RAQUEL MÜLLER GONÇALVES LOPES

Caracterização de linfócitos T CD4⁺ que expressam
moléculas reguladoras e fontes celulares de
interleucina 10 na malária humana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

RAQUEL MÜLLER GONÇALVES LOPES

Caracterização de linfócitos T CD4⁺ que expressam
moléculas reguladoras e fontes celulares de interleucina 10
na malária humana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lopes, Raquel Müller Gonçalves.

Caracterização de linfócitos T CD4+ que expressam moléculas reguladoras e fontes celulares de interleucina 10 na malária humana / Raquel Müller Gonçalves Lopes. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Malária humana.

Versão do título para o inglês: Characterization of T CD4+ lymphocytes expressing regulatory molecules and cellular sources of interleukin 10 in human malaria.

1. Malária 2. Linfócito T 3. Citocinas 4. Interleucina 10 5. Plasmodium 6. Imunologia celular I. Ferreira, Prof. Dr. Marcelo Urbano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0122/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raquel Müller Gonçalves Lopes.

Título da Tese: Caracterização de linfócitos T CD4+ que expressam moléculas reguladoras e fontes celulares de interleucina 10 na malária humana.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 03 de setembro de 2010.

PARECER 954/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 19.08.2010 **APROVOU** o projeto intitulado: "*Regulação da resposta imune celular na malária humana: o papel das células T-reg CD4+CD25+*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. **MARCELO URBANO FERREIRA** e a aluna **RAQUEL MULLER GONÇALVES**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em
19.08.2011

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais, **José Francisco e Elvira**, pelo amor e por estarem sempre ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Ao final de exatos quatro anos e quatro meses do início da execução deste trabalho, só posso agradecer a **Deus** por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais, tão competentes e tão bondosas. Como (quase) todo trabalho de pesquisa, este teve inúmeras intencorrências e hoje, ao pensar em tudo o que aconteceu, me sinto tão abençoada por Deus, pois Ele colocou em minha vida as pessoas certas, nos momentos certos. Obrigada Senhor, pela saúde, proteção, sabedoria e pelo seu amor inigualável!

Gostaria de agradecer ao meu estimado orientador, Prof. Dr. **Marcelo Urbano Ferreira**, por contribuir diariamente para minha formação profissional e pela oportunidade, tão gratificante e inigualável, de conhecer a área endêmica de malária. Marcelo, para mim tu és um exemplo de bondade, generosidade, competência e dedicação. Obrigada pela disponibilidade irrestrita, pela preocupação com meu futuro profissional. Sinto-me extremamente honrada por ser sua aluna.

Um agradecimento especial a **Nathália Ferreira Lima**, minha “comadre”, colega e amiga/irmã do coração, que foi meu braço esquerdo (e às vezes o direito também) durante vários experimentos. Tu és e sempre será a minha dupla favorita de trabalho!

Agradeço a Dra. **Karina Carvalho Salmazi**, que muito além de uma colaboradora, contribuiu grandemente em minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. **Esper Kallás** pelo acesso irrestrito ao seu laboratório e a todos os colaboradores do LIM60, da Faculdade de Medicina da USP, especialmente a Helena, Nádila, Priscila, Angélica e Cláudia que me auxiliaram em muitos momentos e fizeram com que eu me sentisse em meu próprio laboratório enquanto estive no LIM60.

Aos colegas de laboratório: **Melissa Bastos, Camilla Batista, Pablo Fontoura, Susana Barbosa, Vanessa Nicolete, Priscila Thihara, Bianca Cechetto, Danielle Vega e Jaques Franco**. Um agradecimento especial a **Maria José Menezes (Zezé)**, por seu suporte em vários momentos durante a execução deste projeto. Pessoal, obrigada pelo apoio, ajuda e pela amizade.

Ao Prof. Dr. **Luis Carlos Ferreira**, do departamento de Microbiologia da USP, pela confiança e acesso ao Citômetro de Fluxo. Um agradecimento especial aos seus alunos **Bruna e Eduardo**.

Ao **Dr. Luiz Sardinha** que me auxiliou, de maneira muito competente, na execução das dosagens dos sobrenadates de cultura por CBA.

Aos **pacientes e controles imunes**, sem os quais este trabalho não seria executado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro** do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade da realização do doutorado.

Aos professores **Dr. Gil Benard**, **Dr. Niels Olsen** e **Dr. Cláudio Marinho** pela participação em meu exame de qualificação e pelas suas excelentes sugestões.

À **FAPESP**, pelo suporte financeiro, imprescindível para realização deste projeto.

Por fim, aqueles que são as pessoas mais importantes da minha vida...

Meu pai, **José Francisco**, e minha mãe, **Elvira**, por cuidarem de mim mesmo eu estando longe, pelo seu amor, por seu exemplo; meus amados irmãos, **André** e **Daniela**, meu cunhado **Luis** e aos meus sobrinhos queridos, **Caio** e **Rafael**... Obrigada pela benção de fazer parte dessa família! Obrigada por compreenderem minha ausência e pelo apoio na realização dos meus sonhos! Saibam que cada conquista minha é mérito de vocês!

Meu marido, **Vitor**, que torna os meus dias muito mais felizes e com quem divido essa conquista!! Meu amor, teu apoio e compreensão foram essenciais para que eu me dedicasse quase que exclusivamente, nos últimos meses, na preparação desta tese!

RESUMO

Gonçalves Lopes RM. Caracterização de linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas reguladoras e fontes celulares de interleucina 10 na malária humana. [Tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Controlar a infecção sanguínea sem induzir patologia requer um equilíbrio delicado entre respostas pró- e anti-inflamatórias. As células T reguladoras clássicas (T_{reg}), fenotipicamente definidas como CD4⁺CD25^{high}CD127-FOXP3⁺, são cruciais para este equilíbrio, mas outros subtipos celulares que expressam moléculas reguladoras e produzem IL-10 podem desempenhar papel imunomodulador na malária. Neste trabalho, utilizamos marcadores de ativação celular (CD69 e HLA-DR) e de atividade reguladora (CD39, CTLA-4, OX40, GITR e TNFRII) para caracterizar populações de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) em indivíduos infectados por *P. falciparum*, *P. vivax* ou co-infectados por ambas as espécies, bem como em controles saudáveis de uma área endêmica de malária na Amazônia Brasileira. A análise de PBMCs, por citometria de fluxo multiparamétrica, de 63 pacientes com malária mostrou aumento da proporção de células CD4⁺ que expressam CTLA-4, TNFRII, GITR, OX40 e CD69, em comparação com 15 controles não-infectados. Embora os controles apresentassem maior proporção de T_{reg} clássicas circulantes do que os pacientes, a proporção de T_{reg} que expressam CTLA-4 (todos os pacientes) e OX40 (malária vivax) aumentou durante a malária aguda. Concluimos que a malária vivax induziu duas subpopulações principais de T_{reg}, uma expressando CTLA-4 (uma molécula de superfície que inibe a ativação de células T) e a outra expressando OX40 (uma molécula co-estimulatória que pode suprimir a atividade supressora da T_{reg}). Verificamos também se as concentrações plasmáticas de sete citocinas e de receptores solúveis do fator de necrose tumoral (TNF) estavam associadas a desfechos clínicos e laboratoriais, a partir da análise de infecções agudas não-complicadas por *P. vivax* (n = 85), *P. falciparum* (n = 30), ou ambas as espécies (n = 12), e de 45 pacientes assintomáticos com baixa parasitemias de *P. vivax*. A malária vivax sintomática, embora apresentasse paroxismos mais intensos que as infecções por *P. falciparum* ou ambas as espécies, não se caracterizou por um desequilíbrio pró-inflamatório. Ao contrário, observamos nestes pacientes níveis mais elevados da citocina reguladora interleucina (IL)-10, correlacionados positivamente com a densidade parasitária, bem como razões IL-10/TNF- α , IL-10/interferon (IFN)- γ , IL-10/IL-6 e sTNFRII/TNF- α mais elevadas em comparação com os demais grupos de pacientes. Os níveis de citocinas reguladoras retornaram aos valores normais após 28 dias da eliminação do *P. vivax* pelo tratamento. Finalmente, pacientes assintomáticos com baixa parasitemias de *P. vivax* apresentaram níveis significativamente mais baixos de citocinas inflamatórias e reguladoras do que os pacientes com malária clínica devida a outras espécies. Mostramos que diferentes populações de PBMCs, provenientes de pacientes com malária e controles saudáveis, produzem IL-10 após a estimulação *ex vivo* com phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) e ionomicina em comparação com o estímulo com lipopolissacarídeo (LPS). A grande maioria das PBMCs de pacientes com malária e de controles saudáveis que produziram IL-10 após 5 horas da

estimulação com PMA e ionomicina consistia de células T; até 30% destas eram células CD4⁺CTLA-4⁺. Em contraste, monócitos de pacientes com malária vivax e controles saudáveis, mas não aqueles de pacientes com malária falciparum, foram a principal fonte de IL-10 após a estimulação *ex- vivo* das PBMCs com LPS por 12 horas.

Palavras- chave: Malaria humana. Linfócitos T CD4⁺ reguladores. Citocinas. Fontes celulares de IL-10.

ABSTRACT

Gonçalves Lopes RM. Characterization of T CD4⁺ lymphocytes expressing regulatory molecules and cellular sources of interleukin 10 in human malaria. [Ph. D. thesis (Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Clearing blood-stage malaria parasites without inducing major host pathology requires a finely tuned balance between pro- and anti-inflammatory responses. Classical regulatory T (T_{reg}) cells, phenotypically defined as CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺, are crucial to maintain such a balance, but other T cell subtypes that express regulatory molecules and produce IL-10 can also play an immunomodulatory role in malaria. Here, we used markers of cell activation (CD69 and HLA-DR) and regulatory activity (CD39, CTLA-4, OX40, GITR, and TNFRII) to characterize peripheral-blood mononuclear cell (PBMCs) subpopulations in individuals infected with *P. falciparum*, *P. vivax* or co-infected with both species and in healthy controls living in an area of unstable malaria endemicity in the Brazilian Amazon. Multiparameter flow cytometry analysis of PBMCs from 63 malaria patients and 15 malaria-exposed but non-infected controls showed increased proportions of CD4⁺ cells expressing CTLA-4, TNFRII, GITR, OX40 and CD69 in acutely infected patients. Although controls had higher proportions of circulating classical T_{reg} than malaria patients, the proportion of T_{reg} expressing CTLA-4 (all patients) and OX40 (*vivax* patients) increased during acute malaria. Therefore, *vivax* malaria appears to induce two main subpopulations of T_{reg} cells, one expressing a surface molecule that inhibits T-cell activation (CTLA-4) and another expressing a co-stimulatory molecule that might abolish the suppressive activity of T_{reg} (OX40). We also measured plasma concentrations of seven cytokines and two soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors, and evaluated clinical and laboratory outcomes, in acute uncomplicated infections with *P. vivax* (n = 85), *P. falciparum* (n = 30), or both species (n = 12), and in 45 asymptomatic carriers of low-density *P. vivax* infection. Symptomatic *vivax* malaria patients, compared to those infected with *P. falciparum* or both species, had more intense paroxysms, but they had no clear association with a pro-inflammatory imbalance. To the contrary, these patients had higher levels of the regulatory cytokine interleukin (IL)-10, whose concentrations correlated positively with parasite density, and elevated IL-10/TNF- α , IL-10/interferon (IFN)- γ , IL-10/IL-6 and sTNFRII/TNF- α ratios, compared to *falciparum* or mixed-species malaria patients. *Vivax* malaria patients had the highest levels of circulating soluble TNF receptor sTNFRII. Levels of regulatory cytokines returned to normal values 28 days after *P. vivax* clearance following chemotherapy. Finally, asymptomatic carriers of low *P. vivax* parasitemias had substantially lower levels of both inflammatory and regulatory cytokines than did patients with clinical malaria due to either species. We also found that different PBMC populations from malaria patients and healthy controls produce IL-10 after *ex-vivo* stimulation with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and ionomycin compared with lipopolysaccharide (LPS) stimulation. The vast majority of PBMC from malaria patients and healthy controls that produced IL-10 after 5 hours stimulation with PMA and ionomycin were T cells; up to 30% of them

were CD4⁺CTLA-4⁺ cells. In contrast, monocytes from vivax malaria patients and healthy controls, but not those from falciparum malaria patients, were the main source of IL-10 after *ex-vivo* LPS stimulation of PBMC for 12 hours.

Keywords: Human malaria. Regulatory CD4⁺ T cell. Cytokines. Cellular sources of IL-10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Registro de casos de malária no Brasil entre 1959-2012.....	24
Figura 2 - Ciclo de vida dos plasmódios que infectam o homem.....	26
Figura 3 - A área de assentamento agrícola recente, Remansinho, pertencente ao município de Lábrea-AM.....	41
Figura 4 - Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39 e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFR2 e CTLA-4.....	48
Figura 5 - Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39, e os marcadores de atividade reguladora (CTLA-4, GITR e OX40).....	49
Figura 6 - Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39, e células T _{reg} (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127-FOXP3 ⁺) que expressam os marcadores de memória.....	50
Figura 7 - Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T _{reg} que expressam OX40, GITR, CTLA-4, TNFR2 e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69).....	51
Figura 8 - Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que expressam OX40, GITR, CTLA-4, TNFR2 e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69).....	52
Figura 9 - Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que expressam os marcadores de memória.....	53
Figura 10 - Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ produtoras de IL-10 intracelular.....	59
Figura 11 - Estratégia de análise utilizada para definir o percentual de linfócitos T, T CD4 ⁺ , T CD4 ⁺ CD45RO ⁺ e T CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺ responsável pela produção de IL-10 a partir das PBMCs viáveis.....	60
Figura 12 - Estratégia de análise utilizada para definir monócitos produtores de IL-10 intracelular.....	61

Figura 13 - Estratégia de análise utilizada para definir o percentual de monócitos CD14 ⁺ responsável pela produção de IL-10 a partir das PBMCs viáveis.....	62
Figura 14 - Estratégia de análise utilizada para avaliar a proliferação de linfócitos, linfócitos T, linfócitos T CD4 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺	65
Figura 15 - Correlação entre a proporção de células CD4 ⁺ e parasitemia.....	80
Figura 16 - Correlação entre a proporção de células T _{reg} (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127-FOXP3 ⁺) e parasitemia.....	81
Figura 17 - Proporção de PBMCs IL10 ⁺ de acordo com o estímulo e o tempo de cultivo.....	97
Figura 18 - Concentração de IL10 (pg/mL) nos sobrenadantes de cultura de acordo com o estímulo e o tempo de cultivo.....	108
Figura 19 - Proporção de linfócitos em proliferação após o estímulo com PHA-P.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores de células T reguladoras.....	32
Tabela 2 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4 ⁺ que expressam CTLA-4, TNFR ^{II} e moléculas com potencial efeito ativador....	45
Tabela 3 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4 ⁺ que expressam moléculas de atividade reguladora.....	45
Tabela 4 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4 ⁺ que expressam marcadores de memória.....	46
Tabela 5 - Volume dos anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4 ⁺	46
Tabela 6 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados na identificação de subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ produtores de IL-10 intracelular.....	56
Tabela 7 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados para identificar monócitos produtores de IL-10 intracelular.....	56
Tabela 8 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da proliferação celular.....	64
Tabela 9 - Características demográficas, clínicas e hematológicas dos participantes do estudo.....	68
Tabela 10 - Características hematológicas em amostras pareadas de fase aguda e convalescente da infecção por <i>P. vivax</i>	71
Tabela 11 - Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ que expressam marcadores de atividade moduladora, de ativação e de memória.....	73
Tabela 12 - Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127-FOXP3 ⁺ (T _{reg}) que expressam marcadores de atividade moduladora, de ativação e de memória.....	75
Tabela 13 - Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ que são subpopulações de T _{reg} (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127-FOXP3).....	77
Tabela 14 - Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ que expressam marcadores de atividade moduladora e de ativação na fase aguda e convalescente da infecção por <i>P. vivax</i>	78

Tabela 15 - Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127-FOXP3 ⁺ (T _{reg}) que expressam marcadores de atividade moduladora e de ativação na fase aguda e convalescente da infecção por <i>P.vivax</i>	79
Tabela 16 - Características demográficas, clínicas e hematológicas dos participantes do estudo.....	83
Tabela 17 - Níveis absolutos e relativos de citocinas dos participantes do estudo.....	86
Tabela 18 - Níveis de citocinas em amostras pareadas de fase aguda e convalescente da infecção por <i>P. vivax</i>	90
Tabela 19 - Proporção de linfócitos que são IL-10 ⁺ na infecção por <i>Plasmodium</i> e controles não-infectados.....	93
Tabela 20 - Proporção de monócitos na infecção por <i>Plasmodium</i> e controles não-infectados.....	95
Tabela 21 - Proporção de PBMCs produtoras de IL-10 na infecção por <i>Plasmodium</i> e controles não-infectados.....	100
Tabela 22 - Proporção de monócitos em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por <i>P.vivax</i>	101
Tabela 23 - Proporção de linfócitos produtores de IL-10 em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por <i>P.vivax</i>	103
Tabela 24 - Proporção de PBMCs produtoras de IL-10 em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por <i>P.vivax</i>	105
Tabela 25 - Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com PMA combinado com Ionomicina e LPS.....	107
Tabela 26 - Proporções de subpopulações de linfócitos em proliferação.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

χ^2 - qui-quadrado (teste estatístico)

AC - Acre

AICD - Morte celular induzida por ativação, do inglês *Activation-induced cell death*

AM - Amazonas

AMP - Adenosina monofosfato

APC - Aloficocianina

APCCy7- Aloficocianina *Cy-chrome 7*

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

ATP- Adenosina trifosfato

BSA - Albumina sérica bovina

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

CCR - Receptor de quimiocina

CD- Grupos de diferenciação (moléculas de superfície celular que servem como marcadores; do inglês *cluster of differentiation*)

CEP - Comitê de ética em pesquisas com seres humanos

CO₂ - Dióxido de carbono

CTLA-4 - Antígeno-4 do Linfócito T Citotóxico

DCs - Células dendríticas

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECD - do inglês *R Phycoerythrin-Texas Red®-X*

ECM- Malária cerebral experimental

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Imunoensaio enzimático

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

FOXP3 - do inglês *forkhead box P3*

FSC - do inglês *Forward Scatter*

g - grama

g - Unidade de aceleração gravitacional

GITR - Receptor de TNF induzido por glicocorticóide
H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico
HCl - Ácido Clorídrico
HLA-DR - Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
ICOS - Co-estimulador induzível de célula T
IL - Interleucina
INF- γ - Interferon- gama
iRBC - Eritrócitos infectados
km - quilômetros
L - Litro
LAP - Peptídeo associado à latência
LPS - Lipopolissacarídeo
M - molaridade
mg - miligrama
mL - mililitros
mM - milimolar
N - Normalidade ou concentração normal
NaN₃ - Ázida sódica
NaOH - Hidróxido de Sódio
ng - nanogramas
NK - Célula *Natural Killer*
nm - nanometro
°C - Graus Celsius
OX40 (CD134) - membro da superfamília dos receptores de TNF
PBMCs - Células mononucleares de sangue periférico
PBS - Tampão Salino Fosfatado
PD-1 - do inglês *Programmed cell death protein 1*
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PE - Ficoeritrina
PECy7 - Ficoeritrina *Cy-chrome 7*
PerCPCy5.5 - do inglês *Peridinin chlorophyll cyanine dye*

PE-TR - do inglês *Phycoerythrin-Texas Red*

pg - picogramas (unidade de medida de massa)

PHA-P - do inglês *Phytohemagglutinin-P*

PMA - phorbol-12-myristate-13-acetate

RPMI - Meio de Cultura Celular (Roswell Park Memorial Institute)

RO - Rondônia

rpm - rotações por minuto

SAv - HRP- do inglês *streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*

SFB - Soro fetal bovino

SSC - Side Scatter

sTNFR1 - Receptor solúvel I do Fator de Necrose Tumoral

sTNFR2 - Receptor solúvel II do Fator de Necrose Tumoral

TCR - Receptor da célula T

T γ/δ - Linfócito T gama-delta

TA - Temperatura ambiente

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

Th1 - Linfócito T auxiliador (*helper*) Th1

Th2 - Linfócito T auxiliador (*helper*) Th2

Th3 - Linfócito T regulador Th3 (Linfócito T *helper* com função reguladora)

Th17 - Linfócito T auxiliador (*helper*) Th17

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- alpha

TNFR1 - Receptor I do Fator de Necrose Tumoral

TNFR2 - Receptor II do Fator de Necrose Tumoral

Tr1 - Linfócito T regulador do tipo 1

T_{reg} - Linfócito T regulador (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺)

UV - Ultravioleta

μ g - micrograma

μ L - microlitro

μ M - micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1.1 A malária como problema de Saúde Pública.....	22
1.2 Ciclo de vida dos plasmódios humanos.....	24
1.3 A imunidade à malária.....	27
1.4 A regulação da resposta imune celular durante a malária.....	27
1.5 Fontes celulares de interleucina-10 na malária.....	28
1.6 Células T reguladoras	30
1.7 Marcadores fenotípicos de células T_{reg}.....	31
1.7.1 CD25.....	32
1.7.2 CD127.....	32
1.7.3 FOXP3.....	33
1.7.4 CTLA-4.....	33
1.7.5 CD39.....	34
1.7.6 TNFR11.....	34
1.7.7 OX40.....	35
1.7.8 GITR.....	36
1.8 Células T reguladoras na malária.....	36
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Área e população de estudo.....	40
3.2 Obtenção de PBMCs.....	42
3.3 Diagnóstico de infecção por <i>Plasmodium</i>.....	43
3.3.1 Diagnóstico parasitológico.....	43
3.3.2 Diagnóstico molecular.....	43
3.4 Descongelamento das PBMCs criopreservadas.....	44
3.5 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador, ativador e de memória.....	44
3.6 Quantificação de citocinas plasmáticas durante a infecção sintomática e	

assintomática.....	53
3.7 Detecção de IL-10 intracelular produzida por subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e por monócitos.....	55
3.8 Detecção de citocinas dos sobrenadantes dos ensaios de reestímulo celular.....	62
3.9 Ensaios de proliferação celular frente à mitógeno.....	63
3.10 Análise estatística.....	66
4 RESULTADOS.....	67
4.1 População de estudo.....	67
4.2 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador, ativador e de memória.....	72
4.3 Níveis de citocinas plasmáticas durante a infecção sintomática e assintomática.....	82
4.3.1 Características dos indivíduos.....	82
4.3.2 Citocinas e os Receptores Solúveis de TNF durante a infecção por <i>Plasmodium</i>	84
4.3.3 Citocinas e os Receptores Solúveis de TNF em relação aos desfechos clínicos e laboratoriais durante a infecção por <i>P. vivax</i>	87
4.3.4 Citocinas e os Receptores Solúveis de TNF na malária vivax após o tratamento.....	89
4.4 Detecção de IL-10 intracelular produzida por subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e por monócitos.....	91
4.4.1 Detecção de IL-10 intracelular em subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺	91
4.4.2 Detecção de IL-10 intracelular em monócitos CD14 ⁺	94
4.4.3 Caracterização de PBMCs produtoras de IL-10.....	96
4.4.4 Detecção de IL-10 intracelular em monócitos e subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por <i>P.vivax</i>	101
4.4.5 Caracterização de PBMCs produtoras de IL-10 em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por <i>P.vivax</i>	104
4.5 Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura.....	106
4.6 Proliferação celular.....	110

5. DISCUSSÃO.....	112
5.1 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador, ativador e de memória.....	112
5.2 Citocinas plasmáticas na malária humana.....	117
5.3 Fontes celulares de IL-10 na malária humana.....	120
5.4 Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs re-estimuladas com PMA combinado com Ionomicina ou LPS.....	122
6 CONCLUSÕES.....	125
REFERÊNCIAS.....	127

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A malária como problema de Saúde Pública

A malária, uma das mais importantes doenças infecciosas do mundo, é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. No homem, ela pode ser causada por cinco espécies do parasito: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Segundo o relatório mais recente da Organização Mundial de Saúde, existem 103 países endêmicos para malária, sendo que destes, 43 localizam-se no Continente Africano. Em 2012, estimou-se a ocorrência de 207 milhões de casos de malária no mundo, dos quais 80% na África Subsaariana, seguido pelo Sudeste Asiático (13%) e Mediterrâneo Oriental (6%). Cerca de 9% dos casos globais são devidos a *P. vivax*, embora a proporção de infecção por essa espécie fora do Continente Africano chegue a 50%. O número de mortes devido à malária, registradas em 2012, foi de 627.000, sendo 482.000 em crianças menores de cinco anos de idade (quase 77% do total global; World Health Organization, 2013). A maioria dos casos de óbito foi devida a *P. falciparum*; no entanto, *P. vivax* é cada vez mais reconhecida como uma causa de malária grave e morte (Alexandre et al., 2010; Kochar et al., 2009; Tjitra et al., 2008; World Health Organization, 2013).

O maior controle do vetor e a melhora no diagnóstico e no tratamento da doença reduziram o número de mortes relacionadas à malária em 42%, mundialmente, e em cerca de 49% na África, entre 2000 e 2012. Neste mesmo período, a incidência da doença diminuiu 25%, globalmente, e 31% na África (World Health Organization, 2013).

Em 2012, o Brasil contribuiu com 52% das notificações na Região das Américas e o Caribe, totalizando 242.758 casos confirmados (World Health Organization, 2013). A transmissão de malária no Brasil ocorre quase que exclusivamente na Bacia Amazônica, região que atualmente responde por 99,9% dos casos de malária em todo o país (da Silva-Nunes et al., 2012). A doença continua sendo uma ameaça significativa de Saúde Pública no Brasil, apesar de décadas de esforços de controle (Ferreira, da Silva-Nunes, 2010) e milhões de dólares de financiamento (Barat, 2006). Atualmente, as estratégias de controle da malária neste país estão focadas no

tratamento rápido e adequado dos infectados, borrifação intradomiciliar de inseticidas, além do aumento no número de postos de atendimento para o diagnóstico e o fornecimento de antimaláricos (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Além disso, nos últimos anos, o Ministério da Saúde iniciou a distribuição gratuita de mosquiteiros impregnados com inseticida (da Silva Nunes et al., 2012).

O atual quadro de incidência de malária deve-se, entre outros fatores, à colonização em áreas densamente florestadas da Amazônia que têm atraído agricultores migrantes das regiões Sul e Sudeste livres de malária, dando origem a uma série de novas fronteiras de assentamentos agrícolas (Confolonieri et al., 2014). O desmatamento inicial pode induzir grandes mudanças na biologia do vetor, através da criação ou expansão de habitats de reprodução do mosquito *Anopheles darlingi*, o vetor dominante da malária no Brasil (Castro et al., 2006; Hahn et al., 2014; Vittor et al., 2009).

Recentemente, foi observada uma clara mudança na distribuição das principais espécies de plasmódios que causam malária no Brasil. Proporções semelhantes de infecções confirmadas devidas a *P. falciparum* e *P. vivax* eram observadas até 1990, mas a transmissão da última espécie se manteve alta, enquanto que a de *P. falciparum* diminuiu de forma constante ao longo da década seguinte (Figura 1) (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Em 2012, *P. vivax* foi responsável por 85% dos casos de malária no Brasil (World Health Organization, 2013). Estas tendências podem ser explicadas por alguns fatores, como a presença de estágios hepáticos dormentes (hipnozoítos) e a circulação precoce dos estágios sexuais (gametócitos) no sangue periférico, o que pode tornar *P. vivax* menos sensível do que o *P. falciparum* às estratégias de controle disponíveis (Sattabongkot et al., 2004; Shanks, 2012).

Figura 1: Registro de casos de malária no Brasil entre 1959-2012. Em verde está representado o número total de casos, independente da espécie de *Plasmodium*. Em azul, os casos devidos à *P. vivax*, enquanto que em vermelho à *P. falciparum*. Fonte: SISMAL e SIVEP Malária.

1.2 Ciclo de vida dos plasmódios humanos

Os plasmódios apresentam um ciclo vital complexo (Figura 2). A transmissão natural da malária humana ocorre quando fêmeas de mosquitos anofelinos inoculam no hospedeiro vertebrado, durante seu repasto sanguíneo, as formas infectantes do parasito, denominadas esporozoítos. Embora os esporozoítos possam ser injetados diretamente nos capilares sanguíneos do hospedeiro, a maior parte deles é inoculada no tecido subcutâneo (Amino et al., 2006; Prudêncio et al., 2006; Vanderberg, Frevert, 2004). Somente aqueles que penetram nos capilares chegam aos hepatócitos iniciando o ciclo exo-eritrocítico da doença (Amino et al., 2006; Vanderberg, Frevert, 2004).

Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se multiplicam por reprodução assexuada (esquizogonia), originando milhares de merozoítos hepáticos (2.000 a 40.000, dependendo da espécie). O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos originam formas dormentes intra-hepáticas conhecidas como hipnozoítos (Krotoski, 1985). Estes hipnozoítos são os responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação (semanas ou meses depois da infecção primária). A liberação

dos merozoítos hepáticos para a circulação dá-se por meio de uma estrutura conhecida como merossomo (Sturm et al., 2006).

O desenvolvimento eritrocítico do parasito segue duas vias distintas: multiplicação assexuada por esquizogonia e diferenciação em estágios sexuais, denominados gametócitos, que irão evoluir no mosquito dando origem aos esporozoítos. Da esquizogonia sangüínea são formados os merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Assim, o ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, sendo responsável pela patogenia da doença. Dependendo da espécie de *Plasmodium*, os sintomas podem se manifestar na forma não-complicada, evoluindo ou não para a forma complicada. Nas infecções por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* predomina a forma não complicada, caracterizada por febre intermitente e intensa debilidade física, entre outros sintomas. Nas infecções por *P. falciparum*, manifestações mais graves podem ocorrer, caracterizando a forma complicada da doença, podendo levar o paciente ao óbito. Dentre essas, destacam-se os quadros de malária cerebral, anemia grave e acidose metabólica (Miller et al., 2002). Hoje, no entanto, é amplamente reconhecida a capacidade de *P. vivax* produzir doença grave, eventualmente fatal, e adquirir resistência a diversos antimaláricos de uso corrente, especialmente a cloroquina (Price et al., 2009).

A próxima fase do ciclo, conhecida como esporogonia, ocorre no mosquito. Os gametócitos ingeridos durante o repasto sanguíneo, diferentemente dos demais estágios eritrocitários do parasito, não são digeridos no estômago dos insetos. Em poucos minutos o gametócito masculino sofre exflagelação, que resulta na formação de 6 a 8 gametas masculinos ou microgametas, enquanto que os gametócitos femininos transformam-se em macrogametas. O zigoto formado pela fusão de microgametas e macrogametas transforma-se, em poucas horas, em um estágio móvel chamado oocineto. Ao penetrar na parede do estômago do mosquito, o oocineto transforma-se em oocisto, uma estrutura esférica que se aloja entre o epitélio e a membrana basal, em cujo interior se formam os esporozoítos. Com a ruptura do oocisto, milhares de esporozoítos liberam-se e migram para as glândulas salivares dos mosquitos. A cada repasto sangüíneo, dezenas de esporozoítos são inoculados

no hospedeiro vertebrado. O ciclo esporogônio no mosquito dura aproximadamente 14 dias (Matuschewski, 2006).

Figura 2: Ciclo de vida dos plasmódios que infectam o homem. Não estão representados, neste ciclo genérico, os hipnozoítos que ocorrem em *P. vivax* e *P. ovale*. As etapas de desenvolvimento do parasito no vetor estão simplificadas. Fonte: Ferreira, MU. *Parasitologia Contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

1.3 A imunidade à malária

Os fatores que regulam a imunidade anti- *Plasmodium* não são completamente compreendidos. A proteção efetiva à malária parece requerer componentes imunes humorais e celulares, provavelmente em cooperação (Beeson et al., 2008). A imunidade clínica se desenvolve, eventualmente, em indivíduos de regiões endêmicas, mas somente depois de repetidas infecções com significativa morbidade (Langhorne et al., 2008). Estudos em regiões de alta intensidade de transmissão de malária mostram que a incidência de doença grave diminui consideravelmente após os primeiros anos de vida, mas a imunidade estéril (ou seja, completa prevenção de re-infecção) nunca ou raramente se desenvolve (Marsh, Kinyanjui, 2006; Tran et al., 2013). Além disso, indivíduos previamente imunes podem perder a proteção contra a infecção sintomática na ausência de exposição contínua (Langhorne et al., 2008). No Brasil, existe evidência de aquisição de imunidade clínica, após anos de exposição ao parasito, tanto em populações nativas da Amazônia (Alves et al., 2002) como em comunidades rurais predominantemente compostas por migrantes de áreas não-endêmicas (da Silva-Nunes et al., 2008), embora os níveis de transmissão de malária sejam substancialmente inferiores aos observados na África. Os obstáculos ao desenvolvimento de imunidade contra a malária podem incluir a extensa diversidade antigênica parasitária (Ferreira et al., 2007) e os mecanismos imunorregulatórios do hospedeiro induzidos pelo parasito (Freitas do Rosário et al., 2012; Freitas do Rosario, Langhorne, 2012; Ho et al., 1986; Plebanski et al., 1999; Walther et al., 2005).

1.4 A regulação da resposta imune celular durante a malária

Muitos estudos tem reportado imunossupressão transitória durante a infecção aguda: desde o início da década de 1970 observam-se, entre crianças infectadas por *P.falciparum*, baixas respostas proliferativas de células mononucleares periféricas *ex-vivo* frente a antígenos do parasito e antígenos não-relacionados (Greenwood et al., 1972). Esse padrão de resposta celular, confirmado com diversos antígenos parasitários bem definidos, tem reversão parcial após o tratamento da infecção (Ho et

al., 1986; Ho, Webster, 1990; Riley et al., 1988; Theander et al., 1990; Troye-Blomberg et al., 1984). Observa-se também hiporresponsividade celular em indivíduos sadios continuamente expostos à malária falciparum ou vivax em diferentes áreas, com respostas preservadas contra mitógenos endêmicas (Braga et al., 2002; Goonewardene et al., 1990; Greenwood et al., 1972).

Diversas hipóteses, não mutuamente exclusivas, são sugeridas para explicar a supressão de resposta contra antígenos dos plasmódios. As populações celulares efetoras parasito-específicas, por exemplo, podem ter sido recrutadas, durante a infecção aguda, da circulação periférica para os tecidos linfóides (Ho, Webster, 1990). Podem ainda ter sido drasticamente reduzidas por morte celular programada (Touré-Balde et al., 1996; Wipasa et al., 2001; Xu et al., 2002), dependente de fatores ainda pouco conhecidos. Sugere-se ainda que hiperativação do sistema imune durante a infecção aguda esgote a capacidade de células T proliferarem quando expostas a novos estímulos antigênicos *in vitro*, em um fenômeno conhecido como exaustão celular (Gigley et al., 2012).

A supressão da resposta imune celular na malária pode, no entanto, ser mero reflexo dos mecanismos imunorregulatórios que permitem ao hospedeiro controlar a parasitemia sem grande lesão tecidual decorrente de inflamação (Finney et al., 2010). Na malária experimental e humana, níveis apropriados de citocinas pró-inflamatórias são essenciais para a redução inicial da carga parasitária, mas devem ser seguidos da indução de citocinas regulatórias, como a interleucina (IL)-10 e o fator de transformação do crescimento beta (do inglês: *transforming growth factor beta*, TGF- β) (Riley et al., 2006), para prevenir diversas complicações de natureza inflamatória que caracterizam a malária grave (Artavanis-Tsakonas et al., 2003).

1.5 Fontes celulares de interleucina-10 na malária

Na tentativa de controlar a infecção, o sistema imune do hospedeiro produz uma resposta pró-inflamatória potente caracterizada pelos altos níveis de interferon gama (IFN- γ), IL-1, fator de necrose tumoral alpha (do inglês: *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), IL-6 e IL-12, que pode ocasionar patologia imuno-mediada, como

observado nas infecções por *P. falciparum* (Armah et al., 2007; Lyke et al., 2004; Walley et al., 2004) e por *P. vivax* (Andrade et al., 2010b; Genton et al., 2008; Tjitra et al., 2008). Um equilíbrio entre as respostas pró- e anti-inflamatórias é, portanto, fundamental para a eliminação do parasito sem a indução de patologia excessiva no hospedeiro. Neste contexto, a IL-10 vem sendo descrita como a citocina chave: os estudos com modelos animais apontam claramente o papel da IL-10 no controle de respostas inflamatórias, prevenindo ou amenizando as manifestações clínicas, apesar dos dados com seres humanos serem contraditórios (Freitas do Rosario, Langhorne, 2012).

Hoje, sabe-se a capacidade de sintetizar IL-10 não é limitada a certos subtipos de células T, mas essa é uma característica de quase todos os leucócitos (Wolk et al., 2002). Essa citocina é produzida por células ativadas, em particular os monócitos/macrófagos, células dendríticas (DCs), células B e subconjuntos de células T, incluindo as células T reguladoras do tipo 1 (Tr1) e T reguladoras FOXP3⁺. A IL-10 atua através de um complexo receptor transmembrana e regula as funções de várias células imunes. Em monócitos/macrófagos, diminui a produção de mediadores inflamatórios e inibe a apresentação antigênica, além de desempenhar um importante papel na biologia das células B e células T. A relevância fisiológica especial desta citocina encontra-se na prevenção e limitação de respostas inflamatórias excessivas, que possa gerar como consequência, danos aos tecidos (Sabat et al., 2010).

Nas infecções por *P. chabaudi*, em camundongos, várias células imunes distintas, tais como linfócitos T CD4⁺, linfócitos B e células CD11c^{high}, produzem IL-10 (Freitas do Rosário et al., 2012). Eritrócitos infectados por *P. yoelii* foram capazes de induzir a produção de IL-10 por DCs, afetando a sua sobrevivência e maturação (Ocana-Morgner et al., 2003). Em humanos infectados por *P. falciparum*, células T CD4⁺ e CD8⁺ obtidas a partir do sangue periférico, monócitos e DCs derivadas de monócitos são todos capazes de produzir IL-10 (Giusti et al., 2011; Walther et al., 2009; Winkler et al., 1998).

No entanto, na malária, várias evidências apontam para as células T como sendo uma fonte fundamental de IL-10 na regulação da patologia, apesar dos dados

da literatura referir-se, principalmente, aos obtidos em estudos com modelos animais. Foi demonstrado que subpopulações de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 são capazes de suprimir respostas inflamatórias exacerbadas nas infecções por *P. chabaudi* e *P. yoelii* (Chen et al., 2009; Couper et al., 2008; Freitas do Rosário et al., 2012), ao passo que a IL-10 proveniente de células B ou de populações de células mielóides não desempenha um papel importante (Freitas do Rosário et al., 2012). Células CD4⁺CD45RO⁺FOXP3⁻, dentre os linfócitos T, são as principais fontes de IL-10 em crianças com malária não-complicada, sugerindo o papel crucial dessas células no controle da inflamação (Walther et al., 2009). Recentemente, foi observado, em crianças com intensa exposição à malária, que maioria das células T específicas (em resposta a eritrócitos infectados) eram células T CD4⁺ co-produtoras de IL-10 e IFN- γ . Os autores acreditam que esse subtipo celular possa desempenhar um importante papel modulador no desenvolvimento da imunidade anti-malária (Jagannathan et al., 2014).

1.6 Células T reguladoras

As células T reguladoras (T_{reg}), presentes naturalmente no sistema imune, são linfócitos T CD4⁺ que co-expressam a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) e o fator de transcrição nuclear FOXP3 (do inglês *forkhead box P3*), diretamente responsável pelo seu desenvolvimento e função (Fontenot et al., 2003). Essas células são indispensáveis na auto tolerância e são de grande importância para manutenção da homeostase do sistema imune (Baecher-Allan et al., 2001) suprimindo a ativação, a proliferação e diversas funções efetoras -- tais como a produção de citocinas -- de diversas populações celulares, incluindo células CD4⁺ e CD8⁺, células *Natural Killer* (NK), células B e células apresentadoras de antígenos (APCs) (Sakaguchi et al., 2010). As funções supressoras propostas para as células T_{reg} são: a geração de citocinas inibidoras, citólise, perturbação metabólica e a inibição das funções das células dendríticas (Vignali et al., 2008).

As células T_{reg} naturais se desenvolvem no timo, mas podem ser induzidas na periferia (T_{reg} adaptativas ou induzidas) a partir dos linfócitos T *naïve* mediante

contato com citocinas imunomoduladoras (IL-10, TGF- β), a partir de drogas imunossupressoras, ou por APCs condicionadas por produtos microbianos (Hansen, Schofield, 2010; O'Garra et al., 2004; O'Garra, Vieira, 2004). Outras populações de células T reguladoras induzidas ou adaptativas, convertidas durante o processo inflamatório nos tecidos periféricos ou experimentalmente, incluem as células Tr1 e as células T *helper* 3 (Th3). As Tr1 são células CD4⁺ que secretam IL-10 e TGF- β e são produzidas *in vitro* na presença de IL-10. As Th3 são células T antígeno-específicas secretoras de TGF- β (Sakaguchi et al., 2008). Normalmente, essas populações reguladoras não expressam FOXP3 (Vignali et al., 2008). Células com atividade imunossupressora também compreendem as CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ (duplo negativo) e as T γ/δ (Shevach, 2006).

Em contraste com as células T_{reg} naturais, T_{reg} induzidas muitas vezes têm uma especificidade restrita de tipos de células particulares, tumores ou antígenos (Vignali et al., 2008). Bluestone e Abbas acreditam que as células T_{reg} naturais, podem ser mais efetivas em suprimir células T autoreativas, em um cenário não-inflamatório, enquanto que as adaptativas podem ser induzidas para suprimir a resposta imune patológica (Bluestone, Abbas, 2003).

1.7 Marcadores fenotípicos de células T_{reg}

A caracterização fenotípica de células T_{reg} é dificultada pela crescente heterogeneidade de expressão de marcadores de superfície e de atividade reguladora observada entre as populações celulares T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Sakaguchi et al., 2010). Sabe-se que a expressão de alguns marcadores, como CD25 e FOXP3, pode ser induzida (de maneira transitória) em células T CD4⁺ *naïve*, após a ativação celular, sugerindo que esses marcadores sejam insuficientes para definir a população de células T_{reg} (Gavin et al., 2006). De fato, novos marcadores fenotípicos vêm sendo descritos para caracterizar células T_{reg} clássicas (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺). A Tabela 1 relaciona os principais marcadores fenotípicos de células T reguladoras descritos na literatura recente.

Tabela 1 - Marcadores de células T reguladoras

Fator de transcrição	Ativação e memória	Origem e “homing”	Função supressora e efetora	Apoptose, sobrevivência e outros
FOXP3	CD45RA	CD62L	CTLA-4	CD27
	CD45RO	CCR4	ICOS	OX40
	CD25	CCR6	CD39-CD73	CD95
	HLA-DR	CCR9	LAP	GITR
	Ausência de CD127	CD103	Granzima B	Galectina 3
	CD69	CD304	Galectina 10	IL-1R
		Ausência de CD49d	CD80 e CD86	

FOXP3: *forkhead box P3*; HLA-DR: Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II; CCR: receptor de quimiocina; CTLA-4: Antígeno-4 do linfócito T citotóxico; ICOS: co-estimulador induzível de célula T; LAP: peptídeo associado à latência; OX40 ou CD134: membro da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (TNF); GITR: receptor de TNF induzido por glicocorticóide. Adaptado de Sakaguchi et al., 2010.

1.7.1 CD25

Tradicionalmente, células T_{reg} murinas e humanas foram caracterizadas como CD4⁺CD25⁺ (Vignali et al., 2008). Em camundongos, as células CD4⁺CD25⁺ são geralmente T_{reg} FOXP3⁺ (Chenn, Oppenheim, 2011), mas a identificação das células T_{reg} em seres humanos, baseadas apenas na expressão de CD25, conhecido como a cadeia α do receptor de IL-2, tem sido um grande problema uma vez que as células T aumentam a expressão desta molécula após a ativação (Fontenot et al., 2005). Até 30% das células T CD4 periféricas expressam CD25 (Ng et al., 2001) e provavelmente incluem T efetoras ativadas. Na verdade, em seres humanos, apenas 1 a 2% das células com alta expressão de CD25 (CD25^{high}) são T_{reg} com função supressora consistente (Baecher-Alan et al., 2001; Baecher-Alan et al., 2002). Um dos grandes problemas é que não há nenhum critério objetivo para definir o fenótipo CD25^{high} em experimentos de citometria de fluxo (Chenn, Oppenheim, 2011).

1.7.2 CD127

T_{reg} murinas são geralmente caracterizadas pela baixa expressão de CD127 (cadeia α do receptor de IL-7), em comparação com as células T efetoras (Cozzo et al., 2003). No entanto, os níveis de expressão de CD127 nas T_{reg} desses animais podem

variar, dependendo da sua localização e estado de ativação. Observa-se um aumento na expressão dessa molécula durante ativação *in vitro* e *in vivo*, e nas T_{reg} localizadas na medula óssea e na pele (Simonetta et al., 2010). A ausência de CD127, em conjunto com a alta expressão de CD25, tem sido amplamente utilizada nos últimos anos para definir T_{reg} humanas funcionais (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). Há uma forte associação entre as células T CD4⁺CD25⁺CD127^{low} e a expressão de FOXP3 (Liu et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007). No entanto, a expressão de CD127 também é regulada negativamente na fase inicial da ativação de células T efetoras (Aerts et al., 2008). Com isso, alguns pesquisadores utilizam outros marcadores, em conjunto, como o CD62L, que pode diferenciar as T_{reg} das células efetoras recentemente ativadas (Sakaguchi et al., 2010).

1.7.3 FOXP3

Um importante avanço na análise de células T_{reg} veio com a identificação de FOXP3, que é um fator de transcrição nuclear, considerado o regulador chave do desenvolvimento e função das células T_{reg} (Fontenot et al., 2003). Em seres humanos, a expressão de FOXP3 é necessária, mas não é suficiente para a identificação de células T_{reg}, uma vez que um número significativo de células T ativadas expressam FOXP3, de maneira transitória, sem apresentar atividade supressora (Allan et al., 2007). A expressão sustentada de FOXP3 por células T ativadas, no entanto, pode conferir capacidade reguladora (Sakaguchi et al., 2010).

1.7.4 CTLA-4

O Antígeno-4 do Linfócito T Citotóxico (CTLA-4, do inglês *Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*) é uma molécula de superfície celular expressa quase que exclusivamente por células CD4⁺ e CD8⁺ (McCoy, Le Gros, 1999). Vários trabalhos descrevem a importância do CTLA-4 como potente regulador negativo de respostas imunes celulares, uma vez que a ligação entre CTLA-4 e B7 (CD80 e CD86) tem um efeito inibitório na ativação do linfócito T, por bloquear a co-estimulação mediada por CD28 (Krummel, Allison, 1995; Marengere et al., 1996; Miyara,

Sakaguchi, 2011; Yamaguchi et al., 2011). Esta molécula é expressa em maior quantidade pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ recentemente ativadas (Butty et al., 2007; Jago et al., 2004), sendo necessária para a função das T_{reg} *in vivo* (Wing et al., 2008) contribuindo ativamente para a atividade supressora da T_{reg} (Blansfield et al., 2005; Maker et al., 2005; Maker et al., 2006; Phan et al., 2003; Read et al., 2000). CTLA-4 localiza-se, principalmente, em vesículas intracelulares, sendo, após a estimulação via TCR (receptor de célula T), transportado para a superfície celular (Gough et al., 2005).

1.7.5 CD39

O CD39 foi originalmente descrito como um marcador de ativação de células B. Em camundongos e seres humanos, muitos leucócitos que são CD39⁺ são células B, seguidos por algumas células T CD4⁺. A expressão de CD39 tem sido demonstrada em células endoteliais, monócitos, DCs, células de Langerhans e células T NK (Koziak et al., 1999). O CD39 é uma ectonucleotidase que hidrolisa ATP e forma AMP, que pode ser clivado pelo CD73 para formar adenosina. ATP extracelular tem vários efeitos pró-inflamatórios, e sua remoção pode, portanto, ter efeito anti-inflamatório (Fletcher et al., 2009). A ligação da Adenosina ao seu receptor A2A, que é expresso em células T, resulta na elevação do cAMP intracelular e a supressão da função efetora das células T (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). Em camundongos, o CD39 é expresso por todas as células T FOXP3⁺, mas essa observação nos humanos não é clara, existindo apenas um subconjunto de células T_{reg} FOXP3⁺ co-expressando CD39. Em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de seres humanos saudáveis, o CD39 é expresso por cerca 60% das células FOXP3⁺, existindo uma correlação linear de expressão entre CD39 e FOXP3 (Borsellino et al., 2007).

1.7.6 TNFR1

Os estudos de Chen e Oppenheim mostram que o TNF exerce uma atividade negativa sobre as respostas inflamatórias, ativando e expandindo as T_{reg} através de

TNFRII (Chen et al., 2007; Chen, Oppenheim, 2010). TNFRII, um dos dois receptores de TNF (TNFRI e TNFRII), é preferencialmente expresso em 30 a 40% das T_{reg} presentes nos tecidos linfóides periféricos de camundongos normais, enquanto que menos de 10% das células T efetoras expressam TNFRII. Células CD25⁺ ou FOXP3⁺ expressando TNFRII exibem uma atividade supressora mais potente, enquanto que T_{reg} TNFRII⁻, mesmo que elas sejam CD25⁺ e FOXP3⁺, mostram pouca ou nenhuma capacidade de supressão (Chen et al., 2008; Chen et al., 2010). Cerca de 70% das células FOXP3⁺ humanas circulantes, sejam elas CD25^{high}, CD25^{low} e mesmo CD4⁺CD25⁻, expressam níveis elevados de TNFRII, comparados com cerca de 20% das células T efetoras CD4⁺FOXP3⁻ (Chen et al., 2010). Chen e Oppenheim sugerem que, em seres humanos, a co-expressão de CD25 e TNFRII possa identificar de maneira mais satisfatória as T_{reg} FOXP3⁺, com atividade supressora potente, do que a expressão de CD25^{high}. A identificação das T_{reg} FOXP3⁺ pode ainda ser aperfeiçoada com a combinação de um marcador adicional, como, por exemplo, o CD127 (Chen, Oppenheim, 2010).

1.7.7 OX40

A ligação de OX40 (CD134), membro da superfamília dos receptores de TNF, promove a ativação da célula T, a sobrevivência, a proliferação e produção de citocinas (Schaer et al., 2014). OX40 é expresso principalmente nas células T CD4⁺ ativadas (24-48 horas após a ativação), em células T CD8⁺, neutrófilos e T_{reg} (Takeda et al., 2004; Weinberg et al., 2011). O ligante natural de OX40, OX40 ligante (OX40L) é mais comum nas APCs, mas também é encontrado em células T ativadas. A expressão de OX40 é induzida pela estimulação via TCR, mas a co-estimulação por meio de outras moléculas, tais como CD28, ou a exposição a certas citocinas pode regular positivamente a sua expressão (Redmond et al., 2012). Enquanto OX40 tem um papel fundamental no desenvolvimento e na função de T_{reg}, o engajamento de OX40 com um anticorpo agonista também pode desativar a função supressora das T_{reg} (Croft, 2010; Griseri et al., 2010; Piconese et al., 2010; Ruby et al., 2009; Takeda et al., 2004; Valzasina et al., 2005).

1.7.8 GITR

GITR, o receptor de TNF induzido por glicocorticóide, é expresso em baixos níveis por células CD4⁺ e CD8⁺ “em repouso”. Sua expressão é regulada positivamente após 24-72 horas de estimulação e continua a ser expresso durante vários dias (Nocentini et al., 1997; Nocentini et al., 2012; Schaer et al., 2012). Em contraste com as células T efectoras, T_{reg} expressam constitutivamente GITR, assim como DCs, monócitos e células NK. De modo semelhante ao OX40, a ligação de GITR fornece sinais co-estimulatórios que aumentam a proliferação das células T e a função efectora, e protegem as células T da morte celular induzida por ativação (AICD, *Activation-induced cell death*) (Nocentini et al., 2012; Schaer et al., 2012). O ligante para GITR (GITRL) é altamente expresso em APCs ativadas e células endoteliais. Curiosamente, enquanto o papel de GITRL nas APCs parece proporcionar a co-estimulação, foi recentemente mostrado que as interações GITRL/GITR nas células endoteliais podem ser importantes para o início da adesão de leucócitos e transmigração (Lacal et al., 2013).

1.8 Células T reguladoras na malária

As células T_{reg} participam da regulação da resposta imune celular durante a malária experimental em roedores e em infecções naturais em seres humanos. Nos estudos iniciais, observou-se predominantemente o efeito imunossupressor proporcionando a sobrevivência e o desenvolvimento do parasito (Hisaeda et al., 2004; Long et al., 2003; Walther et al., 2005; Wu et al., 2007). Esses resultados foram essencialmente corroborados por diversos estudos subsequentes de infecções experimentais em camundongos (Cambos et al., 2008; Chen et al., 2009; Couper et al., 2007; Couper et al., 2008; Hisaeda et al., 2005; Hisaeda et al., 2008; Vigario et al., 2007).

Na malária humana, observa-se geralmente aumento na proporção de células T_{reg} em indivíduos infectados por *P. falciparum* (Brustoski et al., 2006; Minigo et al., 2009; Walther et al., 2005) e *P. vivax* (Bueno et al., 2010; Jangpatarapongsa et al., 2008). Entretanto, não há concordância completa entre os resultados obtidos em diferentes

modelos de malária experimental e em diferentes populações humanas expostas a diferentes espécies de plasmódios (Finney et al., 2010; Scholzen et al., 2010). Nem sempre ocorre expansão de células T_{reg} durante a infecção aguda e a depleção dessas células nem sempre resulta no efeito esperado nas cargas parasitárias e no risco de complicações de natureza inflamatória, como a malária cerebral em camundongos. Um dos fatores que limitam a comparabilidade entre estudos é o uso de diferentes estratégias de caracterização fenotípica das células T_{reg} , definidas alternativamente como $CD4^+CD25^+$ (Hisaeda et al., 2004; Hisaeda et al., 2005; Long et al., 2003; Wu et al., 2007), $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ (Brustoski et al., 2006), $CD4^+CD25^{hi}CD69^-$ (Walther et al., 2005), $CD4^+CD127^{low}FOXP3^+$ (Walther et al., 2009) ou $CD4^+CD25^+CD127^{low}FOXP3^+$ (Minigo et al., 2009). Acrescentar um marcador fenotípico pode mudar substancialmente os resultados. Por exemplo, em estudo recente de pacientes amazônicos com malária, observamos um aumento da subpopulação de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ que expressam a molécula imunomoduladora CTLA-4, sem aumento no número da população total de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ (Gonçalves et al., 2010).

O foco em populações de células T_{reg} clássicas na malária pode ainda subestimar diversas outras populações celulares com potencial papel regulador que são expandidas durante a infecção aguda. Essas células expressam em sua superfície certos marcadores fenotípicos de células reguladoras, como CTLA-4, TNFR11, GITR, OX40, mas não são T_{reg} clássicas por não expressarem necessariamente CD25 e FOXP3. Schlotmann e colaboradores, por exemplo, mostraram grande aumento de populações de linfócitos T $CD4^+CTLA-4^+$ (mas sem avaliar CD25 e FOXP3) durante a malária falciparum (Schlotmann et al., 2000). Em modelo experimental, Steeg e colaboradores observaram grande aumento da população T $CD4^+CTLA-4^+FOXP3^-$ sete dias após a inoculação de *P. berghei* (Steeg et al., 2009), sugerindo que uma grande proporção de células CTLA-4⁺ induzidas na malária compreende células T $CD4^+FOXP3^-$. Da mesma maneira, observamos uma expansão da população T $CD4^+$ que co-expressa CTLA-4⁺ no sangue periférico de pacientes amazônicos com malária (Gonçalves et al., 2010).

Como já descrito, subtipos de células T, que não são T_{reg} clássicas, podem ser fontes de citocinas regulatórias como a IL-10 (Couper et al., 2008; Freitas do Rosário et al., 2012; Walther et al., 2009). Em pacientes amazônicos infectados por *P. vivax*, observamos níveis plasmáticos de IL-10 extremamente elevados, que não se correlacionam com a proporção de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ e de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CTLA-4⁺ no sangue periférico (Gonçalves et al., 2010). As principais populações celulares que produzem citocinas anti-inflamatórias nesses pacientes permanecem desconhecidas. Este projeto tem como foco populações de células T, presentes em grande número na circulação periférica durante a malária humana. Não se limita, portanto, a examinar células T_{reg} clássicas, mas inclui populações celulares que expressam em sua superfície diferentes combinações de possíveis marcadores de atividade moduladora, como FOXP3, OX-40, TNFR11, GITR e CTLA-4.

2 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo geral caracterizar fenotipicamente populações celulares com possível papel imunorregulador observadas no sangue periférico durante a malária humana e verificar quais subtipos celulares representam fontes importantes da principal citocina imunossupressora, IL-10.

Objetiva-se:

1. Verificar se, durante a infecção aguda, ocorre aumento de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador, de ativação e de memória (FOXP3, OX40, CD69, CD45RA, CD45RO, TNFR2, CD25, HLA-DR, CD127, GITR e CTLA-4);
2. Verificar se a infecção com diferentes espécies de plasmódios induz o aumento de subpopulações distintas de linfócitos T CD4⁺ com potencial efeito imunorregulador;
3. Analisar o perfil de citocinas plasmáticas na infecção malárica e secretadas em ensaios de reestimulação com mitógeno e LPS;
4. Caracterizar fenotipicamente as populações de monócitos e linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10 em ensaios *in vitro* de reestimulação com mitógeno e LPS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área e população de estudo

Os indivíduos recrutados para este estudo provêm, em sua maioria, de uma região de assentamento agrícola pertencente ao município de Lábrea (AM) conhecida como Remansinho (Figura 3). Apesar de pertencer ao estado do Amazonas, Remansinho localiza-se a cerca de 60 km do distrito de Nova Califórnia (RO) e a 120 km de Acrelândia (AC), onde a nossa equipe mantém um laboratório de campo com infraestrutura adequada ao processamento de amostras biológicas. A população é tipicamente formada por migrantes do centro-sul do país que se estabeleceram nesse assentamento há menos de sete anos, provenientes de outros assentamentos em Rondônia e Mato Grosso. As famílias habitam pequenos lotes agrícolas situados ao longo de 60 km de uma estrada de terra, originada na rodovia BR-364.

Para este estudo, foram abordados pacientes, com ou sem história pregressa de malária, infectados por *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* ou co- infectados. Amostras de sangue provenientes de indivíduos saudáveis definidos como controles expostos foram coletadas e utilizadas como controles para os experimentos propostos. Como critério de inclusão considerou-se que os controles expostos deveriam residir em área endêmica e relatar ter sofrido o último episódio clínico de malária há pelo menos seis meses. Além disso, incluíram-se neste estudo, amostras sanguíneas de pacientes inicialmente infectados por *P. vivax* que tiveram uma segunda amostra sanguínea coletada 28 dias após o início do tratamento antimalárico e assim, formaram o grupo de indivíduos convalescentes.

Todos os indivíduos envolvidos nesse estudo (pacientes ou controles expostos) ou o seu representante legal forneceram consentimento para a doação da amostra, tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, além de responderam a um questionário clínico-epidemiológico previamente elaborado e testado em campo.

Figura 3: A área de assentamento agrícola recente, Remansinho (seta), pertencente ao município de Lábrea (AM).

Cada amostra sanguínea, consistindo de 80 mL de sangue venoso heparinizado, foi destinada a obtenção de PBMCs e obtenção de plasma. Outros dois mL de sangue, coletados em tubos contendo EDTA, foram destinados à realização de hemograma automatizado (Micros 60) (Horiba, Montpellier, França) e extração de DNA do parasito. Para evitar o efeito dos medicamentos antimaláricos sobre os parâmetros pesquisados, as amostras de sangue dos pacientes durante a infecção aguda foram colhidas obrigatoriamente antes da administração do tratamento específico. O diagnóstico da espécie infectante foi primeiramente realizado por meio de microscopia convencional de gota espessa e posteriormente confirmado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real.

A intensidade da doença associada à malária foi avaliada quantitativamente (Karunaweera et al., 1998). Para este fim, todos os pacientes foram interrogados sobre a percepção de intensidade dos 13 principais sintomas associados a infecção malárica (febre, calafrios, sudorese, cefaléia, mialgia, artralgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, tonturas, tosse, dispnéia e diarreia), classificados como ausente, leve, moderado ou intenso (correspondente escore número de 0, 1, 2 e 3, respectivamente). As pontuações numéricas foram agregadas em um índice clínico para classificar os pacientes de acordo com a intensidade global dos sintomas.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (parecer #954/CEP).

3.2 Obtenção de PBMCs

Imediatamente após a coleta, o sangue foi diluído na proporção de 1:1 em Hanks (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e centrifugado a 500 g, durante 17 minutos, em gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) na proporção de 2:1. A seguir, o anel de células mononucleares obtido do gradiente de densidade foi coletado e submetido a duas lavagens sequenciais com tampão salino - Hanks (Sigma-Aldrich), seguidas de centrifugação a 300 g por 10 minutos. O sedimento de células foi ressuspenso em meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Escócia, Reino Unido) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil), Hepes (10 mM) (Gibco), Piruvato de Sódio (1 mM) (Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM) (Gibco), Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B (1%) (Gibco) e 2-Mercaptoetanol (55 µM) (Gibco). A viabilidade celular foi averiguada, utilizando-se azul de tripan (0,04%), e o número de células estimado em câmara hemocitométrica de Neubauer (diluição 1:20). As amostras foram, então, congeladas a -70 °C em solução contendo 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich) e 90% de SFB (Cultilab) em uma concentração celular de 10^7 células/mL. Os tubos contendo as PBMCs foram mantidos a -70 °C por 24 horas e foram criopreservados e transportados em

nitrogênio líquido até o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde foram realizados os experimentos propostos por este estudo.

3.3 Diagnóstico de infecção por *Plasmodium*

3.3.1 Diagnóstico parasitológico

Em campo, o diagnóstico da infecção malárica foi realizado por meio do exame de gota espessa. Para tal, duas gotas de sangue (volume aproximado de 5,0 µL cada), colhidas diretamente por punção digital com o auxílio de uma lanceta estéril, foram espalhadas sobre uma lâmina de microscopia de modo a formar dois retângulos de aproximadamente um centímetro de diâmetro ou largura cada. Depois de secar à temperatura ambiente (TA), realizou-se o procedimento de coloração do sangue pelo método de Giemsa. Para isso, após a retirada da hemoglobina e pré-coloração utilizando-se solução hipotônica de azul de metileno, a lâmina contendo o sangue permaneceu em contato com a solução de Giemsa (0,075% massa/volume) por 10 minutos. A seguir, as mesmas foram lavadas em água tamponada para retirada do excesso de corante e mantidas em TA para secagem. Todas as gotas espessas foram examinadas por microscopistas treinados em objetiva de imersão (aumento de 1000X).

3.3.2 Diagnóstico molecular

O diagnóstico confirmatório foi realizado em nosso laboratório, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Para tal, o DNA de cada amostra foi isolado, em equipamento QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemanha), a partir de 200 µL de sangue total utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Foi utilizada a PCR quantitativa em tempo real, que tem como alvo o gene *18S rRNA*. A reação teve um volume final de 20 µL: 2 µL de DNA da amostra, 10 µL de master Maxima SYBR Green qPCR 2x (Fermentas, Burlington, Ontario, Canadá) e 0,5 µM do primer gênero específico P1 (ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT) combinado com 0,5 µM de qualquer um dos primers espécie específicos V1 (CAA

TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A) de *P.vivax* ou F2 (CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG) de *P. falciparum*.

Diante das evidências de que indivíduos continuamente expostos a malária em área endêmica podem desenvolver imunidade antimalárica, caracterizada pela presença do parasito na completa ausência de sintomas (da Silva-Nunes et al., 2008, Scopel et al., 2004) os controles expostos, como também as amostras coletadas durante a convalescença, foram submetidos à PCR quantitativa em tempo real com o objetivo de confirmar a ausência de infecção malárica.

3.4 Descongelamento das PBMCs criopreservadas

Em momento oportuno, durante os ensaios de caracterização fenotípica e cultivos celulares, os criotubos contendo PBMCs, necessários para cada experimento, foram descongelados rapidamente, em banho-maria a 37 °C. A suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 mL, contendo 10 mL de meio RPMI completo -- RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de SFB inativado (Gibco), Hepes (10 mM) (Gibco), Piruvato de Sódio (1 mM) (Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM) (Gibco), Penicilina/Estreptomicina/ Anfotericina B (1%) (Gibco) e 2-Mercaptoetanol (55 µM) (Gibco) -- seguindo-se de centrifugação a 500 g durante oito minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em um mL de meio completo. A viabilidade celular foi averiguada utilizando-se azul de tripan 0,04%, e o número de células viáveis foi estimado utilizando contador automático (*Countess Automated Cell Counter*, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

3.5 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador, ativador e de memória

Para caracterização de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ foram definidos três painéis que compreendem os marcadores de atividade reguladora, de ativação celular e de memória, permitindo uma completa caracterização fenotípica de populações celulares com potencial papel na imunorregulação na malária humana

(Tabelas 2, 3 e 4). Para a determinação dos fenótipos escolhidos, todos os anticorpos utilizados foram titulados utilizando-se células provenientes de pacientes controles não pertencentes ao grupo experimental, mas submetidos às mesmas condições de obtenção, processamento e conservação (Tabela 5).

Tabela 2 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4+ que expressam CTLA-4, TNFRII e moléculas com potencial efeito ativador (painel 1)

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Clone	Número de catálogo
TNFRII	FITC	R&D Systems	22235	FAB226F
CD127	Bril. Violet 421	Biologend	A19D5	351310
CD39	PE	e-Bioscience	eBioA1 (A1)	12-0399-42
FOXP3	PerCPCy5.5	BD Pharmingen	236a	561493
CTLA-4	APC	Biologend	L3D10	349908
CD25	APCCy7	Biologend	BC96	302614
CD69	PECy7	Biologend	FN50	310912
CD4	V500	BD Horizon	RPA-T4	560768
HLA-DR	ALEXA 700	BD Pharmingen	(L243)	560743
CD3	ECD	Beckman Coulter	UCHT1I	IM2705U
Viabilidade	UV	Invitrogen	-	L23105

Tabela 3 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4+ que expressam moléculas de atividade reguladora (painel 2)

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Clone	Número de catálogo
CD39	PE	e-Bioscience	eBioA1 (A1)	12-0399-42
GITR	FITC	R&D Systems	110416	FAB689F
OX40	PECy7	Biologend	ACT35	350012
FOXP3	PerCPCy5.5	BD Pharmingen	236a	561493
CTLA-4	APC	Biologend	L3D10	349908
CD127	Bril. Violet 421	Biologend	A19D5	351310
CD25	APCCy7	Biologend	BC96	302614
CD4	V500	BD Horizon	RPA-T4	560768
CD3	ECD	Beckman Coulter	UCHT1I	IM2705U
Viabilidade	UV	Invitrogen	-	L23105

Tabela 4 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4+ que expressam marcadores de memória (painel 3)

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Clone	Número de catálogo
CCR7	FITC	Biolegend	G043H7	353216
CD39	PE	e-Bioscience	eBioA1 (A1)	12-0399-42
FOXP3	PerCPCy5.5	BD Pharmingen	236a	561493
CD45RO	APC	Biolegend	UCHL1	304210
CD127	Bril. Violet 421	Biolegend	A19D5	351310
CD25	APCCy7	Biolegend	BC96	302614
CCR4	PECy7	Biolegend	TG6/CCR4	335405
CD4	V500	BD Horizon	RPA-T4	560768
CD45RA	ALEXA 700	Biolegend	HI100	304120
CD3	ECD	Beckman Coulter	UCHT1I	IM2705U
Viabilidade	UV	Invitrogen	-	L23105

Tabela 5 - Volume dos anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem dos linfócitos T CD4+ (μL /teste)

Anticorpo	Fluorocromo	Volume (μL)
CD3	ECD	1
CD4	V500	1
CD25	APCCy7	10
FOXP3	PerCPCy5.5	5
CD39	PE	1
CD69	PECy7	5
CD127	Bril. Violet 421	3
HLA-DR	ALEXA 700	3
TNFR1I	FITC	7,5
CTLA-4	APC	15
OX40	PECy7	10
CD45RO	APC	10
CD45RA	ALEXA 700	1
CCR7	FITC	5
CCR4	PECy7	1
Viabilidade	UV	0,67

Em cada análise (painéis 1, 2 e 3) foram utilizadas 10^6 células viáveis, descongeladas como descrito na seção 3.5, transferidas para placa de 96 poços em fundo “V” (Nunc, Rochester, NY, Estados Unidos), a qual foi centrifugada a 600 g por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e a cada poço foram adicionados 200 μ L de tampão MACS (PBS pH 7,2, SFB 2%, EDTA 2 mM pH 8,0). A placa foi novamente centrifugada a 600 g por cinco minutos e essa etapa de lavagem foi repetida para retirada total do meio RPMI. O sedimento celular foi ressuspensionado em tampão MACS seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos monoclonais de superfície (volume final total da solução: 100 μ L). Após ser incubada por 30 minutos no escuro a 4 °C, a placa foi centrifugada a 500 g, por cinco minutos. Após uma etapa de lavagem com 200 μ L de tampão MACS, seguidas por centrifugação a 500 g por cinco minutos, iniciou-se a etapa de marcação intranuclear de FOXP3 utilizando-se o kit comercializado pela BD Pharmingen (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos). A partir dessa etapa os experimentos foram realizados à TA.

Assim, as células foram ressuspensionadas em 200 μ L de solução de fixação (*buffer A* 1 $\times$) seguindo-se incubação por 10 minutos, protegidas da luz. Após serem lavadas com 200 μ L de tampão MACS e centrifugadas a 600 g durante cinco minutos à TA, as células foram incubadas por 30 minutos com solução de permeabilização (*buffer C*), protegidas da luz. Procedeu-se uma lavagem, utilizando 200 μ L de tampão MACS, e centrifugação a 600 g durante cinco minutos à TA. Por fim, as amostras foram incubadas por uma hora com anticorpo monoclonal anti-FOXP3 marcado com PerCPCy5.5. A seguir, as mesmas foram lavadas com 200 μ L de tampão MACS e fixadas em paraformaldeído 1% seguindo-se a leitura no equipamento *LSRFortessa* (BD Biosciences). Foram adquiridos 300 mil eventos para cada painel fenotípico. As análises foram realizadas utilizando-se o software *FlowJo* (TreeStar, Ashland, OR, Estados Unidos).

As figuras a seguir descrevem as estratégias de análise utilizadas para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39, e: os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFR11 e CTLA-4 (Figura 4, painel 1), os marcadores de atividade reguladora (OX40, GITR e CTLA-4) (Figura 5, painel 2) e os

marcadores de memória (Figura 6, painel 3). A expressão de HLA-DR, CD69, CTLA-4, OX40 e GITR foi, alternativamente, avaliada na população de células T_{reg} (CD4⁺CD25^{high}CD127-FOXP3⁺), independentemente de CD39 (Figura 7), e na população de linfócitos T CD4⁺ (Figura 8). Por fim, analisamos a expressão dos marcadores de memória em células T_{reg} (Figura 6) e em linfócitos T CD4⁺ (Figura 9).

Figura 4: Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que co-expressam FOXP3 e CD39 e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69), TNFR2 e CTLA-4. A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis (negativos para kit de viabilidade); E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Dupla marcação para CD4 e CD25, para analisar a população de células CD4⁺CD25^{high} e CD4⁺CD25^{low/negativo}; G- Seleção de linfócitos T CD4⁺CD25^{high} que não expressam CD127; H- Linfócitos que co-expressam FOXP3 e CD39 a partir da população CD4⁺CD25^{high}CD127-; H1- Linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺FOXP3⁺; H2- Linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺FOXP3⁺; H3- Linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁻FOXP3⁺; I- Linfócitos que co-expressam FOXP3 e CD39 a partir da população CD4⁺CD25^{low/negativo}; I1- Linfócitos T CD4⁺CD25^{low/negativo}CD39⁺FOXP3⁺; I2- Linfócitos T CD4⁺CD25^{low/negativo}CD39⁺FOXP3⁺ e I3- Linfócitos T CD4⁺CD25^{low/negativo}CD39⁻FOXP3⁺. A expressão de TNFR2 (J) HLA-DR (L), CD69 (M) e CTLA-4 (N) foi avaliada em H1, H2, H3, I1, I2 e I3.

Figura 5: Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ que co-expressam FOXP3 e CD39, e os marcadores de atividade reguladora (CTLA-4, GITR e OX40). A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis; E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Dupla marcação para CD4 e CD25, para analisar a população de células $CD4^+CD25^{high}$ e $CD4^+CD25^{low/negativo}$; G- Seleção de linfócitos T $CD4^+CD25^{high}$ que não expressam CD127; H- Linfócitos que co-expressam FOXP3 e CD39 a partir da população $CD4^+CD25^{high}CD127^-$; H1- Linfócitos T $CD4^+CD25^{high}CD127^-CD39^+FOXP3^+$; H2- Linfócitos T $CD4^+CD25^{high}CD127^-CD39^-FOXP3^+$; H3- Linfócitos T $CD4^+CD25^{high}CD127^-CD39^-FOXP3^-$; I- Linfócitos que co-expressam FOXP3 e CD39 a partir da população $CD4^+CD25^{low/negativo}$; I1- Linfócitos T $CD4^+CD25^{low/negativo}CD39^+FOXP3^+$; I2- Linfócitos T $CD4^+CD25^{low/negativo}CD39^+FOXP3^-$ e I3- Linfócitos T $CD4^+CD25^{low/negativo}CD39^-FOXP3^+$. A expressão de CTLA-4(J), GITR (L) e OX40 (M) foi avaliada em H1, H2, H3, I1, I2 e I3.

Figura 6: Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ que co-expressam FOXP3 e CD39, e células T_{reg} ($CD4^+CD25^{high}CD127-FOXP3^+$) que expressam os marcadores de memória. A-Time; B-Singlets; C-Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis; E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Dupla marcação para CD4 e CD25, para analisar a população de células $CD4^+CD25^{high}$; G- Seleção de linfócitos T $CD4^+CD25^{high}$ que não expressam CD127; H- Linfócitos que co-expressam FOXP3 e CD39 a partir da população $CD4^+CD25^{high}CD127-$; H1- Linfócitos T $CD4^+CD25^{high}CD127-CD39^+FOXP3^+$; H2- Linfócitos T $CD4^+CD25^{high}CD127-CD39^+FOXP3^+$ e H3- Linfócitos T $CD4^+CD25^{high}CD127-CD39-FOXP3^+$; I- Linfócitos T_{reg} $CD4^+CD25^{high}CD127-FOXP3^+$; J- A expressão de CD45RO (marcador de células de memória) e CD45RA (marcador de células *naïve*) foi avaliada nas subpopulações H1, H2, H3 e I. Os linfócitos de memória $CD45RO^+CD45RA^-$ foram subdivididos em duas subpopulações: linfócitos de memória central ($CCR7^+$) e linfócitos de memória efetora ($CCR7^-CCR4^+$).

Figura 7: Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T_{reg} que expressam OX40, GITR, CTLA-4, TNFRFII e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69). A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis; E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Dupla marcação para CD4 e CD25, para analisar a população de células $CD4^+CD25^{high}$; G- Seleção de linfócitos T $CD4^+CD25^{high}$ que não expressam CD127; H- Linfócitos T_{reg} ($CD4^+CD25^{high}CD127^-FOXP3^+$); I- Linfócitos T_{reg} que expressam OX40; J- Linfócitos T_{reg} que expressam GITR; L- Linfócitos T_{reg} que expressam CD69; M- Linfócitos T_{reg} que expressam CTLA-4; N- Linfócitos T_{reg} que expressam HLA-DR e O- Linfócitos T_{reg} que expressam TNFRFII.

Figura 8: Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que expressam OX40, GITR, CTLA-4, TNFRFII e os marcadores de ativação (HLA-DR e CD69). A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis; E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Seleção dos linfócitos T CD4⁺; G- Linfócitos T CD4⁺OX40⁺; H- Linfócitos T CD4⁺GITR⁺; I- Linfócitos T CD4⁺CD69⁺, J- Linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺, L- Linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e M- Linfócitos T CD4⁺TNFRFII⁺.

Figura 9: Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ que expressam os marcadores de memória. A- Time; B- Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis; E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Seleção dos linfócitos T $CD4^+$; G- Linfócitos T $CD4^+CD45RA^+$; H- Linfócitos T $CD4^+CD45RO^+$; I- Dupla marcação para CCR4 e CCR7, para analisar a população de Linfócitos T $CD4^+CD45RA^+$ e J- Dupla marcação para CCR4 e CCR7, para analisar a população de Linfócitos T $CD4^+CD45RO^+$.

3.6 Quantificação de citocinas plasmáticas durante a infecção sintomática e assintomática

Interessados em conhecer o perfil de citocinas liberadas durante a infecção por diferentes espécies de *Plasmodium*, quantificamos e comparamos níveis plasmáticos de várias citocinas pró- e anti-inflamatórias das amostras obtidas dos indivíduos participantes do estudo de fenótipos celulares. Adicionalmente, utilizamos amostras plasmáticas de indivíduos recrutados em Plácido de Castro (Figura 3), localizado no estado do Acre, a 35 km de Acrelândia (coleta realizada seis meses antes da coleta das amostras destinadas ao processamento de PBMCs) e de portadores

assintomáticos da infecção por *P. vivax*, participantes de um estudo de coorte prospectivo de fatores de risco de malária desenvolvido por nossa equipe no Remansinho. Os indivíduos desses dois últimos grupos não forneceram PBMCs para fenotipagem celular. Todas as amostras, independentemente do local e período da coleta, foram processadas e armazenadas da mesma maneira.

Com isso, amostras plasmáticas foram examinadas para TGF- β , IL-4, IL-10, IL-12p40, IFN- γ e TNF- α usando os kits de ELISA de Captura OptEIA (BD Pharmingen), enquanto que os níveis de IL-6, sTNFRI e sTNFRII foram avaliados através dos kits de ELISA de captura DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), segundo as normas do fabricante.

Para quantificação dos níveis plasmáticos de TGF- β , IL-4, IL-10, IL-12p40, IFN- γ e TNF- α , placas de 96 orifícios (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos) foram sensibilizadas com 15 μ g/mL do anticorpo de captura específico, diluído em tampão carbonato de sódio (0,1 M, pH 9,5) e incubadas *overnight* a 4 °C. A seguir, os poços foram aspirados e as placas lavadas três vezes, com 300 μ L PBS-Tween 20 (0,05%) sendo, então, bloqueadas com 200 μ L de solução de bloqueio (10% de SFB em PBS) por 1 hora à TA. Após descarte da solução de bloqueio, 50 μ L de cada diluição da curva padrão, preparadas de acordo como as recomendações do fabricante, bem como as amostras de plasma teste (pacientes e controles), foram distribuídos por orifício seguindo-se incubação por 2 horas à TA. Após serem lavados cinco vezes com 300 μ L de PBS-Tween 20 (0,05%), cada orifício recebeu 50 μ L da solução de detecção (anticorpo monoclonal biotilado + SAV-HRP/*streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*) seguindo-se incubação por 1 hora à TA. Finalmente, as placas foram lavadas sete vezes, com 300 μ L PBS-Tween 20 (0,05%), e incubadas com 50 μ L do substrato apropriado (Tetrametilbenzidina -TMB - e Peróxido de hidrogênio, BD Pharmingen) por 30 minutos, protegidas da luz, à TA. A reação foi finalizada com 25 μ L de H₂SO₄ (2 N) e a leitura das placas foi realizada em leitor automático de ELISA a 450 nm. As absorbâncias obtidas foram, então, convertidas em pg/mL e plotadas frente a uma curva padrão específica. Para a dosagem de TGF- β , as amostras de plasma foram diluídas cinco vezes (em PBS), como recomendação do fabricante. Para isso, antes de serem distribuídas aos orifícios, cada amostra teste foi diluída e

inativada com 4 μ L de HCl (1 N) durante 1 hora, à 4 °C. Após esse tempo as mesmas foram neutralizadas com 4 μ L de NaOH. Para quantificação dessa citocina, o valor em pg/mL foi multiplicado por cinco para corrigir a diluição da amostra.

Para avaliar os níveis plasmáticos de IL-6 e dos receptores solúveis de TNF I e II, placas de 96 orifícios (Millipore) foram sensibilizadas com 2 μ g/mL do anticorpo de captura para IL-6 e sTNFRII e com 4 μ g/mL do anticorpo de captura para sTNFRI, diluídos em PBS e incubadas *overnight* à TA. A seguir, os poços foram aspirados e as placas lavadas três vezes, com 300 μ L PBS-Tween 20 (0,05%) sendo, então, bloqueadas com 200 μ L de solução de bloqueio (10% de SFB em PBS) por 1 hora à TA. Após descarte da solução de bloqueio, 50 μ L de cada diluição da curva padrão, preparadas de acordo como as recomendações do fabricante, bem como as amostras de plasma teste (pacientes e controles), foram distribuídos por orifício seguindo-se incubação por 2 horas à TA. Para dosagem de sTNFRI as amostras foram diluídas 1/10 (em solução contendo 1% BSA e PBS) e para a dosagem de sTNFRII, diluídas 1/100. Após serem lavados, três vezes, com 300 μ L de PBS-Tween 20 (0,05%), cada orifício recebeu 50 μ L da solução de detecção (anticorpo monoclonal biotilado) seguindo-se incubação por 2 horas à TA. Procedeu-se novas etapas de lavagens (três vezes) e adicionou-se a cada poço 50 μ L da SAv-HRP. As placas foram novamente incubadas à TA por 20 minutos. Finalmente, as placas foram lavadas cinco vezes, com 300 μ L PBS-Tween 20 (0,05%), e incubadas com 50 μ L do substrato apropriado (TMB e Peróxido de hidrogênio, BD Pharmingen) por 20 minutos, protegidas da luz, à TA. A reação foi finalizada com 25 μ L de H₂SO₄ (2 N) e a leitura das placas foi realizada em leitor automático de ELISA a 450 nm. As absorbâncias obtidas foram, então, convertidas em pg/mL e plotadas frente a uma curva padrão específica. Para quantificação do sTNFRI e do sTNFRII, o valor em pg/mL foi multiplicado pelo fator de correção 10 e 100, respectivamente.

3.7 Detecção de IL-10 intracelular produzida por subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e por monócitos

Com o objetivo de verificar se subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e monócitos são importantes fontes de IL-10 intracelular, os criotubos contendo PBMCs de

pacientes durante a fase aguda e convalescente da infecção malárica, como também de controles foram descongelados como descrito na seção 3.5.

As PBMCs foram cultivadas para identificar linfócitos produtores de IL-10 (painel fenotípico definido na Tabela 6) em duas condições: estimuladas com PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) combinado com Ionomicina por cinco horas e estimuladas com LPS (Lipopolissacarídeo) por 12 horas; enquanto que para identificação dos monócitos produtores de IL-10 (painel fenotípico definido na Tabela 7), as PBMCs foram estimuladas com LPS por 12 horas. Os painéis definidos para quantificação de IL-10 intracelular nessas subpopulações estão descritos, a seguir, nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados na identificação de subpopulações de linfócitos T CD4+ produtores de IL-10 intracelular

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Clone	Número de catálogo
CD45RO	Alexa 700	Biolegend	UCHL-1	304218
IL-10	PE	Biolegend	JES3-9D7	501404
CTLA-4	APC	Biolegend	L3D10	349908
CD25	PECy7	Biolegend	BC96	302612
CD39	FITC	Biolegend	A1	328206
CD4	APCCy7	Biolegend	RPA-T4	300518
CD127	Bril. violet 421	Biolegend	A019D5	351310
CD3	PE-TR	Invitrogen	AKA7D6	MHCD0317
Viabilidade	Acqua	Invitrogen	-	L34957

Tabela 7 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados para identificar monócitos produtores de IL-10 intracelular

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Clone	Número de catálogo
HLA-DR	Alexa 700	BD Pharmingen	G46-6	560743
IL-10	APC	Biolegend	JES3-9D7	501410
CCR2	PE	R&D	48607	FAB151P
CD14	PerCPCy5.5	Biolegend	HCD14	325622
CD19	PE-TR	Invitrogen	SJ25-Cl	MHCD1917
CD8	PE-TR	Invitrogen	3B5	MHCD0817
CD56	PE-TR	Invitrogen	MEM-188	MHCD5617
CD3	PE-TR	Invitrogen	AKA7D6	MHCD0317
Viabilidade	Acqua	Invitrogen	-	L34957

Em cada cultivo foram utilizadas $2,0 \times 10^6$ PBMCs viáveis. Todas as amostras tiveram o seu respectivo controle de estímulo, isto é, foram cultivadas sob as mesmas condições exceto pela adição do estímulo utilizado. Após terem sua viabilidade averiguada e o número estimado, as células foram ressuspendidas em meio RPMI completo -- RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de SFB inativado (Hyclone, Logan, UT, Estados Unidos), Hepes (10 mM) (Gibco), Piruvato de Sódio (1 mM) (Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM) (Gibco), Penicilina /Estreptomicina/ Anfotericina B (1%) (Gibco) e 2-Mercaptoetanol (55 μ M) (Gibco) -- e transferidas para placa de 96 poços em fundo "U" (volume final por poço: 200 μ L), estimuladas com PMA (250 ng/mL, Sigma-Aldrich) e Ionomicina (1 μ g/mL, Sigma-Aldrich) ou LPS (1 μ g/mL, Sigma-Aldrich), e incubadas em estufa de CO₂. Após uma hora do início do estímulo, 1 μ L de Brefeldina A foi adicionado a cada poço (estimulado e não-estimulado) e a placa foi incubada em estufa de CO₂ por mais quatro horas (amostras estimuladas com PMA combinado com Ionomicina) ou por mais 11 horas (amostras estimulados com LPS).

Ao término da incubação, as células foram transferidas para placa de 96 poços em fundo "V" (Nunc) e iniciou-se o procedimento de marcação das moléculas de superfície seguido pela marcação de IL-10 intracelular. Para tal, a placa foi centrifugada a 600 g por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e a cada poço foram adicionados 200 μ L de tampão FACS (PBS pH 7,2, SFB 5%, 0,1% NaN₃). A placa foi novamente centrifugada a 600 g por cinco minutos e essa etapa de lavagem foi repetida para retirada total do meio RPMI completo. O sedimento celular foi ressuspendido em tampão FACS seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos monoclonais de superfície (volume final total da solução: 100 μ L) dos painéis que identificam subpopulações de linfócitos (Tabela 6) e os monócitos (Tabela 7). Após incubação de 15 minutos no escuro à TA, foram adicionados a cada poço 100 μ L do tampão A (*buffer* A, GAS001S100, Invitrogen) e as amostras foram novamente incubadas por 15 minutos à TA. A placa foi então centrifugada a 600 g, por cinco minutos. Após uma etapa de lavagem com 200 μ L de tampão FACS, seguidas por centrifugação a 600 g por cinco minutos, iniciou-se a etapa de marcação intracelular de IL-10. Assim, as células foram ressuspendidas em tampão B (*buffer* B,

GAS002S100, Invitrogen) seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos de IL-10 conjugada a PE (painel de linfócitos) ou IL-10 conjugada a APC (painel de monócitos) (volume final total da solução: 100 μ L). Após 20 minutos, a cada poço foi adicionado 100 μ L de tampão FACS, seguido por centrifugação a 600 g por cinco minutos. Procedeu-se uma etapa de lavagem com 200 μ L de tampão FACS, a placa foi centrifugada a 600 g por cinco minutos e as amostras foram fixadas em paraformaldeído 1% seguindo-se a leitura no equipamento *LSRFortessa* (BD Biosciences) disponível no departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Foram adquiridos 600 mil eventos para cada painel. As análises foram realizadas utilizando-se o software *FlowJo* (TreeStar).

As figuras a seguir descrevem as estratégias de análise utilizadas para identificar subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Figuras 10 e 11) e monócitos (Figura 12 e 13) produtores de IL-10 intracelular.

Figura 10: Estratégia de análise utilizada para definir subpopulações de linfócitos T CD4⁺ produtoras de IL-10 intracelular. A- Time; B-Singlets; C- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de linfócitos viáveis; D1- IL-10 produzida por linfócitos viáveis; E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; E1- IL-10 produzida por linfócitos T; F- Linfócitos T CD4⁺; F1- IL-10 produzida por linfócitos T CD4⁺; G- Linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺; G1- IL-10 produzida por linfócitos T CD4⁺ CD45RO⁺; H- Linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺; H1- IL-10 produzida por linfócitos T CD4⁺ CTLA-4⁺; I- Dupla marcação para CD4 e CD25, para analisar a população de células CD4⁺CD25^{high}; I1- IL-10 produzida por linfócitos T CD4⁺ CD25^{high}; J- Dupla marcação para CD127 e CD39, para analisar a população de células T CD4⁺ CD25^{high} CD127-CD39⁺; J1- IL-10 produzida por linfócitos T CD4⁺ CD25^{high}CD127-CD39⁺; L- Linfócitos T CD4⁺CD25^{high} CD127-CD39⁺CD45RO⁺; L1- IL-10 produzida por linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CD45RO⁺; M- Linfócitos T CD4⁺CD25^{high} CD127-CD39⁺CTLA-4⁺; M1- IL-10 produzida por linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CTLA-4⁺.

Figura 11: Estratégia de análise utilizada para definir o percentual de linfócitos T, T CD4⁺, T CD4⁺CD45RO⁺ e T CD4⁺CTLA-4⁺ responsável pela produção de IL-10 a partir das PBMCs viáveis. A- Time; B-Singlets; C- Seleção de PBMCs viáveis; D- IL-10 produzida por PBMCs viáveis; E- Seleção dos linfócitos T por meio da expressão de CD3; F- Linfócitos T CD4⁺; G- Linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺; H- Linfócitos T CD4⁺CTLA-4⁺.

Figura 12: Estratégia de análise utilizada para definir monócitos produtores de IL-10 intracelular. A- Time; B-Singlets; C- Os monócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; D- Seleção de monócitos viáveis e negativos para CD3, CD8, CD56 e CD19; E- Seleção dos monócitos CD14⁺; E1- Monócitos CD14⁺HLA-DR⁺; E2- IL-10 produzida por monócitos CD14⁺ e E3- Monócitos CD14⁺CCR2⁺.

Figura 13: Estratégia de análise utilizada para definir o percentual de monócitos CD14⁺ responsável pela produção de IL-10 a partir das PBMCs viáveis. A- Time; B-Singlets; C- Seleção de PBMCs viáveis; D- IL-10 produzida por PBMCs viáveis; E- Monócitos CD14⁺.

3.8 Detecção de citocinas dos sobrenadantes dos ensaios de reestímulo celular

Com o objetivo de avaliar outras citocinas produzidas durante o reestímulo com PMA combinado com Ionomicina ou LPS, nos ensaios para detecção de IL-10 intracelular, algumas amostras foram cultivadas e estimuladas sob as mesmas condições que as destinadas à marcação intracelular excetuando-se pela adição de Brefeldina A. Para este fim, a placa com as amostras destinadas a coleta do sobrenadante de cultura foi centrifugada a 600 g por cinco minutos e 150 μ L do sobrenadante de cultura foi coletado e imediatamente armazenado à -80 °C.

As amostras de sobrenadantes foram avaliadas utilizando o kit de detecção de citocinas humano *CBA Th1/Th2/Th17* (BD Biosciences), que permite quantificar simultaneamente IL-2, INF- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A, seguindo-se as recomendações do fabricante. Assim, preparou-se as curvas padrão adicionando a um tubo de 15 mL as sete esferas padrão (uma para cada citocina avaliada) e dois mL

de diluente do ensaio, seguida de incubação por 15 minutos, à TA. Realiza-se uma diluição seriada, com nove pontos de curva, sendo que o primeiro e último pontos são equivalentes a 5000 pg/mL e 20 pg/mL, respectivamente. Após esta etapa, inicia-se a preparação das *beads* de captura baseando-se no número de amostras a serem testadas (incluindo a diluição da curva padrão). Os tubos contendo as *beads* de captura individuais (de A1 a A7, um para cada citocina) foram vigorosamente homogeneizados e adicionou-se 10 µL de cada citocina por teste a um tubo de 15 mL. O tubo contendo volumes iguais de todas as *beads* de captura foi homogeneizado e a partir deste momento inicia-se o ensaio para detecção de citocinas.

Foram distribuídos 100 µL de tampão de lavagem (*wash buffer*) a cada orifício de uma placa com filtro (*Millipore MultiScreen HTS-BV 1.2 µm Clear non-sterile filter plates*, Millipore). Em seguida, o volume adicionado foi aspirado à vacuo utilizando-se o *Manifold* (*Millipore MultiScreen HTS Vacuum Manifold*, Millipore,) até que todo o tampão de lavagem fosse drenado. A cada orifício foram, então, adicionados 50 µL da mistura das *beads* de captura, 50 µL da amostra (ou da curva padrão) e 50 µL do reagente de detecção Th1/Th2/Th17 PE *human*. A placa foi protegida da luz e agitada por 5 minutos a 1.100 rpm. Após essa etapa, foi incubada por 3 horas, à TA, no escuro. Por fim, utilizando o *Manifold* o volume foi drenado à vacuo e a cada poço foi adicionado 120 µL de tampão de lavagem. As amostras foram transferidas para tubos de citometria que continham outros 180 µL de tampão de lavagem, totalizando um volume final de amostra de 300 µL. As amostras foram adquiridas no equipamento *LSRFortessa* (BD Biosciences), disponível no Hospital Israelita Albert Einstein. Foram adquiridos 2500 eventos. As análises foram realizadas utilizando-se o software *FCAP Array* versão 3.0 (BD Biosciences).

3.9 Ensaios de proliferação celular frente a mitógeno

Para avaliar a proliferação celular durante a infecção por *Plasmodium*, utilizamos o reagente *Cell Trace* (*CellTrace Violet Cell Proliferation Kit*, catálogo#C34557, Invitrogen) para citometria de fluxo. Para tal, os criotubos contendo PBMCs foram descongelados como descrito na seção 3.5.

Para a marcação com o *Cell Trace*, 10^6 células foram lavadas duas vezes com PBS estéril, centrifugadas a 500 g por oito minutos, ressuspensas em um mL de PBS estéril e incubadas com o reagente (5 mM) por 20 minutos. Após esta etapa de incubação, a marcação foi interrompida adicionando-se 14 mL de RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de SFB inativado (Hyclone), Hepes (10 mM) (Gibco), Piruvato de Sódio (1 mM) (Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM) (Gibco), Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B (1%) (Gibco) e 2-Mercaptoetanol (55 μ M) (Gibco), seguindo-se de incubação por cinco minutos. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 500 g por oito minutos e o sedimento celular foi então ressuspendido em meio RPMI suplementado como descrito acima. As células foram então transferidas para placa de 96 poços em fundo “U”, estimuladas PHA-P (*Phytohemagglutinin-P*) (Sigma-Aldrich), em uma concentração de 10 μ g/mL (volume final do poço: 200 μ L) e incubadas em estufa de CO₂, à 37 °C, por 72 horas. Todas as amostras tiveram o seu respectivo controle de estímulo, isto é, foram cultivadas sob as mesmas condições exceto pela adição do estímulo utilizado (PHA-P).

Finalmente, após o período de incubação, as células foram transferidas para placa em fundo “V” (Nunc), a mesma foi centrifugada a 600 g por cinco minutos e essa etapa de lavagem foi repetida para retirada total do meio RPMI. O sedimento celular foi ressuspendido em tampão FACS seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos monoclonais de superfície com os fenótipos de interesse (volume final total da solução: 100 μ L). A Tabela 8 descreve o painel de marcadores utilizado para avaliação da proliferação celular.

Tabela 8 - Lista de anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da proliferação celular

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Clone	Número de catálogo
CD4	FITC	BD Pharmingen	RPA-T4	302006
CD3	PE-TR	Invitrogen	AKA7D6	MHCD0317
CD8	APCCY7	Biolegend	SK1	344717
Proliferação	Pacific Blue	Invitrogen	-	C34557

Após ser incubada por 30 minutos no escuro à TA, a placa foi centrifugada a 600 g, por cinco minutos. A seguir, as amostras foram lavadas com 200 μ L de tampão FACS e ressuspensas em PBS seguindo-se a leitura no equipamento *LSRFortessa* (BD Biosciences) disponível no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Foram adquiridos 200 mil eventos. As análises foram realizadas utilizando-se o software *FlowJo* (TreeStar).

A figura a seguir descreve a estratégia de análise utilizada para avaliar a proliferação celular por citometria de fluxo (Figura 14).

Figura 14: Estratégia de análise utilizada para avaliar a proliferação de linfócitos, linfócitos T, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. A- Os linfócitos foram selecionados por seu tamanho e complexidade; A1- Proliferação dos linfócitos; B- Linfócitos T; B1- Proliferação dos linfócitos T; C- Linfócitos T CD4⁺; C1- Proliferação dos linfócitos T CD4⁺; D- Linfócitos T CD8⁺; D1- Proliferação dos linfócitos T CD8⁺.

3.10 Análise estatística

Em todas as análises de variáveis contínuas, foram utilizados testes não-paramétricos. Para as comparações entre mais de dois grupos de indivíduos (por exemplo, aqueles infectados por *P. falciparum*, *P. vivax*, ambas as espécies e controles imunes), foram utilizados testes de Kruskal-Wallis seguidos de comparações dois a dois com testes de Mann-Whitney. Variáveis contínuas em amostras pareadas (por exemplo, de indivíduos durante a infecção aguda e a convalescença) foram comparadas com o teste de Wilcoxon. Proporções em amostras pareadas foram comparadas com o teste de McNemar. Proporções em amostras independentes foram comparadas com testes de χ^2 . O teste de correlação de Spearman foi utilizado para correlacionar variáveis quantitativas. Para todos os testes foi estabelecido um nível de significância de 5%.

Utilizamos modelos de regressão linear múltipla para determinar se os níveis de citocinas plasmáticas se correlacionavam com os seguintes desfechos: níveis de hemoglobina, contagens de plaquetas, parasitemia e índice clínico. Essa análise foi limitada aos indivíduos com infecção por *P. vivax*. As parasitemias e os níveis de citocinas foram transformados logaritmicamente (log de base 10) para normalizar os dados. Os coeficientes de correlação padronizados (β) foram interpretados como uma medida da influência de cada variável independente em cada um dos desfechos, ajustando-se o efeito de todas as demais variáveis independentes incluídas no modelo. Os modelos de regressão linear múltipla para cada citocina incluíram, como variáveis independentes, a idade (em anos), o gênero (feminino = 0, masculino = 1) e a duração (em anos) da exposição à malária. Parasitemia foi incluída como variável independente exceto quanto ela representava o desfecho a ser analisado. Um modelo final foi construído para determinar o efeito de cada citocina, uma vez ajustado o efeito de todas as demais citocinas, nos desfechos de interesse. Esse modelo final incluiu somente as variáveis associadas ao desfecho ao nível de significância de 5%. Em todas as análises utilizamos o programa SPSS versão 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, Estados Unidos).

4 RESULTADOS

4.1 População de estudo

As características demográficas, clínicas e hematológicas dos participantes do estudo estão apresentadas na Tabela 9. Enquanto que os indivíduos com malária vivax mostraram-se mais jovens que os infectados por *P. falciparum*, os pacientes infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum*, os co-infectados com ambas as espécies e os controles imunes são todos comparáveis em sexo, tempo de exposição à malária, níveis de hemoglobina, número de plaquetas e nos percentuais de anêmicos e plaquetopênicos. Anemia foi definida quando as concentrações de hemoglobina estiveram abaixo dos seguintes valores de corte: 120 g/L para adolescentes com idade entre 12 a 14 anos e mulheres não grávidas, e 130 g/L para homens com idade maior ou igual a 15 anos. Plaquetopenia foi definida quando as contagens de plaquetas foram menores que $150 \times 10^9/L$. Todas as espécies de parasito, independente da espécie, induziram significativas reduções no número de leucócitos da circulação. A diminuição do número de linfócitos, linfócitos T e linfócitos T CD4⁺ foi observada somente nos infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum*. As contagens de parasitos determinada pela PCR quantitativa em tempo real foram maiores em *P. vivax*, enquanto que os infectados por *P. falciparum* relataram uma maior duração de dias com sintomas até o diagnóstico. As intensidades totais de sintomas relacionados com a malária (estimada pelo índice clínico) foram semelhantes entre indivíduos infectados, independentemente da espécie.

Tabela 9- Características demográficas, clínicas e hematológicas dos participantes do estudo.

Característica	Valor por grupo ^a				Valor de <i>p</i>
	Controles não infectados	Infectados por <i>P.vivax</i>	Infectados por <i>P.falciparum</i>	Infectados por <i>P.vivax</i> e <i>P.falciparum</i>	
Número de indivíduos	15	38	17	8	
Idade (anos)	33,5 (28,75- 41,75)	28,5 (21-43)	43 (35-49,5)	34 (20,2-43)	0,030 ^b
Sexo (% homens)	53,3% (8/15)	68,4% (26/43)	70,5% (12/17)	50% (4/8)	0,660
Tempo de exposição à malária (anos)	28,5 (22,0- 34,7)	21 (13,9-30,1)	30 (21,2- 37,7)	22,5 (16- 33,8)	0,075
Níveis de hemoglobina (g/L)	143 (120- 149)	131 (115-141)	132 (120- 137)	133 (113-139)	0,509
Percentual de anêmicos	20 (3/15)	42,1 (16/38)	29,4 (5/17)	25 (2/8)	0,410
Número de plaquetas (10 ⁹ /L)	199 (141- 231)	178 (118-207)	208 (168- 231)	240 (160,7-300,5)	0,072
Percentual de plaquetopênicos	33,3 (5/18)	42,1 (16/38)	17,6 (3/17)	25 (2/8)	0,328
Número de leucócitos (10 ³ /mm ³)	7,3 (5,6- 8,5)	5,6 (4,3- 6,7)	5,1 (4,5- 6,4)	6,5 (5,5- 7,2)	0,017 ^c
Número de linfócitos (10 ³ /mm ³)	2,1 (1,5- 3,3)	1,2 (0,8- 1,6)	1,3 (0,9- 1,7)	1,8 (1,5- 2,2)	<0,0001 ^d
Número de linfócitos T (10 ³ /mm ³)	1,5 (1,2-2,4)	0,8 (0,5-1,2)	1,0 (0,6-1,1)	1,3 (1,0-1,6)	<0,0001 ^e
Número de linfócitos T CD4 ⁺ (10 ³ /mm ³)	1,0 (0,7-1,4)	0,5 (0,3-0,7)	0,5 (0,4-0,8)	0,8 (0,6-1,0)	0,001 ^f
Número de monócitos (10 ³ /mm ³)	0,2 (0,0-0,4)	0,3 (0,2-0,4)	0,4 (0,2-0,5)	0,5 (0,2-0,5)	0,087
Parasitemia (parasitos/μL)		2384,6 (662-8088)	515,5 (31,5-3638)	101,8 (27,5-444,4)	0,003 ^g
Índice clínico		0,31 (-2,5-3,7)	0,30 (-4,6-3,2)	-3,17 (-5,8-[-0,7])	0,103
Duração de sintomas (dias)		3 (2-5)	5 (4-7)	2 (1-3)	0,030 ^h

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados entre três ou quatro grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (variáveis contínuas) ou teste χ^2 (proporções).

^b O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por *P.vivax* [Pv] e os infectados por *P.falciparum* [Pf] ($p=0,006$).

^c O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre controles [Co] e infectados por Pv ($p=0,017$) ou por Pf ($p=0,004$).

^d O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre Co e infectados por Pv ($p<0,0001$) ou por Pf ($p=0,002$) e entre infectados por *P.vivax* e *P.falciparum* [Pv+Pf] e por Pv ($p=0,008$).

^e O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre Co e infectados por Pv ($p<0,0001$) ou por Pf ($p=0,001$) e entre infectados por Pv+Pf e por Pv ($p=0,005$) ou por Pf ($p=0,011$).

^f O teste de Mann- Whitney mostrou diferença significativa entre Co e infectados por Pv ($p=0,001$) ou por Pf ($p=0,002$) e entre infectados por Pv+Pf e por Pv ($p=0,009$) ou por Pf ($p=0,027$).

^g O teste de Mann- Whitney mostrou diferença significativa entre infectados por Pv e por Pv+Pf ($p=0,001$) e diferença limítrofe entre infectados por Pv e por Pf ($p=0,051$).

^h O teste de Mann- Whitney mostrou diferença significativa entre infectados por Pf e por Pv ($p=0,038$) ou por Pv+Pf ($p=0,022$).

Para determinar se as mudanças observadas nas subpopulações de células brancas periféricas durante a fase aguda da infecção malária se mantinham depois que os parasitos tinham sido eliminados pelo tratamento, nós comparamos 14 pares de amostras de fase aguda e convalescente de pacientes infectados inicialmente por *P. vivax*. Todas as amostras da fase convalescente, coletadas 28 dias (variando de 26-30 dias) após o início do tratamento, foram negativas pela PCR quantitativa em tempo real para *P. vivax* e *P. falciparum*. Apesar de não observamos diferença significativa entre o número de leucócitos, as medianas pós-tratamento dos números de linfócitos, linfócitos T, linfócitos T CD4⁺, aumentaram significativamente, como observado na Tabela 10. Observe também que o percentual de anêmicos foi reduzido e que a plaquetopenia, observada em três pacientes na fase aguda, foi eliminada. Estes resultados indicam que as alterações hematológicas observadas durante a infecção malárica são parcialmente revertidas após a cura da doença.

Tabela 10- Características hematológicas em amostras pareadas de fase aguda e convalescente da infecção por *P. vivax*

Característica	Valor ^a		Valor de <i>p</i>
	Fase aguda (n=14)	Fase convalescente (n=14)	
Níveis de hemoglobina (g/L)	133 (108-145)	135 (119-144)	0,093
Percentual de anêmicos	35,7 (5/14)	21,5 (3/14)	0,500
Número de plaquetas (10 ⁹ /L)	189 (149,5-211,7)	270 (237,7-339,0)	0,001
Percentual de plaquetopênicos	21,5 (3/14)	0 (0/14)	0,250
Número de leucócitos (10 ³ /mm ³)	5,45 (4,0-6,8)	5,80 (4,8-7,45)	0,073
Número de linfócitos (10 ³ /mm ³)	1,0 (0,64-1,39)	1,8 (1,40-2,04)	0,002
Número de linfócitos T (10 ³ /mm ³)	0,72 (0,47-0,92)	1,2 (0,8-1,4)	0,011
Número de linfócitos T CD4 ⁺ (10 ³ /mm ³)	0,45 (0,31-0,66)	0,72 (0,45-0,87)	0,013
Número de monócitos (10 ³ /mm ³)	0,2 (0,1-0,3)	0,35 (0,3-0,4)	0,08

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Wilcoxon (variáveis contínuas) ou teste de McNemar (proporções). Não há dados hematológicos para um par de amostras.

4.2 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador, ativador e de memória

Nossa ampla caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ presentes circulação periférica durante a malária humana, não se limitou examinar somente as células T_{reg} clássicas (CD4⁺CD25^{high}CD127-FOXP3⁺), mas incluiu várias populações celulares que expressam em sua superfície diferentes combinações de possíveis marcadores de atividade moduladora, como FOXP3, OX-40, TNFRII, GITR, CD39 e CTLA-4, de ativação, como HLA-DR e CD69, e memória, como CD45RO e CCR7.

Nossa análise teve início comparando a expressão de vários destes marcadores pelos linfócitos CD4⁺ entre pacientes infectados por *P.vivax* (n=38), por *P.falciparum* (n=17), co-infectados (n=8) e controles imunes (n=15). Pelo teste de Kruskal-Wallis, houve diferença significativa entre estes grupos para várias populações celulares, como observado na Tabela 11, exceto para expressão de HLA-DR, CD39 e dos marcadores de memória. A partir desses resultados, e somente para as variáveis que mostraram valor de significância, realizamos as comparações entre dois grupos independentes, pelo teste de Mann-Whitney.

O percentual de linfócitos T CD4⁺ que expressa CD69, um marcador de ativação recente, esteve aumentado em todos os indivíduos infectados comparados aos controles expostos; os que expressam CTLA-4, OX40 e TNFRII apresentaram proporções maiores nos infectados por *P. vivax* e por *P. falciparum* quando comparados com controles e, para algumas dessas populações, com co-infectados. Não houve diferença nas comparações entre infectados por *P.vivax* e por *P. falciparum* (Tabela 11).

Tabela 11- Percentual de linfócitos T CD4⁺ que expressam marcadores de atividade moduladora, de ativação e de memória.

% de linfócitos T CD4 ⁺	Valor por grupo ^a				Valor de <i>p</i>
	Controles não infectados	Infectados por <i>P.vivax</i>	Infectados por <i>P.falciparum</i>	Infectados por <i>P.vivax</i> e <i>P.falciparum</i>	
Número de indivíduos	15	38	17	8	
CTLA-4 ⁺	0,57 (0,41-0,74)	1,29 (0,91-1,65)	0,89 (0,67-1,89)	0,66 (0,50-0,82)	<0,0001 ^b
TNFRII ⁺	1,26 (0,83-1,39)	1,89 (1,44-2,44)	1,69 (1,25-2,26)	1,29 (1,05-1,64)	0,001 ^c
GITR ⁺	0,74 (0,60-0,82)	1,04 (0,77-1,50)	0,76 (0,62-1,14)	0,72 (0,62-0,91)	0,006 ^d
OX40 ⁺	8,06 (6,56-11,0)	12,55 (7,97-15,8)	12,3 (8,23-15,6)	9,03 (7,19-11,5)	0,017 ^e
CD39 ⁺	6,45 (4,12-8,25)	7,10 (4,15-11,2)	7,58 (6,12-10,2)	5,81 (2,62-10,4)	0,499
CD69 ⁺	3,66 (1,67-4,20)	8,37 (6,02-12,2)	7,92 (3,93-12,7)	9,21 (5,72-11,8)	0,002 ^f
HLA-DR ⁺	4,95 (3,61-6,47)	5,66 (3,88-7,61)	6,47 (4,33-9,62)	6,15 (4,14-7,81)	0,278
CD45RO ⁺	57,7 (51,1-71,6)	58,8 (43,0-70,5)	63,8 (56,5-67,4)	61,6 (46,0-77,5)	0,760
CD45RO ⁺ CCR7 ⁺ CCR4 ⁻	39,7 (36,5-41,5)	37,5 (33,9-45,2)	40,1 (33,8-47,1)	43,5 (40,8-49,5)	0,279
CD45RO ⁺ CCR7 ⁻ CCR4 ⁺	13,1 (10,5-14,2)	12,8 (10,4-16,7)	12,0 (9,35-13,8)	10,1 (6,86-12,0)	0,130
CD45RA ⁺	24,6 (15,9-27,9)	25,2 (17,5-40,75)	27,4 (21,6-28,6)	28,0 (13,2-43,4)	0,825
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ CCR4 ⁻	92,4 (86,4-93,7)	90,2 (84,0-94,0)	91,3 (88,3-93,8)	94,3 (81,8-96,3)	0,682
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ CCR4 ⁺	1,01 (0,56-1,75)	0,95 (0,55-1,51)	1,02 (0,74-1,68)	0,65 (0,32-1,96)	0,856

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados entre quatro grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

^b O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre controles [Co] e infectados por *P.vivax* [Pv] ($p < 0,0001$) ou por *P.falciparum* [Pf] ($p = 0,001$) e entre infectados por *P.vivax* e *P.falciparum* [Pv+Pf] e por Pv ($p = 0,01$) ou por Pf ($p = 0,043$).

^c O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre Co e infectados por Pv ($p < 0,0001$) ou por Pf ($p = 0,014$) e entre infectados por Pv+Pf e por Pv ($p = 0,021$).

^d O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre Co e infectados por Pv ($p = 0,002$) e entre infectados por Pv+Pf e por Pv ($p = 0,016$).

^e O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre Co e infectados por Pv ($p = 0,010$) ou por Pf ($p = 0,006$).

^f O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre Co e infectados por Pv ($p < 0,0001$) ou por Pf ($p = 0,005$) ou por Pv+Pf ($p = 0,008$).

Em seguida, analisamos a população de linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺, as células T_{reg} clássicas. Observamos que a proporção de células T CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ que expressam FOXP3 é menor nos infectados por *P.vivax* quando estes são comparados com controles expostos ($p<0,0001$) e com os infectados por *P. falciparum* ($p=0,030$) (*P.vivax*: 71,85 [67,0-78,5]; *P.falciparum* 79,1 [75,5-81,9] e controles 82,1 [75,2-86,5], medianas e intervalo interquartil). Não houve diferença significativa nas proporções de subpopulações de células T_{reg} segundo a expressão de CD39 (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺CD39⁺ ou CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺CD39⁻) entre pacientes e controles.

Apesar disso, quando avaliamos a expressão dos marcadores de atividade moduladora, de ativação e de memória, nas subpopulações de T_{reg}, os resultados são bastante semelhantes aos observadas para as populações de linfócitos T CD4⁺. Como observado na Tabela 12, a expressão de CTLA-4 esteve aumentada em todos os indivíduos infectados comparados aos controles expostos; os que expressam OX40 apresentaram proporções maiores nos infectados por *P. vivax* quando comparados com controles e com os co-infectados, enquanto os co-infectados apresentaram maiores proporções de T_{reg} expressando GITR que os controles e os infectados por *P. vivax*. A expressão de HLA-DR foi menor nos infectados com malária vivax do que nos com malária falciparum ou malária mista; essa característica fenotípica das T_{reg} foi a única que diferiu os infectados por *P.vivax* e por *P. falciparum*. Uma única população de T_{reg} com fenótipo de memória/efetora, CD45RO⁺CD45RA⁻CCR7⁺CCR4⁺, mostrou-se aumentada na malária vivax em comparação com os controles (Tabela 12).

As células T_{reg} CD39⁺ e CD39⁻ apresentaram fenótipos semelhantes quanto aos demais marcadores analisados, sugerindo que CD39 não define uma subpopulação distinta de T_{reg} em pacientes com malária.

Tabela 12- Percentual de linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127-FOXP3⁺ (T_{reg}) que expressam marcadores de atividade moduladora, de ativação e de memória/efetora.

% de linfócitos T _{reg}	Valor por grupo ^a				Valor de <i>p</i>
	Controles não infectados	Infectados por <i>P.vivax</i>	Infectados por <i>P.falciparum</i>	Infectados por <i>P.vivax</i> e <i>P.falciparum</i>	
Número de indivíduos	15	38	17	8	
CTLA-4 ⁺	4,85 (3,51-5,95)	10,0 (6,83-13,85)	8,85 (6,87-13,8)	8,12 (5,91-11,9)	0,001 ^b
TNFR11 ⁺	6,10 (5,16-6,99)	6,21 (4,84-7,81)	7,34 (4,95-9,88)	8,68 (5,69-12,3)	0,371
GITR ⁺	3,44 (2,22-4,02)	3,60 (2,57-4,63)	3,53 (2,99-4,18)	4,80 (4,18-5,74)	0,049 ^c
OX40 ⁺	11,3 (9,69-13,1)	14,8 (11,5-19,7)	12,0 (10,8-21,2)	10,84 (9,34-15,6)	0,015 ^d
CD69 ⁺	9,01 (5,79-11,0)	8,61 (6,86-11,6)	7,76 (5,76-11,1)	7,65 (7,32-7,81)	0,689
HLA-DR ⁺	38,7 (30,5-48,0)	37,15 (25,6-40,3)	42,6 (36,3-43,9)	47,9 (42,1-59,8)	0,013 ^e
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻	95,6 (90,5-97,2)	92,9 (87,5-96,3)	96,1 (92,8-97,5)	95,0 (93,1-97,4)	0,157
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CCR4 ⁻	2,15 (1,34-4,99)	3,61 (2,39-5,13)	4,02 (2,96-5,20)	2,67 (0,75-3,68)	0,106
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ CCR4 ⁺	26,0 (22,7-29,8)	30,25 (26,6-36,3)	29,0 (24,1-34,3)	23,9 (21,1-36,4)	0,037 ^f
CD45RO ⁻ CD45RA ⁺	1,20 (0,58-2,02)	1,41 (0,38-4,05)	0,66 (0,39-1,83)	1,01 (0,50-2,53)	0,610

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados entre quatro grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

^b O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre controles [Co] e infectados por *P.vivax* [Pv] ($p < 0,0001$) ou por *P.falciparum* [Pf] ($p = 0,001$) ou por *P.vivax* e *P.falciparum* [Pv+Pf] ($p = 0,019$).

^c O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre infectados por Pv+Pf e por Pv ($p = 0,023$) ou Pf ($p = 0,011$) ou Co ($p = 0,004$).

^d O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por Pv e por Pv+Pf ($p = 0,039$) ou Co ($p = 0,003$).

^e O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por Pv e por Pf ($p = 0,018$) ou por Pv+Pf ($p = 0,004$).

^f O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre Co e infectados por Pv ($p = 0,010$).

A partir destes resultados, decidimos avaliar, nos pacientes e controles, qual a proporção de células CD4⁺ que apresentavam fenótipo de células T_{reg}, T_{reg} CTLA-4⁺, T_{reg} OX40⁺, T_{reg} GITR⁺, T_{reg} TNFRII⁺ e T_{reg} CD39⁺, e quais seriam as proporções de células CD4⁺ que expressavam estes marcadores que eram T_{reg} expressando este mesmo marcador, por exemplo, qual seria a proporção dos linfócitos T CD4⁺ CTLA-4⁺ que são T_{reg} CTLA-4⁺; os resultados obtidos dessas análises estão detalhados a seguir, na Tabela 13.

A proporção de células CD4⁺ que apresentavam fenótipo de células T_{reg}, variou entre os infectados de 0,48% (nos co-infectados) a 1,03% (nos infectados por *P. falciparum*); sendo que os co-infectados apresentaram menores proporções do que os outros infectados e os controles. Os infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum* tiveram o maior percentual de células CD4⁺ com fenótipo de T_{reg} CTLA-4⁺, comparados com os controles ou os co-infectados, enquanto que nos últimos encontramos os menores percentuais de células T CD4⁺ que são T_{reg} OX40⁺ e de linfócitos T CD4⁺ OX40⁺ que são T_{reg} OX40⁺. As proporções de células CD4⁺ GITR⁺ que exibiram fenótipo de T_{reg} GITR⁺ foram maiores na malária falciparum comparados com a vivax, enquanto que os infectados por *P. vivax* apresentaram menores percentuais de linfócitos T CD4⁺ TNFRII⁺ que exibiram fenótipo de T_{reg} TNFRII⁺ comparados com os infectados por *P. falciparum* ou controles (Tabela 13).

Tabela 13- Percentual de linfócitos T CD4⁺ que são subpopulações de T_{reg} (CD4⁺CD25^{high}CD127-FOXP3).

% de linfócitos	Valor por grupo ^a				Valor de <i>p</i>
	Controles não infectados	Infectados por <i>P.vivax</i>	Infectados por <i>P.falciparum</i>	Infectados por <i>P.vivax</i> e <i>P.falciparum</i>	
Número de indivíduos	15	38	17	8	
CD4 ⁺ que são T _{reg}	0,73 (0,66-0,94)	0,77 (0,54-1,00)	1,03 (0,66-1,46)	0,48 (0,43-0,66)	0,019 ^b
CD4 ⁺ que são T _{reg} CTLA-4 ⁺	0,036 (0,028-0,067)	0,073 (0,045-0,10)	0,090 (0,060-0,14)	0,042 (0,029-0,061)	0,003 ^c
CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺ que são T _{reg} CTLA-4 ⁺	6,97 (5,01-9,82)	5,15 (3,81-7,08)	8,71 (5,46-10,82)	5,88 (4,18-10,5)	0,056
CD4 ⁺ que são T _{reg} OX40 ⁺	0,088 (0,079-0,110)	0,10 (0,078-0,17)	0,14 (0,07-0,23)	0,062 (0,047-0,082)	0,004 ^d
CD4 ⁺ OX40 ⁺ que são T _{reg} OX40 ⁺	1,07 (0,78-1,50)	1,10 (0,73-1,44)	1,13 (0,63-2,53)	0,75 (0,51-0,82)	0,044 ^e
CD4 ⁺ que são T _{reg} GITR ⁺	0,026 (0,019-0,031)	0,021 (0,019-0,031)	0,04 (0,019-0,052)	0,026 (0,020-0,028)	0,161
CD4 ⁺ GITR ⁺ que são T _{reg} GITR ⁺	3,36 (2,50-4,32)	2,23 (1,84-3,73)	4,09 (3,42-5,15)	3,32 (2,74-4,73)	0,007 ^f
CD4 ⁺ que são T _{reg} TNFRII ⁺	0,045 (0,03-0,05)	0,052 (0,034-0,064)	0,086 (0,04-0,093)	0,042 (0,030-0,057)	0,138
CD4 ⁺ TNFRII ⁺ que são T _{reg} TNFRII ⁺	3,70 (2,87-6,44)	2,49 (1,87-3,77)	3,74 (2,42-7,51)	3,54 (2,43-3,92)	0,029 ^g
CD4 ⁺ que são T _{reg} CD39 ⁺	0,59 (0,29-0,79)	0,51 (0,27-0,76)	0,68 (0,46-1,13)	0,36 (0,24-0,41)	0,072
CD4 ⁺ CD39 ⁺ que são T _{reg} CD39 ⁺	0,75 (0,38-0,91)	0,73 (0,59-0,89)	0,81 (0,67-0,88)	0,78 (0,42-0,87)	0,934

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados entre quatro grupos pelo teste de Kruskal-Wallis

^b O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por *P.vivax* e *P.falciparum* [*Pv+Pf*] e Controles [*Co*] (*p*=0,013) ou infectados por *P.vivax* [*Pv*] (*p*=0,019). ou por *P.falciparum* [*Pf*] (*p*=0,007).

^c O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre *Co* e infectados por *Pv* (*p*=0,006) ou por *Pf* (*p*=0,004) e entre os infectados por *Pv+Pf* e por *Pv* (*p*=0,046) ou por *Pf* (*p*=0,013).

^d O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por *Pv+Pf* e por *Pv* (*p*<0,0001) ou por *Pf* (*p*=0,005) ou *Co* (*p*=0,016).

^e O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por *Pv+Pf* e por *Pv* (*p*=0,008) ou por *Pf* (*p*=0,031) ou *Co* (*p*=0,004).

^f O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por *Pv* e por *Pf* (*p*=0,002).

^g O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por *Pv* e por *Pf* (*p*=0,009) ou *Co* (*p*=0,035).

Avaliamos também se as populações que se mostraram aumentadas na malária vivax retornavam aos valores observados nos controles, comparando amostras pareadas de pacientes de fase aguda com as de fase convalescente, isto é 28 dias após o início do tratamento anti-malárico.

Como pode ser observado (Tabela 14) o percentual de linfócitos T CD4⁺ que expressam marcadores de atividade moduladora e de ativação foi significativamente maior na fase aguda em comparação com a convalescente da infecção por *P.vivax*, exceto para a expressão de CD39.

Tabela 14- Percentual de linfócitos T CD4⁺ que expressam marcadores de atividade moduladora e de ativação na fase aguda e convalescente da infecção por *P.vivax*.

% de linfócitos T CD4 ⁺	Valor ^a		Valor de <i>p</i>
	Fase aguda (n=15)	Fase convalescente (n=15)	
CTLA-4 ⁺	1,31 (0,82-1,59)	0,70 (0,43-0,98)	0,001
TNFRII ⁺	1,87 (1,42-2,34)	1,07 (0,96-1,35)	0,001
GITR ⁺	0,89 (0,62-1,33)	0,69 (0,50-0,80)	0,011
OX40 ⁺	13,1 (7,12-16,7)	9,08 (5,53-12,6)	0,001
CD39 ⁺	7,74 (3,93-11,7)	7,20 (4,72-9,71)	0,112
CD69 ⁺	9,37 (6,96-14,4)	3,73 (1,68-4,51)	0,001
HLA-DR ⁺	6,00 (3,22-7,68)	4,06 (2,78-5,97)	0,008

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Wilcoxon.

A proporção de células T CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ que expressam FOXP3 na fase convalescente da infecção por *P.vivax* foi semelhante aos valores observados na fase aguda, apesar de termos observamos uma maior expressão de FOXP3 na fase convalescente, sem diferença significativa (fase aguda 73,4 [68,9-80,6] e fase convalescente 83,8 [75,8-86,5], medianas e intervalo interquartil). Quando avaliamos a expressão dos marcadores de atividade moduladora e de ativação nas subpopulações de T_{reg}, somente as células que são OX40⁺ e CD69⁺, mostram-se aumentadas na fase aguda de maneira significativa, enquanto que as que expressam HLA-DR apresentam proporções maiores na convalescença.

Tabela 15- Percentual de linfócitos T CD4⁺CD25^{high}CD127-FOXP3⁺ (T_{reg}) que expressam marcadores de atividade moduladora e de ativação na fase aguda e convalescente da infecção por *P.vivax*

% de linfócitos T _{reg}	Valor ^a		Valor de <i>p</i>
	Fase aguda (n=15)	Fase convalescente (n=15)	
CTLA-4 ⁺	8,07 (5,97-14,7)	7,36 (5,00-9,13)	0,307
TNFR2 ⁺	5,64 (4,48-8,81)	5,99 (4,15-8,72)	0,910
GITR ⁺	3,46 (1,82-4,86)	2,32 (1,57-3,65)	0,173
OX40 ⁺	14,9 (12,3-21,0)	9,89 (7,54-12,6)	0,021
CD69 ⁺	8,46 (7,07-14,2)	4,82 (4,26-5,93)	0,003
HLA-DR ⁺	36,2 (25,6-39,1)	40,1 (35,7-48,2)	0,027

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Wilcoxon.

Decidimos, então, avaliar se as proporções de células que se mostraram aumentadas na fase aguda da infecção malárica (independente da espécie) estavam correlacionadas com parasitemia. Observamos que proporção de células CD4⁺ que expressam CD69 (Correlação de Spearman, 0,418; *p*=0,002), TNFR2 (Correlação de Spearman, 0,424; *p*=0,002), GITR (Correlação de Spearman, 0,308; *p*=0,014), OX40 (Correlação de Spearman, 0,328; *p*=0,009), CTLA-4 (Correlação de Spearman, 0,479; *p*<0,0001) e a proporção de células CD4⁺ que são T_{reg}, ou seja, CD25^{high}CD127-FOXP3⁺ (Correlação de Spearman, 0,464; *p*<0,0001) correlacionam-se positivamente com o número de parasitos circulantes (Figura 15).

Observamos também uma correlação positiva entre as proporções de células T_{reg} que expressam OX40 (Correlação de Spearman, 0,373; *p*=0,003) e parasitemia de todos os infectados (independente da espécie). Apesar de termos observado uma correlação na mesma direção entre parasitemia e células T_{reg} que expressam CTLA-4 (Correlação de Spearman, 0,520; *p*=0,033), essa mostrou-se significativa somente quando analisamos o grupo de pacientes infectados por *P. falciparum* (círculos preenchidos na Figura 16). Por fim, encontramos uma correlação negativa entre parasitemia (todos os infectados) e percentuais de T_{reg} que expressam HLA-DR (Correlação de Spearman, -0,433; *p*=0,002) (Figura 16).

Figura 15: Correlação entre a proporção de células CD4⁺ e parasitemia. Os quadrados representam os infectados por *P. vivax*, os círculos os infectados por *P. falciparum*, enquanto que os triângulos invertidos representam os co-infectados.

Figura 16: Correlação entre a proporção de células T_{reg} ($CD4^+CD25^{high}CD127-FOXP3^+$) e parasitemia. Os quadrados representam os infectados por *P. vivax*, os círculos (ou círculos preenchidos) os infectados por *P. falciparum*, enquanto que os triângulos invertidos representam os co-infectados.

4.3 Níveis de citocinas plasmáticas durante a infecção sintomática e assintomática

Para avaliar os níveis de citocinas plasmáticas durante a infecção sintomática e assintomática por *Plasmodium*, analisamos, além das amostras destinadas ao processamento de PBMCs, amostras plasmáticas de pacientes abordados em Plácido de Castro e de portadores assintomáticos da infecção por *P. vivax*, participantes de um estudo de coorte prospectivo de fatores de risco de malária desenvolvido por nossa equipe no Remansinho. Por este motivo, as características demográficas, hematológicas e clínicas, destes sujeitos, serão apresentadas de maneira distinta.

4.3.1 Características dos indivíduos

Os grupos de pacientes sintomáticos infectados por *P. vivax*, *P. falciparum* ou co-infectados com ambas as espécies foram comparáveis entre si e com indivíduos controles em termos de idade, sexo, tempo de exposição à transmissão da malária (anos de residência no Amazônia), concentração de hemoglobina e prevalência de anemia. Portadores assintomáticos de *P. vivax*, no entanto, mostraram-se mais jovens e com menos exposição cumulativa à malária do que os outros sujeitos do estudo (Tabela 16). O número de parasitos circulantes foi muito baixo entre indivíduos com infecção assintomática e, nos pacientes sintomáticos, as maiores e menores médias geométricas foram encontradas nos infectados por *P. vivax* apenas e nos co-infectados, respectivamente. A mediana da contagem de plaquetas foi menor, com maior prevalência de plaquetopenia, nas infecções por *P. vivax* sintomática, em comparação com os outros grupos de infecções sintomáticas, como também na infecção assintomática por *P. vivax*.

Tabela 16 - Características demográficas, clínicas e hematológicas dos participantes do estudo.

Característica	Valor por grupo [¥]					Valor de <i>p</i>
	Controles não infectados	Infecção sintomática por <i>P.vivax</i>	Infecção assintomática por <i>P.vivax</i>	Infecção sintomática por <i>P.falciparum</i>	Infecção sintomática por <i>P.vivax</i> e <i>P.falciparum</i>	
Número de indivíduos	20	85	45*	30	12 [§]	
Idade (anos)	32 (28- 42) ^a	30 (21-43) ^a	23 (12-37,5) ^b	34 (26,5-46) ^a	33 (16-43) ^{ab}	0,012
Sexo (% homens)	55,5	62,4	48,9	66,7	54,5	0,538
Anos de exposição à malária	28 (20- 40) ^a	23 (15-35) ^a	14 (6-23) ^b	26 (20-33) ^a	22 (16-33) ^{ab}	<0,0001
Níveis de hemoglobina (g/L)	140 (118-152)	132 (120-143)	126 (116-144)	133 (122-142)	129 (116-139)	0,531
Percentual de anêmicos	20,7	30,6	17,8	26,7	27,3	0,986
Número de plaquetas (10 ⁹ /L)	-	158 (113-201) ^a	204 (166-242) ^a	202 (148-226) ^b	202 (147-266) ^b	0,002
Percentual de plaquetopênicos	-	47,1 ^a	8,9 ^b	23,3 ^c	27,3 ^{ac}	0,006
Parasitemia (parasitos/ μ L)	-	1184 (193-4594) ^a	16 (6-121) ^b	525 (130-4216) ^{ac}	228 (37-477) ^c	<0,0001
Média geométrica parasitemia	-	830,0	22,1	59,5	19,8	
Índice clínico	-	0,9 (-1,5-3,3) ^a	-	0,3 (-1,5-3,0) ^a	-1,26 (-5,8-0,1) ^b	0,029
Duração de sintomas (dias)	-	4 (2-5)	-	5 (3-9)	3 (1-5)	0,068

[¥]Os dados são expressos como mediana (intervalo interquartil), salvo indicação contrária e comparados entre 3 a 5 grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (variáveis contínuas) ou teste χ^2 (proporções). Os valores de *p* para a comparação entre os grupos são apresentados na coluna da direita. Somente quando as comparações entre os grupos apresentaram significância estatística, comparações pareadas foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney (variáveis contínuas) ou teste χ^2 (proporções). Valores com diferentes sobrescritos indicam comparações pareadas com significância estatística ao nível de 5% ao longo da mesma linha da tabela. O mesmo valor pode ter mais de um sobrescrito. Valores com iguais subscritos indicam que não foi encontrada diferença estatística significativa.

* Número de indivíduos = 27 para níveis de hemoglobina e contagem de plaquetas.

§ Número de indivíduos = 11 para níveis de hemoglobina e contagem de plaquetas.

Os sintomas clínicos foram avaliados em 84 indivíduos infectados por *P. vivax*, 27 pacientes infectados por *P. falciparum* e 11 sujeitos portadores de infecções mistas (*P. vivax* e *P. falciparum*). Dor de cabeça (91,8%), febre (82,0%), calafrios (72,1%), sudorese (63,1%), artralgia (61,5%) e mialgia (55,7%) foram os sintomas individuais mais prevalentes, mas os sintomas de paroxismo típico (febre, arrepios e sudorese) coexistiam em apenas 64 indivíduos (50,8%). Diferenças significativas entre as espécies foram encontradas na intensidade de calafrios (maior em *vivax* do que na malária *falciparum* [$p=0,009$] e na malária mista [$p=0,001$]), sudorese (maior em *vivax* do que na malária mista, $p=0,044$) e dispnéia (maior em *falciparum* do que na malária por *P. vivax*, $p=0,005$). As diferenças no índice clínico geral sugerem que as infecções mistas provocam sintomas mais leves, em comparação com as infecções por única espécie (Tabela 16).

4.3.2 Citocinas e os Receptores Solúveis de TNF durante a infecção por *Plasmodium*

As concentrações plasmáticas de IL-4, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-10, sTNFR1 e sTNFR2 foram maiores em um ou mais grupos de pacientes sintomáticos, em comparação com controles não-infectados (Tabela 17). Embora a malária por *P. vivax* tenha sido associada com sintomas relacionados aos paroxismos mais intensos, nenhum desequilíbrio pró-inflamatório foi encontrada nestes pacientes. Na verdade, este grupo apresentou maiores concentrações de IL-10 e de sTNFR2 do que pacientes infectados por *P. falciparum*, e níveis mais elevados de IL-10, IL-12p40, IFN- γ , sTNFR1 e sTNFR2 do que os pacientes infectados com ambas as espécies. A malária *falciparum* foi associada com níveis plasmáticos mais elevados TNF- α do que nas co-infecções.

Os níveis de citocinas ou dos receptores solúveis de TNF foram muitas vezes correlacionados uns com os outros em pacientes com malária *vivax*. Por exemplo, as concentrações de IL-10 foram correlacionadas positivamente com os de IL-12p40 ($r_s=0,452$, $p<0,0001$), IFN- γ ($r_s=0,361$, $p=0,001$), IL-6 ($r_s=0,439$, $p<0,0001$), sTNFR1 ($r_s=0,449$, $p<0,0001$) e sTNFR2 ($r_s=0,395$, $p=0,001$). Níveis de sTNFR1, mas não os de sTNFR2, apresentaram uma correlação negativa com as concentrações de TNF- α

($r_s=-0,267$, $p=0,038$). Os níveis de ambos receptores solúveis de TNF foram correlacionados positivamente com os de IL-6 ($r_s=0,413$ [$p=0,001$] e $r_s=0,416$ [$p<0,0001$] para sTNFRI e sTNFRII, respectivamente). Entre os portadores assintomáticos de *P. vivax*, as concentrações de IL-10 foram correlacionadas positivamente com os de IL-12p40 ($r_s=0,459$, $p=0,002$), IFN- γ ($r_s=0,516$, $p<0,0001$) e sTNFRII ($r_s=0,429$, $p=0,003$).

Visto que IL-10 regula a produção e a função de citocinas inflamatórias (Couper et al., 2008), calculamos as razões de IL-10/TNF- α , IL-10/IFN- γ e IL-10/IL-6 e encontramos uma diferença em relação a citocina reguladora na malária vivax (Tabela 17). Essa característica não pode ser observada entre portadores assintomáticos de *P. vivax*, que normalmente apresentaram baixas concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e regulatórias (Tabela 17).

Tabela 17- Níveis absolutos e relativos de citocinas dos participantes do estudo

Citocina	Valor por grupo [¥]					Valor de <i>p</i>
	Controles não infectados	Infecção sintomática por <i>P.vivax</i>	Infecção assintomática por <i>P.vivax</i>	Infecção sintomática por <i>P.falciparum</i>	Infecção sintomática por <i>P.vivax</i> e <i>P.falciparum</i>	
Número de indivíduos	18	81	45	30	12	
IL-4 (pg/mL)	1,9 (1,7-2,5) ^a	3,9 (2,9-6,0) ^b	4,7 (4,1-5,8) ^c	3,4 (2,7-4,9) ^b	30, (2,4-3,7) ^b	<0,0001
IL-12p40 (pg/mL)	30,8 (28,4-50,7) ^a	63,8 (42,8-94,3) ^b	53,1 (34,1-82,3) ^{bc}	53,2 (36,4-71,8) ^{bc}	39,7 (27,1-63,6) ^c	0,033
IFN- γ (pg/mL)	5,4 (3,1-8,5) ^a	11,9 (5,5-36,8) ^b	4,0 (3,2-7,5) ^a	10,5 (4,4-61,3) ^b	3,8 (3,0-23,3) ^b	<0,0001
IL-6 (pg/mL)	10,3 (9,5-17,9)	13,4 (10,0-22,4)	11,1 (10,4-13,3)	13,2 (9,8-16,6)	10,2 (9,8-11,4)	0,177
TNF- α (pg/mL)	3,8 (3,0-4,3) ^a	6,8 (4,9-9,8) ^{bc}	3,6 (3,1-5,0) ^a	7,8 (6,1-10,8) ^b	4,7 (3,2-9,7) ^{ac}	<0,0001
IL-10 (pg/mL)	6,2 (4,4-9,1) ^a	260,1 (53,5-532,7) ^b	10,1 (8,0-16,8) ^c	47,8 (19,7-298,5) ^d	24,8 (5,5-121,3) ^{cd}	<0,0001
TGF- β (pg/mL)	379 (178-1440) ^{ab}	948 (415-3862) ^c	368 (192-970) ^b	826 (492-1936) ^{ac}	720 (487-3802) ^c	<0,0001
sTNFR1 (pg/mL)	648 (474-1728) ^{ab}	3015 (1487-5622) ^c	1097 (870-1377) ^a	2481 (855-4966) ^c	1127 (641-3385) ^{ac}	<0,0001
sTNFR2 (pg/mL)	3259 (2540-8016) ^a	16060 (10442-32971) ^b	4128 (3030-6704) ^a	10217 (6760-20598) ^c	7659 (4881-20479) ^c	<0,0001
Razão IL-10/TNF- α	1,6 (1,3-1,9) ^a	39,3 (6,5-70,5) ^b	3,0 (2,0-4,3) ^c	6,0 (1,5-33,4) ^c	3,2 (1,7-13,7) ^c	<0,0001
Razão IL-10/IFN- γ	1,4 (1,0-1,7) ^a	14,0 (3,2-39,3) ^b	2,5 (1,7-3,3) ^c	3,6 (1,5-9,7) ^c	3,5 (1,7-7,5) ^c	<0,0001
Razão IL-10/IL-6	0,3 (0,2-0,5) ^a	9,6 (2,2-27,6) ^b	0,8 (0,6-1,5) ^c	3,9 (1,4-18,8) ^b	1,7 (0,5-9,6) ^c	<0,0001
Razão sTNFR1/TNF- α	619 (351-694)	405 (210-882)	281 (195-380)	306 (71,5-675)	188 (151-382)	0,066
Razão sTNFR2/TNF- α	2252 (1112-3639) ^{ab}	2902 (1284-5009) ^a	1004 (596-1766) ^b	1187 (539-2619) ^b	1681 (771-2514) ^{ab}	<0,0001

[¥]Os dados são expressos como mediana (intervalo interquartil) e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os valores de *p* para a comparação entre os grupos são apresentados na coluna da direita. Somente quando as comparações entre os grupos apresentaram significância estatística, comparações pareadas foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney. Valores com diferentes sobrescritos indicam comparações pareadas com significância estatística ao nível de 5% ao longo de uma mesma linha da tabela. O mesmo valor pode ter mais de um sobrescrito. Valores com iguais subscritos indicam que não foi encontrada diferença estatística significativa.

4.3.3 Citocinas e os Receptores Solúveis de TNF em relação aos desfechos clínicos e laboratoriais durante a infecção por *P. vivax*

As relações entre os níveis de citocinas circulantes durante episódios agudos de malária (variáveis independentes) e quatro resultados (variáveis dependentes): níveis de hemoglobina, contagem de plaquetas, parasitemias e intensidade dos sintomas, foram explorados. Entre os 82 pacientes com malária vivax clínica, a idade ($\beta=0,167$, $p=0,005$), sexo ($\beta=0,612$, $p<0,001$) e parasitemia ($\beta=-0,231$, $p=0,009$), mas nenhuma das citocinas ou receptores solúveis de TNF foi identificada como preditor independente de níveis de hemoglobina na malária vivax em modelos lineares múltiplos. O próximo modelo incorporou tanto infecções sintomáticas e assintomáticas por *P. vivax* (dados completos para 109 indivíduos) e produziu resultados bastante semelhantes: idade ($\beta=0,190$, $p=0,017$), sexo ($\beta=0,528$, $p<0,001$) e a parasitemia ($\beta=-0,184$, $p=0,021$) surgiram como os únicos preditores significativos de níveis de hemoglobina.

Em seguida, testamos se as citocinas foram associadas com plaquetopenia, uma complicação comum de infecções por *P. vivax* observadas neste (Tabela 16) e em outros estudos (Lacerda et al., 2011; Rodriguez-Morales et al., 2005). Os níveis das seguintes citocinas foram negativamente correlacionados com a contagem de plaquetas nos modelos de regressão linear parciais com dados das infecções sintomáticas da malária vivax: IL-12p40 ($\beta=-0,274$, $p=0,014$), IFN- γ ($\beta=-0,254$, $p=0,020$), IL-10 ($\beta=-0,310$, $p=0,004$), a razão IL-10/TNF- α ($\beta=-0,321$, $p=0,003$) e sTNFRII ($\beta=-0,241$, $p=0,034$). Os modelos de regressão, incluindo a IL-12p40, IFN- γ , IL-10 ou a razão IL-10/TNF- α e sTNFRII como variáveis independentes, além de idade, sexo, tempo de exposição à malária e parasitemia, revelaram que a parasitemia ($\beta=-0,332$, $p=0,005$) e idade ($\beta=-0,419$, $p=0,001$), mas nenhuma das outras variáveis, foram preditores independentes de contagem de plaquetas na malária vivax. Somente a idade ($\beta=0,235$, $p=0,014$) manteve-se como um preditor independente significativo da contagem de plaquetas em um modelo de regressão linear múltiplo com os dados completos de sujeitos infectados por *P. vivax* ($n = 109$), sintomáticos ou não.

Embora os níveis de diversas citocinas tenham sido proporcionais as parasitemias na malária vivax sintomática, a direção da correlação variou. Por exemplo, IL-4 ($\beta=-0,282$, $p=0,007$) e TGF- β ($\beta=-0,303$, $p=0,004$) foram correlacionados negativamente, enquanto que os níveis de IL-10 ($\beta=0,297$, $p=0,004$) e de sTNFRII ($\beta=0,259$, $p=0,022$) e a razões IL-10/TNF- α ($\beta=0,306$, $p=0,002$), IL-10/IFN- γ ($\beta=0,388$, $p<0,0001$) e sTNFRII/TNF- α ($\beta=0,242$, $p=0,033$) foram positivamente correlacionados com a contagem de parasitos. Os modelos de regressão linear finais, composta de IL-4, TGF- β , IL-10 ou das razões IL-10/TNF- α ou IL-10/IFN- γ e sTNFRII ou a razão sTNFRII/TNF- α como variáveis independentes, além de idade, sexo e tempo de exposição à malária, apontaram para o tempo de exposição à malária ($\beta=-0,330$, $p=0,002$), os níveis de TGF- β ($\beta=-0,323$, $p=0,003$), e a razão IL-10/TNF- α ($\beta=0,332$, $p=0,004$) como principais preditores independentes das parasitemias de *P. vivax*. Portanto, os níveis de citocinas anti-inflamatórias podem estar correlacionados de forma positiva (IL-10) ou negativamente (TGF- β) com a densidade parasitária na malária vivax sintomática. Uma correlação positiva também foi encontrada entre os níveis de sTNFRII e a densidade parasitária na malária vivax ($\beta=0,526$, $p=0,015$). Em seguida, testamos se incorporação de portadores assintomáticos com baixas parasitemias de *P. vivax* renderia resultados semelhantes (dados completos para 127 indivíduos). Descobrimos que as concentrações plasmáticas de sTNFRII ($\beta=0,361$, $p<0,001$) e de IL-10 ($\beta=0,503$, $p<0,001$), ou as razões IL-10/TNF- α ($\beta=0,324$, $p=0,001$) ou IL-10/IFN- γ ($\beta=0,476$, $p<0,001$) foram correlacionadas positivamente com as densidades parasitárias na infecção humana por *P. vivax*, independentemente da presença de sintomas.

Não foram encontradas evidências sugerindo que os pacientes com malária vivax tenderam a relatar sintomas clínicos mais leves por conta dos níveis crescentes de citocinas regulatórias. Ao contrário, as concentrações de IL-10 e a razão IL-10/TNF- α ($\beta=0,270$, $p=0,014$ e $\beta=0,225$, $p=0,046$, respectivamente), além dos níveis de IL-6 ($\beta=0,302$, $p=0,014$) e sTNFRII ($\beta=0,258$, $p=0,035$), foram correlacionados positivamente com o índice clínico nos modelos de regressão linear múltiplos parciais. A intensidade total dos sintomas não se correlacionou com a idade do paciente, o tempo de residência na Amazônia ou com parasitemia. Modelos de

regressão múltipla com IL-10 ou IL-10/TNF- α , IL-6 e sTNFRII não conseguiram detectar qualquer correlação independente entre estas citocinas e o índice clínico geral por causa da co-linearidade clara entre muitas variáveis.

Os níveis de IL-10, IL-6 e sTNFRII ($\beta=0,308$, $p=0,005$, $\beta=0,248$, $p=0,043$ e $\beta=0,273$, $p=0,023$, respectivamente) e a razão IL-10/TNF- α ($\beta=0,225$, $p=0,046$) foram também correlacionados com a intensidade dos sintomas relacionados com os paroxismos em modelos de regressão parciais. Da mesma forma, modelos de regressão linear múltiplos com IL-10 ou a razão IL-10/TNF- α , IL-6 e sTNFRII foram afetados pela co-linearidade entre as variáveis e não detectaram preditores independentes da intensidade dos sintomas relacionados ao paroxismo. Conclui-se que a menor resposta de citocinas inflamatórias na malária vivax não se traduziu em manifestações clínicas mais leves ou paroxismos menos intensos.

4.3.4 Citocinas e os Receptores Solúveis de TNF na malária vivax após o tratamento

Para examinar se os níveis de citocinas e receptores solúveis de TNF permaneceram elevados após a eliminação do parasito pela quimioterapia, amostras de fase aguda e convalescente de pacientes com malária vivax foram comparadas. Os níveis plasmáticos de IL-12p40, IL-6, IFN- γ , IL-10, TGF- β , sTNFRI e sTNFRII mostraram-se diminuídos de forma significativa, enquanto que os da IL-4 e os de TNF- α mantiveram-se estáveis durante a convalescença (Tabela 18), mas foram elevados em comparação com os controles não infectados (Tabela 17). A diminuição de 40 vezes nos níveis de IL-10 nas amostras convalescentes merece destaque.

Tabela 18- Níveis de citocinas em amostras pareadas de fase aguda e convalescente da infecção por *P. vivax*

Variável	Valor ^a		Número de amostras pareadas	Valor de <i>p</i>
	Fase aguda	Fase convalescente		
Níveis de Hemoglobina (g/L)	134 (123-149)	135 (123-142)	39	0,850
Número de plaquetas (10 ⁹ /L)	158 (113-206)	235 (213-302)	39	<0,0001
IL-4 (pg/mL)	4,67 (3,0-6,8)	3,9 (3,8-5,6)	36	0,220
IL-12p40 (pg/mL)	66,5 (49,4-101,7)	39,1 (29,9-55,1)	33	<0,0001
IL-6 (pg/mL)	13,6 (10,2-29,5)	9,6 (9,1-10,8)	39	<0,0001
IFN- γ (pg/mL)	12,5 (5,8-57,5)	7,5 (2,9-12,3)	37	0,011
TNF- α (pg/mL)	7,3 (5,1-10,1)	8,6 (4,0-11,3)	37	0,777
IL-10 (pg/mL)	297,4 (79,9-523,9)	7,2 (4,5-9,7)	37	<0,0001
TGF- β (pg/mL)	712,6 (378-4115)	538 (375-1008)	36	0,011
sTNFRI (pg/mL)	3167 (1821-5798)	610 (542-681)	35	<0,0001
sTNFRII (pg/mL)	15363 (11175-34243)	4269 (2498-5734)	39	<0,0001
Razão IL-10/TNF- α	43,4 (7,4-68,4)	1,0 (0,7-1,5)	37	<0,0001
Razão IL-10/IFN- γ	14,1 (3,6-41,4)	1,9 (0,7-1,9)	37	<0,0001
Razão IL-10/IL-6	11,2 (3,0-28,3)	0,6 (0,4-0,9)	33	<0,0001
Razão sTNFRI/TNF- α	405,3 (206,7-872,2)	116,4 (58,1-172,6)	29	<0,0001
Razão sTNFRII/TNF- α	2930 (1323-4436)	601 (263-1298)	33	<0,0001

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados pelo teste de Wilcoxon.

4.4 Detecção de IL-10 intracelular produzida por subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e por monócitos

O próximo passo consistiu em verificar se subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e monócitos são importantes fontes de IL-10 intracelular. Para análise das subpopulações de linfócitos T CD4⁺, PBMCs de pacientes e controles foram estimuladas com PMA combinado com Ionomicina por cinco horas e estimuladas com LPS por 12 horas. Para análise dos monócitos (CD3-CD8-CD19-CD56-CD14⁺) produtores de IL-10, as PBMCs foram estimuladas com LPS por 12 horas.

Para avaliar a produção de IL-10 por essas populações celulares, nossa análise teve início comparando as amostras não estimuladas de pacientes com as amostras não estimuladas de controles e, em um segundo momento, as amostras estimuladas de pacientes com as amostras estimuladas de controles, para monócitos e para linfócitos nas duas condições de estímulo. Essa decisão foi tomada porque algumas moléculas, como por exemplo CTLA-4, tiveram a sua expressão aumentada após o estímulo com PMA combinado com Ionomicina.

4.4.1 Detecção de IL-10 intracelular em subpopulações de linfócitos T CD4⁺

Ao analisarmos os resultados obtidos das amostras provenientes de pacientes e de controles (teste de Mann-Whitney), observamos que a proporção de células T (todas as subpopulações analisadas, detalhadas a seguir) produtoras de IL-10 é significativamente maior na malária aguda quando as PBMCs são estimuladas com PMA combinado com Ionomicina por 5 horas: CD3⁺ ($p < 0,0001$), CD4⁺ ($p = 0,001$), CD4⁺CD45RO⁺ ($p = 0,001$), CD4⁺CTLA-4⁺ ($p < 0,0001$), CD4⁺CD25^{high} ($p = 0,001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺ ($p < 0,0001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CD45RO⁺ ($p < 0,0001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CTLA-4⁺ ($p < 0,0001$); e também nas amostras não-estimuladas cultivadas por 5 horas: CD3⁺ ($p < 0,0001$), CD4⁺ ($p = 0,001$), CD4⁺CD45RO⁺ ($p < 0,0001$), CD4⁺CTLA-4⁺ ($p = 0,046$), CD4⁺CD25^{high} ($p < 0,0001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺ ($p = 0,009$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CD45RO⁺ ($p = 0,004$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CTLA-4⁺ ($p = 0,006$).

O mesmo é observado quando as PBMCs são estimuladas com LPS por 12 horas: CD3⁺ ($p=0,005$), CD4⁺ ($p=0,001$), CD4⁺CD45RO⁺ ($p=0,003$), CD4⁺CTLA-4⁺ ($p=0,004$), CD4⁺CD25^{high} ($p=0,001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺ ($p<0,0001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CD45RO⁺ ($p=0,001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CTLA-4⁺ ($p=0,003$); e não-estimuladas, cultivadas por 12 horas: CD3⁺ ($p=0,021$), CD4⁺ ($p=0,010$), CD4⁺CD45RO⁺ ($p=0,003$), CD4⁺CTLA-4⁺ ($p=0,004$), CD4⁺CD25^{high} ($p=0,001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺ ($p<0,0001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CD45RO⁺ ($p<0,0001$), CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CTLA-4⁺ ($p<0,0001$).

Quando comparamos amostras de pacientes infectados por *P. vivax* com as de controles (teste de Mann-Whitney), observamos que a proporção de células T (todas as subpopulações analisadas) produtoras de IL-10 é significativamente maior na malária vivax quando as PBMCs são estimuladas com PMA combinado com Ionomicina por 5 horas, quando essas são estimuladas com LPS por 12 horas e também nas amostras não-estimuladas, cultivadas por 5 ou 12 horas (medianas e intervalos interquartis apresentados na Tabela 19).

Quando analisamos amostras de infectados por *P. falciparum* com a de controles (teste de Mann-Whitney), observamos que a proporção de células T (todas as subpopulações analisadas) produtoras de IL-10 é significativamente maior na malária falciparum quando as PBMCs são estimuladas com LPS por 12 horas; o mesmo foi observado ao analisar os cultivos sem estímulos, mantidos por 12 horas. Quando as PBMCs são estimuladas com PMA combinado com Ionomicina por 5 horas, o perfil é bastante semelhante, exceto para as populações CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CD45RO⁺ e CD4⁺CD25^{high}CD127-CD39⁺CTLA-4⁺, nas quais a produção de IL-10 foi semelhante entre infectados por *P. falciparum* e controles. Nas amostras cultivadas por 5 horas sem estímulo, a única população que apresentou uma produção maior nos pacientes com malária falciparum foi a de linfócitos T ($p=0,047$) (medianas e intervalos interquartis apresentados na Tabela 19).

Tabela 19: Proporção de linfócitos que são IL-10⁺ na infecção por *Plasmodium* e controles não-infectados.

Fenótipo (%)	PMA (5 horas)			Controle (5 horas)			LPS (12 horas)			Controle (12 horas)		
	<i>Pv</i> (n=23)	<i>Pf</i> (n=8)	Co (n=12)	<i>Pv</i> (n=23)	<i>Pf</i> (n=8)	Co (n=12)	<i>Pv</i> (n=18)	<i>Pf</i> (n=6)	Co (n=10)	<i>Pv</i> (n=18)	<i>Pf</i> (n=6)	Co (n=10)
CD3 ⁺	0,86 (0,56- 1,21) ^a	0,81 (0,76- 1,55) ^a	0,37 (0,32- 0,47) ^b	0,21 (0,15- 0,30) ^a	0,12 (0,06- 0,20) ^b	0,05 (0,02- 0,08) ^c	0,12 (0,07- 0,21) ^a	0,16 (0,09- 0,28) ^a	0,05 (0,03- 0,08) ^b	0,11 (0,06- 0,20) ^a	0,13 (0,07- 0,18) ^a	0,04 (0,03- 0,09) ^b
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,75 (0,51- 1,19) ^a	0,80 (0,71- 1,16) ^a	0,41 (0,33- 0,50) ^b	0,17 (0,10- 0,28) ^a	0,08 (0,03- 0,13) ^b	0,05 (0,02- 0,10) ^b	0,13 (0,09- 0,26) ^a	0,18 (0,12- 0,24) ^a	0,06 (0,04- 0,08) ^b	0,13 (0,07- 0,30) ^a	0,14 (0,09- 0,15) ^a	0,05 (0,04- 0,09) ^b
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	1,69 (1,17- 2,43) ^a	1,31 (0,97- 1,80) ^a	0,81 (0,57- 1,10) ^b	0,35 (0,23- 0,47) ^a	0,12 (0,08- 0,26) ^b	0,09 (0,04- 0,26) ^b	0,35 (0,17- 0,47) ^a	0,41 (0,23- 0,60) ^a	0,13 (0,10- 0,18) ^b	0,26 (0,18- 0,54) ^a	0,29 (0,18- 0,37) ^a	0,12 (0,08- 0,15) ^b
CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	2,02 (1,41- 3,38) ^a	2,28 (1,53- 3,24) ^a	1,12 (0,90- 1,29) ^b	0,85 (0,64- 1,30) ^a	0,53 (0,33- 1,27) ^{ab}	0,54 (0,19- 0,82) ^b	1,46 (0,91- 2,70) ^a	2,68 (2,26- 3,08) ^a	0,94 (0,77- 1,18) ^b	1,53 (0,96- 2,31) ^a	2,31 (1,46- 2,83) ^a	0,85 (0,76- 1,04) ^b
CD4 ⁺ CD25 ^{high}	7,53 (5,55- 11,3) ^a	5,50 (3,82- 6,51) ^{ab}	4,11 (2,19- 5,41) ^b	3,09 (2,16- 3,85) ^a	1,07 (0,63- 1,20) ^b	0,87 (0,46- 1,74) ^b	4,46 (3,00- 6,67) ^a	7,20 (5,78- 8,15) ^b	2,64 (2,24- 3,52) ^c	4,81 (2,75- 5,44) ^a	6,20 (5,26- 7,00) ^b	2,00 (1,47- 3,05) ^c
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127- CD39 ⁺	7,18 (5,20- 10,20) ^a	6,41 (3,82- 10,04) ^a	2,93 (2,60- 3,86) ^b	2,45 (1,56- 3,48) ^a	1,16 (0,92- 2,52) ^{ab}	0,98 (0,71- 1,33) ^b	3,32 (2,17- 4,33) ^a	5,23 (4,58- 5,40) ^b	1,81 (1,13- 2,46) ^c	3,51 (1,98- 4,19) ^a	4,88 (3,50- 5,77) ^b	1,46 (1,03- 2,42) ^c
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127- CD39 ⁺ CD45RO ⁺	8,29 (5,66- 12,7) ^a	4,85 (3,34- 8,10) ^b	3,93 (3,26- 4,88) ^b	2,95 (1,96- 5,11) ^a	1,06 (0,73- 2,09) ^b	1,28 (1,08- 2,59) ^b	5,90 (4,35- 8,07) ^a	5,72 (4,71- 8,17) ^a	3,47 (2,62- 4,42) ^b	6,17 (4,28- 7,22) ^a	5,50 (4,50- 6,51) ^a	3,15 (2,31- 3,53) ^b
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127- CD39 ⁺ CTLA-4 ⁺	7,45 (5,87- 11,2) ^a	4,17 (3,13- 7,64) ^b	3,68 (3,08- 4,72) ^b	6,63 (4,82- 11,1) ^a	2,86 (1,26- 8,02) ^b	3,41 (1,43- 4,25) ^b	9,33 (6,15- 14,8) ^a	8,40 (4,50- 13,4) ^a	3,70 (1,89- 5,19) ^b	10,86 (5,96- 13,9) ^a	7,83 (6,27- 11,2) ^a	3,17 (1,78- 4,21) ^b

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). Valores com diferentes sobrescritos indicam comparações pareadas com significância estatística ao nível de 5% entre amostras submetidas às mesmas condições de cultivo. *Pv*= infectados por *P.vivax*; *Pf*= infectados por *P.falciparum*; Co= Controles não-infectados.

Várias populações de linfócitos IL-10⁺ diferiram na comparação entre infectados por *P. vivax* e por *P. falciparum*. As proporções de células T produtoras de IL-10 são significativamente maiores na malária vivax quando as PBMCs são estimuladas com PMA combinado com Ionomicina para as subpopulações de CD4⁺CD25^{high}CD127⁻CD39⁺CD45RO⁺ ($p=0,038$) e CD4⁺CD25^{high}CD127⁻CD39⁺CTLA-4⁺ ($p=0,018$); não-estimuladas cultivadas por 5 horas para as subpopulações de CD3⁺ ($p=0,018$), CD4⁺ ($p=0,005$), CD4⁺CD25^{high} ($p=0,002$), CD4⁺CD45RO⁺ ($p=0,003$), CD4⁺CD25^{high}CD127⁻CD39⁺CD45RO⁺ ($p=0,003$) e CD4⁺CD25^{high}CD127⁻CD39⁺CTLA-4⁺ ($p=0,018$); enquanto que as estimuladas com LPS por 12 horas para CD4⁺CD25^{high} ($p=0,027$) e CD4⁺CD25^{high}CD127⁻CD39⁺ ($p=0,003$) e não-estimuladas cultivadas por 12 horas CD4⁺CD25^{high} ($p=0,033$) e CD4⁺CD25^{high}CD127⁻CD39⁺ ($p=0,027$) foram maiores nos infectados por *P. falciparum* (tabela 19).

4.4.2 Detecção de IL-10 intracelular em monócitos CD14⁺

Ao contrário do observado na população de linfócitos T, nossos resultados mostraram uma queda significativa no percentual de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 na fase aguda da malária: os controles apresentaram maiores proporções de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 do que os infectados por *P. vivax* ($p<0,0001$) e por *P. falciparum* ($p=0,001$) nas amostras estimuladas, sem diferença entre os dois grupos de infectados. Nas amostras não-estimuladas, o perfil é exatamente o mesmo, com diferença entre controles e infectados por *P. vivax* ($p<0,0001$) e por *P. falciparum* ($p<0,0001$) (Tabela 20).

Os nossos dados também mostraram que o percentual de monócitos estimulados expressando CCR2 (receptor de CCL2 - quimiocina que medeia a quimiotaxia dos monócitos) é significativamente menor nos infectados por *P. vivax* em comparação com os controles expostos ($p=0,001$) e os infectados por *P. falciparum* ($p=0,034$), quando estes são estimulados por 12 horas com LPS, enquanto que nas amostras não-estimuladas, houve diferença apenas entre infectados por *P. vivax* e controles ($p=0,006$). Não observamos diferença significativa entre pacientes e controles no percentual de monócitos que expressam HLA-DR (Tabela 20).

Tabela 20: Proporção de monócitos na infecção por *Plasmodium* e controles não-infectados.

% de monócitos	LPS (12 horas)			Controle (12 horas)		
	<i>Pv</i> (n=21)	<i>Pf</i> (n=5)	Co (n=11)	<i>Pv</i> (n=21)	<i>Pf</i> (n=5)	Co (n=11)
CD14 ⁺						
CCR2 ⁺	1,57 ^a (1,30-1,93)	1,96 ^b (1,91-2,39)	4,04 ^c (2,96-6,04)	1,45 ^a (1,07-1,81)	1,96 ^{ab} (1,57-2,49)	2,84 ^b (2,23-3,40)
HLA-DR ⁺	94,90 (88,25-96,80)	86,10 (78,35-93,30)	89,80 (82,80-96,20)	92,50 (84,45-95,70)	83,20 (81,45-93,55)	93,70 (91,60-95,90)
IL-10 ⁺	15,50 ^a (10,22-18,95)	13,00 ^a (9,51-16,95)	30,50 ^b (24,20-37,90)	4,67 ^a (1,40-8,20)	1,82 ^a (1,13-5,84)	25,80 ^b (17,30-34,00)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). As comparações entre grupos *Pv*, *Pf* e Co foram realizadas nas amostras submetidas às mesmas condições de cultivo. Somente quando as comparações entre os grupos apresentaram significância estatística, comparações pareadas foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney. Valores com diferentes sobrescritos indicam comparações pareadas com significância estatística ao nível de 5%. O mesmo valor pode ter mais de um sobrescrito. Valores com iguais subscritos indicam que não foi encontrada diferença estatística significativa.

Pv= infectados por *P.vivax*; *Pf*= infectados por *P.falciparum*; Co= Controles não-infectados.

4.4.3 Caracterização de PBMCs produtoras de IL-10

Para caracterização de PBMCs produtoras de IL-10, inicialmente, avaliamos a proporção de PBMCs viáveis que eram IL-10⁺, em todas as condições de cultivo utilizadas. A Figura 17 mostra que as proporções de PBMCs IL-10⁺ diferiram de acordo com o estímulo e o tempo que as amostras foram cultivadas. Em 5 horas de cultivo, sem estímulo, as proporções de PBMCs IL-10⁺ são extremamente baixas, não apresentando diferença significativa entre os grupos (*P. vivax*: 0,26; *P. falciparum*: 0,13 e controles expostos: 0,20; medianas), e aumentam nas amostras estimuladas com PMA combinado com Ionomicina (*P. vivax*: 0,78; *P. falciparum*: 1,02 e controles expostos: 0,46; medianas), chegando a 1% nos infectados por *P. falciparum* (Figura 17, painel A). Quando analisamos os cultivos de 12 horas estimulados ou não com LPS, o perfil (mas não os valores de medianas) é bastante semelhante com os dados obtidos do painel de linfócitos, exceto para os infectados com *P. falciparum* (amostras não estimuladas com LPS- *P. vivax*: 0,61; *P. falciparum*: 0,23 e controles expostos: 2,27; amostras estimuladas com LPS- *P. vivax*: 1,19; *P. falciparum*: 0,34 e controles expostos: 0,84; medianas) (Figura 17, painel B) e do painel de monócitos (amostras não estimuladas com LPS- *P. vivax*: 0,38; *P. falciparum*: 0,20 e controles expostos: 1,28; amostras estimuladas com LPS- *P. vivax*: 0,68; *P. falciparum*: 0,42 e controles expostos: 0,57; medianas) (Figura 17, painel C) para os infectados estimulados ou não; no entanto, curiosamente, os controles não estimulados por 12 horas apresentaram maiores proporções de PBMCs produtoras de IL-10 do que os estimulados e os pacientes infectados, estimulados ou não.

A segunda estratégia de análise consistiu em estimar, entre as PBMCs viáveis produtoras de IL-10, as proporções de cada fenótipo celular (linfócitos T, T CD4⁺, T CD4⁺CD45RO⁺, T CD4⁺CTLA-4⁺ e monócitos CD14⁺). Em outras palavras, nossa idéia era verificar a contribuição relativa de cada fenótipo celular para a produção de IL-10 total detectada a partir das PBMCs viáveis.

Figura 17: Proporção de PBMCs IL10⁺ de acordo com o estímulo e o tempo de cultivo. Em A, as PBMC foram estimuladas ou não com PMA combinado com Ionomicina por 5 horas; em B, os dados foram obtidos do painel de linfócitos e as PBMC foram estimuladas ou não com LPS por 12 horas; em C, os dados foram obtidos do painel de monócitos e as PBMC foram estimuladas ou não com LPS por 12 horas. As barras representam as medianas. Pv= infectados por *P. vivax*; Pf= infectados por *P. falciparum* e Co= controles expostos.

Assim, 44-45% das PBMCs não-estimuladas, cultivadas por 5 horas, de indivíduos infectados e 26% dos controles são linfócitos T ($p=0,001$, comparação entre infectados por *P. vivax*, *P.falciparum* e controles não-infectados, teste de Kruskal-Wallis). Cerca de 30% dessas células de pacientes infectados por *P. vivax* (com menor proporção entre infectados por *P. falciparum* e controles) são linfócitos T CD4⁺ ($p<0,0001$, comparação entre infectados por *P. vivax*, *P.falciparum* e controles não-infectados). Diferenças significantes também foram encontradas para as populações de CD4⁺CD45RO⁺ e CD4⁺CTLA-4⁺ ($p=0,001$ e $p<0,0001$, respectivamente; comparação entre infectados por *P. vivax*, *P.falciparum* e controles não-infectados, teste de Kruskal-Wallis). Nas comparações pareadas, não observamos diferença significativa entre indivíduos infectados por diferentes espécies, mas sim entre eles e os controles (teste de Mann-Whitney).

Em experimentos de cultivo por 5 horas com estímulo combinado de PMA e Ionomicina, observa-se que mais de dois terços das células produtoras de IL-10 são linfócitos T (Tabela 21). Das células produtoras de IL-10 de indivíduos com malária vivax, um terço têm o fenótipo T CD4⁺CD45RO⁺ e um terço têm o fenótipo T CD4⁺CTLA-4⁺, com participação menor (pouco superior a 20%) de células T CD4⁺CTLA-4⁺, entre as células produtoras de IL-10 de indivíduos infectados por *P. falciparum* e controles não-infectados (Tabela 21). No entanto, para essa condição de cultivo, não observamos diferença significativa na comparação entre infectados por *P. vivax*, *P.falciparum* e controles não-infectados.

Quando as PBMCs são cultivadas por 12 horas sem estímulo, observamos que um pequeno percentual de linfócitos são IL-10⁺. Observamos diferença significativa, na comparação entre infectados por *P. vivax*, *P.falciparum* e controles não-infectados, para CD3⁺ ($p=0,001$), CD4⁺ ($p=0,001$), CD4⁺CD45RO⁺ ($p=0,002$), e CD4⁺CTLA-4⁺ ($p<0,0001$). Este mesmo padrão foi observado nas PBMCs estimuladas por 12 horas com LPS (Tabela 21). Um aspecto inesperado observado nos experimentos de cultivo por 12 horas, com ou sem estímulo com LPS, é o padrão associado às infecções com *P. falciparum*, em que há participação proporcionalmente maior de linfócitos na produção de IL-10 (Tabela 21). Essa diferença foi estatisticamente significativa,

quando comparados os indivíduos infectados por *P. falciparum* e *P. vivax*, no experimento com estímulo com LPS ($p=0,003$, teste de Mann-Whitney).

A Tabela 20 mostra que o percentual de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 é menor entre pacientes com malária do que em controles não-infectados. Apesar disso, os monócitos são uma fonte importante de IL-10 na malária vivax (compreendendo 75% das PBMCs IL-10⁺), a julgar pelos experimentos de reestímulo de PBMC com LPS por 12 horas (Tabela 21). Em amostras não-estimuladas, cultivadas por 12 horas, os monócitos são responsáveis por cerca de 83% do total de células IL-10⁺ encontradas nos controle não-infectados, com percentuais menores nos infectados por *P. vivax* e proporções significativamente menores nos infectados por *P. falciparum* (Tabela 21). Esses dados sugerem que outras populações celulares, não caracterizadas neste estudo, possam ser importantes fontes adicionais de IL-10 na malária aguda.

Tabela 21- Proporção de PBMCs produtoras de IL-10 na infecção por *Plasmodium* e controles não-infectados.

Fenótipo (%)	PMA (5 horas)			Controle (5 horas)			LPS (12 horas)			Controle (12 horas)		
	<i>Pv</i> (n=23)	<i>Pf</i> (n=8)	Co (n=12)	<i>Pv</i> (n=23)	<i>Pf</i> (n=8)	Co (n=12)	<i>Pv</i> (n=18)	<i>Pf</i> (n=6)	Co (n=10)	<i>Pv</i> (n=18)	<i>Pf</i> (n=6)	Co (n=10)
CD3 ⁺	71,20 (59,10- 78,40)	72,15 (58,52- 75,57)	64,40 (49,12- 74,50)	43,70 (31,40- 59,60) ^a	45,55 (30,85- 70,05) ^a	26,05 (13,45- 29,9) ^b	4,75 (2,36- 6,85) ^a	18,15 (8,43- 33,52) ^b	2,40 (1,20- 2,40) ^a	7,63 (2,72- 23,42) ^a	31,75 (23,45- 36,35) ^a	0,87 (0,60- 2,56) ^b
CD3 ⁺ CD4 ⁺	50,60 (31,27- 64,36)	40,73 (27,32- 56,90)	33,97 (30,43- 50,82)	30,30 (22,14- 37,99) ^a	21,58 (15,70- 34,63) ^a	11,64 (6,42- 18,10) ^b	3,62 (1,43- 5,15) ^a	10,58 (3,42- 17,00) ^b	1,45 (0,52- 3,87) ^c	5,21 (1,85- 16,53) ^a	13,72 (7,08- 24,25) ^a	0,44 (0,23- 1,77) ^b
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	33,87 (20,57- 53,84)	32,00 (16,97- 37,59)	25,47 (18,07- 36,46)	18,15 (10,66- 21,88) ^a	13,66 (9,53- 26,52) ^a	6,03 (3,17- 10,36) ^b	2,07 (0,76- 3,61) ^a	5,71 (1,09- 9,03) ^a	0,72 (0,28- 1,72) ^b	3,10 (0,92- 7,92) ^a	5,81 (3,21- 11,38) ^a	0,23 (0,11- 0,80) ^b
CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	30,69 (20,10- 44,87)	25,22 (14,73- 40,17)	23,12 (16,04- 37,85)	6,54 (5,22- 8,89) ^a	6,53 (2,65- 14,79) ^a	2,59 (1,27- 3,44) ^b	0,96 (0,54- 1,87) ^a	3,60 (1,14- 5,06) ^b	0,15 (0,07- 0,42) ^c	2,33 (0,30- 3,95) ^a	3,81 (0,86- 8,41) ^a	0,07 (0,05- 0,19) ^b
CD14 ⁺	NA	NA	NA	NA	NA	NA	75,20 (51,80- 80,35) ^a	42,60 (23,95- 53,70) ^b	59,30 (32,70- 75,60) ^{ab}	59,50 (44,25- 77,55) ^a	28,60 (14,68- 32,70) ^b	82,10 (70,00- 88,70) ^c

Os dados são apresentados como mediana (intervalo inter-quartil). As comparações entre grupos *Pv*, *Pf* e Co foram realizadas nas amostras submetidas as mesmas condições de cultivo. Somente quando as comparações entre os grupos apresentaram significância estatística, comparações pareadas foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney. Valores com diferentes sobrescritos indicam comparações pareadas com significância estatística ao nível de 5%. O mesmo valor pode ter mais de um sobrescrito. Valores com iguais subscritos indicam que não foi encontrada diferença estatística significativa.

Pv= infectados por *P.vivax*; *Pf*= infectados por *P.falciparum*; Co= Controles não-infectados.

NA= não analisado.

4.4.4 Detecção de IL-10 intracelular em monócitos e subpopulações de linfócitos T CD4⁺ em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por *P.vivax*

Avaliamos se as proporções de monócitos e de células T produtores de IL-10 diferia após o tratamento anti-malárico comparando amostras pareadas de pacientes de fase aguda com as de fase convalescente.

Como observado na Tabela 22, a proporção de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 aumentou significativamente na convalescença da infecção por *P. vivax* quando estes foram estimulados com LPS ($p=0,025$, teste de Wilcoxon) e cultivados sem estímulo por 12 horas (apesar de não observarmos diferença significativa nessa última condição de cultivo, $p=0,093$, teste de Wilcoxon). Os percentuais de monócitos que expressam CCR2 e HLA-DR não foram alterados na fase convalescente da infecção.

Tabela 22 - Proporção de monócitos em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por *P.vivax*

% de monócitos CD14 ⁺	LPS (12 horas)		Controle (12 horas)	
	Fase aguda	Fase Convalescente	Fase aguda	Fase Convalescente
	(n=8)		(n=8)	
CCR2 ⁺	1,60 (1,06-2,21)	1,35 (0,77-4,03)	1,39 (1,06-2,17)	1,62 (1,15-3,20)
HLA-DR ⁺	96,65 (96,00-98,00)	95,50 (90,20-98,52)	94,75 (92,07-96,42)	94,05 (93,35-96,72)
IL-10 ⁺	16,75 (12,42-20,40)*	24,90 (16,37-31,45)*	3,23 (1,01-6,18)	8,63 (1,29-12,00)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). As comparações entre indivíduos de fase aguda e convalescente foram realizadas nas amostras submetidas as mesmas condições de cultivo. *O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação entre agudos e convalescentes ($p=0,025$)

Ao analisarmos as subpopulações células T produtores de IL-10 em pacientes de fase aguda em comparação com os de fase convalescente (teste de Wilcoxon), observamos que a proporção de células T (todas as subpopulações analisadas, exceto para a população CD4⁺CD25^{high}) produtoras de IL-10 é significativamente maior na malária aguda quando as PBMCs são estimuladas com PMA combinado com Ionomicina por 5 horas (Tabela 23). O mesmo perfil não é observado quando as

PBMCs são cultivadas sem estímulo por 5 horas, com diferença significativa entre agudos e convalescentes somente para as populações de linfócitos T $CD4^+CD45RO^+$ ($p=0,049$) e $CD4^+CD25^{high}CD127-CD39^+$ ($p=0,038$) (Tabela 23). Utilizando LPS como estímulo, nenhuma diferença significativa foi observada, enquanto que nas amostras cultivadas por 12 horas sem estímulo, as proporções de linfócitos T $CD4^+CD45RO^+$ ($p=0,042$) e $CD4^+CD25^{high}$ ($p=0,043$) produtores de IL-10 foram maiores na fase aguda da infecção (Tabela 23). Observe que apesar de não conseguimos detectar diferença significativa entre indivíduos pareados na maioria das comparações, proporções de células T produtoras de IL-10 são maiores na malária aguda. Estes achados devem-se, provavelmente, pelo fato das comparações terem sido realizadas em um número muito pequeno de amostras ($n=5$).

Tabela 23: Proporção de linfócitos produtores de IL-10 em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por *P.vivax*.

Fenótipo (%)	PMA (5 horas)		Controle (5 horas)		LPS (12 horas)		Controle (12 horas)	
	Ag	Cv	Ag	Cv	Ag	Cv	Ag	Cv
	(n=9)		(n=9)		(n=5)		(n=5)	
CD3 ⁺	1,06*	0,64*	0,27	0,11	0,15	0,07	0,13	0,06
	(0,65-1,23)	(0,36-0,77)	(0,13-0,31)	(0,07-0,31)	(0,07-0,19)	(0,07-0,14)	(0,09-0,23)	(0,04-0,13)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,84*	0,42*	0,17	0,07	0,15	0,11	0,13	0,08
	(0,50-1,44)	(0,27-0,63)	(0,08-0,29)	(0,04-0,14)	(0,08-0,22)	(0,08-0,18)	(0,12-0,30)	(0,05-0,15)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	2,37*	1,02*	0,30*	0,20*	0,39	0,24	0,35*	0,14*
	(1,19-2,86)	(0,72-1,38)	(0,23-0,66)	(0,12-0,34)	(0,16-0,45)	(0,14-0,37)	(0,26-0,52)	(0,12-0,26)
CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	2,90*	1,34*	0,67	0,60	1,71	0,95	1,96	0,58
	(1,39-3,93)	(0,95-1,57)	(0,47-1,25)	(0,22-0,85)	(0,65-2,93)	(0,55-1,19)	(0,92-2,46)	(0,50-0,88)
CD4 ⁺ CD25 ^{high}	5,56	3,43	2,96	1,33	3,58	3,30	4,90*	2,49*
	(4,08-7,61)	(2,52-5,00)	(1,46-3,49)	(0,53-2,90)	(2,86-5,94)	(1,56-6,14)	(2,58-6,78)	(1,42-5,06)
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁻ CD39 ⁺	10,20*	3,88*	2,77*	1,42*	3,77	2,55	4,10	1,77
	(4,63-14,05)	(2,65-6,55)	(0,89-4,81)	(0,60-1,95)	(2,26-4,58)	(2,09-3,57)	(2,55-5,03)	(1,66-5,12)
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁻ CD39 ⁺ CD45RO ⁺	12,70*	6,26*	4,44	2,06	5,35	4,31	5,26	4,37
	(6,55-15,60)	(4,98-7,48)	(1,85-7,16)	(1,84-2,22)	(4,51-8,41)	(3,29-5,76)	(3,96-8,88)	(3,48-8,06)
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ⁻ CD39 ⁺ CTLA-4 ⁺	11,20*	4,33*	11,1	2,61	13,50	4,94	12,50	5,97
	(5,65-13,6)	(3,92-6,14)	(2,50-13,9)	(2,06-5,30)	(8,19-21,9)	(3,65-12,0)	(9,46-17,6)	(4,87-10,9)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). *O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação entre agudos e convalescentes.

Ag= Fase aguda da infecção por *P.vivax*; Cv= Fase convalescente da infecção por *P.vivax*

4.4.5 Caracterização de PBMCs produtoras de IL-10 em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por *P.vivax*

A seguir, verificamos se a contribuição relativa de cada fenótipo celular para a produção de IL-10, detectada a partir das PBMCs viáveis na fase aguda da infecção por *P. vivax*, era alterada após a eliminação do parasito. Observamos uma diminuição nas proporções de subpopulações de linfócitos T responsáveis pela produção de IL-10 na convalescença; no entanto, só encontramos diferença estatisticamente significativa para a população de células CD4⁺CTLA-4⁺ ($p=0,011$), quando as amostras foram estimuladas com PMA combinado com Ionomicina: cerca de 40% das PBMCs produtoras de IL-10 de pacientes na fase aguda, mas somente 20% das PBMCs de convalescentes, são células CD4⁺CTLA-4⁺. Diferenças significantes também foram encontradas para as populações de CD4⁺CD45RO⁺ e CD4⁺CTLA-4⁺ ($p=0,043$ e $p=0,043$, respectivamente; comparação entre infectados por *P. vivax* na fase aguda e convalescente, teste de Wilcoxon) produtoras de IL-10, em amostras não-estimuladas, cultivadas por 12 horas. Em contrapartida, há um aumento nas proporções de monócitos CD14⁺ responsáveis pela produção de IL-10 na fase convalescente da infecção, apesar dessa diferença (de cerca de 10%) não ser estatisticamente significativa (Tabela 24).

Tabela 24 - Proporção de PBMCs produtoras de IL-10 em indivíduos de fase aguda e convalescente da infecção por *P.vivax*.

Fenótipo (%)	PMA (5 horas)		Controle (5 horas)		LPS (12 horas)		Controle (12 horas)	
	Ag	Cv	Ag	Cv	Ag	Cv	Ag	Cv
	(n=9)		(n=9)		(n=5)		(n=5)	
CD3 ⁺	69,70 (50,2-76,4)	67,50 (57,5-77,6)	39,40 (30,3-58,5)	35,10 (30,5-53,8)	5,02 (2,2-9,2)	4,87 (2,9-8,3)	19,40 (12,4-31,7)	6,52 (3,0-18,6)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	54,53 (31,4-66,9)	55,82 (30,1-59,0)	31,07 (24,1-55,3)	27,41 (21,4-43,0)	3,97 (1,2-6,3)	2,93 (1,5-5,8)	14,47 (7,0-24,9)	4,46 (2,2-12,1)
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	43,11 (22,9-56,2)	30,72 (17,4-48,7)	19,38 (14,0-36,6)	19,22 (12,7-22,6)	2,76 (0,8-4,4)	1,14 (0,78-3,1)	6,87* (4,4-15,7)	2,36* (1,3-4,0)
CD4 ⁺ CTLA-4 ⁺	39,75 (20,9-48,2)*	22,32 (14,5-34,5)*	6,99 (5,2-11,9)	4,34 (3,0-6,9)	1,38 (0,7-1,6)	0,22 (0,18-0,87)	3,23* (2,4-8,2)	0,91* (0,19-1,8)
CD14 ⁺ §	NA	NA	NA	NA	59,65 (40,1-85,3)	68,10 (51,4-77,0)	48,60 (20,6-67,3)	57,45 (34,0-71,4)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). *O teste de Wilcoxon mostrou diferença significativa para a comparação entre agudos e convalescentes.

Ag= Fase aguda da infecção por *P.vivax*; Cv= Fase convalescente da infecção por *P.vivax*

§ Para células CD14⁺ as comparações foram realizadas em oito pares de amostras

4.5 Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura

Para avaliar a produção de outras citocinas produzidas durante o reestímulo com PMA combinado com Ionomicina ou LPS, amostras de sobrenadantes de cultura foram avaliadas para IL-2, INF- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A, por CBA.

Como podemos observar na Tabela 25, os níveis de várias dessas citocinas diferiram entre pacientes em controles, com concentrações significativamente maiores nos controles expostos. Quando comparamos controles expostos com os infectados por *P. vivax* ou por *P.falciparum*, observamos diferença nas amostras estimuladas com LPS para os níveis de IL-10 (*P. vivax*, $p<0,0001$ e *P.falciparum*, $p=0,004$), IL-6 (*P.falciparum*, $p=0,009$), IL-4 (*P. vivax*, $p=0,009$) e IL-2 (*P.falciparum*, $p=0,009$); nas amostras não estimuladas cultivadas por 5 horas para IFN- γ (*P. vivax*, $p=0,006$ e *P.falciparum*, $p=0,029$), IL-4 (*P. vivax*, $p=0,014$) e IL-6 (*P.falciparum*, $p=0,040$); e, nas amostras não estimuladas cultivadas por 12 horas para IL-10 (*P. vivax*, $p<0,0001$ e *P.falciparum*, $p=0,004$), IL-6 (*P.vivax*, $p=0,017$) e IFN- γ (*P.falciparum*, $p=0,004$), sempre com os controles apresentando concentrações mais elevadas que os pacientes.

Na comparação entre infectados por *P. vivax* e por *P.falciparum*, as PBMCs de pacientes com malária vivax produziram níveis maiores de IL-6 ($p=0,041$), quando foram cultivadas sem estímulo por 5 horas, e de IFN- γ ($p=0,026$) e IL-10 ($p=0,010$), quando cultivadas por 12 horas sem estímulo (Tabela 25).

Tabela 25 - Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com PMA combinado com Ionomicina e LPS.

Citocina (pg/mL)	PMA (5 horas)			Controle (5 horas)			LPS (12 horas)			Controle (12 horas)		
	<i>Pv</i>	<i>Pf</i>	Co	<i>Pv</i>	<i>Pf</i>	Co	<i>Pv</i>	<i>Pf</i>	Co	<i>Pv</i>	<i>Pf</i>	Co
	(n=18)	(n=8)	(n=6)	(n=18)	(n=8)	(n=6)	(n=13)	(n=5)	(n=6)	(n=13)	(n=5)	(n=6)
IL-17A	287,8 (141,2- 388,5)	261,9 (11,14- 545,0)	305,8 (0,00- 361,2)	0,00 (0,00- 0,95)	0,19 (0,00- 0,68)	0,00 (0,00- 104,3)	2,61 (1,49- 164,5)	1,66 (1,13- 316,5)	1,60 (1,32- 1,97)	2,14 (1,39- 81,0)	1,28 (0,55- 2,47)	1,69 (0,00- 3,88)
INF- γ	3754,9 (3334,6- 4260,23)	3666,0 (526,8- 4461,2)	3644,5 (49,0- 3753,7)	1,54 (0,64- 3,34) ^a	0,21 (0,00- 1,83) ^a	40,7 (2,82- 1453,4) ^b	57,81 (9,16- 710,4)	33,0 (6,43- 1487,6)	226,4 (119,0- 519,6)	36,9 (3,80- 176,5) ^a	3,98 (1,07- 4,05) ^b	70,0 (52,5- 799,9) ^a
TNF	12879,1 (9681,0- 15044,3)	13604,0 (5569,5- 17982,9)	18667,1 (3534,4- 19430,3)	138,1 (40,87- 2076,7)	110,4 (41,02- 354,0)	1370,6 (126,0- 5334,4)	1692,2 (630,1- 3958,1)	2728,7 (581,4- 9096,36)	2413,2 (1729,9- 6279,1)	101,0 (27,9- 861,1)	30,1 (9,29- 2509,3)	1001,6 (285,2- 3099,7)
IL-10	601,2 (272,8- 1271,1)	716,2 (158,8- 1528,4)	270,2 (102,6- 1205,3)	16,1 (11,3- 31,21)	9,30 (5,14- 140,7)	69,3 (7,49- 109,5)	1381,5 (472,0- 1704,0) ^a	549,9 (179,1- 758,8) ^a	5299,5 (3659,0- 6297,1) ^b	358,2 (61,6- 1174,4) ^a	29,0 (9,01- 73,4) ^b	3005,5 (2446,9- 4003,2) ^c
IL-6	3266,8 (1905,7- 8855,2)	2335,1 (1243,3- 9340,5)	6815,0 (3556,2- 12526,2)	2336,3 (793,2- 8851,6) ^a	522,3 (294,3- 1871,2) ^b	8128,6 (1824,3- 14676,7) ^a	7276,0 (602,9- 11243,2) ^{ab}	7700,5 (3293,6- 9677,7) ^a	11198,3 (10640,8- 11519,6) ^b	2038,7 (881,7- 10309,9) ^a	1181,0 (142,6- 7591,2) ^{ab}	10983,1 (9978,0- 11577,0) ^b
IL-4	621,5 (255,5- 873,3)	433,8 (44,8- 613,2)	505,1 (0,46- 896,3)	0,12 (0,00- 0,43) ^a	0,96 (0,00- 1,49) ^{ab}	1,27 (0,53- 213,9) ^b	1,18 (0,43- 202,1) ^a	0,00 (0,00- 527,7) ^{ab}	0,00 (0,00- 0,08) ^b	0,57 (0,00- 97,1)	0,00 (0,00- 0,38)	0,41 (0,00- 1,29)
IL-2	12246,7 (11171,2- 13302,3)	11687,9 (1585,1- 14354,5)	12998,3 (1,42- 13377,8)	2,21 (1,05- 4,77)	5,03 (1,91- 9,15)	2,19 (1,42- 5633,0)	12,0 (5,95- 211,6) ^{ab}	19,25 (8,67- 6158,5) ^a	5,58 (2,58- 7,04) ^b	7,64 (4,65- 102,7)	12,6 (3,69- 26,2)	7,10 (5,46- 11,5)

Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil). As comparações entre grupos *Pv*, *Pf* e Co foram realizadas nas amostras submetidas as mesmas condições de cultivo. Somente quando as comparações entre os grupos apresentaram significância estatística, comparações pareadas foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney. Valores com diferentes sobrescritos indicam comparações pareadas com significância estatística ao nível de 5%. O mesmo valor pode ter mais de um sobrescrito. Valores com iguais subscritos indicam que não foi encontrada diferença estatística significativa.

Pv= infectados por *P.vivax*; *Pf*= infectados por *P.falciparum*; Co= Controles não-infectados.

Curiosamente, quando avaliamos os níveis de IL-10 nos sobrenadantes de cultura, em amostras estimuladas com PMA combinado com Ionomicina ou LPS (Figura 18), o perfil é bastante semelhante com os resultados obtidos dos ensaios de detecção de IL-10 intracelular, para as proporções de PBMCs IL10⁺ (compare os resultados da Figura 18 com os da Figura 17): as concentrações de IL-10 nos sobrenadantes de cultura diferem de acordo com o estímulo e o tempo em que as amostras foram cultivadas e as amostras provenientes de controles estimulados ou não por 12 horas apresentaram maiores concentrações de IL-10 do que os pacientes infectados (Tabela 25 e Figura 18).

Figura 18: Concentração de IL-10 (pg/mL) nos sobrenadantes de cultura de acordo com o estímulo e o tempo de cultivo. As PBMCs foram estimuladas ou não com PMA combinado com Ionomicina por 5 horas ou estimuladas ou não com LPS por 12 horas. As barras representam as medianas. Pv= infectados por *P. vivax*; Pf= infectados por *P. falciparum* e Co= controles expostos.

Como os níveis basais de produção de várias citocinas se mostraram elevados nos controles não-infectados, decidimos controlar este possível viés calculando as razões entre as concentrações de citocinas produzidas frente à PMA combinado com Ionomicina ou LPS e os níveis basais; em outras palavras, procuramos estimar quantas vezes a concentração de cada uma das citocinas estudadas foi maior frente ao estímulo em comparação aos níveis produzidos na ausência de estímulo.

Encontramos que, em comparação com controles não-infectados, pacientes com malária vivax apresentaram maiores razões de IL-10 ($p=0,034$; *P. vivax*: 33,5 [14,7-61,7] e controles 11,0 [1,94-20,0]; mediana e intervalo interquartil, respectivamente, teste de Mann-Whitney) e IFN- γ ($p=0,004$; *P. vivax*: 1487,8 [311,2-4475,3] e controles 32,5 [2,46-102,8]; mediana e intervalo interquartil, respectivamente, teste de Mann-Whitney) quando as PBMCs foram estimuladas com PMA combinado com Ionomicina, e de IL-6 ($p=0,017$; *P. vivax*: 1,77 [1,09-3,08] e controles 0,99 [0,95-1,8]; mediana e intervalo interquartil, respectivamente, teste de Mann-Whitney) e IL-2 ($p=0,007$; *P. vivax*: 1,42 [1,05-1,93] e controles: 0,76 [0,32-1,12]; mediana e intervalo interquartil, respectivamente, teste de Mann-Whitney) quando as PBMCs foram estimuladas com LPS.

Infectados por *P.falciparum*, também em comparação com os controles, apresentaram maiores razões de IL-10 ($p=0,004$; *P.falciparum*: 11,6 [9,15-30,9] e controles: 1,45 [0,93-2,41]; mediana e intervalo interquartil, respectivamente, teste de Mann-Whitney) e TNF

($p=0,030$; *P.falciparum*: 34,9 [12,8-279,7] e controles: 4,25 [1,04-11,0]; mediana e intervalo interquartil, respectivamente, teste de Mann-Whitney) quando as PBMCs são estimuladas com LPS e de TNF ($p=0,021$; *P.falciparum*: 39,3 [23,5-428,4] e controles: 13,6 [3,49-21,4]; mediana e intervalo interquartil, respectivamente, teste de Mann-Whitney) frente ao PMA combinado com Ionomicina.

Não observamos diferença significativa quando comparamos pacientes infectados por *P.vivax* e *P.falciparum*.

4.6 Proliferação celular

Para avaliar a capacidade proliferativa de subpopulações de linfócitos na fase aguda da infecção malárica, PBMCs foram marcadas com *Cell Trace*, estimuladas com PHA-P e cultivadas por 72 horas. Após este período, as PBMCs foram fenotipadas, para avaliar a proliferação de linfócitos T (CD3⁺), T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) e T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺). Para calcular o percentual de cada subpopulação de linfócitos em proliferação, subtraímos do valor encontrado nas amostras estimuladas o resultado obtido nas amostras não estimuladas, isto é, o percentual basal de proliferação cada população. A Tabela 26 e a Figura 19 descrevem os resultados de medianas e intervalos interquartis após a subtração do percentual basal de proliferação.

Tabela 26: Proporções de subpopulações de linfócitos em proliferação

Fenótipo	Valor por grupo ^a			Valor de <i>p</i>
	Infectados por <i>P.vivax</i> (n=9)	Infectados por <i>P.falciparum</i> (n=9)	Controles expostos (n=8)	
Linfócitos	33,2 (24,4-41,3)	13,3 (11,8-26,3)	11,2 (5,7-18,0)	0,007 ^b
Linfócitos T	34,4 (25,2-42,1)	14,7 (12,3-28,0)	13,2 (6,1-21,3)	0,012 ^c
Linfócitos T CD4 ⁺	30,1 (25,8-37,4)	12,7 (9,8-26,1)	14,6 (6,5-18,6)	0,009 ^d
Linfócitos T CD8 ⁺	49,9 (30,7-60,9)	23,5 (19,3-39,5)	15,7 (6,2-36,5)	0,012 ^e

^a Os dados são apresentados como mediana (intervalo interquartil) e foram comparados entre os três grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

^b O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por *P.vivax* [Pv] e infectados por *P.falciparum* [Pf] ($p=0,008$) ou Controles [Co] ($p=0,006$).

^c O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por Pv e infectados por Pf ($p=0,008$) ou Co ($p=0,011$).

^d O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por Pv e infectados por Pf ($p=0,011$) ou Co ($p=0,008$).

^e O teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os infectados por Pv e infectados por Pf ($p=0,011$) ou Co ($p=0,011$).

De maneira clara, observamos que os indivíduos infectados por *P.vivax* apresentam maiores proporções de linfócitos em proliferação em comparação com infectados com *P. falciparum* ou com os controles expostos. Como observado na Figura 19, essa característica abrange todas as subpopulações de linfócitos investigadas (Figura 19). Portanto, a infecção por *P.vivax* aparentemente não afeta a

capacidade proliferativa das PBMCs frente a um estímulo mitógeno; pelo contrário, as células de indivíduos com malária vivax parecem apresentar maior responsividade a mitógenos.

Figura 19: Proporção de linfócitos em proliferação após o estímulo com PHA-P. As barras representam as medianas. Pv= infectados por *P. vivax*; Pf= infectados por *P. falciparum* e Co= controles expostos.

5 DISCUSSÃO

O entendimento dos mecanismos que modulam o desenvolvimento de imunidade adaptativa, em indivíduos expostos à malária, ainda hoje constitui um grande desafio, especialmente no que se refere ao desenvolvimento de vacinas. Até então, várias hipóteses foram estudadas com o objetivo de definir condições fundamentais para o estabelecimento de imunidade em diversas regiões endêmicas do mundo. Embora os fatores demográficos, tais como idade, nível de endemicidade local e tempo de exposição à doença, pareçam determinar a rapidez com que a imunidade é adquirida, os fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro, que dirigem a maquinaria imunológica, constituem o ponto fundamental para a determinação de estratégias vacinais. Os obstáculos ao desenvolvimento de imunidade contra a malária podem incluir, entre outros, os mecanismos imunorregulatórios do hospedeiro induzidos pelo parasito. Neste contexto, incluem-se subpopulações de células com função imunorreguladora e citocinas anti-inflamatórias.

Neste estudo, observamos um aumento relativo das populações de células T CD4⁺ circulantes que expressam diversos marcadores fenotípicos de células T_{reg}, especialmente CTLA-4 e OX40, diretamente proporcional à densidade parasitária. Entretanto, somente uma pequena proporção dessas células tinha o fenótipo de T_{reg} clássicas (CD4⁺CD25^{high}CD127⁻FOXP3⁺). Observamos também elevados níveis plasmáticos de IL-10 durante as infecções agudas sintomáticas, especialmente aquelas por *P. vivax*, o que nos levou a caracterizar fenotipicamente as células produtoras dessa citocina em experimentos de reestimulação *ex-vivo* com PMA combinado com Ionomicina e LPS.

5.1 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ que expressam moléculas com potencial efeito imunorregulador, ativador e de memória

Neste estudo, a caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ presentes na circulação periférica durante a malária humana não se limitou a

examinar as células T_{reg} clássicas ($CD4^+CD25^{high}CD127-FOXP3^+$), mas incluiu várias populações celulares que expressam em sua superfície diferentes combinações de possíveis marcadores de atividade moduladora, como FOXP3, OX-40, TNFRII, GITR, CD39 e CTLA-4, de ativação, como HLA-DR e CD69, e memória, como CD45RO e CCR7.

Quando analisamos a expressão destes marcadores pelos linfócitos $CD4^+$ em pacientes e controles, observamos que a malária aguda induz um aumento na expressão de CD69, CTLA-4, GITR, OX40 e TNFRII pelos linfócitos T $CD4^+$ (Tabela 11), que, em geral, é diretamente proporcional à densidade parasitária medida por PCR em tempo real (Figura 15). Somente uma pequena proporção (1-8%) das células T $CD4^+$ que expressam CD69, CTLA-4, GITR, OX40 e TNFRII são caracterizadas fenotipicamente como T_{reg} clássicas $CD4^+CD25^{high}CD127-FOXP3^+$ (Tabela 13), sugerindo que uma ampla gama de subtipos celulares, além de T_{reg} , expressam marcadores cruciais na regulação da resposta imune. Muitos autores têm relatado que a expressão destes marcadores em células T é induzida após sua ativação, mas nos últimos anos vários trabalhos vêm destacando o efeito imunomodulador dessas moléculas. Por exemplo, por muitos anos a expressão de CD69 foi utilizada como um indicador de ativação celular recente, mas novos estudos têm sugerindo que, além disso, o CD69 exerce um complexo papel imunorregulador em seres humanos, controlando respostas imunes e fenômenos inflamatórios (Gonzalez-Amaro et al., 2013). A ligação de GITR e de OX40 aos seus respectivos ligantes fornece sinais co-estimulatórios que aumentam a proliferação das células T e sua função efetora (Nocentini, Riccardi, 2005). Os mecanismos de ação do CTLA-4 têm sido alvo de muito debate, mas tem sido sugerido que essa molécula transmite um sinal inibitório para as células que a expressam (Walker, Sansom, 2011).

Não observamos aumento da proporção de células T $CD4^+CD25^{high}CD127-$ que expressam FOXP3 durante a malária aguda. De fato, nos dados de literatura não há consenso quanto ao efeito da malária humana ou experimental na população de células T_{reg} clássicas circulantes. Na malária humana, há diversos relatos de aumento na proporção de células T_{reg} em indivíduos infectados por *P. falciparum* (Brustoski et al., 2006; Minigo et al., 2009; Walther et al., 2005) e *P. vivax* (Bueno et al., 2010;

Jangpatarapongsa et al., 2008), mas o uso de diferentes marcadores fenotípicos pode limitar a comparabilidade dos resultados envolvendo células T_{reg} . Para nossa surpresa, encontramos menor proporção de células T_{reg} clássicas ($CD4^+CD25^{high}CD127-FOXP3^+$) nos indivíduos infectados, quando comparados aos controles não-infectados, mas duas subpopulações principais de células T_{reg} estão aumentadas na malária aguda: aquelas que expressam CTLA-4 (em infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*) e aquelas que expressam OX-40 (em infecções por *P. vivax*) (Tabela 12). Esse aumento tende a ser diretamente proporcional à densidade parasitária (Figura 16). O aumento da subpopulação de células T_{reg} CTLA-4⁺ na malária humana havia sido caracterizado em nosso estudo anterior, mas a definição fenotípica de T_{reg} havia sido diferente ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$), sem o uso de CD127 em sua tipagem (Gonçalves et al., 2010). Com relação à função da molécula CTLA-4 em células T_{reg} , existem evidências de que essa molécula contribui ativamente para a sua atividade supressora (Blansfield et al., 2005; Maker et al., 2005; Maker et al., 2006; Phan et al., 2003; Read et al., 2000), uma vez que a sua expressão em T_{reg} é necessária para a sua atividade supressora. Entretanto, os dados na literatura são controversos: alguns estudos não conseguiram demonstrar o efeito de CTLA-4 na T_{reg} e outros sugerem que o bloqueio dessa molécula anula a função da T_{reg} (Walker, Sansom, 2011). Pouco se sabe sobre o papel de OX40 na regulação da função de células T_{reg} FOXP3⁺. Existem relatos na literatura sugerindo que OX40 é antagonista da indução de FOXP3⁺ pelas células T CD4 *naïve* e que pode modificar as funções de supressão de T_{reg} (So et al., 2008), ou mesmo anular a atividade supressora dessa população (Takeda et al., 2004; Vu et al., 2007).

Os dados sobre a função de OX40 na malária são escassos. Um único estudo avaliou o papel de OX40 na patogênese da malária cerebral causada por *P. berghei* ANKA. Animais que exibiram sintomas de malária cerebral experimental expressaram altos níveis de OX40 em um subgrupo de células linfóides no cérebro. Em comparação, as secções de tecido de camundongos sem sintomas apresentaram poucas células expressando OX40. Os pesquisadores sugerem que a expressão de OX40 no cérebro durante a infecção por *P. berghei* possa estar relacionada com a progressão da doença (Oakley et al., 2009).

Por outro lado, recentes estudos vêm destacando o papel regulador de CTLA-4, especialmente nos modelos experimentais de malária. Um dos primeiros estudos mostrou que a malária murina (por *P. berghei*) é exacerbada pelo bloqueio de CTLA-4, sugerindo que o desenvolvimento de malária cerebral experimental (ECM) é mediado por falhas na regulação negativa da ativação de células T (Jacobs et al., 2002). Um estudo subsequente também observou que o bloqueio de CTLA-4, como também de PD-1/PD-L1, durante a infecção por *P. berghei* em camundongos BALB/c resistentes a ECM, resulta em níveis mais elevados de ativação das células T, aumento da produção de IFN- γ , da detenção intravascular de eritrócitos parasitados e células T CD8⁺ no cérebro, e consequentemente aumento da incidência de ECM (Hafalla et al., 2012). Abel e colaboradores demonstraram que remoção específica de T_{reg} FOXP3⁺ durante a infecção experimental por *P. yoelii* conduz a um aumento na ativação de células T, acompanhado por uma diminuição significativa da parasitemia; além disso, durante a infecção experimental tanto as T_{reg} FOXP3⁺ quanto as células CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ aumentam a expressão de CTLA-4, granzima B e IL-10 (Abel et al., 2012). Por fim, o aumento de populações de T_{reg} *in vivo* associa-se com a completa proteção contra a doença grave, prevenindo a ECM em camundongos infectados com *P. berghei* ANKA, sendo que a proteção mediada por células FOXP3⁺ foi dependente de CTLA-4 e não de IL-10 (Haque et al., 2010). Como visto, os relatos referem-se principalmente a ECM, sem estudos que avaliem a função/papel de CTLA-4 nos casos de malária humana não-complicada, foco deste estudo.

Uma questão intrigante refere-se à expressão destes marcadores por células T e por células T_{reg}. Por um lado, CTLA-4 é transcricionalmente induzido após ativação da célula T, enquanto as T_{reg} constitutivamente o expressam (Walker, 2013). Da mesma maneira, a expressão de OX40 pode ser induzida em células T ativadas, mas é constitutiva na T_{reg} (Redmond et al., 2012). Resta a questão: a expressão dessas moléculas por diferentes células fazem com que elas exibam ou adquiram as mesmas características moduladoras de que uma célula reguladora? Os raros estudos disponíveis sugerem características funcionais distintas para essas moléculas, de acordo com o subtipo celular que as expressam, apesar de algumas similaridades.

A indução de OX40 na célula T ativada é dependente do TCR, da produção de IL-2 e da expressão de IL-2R. A ligação do OX40 via OX40L aumenta a produção de IL-2 como também da expressão do IL-2R, aumentando a expansão clonal, a diferenciação e sobrevivência da célula T (Redmond et al., 2009). Recentemente, essa molécula tem sido utilizada na modulação de respostas imunes: agentes bloqueantes de OX40 inibem a inflamação indesejável, enquanto que agonistas são utilizados para aumentar as respostas imunes (Weinberg et al., 2011). A co-estimulação mediada por OX40 parece também afetar a geração de células T_{reg} induzidas via secreção de citocinas inflamatórias, como IL-4, IL-6 e IFN- γ . Já na célula T_{reg} , a ligação de OX40 pode anular a capacidade supressora da T_{reg} , o que poderia ser um mecanismo de auto-regulação das funções da T_{reg} (Redmond et al., 2009).

Em contrapartida, o CTLA-4 é um regulador negativo essencial das respostas imunes mediadas pelas células T e interage com os mesmos ligantes do CD28 (CD80 e CD86). Se, por um lado, a ligação de CD28 resulta em co-estimulação das funções da célula T (Keir, Sharpe, 2005), aumento da proliferação, produção de citocinas (Thompson, Allison, 1993) e sobrevivência (Boise et al., 1995), a ligação de CTLA-4 induz sinais inibitórios (Walker, Sansom, 2011). Neste contexto, agonistas de CTLA-4 vem sendo utilizados na atenuação da doença do enxerto-versus-hospedeiro (GVHD), inibindo a via de sinalização CD28/CD80/CD86, enquanto que a utilização de antagonistas, bloqueando CTLA-4, induz ativação de células T em respostas a tumores (Wu et al., 2012). A maior afinidade de CTLA-4 para CD80 e CD86 (Collins et al., 2002), em relação ao CD28, é contrabalanceada pela sua localização intracelular (Linsley et al., 1996), enquanto CD28 é constitutivamente expresso na superfície da célula. A estimulação via TCR promove o transporte do CTLA-4 das vesículas intracelulares para a superfície da célula (Egen, Allison, 2002). Recentemente, uma variedade de mecanismos tem sido propostos para explicar a função inibitória de CTLA-4. Descreve-se que a ligação dessa molécula pode afetar a célula T que a expressa (regulação celular intrínseca), mas pode também afetar outras células (regulação celular extrínseca) (Walker, Sansom, 2011). Tem sido claramente estabelecido que o CTLA-4 pode regular as respostas de células T, quando expresso por essas células (Walker, 2013). Trabalhos recentes mostram que as células T, via

CTLA-4, foram capazes de afetar outras células de maneira extrínseca - essencialmente como as T_{reg} (Corse, Allison, 2012; Wang et al., 2012). No entanto, um estudo sugeriu que as células T CD4⁺ expressando CTLA-4⁺ apresentam capacidade supressora modesta em comparação com as T_{reg} CTLA-4⁺ (Wang et al., 2012).

Os resultados obtidos das fenotipagens celulares revelaram que várias subpopulações de células T expressando moléculas moduladoras e de ativação estiveram aumentadas na malária. A expressão dessas moléculas em células T CD4⁺ após o tratamento da infecção malárica foi reduzida (Tabela 14), reforçando a idéia de que o plasmódio induz vários mecanismos moduladores no hospedeiro. No entanto, quando analisamos as subpopulações de T_{reg} na convalescença da infecção, observamos uma redução no percentual de T_{reg} que expressam OX40, mas não há diferença nas proporções de T_{reg} que expressam CTLA-4 (Tabela 15). Estes resultados sugerem que a regulação mediada pelas T_{reg} expressando CTLA-4, na malária vivax, se mantém mesmo depois que o parasito é eliminado. Neste contexto, sugerimos que a expressão de CTLA-4 na T_{reg} não está relacionada ao estado de ativação dessas células, podendo estar nas células T. Acreditamos que a expressão dessa molécula pela célula T_{reg} esteja associada à regulação da resposta imune durante a infecção malárica e parece ser mantida mesmo depois de 28 dias do início do tratamento da doença.

5.2 Citocinas plasmáticas na malária humana

Ao analisar os resultados obtidos dos perfis de citocinas plasmáticas liberadas durante a infecção por *Plasmodium* observamos padrões de equilíbrio distintos nas infecções sintomáticas por *P. vivax*, *P. falciparum* e nas co-infecções. Contrariando a recente sugestão de que *P. vivax* provoca mais inflamação do que *P. falciparum* (Hemmer et al., 2006; Yeo et al., 2010), encontramos maiores razões de IL-10 /TNF- α , IL-10/IFN- γ e IL-10/IL-6 na malária vivax em comparação com a malária falciparum. A razão IL-10/TNF- α e os níveis de sTNFRII foram correlacionados positivamente com a parasitemia, mas não com a intensidade dos sintomas. Além disso, observamos que a resposta de citocinas predominantemente anti-inflamatória

na malária clínica foi de curta duração, com as concentrações de IL-10 e as razões IL-10/TNF- α , IL-10/IFN- γ e IL-10/IL-6 retornando aos intervalos normais, encontrados em controles não infectados, após o tratamento. Este trabalho e diversos outros (Cox-Singh et al., 2011; Fernandes et al., 2008; Medina et al., 2011) mostram respostas de IL-10 proeminentes na malária sintomática por *P. vivax*, mas suas principais fontes celulares são ainda desconhecidas.

Pacientes assintomáticos com baixas parasitemias de *P. vivax* apresentaram níveis significativamente inferiores de citocinas inflamatórias e reguladoras do que os pacientes com malária clínica, infectados por *P. vivax*. Os assintomáticos tiveram níveis mais elevados de IL-4, IL-10 e IL-12p40 que os controles não infectados. O encontro de níveis relativamente baixos de citocinas na maioria dos portadores assintomáticos com baixas parasitemias sugere que um limiar de densidade parasitária deve ser alcançado antes de se desencadear uma grande liberação de citocinas no sangue periférico.

Nossas medidas de citocinas em um único ponto no tempo são incapazes de fornecer dados sobre a seqüência de eventos, desde a inoculação do parasito até o aparecimento da doença clínica (Walther et al., 2006). A correlação positiva entre os níveis de IL-10 e a densidade de *P. vivax*, bem como a detecção de baixas concentrações plasmáticas de IL-10 em portadores assintomáticos de parasitemias extremamente baixas, permite duas interpretações concorrentes. Níveis elevados de IL-10 podem ser uma consequência da alta densidade de parasitos, se um limiar mínimo de densidade é necessário para desencadear uma produção substancial de IL-10. Alternativamente, o aumento da IL-10 pode favorecer a multiplicação do parasito por inibir mecanismos efetores de eliminação dos parasitos nos seres humanos (Hugosson et al., 2004) e em camundongos (Couper et al., 2008).

Da mesma forma, os resultados de altos níveis de IL-4 nos assintomáticos e a correlação negativa entre níveis de IL-4 e parasitemia poderiam ser interpretados como indicativo de que uma forte resposta de IL-4 ajuda a controlar a parasitemia de *P. vivax* (e, assim, reduzir o risco de doenças relacionadas com a malária) nas fases iniciais da infecção. No entanto, uma única medição de IL-4 durante o curso da infecção, não permite inferir uma relação de causalidade; alternativamente, podemos

simplesmente ter detectado níveis mais elevados de IL-4 em indivíduos que estavam nas fases iniciais da infecção, enquanto as densidades parasitárias ainda são baixas e doença clínica é menos provável de ocorrer.

O aumento acentuado dos níveis de TNF- α anteriores aos paroxismos febris na malária vivax (Karunaweera et al., 2003) pode provocar a liberação dos receptores solúveis de TNF, que por sua vez regulam a atividade do TNF- α . Em baixas concentrações, os receptores solúveis de TNF, que são derivados da clivagem proteolítica do receptor de TNF na superfície celular, estabilizam o TNF- α e prolongam a sua meia-vida (Aderka, 1996). Em altas concentrações, no entanto, eles competem com o TNF- α pela ligação com os receptores celulares (Grell, 1995), assim inibindo a bioatividade do TNF- α (Mohler et al., 1993). Como consequência, os receptores solúveis de TNF podem ser biomarcadores mais confiáveis da inflamação induzida pelo parasito do que o TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias clássicas (Andrade, Barral-Netto, 2011). Uma vez que os nossos pacientes com malária vivax apresentaram maiores concentrações de sTNFRII (que se correlacionam positivamente com parasitemia) e razões sTNFRII/TNF- α do que os pacientes com malária falciparum, eles têm comparativamente menos TNF- α livre disponível para interagir com os receptores de superfície celular.

Respostas de citocinas refletem diferentes estratégias do hospedeiro para controlar a infecção por diferentes espécies de plasmódios (Omer et al., 2003). O controle de estágios sanguíneos de *P. falciparum* pode exigir uma resposta inflamatória potente que pode prevenir infecções fulminantes, mas pode levar a doença grave. Nossa hipótese é que um rígido controle no crescimento dos parasitos não é necessário nos casos de malária por *P. vivax*, uma vez que os parasitos encontram um número limitado de reticulócitos para parasitar no sangue periférico e não há risco de parasitemias esmagadoras. Como consequência, a prevenção de danos aos tecidos relacionados à inflamação, com uma precoce resposta de citocina reguladora, pode ser uma prioridade, embora essa estratégia favoreça a multiplicação do parasito. Os recentes avanços na nossa compreensão da fisiopatologia (Anstey et al., 2007; Anstey et al., 2009; Carvalho et al., 2010) e imunopatologia (Andrade et al., 2010a; Andrade et al., 2010b; Andrade et al., 2010c)

da malária vivax grave fornece novas bases para interpretação das respostas de citocinas e suas conseqüências na infecção humana por essa espécie.

5.3 Fontes celulares de IL-10 na malária humana

Os elevados níveis plasmáticos de IL-10 durante as infecções agudas sintomáticas, especialmente aquelas por *P. vivax*, nos levou a caracterizar fenotipicamente as células produtoras dessa citocina na malária humana. Essa caracterização foi feita em experimentos de reestimulação *ex-vivo* com PMA combinado com Ionomicina e LPS. Essas duas condições experimentais produziram resultados distintos. Em experimentos de cultivo por 5 horas, mais de dois terços das células que produzem IL-10 após estímulo com PMA combinado com Ionomicina eram linfócitos T. Entre um terço e um quarto das células produtoras de IL-10 eram linfócitos CD4⁺ que expressam CTLA-4, indicando uma grande contribuição de células CD4⁺CTLA-4⁺ para a produção de IL-10 nessas condições experimentais. Entre células mantidas em cultivo por 5 horas, mas sem estímulo, uma proporção menor (cerca da metade das células de indivíduos infectados) das células produtoras de IL-10 consistia de linfócitos T, com pequena proporção de células CD4⁺CTLA-4⁺ (Tabela 21).

Os experimentos de cultivo por 12 horas, com ou sem estímulo com LPS, mostram um resultado bem distinto: a participação de linfócitos T, entre as células produtoras de IL-10, é muito pequena, com aumento proporcional da participação de monócitos como fonte dessa citocina (Tabela 21). Os indivíduos infectados com *P. falciparum* representam uma exceção interessante, com maior participação relativa de linfócitos T como produtores de IL-10 com ou sem estímulo com LPS.

As diferenças entre os resultados obtidos em experimentos de 5 horas e 12 horas podem dever-se ao tempo de cultivo, que pode ter afetado o perfil de produção de IL-10. Além disso, o uso de estímulos distintos (PMA combinado com Ionomicina ou LPS) pode induzir diferentes subpopulações celulares a produzirem IL-10.

Apesar disso, observamos que a proporção de células T, em todas as subpopulações analisadas, produtoras de IL-10 é significativamente maior na malária

aguda do que nos controles não infectados quando as PBMC são estimuladas ou não por 5 horas com PMA combinado com Ionomicina e estimuladas ou não por 12 horas com LPS, especialmente nas amostras provenientes de infectados por *P. vivax* (Tabela 19). Na malária, várias evidências sugerem um papel importante para as células T produtoras de IL-10 na regulação da patologia. Foi demonstrado que subpopulações de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 são capazes de suprimir respostas inflamatórias exacerbadas nas infecções por *P. chabaudi* e *P. yoelii* (Chen et al., 2009; Couper et al., 2008; Freitas do Rosário et al., 2012). Células CD4⁺CD45RO⁺FOXP3⁻ são a principal fonte de IL-10, dentre os linfócitos T, em crianças com malária não-complicada, sugerindo o papel crucial dessas células no controle da inflamação (Walther et al., 2009). No elegante estudo de Jagannathan e colaboradores, foi observado que, em crianças com intensa exposição à malária, a maioria das células T específicas (em resposta a eritrócitos infectados) eram células T CD4⁺ co-produtoras de IL-10 e IFN- γ (Jagannathan et al., 2014).

Como o estímulo de PMA combinado com Ionomicina induz a produção de citocinas por células recentemente ativadas, estes dados sugerem que estes mitógenos estimulem a produção de citocinas pelas células T específicas para a malária, isto é, as que foram recentemente expostas aos antígenos de plasmódios. A produção de citocinas por células T induzidas por este estímulo inespecífico vem sendo descrita no contexto da infecção malárica aguda (Walther et al., 2005; Winkler et al., 1998). Jagannathan e colaboradores compararam a estimulação por eritrócitos infectados (iRBC) e PMA combinado com Ionomicina, e encontraram uma forte correlação entre as frequências de células T CD4⁺ co-produtoras de IL-10 e IFN- γ induzidas por esses dois estímulos (Jagannathan et al., 2014).

Um aspecto surpreendente do nosso trabalho foram os dados sobre os monócitos CD14⁺. Ao contrário do observado nas subpopulações de linfócitos T, nossos resultados mostraram uma queda significativa no percentual de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 na fase aguda da malária, em comparação com os controles não-infectados (Tabela 20). As proporções de monócitos CD14⁺ produtores de IL-10 aumentaram na convalescença da infecção, mas sem apresentar diferença significativa (Tabela 24). Estes dados corroboram aqueles obtidos por Leoratti e

colaboradores, com níveis de IL-10 em sobrenadantes de cultivo de monócitos, estimulados por LPS, menores na fase aguda do que na convalescença da infecção por *P. vivax*. Os autores acreditam que, durante a malária aguda, os monócitos se diferenciam em um estágio inflamatório, produzindo altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e baixos níveis de IL-10 (Leoratti et al., 2012). Nos monócitos de pacientes infectados, também encontramos uma diminuição na expressão de CCR2, que é o receptor para CCL2, a quimioquina que medeia a quimiotaxia dos monócitos. Monócitos CD14⁺ expressam CCR2 e migram da circulação para sítios inflamatórios, onde se diferenciam em macrófagos ou DCs (Yona, Jung, 2010). Portanto, a diminuição da expressão de CCR2 nos monócitos de pacientes durante a malária aguda pode afetar o tráfego celular e a resposta imune eficiente durante a infecção.

No entanto, os monócitos permanecem como fontes importantes de IL-10 durante a malária aguda em comparação com os linfócitos T, apesar das menores proporções de monócitos produtores de IL-10 na fase aguda da doença em comparação com os controles infectados. Sugerimos, contudo, que outras populações celulares não avaliadas por este estudo possam contribuir para a produção de IL-10 em seres humanos com malária.

5.4 Níveis de citocinas dos sobrenadantes de cultura de PBMCs reestimuladas com PMA combinado com Ionomicina ou LPS

Quando analisamos os níveis de citocinas produzidas durante o reestímulo com PMA combinado com Ionomicina ou LPS, observamos que as concentrações nos sobrenadantes mostraram-se maiores nas amostras provenientes de controles não-infectados, principalmente quando as PBMCs foram cultivadas por 12 horas com ou sem estímulo de LPS (Tabela 25). Estes resultados nos levaram a acreditar que, ao longo de 12 horas de experimento, as células de pacientes em fase aguda da infecção perdiam a capacidade de responder, mesmo a um estímulo inespecífico. No entanto, nossos resultados dos ensaios de proliferação mostram claramente que, mesmo após 72 horas de cultivo, as PBMCs de indivíduos com malária vivax apresentam grande responsividade a mitógeno (Figura 19). Uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias foi observada nos cultivos com PMA combinado com Ionomicina, sem

diferença significativa na comparação entre infectados e controles, enquanto que níveis de IL-10 mostraram-se maiores com o estímulo de LPS. É intrigante, no entanto, observar que PBMCs de controles não-infectados apresentaram elevadas concentrações de IL-10 e de algumas citocinas pró-inflamatórias em comparação com os infectados. Com relação a IL-10, essa característica já tinha sido observada quando avaliamos as proporções de PBMCs IL-10⁺ (compare a Figura 17 com a Figura 18). Assim, para compreender melhor estes resultados, sugerimos duas possibilidades: (a) algumas populações celulares apresentam uma menor capacidade de produzir citocinas quando são reestimuladas *ex vivo*, como observado para a produção de IL-10 por monócitos CD14⁺, em comparação com indivíduos controles; ou (b) o cultivo de 12 horas e o estímulo com LPS não são totalmente adequados para avaliar a produção dessas citocinas por PBMCs de pacientes com malária. Observe-se que, enquanto o estímulo com PMA combinado com Ionomicina induz uma maior produção de IL-17A, IFN- γ , TNF, IL-4 e IL-2, os níveis dessas citocinas são menores quando as PBMCs são estimuladas com LPS. Somente para IL-10 e IL-6 as concentrações foram maiores frente ao estímulo com LPS, com níveis elevados nos controles não infectados. Os níveis de IL-17A e IL-4 foram extremamente baixos quando as PBMCs foram cultivadas por 5 ou 12 horas e frente ao estímulo com LPS.

Para amenizar estes possíveis vieses, calculamos as razões entre as concentrações de citocinas produzidas durante o reestímulo e os níveis basais de produção. Com essa estratégia, observamos que infectados por *P. vivax* apresentaram maiores razões de IL-10 e IFN- γ , quando reestimulados com PMA combinado com Ionomicina, e de IL-6 e IL-2 com o estímulo de LPS, apesar de os níveis de IL-2 serem relativamente baixos. Por outro lado, pacientes com malária falciparum, apresentaram maiores razões de TNF, independente do tipo de estímulo, e de IL-10 após a reestimulação com LPS.

Apesar das dificuldades em interpretar nossos resultados de produção de citocinas durante a reestimulação *ex vivo*, conclui-se que PMA combinado com Ionomicina, quando comparado com LPS, parece ser o estímulo mais adequado para avaliar a produção de citocinas por PBMCs que foram recentemente expostas aos

antígenos de plasmódios. O estímulo com LPS parece induzir uma produção relativamente pequena de citocinas pró-inflamatórias.

6 CONCLUSÕES

Com base neste estudo pode-se concluir que *P. falciparum* e *P. vivax* parecem estimular diferentes padrões de resposta imune no hospedeiro, mesmo quando a comparação envolve somente indivíduos com malária não-complicada expostos a níveis semelhantes de transmissão de malária.

Como conclusões pontuais têm-se que:

1. Durante a malária humana aguda, independente da espécie do parasito infectante, há um aumento relativo das populações de células T CD4⁺ que expressam CTLA-4, TNFRII, GITR, OX40 e CD69, positivamente correlacionada com parasitemia. Somente uma pequena proporção dessas células apresentou fenótipo de T_{reg} clássicas (CD4⁺CD25^{high}CD127-FOXP3⁺).
2. A malária, independentemente da espécie do parasito infectante, induz aumento na proporção de T_{reg} clássicas que expressam CTLA-4, enquanto que somente os pacientes infectados por *P. vivax* mostraram percentuais mais elevados de T_{reg} OX40⁺. Este aumento é positivamente correlacionado com a densidade parasitária.
3. Pacientes com malária vivax sintomática, em comparação com os infectados por *P. falciparum* ou ambas as espécies, apresentam paroxismos mais intensos, níveis mais elevados de IL-10 e de sTNFRII, correlacionados positivamente com a densidade parasitária, e elevadas razões IL-10/TNF- α , IL-10/IFN- γ , IL-10/IL-6 e sTNFRII/TNF- α .
4. Pacientes assintomáticos com baixa parasitemias de *P. vivax* apresentam níveis significativamente mais baixos de citocinas inflamatórias e reguladoras em comparação com os pacientes com malária clínica devida a outras espécies.
5. A grande maioria das PBMCs de pacientes com malária e de controles saudáveis que produziram IL-10 após 5 horas da estimulação com PMA e Ionomicina consistia de células T, enquanto que os monócitos de pacientes com malária vivax e controles saudáveis, mas não aqueles de pacientes com malária falciparum, foram a principal fonte de IL-10 após a estimulação *ex-vivo* das PBMCs com LPS ao longo de 12 horas.

6. Em comparação com controles não-infectados, pacientes com malária vivax apresentaram maiores razões de IL-10 e IFN- γ quando as PBMCs foram reestimuladas *ex-vivo* com PMA combinado com Ionomicina e de IL-6 e IL-2, quando reestimuladas com LPS. Por outra lado, pacientes infectados por *P. falciparum* apresentaram maiores razões, comparado com controles não-infectados, de TNF (independente de estímulo) e de IL-10 quando as PBMCs foram reestimuladas com LPS.

REFERÊNCIAS*

Abel S, Lückheide N, Westendorf AM, Geffers R, Roers A, Müller W, Sparwasser T, Matuschewski K, Buer J, Hansen W. Strong impact of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and limited effect of T cell-derived IL-10 on pathogen clearance during *Plasmodium yoelii* infection. J Immunol. 2012;188:5467-77.

Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 1996;7:231-40.

Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. Cell Immunol. 2008;251:109-15.

Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, Alecrim Md. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2010;16:1611-4.

Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. Int Immunol. 2007;19:345-54.

Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:641-8.

Amino R, Thiberg S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nat Med. 2006;12:220-4.

Andrade BB, Barral-Netto M. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106: 70-8.

Andrade BB, Araújo-Santos T, Luz NF, Khouri R, Bozza MT, Camargo LM, Barral A, Borges VM, Barral-Netto M. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. J Immunol. 2010a;185:1196-1204.

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. Malar J. 2010b;13:9:13.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Raffaele-Netto I, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of *vivax* malaria severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010c;4:e650.

Anstey NM, Handojo T, Pain MC, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, Maguire GP. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis*. 2007;195:589–96.

Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*. 2009;25:220–7.

Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, Powell MD, Bond VC, Anderson W, Adjei AA, Gyasi RK, Tettey Y, Wiredu EK, Tongren JE, Udhayakumar V, Stiles JK. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J*. 2007;6:147.

Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol*. 2003;133:145–52.

Barat LM. Four malaria success stories: how malaria burden was successfully reduced in Brazil, Eritrea, India, and Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:12–6.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;167:1245–53.

Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4⁽⁺⁾CD25^(+high) regulatory T cell function. *J Immunol*. 2002;169:6210–7.

Beeson JG, Osier FH, Engwerda CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends Parasitol*. 2008;24:578–84.

Blansfield JA, Beck KE, Tran K, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Topalian SL, Haworth LR, Levy C, Rosenberg SA, Sherry RMJ. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 blockage can induce autoimmune hypophysitis in patients with metastatic melanoma and renal cancer. *Immunother*. 2005;28:593–8.

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:253–7.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 1995;3:87–98.

Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110:1225-32.

Braga EM, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU. Low cellular response *in vitro* among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66:299-303.

Brustoski K, Moller U, Kramer M, Hartgers FC, Kremsner PG, Krzych U, Luty AJ. Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4⁺ cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis*. 2006;193:146-54.

Bueno LL, Moraes CG, Araújo FF, Gomes JA, Corrêa-Oliveira R, Soares IS, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM. *Plasmodium vivax*: induction of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One*. 2010;5:e9623.

Butty V, Roy M, Sabeti P, Besse W, Benoist C, Mathis D. Signatures of strong population differentiation shape extended haplotypes across the human CD28, CTLA4, and ICOS costimulatory genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:570-5.

Cambos M, Belanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T. Natural regulatory (CD4⁺)CD25⁺FOXP3⁺) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol*. 2008;38:229-38.

Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, Mamoni R, Leite JA, Rodrigues MM, Soares IS, Oliveira TR, Wunderlich G, Lacerda MV, del Portillo HA, Araújo MO, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Rénia L, Costa FT. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis*. 2010;202:638-47.

Castro MC, Monte-Mór RL, Sawyer DO, Singer BH. Malaria risk on the Amazon frontier. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:2452-7.

Chen G, Liu J, Wang QH, Wu Y, Feng H, Zheng W, Guo SY, Li DM, Wang JC, Cao YM. Effects of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells on early *Plasmodium yoelii* 17XL infection in BALB/c mice. *Parasitology*. 2009;136:1107-20.

Chen X, Baumel M, Mannel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J Immunol*. 2007;179:154-61.

Chen X, Hamano R, Subleski JJ, Hurwitz AA, Howard OM, Oppenheim JJ. Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4+FoxP3- conventional T cells to suppression by CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2010;185:174-82.

Chen X, Oppenheim JJ. TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:119-34.

Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol*. 2011;11:1489-96.

Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OM, Mannel DN, Oppenheim JJ. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol*. 2008;180:6467-71.

Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 2002;17:201-10.

Confalonieri UE, Margonari C, Quintão AF. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop*. 2014;129:33-41.

Corse E, Allison JP. Cutting edge: ctla-4 on effector T cells inhibits in trans. *J Immunol*. 2012;189:1123-7.

Couper KN, Blount DG, de Souza JB, Suffia I, Belkaid Y, Riley EM. Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria infected mice. *J Immunol*. 2007;178:4136-46.

Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, Flavell RA, de Souza JB, Riley EM. IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000004.

Cox-Singh J, Singh B, Daneshvar C, Planche T, Parker-Williams J, Krishna S. Anti-inflammatory cytokines predominate in acute human *Plasmodium knowlesi* infections. *PLoS One*. 2011;6:e20541.

Cozzo C, Larkin J 3rd, Caton AJ. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2003;171:5678-82.

Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol*. 2010;2:57-78.

da Silva-Nunes M, Codeço CT, Malafronte RS, da Silva NS, Juncansen C, Muniz PT, Ferreira MU. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:624-35.

da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, Ferreira MU. Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop.* 2012;121:281-91.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204:1257-65.

Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity.* 2002;16:23-35.

Fernandes AAM, Carvalho LJM, Zanini GM, Ventura AM, Souza JM, Cotias PM, Silva-Filho IL, Daniel-Ribeiro CT. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:650-8.

Ferreira, MU. *Parasitologia contemporânea/* Marcelo Urbano Ferreira. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

Ferreira MU, da Silva-Nunes M. Evidence-based public health and prospects for malaria control in Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4:533-45.

Ferreira MU, Zilversmit M, Wunderlic G. Origins and evolution of antigenic diversity in malaria parasites. *Curr Mol Med.* 2007;7:588-602.

Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, Tubridy N, Mills KH. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009;183:7602-10.

Finney OC, Riley EM, Walther M. Regulatory T cells in malaria - friend or foe? *Trends Immunol.* 2010;31:63-70.

Freitas do Rosario AP, Langhorne J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. *Int J Parasitol.* 2012;42:549-55.

Freitas do Rosário AP, Lamb T, Spence P, Stephens R, Lang A, Roers A, Muller W, O'Garra A, Langhorne J. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *J Immunol.* 2012;188:1178-90.

Fontenot JD, Gavin NA, Rudensky AY. FOXP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330-6.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2005;6:1142-51.

Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cells development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:6659-64.

Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, Müller I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*. 2008;5:e127.

Gigley JP, Bhadra R, Moretto MM, Khan IA. T cell exhaustion in protozoan disease. *Trends Parasitol*. 2012;28:377-84.

Giusti P, Urban BC, Frascaroli G, Albrecht L, Tinti A, Troye-Blomberg M, Varani S. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and beta-hematin induce partial maturation of human dendritic cells and increase their migratory ability in response to lymphoid chemokines. *Infect Immun*. 2011;79:2727-36.

Gonçalves RM, Salmazi KC, Santos BA, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, Silber AM, Kallás EG, Ferreira MU, Scopel KK. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun*. 2010;78:4763-72.

González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med*. 2013;19:625-32.

Goonewardene R, Carter R, Gamage CP, Del Giudice G, Davud PH, Howie S, Mendis KN. Human T cells proliferative responses to *Plasmodium vivax* antigens: evidence of immunosuppression following prolonged exposure to endemic malaria. *Eur J Immunol*. 1990;20:1387-91.

Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2005;204:102-15.

Greenwood BM, Bradley-Moore AM, Palit A, Bryceson ADM. Immunosuppression in children with malaria. *Lancet*. 1972;1:169-72.

Grell M. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm*. 1995;47:8-17.

Griseri T, Asquith M, Thompson C, Powrie F. OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *J Exp Med*. 2010;2:699–709.

Hafalla JC, Claser C, Couper KN, Grau GE, Renia L, de Souza JB, Riley EM. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host resistance to *Plasmodium*-induced acute immune pathology. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002504.

Hahn MB, Gangnon RE, Barcellos C, Asner GP, Patz JA. Influence of deforestation, logging, and fire on malaria in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2014;9:e85725.

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

Haque A, Best SE, Amante FH, Mustafah S, Desbarrieres L, de Labastida F, Sparwasser T, Hill GR, Engwerda CR. CD4⁺ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded *in vivo*. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001221.

Hemmer CJ, Holst FG, Kern P, Chiwakata CB, Dietrich M, Reisinger EC. Stronger host response per parasitized erythrocyte in *Plasmodium vivax* or *ovale* than in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health*. 2006;11:817–23.

Hisaeda H, Tetsutani K, Imai T, Moriya C, Tu L, Hamano S, Duan X, Chou B, Ishida H, Aramaki A, Shen J, Ishii KJ, Coban C, Akira S, Takeda K, Yasutomo K, Torii M, Himeno K. Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J Immunol*. 2008;180:2496–2503.

Hisaeda H, Hamano S, Mitoma-Obata C, Tetsutani K, Imai T, Waldmann H, Himeno K, Yasutomo K. Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced TNFR family-related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection. *Eur J Immunol*. 2005;35:3516–24.

Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med*. 2004;10:29–30.

Ho M, Webster HK. T cells responses in acute *falciparum* malaria. *Immunol Lett*. 1990;25:135–8.

Ho M, Webster HK, Looareesuwan S, Supanaranond W, Philips R, Chanthavanivh P, Warrel DA. Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*. 1986;153:763–71.

Hugosson E, Montgomery SM, Premji Z, Troye-Blomberg M, Björkman A. Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of *Plasmodium falciparum* parasites. *Parasite Immunol.* 2004;26:111-7.

Jacobs T, Graefe SE, Niknafs S, Gaworski I, Fleischer B. Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade. *J Immunol.* 2002;169:2323-9.

Jagannathan P, Eccles-James I, Bowen K, Nankya F, Auma A, Wamala S, Ebusu C, Muhindo MK, Arinaitwe E, Briggs J, Greenhouse B, Tappero JW, Kamya MR, Dorsey G, Feeney ME. IFN γ /IL-10 co-producing cells dominate the CD4 response to malaria in highly exposed children. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1003864.

Jago CB, Yates J, Câmara NO, Lechler RI, Lombardi G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol.* 2004;136:463-71.

Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, Hisaeda H, Troye-Blomberg M, Cui L, Udomsangpetch R. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2008;38:2697-705.

Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Mendis K. Demonstration of anti-disease immunity to *Plasmodium vivax* malaria in Sri Lanka using a quantitative method to assess clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:204-10.

Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 2003;19:188-93.

Keir ME, Sharpe AH. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005;204:128-43.

Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite a new theory of malaria relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79:1-11.

Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med.* 1995;182:459-65.

Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, Kochar A, Khatri MP, Gupta V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:194-8.

Koziak K, Sévigny J, Robson SC, Siegel JB, Kaczmarek E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb Haemost.* 1999;82:1538-44.

Lacal PM, Petrillo MG, Ruffini F, Muzi A, Bianchini R, Ronchetti S, Migliorati G, Riccardi C, Graziani G, Nocentini G. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related ligand triggering upregulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 and promotes leukocyte adhesion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347:164-72.

Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:52-63.

Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol*. 2008;9:725-32.

Leoratti FM, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PA, Gravina HD, Tada MS, Pereira DB, Golenbock DT, Antonelli LR, Gazzinelli RT. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1710.

Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of ctla-4 and focal localisation towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 1996;4:535-43.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203:1701-11.

Long TTA, Nakazawa S, Onizuka S, Huaman MC, Kanbara H. Influence of CD4⁺CD25⁺ T cells on *Plasmodium berghei* NK65 infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol*. 2003;33:175-83.

Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, Kone A, Harley R, Plowe CV, Doumbo OK, Sztein MB. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun*. 2004;72:5630-7.

Maker AV, Attia P, Rosenberg SA. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol*. 2005;175:7746-54.

Maker AV, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Hughes M, Yellin MJ, Haworth LR, Levy C, Allen T, Mavroukakis SA, Attia P, Rosenberg SA. Inpatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. *J Immunother*. 2006;29:455-63.

Marengère LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrücker HW, Feng GS, Mak TW. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science*. 1996;272:1170-3.

Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28:51-60.

Matuschewski K. Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the Anopheles vector. *Cell Microbiol*. 2006;8:1547-56.

McCoy KD, Le Gros G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol*. 1999;77:1-10.

Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, Vallinoto AC, Póvoa MM, Silva JS, Cunha MG. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J*. 2011;10:264.

Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol*. 2011;89:346-51.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415:673-9.

Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, Price RN, Engwerda CR, Anstey NM, Plebanski M. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000402.

Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremmler KE, Fung VP, Madani H, Widmer MB. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol*. 1993;151:1548-61.

Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*. 2001;98:2736-44.

Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, Riccardi C. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;2:6216-21.

Nocentini G, Riccardi C. GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol*. 2005;35:1016-22.

Nocentini G, Ronchetti S, Petrillo MG, Riccardi C. Pharmacological modulation of GITRL/GITR system: therapeutic perspectives. *Br J Pharmacol*. 2012;2:2089-99.

Oakley MS, Majam V, Mahajan B, Gerald N, Anantharaman V, Ward JM, Faucette LJ, McCutchan TF, Zheng H, Terabe M, Berzofsky JA, Aravind L, Kumar S. Pathogenic roles of CD14, galectin-3, and OX40 during experimental cerebral malaria in mice. *PLoS One*. 2009;4:e6793.

Ocaña-Morgner C, Mota MM, Rodriguez A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;197:143-51.

O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*. 2004;10:801-5.

O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest*. 2004;114:1372-8.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.

Omer FM, de Souza JB, Riley EM. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol*. 2003;171:5430-6.

Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, Duray PH, Steinberg SM, Allison JP, Davis TA, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8372-7.

Piconese S, Pittoni P, Burocchi A, Gorzanelli A, Carè A, Tripodo C, Colombo MP. A non-redundant role for OX40 in the competitive fitness of Treg in response to IL-2. *Eur J Immunol*. 2010;2:2902-13.

Plebanski M, Flanagan KL, Lee EA, Reece WH, Hart K, Gelder C, Gillespie G, Pinder M, Hill AV. Interleukin 10-mediated immunosuppression by a variant CD4 T cell epitope of *Plasmodium falciparum*. *Immunity*. 1999;10:651-60.

Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis*. 2009;22:430-5.

Prudencio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature*. 2006;4:849-56.

Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000;192:295-302.

Redmond WL, Ruby CE, Weinberg AD. The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Crit Rev Immunol*. 2009;29:187-201.

Redmond WL, Triplett T, Floyd K, Weinberg AD. Dual anti-OX40/IL-2 therapy augments tumor immunotherapy via IL-2R-mediated regulation of OX40 expression. *PLoS One*. 2012;2:e34467.

Riley EM, Anderson G, Otoo LN, Jepsen S, Greenwood BM. Cellular immune responses to *Plasmodium falciparum* antigens in Gambian children during and after an acute attack of *falciparum* malaria. *Clin Exp Med*. 1988;73:17-22.

Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28:35-49.

Rodríguez-Morales AJ, Sánchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, Franco-Paredes C. Occurrence of thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Infect Dis* 2005;41:130-1.

Ruby CE, Yates MA, Hirschhorn-Cymerman D, Chlebeck P, Wolchok JD, Houghton AN, Offner H, Weinberg AD. Cutting edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J Immunol*. 2009;2:4853-7.

Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:331-44.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:490-500.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133:775-87.

Sattabongkot J, Tsuboi T, Zollner GE, Sirichaisinthop J, Cui L. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? *Trends Parasitol*. 2004;20:192-8.

Schaer DA, Hirschhorn-Cymerman D, Wolchok JD. Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy. *J Immunother cancer*. 2014;2:7.

Schaer DA, Murphy JT, Wolchok JD. Modulation of GITR for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2012;2:217-24.

Schlotmann T, Waase I, Jülch C, Klauenberg U, Müller-Myhsok B, Dietrich M, Fleischer B, Bröker BM. CD4 $\alpha\beta$ lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. *J Infect Dis*. 2000;182:367-70.

Scholzen A, Minigo G, Plebanski M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infections. *Trends Parasitol*. 2010;26:16-25.

Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malar J*. 2004;3:8.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006;203:1693-700.

Shanks GD. Control and elimination of *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2012;80:301-41.

Shevach EM, Dipaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2006;212:60-73.

Simonetta F, Chiali A, Cordier C, Urrutia A, Girault I, Bloquet S, Tanchot C, Bourgeois C. Increased CD127 expression on activated FOXP3⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2010;40:2528-38.

So T, Lee SW, Croft M. Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19:253-62.

Stegg C, Adler G, Sparwasser T, Fleischer B, Jacobs T. Limited role of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the control of experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2009;183:7014-22.

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*. 2006;313:1287-90.

Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, Sugamura K, Ishii N. Distinct roles for the OX40-40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol*. 2004;2:3580-9.

Theander TG, Hviid L, Abu-Zeid YA, Abdulhadi NH, Saeed BO, Jakobsen PH, Reimert CM, Jepsen S, Bayoumi RAL, Jensen JB. Reduced cellular immune reactivity in healthy individuals during the malaria transmission season. *Immunol Lett.* 1990;25:237-42.

Thompson CB, Allison JP. The emerging role of ctla-4 as an immune attenuator. *Immunity.* 1997;7:445-50.

Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med.* 2008;5:e128.

Tran TM, Li S, Doumbo S, Doumtabe D, Huang CY, Dia S, Bathily A, Sangala J, Kone Y, Traore A, Niangaly M, Dara C, Kayentao K, Ongoiba A, Doumbo OK, Traore B, Crompton PD. An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. *Clin Infect Dis.* 2013;57:40-7.

Troye-Blomberg M, Romero P, Patarroyo ME, Bjorkman A, Perlmann P. Regulation of the immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. III. Proliferative response to antigen in vitro and subset composition of T cells from patients with acute infection or from immune donors. *Clin Exp Immunol.* 1984;58:380-7.

Toure-Balde A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun.* 1996;64:744-50.

Valzasina B, Guiducci C, Dislich H, Killeen N, Weinberg AD, Colombo MP. Triggering of OX40 (CD134) on CD4 + CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood.* 2005;2:2845-51.

Vanderberg PJ, Frevert U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immunobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol.* 2004;34:991-6.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:523-32.

Vittor AY, Pan W, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Sánchez-Lozano W, Pinedo VV, Salas-Cobos E, Flores S, Patz JA. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:5-12.

Vigario AM, Gorgette O, Dujardin HC, Cruz T, Cazenave PA, Six A, Bandeira A, Pied S. Regulatory CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells expand during experimental *Plasmodium* infection but do not prevent cerebral malaria. *Int J Parasitol*. 2007;37:963–73.

Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, Killeen N, Ishii N, Li XC. OX40 costimulation turns off Foxp3⁺ Tregs. *Blood*. 2007;110:2501–10.

Walley AJ, Aucan C, Kwiatkowski D, Hill AV. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and susceptibility to clinical malaria in a Gambian case-control study. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:132–8.

Walker LS. Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance. *J Autoimmun*. 2013;45:49–57.

Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:852–63.

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

Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, Andersen RF, Bejon P, Thompson F, Dunachie SJ, Edele F, De Souza JB, Sinden RE, Gilbert SC, Riley EM, Hill AVS. Up-regulation of TGF- β , FOXP3, and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*. 2005;23:287–96.

Walther M, Woodruff J, Edele F, Jeffries D, Tongren JE, King E, Andrews L, Bejon P, Gilbert SC, De Souza JB, Sinden R, Hill AV, Riley EM. Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. *J Immunol*. 2006;177:5736–45.

Wang CJ, Kenefeck R, Wardzinski L, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Qureshi OS, Sansom DM, Walker LS. Cutting edge: cell-extrinsic immune regulation by CTLA-4 expressed on conventional T cells. *J Immunol*. 2012;189:1118–22.

Weinberg AD, Morris NP, Kovacsovics-Bankowski M, Urba WJ, Curti BD. Science gone translational: the OX40 agonist story. *Immunol Rev*. 2011;2:218–31.

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322:271-5.

Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, Kremsner PG. Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. 1998;66:6040-4.

Wipasa J, Xu H, Stowers A, Good MG. Apoptotic deletion of Th cells specific for the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein 1 during malaria infection. *J Immunol*. 2001;167:3903-9.

Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol*. 2002;168:5397-402.

World Health Organization (WHO). World malaria report. 2013. Disponível em: www.who.int/entity/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en. Acesso em: 01 Jun 2014.

Wu YL, Liang J, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. Immunotherapies: the blockade of inhibitory signals. *Int J Biol Sci*. 2012;8:1420-30.

Wu Y, Wang Q-H, Zheng L, Feng H, Liu J, Ma SH, Cao YM. *Plasmodium yoelii*: distinct CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Exp Parasitol*. 2007;115:301-4.

Xu H, Wipasa J, Yan H, Zeng M, Makobongo MO. The mechanisms and significance of deletion of parasite-specific CD4⁺ T cells in malaria infection. *J Exp Med*. 2002;195:881-92.

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity*. 2007;27:145-59.

Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol*. 2011;3:424-30.

Yeo TW, Lampah DA, Tjitra E, Piera K, Gitawati R, Kenangalem E, Price RN, Anstey NM. 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*. 2010;202:109-12.

Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol.* 2010;17:53-9.