RAQUEL MÜLLER GONÇALVES

Análise fenotípica de células T reguladoras e células dendríticas
na infecção humana por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium*
falciparum

Dissertação 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
Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

RAQUEL MÜLLER GONÇALVES

Análise fenotípica de células T reguladoras e células dendríticas
na infecção humana por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium*
falciparum

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Parasitologia

Orientador:
Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Gonçalves, Raquel Müller.

Análise fenotípica de células T reguladoras e células dendríticas na infecção humana por *P. vivax* e *P. falciparum* / Raquel Müller Gonçalves. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Marcelo Urbano Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Resposta imune celular na Malária humana.

Versão do título para o inglês: Phenotypic analysis of regulatory T cells and dendritic cells in human infections with *P. vivax* and *P. falciparum*.

Descritores: 1. Malária 2. Imunologia celular 3. Células dendríticas 4. Infecções por protozoários 5. Células T reguladoras I. Ferreira, Marcelo Urbano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB037/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raquel Müller Gonçalves.

Título da Dissertação: Análise fenotípica de células T reguladoras e células dendríticas na infecção humana por *P. vivax* e *P. falciparum*.

Orientador(a): Marcelo Urbano Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 24 de março de 2008.

PARECER 829/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 82ª reunião realizada em 19.03.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Interação Entre Células T Reguladoras Cd4+Cd25+Foxp3+ E Células Dendríticas Na Regulação Da Resposta Imune Celular Contra Plasmodium Falciparum*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador 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 **24 de março de 2009.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
RAQUEL MULLER GONÇALVES
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Dedico este trabalho aos meus pais, **José Francisco e Elvira**, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo.

À Profa. Dra. **Kézia Scopel**, pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais. Pela saúde, sabedoria e pelo seu amor inigualável!

À minha família: meu pai, **José Francisco**, de quem “herdei” o amor pela ciência e a minha mãe, **Elvira**, pelo seu exemplo como mãe, esposa e mulher; aos meus amados irmãos, **André** e **Daniela**, ao meu sobrinho querido, **Caio** e ao meu cunhado **Luis**... Obrigada pela benção de fazer parte dessa família! Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida! Obrigada por compreenderem minha ausência e pelo apoio na realização dos meus sonhos! Saibam que cada conquista minha é mérito de vocês!

Ao meu namorado, **Vitor**, por tornar os meus dias muito mais felizes! Fostes o melhor presente que Deus me deu durante este ano!!

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. **Marcelo Urbano Ferreira**, por seu exemplo profissional, competência, dedicação, disponibilidade irrestrita e pela oportunidade, tão gratificante, de conhecer a área endêmica de malária.

À Profa. Dra. **Kézia Scopel**... Ah, minha amiga, tantas coisas tenho que agradecer a ti... Tantos momentos compartilhados durante esses dois anos. Obrigada por tudo que me ensinastes, pelo incentivo, pela companhia na bancada, no trabalho de campo... Obrigada por tua disposição em me ajudar, por tua amizade, pela tua exigência... Cada pedacinho deste trabalho divido contigo!! Obrigada pela alegria e pelo orgulho que sinto de termos trabalhado juntas!!

Às colegas de laboratório: **Pamela Sánchez**, sempre tão atenciosa e prestativa; **Michelle Brandi**, pela amizade e apoio; **Melissa Bastos**, por sua dedicação na padronização e execução das quantificações de parasitemias; **Maria José**, por seu suporte em vários momentos durante a execução deste projeto. Meninas, obrigada pelo apoio, ajuda, pela amizade e pelas alegrias divididas.

À Profa. Dra. **Sílvia Boscardin**, presente desde o início do trabalho de bancada. Obrigada por suas sugestões e auxílio em todos os momentos que precisei. Um agradecimento especial aos seus alunos **Ícaro** e **Eline** pelos agradáveis momentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. **Esper Kallás**, por abrir as portas de seu laboratório para a execução das fenotipagens celulares. Em especial, agradeço também a **Karina Carvalho** e **Bianca Natali**, pela ajuda e por dividirem comigo a experiência do trabalho em citometria de fluxo.

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

Aos amigos presentes durante estes dois anos: **Rogério Lauria**, pela presença, por sua alegria e por todos os “cafés” compartilhados; a minha amiga querida e colega desde a graduação, **Raquel Panatieri** e ao seu namorado **Henrique**, pelas conversas sobre Imunologia!

À **Dra. Simone Ladeia-Andrade** e ao **Paulo Rufalco** (Soneca) pelo convívio e ajuda durante o trabalho de campo.

Ao Prof. Dr. **Ariel Silber** por sua disposição na coleta de algumas amostras utilizadas como controles imunes e pelo auxílio durante a padronização do PCR quantitativo. Um agradecimento especial aos **seus alunos** e a **Beth**, pelo excelente convívio na sala de cultura.

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 mestrado.

Ao **XIV Seminário Laveran & Deane** sobre malária, pela oportunidade de apresentação deste trabalho e aos amigos que conheci.

Aos professores **Dra. Sílvia Boscardin**, **Dr. Cláudio Marinho** e **Dr. José Maria Mosig** e pela participação em meu exame de qualificação e pelas suas sugestões.

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

RESUMO

Gonçalves RM. Análise fenotípica de células T reguladoras e células dendríticas na infecção humana por *P. vivax* e *P. falciparum*. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2010.

Neste estudo são comparados os níveis de citocinas plasmáticas circulantes e as populações periféricas de células T_{reg} CD4⁺CD25⁺, com base na expressão de FOXP3 e CTLA-4, e de células dendríticas (DCs) em indivíduos infectados por *P. falciparum*, *P. vivax* ou co-infectados por ambas as espécies e em controles saudáveis, porém expostos à malária, provenientes de uma área de transmissão instável na Amazônia brasileira. Amostras sanguíneas de 76 pacientes infectados e de 18 controles expostos foram coletadas e processadas para a obtenção de células mononucleares. As populações celulares foram avaliadas por citometria de fluxo e os níveis de citocinas circulantes, pela técnica de ELISA de captura. A infecção aguda induziu aumento no percentual de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CTLA-4⁺ ($p=0,0029$; teste de Kruskal-Wallis) e redução no número absoluto de DCs ($p=0,0008$; teste de Kruskal-Wallis); mas esses efeitos ocorreram independente da espécie do parasito infectante. Entre os pacientes com malária *vivax*, 35-40% apresentaram baixa proporção de DCs que expressam a molécula co-estimulatória CD86. A única variável associada à baixa proporção de DCs CD86⁺ foi a proporção de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ que expressam CTLA-4. Em relação aos níveis de citocinas circulantes observou-se aumento nos níveis de IFN- γ na infecção por *P. falciparum* ($p=0,0050$; teste de Kruskal-Wallis). Apesar da concentração de IL-10 estar elevada em todos os indivíduos infectados em relação aos controles expostos ($p<0,0001$; teste de Kruskal-Wallis) esses níveis foram bem mais expressivos em indivíduos com malária *vivax*. *Plasmodium 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.

Palavras- chave: Malaria humana. Células T reguladoras. Células dendríticas.

ABSTRACT

Gonçalves RM. Phenotypic analysis of regulatory T cells and dendritic cells in human infections with *P. vivax* and *P. falciparum*. [Master thesis]. Sao Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. 2010.

This study compares levels of circulating cytokines and peripheral-blood populations of CD4+CD25+ Treg cells, based on the expression of FOXP3 and CTLA-4, and dendritic cells (DCs) in individuals infected with *P. falciparum*, *P. vivax* or co-infected with both species and in healthy controls living in an area of unstable transmission of malaria in the Brazilian Amazon. Blood samples from 76 malaria patients and 18 malaria-exposed but non-infected controls were collected and processed to obtain mononuclear cells. Cell populations were characterized by flow cytometry and levels of circulating cytokines were measured by capture ELISA. Acute infection induced an increase in the proportion of CD4+CD25+FOXP3+CTLA-4+ cells ($p= 0.0029$, Kruskal-Wallis) and a decrease in the absolute number of DCs ($p= 0.0008$, Kruskal-Wallis), being both effects independent of the infecting parasite species. 35-40% of the *P. vivax*-infected subjects (but none in the other groups of subjects) had few circulating DCs expressing the co-stimulatory molecule CD86, a putative marker of DC activation. The only variable associated with a low proportion of CD86+ DCs was the proportion of CD4+CD25+FOXP3+ expressing CTLA-4. Analysis of circulating cytokine levels revealed increased levels of IFN- γ in *P. falciparum* infection ($p= 0.0050$, Kruskal-Wallis); although IL-10 levels were high in all infected individuals, compared with exposed controls ($p<0.0001$, Kruskal-Wallis), the increase was much more pronounced in *vivax* malaria. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* appear to stimulate different patterns of immune response in humans, even when comparisons are limited to individuals with uncomplicated malaria exposed to similar levels of malaria transmission.

Keywords: Human malaria. Regulatory T cells. Dendritic cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Transmissão de malária no mundo.....	21
Figura 2: A área de assentamento agrícola recente, Remansinho, pertencente ao município de Lábrea-AM.....	36
Figura 3: Fragmentos obtidos ao final da PCR visualizados em gel de agarose.....	42
Figura 4: Estratégia de análise utilizada para identificar a população de células T _{reg} em PBMCs proveniente de um paciente controle.....	45
Figura 5: Estratégia de análise utilizada para identificar a população de células T _{reg} de PBMCs de um paciente com infecção aguda pelo <i>P.vivax</i>	46
Figura 6: Estratégia de análise usada para identificar os subtipos de DCs nas PBMCs de um paciente controle.....	47
Figura 7: Estratégia de análise usada para identificar os subtipos de DCs nas PBMCs de um paciente com infecção por <i>P. vivax</i>	48
Figura 8: Número absoluto de linfócitos T (CD3+) por mm ³ , comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	58
Figura 9: Número absoluto de linfócitos T CD4+ por mm ³ , comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	58
Figura 10: Percentual de linfócitos T CD4+CD25+FOXP3+, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	59
Figura 11: Número absoluto de linfócitos T CD4+CD25+FOXP3+, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	60
Figura 12: Percentual de linfócitos T CD4+CD25+FOXP3+CTLA-4+, entre indivíduos infectados e controles expostos.....	61
Figura 13: Número absoluto de linfócitos T CD4+CD25+FOXP3+CTLA-4+, entre indivíduos infectados e controles expostos.....	62
Figura 14: Número absoluto de células dendríticas por mm ³ , comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	63
Figura 15: Número absoluto de células dendríticas mielóides por mm ³ , comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	64

Figura 16: Número absoluto de células dendríticas plasmocitóides por mm ³ , comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	64
Figura 17: Razão da população de células dendríticas mielóides (CD11c+) e células dendríticas plasmocitóide (CD123+), nos indivíduos infectados e controles expostos.....	65
Figura 18: Percentual de células dendríticas mielóides que expressam o CD86, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	67
Figura 19: Percentual de células dendríticas plasmocitóides que expressam o CD86, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos.....	68
Figura 20: Células dendríticas mielóides expressando CD86, em relação ao número de T _{reg} CTLA-4+ dos indivíduos infectados pelo <i>P.vivax</i>	69
Figura 21: Células dendríticas plasmocitóides expressando CD86, em relação ao número de T _{reg} CTLA-4+ dos indivíduos infectados pelo <i>P.vivax</i>	69
Figura 22: Concentração de IFN- γ , em pg/mL, nos indivíduos infectados e controles expostos.....	72
Figura 23: Concentração de TNF- α , em pg/mL, nos indivíduos infectados e controles expostos.....	72
Figura 24: Concentração de IL-10, em pg/mL, nos indivíduos infectados e controles expostos.....	73
Figura 25: Razão de IL-10 e TNF- α , nos indivíduos infectados e controles expostos.....	75
Figura 26: Índice clínico dos indivíduos infectados.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem das T _{reg}	43
Tabela 2- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem das DCs.....	43
Tabela 3- Características gerais e hematológicas dos pacientes e controles.....	54
Tabela 4- Características hematológicas em amostras pareadas da fase aguda de infecção por <i>P. vivax</i> e na convalescença.....	55
Tabela 5- Diagnóstico parasitológico e molecular para <i>Plasmodium</i>	56
Tabela 6- Níveis de citocinas circulantes avaliados em plasma de indivíduos infectados e controles expostos.....	71
Tabela 7- Níveis de citocinas em amostras pareadas da fase aguda de infecção por <i>P. vivax</i> e na convalescença.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

χ^2 – qui- quadrado (teste estatístico)

APC - Aloficocianina

APCs- Células Apresentadoras de Antígenos

B CD1⁺- Linfócito B regulador

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

CD102/ICAM-3 - Cluster de Diferenciação 102 ou Molécula de adesão intercelular 3

CD11a/LFA-1- Cluster de Diferenciação 11a

CD11c - Cluster de Diferenciação 11c

CD123 - Cluster de Diferenciação 123

CD127 - Cluster de Diferenciação 127 (receptor para IL-7)

CD14 - Cluster de Diferenciação 14

CD152 - Cluster de Diferenciação 152

CD16 - Cluster de Diferenciação 16

CD19 - Cluster de Diferenciação 19

CD25 - Cluster de Diferenciação 25 (Cadeia α do receptor de IL-2)

CD29/VLA - Cluster de Diferenciação 29

CD3 - Cluster de Diferenciação 3

CD34 - Cluster de Diferenciação 34

CD39 - Cluster de Diferenciação 39

CD4 - Cluster de Diferenciação 4

CD40 - Cluster de Diferenciação 40

CD4-CD8⁻ - Linfócito T duplo-negativo

CD54/ICAM-1 - Cluster de Diferenciação 54 ou Molécula de adesão intercelular 1

CD56 - Cluster de Diferenciação 56

CD62L- Cluster de Diferenciação 62 Ligante (L-selectina)

CD73- Cluster de Diferenciação 73

CD80 - Cluster de Diferenciação 80

CD80/ B7.1 - Cluster de Diferenciação 80
CD86 - Cluster de Diferenciação 86
CD86/B7.2 - Cluster de Diferenciação 86
CTLA-4 – Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico
DCs - Células dendríticas
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTP- Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA- Ensaio imunoenzimático
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
FOXP3- do inglês *forkhead box P3*
Fsc - Forward Scatter
g – grama (unidade de medida de massa)
g- Unidade de aceleração gravitacional
GITR - Receptor de TNF induzido por glicocorticóide
GM-CSF - Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
GPI - Glicosilfosfatidilinositol
H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico
HCl- Ácido Clorídrico
HIV - Vírus da Imunodeficiência adquirida humana
HLA-DR- Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II
HSV - Vírus do Herpes Simples
IDO - Indolamina-desoxigenase
Ig- Imunoglobulina
IL- Interleucina
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 - Interleucina 10
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-2 - Interleucina 2

IL-3 - Interleucina 3

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

INF- γ - Interferon- gama

IQR - Intervalo interquartil

km - Kilômetros (unidade de medida de distância)

Lin 1 - Coquetel de anticorpos anti- CD3, anti- CD14, anti- CD16, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD56.

LPS - Lipopolissacarídeo

M - molaridade (unidade de medida de concentração que relaciona mol/litro)

mDCs - Células Dendríticas mielóides

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

mL- mililitros (unidade de medida volumétrica)

mm³ - milímetros cúbicos (Unidade de medida volumétrica)

mRNA - Ácido Ribonucleico mensageiro

MS - Ministério da Saúde

N- Normalidade ou concentração normal

NaCl- Cloreto de sódio

NaOH- Hidróxido de Sódio

NK- Célula *Natural Killer*

NK/T- Linfócito T *Natural Killer*

nm- nanômetro (unidade de medida de distância)

nPCR - Reação do tipo aninhado (*nested*)

°C - Graus Celsius (medida de temperatura)

OX40 (CD134)- membro da superfamília dos receptores de TNF

p - p-valor, nível de significância

pb - Pares de bases

PBDCs- Células Dendríticas do Sangue Periférico

PBMCs - Células Mononucleares de Sangue Periférico

PBS- Tampão Salino Fosfatado

PCA- Análise de Componentes Principais

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pDCs - Células Dendríticas plasmocitóides

PE – Ficoeritrina

PECy5 – Ficoeritrina Cy-chrome 5

PECy7 – Ficoeritrina Cy-chrome 7

PerCp – Proteína da Clorofila Peridina

PFA- Paraformaldeído

pg- picogramas (unidade de medida de massa)

PPD - Proteína Purificada Derivada da Tuberculina

RPMI- Meio de cultura celular originalmente desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*

rRNA - Ácido Ribonucleico ribossômico

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

SDS – Sódio dodecil sulfato

SFB - Soro Fetal Bovino

SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia

Ssc - Side Scatter

T CD4⁺- Linfócito T CD4 positivo

T CD4⁺CD25⁺ - Linfócito T CD4 positivo e CD25 positivo

T CD8⁺- Linfócito T CD8 positivo

T CD8⁺CD28 - Linfócito T CD8 positivo CD28 negativo

T CD8⁺Qa1⁺ - Linfócito T CD8 positivo regulador via receptor Qa1⁺

T $\gamma\delta$ – Linfócito T gama-delta

TA - Temperatura Ambiente

TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral beta

Th1- Linfócito T auxiliador (helper) CD4 positivo Th1

Th2- Linfócito T auxiliador (helper) CD4 positivo Th2

TH3- Linfócito T regulador TH3 (Linfócito T auxiliar com função regulatória)

TMB- Tetrametilbenzidina

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- alpha

TR1- Linfócito T regulador TR1

T_{reg} - Linfócito T regulador

WHO- Organização Mundial da Saúde

μL – microlitro (Unidade de medida volumétrica)

μM – micromolar (Unidade de medida de concentração que relaciona mol/litro)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1.1 A malária como problema de Saúde Pública.....	21
1.2 Ciclo de vida dos plasmódios humanos no hospedeiro vertebrado.....	22
1.3 A regulação da resposta imune celular durante a malária.....	23
1.4 Células T reguladoras e seu papel na resposta imune celular.....	25
1.5 Células T reguladoras na malária.....	28
1.6 As células dendríticas.....	30
1.7 As células dendríticas na malária.....	31
1.8 A interação entre células dendríticas e células T reguladoras.....	32
2 OBJETIVOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Área e população de estudo.....	36
3.2 Obtenção de PBMCs.....	38
3.3 Exame de fezes.....	38
3.4 Diagnóstico de infecção por <i>Plasmodium</i>.....	39
3.4.1 Diagnóstico parasitológico.....	39
3.4.2 Diagnóstico molecular.....	39
3.4.2.1 Extração do DNA com Fenol-Clorofórmio.....	40
3.4.2.2 Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	40
3.5 Avaliação fenotípica do perfil populacional das células T reguladoras e de células dendríticas no sangue periférico.....	42
3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	49
3.7 Cálculo do índice clínico.....	50
3.8 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS.....	53
4.1 População do estudo.....	53
4.2 Pesquisa de parasitos intestinais.....	55
4.3 Diagnóstico molecular.....	56
4.4 Avaliação fenotípica da população de células T reguladoras e de células	

dendríticas no sangue periférico.....	57
4.4.1 Avaliação fenotípica da população de células T regulatórias.....	58
4.4.2 Avaliação fenotípica da população de células dendríticas.....	62
4.4.3 Avaliação fenotípica do perfil populacional das mDCs e pDCs ativadas.....	66
4.5 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA).....	70
4.6 Citocinas, plaquetopenia e anemia.....	76
4.7 Citocinas e manifestações clínicas.....	77
5. DISCUSSÃO.....	79
5.1 Determinação da espécie de <i>Plasmodium</i> infectante.....	79
5.2 Malária e parâmetros hematológicos.....	80
5.3 Células T reguladoras durante o episódio agudo de malária.....	82
5.4 Número e estado de ativação de DCs durante o episódio agudo de malária.....	85
5.5 Avaliação das citocinas plasmáticas durante a infecção malárica e a convalescença.....	87
5.6 Citocinas e manifestações clínicas.....	90
6 CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A malária como problema de Saúde Pública

A malária é doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. No homem, ela pode ser causada por quatro espécies do parasito: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do globo, onde se distribui de forma heterogênea, a malária constitui um dos maiores problemas de saúde pública do mundo (WHO, 2005). Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde, são 109 os países endêmicos para malária, sendo que destes, 45 localizam-se no Continente Africano. São mais de três bilhões de pessoas vivendo em regiões de risco e cerca de um milhão de mortes a cada ano, principalmente entre crianças com menos de cinco anos de idade e gestantes (WHO, 2008). Em 2006, estimou-se 247 milhões de casos de malária em todo o mundo, dos quais 91% foram causados por *P. falciparum*. A grande maioria dos casos (86%) ocorreram na Região Africana, seguido pelo Sudeste da Ásia (9%) e nas regiões do Mediterrâneo Oriental (3%) (WHO, 2008) (Figura 1).

Figura 1: Transmissão de malária no mundo. Fonte: WHO, 2008.

Embora a grande maioria das mortes causadas por malária *falciparum* ocorra na África, a doença encontra-se amplamente distribuída na América Latina, Sudeste Asiático e Oceania (Figura 1). Enquanto *P. falciparum* predomina no continente africano, *P. vivax* é a espécie prevalente na Ásia e América Latina (Palmer *et al.*, 1998; Sharma, 1999; San Sebastian *et al.*, 2000). Na América Latina, a Região Amazônica concentra 90% dos casos da doença registrados anualmente. No Brasil, 99% das notificações anuais provêm da Amazônia Legal, que compreende os estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão (MS, 2005). Embora o número de casos tenha diminuído nos últimos anos - de 549.439 casos em 2006 para 303.197 em 2009 (MS, 2010) com 85% deles sendo atribuídos a *P. vivax*- o perfil histórico epidemiológico da doença demonstra que seu controle efetivo requer intervenções focais, mas permanentes.

1.2 Ciclo de vida dos plasmódios humanos no hospedeiro vertebrado

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 (Vanderberg, Frevert, 2004; Amino *et al.*, 2006; Prudêncio *et al.*, 2006). Somente aqueles que penetram nos capilares chegam aos hepatócitos iniciando o ciclo exo-eritrocítico da doença (Vanderberg, Frevert, 2004; Amino *et al.*, 2006). Os parasitos drenados pelos vasos linfáticos são retidos próximo ao linfonodo proximal, onde são fagocitados pelas células dendríticas.

Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se multiplicam por reprodução assexuada (esquizogonia), originando milhares de merozoítos hepáticos (15.000 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*, o mosquito inocula distintas populações de esporozoítos; algumas se desenvolvem rapidamente

enquanto outras ficam em estado de latência no fígado (hipnozoítos) (Krotoski, 1985). Estes hipnozoítos são os responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação. A liberação dos merozoítos hepáticos para a circulação dá-se por meio de estruturas denominadas merossomas (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 sangüíneo 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).

1.3 A regulação da resposta imune celular durante a malária

Estudos realizados no início da década de 1970 demonstraram que células mononucleares periféricas provenientes de crianças africanas com infecção por *P. falciparum* deixavam de proliferar quando expostas *in vitro* a antígenos aos quais haviam sido recentemente expostas (Greenwood *et al.*, 1972). Nas décadas seguintes, demonstrou-se que linfócitos T provenientes de pacientes na fase aguda da infecção apresentavam baixa resposta proliferativa *in vitro* a diversos antígenos parasitários bem definidos, com reversão parcial após o tratamento da doença (Troye-Blomberg *et al.*, 1984; Ho *et al.*, 1986; Riley *et al.*, 1988; Ho, Webster, 1990; Theander *et al.*, 1990). Tais observações não se limitaram a indivíduos infectados, estendendo-se também àqueles sadios, porém continuamente expostos à infecção em diferentes áreas

endêmicas (Greenwood *et al.*, 1972; Goonewardene *et al.*, 1990; Braga *et al.*, 2002). Além disso, as respostas proliferativas diante de antígenos não relacionados aos plasmódios, tais como candidina (Brasseur *et al.*, 1983; Riley *et al.*, 1989) e PPD (proteína purificada derivada da tuberculina) (Ho *et al.*, 1986; Mshana *et al.*, 1993), também mostram-se reduzidas durante a malária aguda, o que demonstra a complexidade dos mecanismos imunossupressores desencadeados durante a infecção.

Entre as hipóteses sugeridas para explicar a supressão da resposta imune contra antígenos dos plasmódios encontram-se: (a) a hiperativação do sistema imune durante a infecção aguda, esgotando a capacidade de células T proliferarem quando expostas a novos estímulos antigênicos *in vitro*, (b) o recrutamento das células efectoras da circulação periférica para os tecidos linfóides (Ho, Webster, 1990) e (c) o elevado polimorfismo antigênico, que levaria as células T ativadas por determinados epítopos variantes a não reconhecerem variantes antigênicas distintas (Hviid, 1995). Mais recentemente, mostrou-se que, em infecções experimentais em roedores, as células T CD4⁺ parasito-específicas sofrem morte celular programada (ou apoptose), sendo o INF- γ a principal citocina envolvida nesse processo; reduzindo-se, assim, a capacidade de controle da infecção em um desafio subsequente (Wipasa *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002). Toure-Balde e colaboradores (1996) demonstraram que as células mononucleares provenientes de pacientes na fase aguda da infecção por *P. falciparum* apresentam elevadas taxas de apoptose *in vitro*, ainda que os mecanismos que controlam esse processo sejam obscuros. Além disso, a infecção com formas sangüíneas do parasito parece comprometer, *in vitro*, a maturação e a função das células dendríticas (DCs) (Urban *et al.* 1999; Ocaña- Morgner *et al.* 2003; Good *et al.*, 2005; Orengo *et al.* 2008). Alguns estudos ainda sugerem que a hemozoína, um pigmento insolúvel derivado da degradação da hemoglobina pelos plasmódios, além de inibir a maturação das DCs, induz a produção de IL-10 que termina por regular a resposta imune celular em modelos experimentais e em humanos (Riley *et al.*, 2006).

Atualmente, sugere-se que as células T reguladoras são capazes de atuar na imunorregulação celular durante a malária, proporcionando a sobrevivência e o desenvolvimento do parasito (Hiseada *et al.* 2004, Walther *et al.*, 2005, Minigo *et al.*,

2009). Embora citocinas como TGF- β e IL-10 pareçam estar envolvidas na função reguladora desses linfócitos (Miyara, Sakaguchi, 2007), os mecanismos envolvidos ainda não são bem compreendidos nas infecções pelos plasmódios.

1.4 Células T reguladoras e seu papel na resposta imune celular

Cada microambiente requer um conjunto específico de elementos que são finamente e constantemente ajustados para manter a homeostase local. Várias populações de células T contribuem para a manutenção deste equilíbrio e estabelecimento do controle da resposta imune. Em particular, as células T reguladoras limitam a amplitude das respostas efectoras, que pode resultar na incapacidade de controlar adequadamente a infecção. Por outro lado, essas células também limitam os danos colaterais causados por uma resposta imune vigorosa contra os patógenos (Belkaid, Tarbell, 2009).

Para exercerem sua função, as células imunorregulatórias apresentam como propriedade básica, a capacidade de produção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β . Atuam em uma complexa rede de mecanismos destinados a assegurar a modulação das respostas imunológicas diante dos diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, tumores, aloantígenos, auto-antígenos e alérgenos. Entre as células T, várias subpopulações apresentam propriedades regulatórias, como as células TR1, produtoras de IL-10, que suprimem algumas respostas de células T *in vivo* (Papiernik *et al.*, 1997; Apostolou *et al.*, 2002), as células TH3, capazes de atuar via produção de TGF- β (Bach, 1995; Pearson, McDevitt, 1999), além dos linfócitos T CD8⁺CD28⁻ (CD8⁺ TR), células NK/T, células T $\gamma\delta$ (Sharif *et al.*, 2002; Hayday, Tigelaar, 2003; Ni Choileain, Redmond, 2006), linfócitos T duplo-negativos (CD4⁻CD8⁻) e linfócitos T CD8⁺Qa1⁺ (Lu *et al.*, 2006). Além das células T, outros subtipos celulares foram descritos com tais propriedades. Entre eles as células B CD1⁺, produtoras de IL-10 (Mizoguchi *et al.*, 2002).

Entre os linfócitos T com função imunorregulatória encontram-se as células T CD4⁺ que co-expressam a cadeia α do receptor de IL-2 (ou CD25) e o fator de transcrição nuclear FOXP3, diretamente responsável pelo seu desenvolvimento e

função (Fontenot *et al.*, 2003). Além desses marcadores, essas células também podem expressar outras moléculas, tais como, CTLA-4 (Antígeno-4 do Linfócito T Citotóxico), GITR (membro da superfamília dos receptores de TNF), CD62L, OX40 (CD134) (Shevach *et al.*, 2006), CD39 e CD73 (Deaglio *et al.*, 2007). Contudo, esses marcadores não são específicos para as células T_{reg}, uma vez que eles também podem ser expressos por outras células T ativadas (Belkaid, Tarbell, 2009).

Com base na sua origem, geração e mecanismo de ação, as células T_{reg} têm sido descritas como células de ocorrência natural e induzidas. Enquanto as primeiras se desenvolvem no timo e regulam células T auto-reativas na periferia, as demais parecem se desenvolver na periferia a partir de células T CD4⁺ convencionais após a exposição desses à citocinas reguladoras (especialmente IL-10 e TGF- β) ou células apresentadoras de antígenos (APCs) (Belkaid, 2007).

Descritas em roedores (Sakaguchi *et al.*, 1995) e humanos (Dieckmann *et al.*, 2001; Taams *et al.*, 2001), as células T_{reg}, que constituem 5-10% dos linfócitos T CD4⁺ periféricos, são consideradas fundamentais para a manutenção da tolerância imunológica, prevenindo a ativação e a proliferação de linfócitos T autoreativos (Shevach *et al.*, 2001; Miyara, Sakaguchi, 2007). Em modelos experimentais, esses linfócitos suprimem a ativação e a proliferação das células T CD4⁺ e CD8⁺, bem como a maturação e funcionamento das DCs (Sakaguchi, 2000; Piccirilo, Shevach, 2001; Thornton, 2005; Tang *et al.*, 2006), possivelmente por meio de contato direto com as células efectoras (Thornton, Shevach, 2000; Shevach, 2001; Park *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Miyara, Sakaguchi, 2007) ou por indução de citocinas imunorreguladoras, tais como IL-2, IL-10 e TGF- β (Read, Powrie, 2001; Powrie *et al.*, 2003; Thornton *et al.*, 2004; Miyara, Sakaguchi, 2007). As células T_{reg} parecem também regular a proliferação de linfócitos B (Lim *et al.*, 2005), via indução de apoptose (Zhao *et al.*, 2006). A indução de atividade supressora das T_{reg} requer estímulo antigênico, mas após a ativação esse efeito deixa de ser antígeno-específico (Thornton, Shevach, 2000).

Inicialmente caracterizadas pela sua capacidade em prevenir ou controlar doenças autoimunes em camundongos (Sakaguchi *et al.*, 1995), as células T_{reg} também mostram-se capazes de influenciar a resposta imune contra agentes infecciosos

(Belkaid *et al.*, 2002; Rouse, Suvas, 2004; Belkaid, 2007) atuando possivelmente sobre a ativação, proliferação e/ou função efetora dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, bem como, sobre células NK, NK/T, linfócitos B e DCs (Von Boehmer, 2005). Em modelo experimental de infecção ocular com o vírus do herpes simples (HSV), as células T_{reg} parecem proteger contra o desenvolvimento de lesões inflamatórias induzidas pelo patógeno (Suvas *et al.*, 2004). A infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni* em camundongos também sugere o papel protetor das células T_{reg}, já que a remoção dessas células parece favorecer a exacerbação da patogenia hepática (Hesse *et al.*, 2004; Mckee, Pearce, 2004; Singh *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2006; Baumgart *et al.*, 2006).

Em outros casos, como em infecções por parasitos do gênero *Leishmania*, a interação entre esse agente e células T_{reg}, mostra-se necessária para a manutenção da imunidade protetora (Belkaid *et al.* 2002; Suvas *et al.*, 2004; Belkaid, 2007; Belkaid, Tarbell, 2009). Da mesma forma, em modelos experimentais de colite, estes linfócitos, controlam eficientemente a função de células T efetoras minimizando os danos colaterais no tecido (Powrie *et al.*, 2003). Os linfócitos T_{reg} também parecem desempenhar um papel no controle de infecções por *Helicobacter pylori* (Lundgren *et al.*, 2003; Raghavan *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2008; Kandulski *et al.*, 2008) e nas hepatites virais crônicas (Cabrera *et al.*, 2004; Bolacchi *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Rushbrook *et al.*, 2007; Stoop *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Por outro lado, mostram-se bem relacionados à susceptibilidade a infecções por *Candida albicans* (Belkaid, Rouse, 2005), *Mycobacterium tuberculosis* (Chen *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008) e ao vírus HIV (Aandahl *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2004; Kinter *et al.*, 2004; Oswald-Richter *et al.*, 2004; Apoil *et al.* 2005; Eggena *et al.*, 2005; Tsunemi *et al.*, 2005; Kinter *et al.*, 2007; Antons *et al.*, 2008).

Recentemente, vários grupos demonstraram que, semelhante ao que se observa com as células T CD4⁺ convencionais, a frequência de células T_{reg} encontram-se diminuídas no sangue periférico de pacientes HIV+ (Joshi *et al.*, 2004; Oswald-Richter *et al.*, 2004; Apoil *et al.* 2005; Eggena *et al.*, 2005; Tsunemi *et al.*, 2005) sugerindo a possibilidade de haver destruição progressiva dessas células pelo vírus HIV. No entanto, pesquisas adicionais demonstraram que a expressão de células T_{reg} mostra-se aumentada nos tecidos linfóides e na mucosa de pacientes infectados pelo HIV e

em macacos infectados pelo SIV (vírus da imunodeficiência símia) o que sugere que a migração das células T_{reg} para os tecidos poderia explicar a diminuição da frequência de células T_{reg} no sangue periférico (Andersson *et al.*, 2005; Kornfeld *et al.*, 2005; Epple *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2006; Boasso *et al.*, 2007). Mas, é evidente que tanto as células mononucleares periféricas (Aandahl *et al.*, 2004; Kinter *et al.*, 2004; 2007; Antons *et al.*, 2008) quanto àquelas oriundas dos gânglios linfáticos de pacientes infectados pelo vírus HIV (Kinter *et al.*, 2007) proliferam eficientemente *in vitro* após a remoção de células T_{reg}. O mesmo resultado é obtido quando linfócitos oriundos dos gânglios linfáticos de macacos *rhesus* infectados com SIV (Hryniewicz *et al.*, 2006; Boasso *et al.*, 2007) são depletados de células T_{reg} e estimulados *in vitro*.

1.5 Células T reguladoras na malária

Os estudos iniciais sobre o papel das T_{reg} na regulação da resposta imune celular na malária se mostraram bastante promissores (Long *et al.*, 2003; Hisaeda *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007). Por exemplo, na malária experimental de roedores, animais depletados de células T CD4⁺CD25⁺ e desafiados com *P. berghei* (cepa NK65) apresentam significativo retardo nos picos de parasitemia quando comparados aos animais controles (Long *et al.*, 2003). Na infecção com uma cepa letal de *P. yoelii*, Hisaeda e colaboradores (2004) demonstraram que os esplenócitos provenientes de animais depletados de células T CD4⁺CD25⁺ proliferam mais eficientemente *in vitro* quando comparados àqueles oriundos de animais controles. Além disso, a depleção *in vivo* de células CD25⁺ permite maior taxa de sobrevivência dos animais desafiados subsequente (Hisaeda *et al.*, 2004). Wu e colaboradores (2007) compararam a proporção de T_{reg} em roedores susceptíveis e resistentes à infecção por *P. yoelii*, demonstrando que animais susceptíveis apresentaram aumento da população dessas células após o desafio, quando comparado aos animais resistentes. Além disso, o estudo aponta IL-10 como o principal fator ativador dos mecanismos supressores pelas T_{regs} nos animais susceptíveis (Wu *et al.*, 2007).

Em humanos, ainda há poucos estudos que avaliam a relação entre células T_{reg} e imunidade antimalárica. Contudo, semelhante ao que tem sido observado em

modelos experimentais que utilizam cepas de parasitos que infectam roedores (Hisaeda *et al.*, 2005; Couper *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Vigarito *et al.*, 2007; Cambos *et al.*, 2008; Couper *et al.*, 2008; Hisaeda *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009), tem sido observado um significativo aumento na proporção de células T_{reg} em indivíduos infectados por *P. falciparum* (Walther *et al.*, 2005; Brustoski *et al.*, 2006; Minigo *et al.*, 2009) ou *P. vivax* (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008). Os Fulani, um grupo étnico em Burkina Faso, com baixa suscetibilidade a malária clínica por *P. falciparum*, registrou um déficit de células T_{reg} funcionais com diminuição dos níveis de FOXP3, CTLA-4, TGF- β e receptor de TGF- β , em comparação com as tribos suscetíveis, Mossi e Dogon (Torcia *et al.*, 2008). A expansão de células T_{reg} durante a infecção malárica humana e experimental parece estar associado diretamente com a carga parasitária. Em adultos e em crianças infectados por *P. falciparum*, a proporção de CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FOXP3⁺ foi correlacionada com o número de parasitos circulantes (Minigo *et al.*, 2009; Walther *et al.*, 2009) e com Proteína Rica em Histidina 2 de *P. falciparum*, um marcador para a biomassa total do patógeno (Minigo *et al.*, 2009). No elegante estudo de Walther e colaboradores, com crianças de Gâmbia durante a infecção aguda, observou-se a mesma proporção de células T_{reg} nos pacientes quando comparados com controles saudáveis com parasitemia desconhecida, apesar deste estudo demonstrar uma correlação entre T_{reg} e carga parasitária. Curiosamente, neste mesmo trabalho, o número de T_{reg} e os níveis de mRNA de FOXP3 estiveram aumentados durante a convalescença, em comparação com a doença aguda ou com os controles saudáveis (Walther *et al.*, 2009).

Apesar dos estudos iniciais realizados em modelos de malária murina e em populações expostas aos plasmódios humanos em regiões altamente endêmicas demonstrarem associação positiva entre expansão de células T_{reg} e nível morbidade, ainda existem lacunas a serem exploradas e entendidas. Por exemplo, não se sabe ainda, se em regiões com perfil instável de transmissão há relação entre células T_{reg}, parasitemia e intensidade clínica da infecção.

1.6 As células dendríticas

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígenos sendo extremamente eficientes na ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, capazes de manter tolerância ou desencadear respostas imunes (Steinman *et al.*, 2003). As DCs compreendem menos do 1% do número total de células do sangue periférico (Steinman, 1991) e têm um papel crucial na ligação entre o sistema imune inato e adquirido. Dentre as propriedades funcionais dessas células estão: a captação, o processamento e apresentação antigênica, migração celular, interação com linfócitos T, secreção de citocinas e ativação da resposta imune específica (Banchereau, Steinman, 1998; Keller, 2001; Cirrincione *et al.* 2002; Rossi, Young, 2005).

Vários subtipos de DCs têm sido identificados no sangue humano. Em geral, DCs do sangue periférico (PBDCs) são negativas para os marcadores CD3, CD14, CD16, CD19, CD34 e CD56, mas positivas para CD4 e HLA-DR. As PBDCs podem ser divididas em dois subtipos: CD11c⁺, ou seja, com progenitor mielóide e CD11c⁻, com progenitor linfóide (Cools *et al.*, 2007). Sua origem, portanto, permite com que a população de DCs CD11c⁺ seja definida como DCs mielóides (mDCs) enquanto, as DCs CD11c⁻ como DCs plasmocitóides (pDCs); uma população homogênea que expressa altos níveis de CD123, CD62L (Kadowaki *et al.*, 2001; Briere *et al.*, 2002).

Na falta de estímulo antigênico, tanto as mDCs como as pDCs exibem fenótipos imaturos caracterizados pela baixa expressão de MHC e moléculas co-estimulatórias, principalmente, CD40, CD80 e CD86 (Dzionek *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2002) mas, são especializadas na captura antigênica (Keller, 2001). Após a captação antigênica, essas células sofrem uma série de mudanças morfológicas, fenotípicas e funcionais que as tornam aptas a apresentarem o antígeno processado às células efetoras do sistema imunológico, ou seja, tornam-se maturadas. A maturação das DCs é um processo contínuo que se inicia nos tecidos periféricos e se completa durante sua interação com os linfócitos T nos órgãos linfóides (Keller, 2001) e é estimulada por produtos bacterianos antigênicos, como o LPS, e citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , GM-CSF, IL-1, IL-3 e IL-6 (McLellan, Kämpgen, 2000; Keller, 2001). Tal processo caracteriza-se pela intensificação da morfologia dendrítica,

reorganização do citoesqueleto e aquisição de uma alta motilidade celular e redução da capacidade de captação antigênica em virtude da diminuição da expressão de receptores para opsoninas. Além disso, observa-se um aumento da capacidade de processamento e apresentação de antígenos, decorrente do aumento da expressão das moléculas de histocompatibilidade classe II e classe I, e aumento da expressão de moléculas de adesão e co-estimulatórias (CD54/ICAM-1, CD102/ICAM-3, CD80/B7.1, CD86/B7.2, CD11a/LFA-1, CD29/VLA) envolvidas nos mecanismos de migração celular e interação com os linfócitos T (Hart, 1997; Banchereau, Steinman, 1998; Keller, 2001; Cirrincione *et al.*, 2002). Segundo Keller (2001), as células dendríticas maduras perdem sua capacidade de responder a quimiocinas inflamatórias passando a responder apenas a quimiocinas constitutivas que direcionam a sua migração da periferia para os linfonodos. Uma vez nos linfonodos, essas células interagem com os linfócitos T helper, através de moléculas de adesão e sinais co-estimulatórios, realizando a apresentação antigênica e a conseqüente ativação da resposta imune celular e/ou humoral T dependente (Keller, 2001).

1.7 As células dendríticas na malária

De acordo com alguns estudos, *in vitro* e *in vivo*, a infecção malárica pode inibir a indução de resposta imune *Plasmodium* específica (Riley *et al.* 1989; Luty *et al.*, 2000; Wipasa *et al.*, 2001) e parece ser mediada por apoptose de linfócitos T efetores, inibição da ativação de macrófagos e do processamento antigênico e, mais recentemente, através da inibição da maturação e função das células dendríticas (Urban *et al.* 1999; Urban, Roberts, 2003).

Usando um modelo de malária murina, Ocaña-Morgner e colaboradores, observaram que eritrócitos infectados por *Plasmodium* impediam a ativação das células dendríticas por meio de inibição da regulação das moléculas co-estimulatórias com conseqüente reflexo na sua capacidade de ativar as células T, bem como no padrão de secreção de citocinas (Ocaña-Morgner *et al.*, 2003). Subsequentemente, foi demonstrado que fatores solúveis de *P. yoelli* inibiam o fenótipo de maturação das células dendríticas (Orengo *et al.*, 2008). Baseado em

estudos prévios, um grupo australiano, demonstrou que cepas letais do parasito poderiam comprometer a função das DCs, enquanto que cepas não-letais não influenciariam na atividade funcional dessas células (Wykes *et al.*, 2007).

1.8 A interação entre células dendríticas e células T reguladoras

Juntamente com as DCs, as células T_{reg} CD4⁺CD25⁺ desempenham um papel crucial na manutenção da tolerância *self*. Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a expansão de células T reguladoras depende fortemente da estimulação antigênica periférica mediada pelas DCs maduras (Janeway, Bottomly, 1994; Lenschow *et al.*, 1996; Steinman *et al.*, 2003).

Embora o papel das DCs na geração de células T_{reg} esteja bem estabelecido (Lange *et al.*, 2007), ainda não está totalmente elucidado o efeito direto de T_{reg} sobre as DCs. Atualmente, acredita-se que as células T_{reg} podem modular a maturação e/ou função de DCs. Existem evidências de que DCs imaturas cultivadas na presença de T_{reg} apresentam menor capacidade de maturar, expressar moléculas co-estimuladoras (por exemplo: CD40, CD80, CD83, e CD86) e estimular células T *naïve* (Lange *et al.*, 2007). Em modelos experimentais, células CD4⁺CD25⁺ proporcionam uma nítida redução na expressão de CD80 e CD86 pelas células dendríticas, mas somente os níveis de transcritos (RNAm) de CD80 encontram-se diminuídos (Cederbom *et al.*, 2000). Isso sugere que diferentes mecanismos e fatores podem interagir regulando a expressão dessas moléculas.

Curiosamente, alguns trabalhos utilizando microscopia intravital, revelaram interações diretas entre células T_{reg} e DCs *in vivo*. Essas interações, as quais foram mediadas por CTLA-4 (Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico) (Takahashi *et al.*, 1998; Read *et al.*, 2000), foram propostas como causa para a reduzida ativação das células T efectoras pelas DCs (Tadokoro *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006). Realmente, vários estudos, demonstram que o bloqueio de CTLA-4 anula a função imunorreguladora das T_{reg} durante a doença inflamatória intestinal em modelos murinos (Read *et al.*, 2000). Em humanos, o mesmo efeito tem sido observado em pacientes com melanoma (Phan *et al.*, 2003; Blansfield, *et al.*, 2005; Maker *et al.*, 2005.; Maker *et al.*,

2006.) Estes resultados indicam que CTLA-4 desempenha um papel funcional importante na atividade reguladora das células T_{reg} . Por outro lado, camundongos deficientes para CTLA-4, mas que possuem células T_{reg} expressando o fator de transcrição FOXP3, da mesma forma, apresentam atividade supressora (Tang *et al.*, 2004). De fato, essas observações revelam que CTLA-4 desempenha um papel importante na atividade da célula reguladora, mas não é a única molécula acessória exigida para a função das T_{reg} , uma vez que, o fator de transcrição nuclear FOXP3, foi descrito como responsável direto pelo seu desenvolvimento e função (Fontenot *et al.*, 2003).

Semelhante ao que ocorre em infecções causadas pelo *P. falciparum*, observou-se, recentemente, um aumento significativo do número de células T_{reg} e dos níveis de IL-10 nos pacientes com infecção aguda por *P. vivax*, quando comparados com controles *naïves*. Por outro lado, infecções por *vivax* conduziram a uma geral redução no número de DCs, da relação das populações mielóides e plasmocitóides, sugerindo um possível papel imunorregulador das células T_{reg} durante a infecção aguda por *P. vivax* (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008).

As discrepâncias entre resultados observados em diversos modelos de malária experimental e humana evidenciam as dificuldades atuais para compreender os mecanismos envolvidos na imunorregulação na malária e, em particular, para compreender o papel de células T_{reg} , DCs e de diversas citocinas nesse processo. Embora existam bons estudos sobre o papel dessas células na malária, é difícil explicar e conciliar dados conflitantes, incluindo as diferenças entre adultos e crianças oriundos de diferentes áreas geográficas, como destacado por Scholzen e colaboradores (Scholzen *et al.*, 2009). Os estudos realizados até o momento forneceram boas descrições a respeito das interações parasito-hospedeiro que contribuem para a imunorregulação durante a infecção aguda. No entanto, não existem estudos que avaliem as diferenças nos níveis basais entre regiões geograficamente diferentes, como a América do Sul, nem mesmo estudos que avaliem o impacto das T_{reg} e das DCs na infecção humana com diferentes espécies plasmódios na mesma região demográfica. Diante dessas lacunas, este projeto tem como objetivo principal investigar a população de células T reguladoras e de células

dendríticas durante a infecção natural por *P. falciparum* e por *P. vivax* em uma área de transmissão instável de malária na Amazônia brasileira.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como principal objetivo investigar a relação entre células T reguladoras e células dendríticas durante a fase aguda da infecção malárica em indivíduos provenientes da Amazônia brasileira.

Objetivos específicos:

1. Determinar, no sangue periférico de pacientes com malária aguda, a proporção de células T_{reg} $CD4^+CD25^+$ com base na expressão de FOXP3 e CTLA-4 e analisar se o perfil observado pode ser modulado pela espécie de parasito infectante;
2. Determinar, no sangue periférico de pacientes com malária aguda, o perfil populacional de células dendríticas totais e suas subpopulações (mDCs= $CD11c^+$ e pDCs= $CD123^+$) correlacionando-os com a espécie do parasito;
3. Investigar a relação direta entre células T_{reg} FOXP3+CTLA-4+ e perfil de populacional de DCs totais, subpopulações e fenótipo de ativação dessas células em indivíduos infectados;
4. Investigar a concentração plasmática de citocinas anti- ($TGF-\beta$ e IL-10) e próinflamatórias (IL-4, IL-12, IFN- γ e TNF- α) e sua relação com a redução ou aumento da expansão de células T reguladoras e DCs totais e ativadas durante a infecção malárica.
5. Investigar a relação entre proporções de células T_{reg} e concentração plasmática de citocinas anti- e próinflamatórias no padrão clínico da infecção malárica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área e população de estudo

Os indivíduos recrutados para este estudo, em sua maioria, provêm de uma região pertencente ao município de Lábrea (AM) conhecida como Remansinho (Figura 2). 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). Caracterizada como uma área recente de assentamento agrícola composto por indivíduos oriundos de distintas regiões do país, essa região contabilizou nos meses anteriores ao início deste trabalho uma média de 50 novos casos de malária/mês em uma população de cerca de 200 habitantes distribuídos em 93 domicílios. Embora *P. vivax* seja a espécie predominante, infecções por *P. falciparum* também são frequentes.

Figura 2: A área de assentamento agrícola recente, Remansinho, pertencente ao município de Lábrea-AM (seta).

Para este estudo, foram abordados 66 pacientes, com ou sem história pregressa de malária, dos quais resultaram em 76 casos de infecções maláricas: 66 são infecções primárias e 10 referem-se a re-infecções contraídas durante nosso tempo de permanência na área de estudo. Amostras de sangue provenientes de 18 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. Para esse estudo, considerou-se que a comparação entre indivíduos da mesma área, submetidos a semelhantes condições geográficas, sanitárias, de alimentação e trabalho bem como exposição a patógenos, fosse mais representativa do padrão celular investigado. Além disso, incluiu-se neste estudo, amostras sanguíneas de alguns pacientes convalescentes, com o objetivo de avaliar alguns parâmetros (contagem de células e níveis de citocinas circulantes) após a cura da doença. Dentre os 76 indivíduos recrutados para estudo, 22 pacientes inicialmente infectados por *P. vivax* tiveram uma segunda amostra sanguínea coletada 28 dias após o início do tratamento antimalárico e assim, formaram o grupo de pacientes convalescentes. Alguns dos pacientes infectados por *P. falciparum* ou co-infectados por *P. vivax* e *P. falciparum* dispuseram-se à coleta de amostras, mas optou-se pelo grupo infectado por *vivax*, pois este representou dentro dos outros grupos, um número razoável de indivíduos e assim, com maior força estatística. 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.

Cada amostra sanguínea, consistindo de 80 mL de sangue venoso heparinizado, foi destinada a obtenção de células mononucleares periféricas (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) 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 PCR aninhada (Win *et al.*, 2002). Este trabalho é aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (parecer #829/CEP).

3.2 Obtenção de PBMCs

Imediatamente após a coleta o sangue diluído em Hanks 1X (Sigma Aldrich), foi centrifugado a 500 g, durante 17 minutos, em gradiente de Ficoll-Paque (Nycomed, Amersham Biosciences) na proporção de 2:1. A seguir, o anel de células mononucleares obtido com o gradiente de densidade foi coletado e submetido a duas lavagens seqüenciais com tampão salino – Hanks 1X (Sigma Aldrich), seguidas de centrifugação a 300 g por 10 minutos. O sedimento de células foi ressuspenso em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco, Carsbad, EUA) e 200 mM de L-glutamina (Invitrogen) sendo as mesmas contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer (diluição 1:20). Após terem sua viabilidade averiguada utilizando-se azul de tripan 0,04%, a concentração celular foi corrigida a 10^7 células/mL. As mesmas foram, então, congeladas em meio contendo DMSO (Dimetilsulfóxido) 10% (Sigma Aldrich) + SFB 90% (Sigma Aldrich) e criopreservadas em nitrogênio líquido.

3.3 Exame de fezes

Infecções maláricas e helmínticas comumente ocorrem de forma simultânea em regiões tropicais. Considerando-se evidências atuais de que helmintos intestinais induzem a proliferação de células T_{reg} (Maizels, 2005) investigou-se a ocorrência destes parasitos em todos os pacientes abordados para este estudo. Para tal, as fezes foram coletadas, fixadas em formalina 10% (sistema Coprotest®) e analisadas pelos métodos de Hoffmann (Hoffmann *et al.*, 1934).

3.4 Diagnóstico de infecção por *Plasmodium*

3.4.1 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 cm de diâmetro ou largura cada. Depois de secar a temperatura ambiente (TA), realizou-se o procedimento de coloração do sangue pelo método de Giemsa. Para isso, após a retirada da hemoglobina utilizando-se azul de metileno, a lâmina contendo o sangue permaneceu em contato com a solução de Giemsa (uma gota de corante/mL de água tamponada) durante 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 pertencentes a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) em objetiva de imersão (aumento de 1000X).

3.4.2 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular, realizado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (Win *et al.*, 2002), foi realizado com o objetivo de se confirmar o diagnóstico obtido por meio do exame microscópico de gota espessa. 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 (Scopel *et al.*, 2004; da Silva-Nunes *et al.*, 2008) os controles expostos, como também as amostras coletadas durante a convalescença, foram submetidos à PCR com o objetivo de se confirmar a ausência de infecção malárica.

3.4.2.1 Extração do DNA com Fenol-Clorofórmio

Para a extração do DNA o sangue total dos pacientes, convalescentes e dos controles expostos foi mantido a -20° C até o retorno para o laboratório no Instituto de Ciências Biomédicas da USP. A 200 µL de sangue total de cada paciente, convalescente ou controle imune, adicionou-se 1,0 mL de solução de saponina (0,015%), permanecendo sobre agitação constante por cinco minutos, a 25° C, seguido a centrifugação a 15500 g, a 4° C, por 12 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido em 1,0 mL de PBS e o tubo centrifugado a 15500 g, a 4° C por cinco minutos. O sobrenadante foi novamente removido e essa etapa de lavagem repetida. Após, adicionou-se 200 µL da solução de extração de DNA (Tris-HCl pH 8,8 10 mM, EDTA pH 8,0 5 mM, NaCl 100 mM, SDS 0,5%, e proteinase K 200 µg/mL) ao precipitado. A mistura foi mantida *overnight* em banho-maria a 50° C. Após este período, foram adicionados 250 µL de TE-fenol, agitou-se por 10 minutos (Mixer Eppendorf) e centrifugou-se por 10 minutos, a 4° C, a 15500 g. Transferiu-se a fase aquosa para novo tubo com 250 µL de TE-fenol-clorofórmio, agitou-se por cinco minutos (Mixer Eppendorf), procedido de centrifugação por 10 minutos, a 4° C, a 15500 g. Novamente, transferiu-se a fase aquosa para novo tubo, mas este, com 250 µL de clorofórmio- álcool isoamílico, agitando-se por cinco minutos (Mixer Eppendorf), procedido de centrifugação por 10 minutos, a 4° C, a 15500 g. Para precipitação do DNA, após a centrifugação, à fase aquosa foi adicionado 20 µL de Acetato de sódio (3 M pH 5,2) e 500 µL de etanol gelado (100%). Essa mistura foi mantida a -20° C, *overnight*. Seguido a este período, o tubo contendo a mistura foi centrifugado a 15500 g por 10 minutos, a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspendido em 500 µL de etanol gelado (75%) procedido de centrifugação a 15500 g por 10 minutos, a 4° C. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de água bidestilada e estocado a -20° C.

3.4.2.2 Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para diagnóstico confirmatório ou exclusivo da infecção pelo *Plasmodium*, realizou-se uma reação do tipo nested (nPCR), onde o produto de uma primeira amplificação do DNA de *Plasmodium* (gênero específica) foi utilizado como substrato

para a segunda amplificação do DNA ou reação espécie-específica. A segunda etapa de amplificação, na qual se utilizam iniciadores complementares às seqüências internas do produto obtido na primeira, permite que *P. falciparum*, *P. vivax* e/ou *P. malariae* presentes na amostra sejam detectados.

Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies do Brasil e correspondem as seqüências do gene SSUrRNA (18S do rRNA).

Os iniciadores utilizados foram:

P1-Up (universal, anterior): 5' - TCC ATT AAT CAA GAA CGA AAG TTA AG - 3'
P2 (universal, reverso): 5' - GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T - 3'
P1 (universal, anterior): 5' - ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT - 3'
F2 (para <i>P. falciparum</i> , reverso): 5' - CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG - 3'
V1 (para <i>P. vivax</i> , reverso): 5' - CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A - 3'
M1 (para <i>P. malariae</i> , reverso): 5' - GGA AGC TAT CTA AAA GAA ACA CTC ATA T -3'

Para a realização da primeira reação de amplificação de DNA foram utilizados 12,5 µL de uma mistura comercial (*Go Taq® Green Master Mix*, Promega) composta por tampão de reação *Green Go Taq® 2x* pH 8,0, 400 µM de cada dNTP, e 3 µM MgCl₂, 0,8 µL de P1-Up, 0,8 µL de P2 (10 µM cada) e 4,9 µL de água livre de nucleases, totalizando um volume de 19 µL. Adicionou-se, então, 1,0 µL do DNA teste. O material foi levado ao termociclador (Applied Biosystems), procedendo ao seguinte programa de amplificação:

- um ciclo a 92° C durante dois minutos (desnaturação inicial);- 35 ciclos a 92° C por 30 segundos e 60° C por 90 segundos;- um ciclo a 60° C por cinco minutos (extensão final);- 4° C ∞.

Para a realização da reação espécie-específica, o produto amplificado da primeira reação foi diluído em água bidestilada na proporção 1:10. As condições dessa etapa foram semelhantes a da primeira, excetuando-se pela adição de 2,0 µL de

P1, 2,0 µL de F2, V1 ou M1 (10 µM cada) e 2,6 µL de água livre de nucleases. O material foi, então, levado ao termociclador (Applied Biosystems) onde realizou-se:

- um ciclo a 92° C durante dois minutos (desnaturação inicial);
- 18 ciclos a 92° C por 30 segundos e 60° C por 60 segundos;
- um ciclo a 60° C por cinco minutos (extensão final);
- 4° C ∞.

Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio (100 µM) e identificados com base no padrão de tamanho marcador de 100 pb (Fermentas Life Sciences). Em todas as reações foram utilizados controles positivos para *P. falciparum* e *P. vivax*, além de controles negativos para monitorar contaminações. Amostras positivas apresentaram fragmentos de 102 pb para *P. falciparum*, de 104 pb para *P. vivax* (Figura 3).

Amostras que tiveram resultados discordantes entre gota espessa e PCR, incluindo a presença de infecções mistas, foram reanalisadas.

Figura 3: Fragmentos obtidos ao final da PCR visualizados em gel de agarose. A- controle positivo, *P. falciparum* (102 pb); B- controle negativo; C- amostra negativa; D- amostra positiva para *P. falciparum*; E- amostra positiva para *P. vivax* (104 pb); F- amostra com infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*).

3.5 Avaliação fenotípica do perfil populacional das células T reguladoras e de células dendríticas no sangue periférico

A análise fenotípica das populações celulares nas amostras de PBMCs foi realizada tanto para os casos de malária *vivax* quanto para os casos de malária

falciiparum, casos mistos de infecção e células provenientes de pacientes controles. As frequências das populações celulares de células T reguladoras e células dendríticas mielóides e plasmocitóides foram definidas com base em moléculas de superfície marcadas com fluorocromos específicos. Os marcadores utilizados para determinação dessas populações são apresentados abaixo (Tabelas 1 e 2). 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 1- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem das T_{reg}

Marcador	Conjugado	Clone	Fabricante	Volume utilizado (µL)
CD3	PeCy7	SK7	BD	1,0
CD4	PerCp	SK3	BD	1,0
CD25	PE	2A3	BD	7,5
FOXP3	FITC	PCH101	eBioscience	7,5
CD152	APC	BNI3	BD	10

Tabela 2- Lista de anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem das DCs

Marcador	Conjugado	Clone	Fabricante	Volume utilizado (µL)
Lin 1*	FITC	SK7, 3G8, SJ25C1, L27, MφP9, NCAM 16.2	BD	5,0
CD11c	APC	3.9	eBioscience	1,0
HLA-DR	Alexa 700	L243(G46-6)	Biolegend	0,5
CD123	PE	9F5	BD	3,0
CD86	PECy5	2331(FUN-1)	BD	5,0

* Lin 1 corresponde ao coquetel de anticorpos anti- CD3, anti- CD14, anti- CD16, anti- CD19, anti- CD20, anti- CD56.

Os criotubos contendo PBMC foram descongelados rapidamente, em banho-maria a 37° C, utilizando-se 1,0 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB inativado (Gibco, Carsbad, USA). A suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 mL, contendo 10 mL de meio RPMI completo, seguindo-se de centrifugação a 250 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 2,0 mL de meio completo. A viabilidade celular foi averiguada utilizando-se azul de tripan 0,04%, e o número de células viáveis foi estimado em contagem na câmara hemocitométrica de Neubauer (diluição 20X).

Para cada análise populacional foram utilizadas 10⁶ células viáveis. Brevemente, 10⁶ células viáveis foram transferidas para placa de 96 poços em fundo "V", a qual foi centrifugada a 600 g por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e a cada poço foram adicionados 170 µL de tampão MACS (PBS pH 7,2, SFB 2%, EDTA 2 mM pH8,0). 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, então, ressuspensionado em tampão MACS seguindo-se a adição dos volumes pré-definidos dos anticorpos monoclonais (volume final total da solução: 50 µL). Após serem incubadas por 30 minutos no escuro a 4° C as placas foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos. Após duas etapas de lavagem com 170 µL de tampão MACS, seguidas por centrifugações a 500 g por 5 minutos, as células foram ressuspensionadas em 100 µL de paraformaldeído (PFA) 1%.

Para amostras destinadas a análise das proporções de células T_{reg} periféricas, procedeu-se a marcação intracelular de FOXP3 utilizando-se um kit comercializado pela eBioscience (cat#71-5776). Brevemente, as células foram permeabilizadas e fixadas com solução de permeabilização e fixação seguindo-se incubação por 30 minutos. Após serem lavadas 2X com 200 µL de tampão de permeabilização e centrifugadas a 600 g durante 5 minutos a 4° C as amostras foram incubadas por 1 hora com anticorpo monoclonal anti-FOXP3 marcado com FITC. A seguir, as mesmas foram lavadas 2X com 200 µL de tampão MACS e fixadas em paraformaldeído 1% seguindo-se a leitura em FACSCanto. Foram adquiridos pelo menos 100 mil eventos para cada painel fenotípico de interesse. As análises foram realizadas utilizando-se o software *FlowJO*. As figuras 4, 5, 6 e 7 detalham as estratégias de análise utilizadas

para identificar a população de células T_{reg} em PBMCs provenientes de um indivíduo controle e de um paciente infectado por *P. vivax*, como também as estratégias de análise utilizadas para identificar os subtipos de DCs nas PBMCs de um indivíduo controle e de um paciente infectado por *P. vivax*, respectivamente.

Figura 4. Estratégia de análise utilizada para identificar a população de células T_{reg} em PBMCs proveniente de um indivíduo controle. (A) Seleção de células T (CD3+) por meio de suas características de tamanho (Fsc) e granulosidade (Ssc); (B) Seleção da população CD4+ a partir da população CD3+; (C) Caracterização de células T_{reg} CD4+ por meio da expressão simultânea de CD25+FOXP3+; (D) Entre a população CD4+CD25+FOXP3+, foi adicionalmente caracterizada a subpopulação CTLA-4+.

Figura 5. Estratégia de análise utilizada para identificar a população de células T_{reg} de PBMCs de um paciente infectado por *P. vivax*. (A) Seleção de células T ($CD3^+$) por meio de suas características de tamanho (Fsc) e granulosidade (Ssc); (B) Seleção da população $CD4^+$ a partir da população $CD3^+$; (C) Caracterização de células T_{reg} $CD4^+$ por meio da expressão simultânea de $CD25^+$ $FOXP3^+$; (D) Entre a população $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$, foi adicionalmente caracterizada a subpopulação $CTLA-4^+$.

Figura 6. Estratégia de análise utilizada para identificar os subtipos de DCs nas PBMCs de um indivíduo controle. (A) Células mononucleares foram selecionadas por suas características de tamanho (Fsc) e granulosidade (Ssc); (B) DCs foram identificadas como células positivas para HLA-DR e negativas para CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56. (C) mDCs foram identificadas como CD11c⁺ e CD123⁻ e as pDCs como CD123⁺ e CD11c⁻; (D) pDCs e (E) mDCs foram identificadas como CD86⁺.

Figura 7. Estratégia de análise utilizada para identificar os subtipos de DCs nas PBMCs de um paciente infectado por *P. vivax*. (A) Células mononucleares foram selecionadas por suas características de tamanho (Fsc) e granulosidade (Ssc) (B) DCs foram identificadas como células positivas para HLA-DR e negativas para o marcador lin 1; (C) Selecionando as DCs, as mDCs foram identificadas como CD11c⁺ e CD123⁻ e as pDCs como CD123⁺ e CD11c⁻; (D) pDCs 86⁺; (E) mDCs 86⁺.

3.6 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Níveis de citocinas circulantes, dentre elas TGF- β , IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α , foram avaliadas no plasma de pacientes infectados por *P. falciparum*, por *P. vivax*, com infecções mistas, convalescentes e indivíduos controles, utilizando-se a técnica de ELISA de captura seguindo-se as recomendações do fabricante (BD PharMingen).

Placas de 96 orifícios (Millititer, Millipore Corporation, Bedford, EUA) foram sensibilizadas com 15 $\mu\text{g/mL}$ 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 μL PBS-Tween 20 (0,05%) sendo, então, bloqueadas com 200 μL de SFB (10% em PBS 1x) por 1 hora à temperatura ambiente (TA). Após descarte do meio de bloqueio, 50 μL 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 a TA. Todas as amostras foram testadas em duplicata. Após serem lavados cinco vezes com 300 μL de PBS-Tween 20 (0,05%), cada orifício recebeu 50 μL da solução de detecção (anticorpo monoclonal biotinilado + SAV-HRP/*streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*) seguindo-se incubação por 1 hora à TA. Finalmente, as placas foram lavadas sete vezes, com 300 μL PBS-Tween 20 (0,05%), e incubadas com 50 μL 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 μL de H₂SO₄ (2 N) e a leitura das placas foi realizada em leitor automático de ELISA (filtro de 450 nm). As absorbâncias obtidas foram, então, convertidas em pg mL⁻¹ e plotadas frente a uma curva padrão específica. Para a dosagem de TGF- β , as amostras de plasma foram diluídas cinco vezes (em PBS 1X), como recomendação do fabricante. Para isso, antes de serem distribuídos aos orifícios, cada amostra teste foi diluída e inativada com 4 μL de HCl (1 N) durante 1 hora, à 4° C. Após esse tempo as mesmas foram, então neutralizadas com 4 μL de NaOH. Para quantificação dessa citocina, o valor em pg mL⁻¹ foi multiplicado pelo fator de correção cinco.

Com base na curva padrão específica determinou-se o valor de *cut-off* para cada citocina, sendo de 125, 7.8, 7.8, 31.3, 4.7 e 7.8 pg mL⁻¹ para TGF- β , IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α , respectivamente.

3.7 Cálculo do índice clínico

Pacientes oriundos de uma mesma região demográfica podem manifestar sintomas clínicos distintos com níveis de intensidade variados. Considerando-se que a espécie do parasito envolvida na infecção pode ser um dos moduladores dessas manifestações foi desenvolvido um sistema para quantificar a intensidade da doença clínica (Karunaweera *et al.*, 1998) com base no relato dos pacientes no momento da coleta das amostras.

Para este fim, cada paciente foi interrogado sobre a presença de sintomas que normalmente acompanham uma infecção malárica: febre, calafrios, sudorese, cefaléia, mialgia, artralgia, dor abdominal, náuseas, vômitos, tontura, tosse, dispnéia e diarreia. Cada sintoma referido foi classificado conforme a intensidade, como: ausente (0); leve (1); moderado (2) ou intenso (3). Vômitos e dor abdominal foram classificados como ausente ou presente (0 ou 1). Utilizou-se o mesmo sistema de pontuação para todas as infecções (n=76), independentemente da espécie do parasito. Episódios de malária grave não foram diagnosticados na população de estudo. Para construir um índice clínico global a partir desse sistema de pontuação de cada sintoma, foi utilizada a análise de componentes principais (PCA) para derivar pesos a serem atribuídos a cada sintoma. Esta abordagem tem sido amplamente utilizada para obter índices sócio-econômicos a partir dos dados de propriedades (Filmer e Pritchett, 2001) e foi utilizado, anteriormente, para resumir dados de sintomas de malária (Mackinnon *et al.*, 2000).

A PCA é uma técnica estatística multivariada que resume as informações contidas em um conjunto de variáveis para um menor número de dimensões, criando um conjunto de componentes ortogonais entre si não-correlacionados (componentes principais). Cada componente é uma combinação linear ponderada das variáveis. Do primeiro componente principal, explica-se a maior variação

possível nos dados e pode ser usado como um valor único que captura informações a partir de um conjunto de variáveis em uma medida composta. A análise de componentes principais, realizada utilizando-se o software XLSTAT, versão 7.5.2 (Addinsoft, Nova York, NY), teve início aplicando-se as variáveis (valores numéricos associados a cada sintoma) normalizadas pela sua média e desvio padrão. Esta estratégia permite a combinação de dados codificados de maneiras diferentes - por exemplo, se sintomas são ausentes ou presentes (dados binários) e se os sintomas, quando presentes, são leve, moderado ou grave (dados ordinais). O primeiro componente principal explicou 27,7% da variabilidade e deu maior peso (carga fatorial, informados entre parênteses) para os seguintes sintomas: calafrios (0,744), febre (0,718), sudorese (0,681), náuseas (0,670), dor de cabeça (0,665) e tontura (0,611). As pontuações atribuídas a cada sintoma normalizado foram ponderadas, utilizando a PCA derivada dos pesos fatoriais, e somadas para informar o índice clínico de cada paciente (variação de -5,58 para 9,49). Este índice foi usado para classificar os indivíduos de acordo com a intensidade dos sintomas de malária.

3.8 Análise estatística

Para as comparações entre os grupos de indivíduos infectados por *P. falciparum*, por *P. vivax*, convalescentes ou o grupo de controles imunes, foram utilizados testes estatísticos não-paramétricos (testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Wilcoxon) utilizando-se o programa SPSS versão 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Para todos os testes foi estabelecido um nível de significância de 5%.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação dos fenótipos de células T e células dendríticas, como também na comparação da concentração de citocinas plasmáticas e o escore clínico. Após verificação de significância, a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste de Dunn's.

O teste de Wilcoxon foi utilizado para a comparação de características hematológicas e de citocinas plasmáticas entre os indivíduos infectados e convalescentes.

O teste de McNemar foi utilizado para avaliar a proporção de indivíduos anêmicos e plaquetopênicos entre os infectados por *vivax* e os convalescentes.

A correlação entre a proporção de mDCs e pDCs ativadas e a proporção de células T_{reg} co-expressando CTLA-4 foi realizado utilizando o teste de Mann-Whitney.

As correlações entre as características gerais da população de estudo (como idade, sexo, tempo de exposição) e características hematológicas, foram realizadas utilizando o teste qui-quadrado.

O coeficiente de Sperman foi utilizado para correlacionar o número de células T e de células dendríticas com a concentração das citocinas plasmáticas e o escore clínico dos pacientes infectados.

4 RESULTADOS

4.1 População do estudo

As características gerais da população de estudo, como idade, sexo, tempo de exposição e características hematológicas, estão detalhados na tabela 3. Como pode ser observado, a presença ou ausência da infecção malárica não demonstra correlação com sexo, idade ou tempo de permanência em área endêmica. Além disso, excetuando-se pelas contagens totais de células brancas e linfócitos, as quais foram significativamente maiores no grupo de indivíduos expostos quando comparados aos grupos de pacientes infectados ($p < 0,001$; teste de Kruskal-Wallis), as variáveis hematológicas avaliadas não foram influenciadas pela presença ou ausência da infecção.

A ocorrência de anemia, definida com base na concentração de hemoglobina no sangue (g/100 mL), segundo sexo e idade de cada indivíduo (segundo os padrões da WHO, 2001), foi observada em 34,7% (17/43) dos pacientes com *P. vivax*, em 26,3% (5/19) dos pacientes com *P. falciparum*, em 35,7% (5/14) dos pacientes com infecção mista e em 22,2% (4/18) dos controles expostos. Contudo, a análise geral dos grupos que compõem a população de estudo demonstra que a destruição de eritrócitos infectados e não infectados nesses indivíduos não atinge proporções significantes ($p > 0,05$; teste χ^2) (Tabela 3).

A presença de plaquetopenia (contagens inferiores a 150.000 plaquetas/mm³) foi observada em 39,5% (17/43) dos pacientes com *P. vivax*, em 15,8% (3/19) dos pacientes com *P. falciparum*, em 28,6% (4/14) dos pacientes com infecção mista e em 44,4% (8/18) dos controles expostos. Observa-se que os indivíduos infectados por *P. vivax* e os controles expostos foram os que apresentaram menores contagens de plaquetas circulantes. Novamente, na análise geral dos grupos que compõem a população de estudo, os níveis de plaquetas não atingem proporções significantes ($p > 0,05$; teste χ^2) (Tabela 3). É importante destacar que dentro do grupo dos infectados, apenas um apresentou plaquetopenia grave (> 50000); no entanto, sem repercussão clínica.

Tabela 3- Características gerais e hematológicas dos pacientes e controles

Característica	C. E. (n=18)	<i>P. v.</i> (n=43)	<i>P. f.</i> (n=19)	<i>P.v + P. f.</i> (n=14)	<i>p</i>
Sexo (% homens)	10/18 (55,5%)	27/43 (62,8%)	12/19 (63,2%)	7/14 (50%)	0,816
Idade (anos)*	32 (28,25- 41,75)	29 (21-40)	41 (28-47)	35 (28-46,75)	0,111
Tempo de exposição à malária (anos)*	28 (19,75- 40,25)	22 (15-30)	25 (17- 35,5)	31,12 (19- 39,25)	0,155
Hemoglobina (g/100mL)*	14,15 (12,275- 15,475)	12,9 (11,7-14,1)	13 (11,7- 13,8)	12,8 (11-13,77)	0,107
Percentual de anêmicos	22,2 (4/18)	34,7 (17/43)	26,3 (5/19)	35,7 (5/14)	0,530
Células brancas (10 ³ /mm ³)*	7,55 (6,2- 9,87)	5,7 (4,8- 6,7)	5,1 (4,3- 6,8)	5,85 (4,6- 6,42)	0,003
Linfócitos (10 ³ /mm ³)*	2,65 (1,5- 4,17)	1,1 (0,7- 1,6)	1,5 (0,8- 1,9)	1,4 (1,0- 1,7)	<0,0001
Plaquetas (10 ³ /mm ³)*	157 (129,0- 191,25)	183 (120-220)	201 (164- 234)	223 (128,5-266,5)	0,172
Percentual de plaquetopênicos	44,4 (8/18)	39,5 (17/43)	15,8 (3/19)	28,6 (4/14)	0,217

C.E- controles expostos; *P.v.*- *Plasmodium vivax*; *P.f.*- *Plasmodium falciparum*; *P.v + P. f.*- infecção mista. * mediana e intervalo inter-quartil, teste qui-quadrado.

As contagens de células brancas, plaquetas e níveis de hemoglobina foram investigados, da mesma maneira, nos 22 indivíduos convalescentes infectados por *P. vivax*. Optou-se pelo grupo infectado por *vivax*, pois este representou dentro dos outros grupos (infectados por *P. falciparum* e por ambas as espécies), um número razoável de indivíduos e assim, com maior força estatística. Pacientes infectados por *vivax* apresentaram, nos parâmetros avaliados, valores significativamente maiores do que durante a infecção aguda para a contagem de células brancas ($p=0,003$; teste de McNemar), plaquetas ($p=0,000$; teste de McNemar) e para os níveis de hemoglobina ($p=0,03$; teste de McNemar) (Tabela 4), indicando que a leucopenia, plaquetopenia e anemia, observadas durante a infecção malárica foram parcialmente revertidos após a cura da doença.

Tabela 4- Características hematológicas em amostras pareadas da fase aguda de infecção por *P. vivax* e na convalescença

Característica	Fase aguda (n=22)	Fase convalescente (n=22)	<i>p</i>
Células brancas ($10^3/\text{mm}^3$)*	5,55 (3,1-7,6)	7,0 (3,5-13,2)	0,003
Hemoglobina (g/100 mL)*	12,9 (6,5-16,2)	13,45 (9,6-15,3)	0,03
Anêmicos (%)	40,9 (9/22)	18,1 (4/22)	0,062
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)*	191,5 (70,0-286,0)	292,5 (153,0- 407,0)	0,000
Plaquetopênicos (%)	22,7 (5/22)	0 (0/22)	-

* mediana e intervalo inter-quartil, teste de McNemar.

4.2 Pesquisa de parasitos intestinais

Somente indivíduos *Plasmodium* positivos tiveram amostras fecais analisadas quanto a presença de parasitos. Destes (n=68/76 casos), somente oito (11,7%) foram positivas.

Dentre os protozoários observados, *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* foi o parasito mais comum, representando 3% das amostras. Protozoários não-patogênicos, como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* ou *Iodamoeba bütschlii* foram observados nas fezes de 4, 2 e 4 pacientes, respectivamente.

Com relação às infecções helmínticas, *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis*, foram observados, respectivamente, em um paciente infectado por *P.vivax* (2,6%; n=38) e em um infectado por *P.falciparum* (5,9%, n=17). Todos os indivíduos com malária mista (n=13) foram negativos para a presença de helmintos.

4.3 Diagnóstico molecular

Para os casos clínicos de malária definidos, em campo, com base no exame de gota espessa, bem como para indivíduos com sintomas compatíveis com a infecção, mas negativos pela microscopia, a detecção ou confirmação da espécie de parasito infectante deu-se por meio da PCR (Tabela 5). Apesar da elevada concordância entre as duas técnicas empregadas, observa-se que quando comparada a PCR, a microscopia falha majoritariamente na detecção de infecções mistas e com parasitemia subpatente. Nesse estudo, das 14 infecções definidas como mistas pela PCR, quatro (28%), seis (43%) e quatro (28%) haviam sido consideradas negativas, associadas a *P. vivax* ou associadas a *P.falciparum*, respectivamente. Cinco infecções simples por *P. falciparum* foram observadas entre as amostras negativas pela gota espessa. Além disso, todos os indivíduos pertencentes ao grupo de convalescentes (19 indivíduos infectados inicialmente por *P.vivax*) foram negativos ao diagnóstico molecular.

Tabela 5- Diagnóstico parasitológico e molecular para *Plasmodium*

Espécie do parasito	Diagnóstico para <i>Plasmodium</i>	
	Gota espessa	PCR
<i>P. vivax</i>	49	43
<i>P. falciparum</i>	18	19
<i>P. malariae</i>	0	0
<i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i>	0	14
Negativo	9	0
Total	76	76

Das 20 amostras de sangue inicialmente definidas como controles imunes, 18 foram confirmadas como negativas, enquanto duas foram positivas por meio

da PCR sendo um caso atribuído a *P. falciparum* e outro considerado misto. Essas duas amostras foram excluídas do estudo por serem provenientes de pacientes definidos mais tarde como assintomáticos.

4.4 Avaliação fenotípica da população de células T reguladoras e de células dendríticas no sangue periférico

Neste trabalho foi investigado o padrão populacional de linfócitos T totais, células T CD4⁺ e de células T_{reg} CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ em indivíduos com malária, segundo espécie de parasito infectante (*P. falciparum*: n=14; *P. vivax*: n=39 e infecções mistas: n=14), e controles expostos (n=17). Além disso, optou-se por investigar nesses indivíduos o efeito causal da associação entre células T_{reg} e dendríticas mielóides (CD11c⁺) e plasmócitóides (CD123⁺). Os resultados encontrados são apresentados a seguir.

Independente da espécie, observa-se que durante a fase aguda, a malária induz uma expressiva redução das taxas de linfócitos T totais na periferia (Controles expostos 948,3; 273,0-3391; *P.vivax* 370,8; 79,50-2258; *P.falciparum* 464,4; 128,4-1088 e infecções mistas 481,3; 100,8-1127; mediana e IQR - intervalo inter-quartil-, respectivamente; $p=0,0002$; teste de Kruskal-Wallis) (Figura 8). Essa linfopenia, por sua vez, parece afetar diretamente a proporção de linfócitos T CD4⁺ circulantes já que indivíduos infectados quando comparados aos controles apresentam redução significativa nas células com esse fenótipo - Controles expostos 517,9; 167,1-2238; *P.vivax* 139,7; 14,31-704,3; *P.falciparum* 172,3; 34,67-528,7 e infecções mistas 184,0; 30,34-650,3; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0001$; teste de Kruskal-Wallis- (Figura 9).

Figura 8: Número absoluto de linfócitos T (CD3+) por mm³, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=39; *P. falciparum*: n=14; infecções mistas: n=14.

Figura 9: Número absoluto de linfócitos T CD4+ por mm³, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=39; *P. falciparum*: n=14; infecções mistas: n=14.

4.4.1 Avaliação fenotípica da população de células T regulatórias

A hipótese inicial deste estudo era de que durante o episódio agudo de malária, os indivíduos infectados, independentemente da espécie do parasito, apresentassem maior proporção de células T_{reg} circulantes que os controles. No entanto, partindo-se da população total de células T CD4⁺ selecionada por meio da análise fenotípica em citômetro de fluxo, observou-se que durante o ciclo eritrocítico parece não haver expansão da população de células T_{reg} (definidas como células T CD4⁺CD25⁺ expressando concomitantemente FOXP3⁺) já que proporções similares desses linfócitos foram observadas entre indivíduos infectados e controles - Controles expostos 1,950; 0,8800-3,060; *P.vivax* 2,060; 0,7600-8,380; *P.falciparum* 2,60; 0,64-5,97 e infecções mistas 2,460; 1,160-5,80; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0636$ (teste de Kruskal-Wallis) (Figura 10).

Figura 10: Percentual de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=39; *P. falciparum*: n=14; infecções mistas: n=14.

Porém, curiosamente, quando número de células T CD4⁺ definido por meio de fenotipagem foi corrigido com base no número absoluto de linfócitos

no sangue periférico obtido a partir da realização do hemograma, notou-se que o número absoluto de células T_{reg} circulantes expressando FOXP3 parece ser significativamente maior nos indivíduos expostos do que nos infectados, independente da espécie do parasito- Controles expostos 10,40; 4,763-32,22; *P.vivax* 3,760; 0,1975-13,97; *P.falciparum* 4,419; 0,7891-21,89 e infecções mista 5,021; 0,5911-19,51; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0002$ (teste de Kruskal-Wallis) (Figura 11).

Figura 11: Número absoluto de linfócitos T CD4+CD25+FOXP3+, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=39; *P. falciparum*: n=14; infecções mistas: n=14.

Apesar de FOXP3+ ainda ser considerada a principal molécula envolvida na atividade funcional de células T_{reg} , sabe-se hoje que outras moléculas também participam nos mecanismos imunorreguladores mediados por esses linfócitos. Dentre essas, inclui-se o CTLA-4, uma molécula co-estimulatória diretamente associada com a interação celular entre T_{reg} e células apresentadoras de antígeno (Sansom, 2000). Curiosamente, ao ser analisado o comportamento da subpopulação de células T_{reg} que co-expressa o CTLA-4 e FOXP3 concomitantemente, observou-se que esse se distingue daquele baseado

somente na expressão de FOXP3. Nesse caso, observa-se, com base na figura 12, que indivíduos na fase aguda da infecção malárica apresentam percentual de células T_{reg} CTLA-4+ circulante superior aquele observado para indivíduos expostos, mas sadios - Controles expostos 1,84; 0,0-5,260; *P.vivax* 12,30; 0,0010-57,70; *P.falciparum* 13,15; 0,0-45,40 e infecções mistas (n=14) 15,70; 10,30-29,60, mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0001$ (teste de Kruskal-Wallis) (Figura 12).

Figura 12: Percentual de linfócitos T CD4+CD25+FOXP3+CTLA-4+, entre indivíduos infectados e controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=39; *P. falciparum*: n=14; infecções mistas: n=14.

Da mesma forma, com relação ao número absoluto de células T_{reg} CTLA-4+, os indivíduos na fase aguda da infecção malárica apresentam número de células T_{reg} CTLA-4+ circulantes superior ao observado para indivíduos expostos - Controles expostos 0,2055; 0,0-1,263; *P.vivax* 0,3512; 0,0-3,452; *P.falciparum* 0,4387; 0,0-3,086 e infecções mistas 0,8766; 0,0922-2,478; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0029$ (teste de Kruskal-Wallis) (Figura 13).

Figura 13: Número absoluto de linfócitos T CD4+CD25+FOXP3+CTLA-4+, entre indivíduos infectados e controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=39; *P. falciparum*: n=14; infecções mistas: n=14.

4.4.2 Avaliação fenotípica da população de células dendríticas

A definição das DC circulantes como mielóides ou plasmocitóides foi baseada na expressão de CD11c e CD123 conforme descrito na seção dos materiais e métodos (subitem 3.5). Avaliando-se o perfil populacional dessas células (Figura 14) observa-se que a infecção por *P. vivax* e por *P. falciparum* induz uma significativa redução no número absoluto de DCs em relação controles; o que não é observado em pacientes infectados concomitantemente por essas duas espécies (medianas de 31,82; 13,82; 17,60 e 22,27 para os controles expostos, infecções por *P. vivax*, *P. falciparum* e infecções mistas, respectivamente. $p=0,0008$; teste de Kruskal-Wallis). Ao ser investigado o padrão fenotípico relativo às subpopulações de DCs observa-se que essa redução atinge majoritariamente as DCs mielóides e que esse padrão pode estar sendo modulado pela espécie de parasito infectante (Figura 15). Nesse caso, observa-se que embora as medianas referentes ao número absoluto de mDC

sejam equivalentes entre os indivíduos com infecções simples, a presença de *P. falciparum* parece amenizar os efeitos de *P. vivax* sobre a diferenciação de mDC (Controles expostos 17,23; 5,208-38,66; *P.vivax* 6,774; 0,5131-28,06; *P.falciparum* 6,713; 1,290-39,05 e infecções mistas 11,67; 1,724-20,43; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0047$; teste de Kruskal-Wallis).

Figura 14: Número absoluto de células dendríticas por mm^3 , comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. Controles expostos: $n=17$; *P. vivax*: $n=38$; *P. falciparum*: $n=15$; infecções mistas: $n=14$.

Enquanto as taxas de mDC parecem ser afetadas pela infecção malária, aquelas referentes as pDCs mostram-se equivalentes entre todos os grupos avaliados (Controles expostos 1,977; 0,1449-8,704; *P.vivax* 2,586; 0,3059-13,74; *P.falciparum* 1,894; 0,06293-11,78 e infecções mistas 4,920; 1,074-10,38; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,1354$; teste de Kruskal-Wallis) (Figura 16).

Figura 15: Número absoluto de células dendríticas mielóides por mm³, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=38; *P. falciparum*: n=15; infecções mistas: n=14.

Figura 16: Número absoluto de células dendríticas plasmocitóides por mm³, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=38; *P. falciparum*: n=15; infecções mistas: n=14.

Embora se pudesse supor que a equivalência observada entre o número absoluto de DC em indivíduos com infecção mista em relação aos controles (Figura 14) pudesse ser modulada pelo número absoluto de pDCs (Figura 16), essa hipótese perde força quando a razão de mDC:pDC é investigada (Figura 17). Nesse caso, observa-se que nesse grupo essa razão foi da ordem de dois enquanto para os controles essa razão foi de ordem 5.5. A razão entre a população de mDC (CD11c+) e de pDC (CD123+) nos indivíduos infectados e controles expostos e seus valores de significância, estão apresentados na figura 13 (Controles expostos 5,570; 2,855-83,56; *P.vivax* 1,775; 0,07680-23,60; *P.falciparum* 3,544; 0,9283-36,60 e infecções mistas (n=14) 2,257; 0,6333-14,92, mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0005$; teste de Kruskal-Wallis).

Figura 17: Razão da população de células dendríticas mielóides (CD11c+) e células dendríticas plasmocitóide (CD123+), nos indivíduos infectados e controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=38; *P. falciparum*: n=15; infecções mistas: n=14.

4.4.3 Avaliação fenotípica do perfil populacional das mDCs e pDCs ativadas

Visto que a infecção malárica parece induzir uma redução no número absoluto de mDCs, optou-se por investigar o padrão de ativação dessas células (bem como em relação a pDC) em pacientes infectados e controles. A análise da proporção de células dendríticas ativadas (ou seja, que co-expressam CD86) demonstra diferenças ponderáveis entre pacientes infectados com diferentes espécies de parasitos. Todos os indivíduos com infecção por *P. falciparum* (n = 15) e com infecção mista (n = 14) avaliados neste estudo apresentam mais de 50% de suas mDC (CD11c+) e mais de 40% de suas pDCs (CD123+) ativadas; padrão semelhante ao observado nos controles expostos (Figuras 18 e 19). Em contraste, indivíduos infectados por *P. vivax* dividem-se claramente em dois grupos: com alta e baixa proporção de células dendríticas ativadas.

Aparentemente, o perfil de ativação observado nos portadores de malária *vivax* não se associa a idade, tempo de exposição à malária ou a proporção de células CD4+ que co-expressam somente CD25 e FOXP3 como marcadores de fenótipo T regulador. Entretanto, existe nítida correlação positiva entre a proporção de mDCs e pDCs ativadas e a proporção de células T CD4+CD25+FOXP3+ que expressam CTLA-4, como observado nas figuras 20 (baixa proporção, <50%, n=13, 0,1652; 0,03397-0,5225 e alta proporção, >50%, n=24, 0,8296; 0,00-3,452; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0125$; teste de Mann-Whitney) e 21 (baixa proporção, <30%; n=15, 0,1652, 0,00-0,5225 e alta proporção, >30%; n=22, 0,9916; 0,04531-3,452; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0021$; teste de Mann-Whitney), respectivamente. Em outras palavras, os indivíduos com malária *vivax* que apresentam baixas proporções de células dendríticas expressando CD86 são aqueles que apresentam baixas proporções de linfócitos T_{reg} expressando CTLA-4.

Figura 18: Percentual de células dendríticas mielóides que expressam o CD86, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. 1- *P.vivax* (n=38) 95,60; 0,0-100,0; 2- *P.falciparum* (n=15) 99,60; 97,30-100,0; 3- infecções mistas (n=14) 99,50; 54,10-100,0 e 4- Controles expostos (n=17) 99,70; 97,00-100,0, mediana e IQR (intervalo inter-quartil), respectivamente; $p=0,0008$ (teste de Kruskal-Wallis).

Figura 19: Percentual de células dendríticas plasmocitóides que expressam o CD86, comparando os indivíduos infectados com os controles expostos. 1- *P.vivax* (n=38) 49,75; 0,0-90,70; 2- *P.falciparum* (n=15) 73,30; 40,90-91,90; 3- infecções mistas (n=14) 81,30; 1,320-92,10 e 4- Controles expostos (n=17) 56,40; 12,50-81,80, mediana e IQR (intervalo inter-quartil), respectivamente; $p=0,0007$ (teste de Kruskal-Wallis).

Figura 20: Células dendríticas mielóides expressando CD86, em relação ao número de T_{reg} CTLA-4+ dos indivíduos infectados pelo *P.vivax*. Os pacientes foram divididos em dois grupos, segundo a proporção de DCs que expressam a molécula co-estimulatória CD86: baixa proporção (<50%, n=13) e alta proporção (>50%, n=24).

Figura 21: Células dendríticas plasmocitóides expressando CD86, em relação ao número de T_{reg} CTLA-4+ dos indivíduos infectados pelo *P.vivax*. Os pacientes foram divididos em dois grupos, segundo a proporção de DCs que expressam a molécula co-estimulatória CD86: baixa proporção (<30%, n=15) e alta proporção (>30%, n=22).

4.5 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Os níveis de citocinas circulantes, dentre elas TGF- β , IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α , foram avaliados em todas as amostras de plasma provenientes de indivíduos com malária e controles, sendo os resultados descritos na tabela 6.

Como é possível observar, a concentração plasmática de IL-4, IL-12 e TGF- β entre os indivíduos infectados mostraram-se equivalentes a dos controles expostos. Por outro lado, nota-se um aumento significativo quanto ao nível plasmático de IFN- γ em indivíduos infectados por *P.falciparum* em relação aos controles expostos ($p<0,05$; Figura 22). Curiosamente, observa-se que para IFN- γ a associação de *P. vivax* à *P. falciparum* faz com que seus níveis sejam iguais aos aqueles observados nos controles e em pacientes infectados somente por *P. vivax* (Controles expostos 5,398; 2,218-51,06; *P.vivax* 8,359; 0,1956-364,4; *P.falciparum* 27,22; 0,2463-174,7 e infecções mistas 4,146; 2,444-62,55; mediana e IQR, respectivamente; $p=0,005$; teste de Kruskal-Wallis).

Para TNF- α , observa-se que durante o episódio agudo da doença, a concentração plasmática dessa citocina encontra-se aumentada em todos os grupos de indivíduos comparados aos controles (Controles expostos 3,804; 2,398-9,112; *P.vivax* 5,24; 3,010-25,40; *P.falciparum* 7,795; 3,568-66,60 e infecções mistas 6,489; 1,513-22,80, mediana e IQR, respectivamente; $p=0,0002$ (teste de Kruskal-Wallis) (Figura 23).

Padrão semelhante foi observado em relação a IL-10 (Figura 24). Nesse caso, a concentração plasmática observada entre os pacientes infectados foi ainda mais expressiva quando comparada ao grupo controle (controles expostos 6,172; 3,117-19,69; *P.vivax* 176,5; 4,434-785,2; *P.falciparum* 56,78; 4,234-653,6 e infecções mistas 24,48; 4,378-457,2; mediana e IQR, respectivamente; $p<0,0001$ (teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 6- Níveis de citocinas circulantes avaliados em plasma de indivíduos infectados e controles expostos

Característica	C. E.	<i>P. v.</i>	<i>P. f.</i>	<i>P.v + P. f.</i>	No. de ind.	<i>p</i>
IL-4 (pg mL ⁻¹)	1,91 (1,71-2,46)	2,87 (2,42- 3,57)	2,83 (2,0- 3,57)	2,89 (2,5-3,01)	80	0,066
IL-12 (pg mL ⁻¹)	30,76 (28,4- 50,6)	44,89 (30,15- 75,13)	66,7 (37,0- 83,4)	42,63 (26,21- 61,70)	85	0,125
IFN- γ (pg mL ⁻¹)	5,39 (3,1- 8,46)	8,35 (3,75- 14,25)	27,2 (6,6- 133,50)	4,14 (3,02- 9,93)	93	0,005
TNF- α (pg mL ⁻¹)	3,8 (3,03- 4,26)	5,24 (4,32- 7,59)	7,79 (4,75- 20,9)	6,48 (3,36- 13,79)	92	<0,0001
IL-10 (pg mL ⁻¹)	6,17 (4,45- 9,13)	176,45 (23,56- 455,58)	56,78 (21,02-103,51)	24,47 (6,55- 68,14)	93	<0,0001
TGF- β (pg mL ⁻¹)	379,3 (178,1- 1439,6)	456,84 (289,67-773,59)	593,9 (392,2-1107,0)	502,6 (363,65- 1706,7)	93	0,603
IL-10: TNF*	1,65 (1,25-1,95)	18,99 (4,21-93,37)	5,52 (1,06- 21,38)	2,24 (1,57- 7,82)	92	<0,0001

C.E- controles expostos; *P.v.*- *Plasmodium vivax*; *P.f.*- *Plasmodium falciparum*; *P.v + P. f.*- infecção mista. * Razão.

Figura 22: Concentração de IFN- γ , em pg/mL, nos indivíduos infectados e controles expostos. Controles expostos: n=18; *P. vivax*: n=42; *P. falciparum*: n=19; infecções mistas: n=14.

Figura 23: Concentração de TNF- α , em pg/mL, nos indivíduos infectados e controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=42; *P. falciparum*: n=19; infecções mistas: n=14.

Figura 24: Concentração de IL-10, em pg/mL, nos indivíduos infectados e controles expostos. Controles expostos: n=18; *P. vivax*: n=42; *P. falciparum*: n=19; infecções mistas: n=14.

Avaliou-se os níveis de citocinas circulantes comparando-se os mesmos indivíduos na fase aguda (infectados por *vivax*) e na fase convalescente. Os níveis de IL-4 circulantes foram significativamente maiores durante a convalescença comparados com os níveis dessa citocina durante a malária aguda por *P. vivax* ($p=0,002$; teste de Wilcoxon). Por outro lado, os níveis de IL-12 ($p=0,027$; teste de Wilcoxon), IL-10 ($p=0,000$; teste de Wilcoxon), IFN- γ ($p=0,013$; teste de Wilcoxon) e TNF- α ($p=0,044$; teste de Wilcoxon) foram significativamente maiores durante a fase aguda quando comparados com os convalescentes. Os níveis de TGF- β mantiveram-se semelhantes ($p>0,05$; teste de Wilcoxon) (Tabela 7)

Tabela 7- Níveis de citocinas em amostras pareadas da fase aguda de infecção por *P. vivax* e na convalescença

Característica	Fase aguda (n=19)	Fase convalescente (n=19)	<i>p</i>
IL-4 (pg mL ⁻¹)*	3,02 (1,92-11,78)	5,49 (2,75-12,36)	0,002
IL-12 (pg mL ⁻¹)*	49,30 (10,48-249,75)	33,38 (19,77-112,90)	0,027
IFN- γ (pg mL ⁻¹)*	7,58 (0,20-364,41)	3,0 (2,17-21,30)	0,013
TNF- α (pg mL ⁻¹)*	5,24 (3,01-25,40)	4,17 (2,49-16,16)	0,044
IL-10 (pg mL ⁻¹)*	260,13 (5,68-785,24)	4,83 (0,40-27,63)	0,000
TGF- β (pg mL ⁻¹)*	447,06 (174,93-6666,15)	410,08 (224,01-1625,44)	>0,05

* mediana e intervalo inter-quartil, teste de Wilcoxon.

Como o balanço entre citocinas anti e pró-inflamatórias tem se mostrado relevante durante o curso clínico da infecção malárica, foi calculada a razão entre as concentrações de IL-10 e TNF- α entre indivíduos infectados, bem como entre infectados e controles. Com base na figura 25 é possível observar que indivíduos com malária *vivax* apresentam um comportamento particular no balanço entre essas citocinas com relação aos demais grupos. Neste grupo, há cerca de 20X mais IL-10 que TNF- α , razão significativamente maior que aquela observada com e entre os demais grupos (controles expostos 1,654; 0,4885-4,795; *P.vivax* 17,63; 0,6644-182,6; *P.falciparum* 5,525; 0,1705-139,6 e infecções mistas 2,248; 0,3367-145,6; mediana e IQR, respectivamente; $p < 0,0001$; teste de Kruskal-Wallis). Nota-se ainda, que ao contrário do observado em relação a IFN- γ , a presença de *P. falciparum* parece influenciar diretamente na secreção de IL-10 (Figuras 22 e 24) levando à sua redução.

Figura 25: Razão de IL-10 e TNF- α , nos indivíduos infectados e controles expostos. Controles expostos: n=17; *P. vivax*: n=42; *P. falciparum*: n=19; infecções mistas: n=14.

Apesar das evidências sobre o papel de IL-10 na expansão de células T_{reg} , neste estudo a correlação encontrada entre tais variáveis no grupo de indivíduos infectados é negativa, ou seja, quanto mais alta é a concentração desta citocina menor é o número absoluto de células T_{reg} circulantes (Correlação de Spearman, -0,461; $p < 0,0001$; n=66). Isso sugere que a IL-10 circulante não é produzida majoritariamente por T_{reg} presentes no sangue periférico. Correlação semelhante foi observada em relação ao número absoluto de DCs nos indivíduos infectados, ou seja, IL-10 parece atuar favorecendo a redução da população de células dendríticas no sangue periférico (Correlação de Spearman: -0,699; $p = 0,000$; n=66).

Interessante é a correlação entre as citocinas anti e pró-inflamatórias. IL-10 correlaciona-se positivamente com IL-12 (Correlação de Spearman, 0,373; $p = 0,001$; n=75) e com IFN- γ (Correlação de Spearman, 0,453; $p = 0,000$; n=75) e negativamente com TGF- β (Correlação de Spearman, -0,297; $p = 0,010$; n=75). Isso sugere que IL-10

pode estar atuando na regulação do processo inflamatório, estando envolvida na inibição da patologia durante a infecção malárica.

4.6 Citocinas, plaquetopenia e anemia

Uma vez que 32% dos indivíduos infectados apresentaram plaquetopenia (valores menores que 150.000/mm³), investigou-se o perfil de citocinas circulantes em pacientes plaquetopênicos (n=24) comparados com os pacientes que apresentaram contagens normais (n=51). Observou-se que os níveis de IL-12 (39,84; 3,07-1111,48 nos não-plaquetopênicos vs. 63,21; 7,75-1044,0 nos plaquetopênicos, mediana e IQR, respectivamente; $p=0,030$; teste de Kruskal-Wallis), IL-10 (44,89; 4,23-785,24 nos não-plaquetopênicos vs. 341,92; 5,94-778,22 nos plaquetopênicos, mediana e IQR, respectivamente; $p=0,000$; teste de Kruskal-Wallis) e de IFN- γ (6,67; 0,20-364,41 nos não-plaquetopênicos vs. 11,40; 3,33-190,41 nos plaquetopênicos, mediana e IQR, respectivamente; $p=0,025$; teste de Kruskal-Wallis) foram significativamente maiores nos plaquetopênicos comparados com os pacientes que apresentaram contagens normais. Por outro lado, os níveis de TNF- α (6,74; 3,01-66,60 nos não-plaquetopênicos vs. 4,85; 1,51-15,86 nos plaquetopênicos, mediana e IQR, respectivamente; $p=0,013$; teste de Kruskal-Wallis) foram significativamente menores nos plaquetopênicos comparados com os pacientes que apresentaram contagens normais.

Da mesma maneira, como 36% dos indivíduos infectados apresentaram anemia (calculados com base na idade e sexo dos pacientes), investigou-se o perfil de citocinas circulantes em pacientes anêmicos (n=27) comparados com os pacientes que apresentaram níveis normais de hemoglobina (n=48). Apenas os níveis de TNF- α (5,03; 1,51-22,69 nos não-anêmicos vs. 6,98; 3,57-66,60 nos anêmicos, mediana e IQR, respectivamente; $p=0,014$; teste de Kruskal-Wallis) foram significativamente maiores nos anêmicos comparados com os pacientes que apresentaram níveis normais.

4.7 Citocinas e manifestações clínicas

Com relação ao índice clínico calculado, pela análise de componentes principais, para cada grupo de pacientes, conclui-se pela ausência de diferença significativa, na comparação entre as espécies, indicando que a intensidade das manifestações clínicas na malária entre os pacientes estudados não variam de acordo com a espécie de *Plasmodium* infectante (*P.vivax* (n=43) 0,9122; -5,583-5,264; *P.falciparum* (n=19) 1,123; -4,880-9,494 e infecções mistas (n=14) -1,041; -4,646-3,141; mediana e IQR (intervalo inter-quartil), respectivamente; $p=0,2960$; teste de Kruskal-Wallis) (Figura 26).

Figura 26: Índice clínico dos indivíduos infectados. *P. vivax*: n=43; *P. falciparum*: n=19; infecções mistas: n=14.

Quando relacionou-se o índice clínico calculado para os indivíduos infectados, independente da espécie do parasito, concluiu-se pela ausência de correlação com os níveis de citocinas circulantes, excetuando-se pelos níveis de IL-10 plasmáticos. Embora se pudesse supor que a correlação entre os níveis de IL-10 e o índice clínico fosse negativa, observou-se que a correlação foi positiva (Correlação de Spearman,

0,255; $p=0,027$; $n=75$), isto é, indivíduos que relataram apresentar mais sintomas foram aqueles que apresentaram maiores concentrações de IL-10 circulantes.

Da mesma maneira, relacionou-se os níveis de citocinas circulantes e o índice clínico dividindo-se os indivíduos por espécie de parasito. Não houve relação entre estes dois parâmetros para os indivíduos infectados por *P. vivax*, nem co-infectados por *P. vivax* e por *P. falciparum*. Apenas o índice clínico dos pacientes com malária *falciparum* foi relacionado negativamente com os níveis de IL-12 (Correlação de Spearman, - 0,604; $p=0,006$; $n=19$).

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 se 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 a doença, pareçam determinar a rapidez com que a imunidade se estabelece em áreas endêmicas, é o entendimento dos fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro, que dirigem a maquinaria imunológica, o ponto fundamental para a determinação de estratégias vacinais. Neste contexto, podem ser incluídas atualmente as células T reguladoras. Apesar dos estudos iniciais sugerirem que tais linfócitos exerçam atividade imunorregulatória em animais e humanos durante a fase aguda da infecção malárica, nada se sabe sobre o comportamento dessas populações celulares em indivíduos oriundos de regiões com baixo nível de endemicidade. Portanto, neste trabalho decidiu-se investigar o perfil de expansão desses linfócitos durante a malária *falciparum* e *vivax* e sua relação com a proporção e perfil de ativação de mDCs e pDCs.

5.1 Determinação da espécie de *Plasmodium* infectante

As espécies de *Plasmodium* que infectam o homem apresentam características biológicas marcantes. Por exemplo, enquanto *P. falciparum* infecta eritrócitos de todas as idades por meio de vias variadas, especialmente glicoforina A (Jaśkiewicz, 2007), *P. vivax* invade somente reticulócitos utilizando o receptor do antígeno Duffy como única via de penetração (Miller *et al.*, 1976). Além disso, enquanto *P. falciparum* possui a capacidade de mediar o seqüestro maciço de eritrócitos infectados nos capilares endoteliais exacerbando seu potencial de virulência, *P. vivax* não apresenta mesma habilidade (Sherman *et al.*, 2003.). Apesar do conhecimento restrito a respeito da influência dessas diferenças nos mecanismos imunológicos, torna-se fundamental

para os estudos de imunidade na malária a definição da espécie de *Plasmodium* infectante.

Neste estudo, utilizando a PCR como técnica de diagnóstico, observou-se que 56,6% da população encontrava-se parasitada por *P. vivax*, 25% por *P. falciparum* e 18,4% apresentavam infecção mista. Esse dado contrasta com o obtido pela microscopia, onde 100% das infecções foram causadas por uma única espécie do parasito. Além disso, a PCR detectou a presença do parasito em 11,8% de amostras definidas como negativas pela microscopia de gota espessa. Inúmeros estudos têm relatado a maior sensibilidade da PCR na detecção de baixas parasitemias (Brown *et al.*, 1992, Black *et al.*, 1994, Purnomo *et al.*, 1999), como também a ocorrência de infecção mista em proporções acima das evidenciadas à gota espessa, como demonstrados pelos estudos realizados com PCR na Tailândia (Tirasophon *et al.*, 1991), Venezuela (Morassin *et al.*, 2002) e Brasil (Cavasini *et al.*, 2000). Realmente, apesar da gota espessa ser considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da malária (Ávila, Ferreira, 2000), sobretudo por causa da sua elevada sensibilidade e especificidade, sua sensibilidade é dependente de vários fatores. Por exemplo, essa técnica exige material de boa qualidade e excelente treinamento técnico para o preparo e leitura da lâmina. Além disso, como características importantes das células parasitadas são perdidas durante o processo de coloração do esfregaço, em condições de baixa parasitemia a detecção e definição de infecções mistas podem tornar-se prejudicadas (Scopel *et al.*, 2004). Discute-se a baixa sensibilidade da técnica de gota espessa para o diagnóstico de baixas parasitemias (comum em portadores assintomáticos de plasmódio) e de infecções mistas (Lorenzetti *et al.*, 2008), o que mais uma vez, é confirmado no estudo atual.

5.2 Malária e parâmetros hematológicos

Apesar dos níveis de hemoglobina e do número absoluto de plaquetas estarem dentro dos padrões de referência para maioria dos indivíduos com malária aguda, observou-se que pelo menos 36% dos indivíduos infectados apresentaram-se levemente anêmicos (11,0; 6,5-12,9; mediana e intervalo inter-quartil,

respectivamente, somente para os indivíduos anêmicos, n=27, teste qui-quadrado) e 32% levemente plaquetopênicos (112000; 28000-144000; mediana e intervalo inter-quartil, respectivamente, somente para os indivíduos plaquetopênicos, n=24, teste χ^2). Realmente, outros trabalhos demonstram que anemia e plaquetopenia são as alterações hematológicas mais frequentes em pacientes com malária (Lacerda, 2007). Durante a infecção aguda, a anemia é causada pela combinação da hemólise das hemáceas infectadas no baço, rompimento maciço dos eritrócitos infectados e depressão da medula óssea devido a intensa produção de TNF- α (Mishra, Mohanty, 2001). A plaquetopenia é uma complicação freqüente na malária, com pouca repercussão clínica, mesmo entre pacientes com plaquetopenia grave. Acredita-se que seja causada pela liberação de megaplaquetas compensatórias, pelos megacariócitos, e pela maior ativação das plaquetas por formas sangüíneas do parasito. Embora não se saiba, exatamente, quais fatores levam a redução na contagem de plaquetas, sabe-se que tanto a plaquetopenia quanto a anemia estão diretamente relacionadas ao tempo decorrente da infecção (Lacerda, 2007). Isso pode explicar as reduzidas taxas de anemia e plaquetopenia entre os pacientes infectados já que no Brasil, o diagnóstico e tratamento da malária são realizados logo após o surgimento dos primeiros sintomas clínicos.

Além disso, foi observada neste estudo, uma queda significativa no número de leucócitos circulantes quando dados hematológicos provenientes de pacientes e controles expostos foram comparados. Apesar de outros trabalhos terem observado diferenças entre a contagem de células brancas de pacientes infectados por *P. falciparum* e por *P. vivax* (McKenzie *et al.*, 2005, Tangpukdee *et al.*, 2008), os resultados deste estudo, mostram que a redução de leucócitos foi independente da espécie de *Plasmodium*; apesar de mais expressiva em pacientes infectados por *vivax*. McKenzie *et al.* (2005) mencionam uma série de possíveis fatores que poderiam explicar o motivo pelo qual a contagem de glóbulos brancos durante a infecção por *P. falciparum* é menor do que aquela observada durante a malária *vivax*; a principal delas seria a capacidade de *P. falciparum* ocasionar quadros graves, aumentando o seqüestro dessas células nos gânglios linfáticos. No Brasil, devido a política de diagnóstico e tratamento rápido, indivíduos com malária *falciparum* raramente

evoluem para quadros graves. Isso poderia, portanto, explicar o fato de termos observado contagens semelhantes de glóbulos brancos nos dois grupos de pacientes estudados.

Comparando-se os indivíduos infectados por *P. vivax* durante a doença e a convalescença, observa-se que o número de plaquetas, leucócitos e níveis de hemoglobina apresentaram-se, majoritariamente, dentro da normalidade após a cura da doença. Após 28 dias do início do tratamento específico, a contagem de leucócitos elevou-se de 5.500 para 7.000 (medianas para fase aguda e fase convalescente, respectivamente). O número de plaquetopênicos e anêmicos foi reduzido de 5/22 na infecção aguda para 0/22 durante a convalescença e de 9/22 na fase aguda para 4/22 durante a convalescença, respectivamente. Estes achados indicam que as alterações hematológicas observadas são devidas a infecção malárica e se reestabelecem após a eliminação do parasito.

5.3 Células T reguladoras durante o episódio agudo de malária

A malária aguda induziu redução no número absoluto de linfócitos T, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ no sangue periférico quando os pacientes foram comparados com os indivíduos controles. Uma vez que o número absoluto destes linfócitos foi calculado a partir de dados de hemograma, estes achados podem ser atribuídos à leucopenia observada nos pacientes durante a infecção malárica. Apesar disso, avaliando-se apenas a população de células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, verifica-se que o percentual dessas células esteve aumentado durante a malária aguda; no entanto, este aumento não foi significativo quando os pacientes foram comparados com controles. Tem sido observado que pacientes naturalmente expostos à infecção por *P. falciparum* (Walther *et al.*, 2005; Brustoski *et al.*, 2006; Minigo *et al.*, 2009) ou *P. vivax* (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008) apresentam aumento no número de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Por outro lado, Walther e colaboradores, compararam a proporção de células T_{reg} em pacientes, convalescentes e controles saudáveis, e observaram que o número de células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ estiveram aumentados apenas durante a convalescença, em comparação com a doença aguda e

com os controles não infectados (Walther *et al.*, 2009). Uma possível explicação para o reduzido número absoluto de células T CD4+CD25+FOXP3+ na periferia seria a abordagem do indivíduo durante os primeiros ciclos sanguíneos do parasito, não havendo tempo suficiente para a completa expansão de T_{reg} na periferia, já que essa parece ser fortemente dependente da estimulação antigênica mediada pelas DC maduras na periferia (Janeway, Bottomly, 1994; Lenschow *et al.*, 1996; Steinman *et al.*, 2003). Além disso, foi sugerido recentemente que o número de células T_{reg} no sangue periférico declina, como resultado do sequestro das células T CD4+, para gânglios linfáticos ou outros órgãos, durante a infecção malárica aguda, e que as T_{reg} retornariam para a circulação depois da cura (Walther *et al.*, 2009).

Diante de evidências de que o CTLA-4, além de FOXP3, contribui ativamente para a atividade supressora da T_{reg} (Read *et al.*, 2000; Phan *et al.*, 2003; Blansfield, *et al.*, 2005; Maker *et al.*, 2005; Maker *et al.*, 2006) foi investigada, neste estudo, a proporção de células T_{reg} que expressam a molécula co-estimulatória CTLA-4. Curiosamente, foi observado que durante a malária aguda, independente da espécie do parasito, há uma significativa expansão de células CD4+CD25+FOXP3+CTLA-4+. Inicialmente, descreveu-se a importância do CTLA-4 como potente regulador negativo de respostas imunes celulares. Sabia-se que a ligação entre CTLA-4 e B7 (CD80 e CD86) tinha um efeito inibitório na ativação do linfócito T (Krummel, Allison, 1995; Marengere *et al.*, 1996). No entanto, o mecanismo inibitório não era conhecido. Na última década ficou evidenciado que a enzima indolamina-dioxigenase (IDO), presente em vários tecidos, mas encontrada particularmente em órgãos linfóides e na placenta, inibe células T auto-reativas. Neste contexto, Munn e colaboradores demonstraram que a expressão da IDO na placenta é responsável pela não rejeição do feto pelas células T maternas (Munn *et al.*, 1998). Ou seja, após o implante, células do embrião passariam a produzir IDO que atuaria como uma barreira, impedindo a migração das células T maternas da circulação ao tecido fetal. Em outro trabalho, Grohmann e colaboradores demonstraram que uma molécula híbrida de CTLA-4-imunoglobulina (CTLA-4-Ig) ativa células dendríticas via B7 e induz a expressão da IDO, com consequente catabolismo do triptofano. Mais ainda, CTLA-4-Ig, quando administrada *in vivo*, induzia tolerância imunológica a alo-

enxertos, que poderia ser prevenida com a administração concomitantemente do inibidor da IDO (Grohmann *et al.*, 2002). Estes resultados mostram que o engajamento do CTLA-4 não induz um sinal negativo para o linfócito T. Na realidade, o efeito negativo sobre a célula T é indireto e deve-se à expressão da IDO na célula dendrítica, que depleta triptofano e inibe o ciclo celular da célula T. Com isso, a expansão de células CD4+CD25+FOXP3+CTLA-4+, observada nos pacientes infectados por *Plasmodium*, pode não estar relacionada com a atividade supressora da T_{reg}.

Interessantemente, descobriu-se que o CTLA-4 é expresso em maior quantidade pelas células T CD4+ e CD8+ recentemente ativadas (Butty *et al.*, 2007). Em células não ativadas, o CTLA-4 localiza-se intracelularmente em vesículas semelhantes a lisossomos secretores, sendo, após a estimulação, transportado para a superfície celular (Gough *et al.*, 2005). Jago e colaboradores determinaram a cinética de regulação do CTLA-4 em vários subtipos de células T, incluindo as T não-ativadas, células T de memória, células T_{reg} CD4+CD25+ e células não-reguladoras, uma vez que a função do CTLA-4 está intimamente relacionada à sua expressão. Foi observado, então, que assim como o CTLA-4 expresso na superfície celular pode ser recrutado de estoques intracelulares, reservatórios pré-existentes poderiam ter um papel importante em sua expressão na superfície. Os resultados mostraram, ainda, que células T não ativadas possuem um reservatório intracelular pequeno, enquanto que as células T de memória possuem um reservatório maior de CTLA-4. Foram verificados também níveis intracelulares significantes dessa molécula em células CD4+CD25+, confirmando sua importância na atividade funcional desses tipos celulares. Isso sugere que os níveis intracelulares de CTLA-4 podem estar relacionados com o histórico de estímulos pelo qual a célula foi submetida (Jago *et al.* 2004). Relacionando-se os resultados do presente estudo, com as observações feitas Jago e colaboradores, supõem-se que a alta proporção de células CD4+CD25+FOXP3+CTLA-4+ observada durante a malária aguda está diretamente associada com o estado de ativação das células reguladoras, uma vez que a expressão de CTLA-4, nos indivíduos infectados, foi avaliada na superfície da células T CD4+CD25+FOXP3+.

5.4 Número e estado de ativação de DCs durante o episódio agudo de malária

Em relação ao perfil populacional de DCs no sangue periférico dos pacientes infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum*, foi observada uma redução no número absoluto de células dendríticas nesses pacientes em comparação aos controles expostos, sendo que essa redução foi mais expressiva em relação ao número de células dendríticas mielóides. Estes achados corroboram com os achados de Diallo e colaboradores, quando avaliaram mulheres grávidas infectadas por *P. falciparum* (Diallo *et al.*, 2008) e por Jangpatarapongsa e colaboradores, em um estudo com indivíduos infectados por *P. vivax* (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008). Uma hipótese para explicar a redução de DC na periferia é a realocação dessas células do sangue periférico para os órgãos linfóides. As pDCs estão distribuídas em diversos órgãos linfóides, mas em menor número do que as mielóides e foram originalmente identificadas como as maiores produtoras de IFN- α , β , desempenhando um papel na patogênese das infecções virais e bacterianas, como também na manutenção de tolerância periférica (Soumelis, Liu, 2006). As mDCs são as células dendríticas clássicas. Encontram-se distribuídas por todos os tecidos linfóides e em diversos tecidos do organismo principalmente cutâneo e mucoso, onde residem ainda na forma imatura (Keller, 2001).

Neste estudo, avaliou-se a expressão da molécula co-estimulatória CD86, um marcador de maturação das células dendríticas, com o intuito de avaliar se infecção por *Plasmodium* induz ativação ou supressão das DC como já descrito anteriormente (Coban *et al.*, 2002; Leisewitz *et al.*, 2004; Newman *et al.*, 2006; Sponaas *et al.*, 2006). A análise da proporção de células dendríticas ativadas (ou seja, que co-expressam CD86) demonstra diferenças ponderáveis entre pacientes infectados com diferentes espécies de parasitos. Os indivíduos com infecção por *P. falciparum* e com infecção mista apresentam grande proporção de suas mDC e pDCs ativadas, padrão semelhante ao observado nos controles expostos. Por outro lado, indivíduos infectados por *P. vivax* dividem-se claramente em dois grupos: com alta e baixa proporção de células dendríticas expressando CD86. Como o perfil de ativação foi visto igualmente nos indivíduos infectados por *falciparum*, com infecção mista e nos

controles expostos, acredita-se que este perfil ocorra independente da infecção malárica. No entanto, a análise criteriosa da população infectada por *P. vivax*, demonstra dois grupos de indivíduos cujas DCs apresentam distinto padrão de expressão CD86. Para explicar essa observação, vários fatores inerentes a população foram investigados tais como idade, tempo de exposição à malária ou a proporção de células CD4⁺ que co-expressam somente CD25 e FOXP3 como marcadores de fenótipo T regulador. Curiosamente, a única variável associada ao padrão observado de ativação das mDCs e das pDCs foi a expressão de CTLA-4 pelas células T_{reg}.

Se entre os indivíduos infectados por *P. vivax*, os que apresentaram em suas DCs uma baixa expressão de CD86 foram aqueles que possuíam células T_{reg} com baixa expressão de CTLA-4, acredita-se que a infecção por essa espécie de plasmódio, de alguma maneira, afete a maturação das DCs, como também a ativação das células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. A interação entre CTLA-4 e CD86 tem sido descrita (Sansom, 2000) como sendo fundamental para a perfeita interação entre T_{reg} e DC. Neste caso, novamente, avaliou-se essas populações celulares no sangue periférico e não se pode afirmar que, apesar da expressão de CTLA-4 e de CD86 ter sido diminuída, que a interação entre T_{reg} e DC foi prejudicada.

Neste estudo, houve diminuição da razão mDC:pDC, nos pacientes com malária *vivax* e infecções mistas, quando estes foram comparados aos controles expostos. Tem sido mostrado que as T_{reg} alteram o balanço entre a população de células dendríticas mielóides e plasmocitóides no sangue periférico, o que eventualmente determinaria o desenlace da resposta celular (Rissoan *et al.*, 1999). O aumento da razão mDC:pDC é associado com a ativação da via Th1, enquanto a diminuição da razão é associada com a ativação da via Th2 (Rissoan *et al.*, 1999, Kuwana, 2002). Como não foi observada uma expansão das células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, pode-se sugerir a ativação da via Th2, associada a diminuição da razão mDC:pDC. Realmente, o padrão de citocinas observado neste estudo, com predomínio de Th2, corrobora essa hipótese.

Torna-se fundamental especular o papel da carga parasitária apresentada pelos indivíduos infectados em relação ao percentual de T_{reg} circulantes e subpopulações de DCs já que alguns trabalhos demonstram nítida relação entre tais variáveis tanto

em modelos de malária de roedores como em estudos conduzidos em regiões com alto nível de endemicidade.

5.5 Avaliação das citocinas plasmáticas durante a infecção malárica e a convalescença

Descreve-se que nas infecções por *Plasmodium*, que o balanço entre citocinas pró- e anti- inflamatórias determina os níveis de anemia, carga parasitária, gravidade do quadro clínico e o desfecho final da infecção (Newton, Krishna, 1998, Doodoo *et al.*, 2002). Portanto, neste trabalho, foram avaliados os níveis plasmáticos de citocinas circulantes, dentre elas, TGF- β , IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α , em indivíduos infectados, convalescentes e controles. Ao contrário dos padrões de infecção observado em áreas de alto-transmissão na África, no Brasil, malária é observada com mais frequência em adultos, particularmente do sexo masculino. Isso se deve a sua frequente atividade rural, o que aumenta sua exposição às picadas infectantes de anofelinos (Camargo *et al.*, 1994, Duarte *et al.*, 2004).

Dentre as citocinas avaliadas, os pacientes infectados por *P. falciparum*, apresentaram altos níveis plasmáticos de IFN- γ , comparados com controles e com portadores de infecção mista. Apesar do baixo número de casos de malária grave no Brasil, estes dados confirmam os observados em outros estudos onde a elevação nos níveis de IFN- γ esteve associado com complicações na malária *falciparum* (Al- Yaman *et al.*, 1998, Day *et al.*, 1999). IFN- γ é uma citocina pró- inflamatória, de importância clínica, liberada pelas células T, atuando como um importante fator na ativação dos macrófagos durante a resposta imune à malária (Druilhe *et al.*, 1982).

Indivíduos infectados por *Plasmodium*, independente da espécie, apresentaram níveis elevados de TNF- α . O papel dessa citocina tem sido extensamente estudado no controle da infecção malárica. Aparentemente associa-se com grau de patogenicidade, intensa cefaléia, incluindo hiperparasitemia, anemia grave e malária complicada por *P. falciparum* (Shaffer *et al.*, 1991). Fatores relacionados ao parasito, por exemplo, produtos solúveis (particularmente glicosilfosfatidilinositol ou GPI) liberados ao final da esquizogonia, também têm mostrado influência na produção de

TNF- α (Karunaweera *et al.*, 1992). Em um estudo realizado no Brasil, observaram-se, elevados níveis de TNF- α no plasma de pacientes com malária *vivax* e *falciparum*, sendo que níveis mais elevados foram observados nas infecções por *P. falciparum* (Fernandes *et al.*, 2008). Neste estudo, além de observações a respeito de infecções por *P. falciparum* ou *P. vivax*, foi observado que indivíduos com infecção mista também tiveram elevação nos níveis de TNF- α . Mshana e colaboradores, estudando o papel das citocinas na patogênese da malária *falciparum* numa população de adultos e crianças do Gabão (África), encontraram concentrações plasmáticas de TNF- α e IFN- γ significativamente maiores nos indivíduos parasitêmicos febris do que nos parasitêmicos afebris (Mshana *et al.*, 1991). Febre e cefaléia foram os sintomas mais prevalentes em nosso estudo, fato justificado pelos elevados níveis plasmáticos de IFN- γ e TNF- α observados.

Pacientes com *P. vivax* e *P. falciparum* exibiram altos níveis plasmáticos de IL-10 quando comparados com controles expostos. Resultados similares têm sido reportados nas infecções *P. vivax* e *P. falciparum* (Yeom *et al.*, 2003, Wroczynska *et al.*, 2005, Prakash *et al.*, 2006, Jangpatarapongsa *et al.*, 2008). A IL-10 tem sido sugerida como capaz de inibir a resposta imune pró-inflamatória (Ho *et al.*, 1998) e tem um importante papel na imunorregulação, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (predominantemente TNF- α , IL-6 e IL-12) (Pestka *et al.*, 2004). Uma vez que houve correlação positiva entre IL-10, IL-12 e IFN- γ e negativa com TGF- β , sugere-se que a IL-10 esteja atuando na regulação do processo inflamatório, inibindo a patogenia durante a infecção malárica. Realmente, percebe-se que os níveis de IL-10 estiveram aumentados quando os níveis das citocinas pró-inflamatórias mostraram-se elevados. Este achado aponta um papel importante para a IL-10 na regulação da doença.

Quando foram comparados os níveis de citocinas dos indivíduos infectados por *P. vivax* durante a fase aguda e a convalescença, observou-se que os níveis de IL-4 circulantes foram significativamente maiores durante a convalescença comparados com os níveis dessa citocina durante a malária aguda por *P. vivax*. Por outro lado, os níveis de IL-12, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram significativamente maiores durante a fase aguda quando comparados com os convalescentes. Estes resultados concordam com os

observados por Walther e colaboradores, que avaliaram pacientes com malária complicada e não-complicada durante a fase aguda e a convalescença (Walther *et al.*, 2009), demonstrando que os níveis de citocinas elevaram-se durante a infecção e se reestabeleceram após a cura da doença.

Como o balanço entre citocinas anti e pró-inflamatórias tem se mostrado relevante durante o curso clínico da infecção malárica, principalmente no que se refere à presença de anemia durante a doença (Jain *et al.*, 2010), foi calculada a razão entre as concentrações de IL-10 e TNF- α entre indivíduos infectados, bem como entre infectados e controles. Observa-se que indivíduos com malária *vivax* apresentam um comportamento particular no balanço entre essas citocinas com relação aos demais grupos. Este achado é facilmente explicado pelo fato de grupo infectado por *P.vivax* apresentar os níveis mais elevados de IL-10. Com relação a anemia, alguns estudos vem sugerindo que diminuição da razão de IL-10/TNF- α está associada com anemia grave na malária (Kurtzhals *et al.*, 1998; Othoro *et al.*, 1999). Interessantemente, o grupo de pacientes infectados por *P. vivax* foi o que apresentou menor percentual de anêmicos. Além disso, observou-se que o TNF- α foi a única citocina que esteve aumentada nos indivíduos anêmicos. Aumento nos níveis de TNF- α , resultaria em diminuição da razão IL-10/TNF- α que vem sendo associada com a anemia. De fato, tem-se destacado o papel do TNF- α no desenvolvimento de anemia durante a malária *falciparum* (Kurtzhals *et al.*, 1998).

Apesar das evidências sobre o papel de IL-10 na expansão de células T_{reg} (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008; Minigo *et al.*, 2009), neste estudo a correlação encontrada entre tais variáveis no grupo de indivíduos infectados é negativa, ou seja, quanto mais alta é a concentração desta citocina menor é o número absoluto de células T_{reg} circulantes. Isso sugere que a IL-10 circulante não é produzida majoritariamente por T_{reg} presentes no sangue periférico. Realmente, Walther e colaboradores demonstraram que as células T CD4⁺ CD45RO⁺, e não as T_{reg}, são as principais fontes de IL-10 durante a malária aguda (Walther *et al.*, 2009). O número absoluto de DCs nos infectados foi correlacionado negativamente com os níveis de IL-10, ou seja, IL-10 parece atuar diminuindo a população de células dendríticas no sangue periférico. Existem evidências de que a IL-10 poderia afetar a maturação de

células dendríticas (Steinbrink *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2002). Neste caso, concordando-se com essas evidências, a redução de DC na periferia pela realocação dessas células do sangue periférico, em resposta ao estímulo de maturação torna-se errôneo e assim a diminuição da população durante a fase aguda poderia ser explicada por indução de apoptose de DCs, por exemplo. Todavia, a hipótese mais aceita é que a diminuição no número de DCs observadas durante a fase aguda seja explicada, pela maturação e realocação dessas células.

Uma vez que a liberação de citocinas durante uma resposta inflamatória aguda contribui para a plaquetopenia, investigou-se perfil de citocinas circulantes em pacientes plaquetopênicos comparados com os pacientes que apresentaram contagens normais de plaquetas. Observou-se que os níveis de IL-12, IL-10 e de IFN- γ foram significativamente maiores nos plaquetopênicos. Por outro lado, os níveis de TNF- α foram significativamente maiores nos pacientes que apresentaram contagens normais. TNF- α tem sido associado com o consumo de plaquetas em camundongos (Tacchini-Cottier *et al.*, 1998). A administração de baixas doses de IL-10 recombinante diminuiu a produção de plaquetas em voluntários saudáveis (Sosman *et al.*, 2000). Casals-Pascual e colaboradores compararam os níveis de citocinas circulantes em crianças infectadas por *P. falciparum* plaquetopênicos e não-plaquetopênicos e observaram elevados níveis de IL-10 e IL-12 plasmáticos nos plaquetopênicos (Casals-Pascual *et al.*, 2006). Em outro estudo, comparando pacientes infectados por *P. vivax* plaquetopênicos e com contagens normais foram observados níveis elevados de citocinas circulantes - principalmente de IL-1, IL-6, IL-10 e TGF- β -nos indivíduos plaquetopênicos (Park *et al.*, 2003).

5.6 Citocinas e manifestações clínicas

Uma das preocupações durante a análise de resultados deste estudo, principalmente no que se referia a quantificação dos níveis de citocinas plasmáticas circulantes era se as manifestações clínicas entre os indivíduos infectados por *P. vivax*, *P. falciparum* ou pelas duas espécies poderiam manifestar sintomas clínicos distintos com níveis de intensidade variados. Considerando-se que a espécie do

parasito envolvida na infecção pode ser um dos moduladores dessas manifestações desenvolveu-se um sistema para quantificar a intensidade da doença clínica com base no relato dos pacientes no momento da coleta das amostras. Com relação ao escore clínico calculado para cada grupo de pacientes, concluiu-se pela ausência de diferença significativa na comparação entre as espécies. Essas observações corroboram os estudos de Ladeia-Andrade, avaliando indivíduos infectados por *P. vivax* e *P. falciparum* no Parque Nacional do Jaú, Amazonas (Ladeia-Andrade, 2005). Karunaweera e colaboradores, observaram *scores* de intensidade de sintomas mais baixos nos pacientes infectados por *P. vivax* procedentes de área endêmica quando comparados com os de região não-endêmicas, sugerindo que a redução de intensidade de sintomas em áreas endêmicas pode ser devida a imunidade adquirida contra os estágios sangüíneos do parasito (Karunaweera *et al.*, 1998). De fato, os resultados deste estudo sugerem que *P. falciparum* e *P. vivax* induzem semelhantes manifestações clínicas quando compara-se indivíduos com malária não-complicada na mesma região demográfica.

Acreditava-se que os níveis de citocinas circulantes estariam relacionados com as manifestações clínicas da malária, uma vez que concentrações plasmáticas, por exemplo, de TNF- α e IFN- γ são significativamente maiores nos indivíduos parasitêmicos febris do que nos parasitêmicos afebris (Mshana *et al.*, 1991). No entanto, quando relacionou-se o índice clínico calculado para os indivíduos infectados, independente da espécie do parasito, houve ausência de correlação com os níveis de citocinas circulantes, excetuando-se pelos níveis de IL-10 plasmáticos. Embora se pudesse supor que a correlação entre os níveis de IL-10 e o índice clínico fosse negativa, observou-se que a correlação foi positiva, isto é, indivíduos que relataram apresentar mais sintomas foram aqueles que apresentaram maiores níveis de IL-10 circulantes. Estes resultados somados as observações de que os níveis de IL-10 estiveram aumentados quando os níveis das citocinas pró-inflamatórias mostraram-se elevados, indicam que o excesso dessa citocina, com o intuito de controlar a resposta inflamatória, possa estar inibindo a via Th1 e favorecendo o parasito, como resultado da imunossupressão mediada pelo aumento nos níveis dessas citocinas nos indivíduos infectados, e ocasionado as manifestações clínicas.

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. Na população de estudo, independentemente da espécie de parasito infectante, somente o percentual de células T_{reg} CD4+CD25+FOXP3+ co-expressando CTLA-4+ esteve aumentado durante a malária aguda, sugerindo seu possível papel na ativação desses linfócitos;
2. A redução no número absoluto de células dendríticas observada durante a fase aguda da infecção foi independente da espécie de parasito infectante e parece não ser modulada pelas células T_{reg} .
3. Pacientes infectados por *P. vivax* apresentaram em suas células dendríticas um perfil diferenciado de maturação que foi correlacionado com a expressão de CTLA-4 pelas células T_{reg} .
4. A diminuição da razão mDC:pDC, nos pacientes com malária *vivax* e infecções mistas, foi associada previamente com a ativação da via Th2. Os níveis de citocinas plasmáticas circulantes corroboram essa associação.
5. Níveis elevados de TNF- α foram observados nos indivíduos infectados por *Plasmodium*, independente da espécie. Da mesma maneira, os níveis de IL-10 estiveram aumentados durante a malária aguda, principalmente na malária *vivax*. Por outro lado, altos níveis de IFN- γ foram observados nos pacientes infectados por *falciparum*. Os níveis elevados de citocinas circulantes observados durante a infecção, se reestabeleram após a cura da doença.
6. A IL-10 circulante parece não ser produzida majoritariamente por T_{reg} presentes no sangue periférico, uma vez que a associação entre essas variáveis foi negativa. No entanto, essa citocina parece atuar diminuindo a população de células dendríticas no sangue periférico.

7. Não houve associação entre a espécie do parasito infectante e o índice clínico calculado para cada grupo de pacientes, sugerindo que o *P. falciparum* e o *P. vivax* induzem semelhantes manifestações clínicas, quando se comparam indivíduos com malária não-complicada na mesma região endêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WY, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol*. 2004;78:2454-9.
- Al-Yaman FM, Genton B, Clark IA. The ratio of reactive nitrogen intermediates to tumour necrosis factor and clinical outcome of *falciparum* malaria disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998;92:417-20.
- 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.
- Andersson J, Boasso A, Nilsson J, Zhang R, Shire NJ, Lindback S, Shearer GM, Chougnet CA. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol*. 2005;174:3143-7.
- Antons AK, Wang R, Kalams SA, Unutmaz D. Suppression of HIV-specific and allogeneic T cell activation by human regulatory T cells is dependent on the strength of signals. *PLoS ONE*. 2008;3:e2952.
- Apoil PA, Puissant B, Roubinet F, Abbal M, Massip P, Blancher A. FOXP3 mRNA levels are decreased in peripheral blood CD4+ lymphocytes from HIV-positive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;39:381-5.
- Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*. 2002;3:756-63.
- Avila SLM, Ferreira AW. Na appraisal of laboratory method addressing rolls back malaria. *Ciência e Cultura*. 2000;52:220-8.
- Bach, JF. Organ-specific autoimmunity. *Immunol Today*. 1995;16:353-5.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-52.
- Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J Immunol*. 2006;176:5374-87.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002;420:502-7.

Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*. 2005;6:353-60.

Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:551-89.

Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:875-88.

Black J, Hommel M, Snounou G, Pinder M. Mixed infections with *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* and fever in malaria. *Lancet*. 1994;343:1095.

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.

Boasso A, Vaccari M, Hryniewicz A, Fuchs D, Nacsa J, Cecchinato V, Andersson J, Franchini G, Shearer GM, Chougnet C. Regulatory T-cell markers, indoleamine 2,3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2007;81:11593-603.

Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, Drapeau CM, Rocchi G, Bergamini A. Increased hepatitis C virus (HCV)- specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol*. 2006;144:188-96.

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.

Brasseur PH, Agrapart M, Ballet JJ, Bruilhe P, Warrel MJ, Tharavanij S. Impaired cell-mediated immunity to *Plasmodium falciparum* infected patients with high parasitemias and cerebral malaria. *Clin Immunol Immunopathol*. 1983;27:38-50.

Briere F, Bendriss-Vermare N, Delale T, Burg S, Corbet C, Rissoan MC, Chaperot L, Plumas J, Jacob MC, Trinchieri G, Bates EE. Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol*. 2002;63:1081-93.

Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86:609-12.

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.

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.

Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. Hepatology. 2004;40:1062–71.

Camargo LM, Ferreira MU, Krieger H, de Camargo EP, da Silva LP. Unstable hypoendemic malaria in Rondonia (western Amazon region, Brazil): epidemic outbreaks and work-associated incidence in an agro-industrial rural settlement. Am J Trop Med Hyg. 1994;51:16–25.

Cambos M, Belanger B, Jacques A, Roulet A, Scorza T. Natural regulatory (CD4(+)CD25(+)FOXP(+)) 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.

Casals-Pascual C, Kai O, Newton CR, Peshu N, Roberts DJ. Thrombocytopenia in *falciparum* malaria is associated with high concentrations of IL-10. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:434-6.

Cavasini MT, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondonia, western Brazilian Amazon? Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33:489-92.

Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. Eur J Immunol. 2000;30:1538-43.

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, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. Clin Immunol. 2007;123:50–9.

Cirrinzione C, Pimpinelli N, Orlando L, Romagnoli P. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. J Periodontol. 2002;73: 45-52.

Coban C, Ishii KJ, Sullivan DJ, Kumar N. Purified malaria pigment (hemozoin) enhances dendritic cell maturation and modulates the isotype of antibodies induced by a DNA vaccine. *Infect Immun*. 2002;70:3939-43.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:89195.

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.

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.

Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, Mai NT, Phu NH, Sinh DX, White NJ, Ho M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis*. 1999;180:1288-97.

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.

Diallo M, Aldebert D, Moreau JC, Ndiaye M, Jambou R. Decrease of lymphoid dendritic cells in blood from malaria-infected pregnant women. *Int J Parasitol*. 2008;38:1557-65.

Dieckman P, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. *Ex-vivo* isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193:1303-10.

Dodoo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2002;185:971-9.

Druilhe P, Rhodes-Feuillette A, Canivet M, Gentilini M, Periès J. Circulating interferon in patients with *Plasmodium falciparum*, *P. ovale* and *P. vivax* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1982;76:422-3.

Duarte EC, Gyorkos TW, Pang L, Abrahamowicz M. Epidemiology of malaria in a hypoendemic Brazilian Amazon migrant population: a cohort study. Am J Trop Med Hyg. 2004;70:229-37.

Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol. 2000;165:6037-46.

Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, Mugenyi P, Cao H. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. J Immunol. 2005;174:4407-14.

Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, Troger H, Maul J, Moos V, Berg E, Ullrich R, Schulzke JD, Stein H, Duchmann R, Zeitz M, Schneider T. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. Blood. 2006;108:3072-8.

Feng IC, Koay LB, Sheu MJ, Kuo HT, Sun CS, Lee C, Chuang WL, Liao SK, Wang SL, Tang LY, Cheng CJ, Tsai SL. HBcAg-specific CD4+CD25+ regulatory T cells modulate immune tolerance and acute exacerbation on the natural history of chronic hepatitis B virus infection. J Biomed Sci. 2007;14:43-57.

Fernandes AAM, Carvalho LJM, Zanini GM, Ventura AMRS, 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 Vac Immunol. 2008;15:650-8.

Filmer D, Pritchett LH. Estimating wealth effects without expenditure data-or tear: an application to educational enrolments in states of India. Demography. 2001;38:115-32.

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

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

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.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*. *Nat Immunol.* 2002;3:1097-101.

Harris PR, Wright SW, Serrano C, Riera F, Duarte I, Torres J, Peña A, Rollán A, Viviani P, Guiraldes E, Schmitz JM, Lorenz RG, Novak L, Smythies LE, Smith PD. *Helicobacter pylori* gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology.* 2008;134:491-9.

Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 1997;90:3245-87.

Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:233-42.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol.* 2004;172:3157-66.

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;180:2496-503.

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, Schollaardt T, Snape S, Looareesuwan S, Suntharasamai P, White NJ. Endogenous interleukin-10 modulates proinflammatory response in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 1998;178:520-5.

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.

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

Hoffmann WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation - concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. Am J Public Health. 1934;9:281-98.

Hryniewicz A, Boasso A, Edghill-Smith Y, Vaccari M, Fuchs D, Venzon D, Nacsa J, Betts MR, Tsai WP, Heraud JM, Beer B, Blanset D, Chougnet C, Lowy I, Shearer GM, Franchini G. CTLA-4 blockade decreases TGF- β , IDO, and viral RNA expression in tissues of SIVmac251-infected macaques. Blood. 2006;108:3834-42.

Hviid L. Peripheral T-cell non-responsiveness in individuals exposed to *Plasmodium falciparum* malaria. APMIS Suppl. 1995;103:17-28.

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.

Jain V, Singh PP, Silawat N, Patel R, Saxena A, Bharti PK, Shukla M, Biswas S, Singh N. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. Acta Trop. 2010;113:263-8.

Janeway CA Jr, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. Cell. 1994;76:275-85.

Jangpatrapongsa 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.

Jaśkiewicz E. Glycophorins of human erythrocytes as receptors for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2007;61:718-24.

Joshi A, Vahlenkamp TW, Garg H, Tompkins WA, Tompkins MB. Preferential replication of FIV in activated CD4+CD25+ T cells independent of cellular proliferation. Virology. 2004;321:307-22.

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. J Exp Med. 2001;194:863-9.

Kandulski A, Wex T, Kuester D, Peitz U, Gebert I, Roessner A, Malfertheiner P. Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25^{high}, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher *H. pylori* colonization and increased gene expression of TGF- β 1. *Helicobacter*. 2008;13:295–303.

Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Kwiatkowski D, Del Giudice G, Mendis KN. Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. *Clin Exp Immunol*. 1992;88:499-505.

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.

Keller R. Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunol Lett*. 2001;78:113-22.

Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, Planta M, McGlaughlin M, Jackson R, Ziegler SF, Fauci AS. CD25+CD4+ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4+ and CD8+ HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med*. 2004;200:331–43.

Kinter AL, Horak R, Sion M, Riggin L, McNally J, Lin Y, Jackson R, O'shea A, Roby G, Kovacs C, Connors M, Migueles SA, Fauci AS. CD25+ regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8+ T cells in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23:438–50.

Kornfeld C, Ploquin MJ, Pandrea I, Faye A, Onanga R, Apetrei C, Poaty-Mavoungou V, Rouquet P, Estaquier J, Mortara L, Desoutter JF, Butor C, Le Grand R, Roques P, Simon F, Barré-Sinoussi F, Diop OM, Müller-Trutwin MC. Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. *J Clin Invest*. 2005;115:1082–91.

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.

Kurtzhals JA, Reimert CM, Tette E, Dunyo SK, Koram KA, Akanmori BD, Nkrumah FK, Hviid L. Increased eosinophil activity in acute *Plasmodium falciparum* infection--association with cerebral malaria. *Clin Exp Immunol*. 1998;112:303-7.

Kuwana, M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol*. 2002;63:1156-63.

Lacerda, MVG. Manifestações clínicas e patológicas da plaquetopenia na malária. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.

Ladeia- Andrade, S. Aspectos epidemiológicos da malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

Lange C, Dürr D, Doster H, Melms A, Bischof F. Dendritic cell-regulatory T-cell interactions control self-directed immunity. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85:575-81.

Leisewitz AL, Rockett KA, Gumede B, Jones M, Urban B, Kwiatkowski DP. Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection. *Infect Immun.* 2004;72:4233-9.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:233-58.

Li S, Jones KL, Woollard DJ, Dromey J, Paukovics G, Plebanski M, Gowans EJ. Defining target antigens for CD25+FOXP3+IFN- γ - regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:197-204.

Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2005;175:4180-3.

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.

Lorenzetti A, Fornazari PA, Bonini-Domingos AC, Souza Rodrigues Penhalbel R, Fugikaha E, Bonini-Domingos CR, Fraga VD, Conceição LM, Rossit AR, Cavasini CE, Couto VS, Machado RL. Mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. *Acta Trop.* 2008;107:8-12.

Lu L, Werneck MB, Cantor H. The immunoregulatory effects of Qa-1. *Immunol Rev.* 2006;212:51-9.

Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, Svennerholm AM, Lundin BS. *Helicobacter pylori*-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T -cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect Immun.* 2003;71:1755-62.

Luty AJ, Ulbert S, Lell B, Lehman L, Schmidt-Ott R, Luckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Dubois B, Deloron P, Kremsner PG. Antibody responses to *Plasmodium falciparum*: evolution according to the severity of a prior clinical episode and association with subsequent reinfection. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62:566-72.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100:4512-20.

Mackinnon MJ, Gunawardena DM, Rajakaruna J, Weerasingha S, Mendis KN, Carter R. Quantifying genetic and nongenetic contributions to malarial infection in a Sri Lankan population. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:12661-6.

Maizels RM. Infections and allergy: helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:656-61.

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.

Mckee AS, Pearce EJ. CD4+CD25+ cells contribute to TH2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol*. 2004;173:1224-31.

McKenzie FE, Prudhomme WA, Magill AJ, Forney JR, Permpanich B, Lucas C, Gasser RA Jr, Wongsrichanalai C. White blood cell counts and malaria. *J Infect Dis*. 2005;192:323-30.

McLellan AD, Kämpgen E. Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells. *Immunol Lett*. 2000; 72:101-5.

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

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976;295:302-4.

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.

Ministério da Saúde (MS), 2005. Disponível em: http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/TAB99449:tab_resumo_n?Ano_n=2005. Acessado em 09.12.2009.

Ministério da Saúde (MS), 2010. Disponível em: http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria/TAB99449:tab_resumo_n?Ano_n=2010. Acessado em 05.10.2009.

Mishra SK, Mohanty S. Clinical presentations of severe and complicated malaria in Índia. J Ind Acad Clin Med. 2001;2:125-7.

Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. Trends Mol Med. 2007;13:108-16.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. Immunity. 2002;16:219-30.

Morassin B, Fabre R, Berry A, Magnaval JF. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. Am J Trop Med Hyg. 2002;66:503-8.

Mshana RN, Boulandi J, Mayombo J, Mendome G. *In vitro* lymphoproliferative responses to malaria antigens: a prospective study of residents of a holoendemic area with perennial malaria transmission. Parasite Immunol. 1993;15:35-45.

Mshana RN, Boulandi J, Mshana NM, Mayombo J, Mendome G. Cytokines in the pathogenesis of malaria: levels of IL-1b, IL-4, IL-6, TNF and IFN γ in plasma of healthy individuals and malaria patients in a holoendemic area. J Clin Lab Immunol. 1991;34:131-9.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science. 1998;281:1191-3.

Newman KC, Korbel DS, Hafalla JC, Riley EM. Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer cell interferon-gamma responses to malaria. PLoS Pathog. 2006;2:e118.

Newton CR, Krishna S. Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. Pharmacol Ther. 1998;79:1-53.

Ni Choileain N, Redmond HP. Regulatory T-cells and autoimmunity. J Surg Res. 2006;130: 124-35.

- Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, Shearer GM, Andersson J, Chougnet C. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*. 2006;108:3808-17.
- 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.
- Orengo, JM, Wong, KA, Ocaña-Morgner, C, Rodriguez, A. A *Plasmodium yoelii* soluble factor inhibits the phenotypic maturation of dendritic cells. *Malar J*. 2008;7:254.
- Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, Leelawong M, Sundrud MS, Haas DW, Unutmaz D. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biol*. 2004;2:E198.
- Othoro C, Lal AA, Nahlen B, Koech D, Orago AS, Udhayakumar V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. *J Infect Dis*. 1999;179:279-82.
- Palmer CJ, Makler M, Klaskala WI, Lindo JF, Baum MK, Ager AL. Increased prevalence of *Plasmodium falciparum* malaria in Honduras, Central America. *Rev Panam Salud Publica*. 1998;4:40-2.
- Papiernik M, Leite-de-Moraes MC, Pontoux C, Joret AM, Rocha B, Penit C, Dy M. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J Immunol*. 1997;158:4642-53.
- Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S, Youn, J. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25+ T cells. *Int Immunol*. 2004;16:1203-13.
- Park JW, Park SH, Yeom JS, Huh AJ, Cho YK, Ahn JY, Min GS, Song GY, Kim YA, Ahn SY, Woo SY, Lee BE, Ha EH, Han HS, Yoo K, Seoh JY. Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without thrombocytopenia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97:339-44.
- Pearson CI, McDevitt HO. Redirecting Th1 and Th2 responses in autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;238:79-122.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 2004;202:8-32.

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.

Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells. *J Immunol*. 2001;167:1137-40.

Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H, Maloy K. Control of immune pathology by regulatory cells. *Novartis Found Symp*. 2003;202:92-8.

Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, Pied S. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis*. 2006;194:198-207.

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

Purnomo AS, Gomez-Saladin E, Bangs MJ. Rare quadruple malaria infection in Irian Jaya Indonesia. *J Parasitol*. 1999;85:574-9.

Qin S, Sui Y, Soloff AC, Junecko BA, Kirschner DE, Murphey-Corb MA, Watkins SC, Tarwater PM, Pease JE, Barratt-Boyes SM, Reinhart TA. Chemokine and cytokine mediated loss of regulatory T cells in lymph nodes during pathogenic simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol*. 2008;180:5530-6.

Raghavan S, Suri-Payer E, Holmgren J. Antigen-specific *in vitro* suppression of murine *Helicobacter pylori*-reactive immunopathological T cells by CD4CD25 regulatory T cells. *Scand J Immunol*. 2004;60:82-8.

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.

Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2001;13:644-9.

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, Jobe O, Blackman M, Whittle HC, Greenwood BM. *Plasmodium falciparum* schizont sonic extracts suppress lymphoproliferative responses to mitogens and antigens in malaria-immune adults. *Infect Immun*. 1989;57:3181-8.

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

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999;283:1183-6.

Roberts T, Beyers N, Aguirre A, Walzl G. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- γ production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- β , and interleukin-4 mRNA levels. *J Infect Dis.* 2007;195:870-8.

Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2005;175:1373-81.

Rouse BT, Suvas S. Tregulatory cells and infectious agents: détente cordiale and contraire. *J Immunol.* 2004;173:2211-15.

Rushbrook SM, Hoare M, Alexander GJ. T-regulatory lymphocytes and chronic viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7:1689-703.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151-64.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000;101:455-8.

San Sebastian M, Jativa R, Goicolea I. Epidemiology of malaria in the Amazon basin of Ecuador. *Rev Panam Salud Publica.* 2000;7:24-8.

Sansom, DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology.* 2000;101:169-77.

Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M. *Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25^{hi}Foxp3^{hi} CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGF β . *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000543.

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.

- Shaffer N, Grau GE, Hedberg K, Davachi F, Lyamba B, Hightower AW, Breman JG, Phuc ND. Tumor necrosis factor and severe malaria. *J Infect Dis.* 1991;163:96-101.
- Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Delovitch TL. Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells. *J Mol Med.* 2002;80:290-300.
- Sharma VP. Current scenario of malaria in India. *Parassitologia.* 1999;41:349-53.
- Sherman IW, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect.* 2003;5:897-909.
- 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.
- Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T cell activation by CD4 CD25 suppressor T cells. *Immunol Rev.* 2001;182:58-67.
- Shevach, E. Certified professionals: CD4+CD25+ suppressor T cells. *J Exp Med.* 2001;193:41-6.
- Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Reddy TR, Boros DL. Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Immunology.* 2005;114:410-7.
- Sosman JA, Verma A, Moss S, Sorokin P, Blend M, Bradlow B, Chachlani N, Cutler D, Sabo R, Nelson M, Bruno E, Gustin D, Viana M, Hoffman R. Interleukin 10-induced thrombocytopenia in normal healthy adult volunteers: evidence for decreased platelet production. *Br J Haematol.* 2000;111:104-11.
- Soumelis V, Liu YJ. From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol.* 2006;36:2286-92.
- Sponaas AM, Cadman ET, Voisine C, Harrison V, Boonstra A, O'Garra A, Langhorne J. Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. *J Exp Med.* 2006;203:1427-33.
- Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159:4772-80.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96.

Stoop JN, Van der Molen RG, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology.* 2007;361:141-8.

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.

Suvas S, Azkur AK, Kim BS, Kumaraguru U, Rouse BT. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol.* 2004;172:4123-32.

Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4+CD25+ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol.* 2001;31:1122-31.

Tacchini-Cottier F, Vesin C, Redard M, Buurman W, Piguet PF. Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice. *J Immunol.* 1998;160:6182-6.

Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med.* 2006;203:505-11.

Takahashi K, Asagoe K, Zaishun J, Yanai H, Yoshino T, Hayashi K, Akagi T. Heterogeneity of dendritic cells in human superficial lymph node: *in vitro* maturation of immature dendritic cells into mature or activated interdigitating reticulum cells. *Am J Pathol.* 1998;153:745-55.

Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, Santamaria P, Locksley RM, Krummel MF, Bluestone JA. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol.* 2006;7:83-92.

Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004;34:2996-3005.

Tangpukdee N, Yew HS, Krudsood S, Punyapradit N, Somwong W, Looareesuwan S, Kano S, Wilairatana P. Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. *Parasitol Int.* 2008;57:490-4.

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J Immunol.* 2006;176:5839-47.

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.

Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cells suppressor function. *J Immunol.* 2004;172:6519-23.

Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen non-specific. *J Immunol.* 2000;164:183-90.

Thornton AM. T regulatory cells. *Curr Biol.* 2005;15:R582.

Tirasophon W, Ponglikitmongkol M, Wilairat P, Boonsaeng V, Panyim S. A novel detection of a single *Plasmodium falciparum* in infected blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175:179-84.

Torcia MG, Santarlasci V, Cosmi L, Clemente A, Maggi E, Mangano VD, Verra F, Bancone G, Nebie I, Sirima BS, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Severini C, Sannella AR, Bonini P, Lucibello M, Maggi E, Garaci E, Coluzzi M, Cozzolino F, Annunziato F, Romagnani S, Modiano D. Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:646-51.

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.

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.

Tsunemi S, Iwasaki T, Imado T, Higasa S, Kakishita Shirasaka T Sano H. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *AIDS.* 2005;19:879-86.

Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, Roberts DJ. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature.* 1999;400:25-6.

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

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.

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.

Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005;6:338-44.

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.

Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS, Kojima S, Ishii A, Kawamoto F. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. *Trop Med Int Health*. 2002;7:231-9.

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.

World Health Organization (WHO). World malaria report- WHO, 2008. Disponível em:

http://www.who.int/pmnch/topics/add_publications/2008_worldmalariarep/en/
Acessado em 08.01.2010.

World Health Organization (WHO). World Malaria Situation in 2005. Disponível em: www.who.int/topics/malaria/en/ Acessado em 05.10.2009.

Wroczyńska A, Nahorski W, Bakowska A, Pietkiewicz H. Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease. *Int Marit Health*. 2005;56:103-14.

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.

Wykes MN, Liu XQ, Beattie L, Stanisic DI, Stacey KJ, Smyth MJ, Thomas R, Good MF. *Plasmodium* strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. *PLoS Pathog*. 2007;3:e96.

Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol*. 2006;177:739-47.

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.

Yang G, Liu A, Xie Q, Guo TB, Wan B, Zhou B, Zhang JZ. Association of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B. *Int Immunol*. 2007;19:133-40.

Yeom JS, Park SH, Ryu SH, Park HK, Woo SY, Ha EH, Lee BE, Yoo K, Lee JH, Kim KH, Kim S, Kim YA, Ahn SY, Oh S, Park HJ, Min GS, Seoh JY, Park JW. Serum cytokine profiles in patients with *Plasmodium vivax* malaria: a comparison between those who presented with and without hepatic dysfunction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97:687-91.

Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 2006;107:3925-31.