.*, 2009), bem como em outras doenças crônicas, como a LCMV (WHERRY *et al.*, 2004), doença de Chagas (BUSTAMANTE *et al.*, 2008; MARTIN & TARLETON, 2005) vírus herpes gama (OBAR *et al.*, 2006), e da Hepatite B e C humano (URBANI *et al.*, 2002).

Em um trabalho feito com *Trypanosoma cruzi*, os resultados sugerem que um equilíbrio entre a regulação e as células T efetoras pode ser importante para o desenvolvimento e progressão da doença. Além disso, elevada porcentagem de células T  $CD4^+$  de memória central ( $T_{CM}$ ) em pacientes que apresentavam a forma indeterminada após estimulação sugere que estas células podem modular a resposta inflamatória do hospedeiro ao controlar a migração celular para os tecidos e podem induzir mecanismo imunorreguladores para proteger o hospedeiro contra resposta inflamatória exacerbada (FIUZA *et al.*, 2009).

Estas descobertas podem ser extrapoladas e explicar a observação de que em seres humanos com malária, as células de memória efetoras são adequadamente mantidas em condições de exposição repetida (FREITAS DO ROSARIO *et al.*, 2008, LANGHORNE *et al.*, 2009) ou são perdidas em seres humanos que se afastam de áreas endêmicas por tempo prolongado (SNOW *et al.*, 1997). Isto sugere que métodos de vacinação que aumente a produção e a sobrevivência de células mantenedoras das funções efetoras, podem ser promissores para gerar proteção contra a malária grave.

Com base no fundamento de que as células efetoras são precursoras das células de memória, tem sido proposta a ideia de que a célula T *naive* se diferencie em célula T

de memória central e posteriormente em célula de memória efetora (SALLUSTO *et al.*, 2004). Entretanto, permanece a pergunta: o aumento significativo de células de memória centrais durante a malária vivax poderia induzir um consequente aumento das células efetoras? Nossos dados demonstram que a maioria das células T CD4<sup>+</sup> de memória exibem um fenótipo de memória central não se esperando, portanto, a produção de qualquer uma das citocinas prototípicas da linhagem de células efetoras (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5) após as estimulações dos TCR (PEPPER *et al.*, 2011).

A avaliação das citocinas mostrou que a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 estão elevadas na malária causada por *P. vivax*. A participação destas citocinas tem sido bem descrita na malária causada por *P. falciparum*, porém, recentemente, FERNANDES e colaboradores (2008) mostraram níveis elevados de IFN- $\gamma$  em indivíduos infectados por *P. vivax* e por *P. falciparum*, mas observaram níveis elevados de IL-10 somente na infecção por *P. vivax*. A produção destas citocinas também foi observada em estudo *in vitro*. SIDDIQUI e colaboradores (2007) mostraram que houve produção de IFN- $\gamma$  e de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados por *P. vivax*. Recentemente, alguns estudos mostraram a produção de IFN- $\gamma$  na malária causada por *P. vivax*, porém não avaliaram a sua participação no controle da parasitemia. Em nosso estudo, não foi encontrada correlação entre o aumento desta citocina e a parasitemia. Portanto, não foi possível estabelecer a participação do IFN- $\gamma$  no controle da parasitemia e consequentemente na proteção antimalárica. O aumento de IL-10 sugere que a resposta anti-inflamatória pode estar atuando para regular a resposta pro-inflamatória, que participa tanto da ação direta para eliminação do parasito como pode contribuir para a fisiopatogenia da doença.

Um estudo recente (GONÇALVES *et al.*, 2012) confirmou resultados inicialmente obtidos pelo grupo (GONÇALVES *et al.*, 2010) onde foi possível observar os padrões de produção de citocinas em infecção sintomática sem complicação por *P. vivax* e *P. falciparum* e em co-infecções por ambas as espécies diagnosticadas em pacientes de uma mesma área endêmica brasileira (estado do Acre). Ao contrário da proposição de que *P. vivax* provoca mais inflamação do que *P. falciparum* (HEMMER *et al.* 2006; YEO *et al.*, 2002), o trabalho de GONÇALVES e colaboradores (2012) demonstrou que as respostas de citocinas inflamatórias na malária vivax foram semelhantes àquelas observadas para as infecções por *P. falciparum*. Além disso, este

estudo demonstrou que a resposta de citocinas predominantemente anti-inflamatórias na malária vivax clínica foi de curta duração.

Estudos demonstraram respostas predominantes de IL-10 nas infecções sintomáticas, mas não complicadas por *P. vivax* (GONÇALVES *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2008; COX-SINGH *et al.*, 2011; MEDINA *et al.*, 2011), mas suas principais fontes celulares permanecem desconhecidas. Células CD4<sup>+</sup> reguladoras adaptativas tipo 1 (Tr1), as quais não expressam CD25, CD127 ou FoxP3 na sua superfície, foram recentemente identificadas como a principal fonte de IL-10 em infecção murina experimental por *P. yoelii* (COUPER *et al.*, 2008). No entanto, em infecções com *P. chabaudi*, células T<sub>H1</sub> efetoras ativadas (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, ICOS<sup>high</sup>, e CD127<sup>high</sup>) foram as principais produtoras de IL-10 (FREITAS DO ROSARIO *et al.*, 2010).

No nosso trabalho a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10, para ambas as isoformas de CD45, apresentou-se elevada entre os pacientes infectados por *P. vivax* apontando a participação destas citocinas durante a infecção. Nossa hipótese é de que a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 pode estar associada à exposição natural ao parasito, promovendo a geração de células de memória que promoveriam a secreção de vários componentes imunorreguladores durante a infecção. Um estudo recente descreve que a quantidade de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  tem um valor de meia vida estimado em três anos, enquanto que a IL-10 produzida pelas células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> são estavelmente mantidas durante, pelo menos, seis anos após última infecção (WIPASA *et al.*, 2011). Curiosamente, a expressão concomitante de IFN- $\gamma$  e IL-10 em células de memória difere do padrão de produção de citocinas observado para células T CD4<sup>+</sup> (BUENO *et al.*, 2012) e células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> após re-estimulação antigênica (WIPASA *et al.*, 2011) durante a malária, onde a produção de IL-10 é reduzida em indivíduos infectados. Não obstante, a expressão destas citocinas, também descrita em infecções experimentais por *T. cruzi* (FLORES-GARCIA *et al.*, 2011) e por *Toxoplasma gondii* (JANKOVIC *et al.*, 2007), pode ser explicada como uma auto-regulação através de um *feedback* negativo via co-indução de IL-10 em associação à preexistência de IFN- $\gamma$  nas mesmas células (COPE *et al.*, 2011), resultando na produção de IL-10 pelas células Th1 (ASSENMACHER *et al.*, 1994 e DEL PRETE *et al.*, 1993).

A resposta imune na malária causada por *P. vivax* é caracterizada, portanto, pela participação de citocina do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ), que é importante para o controle

eficiente da densidade parasitaria (SIDDIQI *et al.*, 2007). A IL-10 participa da regulação da resposta pro-inflamatória desencadeada pelo IFN- $\gamma$ , bloqueando a síntese desta citocina e modulando a expressão de moléculas de MHC I e II, o que impede o desenvolvimento de resposta Th1 exacerbada, envolvidas com a patogênese da doença. A regulação de IFN- $\gamma$  por IL-10 também foi mostrada por BRUSTOSKI e colaboradores (2005), que observaram, ao adicionar anticorpos anti-IL-10 humana em cultura de células mononucleares do cordão umbilical estimuladas com eritrócitos infectados por *P. falciparum*, que a produção de IFN- $\gamma$  aumentou significativamente.

Demonstramos pela primeira vez na literatura, que indivíduos com malária vivax apresentam aumento significativo das células T CD4<sup>+</sup> de memória (CD45RO<sup>+</sup>). Entre estas células de memória, os pacientes infectados apresentaram um padrão de células de memória central, demonstrado pela expressão significativa de CCR7 e CD62L pelas células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. De fato, o tipo de célula de memória T CD4<sup>+</sup> é considerado importante para contribuir para a regulação ou para a doença (LANGHORNE *et al.*, 2008).

Além disso, o perfil observado das citocinas secretadas por células de pacientes evidenciou um significativo aumento da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 produzidos por estas células. Estes achados acrescentam informações importantes para o entendimento da resposta imune na infecção por *P. vivax*. Entretanto, estudos adicionais são também necessários para determinar a influência elevada ou mais baixa da exposição ao *P. vivax* em áreas endêmicas e se a indução de resposta de memória estaria associada com as recaídas naturais esperadas durante o ciclo de vida do *P. vivax*.

O padrão de ativação e migração de células de memória durante a infecção malárica parece refletir uma expansão das células T CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, que provavelmente estão deixando os órgãos linfóides secundários e se direcionando para a circulação onde se transformam em efetoras durante a migração até o sítio da infecção.

De uma forma geral, nossos resultados contribuem de forma significativa para o conhecimento das relações parasito-hospedeiro e para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na malária vivax e, conseqüentemente, podem gerar informações básicas na aquisição de resposta imune frente à infecção e com isso compreender um pouco mais essa relação parasito-hospedeiro.

## 7. CONCLUSÕES

- A infecção por *P. vivax* induz a expressão significativa das citocinas interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-10 (IL-10) por linfócitos T CD4<sup>+</sup> bem como o aumento das concentrações das subpopulações celulares CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>high</sup> e T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>high</sup>.
- A infecção por *P. vivax* induz a proliferação de células de memória centrais, fato este que merece mais investigação.
- Nenhuma correlção foi observada entre a parasitemia e as células de memória e nem com os parâmetros hematológicos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahamed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. Review, v. 272 (5258), p. 54-60, 1996.

Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda MV, Alecrim MGC. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v.16, p.1611-1614, 2009.

Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R, Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol*, v. 329, p. 858-862, 2006.

Amino R, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. V.12, p.:220–224, 2006.

Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria, *Trends in Parasitology*, v. 25, p.220-227, 2009.

Appay V, Papagno L, Spina CA, Hnasaasuta P, King A, Jones L, Ogg GS, Little S, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL. Dynamics of T cell responses in HIV infection. *J Immunol*. v. 168(7), p.3660-6, 2002.

Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes, *J Immunol*, v. 169, p. 2956-2963, 2002.

Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A, Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells, *European journal of immunology* v.24, p.1097-1101, 1994.

Awandare GA et al. Increased levels of inflammatory mediators in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria with respiratory distress. *J. Infect. Dis*, v. 194, p.1438–1446, 2006.

Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Trends Parasitol*, v. 48, p.4075-4083, 2004.

Baird JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol* v.23, p.533-539, 2007.

BaronV, Bouneaud C, Cumano A, Lim A, Arstila TP. The repertoires of circulating human CD8<sup>+</sup> central and effector memory T cell subsets are largely distinct. *Immunity* v.18, p.193–204, 2003.

Berenzon D, Schwenk RJ, Letellier L, Guebre-Xabier M, Williams J, et al. Protracted protection to *Plasmodium berghei* malaria is linked to functionally and phenotypically heterogeneous liver memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* v.171, p.2024–2034, 2003

Bergmann ES, Ballou RW, Krzych U. Detection of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T lymphocytes producing IL-4 in response to antigens on *Plasmodium falciparum* erythrocytes: an in vitro correlate of protective immunity induced with attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell Immunol*. v. 180, p. 143 e 152, 1997.

Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. v.281(1-2), p.65-78, 2003.

Brustoski K, Moller U, Kramer M, Petelski A, Brenner S, Palmer DR, Bongartz M, Kremsner PG, Luty AJF, Krzych U. IFN- $\gamma$  and IL- 10 Mediate Parasite-Specific Immune Responses os Cord Blood Cells Induced by Pregnancy-Associated *Plasmodium falciparum* Malaria. *J Immunol*. 174: 1738-1745, 2005.

Brown KN. Immunity to protozoal infections. *Proc Roy Soc Med*. 62: 301-302, 1969.

Bustamante J, Bixby L, Tarleton R. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8<sup>+</sup> T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* v.14, p.542–550, 2008.

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, v. 272(5258), p. 60-66, 1996.

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* v.123, p. 53-57, 2012.

Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, Youngman KR, Siani MA, Thompson DA, Wu L, Zlotnik A, Butcher EC. 6-C-Kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol*, v. 141(4), p. 1053-1059, 1998.

Carrolo M, Giordano S, Cabrita-Santos L, Corso S, Vigario AM, Leiriao P, Carapau D, Armas-Portela R, Comoglio PM, Rodriguez A, Mota MM. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection., *Nat. Med*, v.9, p.1363-9, 2003.

Chizzolini C, Trottein F, Bernard FX, Kaufmann MH. Isotypic analysis, antigen specificity, and inhibitory function of maternally transmitted *Plasmodium falciparum*-specific antibodies in Gabonese newborns. *Am J Trop Med Hyg*, v.45, p.57-64, 1991.

Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, et al. IL-10 from CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog* 4: e1000004, 2008.

Cox MJ, Kum DE, Tavul L, Narara A, Raiko A, et al. Dynamics of malaria parasitemia associated with febrile illness in children from a rural area of Madang, Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* v. 88, p.191-197, 1994.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S, Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production, *Journal of immunology* v.150, p.353-360, 1993.

Doolan, D. L., Hoffman, S. L. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8<sup>+</sup> T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol* v.163, p. 884-892, 1999.

Druilhe, P & Khusmith, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria immune status. *Infect Immun* 55:888-891, 1987.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Anu Rev Immunol*. v.16, p.201-23, 1998.

Egan, AF, Morris, J, Barnish, G, Allen, S, Greenwood, BM, Kaslow, DC, Holder, AA, Riley, EM. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis* v.173, p.765-769, 1996.

Ejigiri I, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current Opinion in Microbiology*, v.12, p.1-7, 2009.

Fadok VA, Chimini G. The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol*, v.13, p. 356-72, 2001.

Fernandes AAM, Carvalho LJM, Zanini GM, Ventura AMRS, Souza JM, Cotias PM, Silva-Filho IL, Daniel-Tadeu CT. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon Region. *Clin Vaccine Immunol*. v. 15, p. 650-658, 2008.

Flores-Garcia Y, Rosales-Encina JL, Satoskar AR, Talamas-Rohana P, IL-10-IFN-gamma double producers CD4<sup>+</sup> T cells are induced by immunization with an amastigote stage specific derived recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*, *Int J Biol Sci* v.7, p.1093-1100, 2011.

Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, v. 99(1), p. 23-33, 1999.

Freitas do Rosario AP, Muxel SM, Rodriguez-Malaga SM, Sardinha LR, Zago CA, et al. Gradual decline in malaria-specific memory T cell responses leads to failure to maintain long-term protective immunity to *Plasmodium chabaudi* AS despite persistence of B cell memory and circulating antibody. *J Immunol* v.181, p.8344–8355, 2008.

Freitas do Rosário AP, Sardinha LR, Castillo-Méndez SI, Zago CA, Rodriguez-Málaga SM, Mosig JMA, D'Império Lima, MR. Comparative Analysis of Activation Phenotype, Proliferation, and IFN- $\gamma$  Production by Spleen NK1.1<sup>+</sup> and NK1.1<sup>-</sup> T Cells During *Plasmodium chabaudi* AS Malaria *J Interferon Cytokine Res.* v. 30(6), p.417–426, 2010.

Garraud O, Poingt JP, Perraut R, Gysin J. Peripheral blood mononuclear cells in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*: characterization and functional aspects of T lymphocytes. *Res Immunol* 140:857-874, 1989.

Garraud O, Perraut R, Gysin J, Behr C, Dubois P, Bonnemains B, Jouin H, Michel JC, Pereira da Silva L. Manipulating blood T cells and B cells from squirrel monkeys: some technical considerations. *J Immunol Methods* 173:165- 173, 1994.

Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. v.101(11), p.4260-6, 2003.

Genton B, Al Yaman F, Beck HP, Hii J, Mellor S, et al. The epidemiology of malaria in the Wosera area, East Sepik Province, Papua New Guinea, in preparation for vaccine trials. II. Mortality and morbidity. *Ann Trop Med Parasitol* v.89, p. 377–390, 1995.

Golenda CF, Li J, Rosenberg R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci USA* v.94, p.6786-6791, 1997.

Gonçalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, 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* v.78, p.4763–4772, 2010.

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* 7(9): journal.pone.0044394, 2012

Good MF, Billsborough J. Human T-cell responses to malaria: mostly forgotten or committed to memory? *Parasitol Today*. v.10(8), p.316-9, 1994.

Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immuno*, v.23, p.69-99, 2005.

Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest* 118(4):1266-76, 2008.

Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci*. v. 107(43), p. 18640–18645, 2010.

Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, Kabaria CW, Tatem AJ, Manh BH, Elyazar IRF, Baird JK, Snow RW, Hay SI. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PloS Neglected Tropical Diseases*, v.4, p.774, 2010.

Hans D, Pattnaik P, Bhattacharyya A, Shakri AR, Yazdani SS, Sharma M, Choe H, Farzan M, Chitnis CE. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Molecular Microbiology*, v.55, p.1423-1434, 2005.

Hansen, D. S., Schofield, L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? *PLoS Pathog* 6:e1000771, 2010.

Harari A, Vallelian F, Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol*. v.34(12), p.3525-33, 2004.

Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* v.4, p.327-336, 2004.

Heller KN, Upshaw J, Seyoum B, Zebroski H, Munz C. Distinct memory CD4<sup>+</sup> T-cell subset mediate immune recognition of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in healthy virus carriers. *Blood*. v109(3), p.1138-46, 2007.

Hemmer CJ, Holst FG, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, et al. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health* v.11, p.817–823, 2006.

Hirunpetcharat C, Good MF. Deletion of *Plasmodium berghei*-specific CD4<sup>+</sup> T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* v.95, p.1715–1720, 1998.

Hogh B, Marbiah NT, Burghaus PA, Andersen PK. Relationship between maternally derived anti- *Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, w t Africa, in which malaria is highly endemic. *Infect Immun*, v.63, p.4034-8, 1995.

Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A, Conventional T-bet<sup>(+)</sup>Foxp3<sup>(-)</sup> Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection, *The Journal of experimental medicine* v.204, p.273-283, 2007.

Jangpatarapongsa K, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Cui L, Montgomery SM, et al. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microbes Infect* v.8, p.680–686, 2006

Jangpatarapongsa K, Xia H, Fang Q, Hu K, Yuan Y, et al. Immunity to Malaria in *Plasmodium vivax* Infection: A Study in Central China. *PLoS ONE* v. 7(9), 2012.

Kaech SM & Wherry EJ\* Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8<sup>+</sup> T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity*. v.27(3), p.: 393–405, 2007.

Kasehagen LJ, Mueller I, McNamara DT, Bockarie MJ, Kiniboro B, et al. Changing patterns of Plasmodium blood-stage infections in the Wosera region of Papua New Guinea monitored by light microscopy and high throughput PCR diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* v.75, p.588–596. (2006)

Kochar DK, Saxena V, Singh n, Kochar SK, Kumar S V, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerging Infectious Diseases*, v.11, p.132-134, 2005.

Krzych U, Schwenk J. The dissection of CD8 T cells during liver-stage infection. *Curr Top Microbiol Immunol* v.297, p.1–24, 2005.

Kurtzals, JA et al. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet*, v. 351, p. 1768–1772, 1998.

Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers, *Nat Immunol*, v. 9, p. 725-732, 2008.

Leitenberg D, Boutin Y, Lu DD, Bottomly K. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity*. v.10, p.701–711, 1999.

Li C, Sanni LA., Omer F, Riley E & Langhorne J. Pathology and mortality of *Plasmodium chabaudi* infection in iL-10-deficient mice is ameliorated by anti-TNF- $\alpha$  and exacerbated by anti-TGF- $\beta$  antibodies. *Infect. Immun*, v. 71, p. 4850–4856, 2003.

Linton PJ, Haynes L, Tsui L, Zhang X, Swain S. From naive to effector—alterations with aging. *Immunol Rev*. v.160, p.9–18, 1997.

Lunel F, Druilhe P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infect Immun* 57:2043-2049, 1989.

Malaguarnera L & Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis*. 2: 472-478, 2002.

Marsh K. & Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Paras Immunol*, v.28, p. 51–60, 2006.

Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* v.291, p.2413–17, 2001.

Martin DL, Tarleton RL. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* v.174, p.1594–1601, 2005.

Mavoungou E, Luty AJ, Kremsner PG. Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. *Eur Cytokine Netw* v.14, p. 134–142, 2003.

Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, 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* 10: 264, 2011.

Meding SJ, Langhorne J. CD4+ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur J Immunol* v.21, p.1433–1438, 1991.

Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.64, p.97-106, 2001.

Michie CA, Mclean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, v. 360(6401), p. 264-265, 1992.

Michon P, Cole-Tobian JL, Dabod E, Schoepflin S, Igu J, et al. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg* v.76, p. 997–1008, 2007.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v.415, p.673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil (SIVEP) 2009. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder\\_malaria\\_2008\\_final.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf). Acesso em: 21 jan 2011.

Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and Immunity*, v.72, p.154-158, 2004..

Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JCR, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodríguez A. Migration of *Plasmodium* through cells before infection. *Science*, v.291, p.141-144, 2001.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, Del Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, v.9, p.555-566, 2009.

Nardin, E. H., Nussenzweig, R. S. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu Rev Immunol* v.11, p.687-727, 1993.

Nussenblatt V, Mukasa G, Metzger A, Ndeezi G, Garrett E, Semba RD. Anemia and Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Erythropoietin Levels among Children with Acute, Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *Am Society for Microbiol.* 8: 1164-1170, 2001.

Obar JJ, Fuse S, Leung EK, Bellfy SC, Usherwood EJ. Gamma herpes virus Persistence Alters Key CD8 T-Cell Memory Characteristics and Enhances Antiviral Protection. *J Virol* v.80, p.8303–8315, 2006.

Ocana-Morgner, C., Mota, M. M., Rodriguez, A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med* v.197, p.143-151, 2003.

Ojo-Amaize, E. A., Vilcek, J., Cochrane, A. H., Nussenzweig, R. S. *Plasmodium berghei* sporozoites are mitogenic for murine T cells, induce interferon, and activate natural killer cells. *J Immunol* v.133, p.1005-1009, 1984.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, v.9, 115, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. World Health Organization 2004. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf) Acesso em: 13 set 2012.

OMS. Organização Mundial da Saúde. World Health Organization 2012. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html) Acesso em: 17 jan 2013.

Osier FH, Polley SD, Mwangi T, Lowe B, Conway DJ, et al. Naturally acquired antibodies to polymorphic and conserved epitopes of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein. *Parasite Immunol* v.29, p.387–394, 2007.

Palmer DR, Krzych U. Cellular and molecular requirements for the recall of IL-4-producing memory CD4(b)CD45RO(b)CD27(-) T cells during protection induced by attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Eur. J. Immunol**, v.32 p.652 e 661, 2002.

Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., Halmen, K. A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D. C., Gazzinelli, R. T., Golenbock, D. T. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proc Natl Acad Sci** v.104, p.1919-1924, 2007.

Peakman M, Mahalingam M, Leslie RD, Vergani D. Co-expression of CD45RA (naive) and CD45R0 (memory) T-cell markers. **Lancet**. v.12, p.343, 1994.

Pepper M, Jenkins MK, Origins of CD4(+) effector and central memory T cells, **Nature immunology** v.12, p.467-471, 2011.

Perkmann T, Winkler H, Graninger W, Kremsner PG, Winkler S. Circulating levels of the interleukin (IL)-4 receptor and of IL-18 in patients with *Plasmodium falciparum* malaria. **Cytokine**. 29: 153-158, 2005.

Pombo, DJ et al. Imunidade à malária após a administração de ultra-baixa dose de glóbulos vermelhos infectados com *Plasmodium falciparum*. **Lancet**, v. 360, p. 610-617, 2002.

Pouniotis, D. S., Proudfoot, O., Bogdanoska, V., Scalzo, K., Kovacevic, S., Coppel, R. L., Plebanski, M. Selectively impaired CD8+ but not CD4+ T cell cycle arrest during priming as a consequence of dendritic cell interaction with *Plasmodium*-infected red cells. **J Immunol** v.175,p.3525-3533, 2005.

Prakash, D. et al . Clusters de citocinas determinam a severidade da malária em *Plasmodium falciparum* pacientes infectados em áreas endêmicas de Central da Índia. **J. Infectar. Dis**, v. 194, p.198-207, 2006.

Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Reviews*, v.4, p.849-856, 2006.

Reece W, Pinder M, Gothard P, Milligan P, Bojang K, et al. A CD4+ Tcell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease. *Nat Med* v.10, p.406–410, 2004.

Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK..Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* v.410, p.101–5, 2001.

Ribeiro CD. Polyclonal B-cell activation (PBA) what have we learned from the study of malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v.83, p.633–648, 1988.

Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol* v.14, p.321–337, 1992.

Riley, E. M., Wahl, S., Perkins, D. J., Schofield, L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol* 28:35-49, 2006.

Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJ, et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med* v.361, p.468–477, 2009.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, v. 401 (5754), p. 708-712, 1999.

Sallusto F & Lanzavecchia A. Lead and follow: the dance of the dendritic cell and T cell. *Nature Immunology* v.5, p.1201 – 1202, 2004.

Salwati E, Minigo G, Woodberry T, Piera KA, de Silva HD, et al. Differential cellular recognition of antigens during acute *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *J Infect Dis* v.203, p.1192–1199, 2011.

Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control. *Trends Parasitol* v.20, p.192–198, 2004.

Scopel KG, 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 parasitemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malária Journal*, v. 3, 2004.

Sehgal VM, Siddiqui WA, Alpers MP. A seroepidemiological study to evaluate the role of passive maternal immunity to malaria in ants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.83 Suppl, p.105-6, 1989.

Serghides, L., Smith, T. G., Patel, S. N., Kain, K. C. CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol* 19:461-469, 2003.

Siddiqui AA, Singh N, Sharma YD. Expression and purification of a *Plasmodium vivax* antigen – PvTARAg55 tryptophan – and alanine-rich antigen and its immunological responses in human subjects. *Vaccine*. v.26, p. 96- 107, 2007.

Sinigaglia F, Richard J, Pink L. Human T lymphocyte clones specific for malaria (*Plasmodium falciparum*) antigens. *EMBO J*. 4: 3819-3822, 1985.

Skorokhod, O. A., Alessio, M., Mordmuller, B., Arese, P., Schwarzer, E. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol* 173:4066-4074, 2004

Smalley ME, Sinden RE: *Plasmodium falciparum* gametocytes. Their longevity and infectivity. *Parasitology*, v.74, p.1-8, 1977.

Smith T, Hii JL, Genton B, Muller I, Booth M, et al. Associations of peak shifts in age-prevalence for human malarials with bednet coverage. *Trans R Soc Trop Med Hyg* v.95, p.1–6, 2001.

Snounou G, White NJ. The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends Parasitol* v.20, p.333–339, 2004.

Snow RW, Omumbo JA, Lowe B, Molyneux CS, Obiero JO, et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet* 349: 1650–1654, 1997.

Snow, RW, Trapézio, JF & Marsh K. O passado, presente e futuro de mortalidade infantil malária na África. *Trends Parasitol.* v.17, p. 593-597, 2001.

Soldati D, Foth BJ, Cowman AF. Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends in Parasitology*, v.20, p.567-574, 2004.

Srisurapanon S, Wiwattanakul S, Apibal S, Suwannuruk R, Sujimanaskul S, et al. Lymphocyte subpopulations in malaria infected individuals living in an endemic area. Southeast Asian. *J Trop Med Public Health* v.34, p. 310–315, 2003.

Stevenson MM. & Riley M. innate immunity to malaria. *Natl. Rev. Immunol*, v. 4, p.169–180, 2004.

Struik SS, Riley EM. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev.* v.201, p.268-90. Review, 2004.

Sturm A, Amino R, Van De Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v. 313, p. 1287-1290, 2006.

Subbarao SK. Centenary celebrations article: *Plasmodium knowlesi*: from macaque monkeys to humans in South-east Asia and the risk of its spread in India. *J Parasit Dis.* v.35(2), p.87-93, 2011.

Tauil P, Daniel-Ribeiro C: Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. *Res Rev Parasitol*, v. 58, p.163-167, 1998.

Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* v.5, 2008.

Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M. Differentiation of human CD8<sup>+</sup> T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol*. v.168(11), p.5538-50, 2002.

Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R, Biondi G. Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *Am Society for Microbiol*. 9: 348-351, 2002.

Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol*, Review v. 12, p. 85-116, 1994.

Tsuji MA. Retrospective evaluation of the role of T cells in the development of malaria vaccine. *Exp Parasitol* v.126, p. 421–425, 2010.

Urban B. et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*, v. 400, p. 73–77, 1999.

Urban B. et al. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* v. 98, p. 2859–2861, 2001.

Urban BC, Roberts DJ. Inhibition of T cell function during malaria: implications for immunology and vaccinology. *J Exp Med*. v.197(2), p.137-41, 2003.

Urban, B. C., Cordery, D., Shafi, M. J., Bull, P. C., Newbold, C. I., Williams, T. N., Marsh, K. The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria. *Infect Immun* 74:6700-6706, 2006.

Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, et al. Virus-specific CD8<sup>+</sup> lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* v.76, p.12423–12434, 2002.

Uzonna JE, Wei G, Yurkowski D, Bretscher P. Immune Elimination of *Leishmania major* in Mice: Implications for Immune Memory, Vaccination, and Reactivation Disease. *J Immunol* v.167, p.6967–6974, 2001.

Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemissen AM. Circulating tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells in melanoma patients contain a CD45RACCCR7<sup>+</sup> effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res.* v.62, p.1743–50, 2002.

Vanderberg JP, Frevert U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol.* v.34, p.991–996, 2004.

Zaph C, Rook K, Goldschmidt M, Mohrs M, Scott P, et al. Persistence and Function of Central and Effector Memory CD4<sup>+</sup> T Cells following Infection with a Gastrointestinal *Helminth*. *J Immunol* v.177, p.511–518, 2006.

Walther, M., Jeffries, D., Finney, O. C., Njie, M., Ebonyi, A., Deininger, S., Lawrence, E., Ngwa-Amambua, A., Jayasooriya, S., Cheeseman, I. H., Gomez-Escobar, N., Okebe, J., Conway, D. J., Riley, E. M. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog* 5:e1000364, 2009.

Webster D, Hill AV. Progress with new malaria vaccines. *Bull World Health Organ* 81:902-909, 2003.

Weiss GE, Crompton PD, Li S, Walsh LA, Moir S, et al. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *J Immunol* v.183, p. 2176–2182, 2009.

Weiss GE, Clark EH, Li S, Traore B, Kayentao K, et al. A positive correlation between atypical memory B cells and *Plasmodium falciparum* transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. ***PLoS One*** 6, 2011.

Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, von Andrian UH, Ahmed R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. ***Nat Immunol.*** v.4(3), p. 225-34, 2003.

Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** v.101, p.16004–16009, 2004.

Wipasa J, Okell L, Sakkhachornphop S, Suphavilai C, Chawansuntati K, Short-Lived IFN- $\gamma$  Effector Responses, but Long-Lived IL-10 Memory Responses, to Malaria in an Area of Low Malaria Endemicity. ***PLoS Pathog*** v. 7(2), 2011.

Woodberry T, Minigo G, Piera KA, Hanley JC, de Silva HD, et al. Antibodies to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 5 in Indonesia: species-specific and cross-reactive responses. ***J Infect Dis*** v.198, p. 134–142, 2008.

Wykes, M., Good, M. F. A case for whole-parasite malaria vaccines. ***Int J Parasitol*** 37:705-712, 2007.

Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. ***Cellular Microbiology***, v.9, p.1215-1222, 2007.

Yeo TW, Lampah DA, Tjitra E, Piera K, Gitawati R, et al. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. ***J Infect Dis*** 202: 109–112, 2010.

## 9. ANEXO

Questionário padrão aplicado aos pacientes que foram atendidos nos ambulatórios Da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (AM).

PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DE TRATAMENTO DE PACIENTES COM MALÁRIA - HUJM			
Número:	Data: ___/___/___	Nome:	
Endereço de residência (colocar 3 pontos de referência):			
Rua:			
Bairro	<input type="checkbox"/> Cuiabá	<input type="checkbox"/> V. Grande	<input type="checkbox"/> Outro
Fone 1:	Fone 2:	Fone 3:	Fone 4:
Solicitar outros nomes e endereços de pessoas para facilitar a localização:			
Idade:	Sexo: 1 <input type="checkbox"/> M 2 <input type="checkbox"/> F	Cor: 1 <input type="checkbox"/> Branca 2 <input type="checkbox"/> Negra 3 <input type="checkbox"/> Amarela 4 <input type="checkbox"/> Parda	
Escolaridade: 1 <input type="checkbox"/> analfabeto 2 <input type="checkbox"/> 1º grau 3 <input type="checkbox"/> 2º grau 4 <input type="checkbox"/> 3º grau			Ocupação:
Se mulher, possibilidade de gestação? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Pretende viajar nos próximos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Pretende viajar nos próximos 6 meses? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Quantas malárias já teve na vida?	
Idade da primeira malária:		Há quanto tempo teve a última malária ( <b>em meses</b> )?	
Viajou para área endêmica após o último tratamento? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Tomou corretamente a medicação da última malária? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Teve diarreia ou vômito durante o tratamento? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Espécie da última malária: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista			
Espécies que já teve já vida: 1 <input type="checkbox"/> F 2 <input type="checkbox"/> V 3 <input type="checkbox"/> Mista 4 <input type="checkbox"/> Não sabe			
Quanto tempo você viveu em área endêmica (especificar de foi permanente ou esporádica) ( <b>em dias</b> ):			
Usou algum medicamento nos últimos 10 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N		Quais?	
Há quantos dias está com sintomas?		<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Calafrio <input type="checkbox"/> Sudorese <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> Epigastralgia <input type="checkbox"/> Tontura <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Vômito <input type="checkbox"/> Fraqueza <input type="checkbox"/> Hiporexia <input type="checkbox"/> Colúria Temperatura axilar se tiver com febre hoje:	
Febre nos últimos 7 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Febre nos últimos 30 dias? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Em qual município pegou malária?			UF:
Deixou de fazer atividades por causa da malária? 1 <input type="checkbox"/> S 2 <input type="checkbox"/> N			
Principais achados físicos:			