

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA
PROTEÍNA CIRCUNSPOROZOÍTA SOBRE A CARGA
PARASITÁRIA E A RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS
INFECTADOS COM *Plasmodium vivax***

BRUNO DE PAULO RIBEIRO

São Luís

2017

BRUNO DE PAULO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA
PROTEÍNA CIRCUNSPOROZOÍTA SOBRE A CARGA
PARASITÁRIA E A RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS
INFECTADOS COM *Plasmodium vivax***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

São Luís

2017

Ribeiro, Bruno de Paulo.

Avaliação da influência de polimorfismos da proteína circunsporozoíta sobre a carga parasitária e a resposta imune de indivíduos infectados com *Plasmodium vivax* / Bruno de Paulo Ribeiro. - 2017.

93 f.

Orientador(a): Prof. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2017.

1. Arginase. 2. Citocinas. 3. Óxido Nítrico Sintase. 4. Proteína Circunsporozoíta. 5. Superóxido Dismutase. I. Nascimento, Prof. Dra. Flávia Raquel Fernandes do. II. Título.

BRUNO DE PAULO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA
PROTEÍNA CIRCUNSPOROZOÍTA SOBRE A CARGA
PARASITÁRIA E A RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS
INFECTADOS COM *Plasmodium vivax***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador (Profa. Dra Maristela Gomes da Cunha)
Universidade Federal do Pará

2º Examinador (Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa)
Universidade CEUMA

3º Examinador (Prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior)
Universidade Federal do Maranhão

4º Examinador (Profa. Dra. Conceição de Maria P S de Azevedo)
Universidade Federal do Maranhão

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele. Destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”

Thomas Huxley

À minha mãe Angélica, meu pai
Vagner, meu avô Antônio (*in
memoriam*) e minhas duas
queridas avós Aurora (*in
memoriam*).

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, fonte de minhas forças e meu guia. Com a Ele a meu lado, os desânimos, naturais da existência humana, foram passageiros!

Ao Prof. Ricardo Machado, e toda a equipe do CIM- São José do Rio Preto. Obrigado pela disposição e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Cláudio Marinho e toda sua equipe, em especial Rodrigo Medeiros, por toda atenção dispensada durante minha passagem por São Paulo. Foram momentos de extremo crescimento profissional e pessoal. Muito obrigado!

À Prof. Elizabeth e seu aluno Domingos pela valiosa contribuição e pela disposição para ajudar em nossas análises.

Meus agradecimentos para minha mãe Angélica e meu avô Antônio (*in memoriam*) por todo apoio que me foi dado. Isto me permitiu caminhar com segurança até aqui e construir um firme alicerce para realizar meus sonhos.

À minha avó Aurora Soares (*in memoriam*). Tua capacidade em conduzir nossa família era tão especial que até mesmo “Seu Antônio, o bravo” se rendia a ti. Teus sábios conselhos eram um norteador infalível. Sem dúvidas, foste o elo mais forte de nossa corrente. Tua falta será eternamente sentida, querida vó.

A meu pai Vagner que, mesmo à distância, nunca poupou palavras de apoio. Teus conselhos foram um guia para os vários momentos de desorientação.

À minha vó Aurora Ribeiro (*in memoriam*). Infelizmente, nos deixaste muito cedo. És minha eterna referência. Referência para entender uma palavra que nem os mais habilidosos poetas conseguiram definir com exatidão: o amor. Para construir tua linda trajetória de vida tiveste que vencer obstáculos que, para muitos, talvez fossem intransponíveis. Tomar-te como inspiração é mais que uma obrigação. É uma honra! Saudades eternas minha vó!

Falando em família, agradeço imensamente ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da UFMA. Teu sucesso tem relação direta com tua capacidade de acolher e ensinar. Sendo assim, é obrigatório citar nominalmente as pessoas diretamente envolvidas neste processo desde seu início: Prof^ª Rosane Guerra e Prof^ª Flávia Nascimento! Muito obrigado em nome de todos os alunos que já tiveram a honra de passar por esta “escola”.

A Daniel, Dalila e Agny, meus “filhos adotivos”. Filhos não vai, “irmãos”. Esta dissertação tem a participação direta de vocês. Obrigado por cada segundo de trabalho dedicado a este projeto. Também agradeço imensamente a Guilherme Tude, Ericka Mesquita e Prof. Dr. Marcos Grisotto pela disposição em nos ajudar a conseguir as amostras, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

Ao amigo Josemar (Stygma) pela amizade, conselhos e palavras de incentivo!

Ao Centro de Referência em Doenças Infecto-Parasitárias (CREDIP), representado aqui pelos professores Antônio Rafael da Silva e Eloísa Gonçalves, de onde também foram provenientes algumas das amostras utilizadas neste trabalho.

À Prof. Dra. Ana Paula Azevedo, pelos intermináveis CBAs e pela disposição em participar de todas as minhas bancas desde a graduação.

À minha mãe científica, orientadora e amiga Flávia Nascimento. Nossa história começou na iniciação científica e perdura até os dias atuais. Os caminhos foram muitas vezes espinhosos e densos, porém, com tua presença a meu lado, minha caminhada tornou-se mais branda e agradável. Tuas lições vão muito além de técnicas e conceitos, querida Flávia. Contigo aprendi que pesquisar é um dom. Um dom que carregas e que sabes transmitir como poucos. Todos os meus “títulos” tem tua participação, da graduação ao doutorado. Teu nome está eternamente gravado em minha história, e, apesar de ser uma grande responsabilidade carregá-lo, o faço com muito orgulho! Obrigado por estar presente em minha vida! A partir de agora, substituímos integralmente a relação aluno-orientador por uma fiel e indissolúvel relação de amizade, carinho e profundo respeito. Amo-te!

As agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMA pelos auxílios fornecidos.

À Universidade Federal do Maranhão, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade de realizar este doutorado.

Muito Obrigado!!!

RESUMO

Os mecanismos envolvidos na gravidade da malária causada por *P. vivax* ainda não foram completamente esclarecidos. Neste estudo foi avaliada a influência das diferentes variantes da Proteína Circunsporozoíta (CSP) sobre os níveis de citocinas plasmáticas, da carga parasitária e das enzimas arginase, óxido nítrico sintase (NOS2) e superóxido dismutase (SOD), variáveis que influenciam diretamente o desfecho da infecção, utilizando indivíduos infectados com *Plasmodium vivax* provenientes de uma área da pré-Amazônia brasileira. Amostras de 25 pacientes infectados exclusivamente por *P. vivax* e 9 controles saudáveis foram coletadas e processadas para obtenção do plasma, dos eritrócitos e das células mononucleares (PBMCs). A infecção aguda induziu aumentos nos níveis de IL-6 e IL-10 e redução nos níveis de TGF- β em relação aos controles saudáveis. Apenas 8 pacientes tiveram concentrações detectáveis de IFN- γ e as citocinas IL-2, IL-4, TNF- α e IL-17 apresentaram concentrações muito baixas ou indetectáveis em ambos os grupos. As atividades de arginase e SOD estavam igualmente aumentadas, ao passo que a atividade de NOS2, avaliada indiretamente pela produção de nitritos, estava inalterada em relação aos indivíduos saudáveis. Os polimorfismos da CSP influenciaram diretamente os resultados obtidos. Além de induzir as maiores cargas parasitárias em relação à VK210, a variante VK247 também apresentou as maiores concentrações de IL-6. Apesar de IL-6 e IL-10 terem apresentado níveis correlacionados no plasma, esta correlação só se manteve nos indivíduos infectados com VK210, variante que também induziu aumento na atividade de arginase. Os polimorfismos da CSP e a carga parasitária não apresentaram correlação com as atividades da SOD e da NOS2. Ratificando que a influência sistêmica do parasito foi determinante para os perfis observados, todos os parâmetros da resposta imune do hospedeiro que estavam alterados no plasma voltaram a patamares normais no sobrenadante de cultura de 48 h das PBMCs. Por fim, apesar de aumentada nos pacientes, a produção de IL-10 não foi acompanhada pela produção de TGF- β . Isto, associado aos níveis aumentados de arginase observados, indicam que a IL-10 pode estar sendo produzida por uma fonte alternativa na malária. Desta forma, propomos que macrófagos reguladores têm importante participação na fase aguda da malária vivax e que os polimorfismos da CSP afetam diretamente o controle da resposta inflamatória e, conseqüentemente, o desfecho da infecção.

Palavras-chave: Proteína Circunsporozoíta; Citocinas; Arginase; Óxido Nítrico Sintase; Superóxido Dismutase.

ABSTRACT

Mechanisms involved in severe *P. vivax* malaria remain unclear. In this study, we investigated the influence of different Circumsporozoite Protein (CSP) variants on circulating plasma cytokines, parasite load and enzymes as arginase, nitric oxide synthase (NOS2) and superoxide dismutase (SOD), variables that determine the malária outcome, in individuals infected with *Plasmodium vivax* from a pre-Amazon area from Brazil. Samples of 25 patients infected exclusively with *P. vivax* and 9 healthy controls were collected and processed to obtain plasma, erythrocytes and mononuclear cells (PBMCs). Acute infection increases IL-6 and IL-10 and reduction TGF- β compared to healthy controls. Only 8 patients had detectable concentrations of IFN- γ and IL-2, IL-4, TNF- α , and IL-17 cytokines showed very low or undetectable concentrations in both groups. The activities of arginase and SOD were similarly increased in patients, whereas NOS2 activity, assessed indirectly by nitrite production, was unchanged relative to healthy subjects. CSP polymorphisms showed influence on the results. In addition to inducing the highest parasite loads in relation to VK210, VK247 variant also had higher concentrations of IL-6. Although IL-6 and IL-10 has been correlated in plasma, this correlation was only maintained in individuals infected with VK210. VK210 has also been shown to be related to the arginase activity increase, which may be related to the IL-10 increase induced by this variant. Polymorphisms of CSP and parasite load did not influence SOD activity. The systemic influence of the parasite was determinant for the observed profiles since all parameters of the host immune response that were altered in plasma returned to normal levels in the 48 h PBMCs culture supernatant. Finally, although increased in the patients, the production of IL-10 followed against TGF- β levels. This, associated to the increased levels of arginase, indicate that IL-10 may be produced by an alternative source in malaria. Thus, we propose that regulatory macrophages have an important role in the acute phase of vivax malaria and that CSP polymorphisms directly affect the control of the inflamed response and, consequently, the infection outcome.

Keywords: Circumsporozoite Protein; *Plasmodium vivax*; Cytokines; Arginase; Nitric Oxide Synthase; Superoxide Dismutase

LISTA DE FIGURAS- REFERENCIAL TÉORICO

Figura 1. Países endêmicos para malária nos anos 2000 e 2016.	17
Figura 2. Distribuição e risco de transmissão da malária no Brasil em 2014	18
Figura 3. Número de casos de malária notificados no Brasil e diferença percentual entre 2014, 2015 e 2016	18
Figura 4. Casos de malária notificados por Estado e percentual de participação no total de casos notificados na Região Amazônica nos anos 2015 e 2016.....	19
Figura 5. Ciclo de vida de Plasmodium sp	21
Figura 6. Interação parasito-hospedeiro na pele.....	27
Figura 7. Interação parasito-hospedeiro no fígado	28
Figura 8. Imunidade inata e adaptativa na fase sanguínea da malária.....	29
Figura 9. Ativação da resposta imune pela hemozoína	31
Figura 10. Metabolismo da L-arginina por macrófagos ativados.....	36

LISTA DE FIGURAS- CAPÍTULO 1

Fig 1. Cytokine profile in the plasma of patients infected with <i>P. vivax</i>	45
Fig 2. Correlation between parasite density and the cytokine profile.	47
Fig 3. Cytokine profile and parasite density in <i>P. vivax</i> circumsporozoite protein (CSP) genotypes.....	49
Fig 4. Cytokine profile in supernatant of patients infected with <i>P.vivax</i>	50
Fig. S1. Cytokine profile in supernatant according circumsporozoite protein (CSP) genotypes.	56

LISTA DE FIGURAS- CAPÍTULO 2

Figura 1. Atividade da Arginase no plasma e sobrenadante de cultura de 48 h de pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	64
--	----

Figura 2. Produção de nitrito no plasma de pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	65
Figura 3. Atividade da SOD no plasma e sobrenadante de cultura de 48 h de pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	66
Figura 4. Influência de polimorfismos da CSP sobre a atividade da arginase, SOD e concentração de nitritos em pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	67
Figura 5. Correlação entre as atividades da Arginase e SOD e concentração de Nitritos com a carga parasitária no plasma de pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	68
Figura 6. Correlação entre as atividades da Arginase e citocinas no plasma de pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	69
Figura 7. Correlação entre as atividades da SOD e citocinas no plasma de pacientes infectados com <i>P. vivax</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD: Classe de Diferenciação, do inglês “*Cluster Differentiation*”

CEM: Campanha de Erradicação da Malária

COX-2: Cicloxigenase 2, do inglês “*Cyclooxygenase 2*”

CREDIP: Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias

CSP- Proteína Circunsporozoíta, do inglês “*Circumsporozoite Protein*”

DBP: Proteína Ligante do Duffy, do inglês “*Duffy Binding Protein*”

EEF: Formas exoeritrocíticas, do inglês “*Exo- erythrocytic Forms*”

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”

G6PD: Enzima Glucose-6-fosfato-desidrogenase, do inglês “*Glucose-6-phosphate dehydrogenase*”

GFM: Membrana de Fibra de Vidro, do inglês “*Glass Fibre Membrane*”

IPA- Índice Parasitário Anual (número de casos registrados por 1000 habitantes)

KC: Células de Kupffer, do inglês “*Kupffer Cell*”

LPS: Lipopolissacarídeo, do inglês “*Lipopolysaccharide*”

LSEC: Células Endoteliais do Sinusóide Hepático, do inglês “*Liver Sinusoid Endothelial Cells*”

M1: Macrófagos Clássicos (M1)

M2: Macrófagos Alternativos (M2)

MSP-1: Proteína 1 de Superfície do Merozoíto, do inglês “*Merozoite Surface Protein 1*”

NOS2: Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida, do inglês “*Induced Nitric Oxide Synthase*”

PBMC: Células Mononucleares do Sangue Periférico, do inglês “*Peripheral Blood Mononuclear Cells*”

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “*Polimerase Chain Reaction*”

PIACM: Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária

pLDH: Lactato Desidrogenase, do inglês “*Lactate Dehydrogenase*”

PNCM: Programa Nacional de Controle da Malária

RFLP: Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição, do inglês “*Restriction Fragment Length Polimorphism*”

SOD: Superóxido Dismutase, do inglês “*Superoxide Dismutase*”

Spz: Esporozoítos, do inglês “*Sporozoites*”

Th1: Célula Auxiliar tipo 1, do inglês “*T Helper 1*”

Th2: Célula Auxiliar tipo 2, do inglês “*T Helper 2*”

TLR: Receptor tipo Toll, do inglês “*Toll-like Receptor*”

WHO: Organização Mundial da Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Referencial Teórico.....	16
2.1 Epidemiologia da malária	16
2.2 Malária no Brasil e no Maranhão.....	17
2.3 Ciclo de vida	19
2.4 Aspectos clínicos	21
2.5 Proteína Circunsporozoíta (CSP): um potencial alvo imunogênico	23
2.6 Aspectos imunológicos	25
2.6.1 Estágio pré-eritrocítico e a imunidade protetora	25
2.6.2 Imunidade no estágio eritrocítico	28
2.7 Caracterização de macrófagos	33
3 Objetivos.....	38
3.1 Capítulo 1.....	38
3.2 Capítulo 2.....	38
4 Resultados	39
4.1 CAPÍTULO 1- Polymorphisms in Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-amazon Endemic Area from Brazil.....	39
4.2 CAPÍTULO 2- Avaliação da influência de aspectos parasitários e resposta de citocinas sobre a caracterização funcional de macrófagos em indivíduos infectados por Plasmodium vivax.....	57
5 Considerações Finais	77
6 Referências Bibliográficas	778
Anexos.....	91

1 Introdução

Na última década, os avanços no controle da malária foram significativos, no entanto a doença permanece com uma elevada prevalência no mundo, infectando cerca de 212 milhões de pessoas distribuídas em 91 países presentes nas regiões tropicais e subtropicais e causando cerca de 429 mil de mortes por ano, vitimando uma criança a cada 2 minutos em algum lugar do planeta. Apesar destes números, é uma doença negligenciada e ainda existem muitas lacunas acerca de seu conhecimento, especialmente em aspectos genéticos.

Desenvolvidas ao longo de milhares de anos, as variações genéticas entre humanos determinaram sua susceptibilidade ou resistência às infecções por *Plasmodium sp*, a exemplo do polimorfismo na região promotora do gene que codifica a IL-12p40, que foi associado com redução na produção de óxido nítrico e aumento da mortalidade em decorrência de malária cerebral em indivíduos portadores de *P. falciparum* (MORAHAN et al, 2002). Em outra evidência da influência genética individual no curso da malária, os Fulani, um povo distribuído em vários países do oeste da África, foram identificados como uma população que apresentava elevados títulos de anticorpos contra *P. falciparum* e eram clinicamente menos susceptível à malária. Esta propriedade foi associada com aumento na frequência do alelo IL4-524 T que codifica a IL-4 nesses indivíduos (LUONI et al, 2001). Alterações genéticas que culminam em hemoglobinopatias também conduzem à mecanismos de resistência inata contra *Plasmodium* (STEVENSON e RILEY, 2004). Porém, além das variações genéticas inerentes ao hospedeiro, é de suma importância identificar as variáveis parasitárias que podem afetar a resposta imune.

A malária afeta gravemente os índices socioeconômicos das regiões atingidas (WHO, 2016) e cada vez mais tem seu controle dificultado devido à resistência aos antimaláricos disponíveis (WHO, 2015). Neste panorama, pesquisas que esclareçam as lacunas no conhecimento acerca da doença são essenciais para o seu controle efetivo, entre elas, as que investigam a influência de fatores genéticos do parasito na resposta imune do hospedeiro (WEINBERG et al, 2008), que podem contribuir para o desenvolvimento de uma vacina efetiva.

Sendo assim, neste estudo avaliou-se a influência de polimorfismos em uma proteína altamente imunogênica de *Plasmodium vivax*, a Proteína Circunsporozoíta (CSP), sobre a carga parasitária e sobre aspectos da resposta imune do hospedeiro, tais como seu perfil de citocinas e de enzimas relacionadas à imunidade contra a malária.

Nossos resultados foram apresentados na forma de 2 artigos. O primeiro encontra-se publicado no periódico PLOS Neglected Tropical Diseases (Qualis A1) e o segundo será

submetido ao periódico Malaria Journal (Qualis B1). Nesses artigos foi demonstrado que os polimorfismos na CSP de *Plasmodium vivax* têm um papel chave nos mecanismos de imunopatogenicidade da doença e que o aprofundamento dos estudos acerca deste e de outros polimorfismos em proteínas imunogênicas do parasito podem auxiliar na adoção de medidas futuras que permitam um controle mais efetivo da malária nas regiões atingidas.

2 Referencial Teórico

2.1 Epidemiologia da malária

Descrita primeiramente por Hipócrates (460-370 a.C.) que a classificou como uma doença sazonal, a malária está presente na história da humanidade há milhares de anos. Há relatos de prováveis episódios da doença que datam de mais de 3000 anos, em regiões como China, Índia e Grécia. O causador do paludismo, como também é conhecida a doença, só foi descrito no final do século XIX pelo francês Charles Louis Alphonse Laveran que encontrou parasitos no sangue de pacientes que possuíam a chamada febre palustre, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de 1907 (LAMBERT, 2003; SCHUMANN, 2007).

Quatro espécies do gênero *Plasmodium* têm sido referenciadas como causadoras da malária em humanos: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Porém, atualmente admite-se a ocorrência de uma quinta espécie, antes descrita apenas na malária em macacos: *Plasmodium knowlesi* (BAIRD e HOFFMAN, 2004; COX-SINGH et al, 2008).

Trata-se de uma doença atrelada a um elevado impacto socioeconômico, deixando marcas irrefutáveis ao longo da história. Uma das mais recentes, em 1906, deu-se durante a construção do canal do Panamá, cuja finalização ficou condicionada ao controle da doença na região, uma vez que dos 26.000 trabalhadores do canal, cerca de 21.000 foram hospitalizados alguma vez em decorrência da doença (CDC, 2010). Atualmente, a malária é a quarta maior causa de morte na África Subsaariana, principal foco das mortes em decorrência da infecção em todo o mundo (WHO, 2015).

Os recursos financeiros sempre foram e continuarão a ser um dos pontos de sustentação de qualquer programa de controle de doenças. O principal fundo de financiamento da malária, o Fundo Internacional para Controle da Malária, foi de US\$ 2.1 bilhões em 2013, US\$ 1.9 bilhões em 2014, aumentando para cerca de US\$ 2.9 bilhões em 2015, porém mantendo-se em um patamar muito aquém dos US\$ 5.1 bilhões anuais estipulados para alcançar as metas globais de controle da doença. Apesar disto, muitos avanços no combate à malária foram alcançados (WHO, 2014; WHO, 2015; WHO, 2016).

A malária está entre as maiores causas de mortalidade em seres humanos, especialmente nas regiões tropicais (COBAN et al, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2015, ainda houve transmissão ativa da doença em cerca de 91 países presentes nas regiões tropicais e subtropicais, contra 108 países que tinham transmissão ativa da doença no ano 2000

(Figura 1) (WHO, 2016), com o agravante que cerca de $\frac{3}{4}$ dos países que fazem o uso de piretróides para controlar o vetor relataram ocorrência de resistência (WHO, 2015).

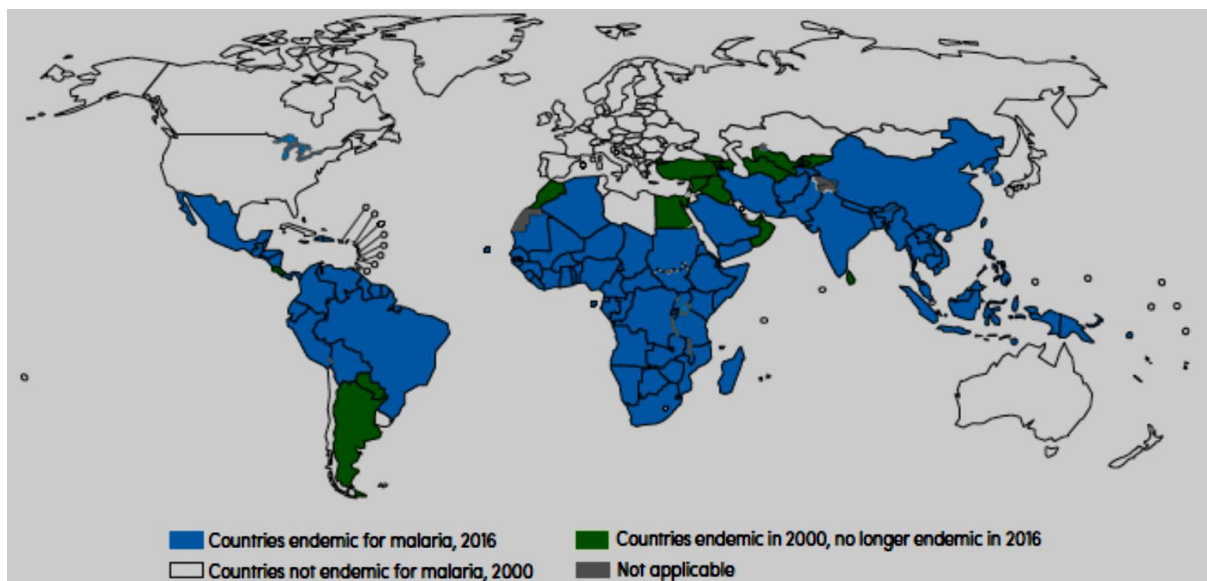


Figura 1. Países endêmicos para malária nos anos 2000 e 2016.

Fonte: WHO, 2016

Além disso, o número de casos de malária reduziu-se em cerca de 41% nos últimos quinze anos, com 212 milhões de casos reportados em 2015 (WHO, 2016). O número de óbitos, cuja maior concentração é na África (92%), também sofreu uma queda substancial, reduzindo-se de 985 mil em 2000 para cerca de 429 mil em 2015, dos quais cerca de 91% causadas por *Plasmodium falciparum*, tendo como principais vítimas (71%) as crianças abaixo de 5 anos.

Na região das Américas, foram registrados cerca de 800 mil casos de malária em 2015, o que representa uma redução de 31% em relação ao ano 2000. *Plasmodium vivax* continua sendo a espécie responsável pela maior parte dos registros nesta região (WHO, 2016) e, em todo o mundo, foi responsável por cerca de 3100 mortes neste último ano. Apesar de ainda se manterem elevados, estes dados mostram avanços no combate à doença (WHO, 2016).

2.2 Malária no Brasil e no Maranhão

No início do século XX a malária era o maior problema de saúde pública do Brasil, estando presente em 85% do território nacional. Este quadro começou a mudar quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs a erradicação da doença, levando o governo brasileiro a criar em 1965 a Campanha de Erradicação da Malária (CEM), que praticamente eliminou a doença nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do país, reduzindo o número de casos de cerca de 6 milhões anuais na década de 1940 para menos de 53 mil em

1970 e deixando-a praticamente restrita à região da Amazônia Legal (LOIOLA et al, 2002; SILVA et al, 2009) (Figura 2).

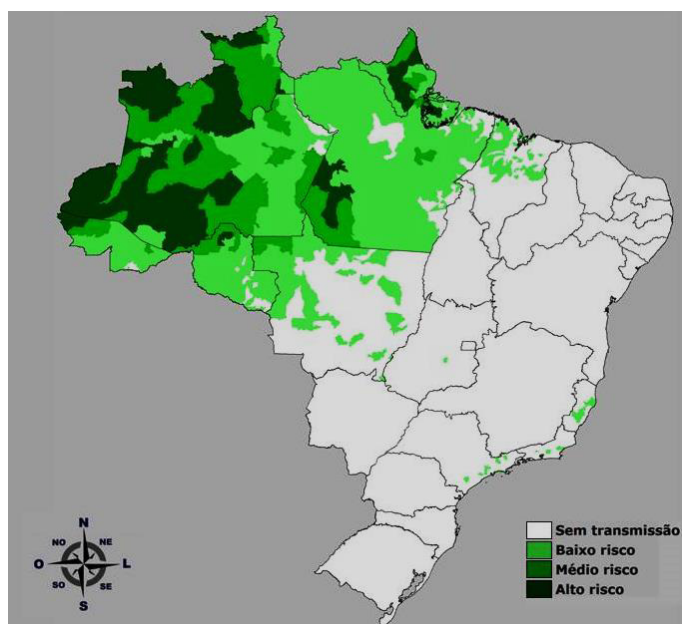


Figura 2. Distribuição e risco de transmissão da malária no Brasil em 2014.

Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

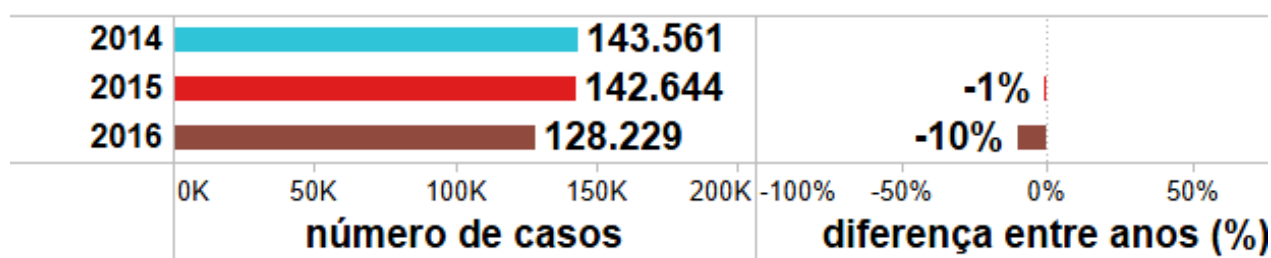


Figura 3. Número de casos de malária notificados no Brasil e diferença percentual entre 2014, 2015 e 2016.

Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

Atualmente, no Brasil, das 5 espécies de parasitos causadores da malária humana, somente *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* são encontrados, com cerca de 99,7 % dos casos ocorrendo nos nove Estados da Amazônia Legal, distribuídos em localidades de baixo, médio e alto risco de transmissão (Figura 2), sendo *P. vivax* responsável por 84% das notificações e *P. falciparum* por aproximadamente 16% (BRASIL, 2015). Nesta região, as condições ambientais, com elevadas temperatura e umidade e coleções hídricas abundantes, propiciam o desenvolvimento do mosquito vetor, representado majoritariamente no país por três espécies: *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitarsis* (WHO, 2014).

Em 2016, segundo dados do Ministério da Saúde, foram notificados mais de 128 mil casos da doença no país. Este número é 10% inferior ao de 2015 e cerca de 11% inferior ao registrado em 2014 (Figura 3), sendo considerado o melhor resultado obtido no controle da infecção nos últimos 35 anos (BRASIL, 2016). Entre os estados da federação, o Amazonas e o Acre lideram as estatísticas do número de casos (Figura 4).

No caso particular do Maranhão, um dos piores anos malarígenos de sua história foi 1987, quando 54% dos casos da doença eram por *P. falciparum*. Logo depois, outro período marcante na história da saúde pública do Estado foi o biênio 1999-2000, quando se chegou a um Índice Parasitário Anual (IPA) geral de 13.9, com pico de 43.6 no norte do Estado (SILVA et al, 2009).

Então, na perspectiva do PIACM (Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária) e do PNCM (Programa Nacional de Controle da Malária), o Maranhão desenvolveu suas estratégias de controle, que acabaram por reduzir seu IPA para 1.1 no ano de 2007, com cerca de 6520 casos registrados (SILVA et al, 2009). Atualmente, no Estado, todas as áreas com transmissão ativa são consideradas de baixo risco (Figura 2), tendo sido registrados 760 casos da doença em 2016, correspondendo a aproximadamente 1% do total de ocorrências da Amazônia Legal (BRASIL,2016) (Figura 4).

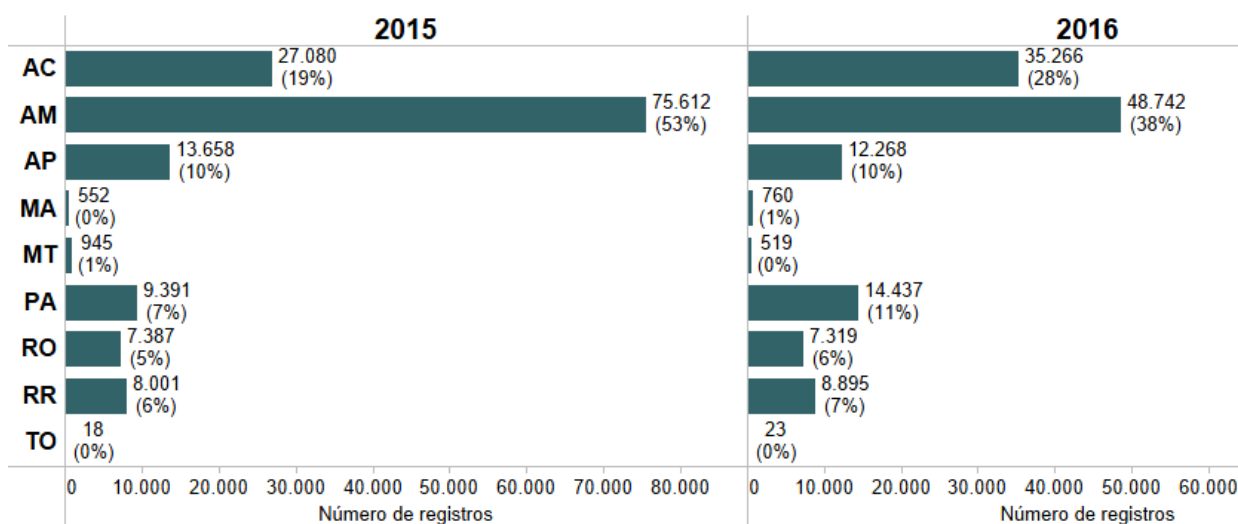


Figura 4. Casos de malária notificados por Estado e percentual de participação no total de casos notificados na Região Amazônica nos anos 2015 e 2016.

Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS

2.3 Ciclo de vida

A malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário taxonomicamente pertencente ao filo Apicomplexa, subordem Haemosporina, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*, que contém mais de 172 espécies.

Conforme descrito pelo inglês Ronald Ross, entre 1897 e 1898, o protozoário possui ciclo de vida heteroxeno (CDC, 2010) que se inicia pela picada das fêmeas de mais de 30 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles*, que inoculam esporozoítos na pele humana durante o repasto sanguíneo (KISZEWSKI et al, 2004). Dentro de 15 minutos a algumas poucas horas, estas formas atingem a corrente sanguínea e chegam ao fígado, onde parasitam os hepatócitos, dando início ao ciclo exoeritrocítico da malária (YAMAUCHI et al, 2007) (Figura 5A).

Os esporozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* podem evoluir para uma fase latente denominada hipnozoíto, responsáveis pelas recidivas que ocorrem semanas, meses ou anos depois (BAIRD e HOFFMAN, 2004; CHEN et al, 2007).

Os esporozoítos que não entram em latência originam os trofozoítos teciduais, que sofrem divisões mitóticas (esquizogonia) e dão origem aos esquizontes, que logo rompem-se e liberam merozoítos na corrente sanguínea (Figura 5A). Este ciclo tissular dura cerca de uma semana para *P. vivax* e *P. falciparum* e duas semanas para *P. malariae*. Quando os merozoítos rompem os hepatócitos e são liberados na corrente sanguínea, inicia-se o ciclo eritrocítico, a fase sintomática da doença (HAFALLA et al, 2011) (Figuras 5B).

Os merozoítos possuem tropismo pelas hemácias e sua penetração nestas células depende de interações específicas. No caso de *P. vivax*, a penetração nos eritrócitos é dependente da interação entre a proteína ligante de Duffy (Duffy Binding Protein-DBP), presente no parasito, e o antígeno Duffy, nos eritrócitos (RYAN et al, 2006; CAVASINI et al, 2007; MCHENRY et al, 2010).

Os protozoários da espécie *P. vivax* parasitam preferencialmente, se não exclusivamente, os reticulócitos (SUWANARUSK et al, 2004; STURM et al, 2006) e como estes perfazem cerca de 1 a 2 % do total de glóbulos vermelhos, esta predileção é também responsável pelas baixas parasitemias observadas nas infecções por esta espécie (MUELLER et al, 2009).

No interior das hemácias, os merozoítos diferenciam-se em trofozoítos jovens, que amadurecem e, por esquizogonia, originam os esquizontes sanguíneos, que rompem-se liberando de 16 a 32 novos merozoítos na circulação (HAFALLA et al, 2011) (Figura 5B).

O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale* ou a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae* (GREENWOOD et al, 2005). Alguns merozoítos resultantes da esquizogonia sanguínea se diferenciam em gametócitos, formas sexuais responsáveis pela infecção do vetor e início da fase sexuada (Figuras 5B).

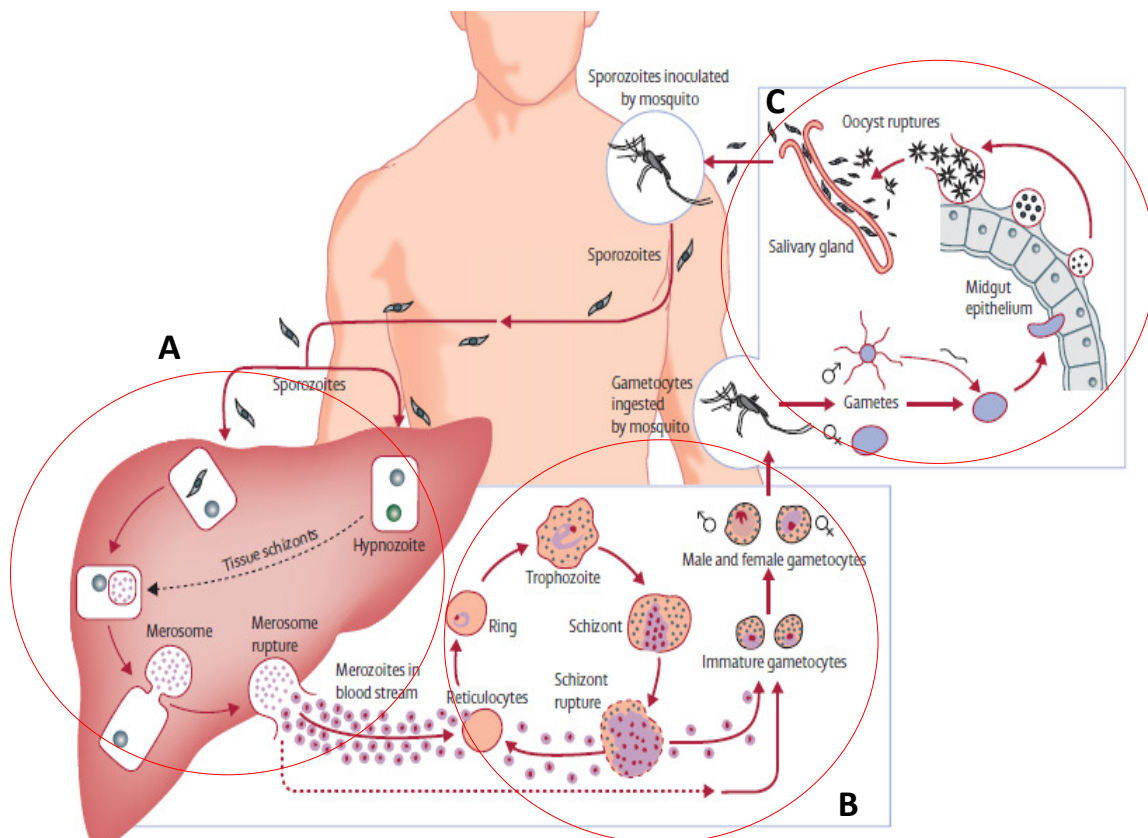


Figura 5. Ciclo de vida de *Plasmodium* sp.

Fonte: adaptado de MUELLER et al, (2009)

O ciclo sexuado foi descrito primeiramente por Grassi, Bastianelli e Bignami entre 1898 e 1899 (CDC, 2010) e inicia-se quando, no interior do mosquito, os microgametas fecundam os macrogametas, formando o ovo ou zigoto, que se torna móvel (oocineto) e, utilizando movimentos amebóides, atravessa o epitélio do intestino médio do mosquito e encista-se (oocisto). No interior do oocisto os parasitos multiplicam-se por esporogonia e originam os esporozoítos. A ruptura do oocisto libera as formas infectantes do parasito que se dirigem para as glândulas salivares do vetor e, por ocasião do repasto da fêmea do mosquito anofelino, poderão ser inoculados em novo hospedeiro humano (MUELLER et al, 2009) (Figura 5C).

2.4 Aspectos clínicos

A fase hepática do ciclo de vida de *Plasmodium* é clinicamente silenciosa, sendo a fase intraeritrocítica, durante o período de esquizogonia sanguínea, a responsável pelo aparecimento dos sintomas (YAMAUCHI et al, 2007; GOLDBERG e COWMAN, 2010). O quadro agudo da malária, que dura cerca de 6 a 12 horas, é caracterizado por febre, calafrios, sudorese, astenia e cefaleia e pode variar de um indivíduo para outro na dependência de alguns fatores, tais como:

espécie do plasmódio, imunidade do hospedeiro, tempo de doença e carga parasitária. A febre geralmente é superior a 40°C e no início ocorre em intervalos regulares, determinados pelo período entre um ciclo esquizogônico e outro, sendo a cada 48 horas para *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale* e a cada 72 horas para *P. malariae* (HALDAR e MOHANDAS, 2009; BRASIL, 2010; MEDINA et al, 2011).

Durante muito tempo, a infecção causada por *P. vivax* foi associada apenas a este quadro agudo característico e considerada clinicamente branda, em parte, porque os estudos iniciais foram realizados em regiões de clima temperado, onde o curso clínico da doença é menos agressivo quando comparado ao promovido por cepas tropicais (SONG et al, 2006; MUELLER et al, 2009). Porém, atualmente, a espécie tem sido associada a casos graves, antes atribuídos apenas à *P. falciparum*. Nos últimos anos, os dados clínicos e epidemiológicos da infecção por *P. vivax* têm atraído a atenção dos órgãos de saúde de diversos países (PRICE et al, 2009; BASSAT et al, 2011; LACERDA et al, 2012).

A malária grave é caracterizada, entre outras coisas, por acidose láctica, malária cerebral, disfunção hepática com icterícia acentuada, lesão pulmonar aguda, edema pulmonar, síndrome da angústia respiratória aguda, choque, insuficiência renal, ruptura do baço, trombocitopenia, hemorragia e anemia intensa (BAIRD, 2007; LAMIKANRA et al, 2007; HALDAR et al, 2009). Achados em países como Índia (KOCHAR et al, 2005; KOCHAR et al 2009), Papua Nova Guiné (GENTON et al, 2008), Indonésia (TJITRA et al, 2008; POESPOPRODJO et al, 2009) e Brasil (ALEXANDRE et al, 2010) têm mostrado a ocorrência de casos graves ocasionados por *P. vivax*. Inicialmente este quadro era atribuído a erro diagnóstico ou a ocorrência de comorbidades. Visando eliminar estas incertezas, Kochar et al. (2009) e Alexandre et al. (2010) excluíram em seus pacientes a possibilidade de infecção mista com *P. falciparum* e a ocorrência simultânea de doenças com aspecto clínico semelhante à malária, tais como dengue, hepatite viral, leptospirose e infecção bacteriana, demonstrando que aquele quadro era decorrente exclusivamente da malária vivax.

Diante disto, estudos têm sido conduzidos no intuito de explicar este novo fato relacionado à doença. Entre estes, estão pesquisas envolvendo mecanismos de citoadesão, rosetamento e variações genéticas em proteínas imunogênicas de *P. vivax*, que, entre outras coisas, podem ajudar desenvolver novas ferramentas de combate à malária (MARÍN-MENENDEZ A et al, 2013), a exemplo de vacinas, e a elucidar os mecanismos envolvidos na resistência a drogas (SOUZA-NEIRAS et al, 2007) e nas recidivas, comuns em infecções por *P. vivax* (CRAIG e KAIN, 1996).

2.5 Proteína Circunsporozoíta (CSP): um potencial alvo imunogênico

As ferramentas moleculares têm sido valiosas aliadas nas pesquisas que envolvem genes codificantes de estruturas antigênicas dos plasmódios e têm reavivado as esperanças de encontrar respostas aos questionamentos ainda vagos a respeito das espécies, como por exemplo, as características intrínsecas dos hipnozoítos que os fazem interromper seu desenvolvimento e causar as recidivas de infecções por *P. vivax*, além de ajudar a prever a eficiência de estratégias de intervenção no controle da doença (ESCALANTE et al, 2002; MUELLER et al, 2009).

Entre os principais alvos destes estudos está a Proteína Circunsporozoíta (CSP) de *P. vivax*. Trata-se de uma proteína diretamente envolvida no processo de invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos (ARÉVALO-HERRERA et al, 2011), com cerca de 58 kDa e altamente imunogênica em humanos. Esta proteína tem sido um dos principais alvos utilizados em pesquisas envolvendo a produção de vacinas (ESCALANTE et al, 2002; HERRERA et al, 2005; YADAVA et al, 2007; AGNANDJI et al, 2011).

A Proteína Circunsporozoíta exibe duas regiões terminais altamente conservadas (N e C-terminal) e uma região central variável composta por dois tipos de nonapeptídeos que se repetem em tandem, GDRA(A/D)GQPA e ANGA(G/D)(N/D)QPG, característicos das variantes moleculares intituladas VK210 e VK247, respectivamente (ARNOT et al, 1985; ROSENBERG et al, 1989). Além destas duas variantes, existe uma terceira descrita por Qari et al. (1993) chamada de *P. vivax-like*, cuja CSP possui a sequência repetitiva APGANQ(E/G)GGAA.

No aspecto imunológico, segundo Souza-Neiras et al. (2010), a produção de anticorpos às variantes é restrita à região central da CSP (que as diferencia) e, na presença de VK210, ocorre uma menor resposta de anticorpos à VK247. Além disso, também mostraram que a resposta a estas variantes torna-se menor na presença de *P. vivax-like*. Arévalo-Herrera et al. (2011) relataram que as regiões terminais da proteína também são capazes de ativar a resposta imune, em especial a região N-terminal, contra a qual foram detectados anticorpos IgG1 e IgG3, sugerindo que esta região da proteína possui epítomos alvo de células Th1.

As variantes podem exibir diferentes características tanto em relação à resposta a drogas quanto à intensidade dos sintomas (KAIN et al, 1993; MACHADO e PÓVOA, 2000). Porém, dados que mostrem possíveis diferenças quanto a virulência ainda são escassos. Devido a estas diferenças entre elas, o diagnóstico molecular adquire importância nas políticas de controle e estudo da malária causada por *P. vivax*. Várias técnicas já foram padronizadas com este fim,

entre elas, o sequenciamento do gene da CSP (KHO et al, 1999) e a GFM/PCR/ELISA, uma técnica que utiliza Membrana de Fibra de Vidro na preparação das amostras para PCR/ELISA (MACHADO e PÓVOA, 2000). Porém, foi a PCR/RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase por Análise de Polimorfismos de Comprimento dos Fragmentos de Restrição) que apresentou os melhores resultados, tanto em relação aos custos quanto ao tempo de execução (ALVES et al, 2007).

A eficácia da imunidade protetora do hospedeiro contra a CSP pode ser diretamente influenciada pelos polimorfismos inerentes a esta proteína, os quais podem apresentar-se em maior ou menor grau, dependendo da região. Diferentes graus de polimorfismos para uma mesma variante já foram encontrados entre cepas de clima tropical e temperado no Irã (ZAKERI et al, 2006). Isto é mais um fator complicador no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas baseadas nesta proteína (ESCALANTE et al, 2002).

Apesar de todas as medidas profiláticas usualmente recomendadas, considera-se o desenvolvimento de uma vacina como a medida mais eficaz e segura para o controle da doença e consequente redução de seus impactos socioeconômicos. Existem várias vacinas em desenvolvimento concomitantemente. Destas, apenas duas contra *P. vivax* encontram-se em fase clínica, em oposição às mais de 23 (de um total de 70) em desenvolvimento contra *P. falciparum*, demonstrando ainda certa negligência em relação a infecção causada pela espécie equivocadamente considerada de curso clínico brando. Das vacinas em estudo, a que está em estágio mais avançado é a RTS,S/AS01 contra *P. falciparum*, que encontra-se em ensaios de fase III e cujo desenvolvimento está sendo conduzido em países africanos, tendo alcançado até o momento uma redução de 39% na incidência clínica da doença e de 31.5% no número de casos de malária grave entre crianças de 5-17 meses que tomaram as 4 doses (MALKIN et al, 2006; MUELLER et al, 2009; AGNANDJI et al, 2011; AGNANDJI et al, 2015; WHO, 2016).

O conhecimento dos polimorfismos presentes nas espécies, além de ser importante nos estudos envolvendo a produção de vacinas, também é fundamental para a elaboração das políticas de controle da doença. Neste aspecto, a pesquisa combinada de mais de um sítio polimórfico, a exemplo da análise combinada de polimorfismos na CSP e na Proteína de Superfície do Merozoíto (MSP-1), pode ser de grande utilidade, pois permite um melhor entendimento da diversidade genética da espécie (LECLERC et al, 2004; CHENET et al, 2008).

Entender como se comporta a resposta imune do hospedeiro frente a tamanha diversidade genética em proteínas imunogênicas do parasito parece ser um passo essencial para evoluirmos no controle da malária.

2.6 Aspectos imunológicos

A constante exposição do hospedeiro ao parasito é capaz de desenvolver uma espécie de proteção em caso de novos episódios de malária, mas isso ocorre de forma diferenciada de acordo com a espécie, visto que *P. vivax*, devido às suas características biológicas intrínsecas, a exemplo de seu mecanismo de invasão dos eritrócitos e da variabilidade em seus antígenos de superfície, parece induzir o desenvolvimento de imunidade mais cedo que *P. falciparum* (MICHON et al, 2007). Além disso, esta proteção demora anos para se desenvolver e se dá apenas contra a forma clínica da doença, não sendo, portanto, uma proteção estéril (ROESTENBERG et al, 2009; HAFALLA et al, 2011). O desenvolvimento deste referido estado de premunição fica evidenciado pelo fato de que a incidência de malária por *P. vivax* reduz-se significativamente com o aumento da idade, atingindo seu pico aos 2 anos e reduzindo-se significativamente após os 5 anos nas áreas endêmicas (MICHON et al, 2007). A resposta imune do hospedeiro que culmina com este estado protetor tem características peculiares a cada fase da infecção. Por isso os mecanismos envolvidos nesta premunição ainda carecem de maiores esclarecimentos.

2.6.1 Estágio pré-eritrocítico e a imunidade protetora

Em todos os estágios de seu ciclo, *Plasmodium* enfrenta uma série de mecanismos de defesa do hospedeiro e a instalação da infecção depende de sua capacidade para superá-los. Isto inicia-se já no momento de sua inoculação na pele. Em modelo experimental com malária murina foi demonstrado que uma pequena parte dos esporozoítos (20 %) inoculados na pele alcançam o sistema linfático e chegam ao linfonodo drenante (YAMAUCHI et al, 2007). Nos linfonodos, os esporozoítos são degradados e apresentados aos linfócitos T por células dendríticas (AMINO et al, 2008) (Figura 6).

Em contrapartida, esporozoítos que não foram drenados não podem permanecer muito tempo na derme, pois a saliva do mosquito induz a degranulação de mastócitos e a infiltração de neutrófilos no sítio de inoculação, fato que poderá culminar na destruição dos parasitos (DEMEURE et al, 2005).

Para escapar desta resposta inicial, os esporozoítos se deslocam ativamente através das células do hospedeiro, rompendo suas membranas até atingir os vasos sanguíneos e, desta forma, penetram no parênquima hepático, onde estão suas células-alvo: os hepatócitos (AMINO et al, 2008; TORGLER et al, 2008).

Esta migração do parasito provoca o rompimento da membrana das células do hospedeiro e culmina com a liberação de material citosólico altamente imunogênico que pode causar respostas inflamatórias (TORGLER et al, 2008).

No fígado, estudos com murinos mostram que as células T CD8⁺ têm papel fundamental no desenvolvimento de imunidade protetora (HAFALLA et al, 2011). Estas células são ativadas em presença de antígenos apresentados pelos hepatócitos que, no fígado, também desempenham papel de células apresentadoras de antígenos (APC) (CHAKRAVARTY et al, 2008). Porém, associado a isto, também é indispensável a participação de APCs profissionais, tais como as células dendríticas, que, apesar de atuarem pré-estimulando células T no próprio fígado, desenvolvem a maior parte deste papel no linfonodo drenante (JUNG et al, 2002; CHAKRAVARTY et al, 2007) (Figuras 6 e 7). Porém, os mecanismos pelos quais as células T CD8⁺ desempenham seu papel efetor na malária ainda carecem de maiores esclarecimentos.

Sabe-se que uma via efetora de grande relevância destas células se dá pela liberação de interferon gama (IFN- γ). Esta citocina induz a produção de IL-12, que, por sua vez, estimula células natural killer (NK) a produzirem ainda mais IFN- γ . Esta citocina ativa a enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2), culminando com o aumento da produção de óxido nítrico (NO), molécula importante nos processos de reparação tecidual e controle de infecções (TORGLER et al, 2008; HAFALLA et al, 2011).

A produção de NO também pode ocorrer de modo independente de linfócitos T, via Toll/MyD88. Os receptores tipo Toll estão presentes nos hepatócitos, nos macrófagos e células dendríticas. No interior dos hepatócitos, a interação entre antígenos parasitários e estes receptores culmina com a ativação do fator de transcrição NF- κ B, principal regulador da resposta inflamatória no hospedeiro, que também induz a NOS2 e culmina com aumento na produção de NO (TORGLER et al, 2008) (Figura 7).

Entre os antígenos-alvo das células T CD8⁺ nos esporozoítos merece destaque a Proteína Circunsporozoíta. Pesquisas com murinos têm demonstrado grande participação de células T CD8⁺ específicas para epítomos desta proteína no desenvolvimento de imunidade protetora nos indivíduos (FREVERT et al, 2009).

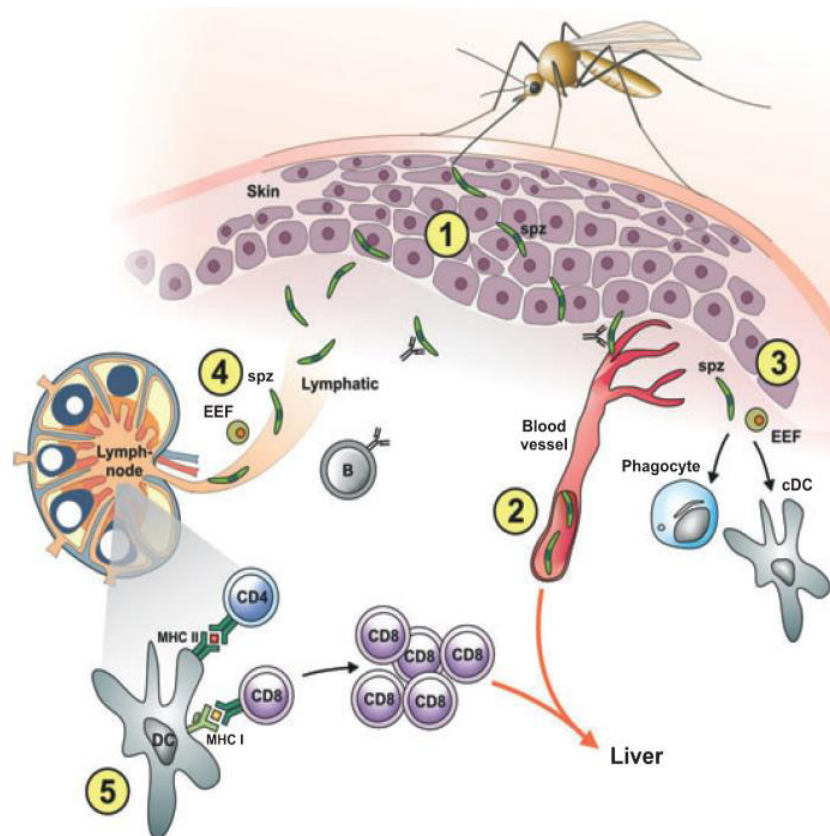


Figura 6. Interação parasito-hospedeiro na pele.
 Spz: esporozoítos; EEF: formas exoeritrocíticas
 Fonte: adaptado de HAFALLA et al, (2011)

A resistência à infecção em humanos também tem sido associada aos linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ e específicos para CSP, porém estas células parecem não ter um papel tão relevante quanto os linfócitos T CD8+ na proteção conferida aos pacientes nesta fase da doença (SEGUIN et al, 1994; PLEBANSKI et al, 2005).

No aspecto humoral, o principal alvo de anticorpos neutralizantes nesta fase é a região central da CSP. Entre as funções efetoras desenvolvidas pelos anticorpos está a inibição da invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos (CROMPTON et al, 2010; HAFALLA et al, 2011).

Apesar dos grandes avanços obtidos nas últimas décadas, ainda permanecem muitas dúvidas quanto aos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da imunidade protetora contra os estágios pré-eritrocíticos da malária. Desta forma, tem-se buscado a identificação de novos epítomos imunogênicos nas formas infectantes.

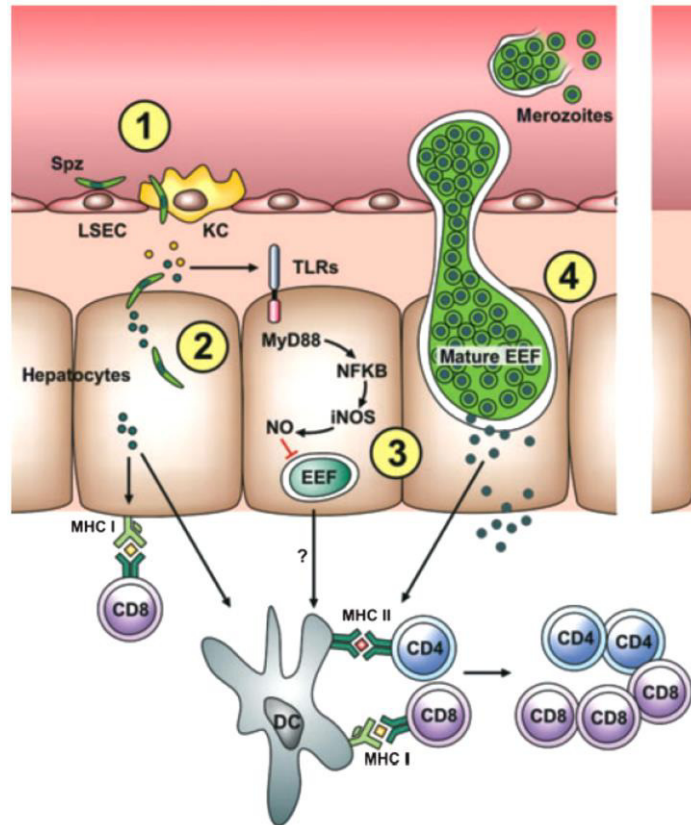


Figura 7. Interação parasito-hospedeiro no fígado

Spz: esporozoítos; LSEC: células endoteliais do sinusóide hepático; KC: células de Kupffer; TLRs: receptores Toll; EEF: formas exo-eritrocíticas

Fonte: adaptado de HAFALLA et al, (2011)

2.6.2 Imunidade no estágio eritrocítico

A hemoglobina presente nos eritrócitos é essencial para a sobrevivência de *Plasmodium*, sendo necessária para sua nutrição na fase sanguínea da doença. Devido a esta dependência fisiológica do parasito em relação à hemoglobina, indivíduos portadores de hemoglobinopatias possuem resistência inata contra as formas graves da malária. Esta resistência natural é comum em portadores de traço falciforme (AIDOO et al, 2002; WILLIAMS et al, 2005) e deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) (MAIGA et al, 2014). Porém, em indivíduos sem estas barreiras naturais, a infecção segue outro curso.

A ruptura dos esquizontes e a subsequente liberação dos merozoítos dá início aos tradicionais sintomas da infecção, que se desenvolvem em consequência de uma resposta inflamatória de citocinas derivadas, inicialmente, de células do sistema imune inato (MILLER et al, 2002).

A exacerbação ou o abrandamento da doença depende de um balanço delicado na produção destas citocinas (JAIN et al, 2009; GONÇALVES et al, 2010). Porém, são muito

comuns relatos de indivíduos, especialmente adultos e crianças acima de 8 anos, vivendo em áreas endêmicas e clinicamente silenciosos, mesmo com formas parasitárias no sangue periférico. Este fato tem levado a indagações acerca dos mecanismos imunológicos envolvidos nesta etapa do ciclo do parasito (CROMPTON et al, 2010).

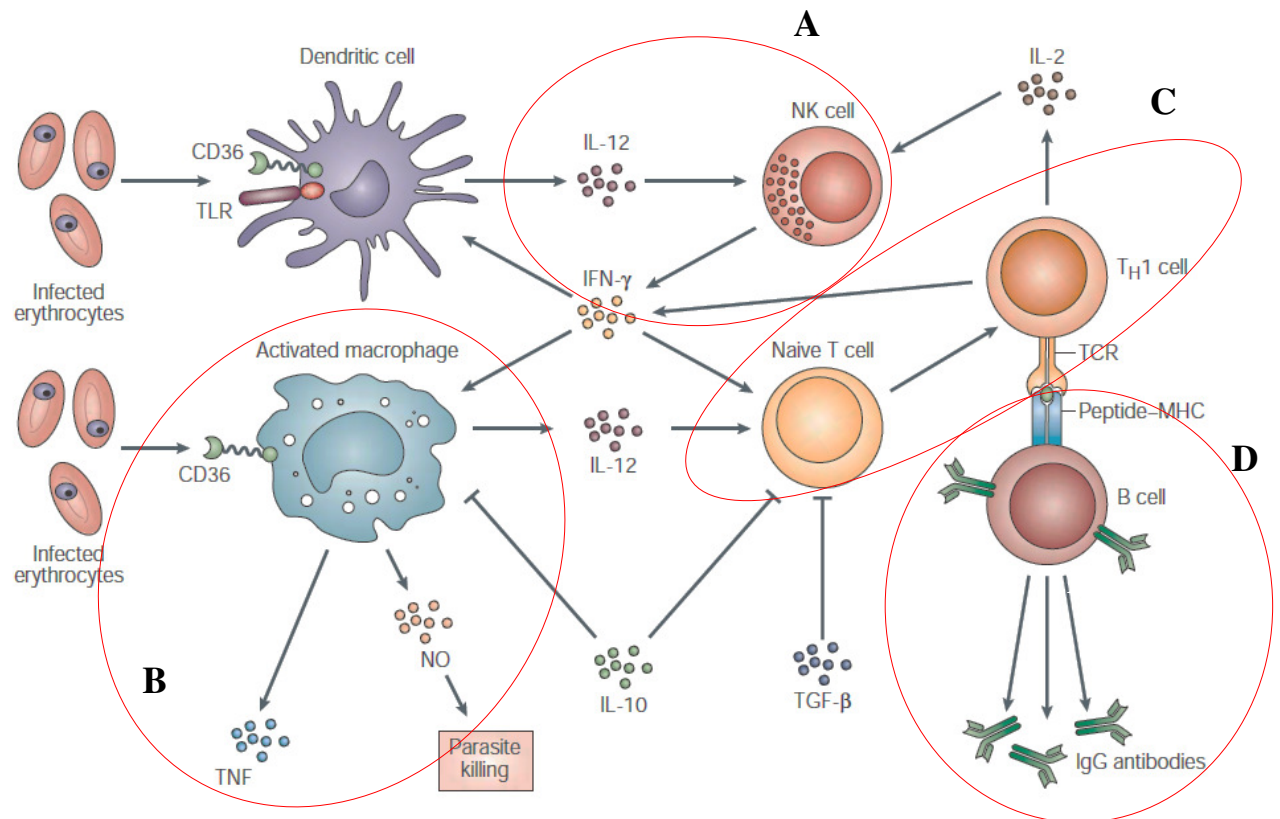


Figura 8. Imunidade inata e adaptativa na fase sanguínea da malária.

TLRs: receptores tipo “Toll”; NK cell: células Natural Killer; TH1 cell: célula “T helper” 1; NO: óxido nítrico; TCR: receptor de célula T.

Fonte: adaptado de Stevenson e Riley (2004)

A forma parasitária alvo da resposta imune nesta fase da doença é o merozoíto. A MSP-1, uma proteína de superfície do merozoíto envolvida na penetração das hemácias é o principal antígeno parasitário presente nesta fase da infecção (TRIPATHI et al, 2011). Esta proteína também se mostrou candidata ao desenvolvimento de vacinas, a exemplo do que já ocorre com a CSP (RICHARDS e BEESON, 2009; HAFALLA et al, 2011).

Estudo *in vitro* utilizando células mononucleares (PBMCs) em co-cultura com *P. falciparum* demonstrou que as células NK têm um importante papel para desencadear a imunidade protetora durante a fase sanguínea da malária, uma vez que foram as primeiras a produzirem IFN-γ de forma altamente dependente de IL-12 oriunda das células dendríticas (Figura 8A). A produção de IFN-γ pelas células NK, além de ativar os macrófagos aumentando

sua capacidade fagocítica e induzindo a produção de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio (Figura 8B) (STEVENSON e RILEY, 2004), também promove a diferenciação de células *T naive* em linfócitos Th1 (Figura 8C), que pela produção de IL-2 ampliam a ativação das células NK e consequentemente a ativação de macrófagos e células dendríticas (STEVENSON e RILEY, 2004). A ativação de macrófagos, por sua vez, também induz a produção de TNF- α e a secreção autócrina desta citocina amplifica ainda mais a resposta imune adaptativa, numa espécie de mecanismo autoestimulante (ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002).

Os linfócitos Th1 ativados também têm a propriedade de secretar IFN- γ , porém, neste mesmo estudo *in vitro* com *P. falciparum* foi demonstrado que a produção desta citocina por linfócitos T $\gamma\delta$ só ocorre após 48-72 h e por linfócitos T $\alpha\beta$ após 4 a 6 dias, evidenciando a importância das células NK no combate à infecção em seus momentos iniciais (ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002).

A participação destes tipos celulares vai além da fase aguda da doença na qual promovem a resposta mediada por células. Em modelo de malária murina com *Plasmodium chabaudi* AS foi evidenciado que linfócitos Th1 são mediadores essenciais para a formação de anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 (Figura 8D) (SU e STEVENSON, 2002), considerados de grande importância na imunidade protetora e que foram relacionados à redução de morbidade em indivíduos com mais idade, e, portanto, mais tempo de exposição. Porém, ratificando a importância da resposta humoral apenas em longo prazo, estes anticorpos se formam tardia e lentamente (OEUVRAY et al, 2000). Sendo assim, a resposta imune de fase aguda é independente da participação dos linfócitos B e da resposta humoral, conforme foi demonstrado em estudos com modelo murino de infecção com *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS (STEVENSON e RILEY, 2004), pois, durante o tempo necessário para ocorrer sua produção, os sintomas já se iniciaram. Além disso, os títulos destes anticorpos caem rapidamente, pois são produzidos por plasmócitos de vida curta (CROMPTON et al, 2010).

A resposta humoral parece ter grande importância apenas em indivíduos que permanecem durante anos em áreas endêmicas sob constante exposição aos parasitos, pois verificou-se que altos níveis de anticorpos gerados contra um grande número de epítomos parasitários são necessários para se obter imunidade clínica, o que demanda tempo e torna lenta este tipo de resposta contra a doença (HAFALLA et al, 2011).

Em contrapartida, a resposta inflamatória que se desenvolve na fase aguda e que foi descrita anteriormente é essencial para o controle da parasitemia. De forma semelhante ao

observado para as demais citocinas inflamatórias, a IL-6 parece ser importante para o controle da doença visto que concentrações reduzidas desta citocina têm correlação com elevadas cargas parasitárias (LYKE et al, 2004). Porém, estas citocinas mostram papéis diversificados na infecção, pois, ao mesmo tempo que contribuem para controlá-la, também medeiam alterações patológicas que culminam com o desenvolvimento dos sintomas (ANSTEY et al, 2009). O próprio IFN- γ , apesar de estar relacionado ao controle da infecção nos estágios iniciais, também pode desencadear a superprodução de citocinas pró-inflamatórias, resultando no agravamento do quadro clínico (ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002).

Entre os principais sintomas desencadeados pelas citocinas inflamatórias está a febre. Seu início ocorre após a ativação de células dendríticas e macrófagos por mecanismo dependente de TLR9 (Toll-like receptor 9), um receptor intracelular que reconhece o DNA plasmodial que reveste a hemozoína liberada durante o rompimento das hemácias (PARROCHE et al, 2004). Este reconhecimento via TLR9 desencadeia a translocação de NF- κ B no núcleo e conduz à secreção de citocinas inflamatórias, que induzem a cicloxigenase 2 (COX-2), regulando positivamente a produção de prostaglandinas e culminando com o aparecimento de febre (Figura 9) (BALL et al, 2004; SCHUMANN, 2007).

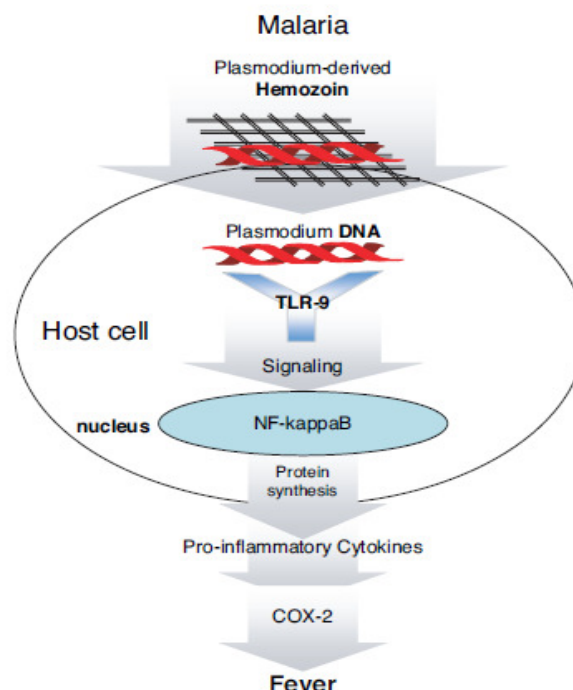


Figura 9. Ativação da resposta imune pela hemozoína

TLR-9: Receptor Toll-9; COX-2: cicloxigenase 2

Fonte: adaptado de SCHUMANN, 2007

Estes mecanismos da imunidade inata controlam satisfatoriamente a parasitemia, mas, gradualmente, mecanismos da imunidade adquirida são requeridos para o controle efetivo da infecção, de forma a evitar danos colaterais ao hospedeiro (STEVENSON e RILEY, 2004).

Logo, é de suma importância regular a resposta inata inflamatória desencadeada durante a infecção. Tanto na malária murina quanto na humana, este papel imunorregulador é exercido principalmente pelas citocinas TGF- β e IL-10. Estas duas citocinas, atuando de forma isolada ou em conjunto, diminuem a proliferação e função linfocitária e controlam a superprodução de IFN- γ e TNF- α (STEVENSON e RILEY, 2004). Desta forma, atuam com um efeito imunorregulador negativo sobre a imunidade mediada por células na malária, controlando os mecanismos de defesa do próprio indivíduo que sejam potencialmente detrimenais, desde que a parasitemia esteja sob controle (LEORATTI 2008; JANGPATARAPONGSA et al, 2008; HAFALLA et al, 2011).

Desta forma, a IL-10 e o TGF- β são essenciais para a manutenção da homeostasia da relação parasito- hospedeiro (HAFALLA et al, 2011) e isto tem incitado a investigação da possível fonte destas citocinas, especialmente IL-10, nas infecções por *Plasmodium* e os resultados têm sido conflitantes.

Entre as células identificadas como sua possível fonte em modelos com malária murina estão células Th1 efectoras (CD4⁺IFN- γ ⁺CD44^{HIGH}ICOS^{HIGH}127^{LOW}) (ROSARIO et al, 2012) e células T regulatórias tipo 1 (Tr1) adaptativas (CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻CD127⁻) (COUPER et al, 2008), ao passo que em pacientes infectados com *P. vivax* já demonstrou-se aumento na quantidade de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, sugerindo ser esta célula Treg clássica a principal fonte de IL-10 no curso das infecções em humanos (BUENO et al, 2010). Neste último caso, a infecção também cursou com aumento de TGF- β .

A produção de IL-10 por linfócitos depende do estímulo de TGF- β (WALTHER et al, 2005; NIKURA et al, 2011). Resultados recentes (HAN et al, 2010; RIBEIRO et al, 2016) têm demonstrado infecções agudas por *P. vivax* apresentando IL-10 aumentada, porém com TGF- β reduzido, indicando que aquela citocina pode estar sendo produzida por uma fonte alternativa. Portanto, somente o paradigma Th1/Th2/Treg parece não ser suficiente para explicar o perfil de citocinas durante a infecção por *P. vivax*, tornando necessária uma investigação mais aprofundada da participação de outros tipos celulares no curso da infecção.

Neste contexto merecem atenção especial os macrófagos. Sua ativação é um processo presente em várias doenças, incluindo desordens metabólicas, doenças alérgicas e autoimunes, câncer, infecções virais e bacterianas, além de doenças parasitárias (MURRAY et al, 2014). Na

malária, a habilidade destas células mononucleares para fagocitar eritrócitos infectados mesmo na ausência de anticorpos citofílicos ou opsonizantes constitui-se em um dos principais mecanismos de reposta imune do hospedeiro nas fases iniciais da infecção (SERGUIDES et al, 2003).

Os macrófagos são reconhecidos como células heterogêneas, capazes de apresentar respostas funcionais polarizadas em relação a um estímulo ambiental. Esta capacidade de polarização os levou a serem classificados em M1-clássico (resposta imune inata) e M2-alternativo (fase de resolução da inflamação) (MANTOVANI et al, 2002; BRONTE e ZANOVELLO, 2005).

A origem dos termos “clássico” e “alternativo” data da década de 90 quando se observou pela primeira vez que a citocina IL-4 tinha a capacidade induzir aumento da expressão do receptor de manose em macrófagos murinos, ativando-os para um perfil alternativo, diferente dos efeitos produzidos por IFN- γ (STEIN et al, 1992). Somente alguns anos depois Mills e colaboradores (2000) propuseram as terminologias M1/M2 que não tinham o objetivo de descrever apenas macrófagos ativados ou inativados, mas células expressando diferentes programas metabólicos. A participação destes tipos funcionais de macrófagos em doenças como Esclerose Múltipla (KOUWENHOVEN et al, 2001), Lúpus (LI et al, 2010) e Filariose (SEMNANI, 2013) tem sido demonstrada. Porém, sua participação em outras doenças infecciosas, a exemplo da malária, e sua contribuição para o desfecho da infecção, ainda carecem de maiores explicações e podem ajudar a entender o comportamento imunológico dos indivíduos frente aos diversos parasitos.

A descrição da ativação de macrófagos é um processo ainda controverso e muitas vezes confuso (MURRAY et al, 2014), mas algumas características que diferenciam estes subtipos celulares já são bem conhecidas.

2.7 Caracterização de macrófagos

Os macrófagos polarizados se diferenciam quanto a produção de citocinas, expressão de receptores de membrana e função efetora (HUNTER et al, 2009).

Sabe-se que macrófagos M1 são ativados por IFN- γ ou LPS e produzem citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-23, além de regular positivamente a enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2), levando à produção de NO, molécula importante nos processos de reparação tecidual e controle de infecções pela morte dos parasitos (Figura 10) (MANTOVANI et al, 2002; BRONTE E ZANOVELLO, 2005, HAFALLA et al 2011).

IFN- γ pode ser produzido tanto por células da imunidade inata, quanto adaptativa. As células NK (natural killer- células da imunidade inata) são a fonte primária desta citocina que, ao ativar os macrófagos, desencadeiam a produção de reativos de oxigênio e nitrogênio por estes fagócitos e aumentam sua capacidade microbicida/citotóxica, propiciando resistência contra infecções. Porém, a produção de IFN- γ pelas células NK é transitória. Neste contexto, os linfócitos Th1 (T helper 1- células da imunidade adaptativa) assumem a produção de IFN- γ e propiciam a manutenção do perfil M1 de ativação. A atuação dos linfócitos T é antígeno específica, ao contrário dos macrófagos, que, após ativados, atuam independentemente do reconhecimento antigênico (MOSSER e EDWARDS, 2008).

De forma semelhante aos macrófagos M1, macrófagos M2 podem surgir em resposta tanto a estímulos inatos quanto adaptativos. Basófilos e mastócitos são a fonte de IL-4, um dos primeiros sinais inatos liberados quando ocorre alguma lesão tecidual (LOKE et al, 2007), contato com fungos ou mesmo parasitas. Porém, semelhante ao visto para M1, a manutenção de macrófagos M2 também é dependente da resposta adaptativa mediada por linfócitos Th2 (T helper 2), que desempenham tal atividade pela produção de IL-4 e IL-13, em resposta a danos de mucosas (REESE et al, 2007) ou mesmo de tecido não mucoso provocada por helmintos, por exemplo (WILSON et al, 2007).

Macrófagos M2, além de produzirem pequenas quantidades de citocinas pró-inflamatórias e grandes quantidades de IL-10, também regulam positivamente a produção de arginase I (argI). Desta forma, um ponto crítico que define a caracterização funcional destas células polarizadas é a forma como metabolizam a L-arginina. Macrófagos M1 metabolizam a L-arginina pela NOS2 para produzir NO, ao passo que macrófagos M2 metabolizam a L-arginina pela arginase I (argI) para produzir L-ornitina, molécula precursora de putrescina, espermidina, espermina e L-prolina (Figura 10), envolvidas em processo de reparação tissular e proliferação celular (MANTOVANI et al, 2002; BRONTE e ZANOVELLO, 2005; MIA et al, 2014). Das 3 formas existentes de NOS, a NOS2 é a que possui a capacidade de produzir as maiores quantidades de NO e é a isoforma presente em várias células do sistema imune, incluindo as células mielóides, ao passo que NOS1 está no tecido neuronal e NOS3 nas células endoteliais (ALDERTON et al, 2001). A avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) no plasma ou na urina é feita com a dosagem de seus metabólitos oxidados estáveis, tais como os nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) (GRANGER et al, 1996).

Há duas isoformas de arginase presentes na maioria dos mamíferos, que diferem por sua distribuição tecidual e localização subcelular. Arginase I (ARG I) é uma proteína citoplasmática

predominantemente expressa no fígado, mas também encontrada em grande quantidade nos eritrócitos (IYER et al, 1998), ao passo que a Arginase II (ARG II) é uma proteína mitocondrial de distribuição tecidual mais ampla, porém expressa constitutivamente em níveis reduzidos, especialmente em macrófagos, rins, cérebro e intestino delgado, sendo que tanto células endoteliais quanto macrófagos podem expressar as duas isoformas (WEINBERG et al, 2008).

A arginina, substrato para ação das enzimas NOS e Arginase, é considerada aminoácido essencial apenas em recém-nascidos e crianças. Nos adultos a maior parte da arginina disponível é proveniente da degradação de proteínas, mas também pode ser adquirida pela dieta. Apenas cerca de 5- 15% da arginina disponível em adultos é proveniente da síntese-de-novo a partir da citrulina (WEINBERG et al, 2008). É comum doenças inflamatórias e infecciosas cursarem com baixos níveis de arginina, pois nestas circunstâncias geralmente a dieta está prejudicada e a síntese-de-novo não é capaz de compensar o aumento que ocorre no catabolismo deste aminoácido (YU et al, 2001; ARGAMAN et al, 2003). Devido a competição pelo mesmo substrato, a presença da arginase pode limitar a produção de NO, mesmo na presença de grandes quantidades de NOS (WEINBERG et al, 2008). Desta forma, altos níveis de arginase estão associados ao prolongamento da infecção na esquistossomose, tripanossomíase e leishmaniose, provavelmente devido à depleção da arginina que limita a ação parasiticida do NO. Além disso, as poliaminas produzidas pela atividade da arginase também propiciam o crescimento do parasito (VINCENDEAU et al, 2003).

A produção de NO também é controlada em parte por um grupo de enzimas que são descritas por serem importantes na sobrevivência do parasito durante a infecção. Dentre elas, a superóxido dismutase (SOD), produzida pelos macrófagos e que faz parte de um grupo de metaloenzimas com função de proteger as células aeróbicas da ação do ânion superóxido (ANDRADE et al 2010).

Apesar de considerados uma importante linha de defesa do hospedeiro, fenótipos de ativação M1 determinam maior susceptibilidade imunológica, pois contribuem para o prolongamento do quadro inflamatório em curso (ANDERSON et al, 2004), para lesões teciduais em doenças inflamatórias crônicas (MIA et al, 2014) e até mesmo para o desenvolvimento de doenças autoimunes (MOSSER e EDWARDS, 2008). Em contrapartida, o fenótipo M2 está relacionado a propriedades imunossupressoras em contextos tumorais (TRAVES et al 2012) e infecciosos (SEMNANI et al, 2013; ANTHONY et al, 2006; ZHAO et al, 2008).

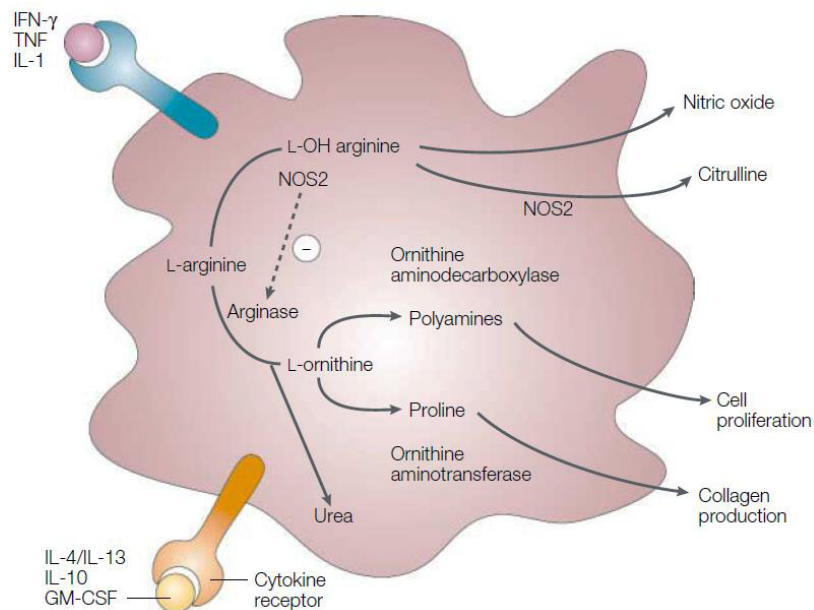


Figura 10. Metabolismo da L-arginina por macrófagos ativados
 Fonte: adaptado de GORDON S, 2003

Este contexto imunossupressor, apesar de importante para contrapor a exacerbação da resposta inflamatória, parece estar relacionado ao mecanismo de evasão de alguns parasitos, a exemplo do que já foi demonstrado para *Leishmania* spp (MILES et al, 2005) e *Trypanosoma* sp (BAETSELIER et al, 2001).

Desta forma, o perfil de polarização de macrófagos parece ter papel-chave no desenvolvimento de susceptibilidade/resistência nas infecções e o balanço de células M1/M2 pode determinar o desfecho do contexto patológico (MIA et al, 2014).

Assim, desenha-se uma perspectiva interessante na terapêutica de diversas doenças caracterizada pela manipulação deste balanço pela transferência de células pré-ativadas (SHECHTER e SCHWARTZ, 2013), que, até o momento, tem se mostrado mais promissor em modelos não humanos.

A transferência de células M2 poderia controlar a dinâmica lesiva de doenças caracterizadas pela prevalência de células M1. Porém, um ponto crítico desta modalidade terapêutica seria a capacidade de manutenção deste perfil regulador em um ambiente fortemente pró-inflamatório. Neste aspecto os resultados ainda são conflitantes. Mia e colaboradores (2014) demonstraram que um perfil regulador induzido *in vitro* por IL-4/IL-10/TGF- β pode ser mantido mesmo após desafio com LPS/IFN- γ . Além disso, demonstraram que mesmo macrófagos recuperados de pacientes com doença inflamatória crônica podem ser induzidos

para um perfil alternativo. Erwig e colaboradores (1998) demonstraram que a natureza do primeiro estímulo é que determina o estado final de polarização.

Na malária, sabe-se que a prevalência de um padrão pró-inflamatório culmina com o agravamento da infecção, ao passo que citocinas anti-inflamatórias são essenciais para contrabalancear este perfil e contribuir para um maior equilíbrio na relação parasito-hospedeiro (LYKE et al, 2004; ANDRADE et al, 2010). Tem-se atribuído este perfil de citocinas à participação de linfócitos T, porém restringir os eventos imunológicos que ocorrem na doença a estes tipos celulares tem deixado lacunas acerca de seus mecanismos imunopatológicos. Diante deste quadro, entender a participação de macrófagos polarizados no curso da infecção por *Plasmodium* poderá contribuir para elucidar os mecanismos imunes envolvidos e, desta forma, facilitar a proposição de novas medidas terapêuticas. Entre estas medidas imunoterápicas pode estar a manipulação dos perfis de polarização observados. Um equilíbrio, onde a resposta do hospedeiro não penda acentuadamente para nenhum destes perfis, poderia ser útil no controle da infecção e na redução da morbidade a ela relacionada. Desta forma, poderia se garantir, minimamente, uma malária mais branda.

Diante deste contexto, neste estudo foi avaliada a influência das diferentes variantes da Proteína Circunsporozoíta (CSP) sobre os níveis de citocinas plasmáticas circulantes, da carga parasitária e de enzimas relacionadas à resposta imune que determinam a atividade de macrófagos na infecção, tais como a arginase, a óxido nítrico sintase (NOS2) e a superóxido dismutase (SOD), em amostras de indivíduos infectados com *Plasmodium vivax* provenientes de uma área da pré-Amazônia brasileira

3 Objetivos

3.1 Capítulo 1

Objetivo Geral:

Caracterizar o perfil de citocinas e carga parasitária de pacientes infectados com *P. vivax* e avaliar a participação de polimorfismos da CSP na indução deste perfil.

Objetivos específicos:

- Quantificar a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-17, IL-10, IL-2 e TGF- β no plasma dos pacientes e no sobrenadante de cultura das células mononucleares do sangue periférico;
- Genotipar a CSP de *P. vivax* e confirmar o diagnóstico parasitológico por RFLP-PCR;
- Quantificar a carga parasitária por PCR em tempo real;
- Comparar a resposta de citocinas do plasma e do sobrenadante de cultura;
- Avaliar a influência das variantes da CSP sobre a carga parasitária e o perfil de citocinas.

3.2 Capítulo 2

Objetivo Geral

Caracterizar funcionalmente os macrófagos em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e avaliar sua correlação com o perfil de citocinas, com as variantes da CSP e com a carga parasitária.

Objetivos específicos

- Caracterizar funcionalmente os macrófagos dos pacientes *in vivo* pela dosagem de arginase, nitrito e superóxido dismutase (SOD) no plasma dos pacientes;
- Relacionar as atividades de arginase, SOD e a produção de nitritos à variante da CSP do parasito, à carga parasitária e ao perfil de citocinas do plasma;

4 Resultados

4.1 CAPÍTULO 1- Polymorphisms in *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-amazon Endemic Area from Brazil

Artigo publicado no periódico *Plos Neglected Tropical Diseases* (PLoS Negl Trop Dis 10(3): e0004479. doi:10.1371/journal.pntd.0004479), Qualis A1 em Medicina 1, Fator de Impacto 3.948

Versão do manuscrito: inglês americano

Short Title: CSP Polymorphisms and Malaria Outcome

Bruno de Paulo Ribeiro^{1,2}, Gustavo Capatti Cassiano³, Rodrigo Medeiros de Souza^{4,7}, Dalila Nunes Cysne², Marcos Augusto Grigolin Grisotto⁵, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos², Cláudio Romero Farias Marinho⁴, Ricardo Luiz Dantas Machado⁶, Flávia Raquel Fernandes Nascimento^{2*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil

² Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil

³ Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

⁴ Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo (ICB/USP), São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵ Laboratório de Imunologia das Parasitoses (Universidade CEUMA), São Luís, Maranhão, Brazil

⁶ Laboratório de Pesquisa Básica em Malária (Instituto Evandro Chagas / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde - IEC/SVS/MS), Belém, Pará, Brazil

⁷ Centro Multidisciplinar, Campus Floresta (Universidade Federal do Acre), Cruzeiro do Sul, Acre, Brazil

*Corresponding author

E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br (FRFN)

RESEARCH ARTICLE

Polymorphisms in *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil

Bruno de Paulo Ribeiro^{1,2}, Gustavo Capatti Cassiano³, Rodrigo Medeiros de Souza^{4,5}, Dalila Nunes Cysne², Marcos Augusto Grigolin Grisotto⁶, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos², Cláudio Romero Farias Marinho⁴, Ricardo Luiz Dantas Machado⁷, Flávia Raquel Fernandes Nascimento^{2*}



OPEN ACCESS

Citation: Ribeiro BP, Cassiano GC, de Souza RM, Cysne DN, Grisotto MAG, de Azevedo dos Santos APS, et al. (2016) Polymorphisms in *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 10(3): e0004479. doi:10.1371/journal.pntd.0004479

Editor: Moriya Tsuji, Aaron Diamond AIDS Research Center with the Rockefeller University, UNITED STATES

Received: August 24, 2015

Accepted: February 1, 2016

Published: March 4, 2016

Copyright: © 2016 Ribeiro et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão—Grant number: 0199/09; www.fapema.br to FRFN; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Grant number: 302129/2012-0; www.cnpq.br to FRFN; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Grant

1 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil, **2** Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil, **3** Centro de Investigação de Microorganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil, **4** Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo (ICB/USP), São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Centro Multidisciplinar, Campus Floresta (Universidade Federal do Acre), Cruzeiro do Sul, Acre, Brazil, **6** Laboratório de Imunologia das Parasitoses (Universidade CEUMA), São Luís, Maranhão, Brazil, **7** Laboratório de Pesquisa Básica em Malária (Instituto Evandro Chagas / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde—IEC/SVS/MS), Belém, Pará, Brazil

* nascimento1971@yahoo.com.br

Abstract

Mechanisms involved in severe *P. vivax* malaria remain unclear. Parasite polymorphisms, parasite load and host cytokine profile may influence the course of infection. In this study, we investigated the influence of circumsporozoite protein (CSP) polymorphisms on parasite load and cytokine profile in patients with *vivax* malaria. A cross-sectional study was carried out in three cities: São Luís, Cedral and Buriticupu, Maranhão state, Brazil, areas of high prevalence of *P. vivax*. Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) and transforming growth factor beta (TGF- β) were quantified in blood plasma of patients and in supernatants from peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures. Furthermore, the levels of cytokines and parasite load were correlated with VK210, VK247 and *P. vivax*-like CSP variants. Patients infected with *P. vivax* showed increased IL-10 and IL-6 levels, which correlated with the parasite load, however, in multiple comparisons, only IL-10 kept this association. A regulatory cytokine profile prevailed in plasma, while an inflammatory profile prevailed in PBMC culture supernatants and these patterns were related to CSP polymorphisms. VK247 infected patients showed higher parasitaemia and IL-6 concentrations, which were not associated to IL-10 anti-inflammatory effect. By contrast, in VK210 patients, these two cytokines showed a strong positive correlation and the parasite load was lower. Patients with the VK210 variant showed a regulatory cytokine profile in plasma, while those infected with the VK247 variant have a predominantly inflammatory cytokine profile and higher parasite loads, which altogether may result in more complications in infection. In conclusion, we propose that CSP polymorphisms is

number: 134159/2011-0; www.fapesp.br to BPR; and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo. Grant number: 2009/03889-0; www.fapesp.br to CRFM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

associated to the increase of non-regulated inflammatory immune responses, which in turn may be associated with the outcome of infection.

Author Summary

Recent evidences have associated *P. vivax* infections with clinical complications, previously only attributed to *P. falciparum* malaria. The interaction between host and parasite may contribute to severity of the disease, however, the specific contribution of each factor remains unclear. Previous studies have shown that polymorphisms in *Plasmodium vivax* CSP may interfere in systemic reactions, response to drug treatments, leading to different symptoms as well as humoral responses. In this study, we investigate whether these polymorphisms could influence the parasite load and cytokine profile, which altogether may influence the malaria outcome. In this sense, studies have shown that subjects with high parasitic loads, responding with production of pro-inflammatory cytokines develop a more severe disease. The present data indicate that VK247 variant are associated with significant higher parasite loads and pro-inflammatory cytokine profile compared to VK210 variant. In this regard, this study demonstrates that *P. vivax* CSP polymorphisms have systemic effects in the host immune response, and the investigation of immunogenicity of parasite proteins may provide evidences for a better understanding of this infection.

Introduction

Malaria caused by *Plasmodium vivax* is responsible for approximately 50% of malaria cases that occur outside Africa, predominantly in countries which are in the disease elimination or pre-elimination phase [1]. Once considered clinically mild when compared with *P. falciparum* infection, *P. vivax* malaria cause debilitating effects that affect social and economic indices of the endemic regions and has been associated with the occurrence of severe cases around the world, including Brazil [2–5]. The mechanisms involved in this process are poorly understood [1,6], however evidences of parasite virulence, host inflammation and parasite burden might play a key role in malaria outcome [2].

Parasite virulence can be determined by genetic variations in *Plasmodium*, particularly on genes encoding immunogenic parasite antigens, such as the repeated portion of the central region of circumsporozoite protein (CSP) [8], which is highly immunogenic, being one of the most studied epitopes of the *Plasmodium* genus [9]. In *P. vivax*, CSP exhibits two highly conserved terminal regions (N- and C-terminal) and one variable central region composed by two nonapeptides that repeat in tandem, GDRA(A/D)GQPA and ANGA(G/D)(N/D)QPG, characteristic of the VK210 and VK247 molecular variants, respectively [10,11]. In addition to these two variants, there is also a third variation, *P. vivax*-like, whose CSP present the repeated APGANQ(E/G)GGAA sequence [12].

In Brazil, serological and molecular studies have shown the prevalence of these genotypes across the country, especially in the Brazilian Amazon region as confirmed by molecular diagnosis, in a study carried out by Machado and Póvoa [13] in the states of Rondônia, Amapá and Pará. Interestingly, in this work the occurrence of VK210 variant was observed in single infections, whereas the VK247 and *P. vivax*-like variants were demonstrated only in mixed infections. The distribution of these variants was reassessed later in five endemic areas of Brazil, and VK210 still the most prevalent variant. However, these results showed a change in the

dynamics of the distribution of the VK247 and *P. vivax*-like variants because both of them were also observed in single infections [14].

Immunologically, the course of infection by *Plasmodium* depends on the balance in the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. In cases where an inflammatory pattern is prevalent, the disease tends to be more severe. In severe malaria, there is an increased level of inflammatory cytokines, such as interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin (IL)-6 [15,16]. In the other hand, high levels of IL-10 have also been reported in individuals with severe disease and has been associated with cerebral malaria. Nonetheless, the upregulation of IL-10 appears to occur after the increase in inflammatory cytokines, due to a regulatory mechanism, to prevent the exacerbated of inflammatory response and its deleterious effects [15–17].

There are still many questions concerning which factors inherent to the host and the parasite are responsible for increased systemic inflammation, parasite load and worsening of the disease. CSP variants infection may affect drug response, symptom severity and humoral response patterns in the host [13,18,19], however the influence of these variants in the cytokine response and parasite load remains unclear. Thus, the present study aimed to characterize the molecular variants of CSP and to correlate them with the cytokine profile and the parasite load in studied region. This research can demonstrate, even indirectly, differences in the degree of virulence of these *P. vivax* variants and clarify the immunological aspects of infection by *P. vivax* variants to understand this new scenario associated with the disease.

Materials and Methods

Study design, region and population

A cross-sectional study was conducted from January 2011 to February 2013 with *P. vivax*-infected patients from São Luís, Cedral and Buriticupu, a pre-Amazon region of the state of Maranhão, which presents a high prevalence of *P. vivax* infections. Eligible *P. vivax*-infected patients were selected among people who sought medical care at the Center for Infectious and Parasitic Diseases (CREDIP) in São Luís, Unit of Basic Health (UBS) in Cedral and Center of Health UFMA in Buriticupu. Epidemiological questionnaires were applied to every patient who freely agreed to participate the study. The patients group included individuals of both genders who were positive for *Plasmodium vivax* in thick blood smear and negative for *Plasmodium falciparum*, that had not yet received treatment. A control group included healthy individuals who lived in the same area, that were not infected with either *Plasmodium vivax* or *Plasmodium falciparum*. The thick blood smear malaria diagnosis was further confirmed by nested PCR with species-specific primers based on the *Plasmodium* small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) genes, as described by Singh and colleagues [20] with modifications (see [S1 Method](#)). The treatment recommended by Brazilian Ministry of Health was guaranteed for all patients, including those who did not agree to participate in the study.

Collection of plasma, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and erythrocytes

A total of 8 to 10 mL of blood was collected by standardized venipuncture in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tubes Vacutainer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Then, aliquots obtained from plasma were frozen at -80°C for subsequent evaluation of the cytokines concentration. Approximately 7 mL of the remaining blood was used to the separation process on a Ficoll-Paque PLUS gradient (GE Healthcare, New Jersey, USA) to obtain PBMC. The cells were then resuspended in 1 mL of RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, USA), supplemented

with 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, USA), 1% streptomycin (100 µg/mL, Merck), penicillin G (100 U/mL, Sigma, St. Louis, USA) and 10% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, USA). Samples were stained with Trypan Blue and cell counts and viability were assessed using a hemocytometer (Neubauer) chamber. Subsequently, the cells were cultured as posteriorly described. Erythrocytes were stored in two aliquots at -20°C to characterize the molecular variants of *P. vivax* and to quantify the parasite load as described later.

PBMC cultures

PBMCs (2×10^6 cells/mL/well) were plated in duplicates in 48-well flat bottom plates for 48 h at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂. After this period, the culture supernatants were collected and frozen at -80°C for subsequent analysis of the cytokines.

Determination of cytokines by cytometric bead array (CBA)

The concentrations of the IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-α, IL-17 cytokines were measured using CBA. Th1/Th2/Th17 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). The dosage of TGF-β was carried out using the Single Plex Flex Set (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) kit. A total of 50 µL of plasma sample and culture supernatants were analyzed in FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) previously calibrated with "setup beads" incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) according to the manufacturer's recommendations. A standard curve was performed for each cytokine. The results were analyzed in the FCAP Array Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and the values were expressed in pg/mL for each cytokine.

Genotyping of the CSP of *P. vivax*

Plasmodial DNA was extracted from an aliquot of erythrocytes using the Easy-DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the recommendations of the manufacturer. The amplification was performed according to the description by Cassiano and colleagues, with modifications [21]. A reaction mix with a final volume of 25 µL was obtained: *P. vivax* DNA, 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.6 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer (5' AGGACAGAGGACTTGGTGAGA 3' and 5'CCACAGGTTACACTGCATGG 3') and 1 U of Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The reaction was performed in a thermocycler (DNA MasterCycler, Eppendorf, Germany) as follows: an initial cycle of 94°C for 15 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. As a positive control, three plasmids were used, containing a gene insert of the repeat portion of CSP amplified from the VK210, VK247 and *P. vivax*-like variants (BlueScript, Stratagene, La Jolla, USA). For the negative control of the reaction, sterile water was used.

The *P. vivax* CSP variants were characterized by the analysis of the PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), following the method described by Cassiano and colleagues [21]. The digestion reaction was performed in a final volume of 20 µL: 10 U of AluI (Invitrogen), 2 µL of the enzyme reaction buffer, 10 µL of the PCR product and 7 µL of sterile DNase-free water. The reactions were performed in a water bath at 37°C overnight.

Quantification of the parasite load by real-time PCR (qPCR)

Plasmodial DNA was extracted from an aliquot of the blood using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the recommendations of the manufacturer. The qPCR was developed according to Gonçalves et al. [22], using the commercial kit Maxima

SYBR Green (Fermentas, Lithuania) and preparing a reaction mix with a final volume of 15 μ L: 7.5 μ L of Maxima SYBR Green master mixture, 0.5 μ M of each primer, 4.0 μ L of DNase-free water and 2 μ L of genomic DNA. The P1 genus-specific primer (5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3') was combined with a species-specific oligonucleotide primer for *P. vivax*, VI (5'-CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA-3'). These primers amplified a 100-bp species-specific fragment of the 18S rRNA gene.

The assays were performed in triplicate in a Mastercycler Realplex Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) and consisted in the denaturation of the template DNA at 95°C for 10 minutes and 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C, acquiring fluorescence at the end of each step of the extension. The amplification was immediately followed by a dissociation curve that consisted of 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 60°C and one gradual temperature increase of 0.2°C.s⁻¹ up to 95°C, acquiring fluorescence at each temperature transition. The result obtained by the software is expressed as the number of copies of the plasmodial genome in a DNA sample, which allows the estimation of the corresponding number of parasites in the sample. The sequence target possessed a length of about 100 base pairs. For quantitation of parasitemia it was used as standard an amplified fragment with oligonucleotide species-specific, purified and cloned into plasmid vector (pGEM T-Easy, Promega), used to transform bacteria DH10B strain. After confirmation of the sequence of cloned recombinant plasmids by sequencing, the solutions with the correct sequence were measured by spectrophotometry and the number of copies per μ L of the target sequence was calculated. It was constructed a curve with 10 points from the serial dilution (dilution factor: 10) of the plasmidial solution. The first point contained 1.468×10^9 copies of the target sequence and the qPCR quantification limit was 0.2 parasites/ μ L of blood.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 and Stata 12 softwares. The gender proportion on the variants was compared using Fisher's exact test. After the normality test of D'Agostino and Pearson, the differences observed in the cytokine profile were evaluated using the two-tailed Mann-Whitney test. For the correlation analyses, the values were log transformed, and the Spearman test was used to evaluate individual cytokines and parasite load associations. To verify the multiple association of cytokines with parasite load the multivariable linear regression model was used. Cytokines and parasite load data were expressed by median (interquartile range-IQR). Differences were considered significant when p values ≤ 0.05 .

Ethics considerations

The present study was approved by the Ethics and Research Committee of the Universidade Federal do Maranhão (Protocol no. 23115 008013/ 2010-07). All the study participants signed a written informed consent or had their legal guardians, if they were underage.

Results

Study samples and population

A total of 33 individuals tested positive for *P. vivax*, however 8 were excluded because they had already started treatment. The 25 remaining patients were from the pre-Amazon region of Maranhão, of both genders (24% were women and 76% were men) with mean of 32.9 years old (range 3 and 58 years). All patients were identified infected only with *P. vivax*. The healthy group consisted of nine individuals from pre-Amazon region, state of Maranhão, Brazil, which had similar profile to patients group, with mean of 29.4 years old (23% women and 77% men).

Genotyping of the CSP

The most prevalent genotype was VK210 (56%), followed by mixed infection (VK210/VK247) (24%) and VK247 (20%). None of the patients had the *P. vivax*-like variant. VK210, VK247 and mixed infection groups had a similar mean of age (38.7, 44.4 and 43.4 years, respectively). The gender difference was not statistically significant among VK210 and VK247 groups (85.8% and 80% of males, respectively) ($p = 1.0$). On the other hand, mixed infection group had a half of male patients (50%), but also was not statistically different of VK247 ($p = 0.54$) and VK210 ($p = 0.13$) proportion.

Plasma cytokine profile

The plasma levels of IL-2, IL-4, TNF- α and IL-17 were very low or undetectable in patients and healthy group. The concentrations of IL-6 (median of 1.75 pg/mL; IQR 0.005–18.7 pg/mL) (Fig 1A) and IL-10 (median of 33.05 pg/mL; IQR 3.9–135.4 pg/mL) (Fig 1B), in turn, were higher in individuals infected by *P. vivax* ($p = 0.0009$ and $p = 0.0002$, respectively) when compared to healthy group (median of zero for both IL-6 and IL-10). Conversely, the TGF- β concentration was lower in infected individuals (median of 22417 pg/mL; IQR 14341–33508 pg/mL) ($p = 0.0009$) when compared to healthy group (median of 90507 pg/mL; IQR 56580–107531 pg/mL) (Fig 1C). Only eight patients had detectable IFN- γ concentrations with a median of approximately zero; however, there was no significant difference compared to the healthy group (Fig 1D).

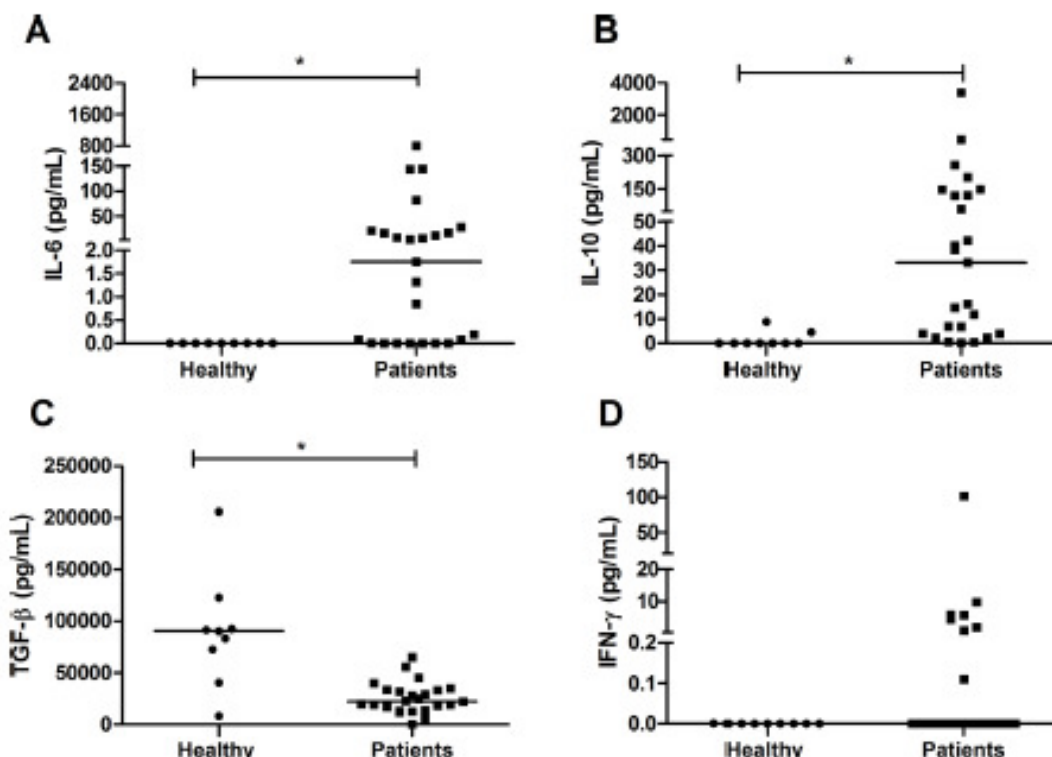


Fig 1. Cytokine profile in the plasma of patients infected with *P. vivax*. Cytokines were measured by CBA. A: Interleukin 6; B: Interleukin 10; C: Transforming growth factor beta; D: Interferon gamma. The bar represents the median of the group, $n = 25$ infected patients and 9 healthy patients (A, B, D) and $n = 24$ infected patients and 9 healthy patients (C). P values were determined by nonparametric Mann-Whitney U tests (* $p < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pntd.0004479.g001

Relation between cytokines and parasite load

The median parasite load quantified by qPCR was 837 parasites/ μ L (IQR 65–2000 parasites/ μ L), with positive correlation both with IL-6 ($r = 0.68$; $p = 0.0002$) and IL-10 ($r = 0.64$; $p = 0.0005$) (Fig 2A and 2B), indicating that these two cytokines tend to increase in response to a raise in parasitaemia. In addition to their correlation with the parasite load, IL-6 and IL-10 also had a positive correlation with each other ($r = 0.86$ and $p < 0.0001$) (Fig 2C). The correlation between the remaining cytokines was not performed due to very low or undetectable concentrations in the plasma of patients.

However, the multiple linear regression analyses among the IL-10, IL-6 and parasite load showed that only IL-10 keeps this association with parasite load ($r = 0.79$ and $p = 0.005$) (Table 1).

Influence of the CSP genotypes in the cytokine profile and in the parasite load

The parasite loads were higher in individuals infected by VK247 (median of 3.35 log parasites/ μ L; IQR 3.1–3.8 log parasites/ μ L) compared to patients infected by VK210 (median of 2.5 log parasites/ μ L; IQR 1.8–3.1 log parasites/ μ L) ($p = 0.05$) and patients with mixed infection (median of 1.8 log parasites/ μ L; IQR 0.52–3.1 log parasites/ μ L) ($p = 0.01$) (Fig 3A). The same fact was observed regarding IL-6 concentrations, which levels were higher in patients with VK247 (median of 16.7 pg/mL; IQR 13.9–82.39 pg/mL) compared to patients with VK210 (median of 1.08 pg/mL; IQR 0.0001–25.54 pg/mL) ($p = 0.04$) and to those with mixed infections (median of 0.08 pg/mL; IQR 0.0001–11.25 pg/mL) ($p = 0.05$) (Fig 3B).

The variants did not influence the IL-10 concentrations (Fig 3C), but in patients infected with VK210, the IL-10 levels correlated with IL-6 concentrations ($r = 0.92$ and $p < 0.0001$) (Fig 3E). However, in patients with VK247, this was not observed and no correlation between the two cytokines was found ($r = 0.3$ and $p = 0.68$) (Fig 3D), which indicates that the increase in inflammatory cytokines was not followed by the regulatory effect of IL-10 in these patients.

Cytokine profile in the culture supernatant

In the PBMC culture supernatants, only the IL-10 (median of 0.09 pg/mL; IQR 0.0001–2.5 pg/mL) and TNF- α (median of 10.02 pg/mL; IQR 0.78–52.06 pg/mL) concentrations were significantly different compared to the healthy group (median of zero for IL-10 and 54.98 pg/mL with IQR 23.3–375.6 pg/mL for TNF- α ; IL-10 was higher ($p = 0.03$) (Fig 4B) and TNF- α was lower ($p = 0.03$) (Fig 4C). In contrast to the results observed in the plasma, IL-6 produced by PBMCs of patients (median of 194 pg/mL; IQR 38.3–808.3 pg/mL) did not show a significant difference from the healthy group (median of 126 pg/mL; IQR 55.8–1472 pg/mL) (Fig 4A).

Interestingly, a different cytokine profile was observed between plasma and the PBMC cultures supernatants. The median IL-10 concentration was 367 times higher in the plasma from patients when compared to that of the culture supernatant. The concentration of the inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 were higher in the culture supernatant than in the plasma, and IL-6 reached 111 times higher concentrations in the supernatant (Fig 4D). Most patients had an increased IL-6 concentration in the culture supernatant compared to that in the plasma (Fig 4E). Individuals who exhibited a greater IL-10 response in the plasma (above 30 pg/mL) had cells that produced lower amounts of the same cytokine in culture (below 8 pg/mL) (Fig 4F). In addition, patients with low levels of IL-10 in the plasma maintained this low baseline production in culture supernatant. Altogether, these facts explain the small median value found for this cytokine in the culture supernatant. Little or no TNF- α production was detected in the

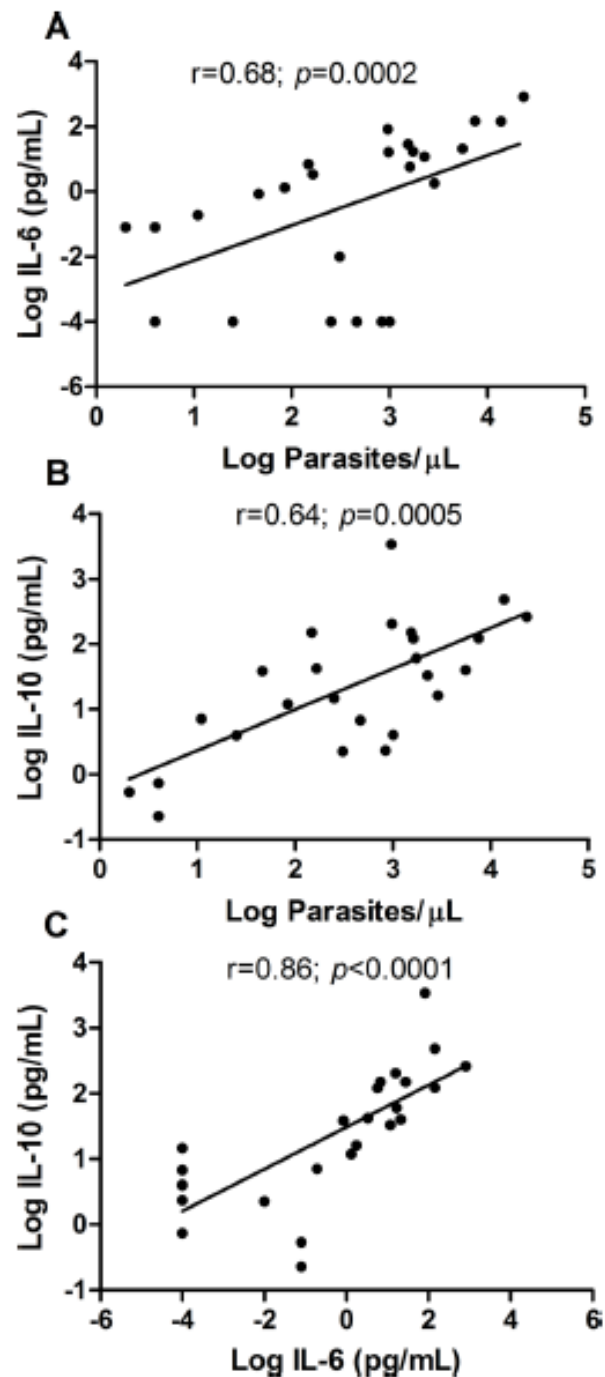


Fig 2. Correlation between parasite density and the cytokine profile. The x axis indicates Log Parasites/ μ L (A and B) or Log IL-6 (pg/mL) (C); the y axis indicates Log Interleukin 6 (pg/mL) (A), Log Interleukin 10 (pg/

mL) (B) and (C). Each point represents the relative parasitaemia and cytokine responses of a single patient (A and B) or represents the relative IL-10 and IL-6 (C) responses of a single patient, $n = 25$ infected patients. The correlations were determined by Spearman's correlation tests.

doi:10.1371/journal.pntd.0004479.g002

plasma of infected patients, however an increase in production was observed the culture supernatants (Fig 4G).

Discussion

P. vivax sporozoites are covered with CSP, a highly immunogenic protein, which is involved in invasion mechanisms into hepatocytes. In the present study, it was shown that the CSP polymorphisms are determinants for both the cytokine balance and the parasite load in vivax malaria. Further, the VK247 variant induced a more prominent inflammatory profile and the highest parasite loads, suggesting that these CSP polymorphisms have systemic effects changing variables that may influence the course of infection.

Initially, it was observed that patients infected with *P. vivax* showed increased plasma IL-10 and IL-6 levels which was associated with the parasite load. This result corroborates with other authors who demonstrated that increased concentrations of IL-6 and IL-10 producing cells, were associated with increased parasitaemia [16,23]. Our results support the notion that in the initial moments of the infection, the IL-6 concentration increased as a response to increase in parasite load and is subsequently controlled by IL-10 secretion as has been discussed for other authors [15–17]. This hypothesis was reinforced in this study by the multivariable regression analyses, which showed that, despite the individual correlation of parasite load with IL-6, only IL-10 is associated to parasite load in this context. Thus, we suggest that the increase of IL-6 induces a counter-regulatory IL-10 production, which, in turns, is crucial to the balance of the parasite-host interaction.

It is important to emphasize that the severity of the malaria is intrinsically related to inflammatory reaction and, despite the fact that IL-10 prevents the deleterious effects caused by a exacerbated inflammatory response [23,24], it may contribute to the maintenance of the parasite in the host, in an equilibrated relation. Hence, it is reasonable to think that the malaria outcome depends on the ability of parasite to regulate the inflammatory response by induction of IL-10 production. This hypothesis is reinforced by a murine model where it was demonstrated that IL-10 depleted mice are able to control parasite replication during *P. chabaudi* AS infection, however, they develop a severe malaria mediated by inflammatory cytokine action [25,26].

The cytokines IL-10, IL-6 and TNF- α were detected in the PBMC culture supernatants, however an inversion in the cytokines pattern was observed in relation to plasma levels (Fig 4D). The IL-10 concentration was higher in plasma than in the supernatant (Fig 4E), in the other hand inflammatory cytokines such IL-6 and TNF- α were higher in the supernatant (Fig 4E and 4F). These results suggest that despite the PBMC from patients produced more IL-10 than healthy individuals (Fig 4B), the IL-10 production was almost abolished in the absence of

Table 1. Multivariable analysis of correlation among cytokines and parasite load.

Factors	Log parasite load		
	Coefficient	p value	95% Conf. interval
Log IL-6	-0.002	0.980	-0.230; 0.224
Log IL-10	0.795	0.005	0.267; 1.324

doi:10.1371/journal.pntd.0004479.t001

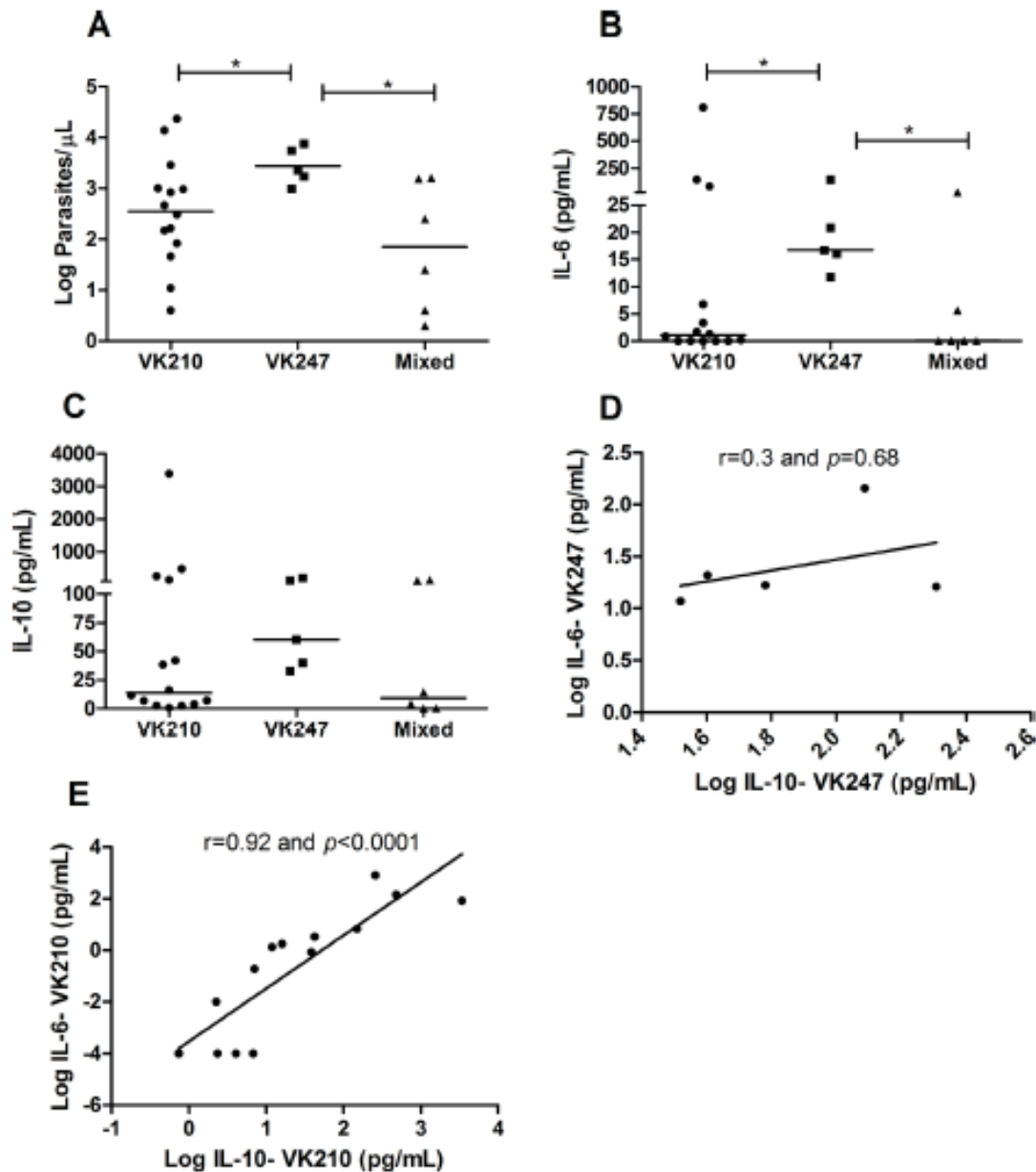


Fig 3. Cytokine profile and parasite density in *P. vivax* circumsporozoite protein (CSP) genotypes. Cytokines were measured by CBA and parasite density was determined by real-time PCR. A: Parasite density (Log parasites/μL); B: Interleukin 6 (pg/mL); C: Interleukin 10 (pg/mL); The bar represents the median of the group, $n = 25$ patients. P values were determined by nonparametric Mann-Whitney U tests ($*p<0.05$). In correlations analyses, the x axis indicates Log IL-10 patient concentrations (pg/mL) in VK247 (D) or VK210 (E); the y axis indicates Log IL-6 patient concentrations (pg/mL) in VK247 (D) or VK210 (E). Each point represents the relative IL-10 and IL-6 responses of a single patient. Correlations were determined by Spearman's correlation tests.

doi:10.1371/journal.pntd.0004479.g003

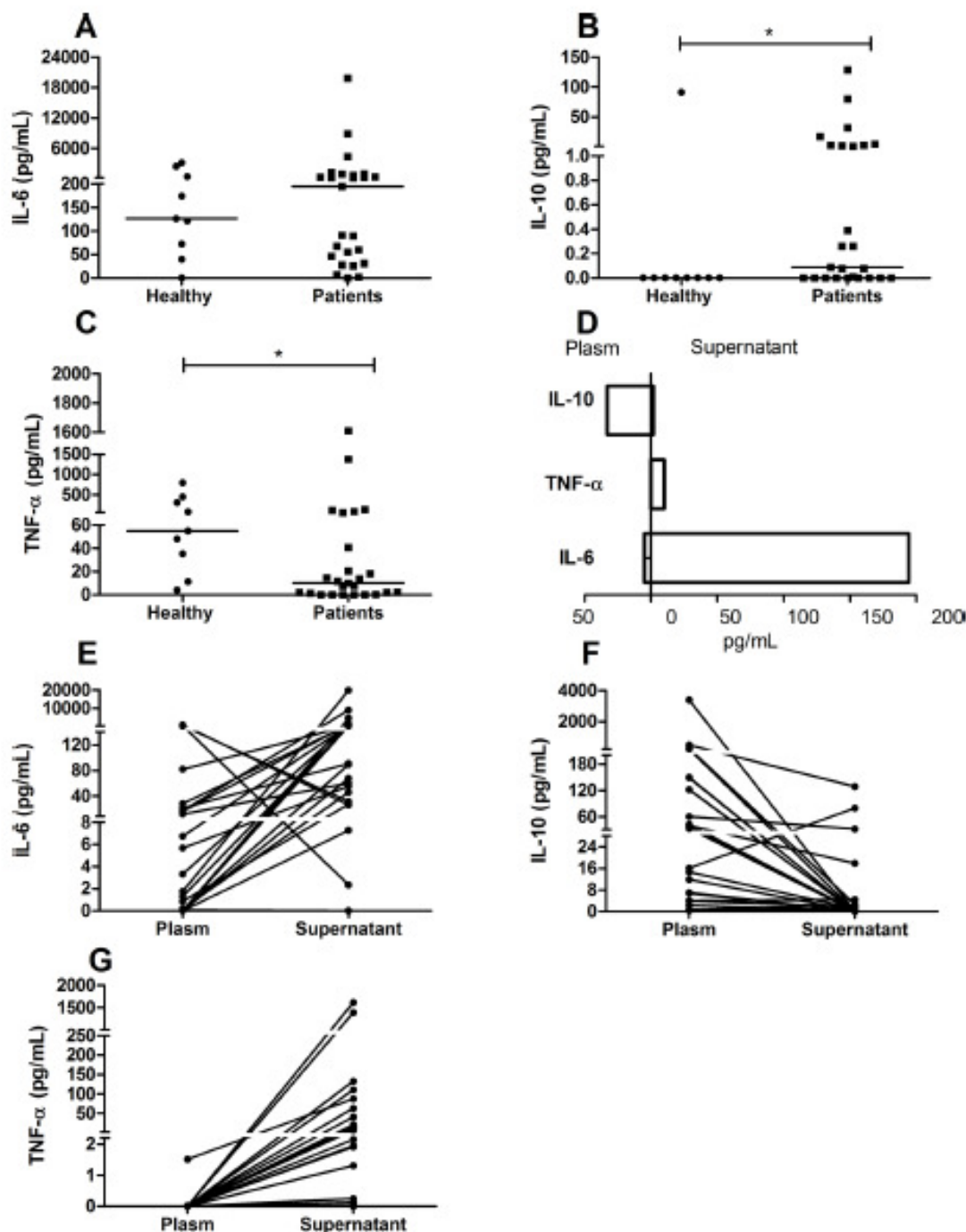


Fig 4. Cytokine profile in supernatant of patients infected with *P. vivax*. Cytokines were measured by CBA. A: Interleukin 6 (pg/mL); B: Interleukin 10 (pg/mL); C: Tumor necrosis factor alpha (pg/mL). The bar represents the median of the group, n = 25 patients and 9 healthy group. P values were determined

by nonparametric Mann-Whitney U tests ($*p \leq 0.05$). In E, F, and G, each point represents the relative plasma/supernatant IL-6 (E), IL-10 (F), and TNF- α (G) responses of a single patient. In D, the bars represent the median of each cytokine in the plasma or supernatant.

doi:10.1371/journal.pntd.0004479.g004

systemic influence of parasite (Fig 4D). Based on that we suppose that the regulatory pattern observed *in vivo* is not necessary *ex vivo* anymore, despite the presence of high levels of IL-6, differently from that observed *in vivo*, where the regulatory response was important to control IL-6.

Given this regulatory response that seems to occur *in vivo*, we investigated the influence of CSP gene polymorphisms on the plasmatic cytokine profile. The present study provided evidences, even that indirectly, of differences in the modulation of host response and malaria outcome among variants of this protein. In this study, there was a prevalence of VK210 in single infections, what corroborate with other studies performed in the same region [14,27]. This demonstrates that there was no dominance alternation among the variants along years in this endemic area.

It has already been shown that individuals with severe vivax malaria have an imbalance in their cytokine response toward an inflammatory profile and also have higher parasitemia compared to those with uncomplicated malaria [15]. Based on this fact, we investigated the influence of the variants on the parasite load of the individuals. The results of Fig 3A show that patients infected with VK247 exhibited a significantly higher parasite load than those with VK210 and mixed infections. This result differs from that found by Machado and Póvoa [13], who observed the greatest parasitaemia in individuals infected by VK210. This difference may be because the authors not found patients with VK247 in single infections, what impairs to compare the results. A possible hypothesis for VK247 higher parasite loads is the "immune selection" occurrence, since the constant VK210 prevalence over all these years in analyzed region may have generated high anti-VK210 antibody titers, hindering the infection establishment by this variant and facilitating by VK247. Even though we did not conduct the antibodies research, it is known that in Brazilian Amazon endemic areas there is a smaller antibody response to VK247 in the presence of VK210 [18].

Even though CSP expression occurs only in liver stage [28] the immunological response to this protein reflects in blood stage of the parasite, since it is a target not only to humoral response but also to a protective cellular response [29]. Moreover, in a murine model of natural infection, it was demonstrate that CSP-specific CD8+ T cells were primed by dendritic cells not only locally in liver but also in draining lymph nodes [30]. Beside this, it was found in a murine model that sporozoite antigen persists for over 8 weeks after immunization and remains being presented to naive cells, including those that are recently recruited from thymus [31].

In order to investigate the systemic influence of CSP variants, we performed correlation analysis of these variants with the plasmatic cytokines. A significant increase of IL-6 in patients with VK247 infection was observed when compared to VK210 and mixed infections (Fig 3B). On the other hand, there was no difference in IL-10 production among the groups (Fig 3C). Additionally, in patients with VK210 infection there was a significant positive correlation between IL-6 and IL-10, which suggests that the increase in inflammatory cytokines was followed by increase in the regulatory response in the same patients (Fig 3E), correlation that was not observed in VK247 infected patients (Fig 3D). These findings demonstrate that VK247 may cause a sustained and stronger inflammatory response than VK210 since this response was not followed by IL-10. Due to this absence of association, we suggest that the necessary equilibrium to control the infection is not present in the VK247, since there is a high inflammatory response and parasite load, without association to the counter-regulatory effect of IL-10 cytokine. Based on this context we suggest that VK247 may induce a more severe infection pattern.

Despite the apparent association of plasmatic inflammatory pattern to the variant, there was no significant difference in IL-6 and IL-10 in PBMC supernatant. Besides, there was no correlation between these cytokines in each variants groups (S1 Fig). This result from plasma and PBMC cultures demonstrates that the CSP variants may be, at least partially, different in their ability to induce initial inflammatory response.

In conclusion, we showed for the first time that *P. vivax* CSP polymorphisms may have systemic effects that influence the cytokine profile and parasite load. It is important to emphasize that VK247 is not common in single infection in the pre-Amazon region [13,14,27]. However, in our study, the sample of VK247 in single infection was representative since we had a high percentage (20%). Our findings represent an important step for better understanding the new scenario related to vivax malaria and shows that polymorphisms in immunogenic proteins of the parasite may be crucial to better understanding this infection and predict malaria outcome.

Supporting Information

S1 Fig. Cytokine profile in supernatant according circumsporozoite protein (CSP) genotypes. Cytokines were measured by CBA. A: Interleukin 6 (pg/mL); B: Interleukin 10 (pg/mL); The bar represents the median of the group, n = 25 patients. P values were determined by non-parametric Mann-Whitney U tests. In correlations analyses, the x axis indicates Log IL-6 supernatant concentrations (pg/mL) in VK210 (C) or VK247 (D); the y axis indicates Log IL-10 supernatant concentrations (pg/mL) in VK210 (C) or VK247 (D). Each point represents the relative IL-10 and IL-6 responses of a single patient. Correlations were determined by Spearman's correlation tests.

(TIF)

S1 Method. Nested PCR for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* characterization. To confirm the thick blood smear diagnosis was performed a nested PCR with species-specific primers based on the *Plasmodium* small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) genes.

(DOCX)

S1 Strobe. Checklist of items that should be included in cross-sectional studies. Detailed list of each item of a cross-sectional study and its location in the manuscript.

(DOCX)

S1 Dataset. Data underlying the findings described in manuscript. Complete and individual data about the cytokine concentrations, parasite load and characterization of CSP variants.

(XLSX)

Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Dr. Eloisa Gonçalves and Prof. Dr. Antônio Rafael, from the Reference Center for Infectious and Parasitic Diseases (Centro de Referência em Doenças Infeciosas e Parasitárias—CREDIP), Erika Mesquita and Guilherme Tude for the valuable help in the recruitment of patients. We also would like to thank Valéria Daltibari Fraga and Luciana Moran Conceição from School of Medicine of São José do Rio Preto (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto—FAMERP).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BdPR FRFN RLDM CRFM. Performed the experiments: BdPR DNC GCC RMdS. Analyzed the data: BdPR APSdAdS MAGG RLDM CRFM

FRFN. Contributed reagents/materials/analysis tools: FRFN RLDM CRFM. Wrote the paper: BIPR CRFM MAGG RLDM FRFN.

References

1. WHO. World Malaria Report 2013. Geneva: WHO; 2013.
2. Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MPG, Lacerda MV, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis. 2010; 16: 1611–4. doi: [10.3201/eid1610.100685](#) PMID: [20875292](#)
3. Genton B, D'Acremont V, Rane L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. PLoS Med. 2008; 5: e127. doi: [10.1371/journal.pmed.0050127](#) PMID: [18563961](#)
4. Kochhar DK, Das A, Kochhar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in Northwestern India. Am J Trop Med Hyg. 2009; 80: 194–198. PMID: [19190212](#)
5. Barber BE, William T, Grigg MJ, Menon J, Auburn S, Marfurt J, et al. A prospective comparative study of knowlesi, falciparum, and vivax malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium vivax* but no mortality with early referral and artesunate therapy. Clin Infect Dis. 2013; 56: 383–97. doi: [10.1093/cid/cir902](#) PMID: [23087389](#)
6. Marín-Méndez A, Bardaji A, Martínez-Espinosa FE, Bóto-Menezes C, Lacerda MV, Ortiz J, et al. Rosetting in *Plasmodium vivax*: a cytoadhesion phenotype associated with anaemia. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7: e2155. doi: [10.1371/journal.pntd.0002155](#) PMID: [23593522](#)
7. Gonçalves BP, Huang C-Y, Morrison R, Holte S, Kabyemela E, Prevots DR, et al. Parasite burden and severity of malaria in Tanzanian children. N Engl J Med. 2014; 370: 1799–1808. doi: [10.1056/NEJMoA1303944](#) PMID: [24806160](#)
8. De Souza-Neiras WC, de Melo LMS, Machado RLD. The genetic diversity of *Plasmodium vivax*—a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102: 245–54. PMID: [17568928](#)
9. Herrera S, Corradin G, Arevalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. Trends Parasitol. 2007; 23: 122–128. PMID: [17258937](#)
10. Annot DE, Bamwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Enos V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. Science. 1985; 230: 815–8. PMID: [2414847](#)
11. Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Science. 1989; 245: 973–6. PMID: [2672336](#)
12. Qari SH, Shi YP, Goldman IF, Udayakumar V, Alpers MP, Collins WE, et al. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. Lancet. 1993; 341: 780–3. PMID: [8095999](#)
13. Machado RLD, Póvoa MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and P. vivax-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94: 377–381. PMID: [11127238](#)
14. Storti-Melo LM, Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Joazeiro ACP, Fontes CJ, Bonini-Domingos CR, et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; 103: 672–678. doi: [10.1016/j.tsmh.2008.07.018](#) PMID: [18804827](#)
15. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Baral A et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. Malar J. 2010; 9: 13–20. doi: [10.1186/1475-2875-9-13](#) PMID: [20070895](#)
16. Lyke KE, Burges R, Cisakko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum levels of the proinflammatory IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12 (p70) in malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. Infect Immun. 2004; 72: 5630–5637. PMID: [15385460](#)
17. Medina TS, Costa SPT, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. Malar J. BioMed Central Ltd; 2011; 10: 264.
18. Souza-Neiras WC, Storti-Melo LM, Cassiano GC, Couto VSCA Couto ÁARA, Soares IS, et al. *Plasmodium vivax* circumsporozoite genotypes: a limited variation or new subspecies with major biological consequences? Malar J. 2010; 9: 178–185. doi: [10.1186/1475-2875-9-178](#) PMID: [20573199](#)

19. Kain KC, Brown AE, Lanoir DE, Ballou WR, Webster HK. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 49: 478–84. PMID: [8214278](#)
20. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60: 687–692. PMID: [10348249](#)
21. Cassiano GC, Storti-Melo LM, Póvoa MM, Galardo AKR, Rosati ARB, Machado RLD. Development of PCR-RFLP assay for the discrimination of *Plasmodium* species and variants of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in *Anopheles* mosquitoes. *Acta Trop*. Elsevier B.V.; 2011; 118: 118–122.
22. Gonçalves RM, Salmeida KC, Santos BAN, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun*. 2010; 78: 4763–4772. doi: [10.1128/IAI.00578-10](#) PMID: [20713627](#)
23. Bueno LL, Morais CG, Araújo FF, Silva JA, Cordeiro-Oliveira R, Soares IS, et al. *Plasmodium vivax*: Induction of CD4+CD25+Foxp3 regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One*. 2010; 5: 1–10.
24. Riley E, Wahl S, Perkins D, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006; 28: 35–49. PMID: [16438675](#)
25. Li C, Coraliza I, Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun*. 1999; 67: 4435–42. PMID: [10456884](#)
26. Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J. Pathology and mortality of *Plasmodium chabaudi* infection in IL-10-deficient mice is ameliorated by anti-TNF- α and exacerbated by anti-TGF- β antibodies. *Infect Immun*. 2003; 71: 4850–4856. PMID: [12933825](#)
27. Machado R, Filho A, Calvosa V, Figueiredo M, Nascimento J, Póvoa M. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia. *Brazilian J Infect Dis*. 2003; 7: 175–177.
28. Mueller A-K, Camargo N, Kaiser K, Andorfer C, Frevert U, Matuschewski K, et al. *Plasmodium* liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 3022–7. PMID: [15699336](#)
29. Hafalla JC, Silve O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. *Immunol Rev*. 2011; 240: 297–316. doi: [10.1111/j.1600-065X.2010.00988.x](#) PMID: [21349101](#)
30. Chakravarty S, Cockburn IA, Kuk S, Overstreet MG, Sacci JB, Zavala F. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat Med*. 2007; 13: 1035–1041. PMID: [17704784](#)
31. Cockburn IA, Chen YC, Overstreet MG, Lees JR, van Rooijen N, Farber DL, et al. Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8+ T cell responses against malaria liver stage parasites. *PLoS Pathog*. 2010; 6: 1–13.

Supplementary method

All patients had negative thick blood smear for *P. falciparum* and were positive for *P. vivax*. This was further confirmed by nested PCR with species-specific primers based on the *Plasmodium* small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) genes, as described by Singh and colleagues[1], with modifications, as follow:

“Plasmodial DNA was extracted from an aliquot of the concentrate of erythrocytes using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the recommendations of the manufacturer. The amplification was performed according to the description by Singh and colleagues., with modifications[1]. A reaction mix with a final volume of 25 µL was obtained: 5 µL of DNA template, 0.25 µM of each primer (rPLU 1 and rPLU 5), 4 mM MgCl₂ (Fermentas, Lithuania), 10 X PCR buffer (10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 0.08% v/v) (Fermentas, Lithuania), 0.12 mM of each dNTP (Roche) and 0.16 U of Taq DNA polymerase (Fermentas, Lithuania).

Nest 1 amplification conditions were as follows: step 1, 95°C for 4 min; step 2, denaturation at 95°C for 30 sec; step 3, annealing at 55°C for 1 min; step 4, extension at 72°C for 90 sec; repeat steps 2–4 35 times, and step 4 for 5 min. One microliter (1 µL) of the nest 1 amplification product served as the DNA template for the nest 2 amplifications. Nest 2 amplification conditions were identical to those of nest 1 except that the annealing temperature in step 3 was 58°C for the species-specific primers (rFAL 1 and 2, rVIV 1 and 2). The PCR products of nest 2 amplifications were analyzed by gel electrophoresis and staining with bromophenol blue.

The primers used were:

rPLU 1: 5'- TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA-3'

rPLU 5: 5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC-3'

rFAL 1: 5'- TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3'

rFAL 2: 5'- ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'

rVIV 1: 5'- CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'

rVIV 2: 5'- ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3'

Reference

1. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60: 687–692.

SUPPLEMENTARY FIGURE (FIG. S1)

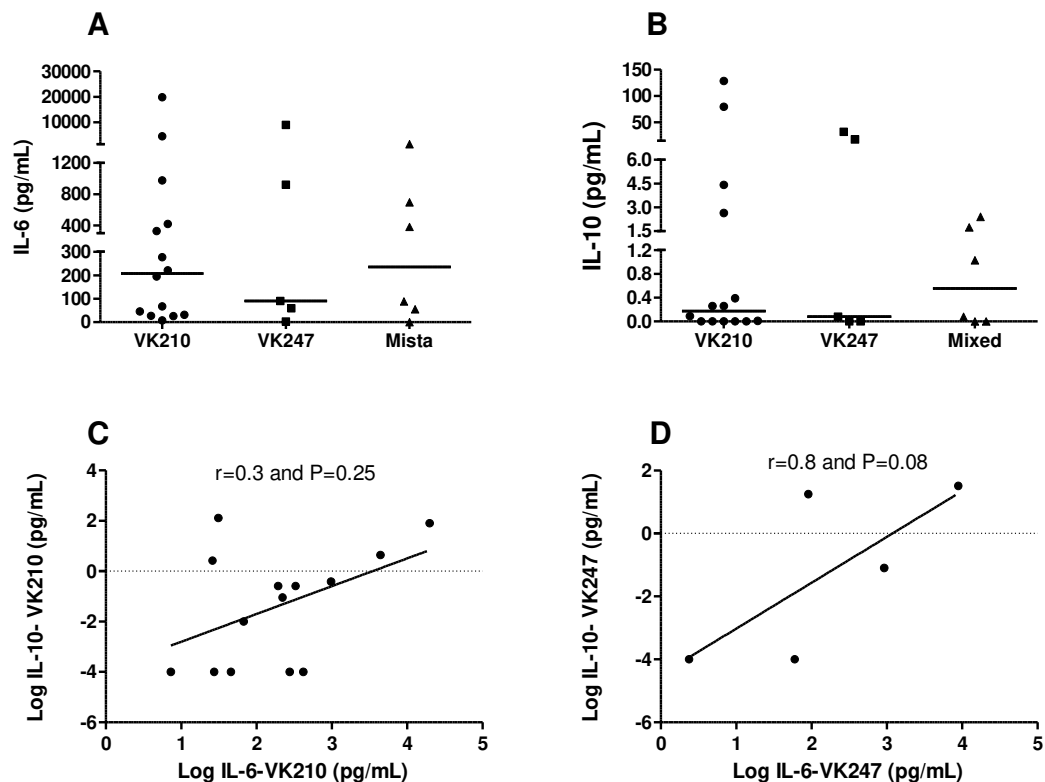


Fig. S1. Cytokine profile in supernatant according to circumsporozoite protein (CSP) genotypes. Cytokines were measured by CBA. A: Interleukin 6 (pg/mL); B: Interleukin 10 (pg/mL); The bar represents the median of the group, $n=25$ patients. P values were determined by nonparametric Mann-Whitney U tests. In correlations analyses, the x axis indicates Log IL-6 supernatant concentrations (pg/mL) in VK210 (C) or VK247 (D); the y axis indicates Log IL-10 supernatant concentrations (pg/mL) in VK210 (C) or VK247 (D). Each point represents the relative IL-10 and IL-6 responses of a single patient. Correlations were determined by Spearman's correlation tests.

4.2 CAPÍTULO 2- Avaliação da influência de aspectos parasitários e resposta de citocinas sobre a caracterização funcional de macrófagos em indivíduos infectados por *Plasmodium vivax*

O artigo será submetido ao periódico Malaria Journal, Qualis B1 em Medicina 1, Fator de Impacto 3.079

Bruno de Paulo Ribeiro^{1,2}, Gustavo Capatti Cassiano³, Rodrigo Medeiros de Souza^{4,5}, Dalila Nunes Cysne², Domingos Magno Santos Pereira⁶, Marcos Augusto Grigolin Grisotto⁶, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos², Elizabeth Soares Fernandes⁶, Cláudio Romero Farias Marinho⁴, Ricardo Luiz Dantas Machado⁷, Flávia Raquel Fernandes Nascimento^{2*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil

² Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil

³ Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

⁴ Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo (ICB/USP), São Paulo, São Paulo, Brasil

⁵ Centro Multidisciplinar, Campus Floresta (Universidade Federal do Acre), Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil

⁶ Laboratório de Imunologia das Parasitoses (Universidade CEUMA), São Luís, Maranhão, Brasil

⁷ Laboratório de Pesquisa Básica em Malária (Instituto Evandro Chagas / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde - IEC/SVS/MS), Belém, Pará, Brasil

*Autor de correspondência

E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br (FRFN)

Resumo

Os macrófagos clássicos (M1) e alternativos (M2) se diferenciam funcionalmente pela forma como metabolizam a L-arginina e pelas citocinas que produzem. Macrófagos M1 secretam principalmente citocinas inflamatórias ao passo que os M2 produzem citocinas reguladoras. A IL-10, citocina com propriedades anti-inflamatórias tem papel crucial na malária e sua produção é quase sempre atribuída a linfócitos T reguladores, de forma dependente de TGF- β . Porém, resultados recentes têm demonstrado que sua produção também pode ocorrer por fontes independentes desta citocina. Neste aspecto, investigar a participação de macrófagos polarizados na fase aguda da malária pode contribuir para melhor compreensão da dinâmica da infecção. Neste trabalho, amostras de 25 pacientes infectados exclusivamente por *P. vivax* e 9 controles saudáveis foram coletadas e processadas para obtenção do plasma, dos eritrócitos e das células mononucleares (PBMCs). Foram dosadas as atividades da arginase, da superóxido dismutase (SOD) e da NOS2 (via produção de nitritos) no plasma e no sobrenadante de cultura das PBMCs, enzimas que caracterizam funcionalmente a atividade dos macrófagos. Avaliou-se então a participação de Polimorfismos da CSP de *P. vivax* e da carga parasitária na indução do perfil observado. As atividades de arginase e SOD foram maiores em pacientes agudamente infectados com *P. vivax*, sendo que pacientes infectados exclusivamente com variante VK210 apresentaram as maiores atividades de arginase em relação aos outros grupos. Nenhuma das enzimas correlacionou-se com a parasitemia. Pode ser sugerido, portanto, ainda que indiretamente, que macrófagos reguladores podem atuar nesta fase da infecção e que polimorfismos da CSP têm efeitos sistêmicos que afetam diretamente este perfil e, consequentemente, a resposta imune do hospedeiro.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*; Proteína Circunsporozoíta; Macrófagos; Arginase; Superóxido Dismutase; Óxido Nítrico Sintase.

Introdução

O quadro clínico clássico da malária, caracterizado por febre, calafrios, sudorese, astenia e cefaleia, coincide com a esquizogonia eritrocitária (HALDAR E MOHANDAS, 2009) e se desenvolve logo nos momentos iniciais do ciclo sanguíneo devido à resposta inflamatória de citocinas desencadeada por células da imunidade inata visando controlar a parasitemia (STEVENSON e RILEY, 2004). Porém, esta resposta inflamatória, ao mesmo tempo que é importante para o controle da infecção, precisa ser limitada por mecanismos reguladores, pois também é lesiva ao próprio hospedeiro (ANSTEY et al, 2009; JAIN et al, 2010; BUENO et al, 2010).

A principal citocina envolvida neste controle é a IL-10. Dada sua importância na infecção, muito tem se discutido sobre sua principal fonte na malária, porém os dados disponíveis ainda são antagônicos (COUPER et al, 2008; GONÇALVES et al, 2012; ROSARIO et al, 2012).

Células regulatórias clássicas e não clássicas já foram encontradas como fonte de IL-10 em diferentes modelos de malária murina e humana. Neste aspecto, estudo em modelo de malária murina com *P. chabaudi* encontrou células Th1 efectoras como fonte desta citocina (ROSARIO et al, 2012), ao passo que em modelo com *P. yoelii* foram as células T regulatórias tipo 1 (Tr1) adaptativas as responsáveis por sua produção. As células Tr1 se diferenciam das células T clássicas pelos marcadores de superfície e também por não produzirem citocinas Th1, Th2 ou Th17 (COUPER et al, 2008). Em contrapartida, em modelo humano, demonstrou-se aumento na quantidade de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em pacientes infectados com *P. vivax*, sugerindo ser esta célula T clássica a principal fonte de IL-10 no curso das infecções que, neste caso, também cursou com aumento de TGF-β (BUENO et al, 2010).

Porém, sabe-se que os linfócitos Treg dependem de IL-2 para se manterem na periferia (COUPER et al, 2008) e que a produção de IL-10 por estes tipos celulares depende do estímulo de TGF-β (FAHLÉN et al, 2005; WALTHER et al, 2005; NIIKURA et al, 2011). Resultados recentes em pesquisas envolvendo malária vivax têm encontrado hospedeiros apresentando elevados níveis de IL-10, porém com TGF-β reduzido (HAN et al, 2010; RIBEIRO et al, 2016), indicando ausência de relação entre as duas citocinas e levando a questionamentos acerca de sua provável fonte na fase aguda da infecção.

Neste cenário, ganham destaque os macrófagos, reconhecidos como células heterogêneas capazes de produzir IL-10 e de apresentar respostas funcionais polarizadas em relação a um estímulo inflamatório. Esta polarização de respostas levou os macrófagos a serem classificados

em M1 (resposta imune inata) e M2 (fase de resolução da inflamação) que, funcionalmente, se diferenciam pela forma como metabolizam a L-arginina. Macrófagos M1 metabolizam a L-arginina pela NOS2 para produzir NO, ao passo que macrófagos M2 metabolizam a L-arginina pela arginase I (argI) para produzir L-ornitina, molécula precursora de putrescina, espermidina, espermina e L-prolina, envolvidas em processo de reparação tissular e proliferação celular (MANTOVANI et al, 2002; BRONTE E ZANOVELLO, 2005), porém a definição das características de macrófagos polarizados ainda é crítica e sua participação na malária permanece desconhecida.

A importância de células mielóides, tais como macrófagos e células dendríticas (DCs) vai além de sua capacidade para fagocitar e destruir patógenos. Estas células também iniciam a ativação de linfócitos T e são responsáveis por sua desativação para evitar danos aos tecidos quando a infecção já está sob controle. Uma das vias pelas quais as células supressoras mielóides realizam este controle é pela regulação do metabolismo da arginase (BRONTE E ZANOVELLO, 2005). Em modelo experimental com carcinoma de próstata em humanos foi demonstrado que o aumento do metabolismo da L-arginina por células mielóides pode culminar em redução da ativação de linfócitos T (BRONTE et al, 2005).

Logo, apesar de classicamente atribuída a linfócitos T reguladores, na malária, a produção de IL-10 pode ocorrer por fontes alternativas e independentes de TGF- β (COUPER et al, 2008; BUENO et al, 2010; ROSARIO et al, 2012), porém este mecanismo ainda não está completamente elucidado. Neste aspecto, investigamos funcionalmente a participação de macrófagos polarizados na fase aguda da infecção, caracterizando as principais enzimas que determinam a atividade destes fagócitos e avaliando a participação de variáveis parasitárias na indução do perfil observado. Pesquisas como esta podem fornecer novos alvos para intervenções em quadros de infecção por malária, além de contribuir com novos esclarecimentos acerca da imunopatologia da infecção.

Material e Métodos

Perfil amostral, obtenção do plasma e das PBMCs e genotipagem da CSP

Pacientes de ambos os gêneros provenientes das cidades de São Luís, Cedral e Buriticupu com gota espessa positiva para *P. vivax* e negativa para *P. falciparum* e que aceitaram participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O grupo controle foi composto por indivíduos da mesma área e com gota espessa

negativa para *Plasmodium*. Após a coleta, foram obtidos o plasma e as PBMCs dos indivíduos e seus eritrócitos foram utilizados para genotipar a CSP de *P. vivax*, conforme método descrito por Ribeiro et al (2016).

Cultura das PBMCs

As PBMCs (2×10^6 células/mL/poço) foram transferidas em duplicata para a placa de 48 poços e mantidas em cultura (estufa 5% CO₂) por 48 horas. Ao final deste período, o sobrenadante foi coletado e congelado à -80°C para caracterização das atividades de SOD e Arginase e para a dosagem de citocinas.

Quantificação das citocinas por CBA

A concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF, IL-17 e TGF- β foi mensurada utilizando a técnica de Arranjo Citométrico de Esferas (CBA), utilizando o kit para citocinas humanas Th1/Th2/Th17 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). Para a dosagem de TGF- β foi utilizado o kit Human TGF- β 1 Single Plex Flex Set (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).

Cinquenta microlitros dos plasmas e sobrenadantes de cultura foram analisados utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), previamente calibrado utilizando “setup beads” incubadas com FITC (Isotilcianato de Fluoresceína) ou PE, conforme as recomendações do fabricante. Uma curva padrão foi delineada para cada citocina. Os resultados foram analisados no software FCAP Array Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

Quantificação de nitrito (NO^x) pelo ensaio de Griess

A concentração de Nitritos (NO₂⁻)/Nitratos (NO₃⁻) foi avaliada pelo ensaio de Griess conforme descrito por Fernandes et al (2012). Todos os reagentes utilizados para a quantificação dos nitritos foram obtidos junto à Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

A incubação de 80 μ L das amostras com 20 μ L de nitrato redutase 1U.mL⁻¹ e 10 μ L de NADPH em estufa à 37°C por 30 minutos reduziu os nitratos (NO₃⁻) presente no plasma dos pacientes para Nitritos (NO₂⁻). Após do período de incubação, foram adicionados 100 μ L do reagente de Griess e a placa foi novamente incubada à 37°C por 15 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 550 nm e, após subtrair a leitura de seus respectivos brancos, a concentração de nitritos foi determinada utilizando a curva padrão (80 μ L do padrão de nitrito 1M diluído seriadamente nas concentrações de 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.4, 4.7, 2.3 e 0 μ M) e seus resultados foram expressos em μ M.

Dosagem de Arginase

Todos os reagentes utilizados para determinação da atividade da arginase foram provenientes do kit de Ensaio da Atividade da Arginase (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Cem microlitros dos plasmas ou sobrenadantes foram filtrados para retirada da ureia fisiológica utilizando-se os filtros Amicon Ultra 0,5 mL- MWCO 10KDa (Merck, Darmstadt, Alemanha) e centrifugando as amostras à 14000g por 1 hora.

Ao final da filtração, metade do volume obtido foi incubado à 37° por 2 horas com 10 µL do substrato tamponado contendo arginina. Após este período, foram adicionados 200 µL do "reagente ureia" e a placa foi novamente incubada por 1 hora à temperatura ambiente.

A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 430 nm e, após subtrair a leitura de seus respectivos brancos, determinou-se a atividade de arginase nas amostras utilizando-se como referência a absorbância obtida para 50 µL do padrão de ureia (1mM), seguindo a fórmula abaixo descrita pelo fabricante, na qual “T” é o tempo de reação (min), “V” é o volume de amostra utilizada após a filtração, “1mM” é a concentração do padrão de ureia e “50” é o volume de reação do padrão. Os resultados foram expressos em unidades/litro, onde 1 unidade de arginase é a quantidade de enzima que converte 1 µmole de L-arginina à ornitina e ureia por minuto à 37°C e pH 9,5.

$$\frac{\text{Aamostra- Branco}}{\text{Apadrão- Água}} \times \frac{(1\text{mM} \times 50 \times 10^3)}{(V \times T)} = \text{Atividade de Arginase}$$

Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD)

Todos os reagentes utilizados para determinação da atividade da SOD foram provenientes do kit de Ensaio da SOD (Sigma- Aldrich, St. Louis, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Vinte microlitros dos plasmas ou sobrenadantes foram incubados à 37° C por 20 minutos com 20 µL da solução de xantina oxidase e 200 µL da solução WST (sal de tetrazolium).

A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 450 nm e, após obter a leitura dos brancos, os resultados foram expressos na forma de atividade da SOD (%), calculada em relação ao padrão de atividade mínima de SOD (100% de formação do corante WST-Formazan) representado pelo branco 1, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\frac{(\text{Abranco1} - \text{Abranco3}) - (\text{Aamostra} - \text{Abranco2})}{(\text{Abranco1} - \text{Abranco3})} \times 100 = \text{Atividade da SOD (\%)}$$

Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Para determinar se a variabilidade das amostras seguia um padrão de distribuição normal foi aplicado o teste de D' Agostino-Pearson. A significância das diferenças observadas entre pacientes e controles foi determinada utilizando-se teste bicaudal de Mann-Whitney. Para as análises de correlação foi utilizado o teste de Spearman. Para a caracterização de resultados "Outliers" foi utilizado o Teste de Grubbs. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de $p \leq 0,05$.

Resultados

Atividade da Arginase

Os pacientes infectados com *P. vivax* apresentaram aumento da atividade de arginase no plasma ($P=0.03$) (Figura 1A), com uma atividade mediana de 19.2 und/L (intervalo interquartil: 9.9- 23.6 und/L) e de 7.6 und/L (intervalo interquartil: 6.6- 12.9 und/L), nos pacientes e nos controles, respectivamente.

Este aumento de atividade da arginase desaparece com a retirada do parasito na cultura de 48 h (figura 1B). A figura 1C demonstra que a maioria dos pacientes (91%) que possuíam elevada atividade de arginase no plasma tem a ação desta enzima reduzida após 48 h sem contato com o parasito.

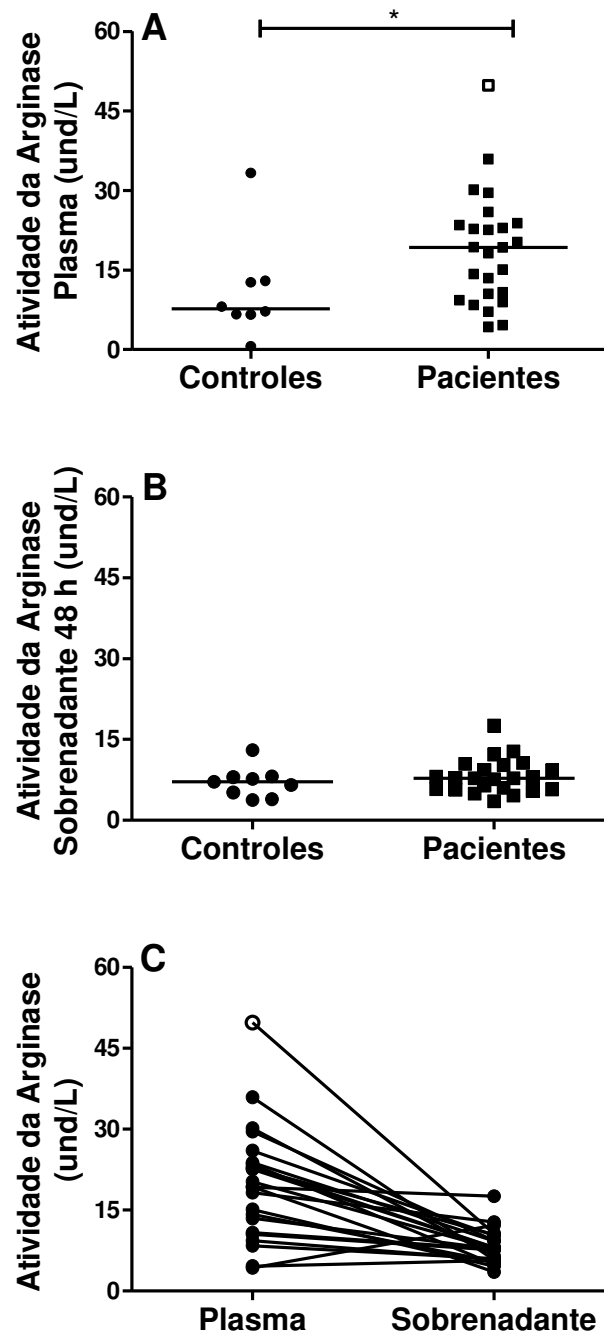


Figura 1. Atividade da Arginase no plasma e sobrenadante de cultura de 48 h de pacientes infectados com *P. vivax*. A atividade da arginase foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o kit de Ensaio da Atividade da Arginase (Sigma Aldrich). A barra representa a mediana dos grupos. A: atividade da arginase no plasma (n=25 pacientes e 8 controles); B: atividade da arginase no sobrenadante de cultura de 48 h das PBMCs (n=23 pacientes e 9 controles); C: Variação individual da atividade de arginase dos pacientes entre plasma e sobrenadante de cultura (n= 23 pacientes). Em A e C, pacientes representados por (○) e (□) foram considerados Outliers (teste de Grubbs com $p \leq 0.05$)

Produção de Nitrito no plasma

A concentração mediana de nitritos no plasma dos pacientes foi de 5.38 μM (intervalo interquartil 4.4- 5.6 μM), não apresentando diferença significativa em relação aos indivíduos saudáveis, nos quais sua concentração foi de 4.82 μM (intervalo interquartil 3.0- 5.6 μM) ($P=0.84$) (Figura 2).

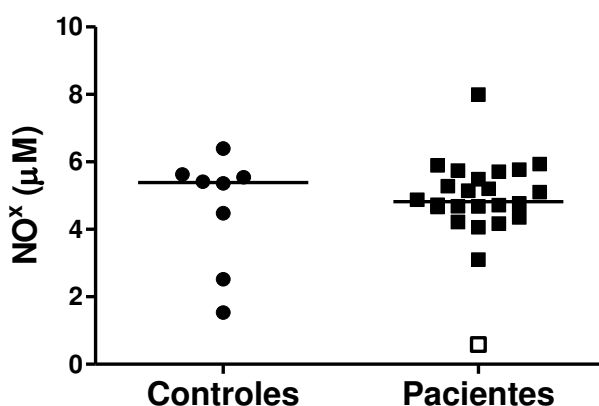


Figura 2. Produção de nitrito no plasma de pacientes infectados com *P. vivax*. A concentração de nitrito foi determinada pelo ensaio de Griess. A barra representa a mediana dos grupos; n=24 pacientes e 8 controles. Paciente representado por (□) foi considerado Outlier (teste de Grubbs com $p \leq 0.05$)

Atividade da SOD

Os pacientes infectados com *P. vivax* apresentaram aumento da atividade da Superóxido Dismutase no plasma ($P=0.02$) (Figura 3A), com uma atividade mediana de 77.88% (intervalo interquartil 66.7- 88.2 %), ao passo que nos controles esta atividade mediana foi de 60.47% (intervalo interquartil 51.5- 64.5 %).

Não houve diferença na atividade da enzima no sobrenadante de 48 h das PBMCs (Figura 3B). A avaliação individual da resposta entre o plasma e o sobrenadante mostrou que a maioria (91%) dos pacientes que possuíam elevada atividade da SOD no plasma tem a ação desta enzima reduzida no sobrenadante (Figura 3C).

Influência do Polimorfismo da Proteína Circunsporozoíta (CSP)

A variante VK210 induziu aumento na atividade de arginase (mediana 19.2 und/L; intervalo interquartil 13.8- 23.6 und/L) em relação a VK247 (mediana 9.1 und/L; intervalo interquartil 5.4- 10.2 und/L) ($P=0.02$) (Figura 4A). A atividade de SOD e a produção de nitritos não sofreu influência dos polimorfismos da CSP.

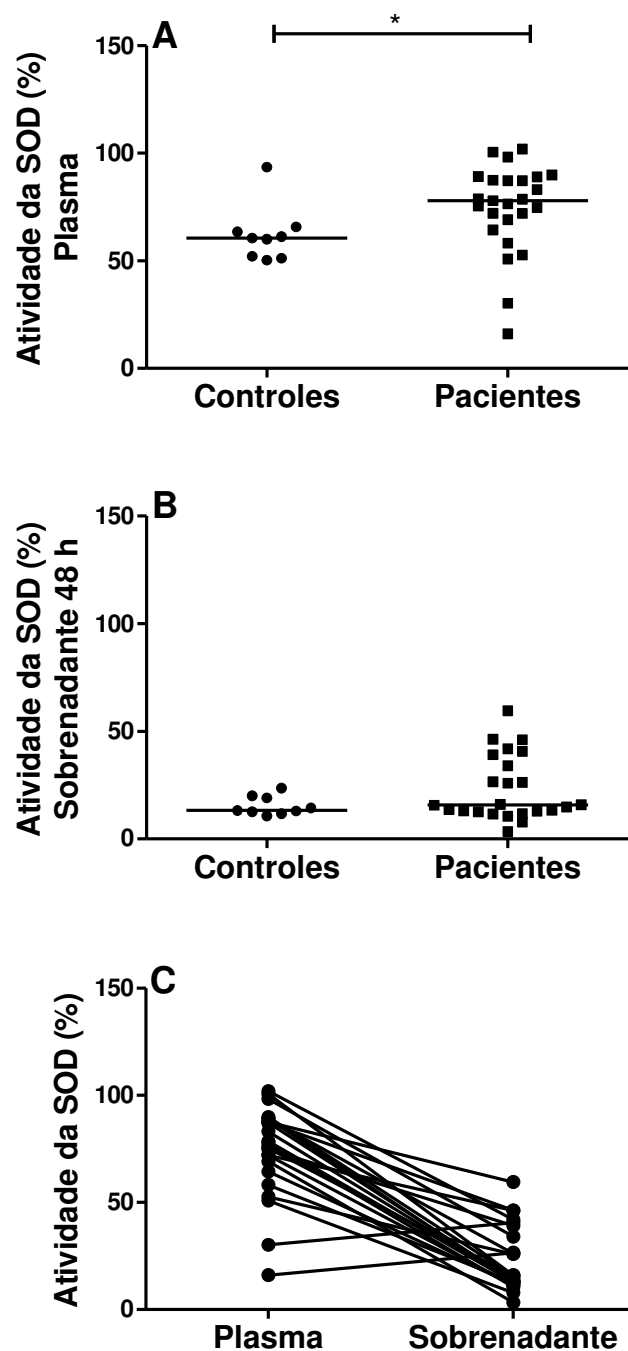


Figura 3. Atividade da SOD no plasma e sobrenadante de cultura de 48 h de pacientes infectados com *P. vivax*. A atividade da SOD foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o kit de Ensaio da Atividade da SOD (Sigma Aldrich). A barra representa a mediana dos grupos. A: atividade da SOD no plasma (n=25 pacientes e 9 controles); B: atividade da SOD no sobrenadante de cultura de 48 h das PBMCs (n=24 pacientes e 9 controles); C: Variação individual da atividade da SOD dos pacientes entre plasma e sobrenadante de cultura de 48h (n= 24 pacientes).

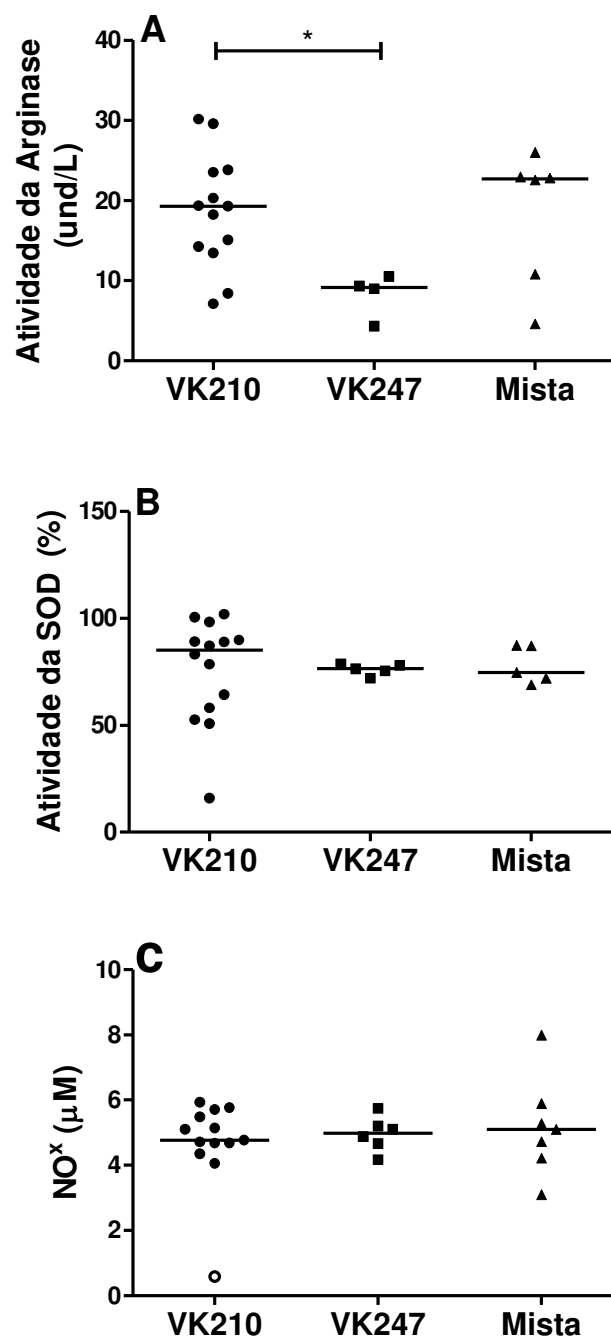


Figura 4. Influência de polimorfismos da CSP sobre a atividade da arginase, SOD e concentração de nitritos em pacientes infectados com *P. vivax*. As atividades da arginase, SOD e nitrito foram determinadas por ensaio colorimétrico e as variantes caracterizadas por PCR-RFLP. As barras representam a mediana dos grupos. Em A: Influência das variantes sobre a atividade da arginase; B: Influência das variantes sobre a atividade da SOD; C: Influência das variantes sobre a produção de nitritos. Em A e C, pacientes representados por (○) e (□) foram considerados Outliers (teste de Grubbs com $p \leq 0.05$).

Influência da parasitemia

Nenhum dos parâmetros analisados apresentou correlação com a carga parasitária (Figura 5).

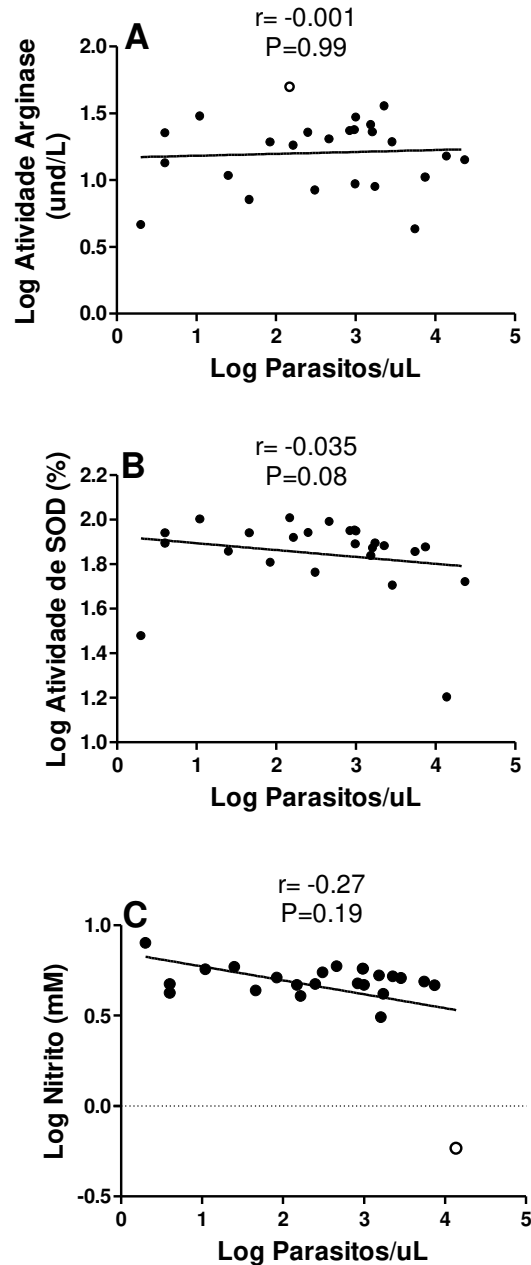


Figura 5. Correlação entre as atividades da Arginase, SOD e concentração de nitritos com a carga parasitária no plasma de pacientes infectados com *P. vivax*. A atividade da arginase foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o kit de Ensaio da Atividade da Arginase (Sigma Aldrich). A atividade da SOD foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o kit de Ensaio da Atividade da SOD (Sigma Aldrich). A concentração de Nitrito foi determinada pelo ensaio de Griess. As parasitemias foram quantificadas por PCR em tempo real. Os resultados foram expressos em Log. Em A: Correlação Log Arginase x Log Parasitemia; B: Correlação Log SOD x Log Parasitemia; C: Correlação Log concentração de Nitritos x Log Parasitemia. Em A e C, pacientes representados por (○) foram considerados Outliers (teste de Grubbs com $p \leq 0.05$).

Correlação entre o perfil de citocinas do hospedeiro e as atividades da arginase e da SOD

Não houve correlação entre as concentrações de IL-6 e IL-10 e a atividade de arginase nos pacientes (Figuras 6A e 6B, respectivamente), mesmo quando analisamos a correlação entre as citocinas e a enzima separando os pacientes em grupos de acordo com as variantes da CSP (dados não mostrados). Também não houve correlação entre TGF- β e a atividade da enzima (Figura 6C).

Não houve correlação entre IL-6, IL-10 e a atividade da SOD no plasma dos pacientes (Figuras 7A e 7B). Porém, a atividade de SOD apresentou correlação positiva com TGF- β ($r=0.69$ e $P=0.0002$) (Figura 7C).

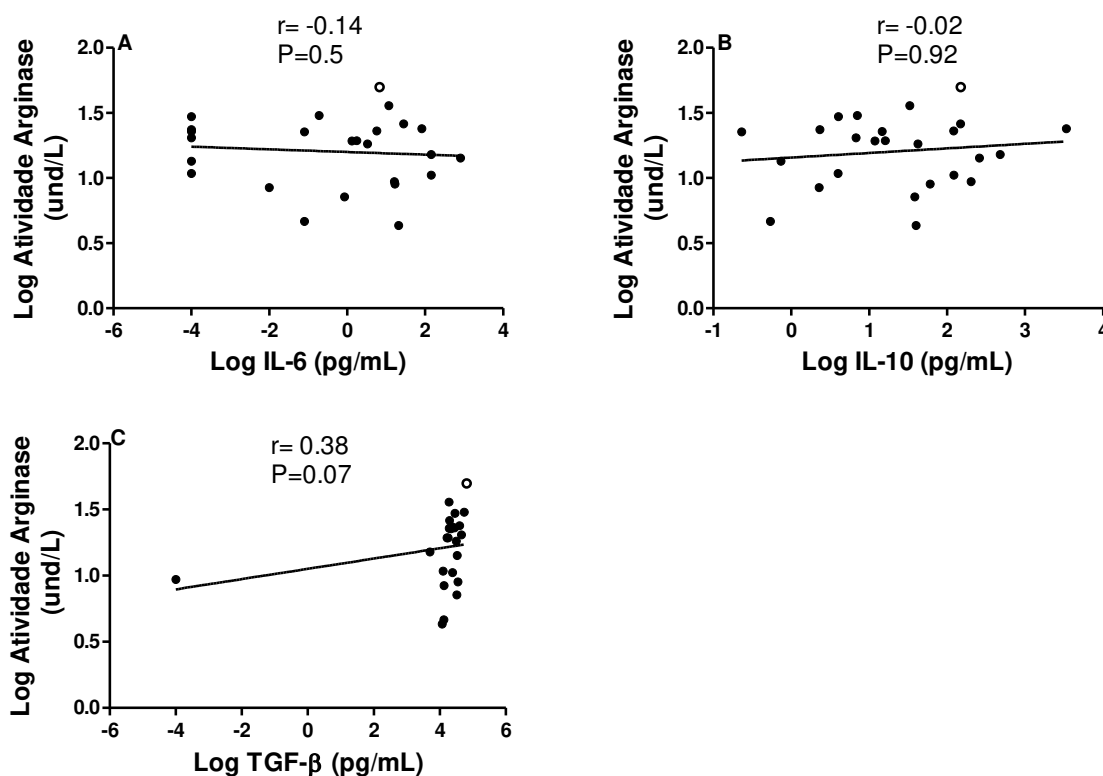


Figura 6. Correlação entre as atividades da Arginase e citocinas no plasma de pacientes infectados com *P. vivax*. A atividade da arginase foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o kit de Ensaio da Atividade da Arginase (Sigma Aldrich). As citocinas foram quantificadas por CBA. Os resultados foram expressos em Log. Em A: Correlação Log Arginase x Log IL-6; B: Correlação Log Arginase x Log IL-10; C: Correlação Log Arginase x Log TGF- β ($n=24$ pacientes). Em A e C, pacientes representados por (o) foram considerados Outliers (teste de Grubbs com $p \leq 0.05$).

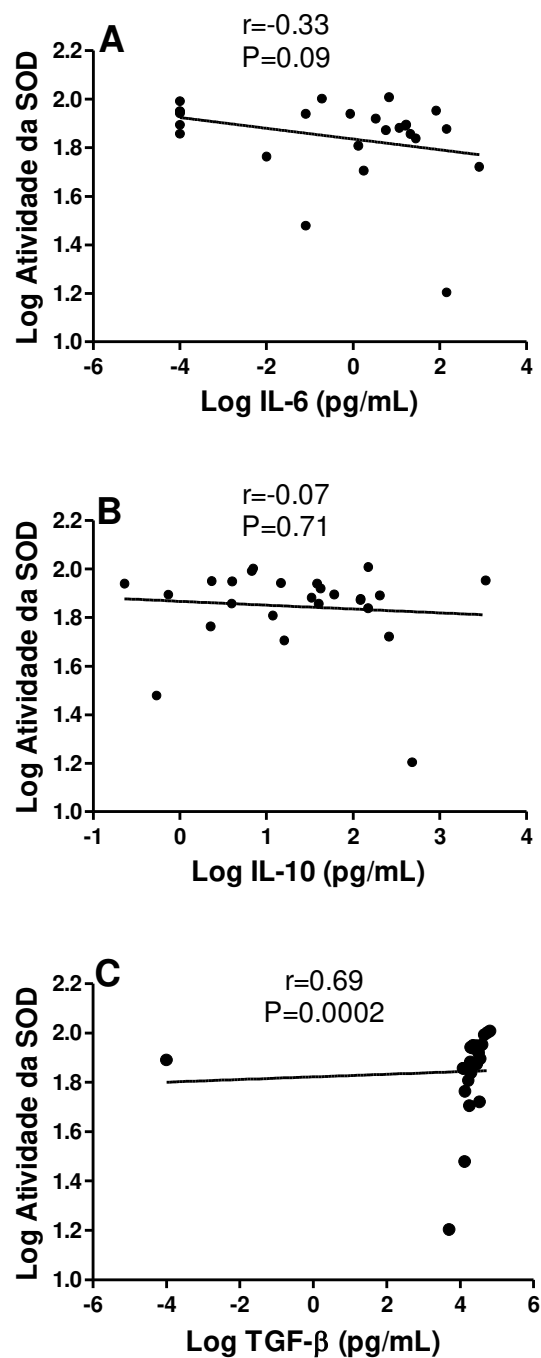


Figura 7. Correlação entre as atividades da SOD e citocinas no plasma de pacientes infectados com *P. vivax*. A atividade da SOD foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o kit de Ensaio da Atividade da SOD (Sigma Aldrich). As citocinas foram quantificadas por CBA. Os resultados foram expressos em Log. Em A: Correlação Log SOD x Log IL-6; B: Correlação Log SOD x Log IL-10; C: Correlação Log SOD x Log TGF- β (n=24 pacientes).

Discussão

Neste trabalho, foi demonstrado que as atividades de arginase e SOD são maiores em pacientes infectados com *P. vivax*, sendo a atividade da arginase diretamente influenciada pela variante VK210. Pode ser sugerido, portanto, ainda que indiretamente, que macrófagos reguladores podem atuar nesta fase da infecção e que polimorfismos da CSP podem ter efeitos sistêmicos que afetam diretamente este perfil.

Os pacientes agudamente infectados com *P. vivax* tiveram aumento da atividade de arginase no plasma (Figura 1A). Este dado em conjunto com resultados anteriores que demonstraram aumento na produção de IL-10 em pacientes infectados mesmo com redução na produção de TGF- β (HAN et al, 2010; RIBEIRO et al, 2016), pode ser um indício de que nesta fase da malária vivax o perfil regulador não é proveniente apenas da fonte clássica (linfócitos T regulatórios) e de que a infecção pode ter a participação de macrófagos produtores de arginase, considerado um parâmetro funcional para caracterização de macrófagos reguladores (MANTOVANI et al, 2002; BRONTE e ZANOVELLO, 2005).

Sendo assim, investigou-se se a arginase e as citocinas possuíam comportamento pareado e constatou-se a inexistência de correlação entre as concentrações de IL-6, IL-10 e a atividade de arginase nos pacientes (Figuras 6A e 6B, respectivamente). Apesar de bastante intrigante esta ausência de correlação, principalmente com relação à IL-10, isto pode se dever ao fato de a citocina e a enzima terem cinéticas diferentes.

Em relação a macrófagos com perfil inflamatório, sabe-se que os M1 metabolizam a L-arginina pela óxido nítrico sintase induzida (NOS2), produzindo óxido nítrico que, por não possuir estabilidade, converte-se em nitrito. Logo, a quantificação dos nitritos visava determinar, ainda que de forma indireta, a atividade da NOS2 nos pacientes agudamente infectados. Isto, associado ao perfil de citocinas e a atividade de arginase avaliada, auxiliaria na investigação acerca do comportamento funcional destes fagócitos durante a infecção. A produção de nitritos não se alterou nos pacientes (Figura 2). Sabe-se que o aumento da atividade de arginase resulta na diminuição da disponibilidade de L-arginina, substrato utilizado pela NOS2 para a produção de óxido nítrico (WEINBERG et al, 2008). Sendo assim, pode-se inferir que, apesar da reconhecida importância desta espécie reativa de oxigênio no controle das infecções (VINCENDEAU et al, 2003), os pacientes apresentaram baixa produção de NO devido ao aumento da atividade de arginase.

Logo, o aumento na atividade de arginase pode representar em um mecanismo de fuga do parasito, pois sabe-se que isto culmina no prolongamento de sua sobrevivência, conforme já foi evidenciado em pesquisas com *Trypanosoma cruzi*, *Chlamydia* spp., *Schistosoma* spp., *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* (VINCENDEAU et al, 2003; NOEL et al, 2004; MUYLDER et al, 2013). Este mecanismo de resistência pode ser intensificado pela baixa produção de NO nos pacientes. Na própria malária, baixas concentrações plasmáticas de arginina foram relacionadas à gravidade da infecção por *P. falciparum* na Tanzânia (LOPANSRI et al, 2003) e na Indonésia (YEO et al, 2007), provavelmente devido à falta de substrato para a ação da NOS2. Achados semelhantes foram descritos em pesquisas com outros parasitos intracelulares. Li et al (2012) relataram que macrófagos peritoneais de camundongos com elevada atividade de arginase e baixa atividade de NOS2 eram mais susceptíveis à infecção por *Toxoplasma gondii*.

Além da arginase e da NOS2, a Superóxido Dismutase (SOD) é outra enzima com marcante importância no curso das infecções. A importância da SOD é tal que já é considerada um marcador de gravidade mais eficiente que a produção de TNF- α , visto que, entre outras coisas, a produção da enzima geralmente acompanha a elevação da carga parasitária em indivíduos com malária grave, que apresentam maiores parasitemias em comparação aos indivíduos assintomáticos e com malária branda (ANDRADE et al, 2010A). Semelhante aos resultados demonstrados por Andrade et al (2010A, B), os pacientes deste estudo apresentaram aumento da atividade da SOD no plasma (Figura 3).

A SOD é uma metaloenzima que possui a propriedade de dismutar o ânion superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio e, desta forma, protege as células do hospedeiro contra agressões oxidativas (SZETO et al, 2006). A malária cursa com altos níveis de espécies reativas de oxigênio, a principal delas o ânion superóxido. Estes radicais livres, ao mesmo tempo que contribuem para a morte do parasito, também causam lesões teciduais no hospedeiro (DELMAS-BEAUVIEUX et al, 1995; PAMPLONA et al, 2007). Como consequência, a SOD acaba desempenhando papéis antagônicos na infecção pois, ao mesmo tempo que oferece esta proteção contra agressões oxidativas, também elimina as moléculas envolvidas na morte do protozoário. Em modelo experimental, camundongos que possuíam grande expressão de SOD apresentaram aumento de vulnerabilidade a *P. berguei* (GOLENSER et al, 1998). Por outro lado, experimentos *in vitro* com suplementação de SOD-1 protegeram as células endoteliais contra a agressão oxidativa por *P. falciparum* (TAOUFIQ et al, 2006).

A SOD também é associada a danos teciduais (PABÓN et al, 2003) por aumentar a produção de TNF- α pelos macrófagos (MARIKOVSKI et al, 2003). Aqui, os pacientes apresentaram concentrações muito baixas ou indetectáveis de TNF- α . Avaliamos então a ocorrência de correlação entre a enzima e as citocinas que estavam aumentadas nos pacientes, porém não houve correlação entre IL-6, IL-10 e a atividade da SOD no plasma, tendo a enzima apresentado correlação positiva apenas com TGF- β .

Neste aspecto, estudo realizado *in vitro* com PBMCs de doadores saudáveis demonstrou que a presença do grupamento heme, liberado em grandes quantidades devido a hemólise que ocorre em infecções graves, aumenta a atividade da SOD e culmina com inibição da produção de TGF- β pelas células mononucleares, por mecanismo dependente da participação da metaloenzima (ANDRADE et al, 2010B). Ou seja, a medida que a doença vai se agravando, aumenta a quantidade de heme livre e, conseqüentemente, de SOD, fazendo com que as produções de SOD e TGF- β adquiram comportamentos opostos, diferente do observado em pacientes que se encontram na fase branda da infecção, tal qual os pacientes que compõe este estudo.

O parasito parece interferir diretamente nos resultados obtidos. A ausência de sua influência sistêmica na cultura de 48h alterou os perfis de arginase (Figura 1B e 1C) e SOD (Figura 3B e 3C) observados *in vivo* (Figuras 1A e 3A, respectivamente). Andrade et al (2010) (B) também encontraram redução nos níveis de SOD no sétimo dia de tratamento em comparação ao período antes de iniciar a terapia antimalárica. Muylder et al (2013) em experimento com *Trypanosoma brucei* demonstraram que fatores liberados pelo parasito (PRF) induzem aumento de IL-10 e na atividade de arginase. Estes dados, em conjunto, indicam que a influência sistêmica do parasito está diretamente relacionada aos perfis observados.

Neste sentido, resta investigar quais aspectos parasitários poderiam interferir nos parâmetros da resposta imune do hospedeiro aqui alterados. Ribeiro et al (2016) demonstraram que polimorfismos na CSP possuem efeitos sistêmicos que culminam com alterações no perfil de citocinas e na carga parasitária de pacientes infectados com *P. vivax*.

A atividade de arginase demonstrou sofrer influência direta das variantes da CSP, sendo VK210 a que induziu os maiores aumentos na atividade da enzima (Figura 4A). Ribeiro et al (2016) demonstraram que em pacientes infectados com VK210, ao contrário do que ocorre com VK247, a resposta inflamatória de citocinas é regulada pela produção de IL-10, mesmo com TGF- β reduzida. Este dado, associado ao aumento da atividade de arginase em pacientes

infectados com VK210 aqui demonstrado é um indício de que macrófagos reguladores podem ter uma importante participação na produção da IL-10 induzida por esta variante.

Em conclusão, somente o paradigma Th1/Th2/Treg parece não ser suficiente para explicar o perfil de citocinas durante a infecção por *P. vivax*, visto que macrófagos com perfil regulador podem ter uma importante participação na fase aguda da malária, sofrendo a influência de polimorfismos da CSP de *P. vivax* que demonstraram a capacidade de induzir efeitos sistêmicos no hospedeiro que podem afetar diretamente o desfecho da infecção.

Referências

ANDRADE BB, REIS-FILHO A, SOUZA-NETO SM, RAFFAELE-NETTO I, CARMARGO LMA, BARRAL A, BARRAL-NETO M. Plasma Superoxide Dismutase-1 as a Surrogate Marker of Vivax Malaria Severity. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 2010; 4 (4): e650. (A)

ANDRADE BB, ARAÚJO-SANTOS T, LUZ NF, KHOURI R, BOZZA MT, CAMARGO LMA et al. Heme Impairs Prostaglandin E2 and TGF- β Production by Human Mononuclear Cells via Cu/Zn Superoxide Dismutase: Insight into the Pathogenesis of Severe Malaria. **The Journal of Immunology** 2010; 185:1196-1204. (B)

ANSTEY NM, RUSSELL B, YEO TW, PRICE RN. The pathophysiology of *vivax* malaria. **Trends Parasitology** 2009; 25: 220-227.

BRONTE V, KASIC T, GRI G, GALLANA K, BORSELLINO G, MARIGO I, BATTISTINI L et al. Boosting anti-tumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. **The Journal of Experimental Medicine** 2005; 201: 1257–1268.

BRONTE V, ZANOVELLO P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature Reviews Immunology** 2005; 5: 641-654

BUENO LL, MORAIS CG, ARAÚJO FF, SILVA JA, CORREA-OLIVEIRA R, SOARES IS, LACERDA MV, FUJIWARA RT, BRAGA EM. *Plasmodium vivax*: induction of CD4 +CD25+FoxP3 regulatory T cells during infection are directly associated with the level of circulating parasite. **PLoS One** 2010; 5: e9623.

COUPER KN, BLOUNT DG, WILSON MS, HAFALLA JC, BELKAID Y, KAMANAKA M, FLAVELL RA, SOUZA JB, RILEY EM. IL-10 from CD4+CD25–Foxp3–CD127– Adaptive Regulatory T Cells Modulates Parasite Clearance and Pathology during Malaria Infection. **PLOS Pathogens** 2008; 4(2).

DELMAS-BEAUVIEUX MC, PEUCHANT E, DUMON MF, RECEVEUR MC, LE BRAS M, CLERC M. Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. **Clinical Biochemistry** 1995; 28(2):163–9.

FAHLEN L, READ S, GORELIK L, HURST SD, COFFMAN RL, FLAVELL RA, POWRIE F. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine** 2005; 201:737–746.

FERNANDES ES, LIANG L, SMILLIE SJ, KAISER F, PURCELL R, RIVETT DW et al. TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome. **J Immunol** 2012; 188: 5741–5751.

GOLENSER J, PELED-KAMAR M, SCHWARTZ E, FRIEDMAN I, GRONER Y, POLLACK Y. Transgenic mice with elevated level of CuZnSOD are highly susceptible to malaria infection. **Free Radical Biology and Medicine** 1998; 24(9):1504–10.

GONÇALVES RM, SCAOPEL KKG, BASTOS MS, FERREIRA UM. Cytokine Balance in Human Malaria: Does *Plasmodium vivax* Elicit More Inflammatory Responses than *Plasmodium falciparum*? **PLoS ONE** 2012; 7(9):e44394

HALDAR K, MOHANDAS N. *Malaria, erythrocytic infection and anemia*. **American Society of Hematology Education Program** 2009; 2009(1): 87–93.

HAN C, LIN Y, SHAN G, ZHANG Z, SUN X, WANG Z, et al. Plasma concentration of malaria parasite-derived macrophage migration inhibitory factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity. **Clinical & Vaccine** 2010; 17(10):1524–32.

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 Tropica** 2010; 113: 263–268.

LI Z, ZHAO Z, ZHU X, REN Q, NIE F, GAO J et al. Differences in NOS2 and Arginase Expression and Activity in the Macrophages of Rats Are Responsible for the Resistance against *T. gondii* Infection. **PLOS One** 2012; 7(4): e35834.

LOPANSRI BK, ANSTEY NM, WEINBERG JB, et al. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. **Lancet** 2003; 361:676–678.

MANTOVANI A, SOZZANI S, LOCATI M, ALLAVENA P, SICA A. Macrophage polarization : tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology** 2002;23(11):549–55.

MARIKOVSKY M, ZIV V, NEVO N, HARRIS-CERRUTI C, AND MAHLER O. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. **The Journal of Immunology** 2003; 170: 2993–3001

MUYLDER GD, DAULOUÉDE S, LECORDIER L, UZUREAU P, MORIAS Y, ABBEELE JVD et al. A *Trypanosoma brucei* Kinesin Heavy Chain Promotes Parasite Growth by Triggering Host Arginase Activity. **PLOS Pathogens** 2013; 9(10): e1003731.

NIKURA M, INOUE S, KOBAYASHI F. Role of Interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** 2011; 2011

NOEL W, RAES G, HASSANZADEH GHASSABEH G, DE BAETSELIER P e BESCHIN A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends in Parasitology** 2004; 20, 126–133.

PABÓN A, CARMONA J, BURGOS LC AND BLAIR S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. **Clinical Biochemistry** 2003; 36: 71–78.

PAMPLONA A, FERREIRA A, BALLA J, JENEY V, BALLA G, EPIPHANIO S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nature Medicine** 2007; 13: 703–710.

RIBEIRO BP, CASSIANO GC, DE SOUZA RM, CYSNE DN, GRISOTTO MAG, DOS SANTOS APSA, MARINHO CRF, MACHADO RLD, NASCIMENTO FRF. Polymorphisms in Plasmodium vivax Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 2016; 10(3): e0004479. doi:10.1371/journal.pntd.0004479.

ROSARIO APF, LAMB T, SPENCE P, STEPHENS R, LANG A, ROERS A, MULLER W, O'GARRA A, LANGHORNE J. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. **Journal of Immunology** 2012; 188: 1178-1190.

STEVENSON MM, RILEY EM. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology** 2004; 4:169 –180.

SZETO, HAZEL H. Mitochondria-Targeted Peptide Antioxidants: Novel Neuroprotective Agents. **The AAPS Journal** 2006; 8(3).

TAOUFIQ Z, PINO P, DUGAS N, CONTI M, TEFIT M, MAZIER D, et al. Transient supplementation of superoxide dismutase protects endothelial cells against Plasmodium falciparum-induced oxidative stress. **Molecular Biochemical Parasitology** 2006; 150:166–73.

VINCENDEAU P, GOBERT AP, DAULOUEDE S, MOYNET D e DJAVAD MOSSALAYI M. Arginases in parasitic diseases. **Trends in Parasitology** 2003; 19: 9–12.

WALTHER M, TONGREN JE, ANDREWS L, KORBEL D, KING E, FLETCHER H, ANDERSEN RF, et al. Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4+CD25 Regulatory T Cells Correlates with More Rapid Parasite Growth in Human Malaria Infection. **Immunity** 2005; 23: 287-296.

WEINBERG JB, LOPANSRI BK, MWAIKABO E, GRANGER DL. Arginine, nitric oxide, carbon monoxide and endothelial function in severe malaria. **Current Opinion in Infectious Diseases** 2008; 21: 468-475.

YEO TW, LAMPAH DA, GITAWATI R, et al. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. **The Journal of Experimental Medicine** 2007; 204:2693–2704.

5 Considerações Finais

- A malária vivax eleva a produção das citocinas IL-6 e IL-10. O aumento da citocina reguladora tem relação direta com a carga parasitária e contrapõe os efeitos deletérios que poderiam ser ocasionados pela exacerbação da resposta inflamatória no hospedeiro;
- No plasma de pacientes infectados com *P. vivax* prevalece um perfil regulador de citocinas e ocorre aumento nas atividades das enzimas arginase e SOD;
- O perfil regulador do plasma associado ao aumento da atividade da SOD, ao aumento na atividade de arginase e a baixa produção de NO observada nos pacientes pode representar um mecanismo de fuga do parasito, visto que estes fatores associados culminam no prolongamento de sua sobrevivência;
- Os polimorfismos da CSP de *P. vivax* produzem efeitos sistêmicos no hospedeiro e interferem diretamente em sua resposta imune, alterando o desfecho da infecção;
- A CSP é um alvo promissor para intervenções em quadros de infecção por malária e novos estudos que aprofundem os conhecimentos acerca da influência destes polimorfismos parasitários sobre a resposta imune do hospedeiro podem ajudar a elucidar a imunopatologia da infecção e propiciar a adoção de medidas de controle mais efetivas;

6 Referências Bibliográficas

- AGNANDJI ST, LELL B, SOULANOUDJINGAR SS, FERNANDES JF, ABOSSOLO BP, et al. First results of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine in African children. **The New England Journal of Medicine** 2011; 365:1863-75.
- AGNANDJI ST, FERNANDES JF, BACHE EB, RAMHARTER M. Clinical development of RTS,S/AS malaria vaccine: a systematic review of clinical Phase I-III trials. **Future Microbiology** 2015; 6.
- AIDOO M, TERLOUW DJ, KOLCZAK MS, et al. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. **Lancet** 2002; 359:1311-2.
- ALDERTON WK, COOPER CE and KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemistry Journal** 2001; 357: 593–615.
- ALEXANDRE M, FERREIRA C, SIQUEIRA A, MAGALHÃES B, MOURÃO M, LACERDA M, ALECRIM M. Severe *Plasmodium vivax* malaria Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases** 2010; 16: 1611-1614.
- ALVES RT, PÓVOA MM, GOLDMAN IF, CAVASINI CE, ROSSIT ARB, MACHADO RLD. A new polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism protocol for *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein genotype (VK210, VK247, and *P. vivax*-like) determination. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 2007; 59: 415– 419.
- ALVING AS, ARNOLD J, HOCKWALD RS, CLAYMAN CB, DERN RJ, BEUTLER E, FLANAGAN CL. Potentiation of the curative action of primaquine in vivax malaria by quinine and chloroquine. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 1955; 46: 301–306.
- AMINO R, GIOVANNINI D, THIBERGE S, GUEIRARD P, BOISSON B, DUBREMETZ JF, PRÉVOST MC, ISHINO T, YUDA M, MÉNARD R. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. **Cell Host Microbe** 2008; 3: 88–96.
- ANDERSSON Å, KOKKOLA R, WEFER J, ERLANDSSON-HARRIS H, HARRIS RA. Differential macrophage expression of IL-12 and IL-23 upon innate immune activation defines rat autoimmune susceptibility. **Journal of Leukocyte Biology** 2004; 76:1118–24
- ANDRADE BB, REIS-FILHO A, SOUZA-NETO SM, CLARÊNCIO J, CAMARGO LMA, BARRAL A, BARRAL-NETTO M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal** 2010; 9: 13.
- ANSTEY NM, RUSSELL B, YEO TW, PRICE RN. The pathophysiology of *vivax* malaria. **Trends Parasitology** 2009; 25: 220-227.
- ANTHONY RM, JR JFU, ALEM F, HAMED HA, ROZO CT, BOUCHER J-L, et al. Memory Th-2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. **Nature Medicine** 2006;12(8):955–60.

ARGAMAN Z, YOUNG VR, NOVISKI N, et al. Arginine and nitric oxide metabolism in critically ill septic pediatric patients. **Critical Care Medicine** 2003; 31:591–597.

ARNOT DE, BARNWELL JW, TAM JP. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science** 1985; 230: 815-817.

AREVALO-HERRERA M, SOTO L, PERLAZA BL, CÉSPEDES N, VERA O, LENIS AM, BONELO A, CORRADIN G, HERRERA S. Antibody-Mediated and Cellular Immune Responses Induced in Naive Volunteers by Vaccination with Long Synthetic Peptides Derived from the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2011; 84(2): 35-42.

ARTAVANIS-TSAKONAS K, RILEY EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Journal of Immunology** 2002; 169(6): 2956-63.

BAETSELIER PD, NAMANGALA B, NOËL W, BRYL L, PAYS E, BESCHIN A. Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis. **International Journal for Parasitology** 2001; 31:575–87.

BAIRD JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends in Parasitology** 2007; 23: 533–39.

BAIRD JK, HOFFMAN SL. Primaquine therapy for malaria. **Clinical Infectious Diseases** 2004; 39:1336–1345.

BALL HJ, MACDOUGALL HG, MCGREGOR IS, HUNT NH. Cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases** 2004; 189(4):751-8

BASSAT Q, ALONSO PL. Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. **Nature medicine** 2011;17 (1): 48-49

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 1ª Edição. 2010

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Projetos, normas e relatórios. Série C. 5ª edição. 2011a

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária na Amazônia. 2011b

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. 2015

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletins e Mapas Interativos- Região Amazônica. 2016

BUENO LL, MORAIS CG, ARAÚJO FF, SILVA JA, CORREA-OLIVEIRA R, SOARES IS, LACERDA MV, FUJIWARA RT, BRAGA EM. *Plasmodium vivax*: induction of CD4

+CD25+FoxP3 regulatory T cells during infection are directly associated with the level of circulating parasite. **PLoS One** 2010; 5: e9623.

CASSIANO GC, STORTI-MELO LM, POVOA MM, GALARDO AKR, ROSSIT ARB, MACHADO RLD. Development of PCR–RFLP assay for the discrimination of *Plasmodium* species and variants of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in *Anopheles* mosquitoes. **Acta Tropica** 118: 118-122.

CAVASINI CE, DE MATTOS LC, COUTO AAD, BONINI- DOMINGOS CR, VALENCIA SH, SOUZA-NEIRAS WC, ALVES RT, ROSSIT ARB, CASTILHO L, MACHADO RLD. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 2007; 101: 1042-1044

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Malaria. 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/malaria>. Acesso em 09 de agosto de 2012.

CHAKRAVARTY S, BALDEVIANO GC, OVERSTREET MG, ZAVALA F. Effector CD8+ T lymphocytes against liver stages of *Plasmodium yoelii* do not require gamma interferon for antiparasite activity. **Infection and Immunity** 2008; 76: 3628–3631.

CHAKRAVARTY S, COCKBURN IA, KUK S, OVERSTREET MG, SACCI JB, ZAVALA F. CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. **Nature Medicine** 2007; 13:1035–1041.

CHEN N, AULIFF A, RIECKMANN K, GATTON M, CHENG Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. **Journal of Infectious Diseases** 2007; 195: 934–41.

COBAN C, ISHII KJ, KAWAI T, HEMMI H, SATO S, UEMATSU S, YAMAMOTO M, TAKEUCHI O, ITAGAKI S, KUMAR N, HORII T, AKIRA S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **The Journal of Experimental Medicine** 2005; 201:19–25.

COX-SINGH J, DAVIS TME, LEE K, SHAMSUL SSG, MATUSOP A, RATNAM S, RAHMAN HA, CONWAY DJ, SINGH B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases** 2008; 46: 165-171.

COUPER KN, BLOUNT DG, RILEY EM. IL-10: The master regulator of immunity to infection. **Journal of Immunology** 2008, 180: 5771-5777.

CRAIG AA, KAIN KC. Molecular analysis of strains of *Plasmodium vivax* from paired primary and relapse infections. **Journal of Infectious Diseases** 1996; 174: 373–79.

CROMPTON PD, KAYALA MA, TRAORE B, KAYENTAO K, ONGOIBA A, WEISS GE et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 2010; 107: 6958–6963.

DEMEURE CE, BRAHIMIK, HACINI F, MARCHAND F, PERONET R, HUERRE M et al. Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. **Journal of Immunology** 2005; 174: 3932–3940.

DOW GS, GETTAYACAMIN M, HANSUKJARIYA P, IMERBSIN R, KOMCHAROEN S, SATTABONGKOT J, KYLE D, MILHOUS W, COZENS S, KENWORTHY D, MULLER A, VEAZEY J, OHRT C. Radical curative efficacy of tafenoquine combination regimens in *Plasmodium cynomolgi* infected *Rhesus* monkeys (*Macaca mulatta*). **Malaria Journal** 2011; 10: 212.

ESCALANTE AA, GREBERT HM, ISEA R, GOLDMAN IF, BASCO F, MAGRIS M, BISWAS S, KARIUKI S, LAL AA. A study of genetic diversity in the gene encoding the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium falciparum* from different transmission areas-XVI. Asembo Bay Cohort Project. **Molecular and Biochemical Parasitology** 2002; 125: 83-90.

ERWIG L, KLUTH DC, WALSH GM, REES AJ. Initial Cytokine Exposure Determines Function of Macrophages and Renders Them Unresponsive to Other Cytokines. **The Journal of Immunology** 1998;161:1983–8.

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. **Clinical Vaccine Immunology** 2008; 15: 650-658.

FREVERT U, MORENO A, CALVO-CALLE JM, KLOTZ C, NARDIN E. Imaging effector functions of human cytotoxic CD4+ T cells specific for *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. **Internacional Journal for Parasitology** 2009; 39:119–132.

GALINSKI MR, BARNWELL JW. *Plasmodium vivax*: who cares? **Malaria Journal** 2008;7 (1): S9.

GENTON B, D'ACREMONT V, RARE L, BAEA K, REEDER JC, ALPERS MP, MÜLLER I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Medicine** 2008; 5 (6): 881-889.

GOLDBERG DE, COWMAN AF. Moving in and renovating: exporting proteins from *Plasmodium* into host erythrocytes. **Nature Reviews** 2010; 8: 617-621.

GONÇALVES EGR, MACHADO RLD, SANTOS AR, MATOS WB, SILVA AR. Caracterização de genótipos de *Plasmodium vivax* na Ilha de São Luís, Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2009; 42: 315-317.

GONÇALVES RM, SALMAZI KC, SANTOS BAN, BASTOS MS, ROCHA SC, BOSCARDIN SB, SILBER AM, KALLÁS EG, FERREIRA MU, SCOPEL KKG. CD4+ CD25+Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? **Infection and Immunity** 2010;78(11): 4763-4772.

GONZÁLEZ JM, HURTADO S, ARÉVALO-HERRERA M, HERRERA S. Variants of the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (VK210 and VK247) in Colombian Isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro** 2001; 96(5): 709-712.

GORDON S. Alternative Activation of Macrophage. **Nature Reviews Immunology** 2003; 3: 23-35.

GRANGER DL, MILLER WC, HIBBS JB JR. Methods of analyzing nitric oxide production in the immune response. In: Feelisch M, Stamler JS, editors. **Methods in nitric oxide research** 1996. John Wiley & Sons Ltd 1996; 603–617.

GREENWOOD BM, BOJANG K, WHITTY CJ, TARGETT GA. Malaria. **Lancet** 2005; 365 (9469):1487-1498.

GUERRA CA, SNOW RW, HAY SI. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends Parasitology** 2006; 22: 353–58.

HAFALLA JC, SILVIE O, MATUSCHEWSKI K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews** 2011; 240: 297–316.

HALDAR K, MOHANDAS N. Malaria, erythrocytic infection and anemia. **American Society of Hematology Education Program** 2009; 2009(1): 87–93.

HAN C, LIN Y, SHAN G, ZHANG Z, SUN X, WANG Z, et al. Plasma concentration of malaria parasite-derived macrophage migration inhibitory factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity. **Clinical and Vaccine Immunology** 2010; 17(10):1524–32.

HERNANDÉZ-MARTINEZ MA, ESCALANTE AA, ARÉVALO-HERRERA M, HERRERA S. Antigenic Diversity of the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein in Parasite Isolates of Western Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2011; 84(2): 51–57.

HERRERA S, BONELO A, PERLAZA BL, FERNÁNDEZ OL, VICTORIA L, LENIS AM, SOTO L, HURTADO H, ACUÑA LM, VÉLEZ JD, PALACIOS R, CHEN-MOK M, CORRADIN G, ARÉVALO-HERRERA M. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naïve volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2005; 73 (5): 3–9.

HUNTER M, WANG Y, EUBANK T, BARAN C, NANA-SINKAM P, MARSH C. Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease. **Frontiers in Bioscience** 2009;14:4079–102

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). IBGE cidades@. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat>. Acesso em 18/03/13.

IYER R, JENKINSON CP, VOCKLEY JG, et al. The human arginases and arginase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease** 1998; 21 (Suppl 1):86–100.

- 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 Tropica** 2010; 113: 263–268.
- JANGPATARAPONGSA K, CHOOTONG P, SATTABONGKOT J, CHOTIVANICH K, SIRICHAISINTHOP J, TUNGPRADABKUL S, HISAEDA H, TROYE-BLOMBERG M, CUI L, UDOMSANGPETCH R. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. **European Journal of Immunology** 2008; 38: 2697–2705.
- KAIN KC, BROWN AE, LANAR DE, BALLOU WR, WEBSTER HK. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene** 1993; 49: 478-484.
- KHO WG, PARK YH, CHUNG JY, KIM JP, HONG ST, LEE WJ, KIM TS, LEE JS. Two new genotypes *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein found in the Republic of Korea. **Korean Journal of Parasitology** 1999; 37: 265–270.
- KISZEWSKI A, MELLINGER A, SPIELMAN A, MALANEY P, SACHS SE, SACHS J. A global index representing the stability of malaria transmission. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2004; 70: 486–98.
- KOCHAR DK, SAXENA V, SINGH N, KOCHAR SK, KUMAR SV, DAS A. *Plasmodium vivax* malaria. **Emergence Infectious Disease** 2005; 11: 132-134.
- KOCHAR DK, DAS A, KOCHAR SK, SAXENA V, SIROHI P, GARG S, KOCHAR A, KHATRI MP, GUPTA V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene** 2009; 80: 194-198.
- KOUWENHOVEN M, TELESHOVA N, OZENCI V, PRESS R, LINK H. Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile. **Journal of Neuroimmunology** 2001;112(1):197–205.
- KROTOSKI WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 1985; 79: 1–11.
- LACERDA MV, FRAGOSO SC, ALECRIM MG, ALEXANDRE MA, MAGALHAES BM, et al. Postmortem Characterization of Patients with Clinical Diagnosis of *Plasmodium vivax* Malaria: To What Extent does this Parasite Kill? **Clinical Infectious Diseases** 2012; 55: e67–74.
- LAMBERT PH. Malaria: past and present. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/educational/medicine/malaria/readmore/history.html>. 2003. Acesso em: 05 de agosto de 2012.
- LAMIKANRA AA, BROWN D, POTOENIK A, CASALS-PASCUAL C, LANGHORNE J, ROBERTS DJ. Malarial anemia: of mice and men. **Blood** 2007; 110: 18–28.

LECLERC M C, MENEGON M, CLIGNY, A. CLIGNY A, NOYER JL, MAMMADOV S, ALIYEV N, GASIMOV E, MAJORI G, SEVERINI C. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* isolates from Azerbaijan. **Malaria Journal** 2004; 3: 40.

LI Y, LEE PY, REEVES WH. Monocyte and Macrophage Abnormalities in Systemic Lupus Erythematosus. **Arch Immunol Ther Exp** 2010;58(5):355–64.

LOIOLA CCP, SILVA CJM, TAUIL PL. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health** 2002;11(4).

LOKE P NG, GALLAGHER I, NAIR MG, ZANG X, BROMBACHER F, MOHRS M, et al. Alternative Activation Is an Innate Response to Injury That Requires CD4+ T Cells to be Sustained during Chronic Infection. **The Journal of Immunology** 2007; 179: 3926–36.

LYKE KE, BURGESS R, CISSOKO Y, SANGARE L, DAO M, DIARRA I, KONE A, HARLEY R, PLOWE CV, DOUMBO OK, SZTEIN MB. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha and IL-12 (p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. **Infection and Immunity** 2004; 72:5630–5637.

LUONI G, VERRA F, ARCA B, SIRIMA BS, TROYE-BLOMBERG M, COLUZZI M, KWIATKOWSKI D, MODIANO D. Antimalarial antibody levels and IL-4 polymorphism in the Fulani of West Africa. **Genes & Immunity** 2001; 2: 411–414.

MACHADO RLD, FILHO AFF, CALVOSA VSP, FIGUEREDO MC, NASCIMENTO JM, PÓVOA MM. Correlation Between *Plasmodium vivax* Variants in Belém, Pará State, Brazil and Symptoms and Clearance of Parasitaemia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** 2003; 7(3): 175-177.

MACHADO RLD, PÓVOA MM. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of Amazonian Brazil and their correlation with chloroquine-treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 2000; 94: 377-381.

MAIGA B, DOLO A, CAMPINO S, SEPULVEDA N, CORRAN P, ROCKETT KA, TROYE-BLOMBERG M, DOUMBO OK, CLARK TG. Glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and susceptibility to mild malaria in Dogon and Fulani, Mali. **Malaria Journal** 2014;13:270

MALKIN E, DUBOVSKY F, MOREE M. Progress towards the development of malaria vaccines. **Trends in Parasitology** 2006; 22: 292–95.

MANTOVANI A, SOZZANI S, LOCATI M, ALLAVENA P, SICA A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology** 2002;23(11):549–55.

MARIN-MENENDEZ A, BARDAJÍ A, MARTÍNEZ-ESPINOSA FE, BÔTTO-MENEZES C, LACERDA MV, ORTIZ J et al. Rosetting in *Plasmodium vivax*: A cytoadhesion phenotype associated with anaemia. **Plos Neglected Tropical Diseases** 2013; 7: e2155.

MCHENRY AM, BARNWELL JW, ADAMS JH. *Plasmodium vivax* DBP binding to *Aotus nancymae* erythrocytes is Duffy antigen dependent. **The Journal of Parasitology** 2010; 96(1): 225–227.

MEDINA TS, COSTA SP, OLIVEIRA MD, VENTURA AM, SOUZA JM, GOMES TF, VALLINOTO AC, PÓVOA MM, SILVA JS, CUNHA MG. Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. **Malaria Journal** 2011; 10: 264.

MIA S, WARNECKE A, ZHANG X-M, MALMSTROM V, HARRIS RA. An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4 / IL-10 / TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. **Experimental Immunology** 2014;79:305–14.

MICHON P, COLE-TOBIAN JL, DABOD E, SCHOEPFLIN S, IGU J, SUSAPU M, TARONGKA N, ZIMMERMAN PA, REEDER JC, BEESON JG, SCHOFIELD L, KING CL, MUELLER I. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2007; 76: 997–1008.

MILES S , CONRAD SM, ALVES RG, JERONIMO SMB, MOSSER DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **The Journal of Experimental Medicine** 2005; 201(5):747–54.

MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. The pathogenic basis of malaria. **Nature** 2002; 415:673–679.

MILLS CD, KINCAID K, ALT JM, HEILMAN MJ, HILL AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of Immunology** 2000; 164:6166–6173.

MOON S, LEE H, KIM J, NA B, CHO S, LIN K, SOHN W, KIM T. High frequency of genetic diversity of *Plasmodium vivax* field isolates in Myanmar. **Acta Tropica** 2009; 109: 30-36.

MORAHAN G, BOUTLIS CS, HUANG D, PAIN A, SAUNDERS JR, HOBBS MR, GRANGER DL, WEINBERG JB, PESHU N, MWAIKAMBO ED, MARSH K, ROBERTS DJ, ANSTEY NM. A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. **Genes & Immunity** 2002; 3: 414–418.

MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology** 2008; 8: 958-69

MUELLER AK, DECKERT M, HEISS K, GOETZ K, MATUSCHEWSKI K, SCHLUTER D. Genetically attenuated *Plasmodium berghei* liver stages persist and elicit sterile protection primarily via CD8 T cells. **American Journal of Pathology** 2007; 171:107– 115.

MUELLER I, GALINSKI MR, BAIRD JK, CARLTON JM, KOCHAR DK, ALONSO PL, PORTILLO HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infectious Diseases** 2009; 9: 555-566.

MURRAY PJ, ALLEN JE, BISWAS SK, FISHER EA, GILROY DW, GOERDT S et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity** 2014; 41(1): 14–20

OEUVRAY C, THEISEN M, ROGIER C, TRAPE JF, JEPSEN S, DRUIHLE P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. **Infection and Immunity** 2000; 68: 2617–2620.

PARROCHE P, LAUW FN, GOUTAGNY N, LATZ E, MONKS BG, VISINTIN A, HALMEN KA, LAMPHIER M, OLIVIER M, BARTHOLOMEU DC, GAZZINELLI RT, GOLENBOCK DT. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 2007; 104:1919–1924.

PLEBANSKI M, HANNAN CM, BEHBOUDI S, FLANAGAN KL, APOSTOLOPOULOS V, SINDEN RE, HILL AV. Direct processing and presentation of antigen from malaria sporozoites by professional antigen-presenting cells in the induction of CD8 T-cell responses. **Immunology and Cell Biology** 2005; 83: 307–312.

POESPOPRODJO JR, FOBIA W, KENANGALEM E, LAMPAH DA, HASANUDDIN A, WARIKAR N, SUGIARTO P, TJITRA E, ANSTEY NM, PRICE RN. Vivax malaria: a major cause of morbidity in early infancy. **Clinical Infectious Diseases** 2009; 48: 1704–1712.

PRICE RN, DOUGLAS NM, ANSTEY NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases** 2009; 22: 430–435.

PUKRITTAYAKAMEE S, VANIJANONTA S, CHANTRA A, CLEMENS R, WHITE NJ. Blood stage antimalarial efficacy of primaquine in *Plasmodium vivax* malaria. **The Journal of Infectious Diseases** 1994; 169: 932–935.

QARI SH, SHI YP, GOLDMAN IF, UDHAYAKUMAR V, ALPERS MP, COLLINS WE, LAL AA. Identification of *Plasmodium vivax*- like human malaria parasite. **Lancet** 1993; 341: 780–783.

REESE TA, LIANG H, TAGER AM, LUSTER AD, ROOIJEN N V, VOEHRINGER D, et al. Chitin Induces Tissue Accumulation of Innate Immune Cells Associated with Allergy Tiffany. **Nature** 2007;447(7140):92–6.

RIBEIRO BP, CASSIANO GC, DE SOUZA RM, CYSNE DN, GRISOTTO MAG, DOS SANTOS APSA, MARINHO CRF, MACHADO RLD, NASCIMENTO FRF. Polymorphisms in *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein (CSP) Influence Parasite Burden and Cytokine Balance in a Pre-Amazon Endemic Area from Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 2016; 10(3): e0004479. doi:10.1371/journal.pntd.0004479.

RIBEIRO MCT, GONÇALVES EGR, TAUIL PL, SILVA AR. Aspectos epidemiológicos de um foco de malária no município de São Luís, MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2005; 38: 272–274.

RICHARDS JS, BEESON JG. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunology & Cell Biology** 2009; 87: 377–390.

ROCKETT KA, AWBURN MM, COWDEN WB, et al. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. **Infection and Immunity** 1991; 59:3280–3283.

ROESTENBERG M, MCCALL M, HOPMAN J, WIERSMA J, LUTY AJF, GEMERT GJV. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. **The New England Journal of Medicine** 2009; 361: 468–477.

ROSENBERG R, WIRTZ RA, LANAR DE, SATTABONGKOT J, HALL T, WATERS AP, PRASITTISUK C. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science** 1989; 245: 973–976.

RYAN JR, STOUTE JA, AMON J, DUNTON RF, MTALIB R, KOROS J, OWOUR B, LUCKHART S, WIRTZ RA, BARNWELL JW, ROSENBERG R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 2006; 75: 575–81.

SEGUIN MC, KLOTZ FW, SCHNEIDER I, WEIR JP, GOODBARY M, SLAYTER M, RANEY JJ, ANIAGOLU JU, GREEN SJ. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. **The Journal of Experimental Medicine** 1994; 180:353–358.

SCHUMANN RR. Malarial fever: Hemozoin is involved but Toll-free. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 2007; 104(6): 1743–1744.

SEMNANI RT. The interaction between filarial parasites and human monocyte/macrophage population. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 2013; 785:49–56.

SERGHIDES I, SMITH TG, PATEL SN, KAIN KC. CD36 and malaria: friends or foes? **Trends in Parasitology** 2003; 19: 461–469.

SHECHTER R, SCHWARTZ M. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer “if” but “how”. **The Journal of Pathology** 2013; 229:332–46

SILVA AN, SANTOS CC, LACERDA RN, MACHADO R, PÓVOA MM. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2006; 101: 547–550 (a)

SILVA AN, FRAIHA-NETO H, SANTOS CCB, SEGURA MNO, AMARAL JCOF, GORAYEB IS, LACERDA RNL, SUCUPIRA IMC, PIMENTEL LN, CONN JE, PÓVOA MM. Fauna anofélica da cidade de Belém, Pará, Brasil: dados atuais e retrospectivos. **Caderno de Saúde Pública** 2006; 22(8): 1575–1585 (b)

SILVA AR, FERNANDES JMC, RODRIGUES TA, DOS SANTOS HJ, CAVALHEIRO NNM, GUIMARÃES MC, GONÇALVES EGR. Controle da malária no Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2009; 42(3): 318–324.

SILVA AR, TAUIL PL, BASTOS JÚNIOR JL, MATOS WB, COSTA EAP, GONÇALVES EGR. Aspectos da transmissão focal de malária na Ilha de São Luís, Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 2006; 39: 250-254.

SONG HH, O SO, KIM SH, MOON SH, KIM JB, YOON JW, KOO JR, HONG KS, LEE MG, KIM DJ, SHIN DH, KANG SH, CHOI MG, LEE KH. Clinical features of *Plasmodium vivax* malaria. **The Korean Journal of Internal Medicine** 2003; 18: 220–24.

SOUZA-NEIRAS WC, STORTI-MELO LM, MACHADO RLD. The genetic diversity of *Plasmodium vivax*- A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2007; 102(3): 245-254.

STEIN M, KESHAV S, HARRIS N, GORDON S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of Experimental Medicine** 1992; 176:287–292.

STEVENSON MM, RILEY EM. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology** 2004; 4:169 –180.

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.

SU Z e STEVENSON MM. IL-12 is required for antibody mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria. **The Journal of Immunology** 2002; 168: 1348–1355 (2002).

SUWANARUSK R, COOKE BM, DONDORP AM, SILAMUT K, SATTABONGKOT J, WHITE NJ, UDOMSANGPETCH R. The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P vivax*. **The Journal of Infectious Diseases** 2004; 189: 190–94.

TJITRA E, ANSTEY NM, SUGIARTO P, WARIKAR N, KENANGALEM E, KARYANA M, LAMPAH DA, PRICE RN. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. **PLoS Medicine** 2008; 5(6): 890-899.

TORGLER R, BONGFEN SE, ROMERO JC, TARDIVEL A, THOME M, CORRADIN G. Sporozoite mediated hepatocyte wounding limits *Plasmodium* parasite development via MyD88- mediated NF-kappa B activation and inducible NO synthase expression. **The Journal of Immunology** 2008; 180:3990–3999.

TRIPATHI V, GUPTA D. Evolutionary analysis of circumsporozoite surface protein and merozoite surface protein-1 (CSP and MSP-1) sequences of malaria parasites. **Bioinformation** 2011; 6(8):320-323.

TRAVÉS PG, LUQUE A, HORTELANO S. Macrophages, Inflammation, and Tumor Suppressors: ARF, a New Player in the Game. **Mediators of Inflammation** 2012 ; 2012: 568783.

VENTURA AMRS. **Anemia da Malária por *Plasmodium vivax*: Estudo Clínico e Laboratorial em Crianças e Adolescentes.** Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Pós-Graduação em Medicina Tropical. 2010

WEINBERG JB, LOPANSRI BK, MWAIKABO E, GRANGER DL. Arginine, nitric oxide, carbon monoxide and endothelial function in severe malaria. **Current Opinion in Infectious Diseases** 2008; 21: 468-475.

WALTHER M, TONGREN JE, ANDREWS L, KORBEL D, KING E, FLETCHER H, ANDERSEN RF, et al. Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4+CD25 Regulatory T Cells Correlates with More Rapid Parasite Growth in Human Malaria Infection. **Immunity** 2005; 23: 287-296.

WELLEMS TE. *Plasmodium* chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug. **Science** 2002; 298:124–126.

WILSON MS, MENTINK-KANE MM, PESCE JT, RAMALINGAM TR, THOMPSON R, WYNN TA. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology** 2007;85(2):148–54.

WILLIAMS TN, MWANGI TW, WAMBUA S, et al. Sick cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. **The Journal of Infectious Diseases** 2005;192:178-86.

World Health Organization (WHO). **Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1 2008.** Geneva: WHO; 2009.

World Health Organization (WHO). **World Malaria Report 2011.** Geneva: WHO; 2011.

World Health Organization (WHO). **World Malaria Report 2012.** Geneva: WHO; 2012.

World Health Organization (WHO). **World Malaria Report 2014.** Geneva: WHO; 2014.

World Health Organization (WHO). **World Malaria Report 2015.** Geneva: WHO; 2015

World Health Organization (WHO). **World Malaria Report 2016.** Geneva: WHO; 2016

YADAVA A, SATTABONGKOT J, WASHINGTON MA, WARE LA, MAJAM V, ZHENG H, KUMAR S, OCKENHOUSE CF. A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. **Infection and Immunity** 2007; 75: 1177–85.

YAMAUCHI LM, COPPI A, SNOUNOU G, SINNIS P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology** 2007; 9(5): 1215–1222.

YEO TW, LAMPAH DA, GITAWATI R, et al. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. **The Journal of Experimental Medicine** 2007; 204:2693–2704.

YU YM, RYAN CM, CASTILLO L, et al. Arginine and ornithine kinetics in severely burned patients: increased rate of arginine disposal. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism** 2001; 280: E509–E517.

ZAKERI S, MEHRIZI AA, DJADID ND, SNOUNOU G. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. **Tropical Medicine and International Health** 2006; 2: 729-737.

ZEYREK FY, KURCER MA, ZEYREK D, SIMSEK Z. Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey. **Parasite Immunology** 2006; 28: 201-207.

ZHAO A, URBAN JF, ANTHONY RM, SUN R, STILTZ J, VAN ROOIJEN N, et al. Th2 Cytokine-Induced Alterations in Intestinal Smooth Muscle Function Depend on Alternatively Activated Macrophages. **Gastroenterology** 2008; 135(1):217–25.

ANEXO I



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

x	PROJETO DE PESQUISA	Número do Protocolo	23115 008013/2010-07
	PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	Data de entrada no CEP	18/06/2010
	TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	Data da assembleia	15/09/2010

I - Identificação:

Título do projeto:	Aplicação de tecnologias moleculares e imunológicas para caracterização clínico-epidemiológica e diagnóstica da malária por <i>Plasmodium vivax</i> no Estado do Maranhão		
Identificação do Pesquisador Responsável:	Profa Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento		
Identificação da Equipe executora:	Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, Antonio Rafael da Silva, Eloisa d Graça do Rosário Gonçalves, Valério Monteiro Neto, Ricardo Luiz Dantas Machado, Maria Regina D'Imperio Lima, Cláudio Romero Farias Marinho, Marcos Grigolin Grisotto.		
Instituição onde será realizado:	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão		
Área temática:	III	Multicêntrico:	Não
Cooperação estrangeira:	Não	Patrocinador:	Sim
		Data de recebimento:	25/08/2010
		Data de devolução	14/09/2010

II - Objetivos:

Geral:

Correlacionar os aspectos clínico-epidemiológicos com os achados moleculares e imunológicos da malária por *Plasmodium vivax* no Estado do Maranhão.

Específico:

1. Caracterizar os aspectos clínicos e epidemiológicos da malária por *P. vivax*;
2. Determinar a frequência dos genótipos da proteína Duffy na população estudada;
3. Determinar a carga parasitária e a frequência dos genótipos da proteína circunsporozoítica em amostras de pacientes;
4. Analisar o perfil de citocinas e de anticorpos e o fenótipo dos leucócitos no sangue de pacientes;
5. Identificar e caracterizar novos alvos biológicos com finalidade diagnóstica e terapêutica;

III - Sumário do projeto:

O projeto de pesquisa "Aplicação de tecnologias moleculares e imunológicas para caracterização clínico-epidemiológica e diagnóstica da malária por *Plasmodium vivax* no Estado do Maranhão" busca o aprimorar o conhecimento molecular acerca das variantes do *Plasmodium vivax* existentes no estado de modo a correlacionar estes achados com as características clínico - epidemiológicas de casos com desfechos de maior gravidade, tais como coagulopatias, comprometimento cerebral, insuficiência renal, dentre outras. Para tanto, estão associados em consórcio o Centro de Referência em Doenças Infecciosas do Departamento de Patologia e os Laboratórios de Imunofisiologia e de Genética e Biologia Molecular, cujas produções técnico - científicas dão substrato confiável à execução do mesmo. O recrutamento de pacientes será realizado pelo centro de referências, onde os mesmos serão atendidos e acompanhados clinicamente. O projeto descreve ainda todos os cuidados e atenção necessários aos pacientes quer aceitem ou não a participação no projeto. Este é um estudo com pleno financiamento pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão - FAPEMA.

IV - Comentários do relator:

O projeto em questão apresenta todas as características técnico – científicas necessárias à sua execução. Não obstante, tem um grande impacto positivo no desenvolvimento de conhecimento das variantes do vetor no estado, o que pode orientar novas formas de manejo e tratamento de forma a evitar os desfechos citados acima. Sendo assim, considerando que não foram identificadas pendências que firam a Resolução 196/96 do CNS, sou de parecer favorável à execução do projeto.

V - Pendências:

Nenhuma

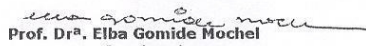
VI - Recomendações:

Nenhuma

VII - Parecer Consubstanciado do CEP

Deste modo, de acordo com relato acima exposto, o Protocolo 23115-008013/2010-07, referente ao projeto de pesquisa sob o título "Aplicação de tecnologias moleculares e imunológicas para caracterização clínico-epidemiológica e diagnóstica da malária por *Plasmodium vivax* no Estado do Maranhão" é considerado por este CEP como APROVADO.

VIII - Data da reunião do CEP: 15/09/2010


Prof. Drª. Elba Gomide Mochel
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA

DATA DE RECEBIMENTO: 23/09/10
RELATÓRIO PARCIAL: 23/09/11
RELATÓRIO FINAL:

NOTA:

1. Anexa folha do Relatório Parcial;
2. Pesquisas com duração acima de 6 meses deverão apresentar relatórios parciais semestrais;
3. Pesquisas com duração acima de 12 meses deverão apresentar relatórios anuais;
4. Após a conclusão da pesquisa deverá ser apresentado relatório final ao CEP/UFMA.

Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Ao assinar este termo, consinto livremente, após esclarecimentos prévios, em participar da pesquisa intitulada “Aplicação de tecnologias moleculares e imunológicas para caracterização clínico-epidemiológica e diagnóstica da malária por *Plasmodium vivax* no Estado do Maranhão”, coordenado pelos professores doutores Flávia Raquel F Nascimento e Antônio Rafael da Silva. Estou ciente que o projeto visa caracterizar os aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da malária causada por *P. vivax* para melhor entender a doença, a sua progressão e a melhor forma de tratamento. Minha participação nesta pesquisa restringe-se à entrevista, à doação de amostra de sangue e à obediência ao protocolo de tratamento que me será dado pelos médicos da equipe. O meu sangue será utilizado para realização de experimentos biológicos para avaliar parâmetros relacionados ao parasito causador da Malária. O sangue que eu doar será estocado para pesquisas futuras. Estou ciente de que será feito acompanhamento clínico e exames parasitológicos regulares para verificação da eficácia do tratamento. Para isso, deverei retornar sempre que chamado pelos médicos da equipe e para isso receberei vales transportes para o deslocamento. Atesto, portanto, que entendi a proposta do projeto e concordo em participar da pesquisa doando amostras de sangue e cooperando com o tratamento. Atesto ainda que os pesquisadores garantiram que o meu tratamento será garantido mesmo que eu não concorde em responder o questionário ou doar as amostras de sangue para a pesquisa.

Nome_____Data_____

Endereço_____

Testemunha_____

Pesquisadores responsáveis:

Profa. Dra. Flávia Raquel F. Nascimento e Prof. Dr. Antônio Rafael da Silva

Universidade Federal Do Maranhão

Endereço: Av dos Portugueses s/n, Campus do Bacanga, Integrado Bloco I, Lab. de Imunofisiologia

Telefone:98 33018548