

## AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO E REGULAÇÃO EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES INFECTADOS POR *Plasmodium vivax*.

MUNIZ, Thyanne França<sup>1</sup>  
NINA, Larissa Neuza d Silva<sup>1</sup>  
SILVA, Cristiane Santos Silva e<sup>1</sup>  
RODRIGUES, João Francisco Silva<sup>1</sup>  
MESQUITA, Ericka Miranda<sup>1</sup>  
GRISOTTO, Marcos Augusto Grigolin<sup>1,2\*</sup>

**Resumo:** A malária é uma doença infecciosa aguda causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e é transmitida ao homem pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Dentre as cinco espécies de *Plasmodium* que infectam seres humanos o *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes na região Amazônica. Dentre os mecanismos imunológicos associados a essa doença, muitos fatores ainda não são totalmente compreendidos, como relação entre ativação de células do sistema imunes e a função das células regulatórias no controle da parasitemia. Este trabalho analisou marcadores de ativação, regulação e moléculas coestimulatórias de células do sistema imune durante a infecção pelo *Plasmodium vivax* em pacientes infectados residentes na cidade de Cruzeiro do Sul (AC). O sangue periférico dos pacientes infectados foi coletado para realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Indivíduos sadios nunca infectados com malária serviram como controle. Resultados: A infecção pelo *Plasmodium vivax* induziu o aumento de CD69 por células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e linfócitos B e de HLA-DR por linfócitos T CD4<sup>+</sup>. A expressão aumentada das moléculas coestimulatórias OX40 e ICOS mas não GITR também foi observada em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos indivíduos acometidos pelo *Plasmodium vivax* em comparação com controles sadios. Por outro lado, um percentual significativamente maior de células T reguladoras foi observado no grupo de pacientes. Em conjunto, esses dados sugerem que a infecção pelo *P. vivax* promove aumento de marcadores de ativação e moléculas coestimulatórias em indivíduos infectados bem como condiciona um aumento no compartimento de células T reguladoras.

**Descritores:** *Plasmodium vivax*; Células Reguladoras; co-estimulação

**Abstract:** Malaria is an acute infectious disease caused by a protozoa of the genus *Plasmodium* being transmitted by the bite of the female *Anopheles* mosquito. Considering the five species of *Plasmodium* that infect humans, *P. falciparum* and *P. vivax* are the most prevalent in the Amazon region. Among the immunological mechanisms associated with this disease, many factors are still not fully understood, as the relationship between the immune system cell activation and function of regulatory T cells in the control of parasitaemia. This study examined activation markers, regulation and co-stimulatory molecules of the immune system cells during infection by *Plasmodium vivax*-infected patients living in the city of Cruzeiro do Sul (AC). The peripheral blood cells of infected patients were collected to perform Immunophenotyping by flow cytometry. Healthy individuals never infected with malaria served as controls. Results: Infection with *Plasmodium vivax* induced increase of CD69 on CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T and B cells and HLA-DR on CD4 + T cells. The increased expression of co-stimulatory molecules OX40 and ICOS but not GITR was also observed in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of individuals affected by *Plasmodium vivax*, compared to healthy controls. On the other hand, a significantly greater percentage of T regulatory cells was observed in the group of patients. Altogether, these data suggest that the *P. vivax* infection promotes an increase in activation markers and co-stimulatory molecules in infected individuals as well as an increase in the regulatory T cell compartment.

**Descriptors:** *Plasmodium vivax*; Regulatory T Cells; co-stimulation

### INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo e acomete milhões de indivíduos por ano, sendo a principal causa de morte e morbidade em diversos países em desenvolvimento<sup>32</sup>. Esta parasitose é transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* infectada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, tendo 5 espécies que infectam seres

humanos: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malarie* e *P. knowlesi*. Na região da Amazônia legal é maior a prevalência do *P. vivax*, e segundo dados da Organização Mundial da Saúde, anualmente ocorrem cerca de 15,8 milhões novos casos mundialmente<sup>32</sup>. A maioria das infecções ocorre em áreas tropicais por conta das condições ambientais que favorecem o desenvolvimento do mosquito vetor

<sup>1</sup> Universidade Ceuma, São Luis (MA).

<sup>2</sup> Instituto Florence de Ensino Superior, São Luis (MA).

sendo que diferentes determinantes como o clima ameno, forma de desordenada ocupação de terras e exploração irracional de recursos naturais podem aumentar a probabilidade de transmissão da doença<sup>24</sup>. Além disso, o descaso com as políticas socioeconômicas e de saúde nas regiões de alta transmissão da doença também estão relacionadas com o aumento dos números de casos ao longo dos anos<sup>8</sup>. Dados da literatura indicam que em áreas endêmicas com transmissão ativa da doença, como o estado do Acre, a parasitemia dos infectados tende a ser baixa ou moderada<sup>9</sup>. Neste estado houve 31.241 casos notificados de malária no ano de 2014.

A maioria dos estudos sobre a malária tem como foco a infecção pelo *P. falciparum*, os quais revelaram uma gama de informações a respeito da infecção e da interação parasita-hospedeiro, entretanto pouco se sabe ainda sobre as alterações do sistema imunológico durante a infecção pelo *P. vivax*. Evidências indicam que sistema imunológico responde à infecção nos diversos estágios do ciclo do parasita, e depende de fatores como inerentes ao parasita e suas propriedades antigênicas<sup>18,28</sup>. Na fase inicial da infecção ocorre a estimulação da produção de anticorpos contra os esporozoítos, enquanto que na fase hepática e sanguínea a resposta é predominantemente celular, que causa a redução da densidade parasitária pela destruição de hepatócitos e hemácias infectadas, sendo dependente da ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos<sup>29, 30, 13</sup>. Dessa forma a resposta imune durante a malária possui um caráter humoral e humoral, visto que as células T estimulam a produção de anticorpos e induzem a ativação de células T *helper* e citolíticas.

Marcadores de ativação são expressos por linfócitos durante as respostas imunes, e invariavelmente durante a infecção malárica, sendo que muitas vezes essa expressão aumentada se correlaciona com a gravidade do quadro clínico<sup>23,14</sup>. Neste sentido, alguns trabalhos relatam que durante a infecção pelo *Plasmodium* ocorre um aumento da expressão dos marcadores HLA-DR e o CD69 por linfócitos T e outros tipos celulares sendo que este aumento ocorre especialmente na fase inicial do estímulo patogênico<sup>29, 30, 23</sup>.

Durante a malária, além do aumento de células ativadas/efetoras em resposta ao parasita surgem

também células T reguladoras (Tregs) que são responsáveis por evitar que haja uma ativação e proliferação exacerbada durante resposta imune, limitando assim a sua magnitude e/ou podendo incapacitar o hospedeiro de combater de forma eficaz e adequada a infecção. Estas células Tregs possuem fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup><sup>25,3</sup>. Além desses marcadores, há também uma variedade de células coestimulatórias que podem contribuir para a modulação do sistema imune como GITR que é membro da superfamília dos receptores TNF e expresso nas superfícies de células regulatórias naturais; o OX40 que cuja expressão nos linfócitos contribui para o desenvolvimento de células de memória e o ICOS que exerce papel importante para os mecanismos supressores das células regulatórias<sup>26</sup>.

Tendo em vista que a malária é um grave problema de saúde pública e a escassez de informações a respeito da modulação do sistema imunológico durante a infecção, este trabalho teve por objetivo analisar a dinâmica de expressão de marcadores de ativação, regulação e moléculas coestimulatórias por linfócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax* residentes na cidade de Cruzeiro do Sul (AC).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### POPULAÇÃO ESTUDADA

Os indivíduos que participaram do estudo são provenientes do município de Cruzeiro do Sul (AC), de ambos gêneros e maiores de 18 anos. As amostras de sangue de todos os participantes foram submetidas ao teste de gota espessa para confirmação da infecção e a identificação da espécie do plasmódio, que foi feita a partir do método observação por microscopia ótica de lâminas coradas com Giemsa (Manual de Diagnóstico Laboratorial da malária, 2005, Ministério da Saúde). A avaliação do nível de parasitemia foi realizada por contagem do número de parasitas através da microscopia ótica.

Foram analisadas amostras de sangue de 25 indivíduos (homens e mulheres) na fase aguda da infecção pelo *P. vivax*, antes do início tratamento. O grupo controle foi composto por 10 indivíduos (homens e mulheres) sadios, que nunca contraíram nenhum tipo de malária, residentes no Estado do

Maranhão (grupo controle), visto que, dentre os indivíduos pesquisados no município de Cruzeiro do Sul (AC) não foram encontrados indivíduos que nunca tivessem sido infectados pelo *Plasmodium*.

### ASPECTOS ÉTICOS

Por tratar-se de um estudo com seres humanos a pesquisa foi submetida e aprovada pelos Comitês de Ética e Pesquisa da Universidade Ceuma (protocolo 00879/09, de 17/12/2009) e da Universidade Federal do Acre (protocolo 136622/12).

### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo indivíduos acima de 18 anos, de ambos os sexos, com exame de gota espessa positivo para *Plasmodium vivax* que concordaram em participar do estudo através da assinatura de um o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram excluídos das análises, indivíduos que relataram apresentar outras comorbidades (hepatopatias, hemopatias, infecções virais e doenças imunossupressoras).

### COLETA E ESTOCAGEM DO MATERIAL

As amostras de sangue obtidas foram acondicionadas em tubos contendo heparina e mantidas sob refrigeração por no máximo 6 horas até o processamento laboratorial. As amostras foram encaminhadas para o Centro de Estudos e Pesquisas em Doenças Infecciosas – CEPDI/ Instituto da Biodiversidade/Universidade Federal do Acre (UFAC) – Campus Floresta, para imunofenotipagem através de citometria de fluxo.

### ISOLAMENTO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO COM TAMPÃO DE LISE

Leucócitos foram isolados a partir de 1 mL de sangue de cada indivíduo por utilização de tampão de lise de hemácias ACK (formulação para 1 litro: 8g NH<sub>4</sub>Cl, 1g KHCO<sub>3</sub>, 1,84g de EDTA 2H<sub>2</sub>O). Em tubos cônicos de 15 ml foram adicionados 10 ml de tampão de lise de hemácias a 37°C para cada mL de sangue e as amostras foram centrifugadas a 300g por 5 minutos. As amostras contendo as células foram lavadas com uma solução de PBS (Sigma-Aldrich, Brasil). Após o isolamento, as células foram transferidas para uma placa de fundo redondo (1x10<sup>6</sup> células por poço) e marcadas com os anticorpos específicos.

### FENOTIPAGEM DE LEUCÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o isolamento, os leucócitos foram incubados por um período de 30 minutos a 4°C com anticorpos anti- CD4(PECy5), CD8(PE), CD19(PECy5) (marcadores de linhagem), HLA-DR (PECy5), CD69(FITC), CD25(PE), CD127(FITC G17R (PE), ICOS (PE) e OX40(FITC)) (marcadores de ativação/regulação), todos adquiridos da BD Biosciences (Pharmingen). Para identificação da subpopulação de linfócitos Treg foram usados os marcadores CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> (com baixa expressão deste último). Após a marcação, as células foram lavadas com 200 µL de solução PBS (Sigma-Aldrich, Brasil) e transferidas para tubos cônicos de 1 mL contendo aproximadamente 400 µL de solução salina. As células foram analisadas utilizando o citômetro BD Accuri C6 e o dados analisados com o software FlowJO (treeStar-CA). Células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, bem como monócitos e granulócitos foram estimadas baseados em marcadores fenotípicos e/ou na distribuição por tamanho e granulosidade (FSC-A vs. SSC-A). Os resultados são expressos na porcentagem do número total de células viáveis ou intensidade de fluorescência.

### ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para as variáveis numéricas. Na comparação entre dois grupos com distribuição normal foi utilizado o Teste *t* de *Student* independente. Não havendo distribuição normal, a comparação entre dois grupos foi feita pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . Os dados estão representados no formato de Box-plots que indicam que 25% valores são menores que o primeiro quartil, 50% são menores que o segundo quartil (valor da mediana da amostra) e 75% são menores que o terceiro quartil. As barras representam os valores mínimos e máximos. Para confecção dos gráficos foi utilizado o programa *Prism for Windows 5.0* (GraphPad).

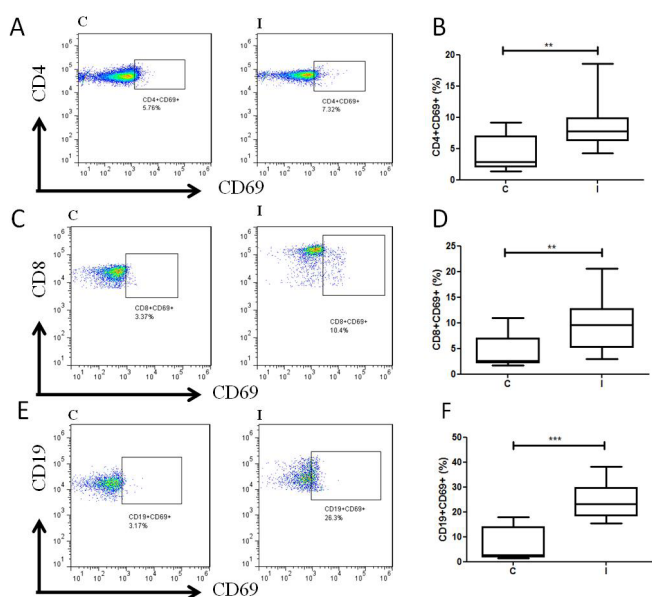


## RESULTADOS

A frequência relativa dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B não foram diferentes entre o grupo infectado e o grupo controle ( $p > 0,05$ ) (dados não mostrados), entretanto quando analisados marcadores de ativação (CD69 e HLA-DR) houve aumento na expressão e frequência destes marcadores durante a infecção pelo *Plasmodium vivax* (Figura 1).

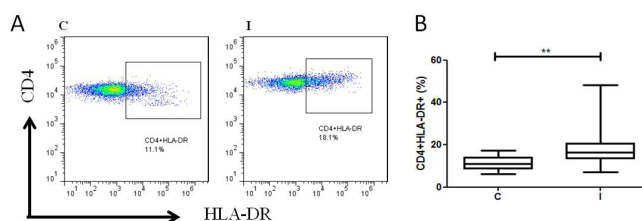
Os indivíduos infectados pelo *Plasmodium vivax* apresentaram frequência significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de células T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> se comparados aos respectivos controles (Figura 1A e 1B). Da mesma forma, um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência relativa de células CD69<sup>+</sup> dentre linfócitos T CD8<sup>+</sup> também foi observado no grupo infectado (Figura 1C e 1D). Resultado semelhante foi obtido em relação aos linfócitos B, onde também houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão de CD69 no grupo de infectados, em relação ao grupo controle (Figura 1E e 1F).

**Figura 1** - Representação da expressão de CD69 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A), T CD8<sup>+</sup> (C) e B (E). Mediana dos valores de células T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>(%) (B), T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>(%) (D) e CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (%) (F) em controles (C) e infectados (I) pelo *Plasmodium vivax*. Box-plots que indicam que 25% valores são menores que o primeiro quartil, 50% são menores que o segundo quartil (valor da mediana da amostra) e 75% são menores que o terceiro quartil. As barras representam os valores mínimos e máximos. \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ .



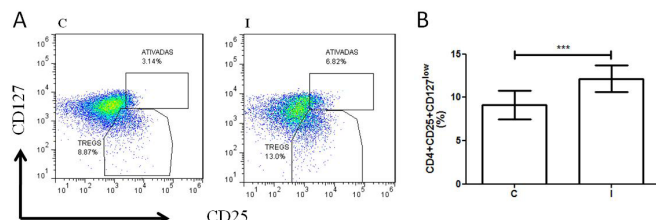
O HLA-DR é uma glicoproteína de superfície que pertence à classe dos antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II que está presente em células apresentadoras de antígenos (APCs) e reflete seu estado de ativação. Entretanto, sua primeira descrição foi relatada em relação aos linfócitos T ativado, representando, portanto, um marcador de ativação para os mesmos em seres humanos. Neste sentido, a infecção pelo plasmódio promoveu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de linfócitos T CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (Figura 2) em comparação com indivíduos sadios e infectados.

**Figura 2** - Expressão de células T CD4<sup>+</sup>HLA-DR (A) e mediana dos valores de células CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (%) em controles (C) e infectados (I) pelo *Plasmodium vivax*. Box-plots que indicam que 25% valores são menores que o primeiro quartil, 50% são menores que o segundo quartil (valor da mediana da amostra) e 75% são menores que o terceiro quartil. As barras representam os valores mínimos e máximos. \*\* $p < 0,005$ .



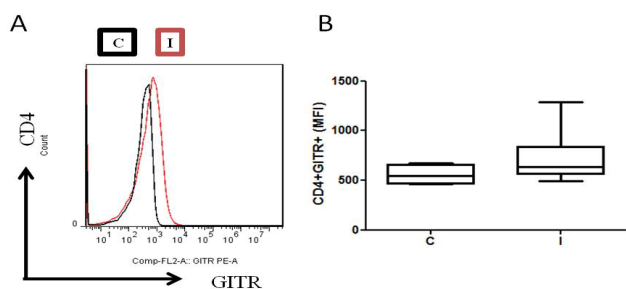
A molécula CD25 (receptor de IL-2) possui expressão aumentada durante a ativação e proliferação celular. Além disso, este receptor também é expresso em células reguladoras, que apresentam o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Por ser um fator de transcrição nuclear, a detecção de FOXP3 demanda a permeabilização celular. Alternativamente, usa-se o marcador CD127 (receptor de IL-7) juntamente com os marcadores CD4 e CD25 para identificação de as células Tregs. Portanto, pode-se dizer que o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> caracteriza esta subpopulação de células Treg<sup>12</sup>. Por outro lado, células T CD4<sup>+</sup> com alta expressão de CD25<sup>+</sup> e CD127 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>) constituem células ativadas (Figura 3A). Verificou-se que a infecção pelo *P. vivax* determinou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> em indivíduos infectados em relação ao grupo controle (Figura 3B), fato não observado em relação às células T CD4<sup>+</sup> ativadas (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>) (dados não mostrados).

**Figura 3** - Frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup> (ativadas) e T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (Tregs) em controles (C) e infectados (I) pelo *Plasmodium vivax* (A). Os gráficos de barras representam a média ± desvio padrão da frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (B). \*\*\*p<0,0005.



O GITR é um receptor da superfamília dos receptores de TNF cuja sinalização possui função supressora em células do sistema imune. Verificou-se uma variabilidade grande de expressão desse marcador em indivíduos infectados, apesar disto não foi observada diferença significativa na mediana da intensidade de fluorescência em linfócitos T CD4<sup>+</sup> em relação aos controles (Figura 4A e B) (p>0,05).

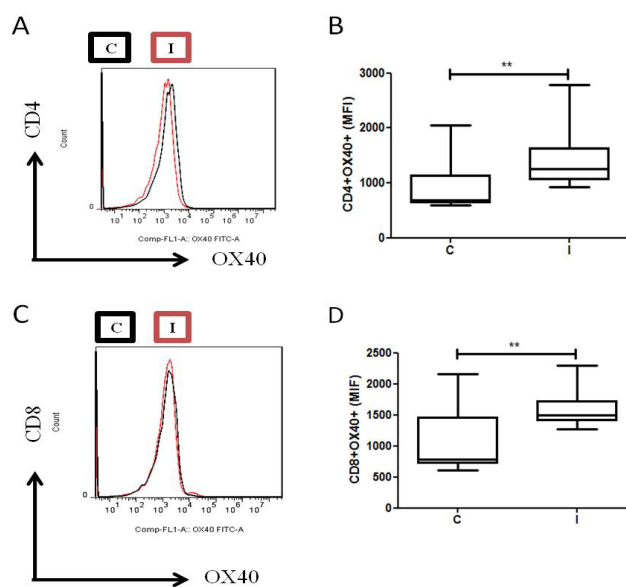
**Figura 4** - Histograma da mediana da intensidade de fluorescência de GITR em linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A). Valores da mediana da intensidade de fluorescência de GITR em linfócitos T CD4<sup>+</sup> (B) em indivíduos controles (linha preta) e infectados (linha cinza) pelo *Plasmodium vivax*. Box-plots que indicam que 25% valores são menores que o primeiro quartil, 50% são menores que o segundo quartil (valor da mediana da amostra) e 75% são menores que o terceiro quartil. As barras representam os valores mínimos e máximos.



Outra molécula coestimulatória investigada no estudo foi o OX40(CD134) geralmente expressa de 24 a 72 horas após a ativação celular. A infecção malarica causou uma alteração na expressão dessa molécula, medida pela mediana da intensidade de fluorescência em células T CD4<sup>+</sup> (Figura 5A) e T CD8<sup>+</sup> (Figura 5C). Em células T CD4<sup>+</sup> a mediana da intensidade de fluorescência de OX40 foi significativamente maior (p<0,05) nos indivíduos infectados, se

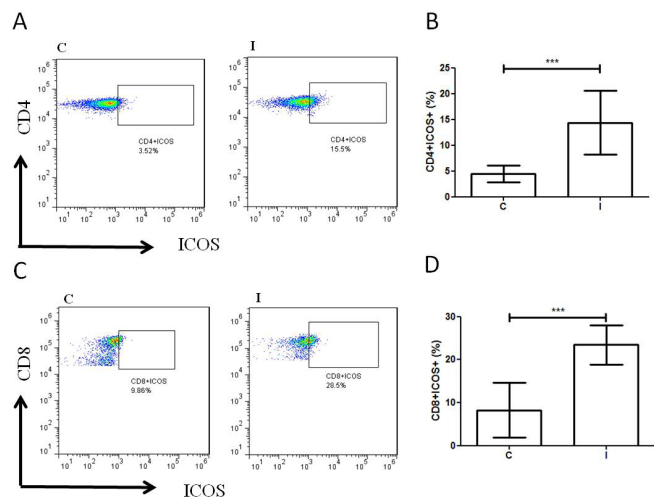
comparado ao grupo controle (Figura 5B), resultado semelhante também ocorreu nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, onde a mediana de fluorescência aumentou de forma significativa (p<0,05) nos indivíduos infectados pelo *Plasmodium vivax* (Figura 5D).

**Figura 5** - Histograma da mediana da intensidade de fluorescência de OX40 em células T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (C) em indivíduos controles (linha preta) e infectados (linha cinza). Mediana da intensidade de fluorescência de OX40 em células T CD4<sup>+</sup>(B) e T CD8<sup>+</sup> (D) em controles (C) e infectados (I) pelo *Plasmodium vivax*. Box-plots que indicam que 25% valores são menores que o primeiro quartil, 50% são menores que o segundo quartil (valor da mediana da amostra) e 75% são menores que o terceiro quartil. As barras representam os valores mínimos e máximos. \*\*p<0,005.



A molécula ICOS (Inducible T-cell Costimulator) também conhecida como CD278 pertence à mesma família dos receptores de membrana CD28 e CTLA-4. A sinalização via ICOS potencializa as respostas de células T à antígenos exógenos, especialmente no que diz respeito à proliferação e secreção de citocinas. Ao avaliar-se sua expressão na população de células T CD4<sup>+</sup> observou-se que pacientes infectados tiveram um aumento significativo (p<0,05) na frequência do marcador ICOS (Figura 6<sup>a</sup> e B). Fato similar ocorreu em relação à população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> (Figura 6C e D).

**Figura 6** - Frequência de células T CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> (C) em indivíduos controles (C) e infectados (I) pelo *Plasmodium vivax*. Os gráficos de barras representam a média ± desvio padrão da frequência de células T CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> (B) e T CD8<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> (D). \*\*\*p<0,0005.



## DISCUSSÃO

A malária é uma doença parasitária infecciosa, endêmica em muitos países tropicais, em que transmissão natural é variável em intensidade nas várias partes do mundo dependendo de fatores locais como padrões climáticos, exploração dos recursos naturais e fatores socioeconômicos. A transmissão em nestas áreas endêmicas deve-se principalmente ao fato da existência de doentes assintomáticas que albergam formas sexuadas do parasita, o que torna o difícil o manejo deste mal<sup>22</sup>.

Este trabalho foi realizado no município de Cruzeiro do Sul (AC), uma região de transmissão ativa de malária no Brasil, onde por muitas vezes os acometidos apresentam baixa parasitem e poucos sintomas fazendo com que os mesmos não procurem atendimento, fato que favorece a transmissão<sup>19</sup>. Sabe-se, entretanto, que mesmo na ausência sintomas clínicos existe a resposta imune na forma de anticorpos e células específicas que mantém a parasitemia em baixos níveis possibilitando aos infectados uma vida quase normal. Este trabalho procurou avaliar o estado de ativação e regulação leucócitos em indivíduos infectados pelo *Plasmodium vivax*. Assim, não foi surpreendente o fato de que não foram observadas diferenças significativas no percentual de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e B (CD19<sup>+</sup>). Estudos

relatam que apesar da frequência de linfócitos totais não se alterar durante a infecção malárica pode haver uma grande ativação de subpopulações de leucócitos durante a infecção<sup>16</sup>. Desse modo, apesar de não haver um aumento percentual significativo de células T e B, a interação entre as mesmas através de moléculas coestimulatórias possuem um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune<sup>20</sup> favorecendo a produção de anticorpos<sup>31</sup> e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), que na maioria das vezes controla, mas não é capaz de eliminar de o parasita<sup>4</sup>.

Para avaliar a ativação do sistema imunológico durante a infecção malárica, utilizamos marcadores como o CD69 e o HLA-DR. O CD69 é uma molécula expressa em linfócitos logo no início da exposição a um estímulo. Nas três populações celulares analisadas (linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e B) houve aumento na frequência de CD69 nos indivíduos acometidos pela malária. Ainda analisando marcadores de ativação durante a infecção, os infectados pelo *P. vivax* apresentaram significativo aumento na frequência de HLA-DR por linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Esses dados corroboram com achados referentes à infecção pelo *P. falciparum*, onde também foi observado um aumento significativo na expressão de HLA-DR por células T CD4<sup>+</sup><sup>14,16</sup>.

Concomitantemente à uma ativação de células efetoras, que tem o papel de combater a infecção, aparecem na corrente sanguínea dos indivíduos infectados células reguladoras (Tregs), uma população de compreende de 5% a 10% de linfócitos T CD4<sup>+</sup> periféricos em humanos, que são fundamentais para a manutenção da tolerância imunológica em situações normais<sup>1</sup>, mas também porque atuam como supressoras das respostas imunes exacerbadas através do contato direto com células imunes efetoras através de moléculas como o CTLA-4 e o GITR e/ou pela produção de citocinas regulatórias<sup>2</sup>.

Em humanos, ainda existem poucos estudos sobre o papel das Tregs e a imunidade antimalárica, porém trabalhos têm mostrado que ocorre um aumento significativo da população de células Treg nas infecções com *P. falciparum* e *P. vivax*<sup>6</sup>. Em nosso estudo verificou-se um aumento significativo desta subpopulação com fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>



(Figura 3). A expansão das células Tregs durante a infecção malárica humana e experimental parece estar relacionada com o aumento da carga parasitária<sup>11</sup>, inclusive em infecções pelo *Plasmodium vivax* em indivíduos de áreas endêmicas<sup>5</sup>, isto porque uma supressão da resposta do padrão Th1 na malária permite ao parasito ter condições favoráveis para sua multiplicação na corrente sanguínea.

No presente trabalho também foi avaliada a expressão de moléculas coestimulatórias, presentes em várias células e que atuam de diferentes maneiras frente a uma infecção. Em linfócitos T CD4<sup>+</sup> a expressão de GITR, foi maior nos grupos de infectados, porém sem diferença estatística significativa. Nocentini (2007)<sup>21</sup> afirma que o GITR desencadeia atividade efetora em células T, pois é expresso em altos níveis nas células regulatórias, tendo um papel importante na modulação da atividade supressora das Tregs, sendo regulada positivamente em células T CD4<sup>+</sup> convencionais após ativação, atuando na proliferação e produção de citocinas em células T efectoras<sup>21</sup>.

Estudos demonstram que durante a infecção pelo *P. vivax* ocorre o aumento de GITR em células regulatórias de infectados<sup>11,5</sup>. Em modelos experimentais de malária em camundongos dados sugerem que a infecção altera a sinalização GITR via Tregs, suprimindo o sistema, e assim a resposta imune, o que eventualmente, contribui para a fuga de parasitas da imunidade da célula T do hospedeiro e aumento da parasitemia<sup>15</sup>. Pode-se pensar que as células reguladoras possuem um papel dúbio relevante na patogênese tanto na proteção do hospedeiro, por um lado autolimitando a resposta imune evitando assim uma ativação exacerbada do sistema imune, mas por outro lado permitindo a proliferação dos parasitas pela inibição da ativação celular.

Nossos resultados indicam um aumento significativo de OX40 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Sabe-se que OX40 está relacionado com células regulatórias e efectoras, sendo que nas células Treg esta molécula é expressa constitutivamente, enquanto nas T efectoras está expressa apenas após a ativação<sup>12</sup>. Estudos demonstram que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> podem se diferenciar em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, e que o OX40 está relacionado com esse mecanismo<sup>27</sup>. Outros trabalhos

afirmam que camundongos deficientes de OX40 apresentam redução de células regulatórias, enquanto que a presença desse marcador nos animais acarreta um aumento da frequência de Tregs<sup>33</sup>.

O ICOS é uma molécula pertencente à família de coreceptores CD28 e CTLA-4, e desempenha um papel importante na estimulação, proliferação e sobrevivência de células T<sup>17</sup>. Neste trabalho houve um aumento significativo da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> positivos para ICOS, resultado semelhante foi encontrado por Costa (2013)<sup>10</sup>, onde pacientes em fase aguda da infecção pelo *P. vivax* tiveram aumento na expressão desse marcador.

A importância da molécula ICOS para o desenvolvimento de células Treg foi relatada em modelo murino, onde os animais estimulados com antígenos tiveram aumento na expressão de ICOS e proliferação de células regulatórias. Por outro lado, camundongos *knockout* para ICOS não apresentam aumento da proliferação de células Treg após o mesmo estímulo<sup>7</sup>.

As moléculas coestimulatórias interagem com diferentes populações celulares, tais como APC, células efectoras ou regulatórias, assim, trazem diferentes respostas que podem resultar na estimulação ou inibição do sistema imune, ou seja, acarretando em respostas que são essenciais e significativas durante a infecção malárica. Sendo assim, pesquisas sobre as alterações imunológicas durante a malária podem contribuir para o entendimento da reação dos indivíduos frente a esta infecção parasitária que se tornou problema de saúde pública.

Este trabalho é um dos primeiros no Brasil a realizar caracterização imunológica em indivíduos infectados pelo *Plasmodium vivax* em uma área de transmissão ativa da doença e a estudar a relação das moléculas coestimulatórias durante essa infecção. Neste sentido os dados aqui apresentados indicam que apesar de não haver variações significativas nas frequências de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> além de linfócitos B, os mesmos apresentaram aumento significativo de moléculas de ativação (CD69 e HLA-DR) durante a infecção aguda pelo *Plasmodium vivax* que pode influenciar no nível geral de ativação do sistema imune e acarretar em secreção de citocinas como a IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , favorecendo o combate ao parasita, mas por outro lado aumentando a sintomatologia<sup>34</sup>.

Por outro lado, o aumento significativo de células reguladoras (Tregs) e de moléculas que estão diretamente relacionadas à função supressora (GITR, OX40 e ICOS) aponta para uma regulação no sistema nos pacientes infectados, no sentido de se evitar uma exacerbação da ativação, que pode ser danosa aos indivíduos. Portanto, estes achados permitem, pelo menos em parte, o entendimento da dinâmica de ativação e regulação do sistema imune durante a infecção aguda pelo *Plasmodium vivax* entretanto mais estudos são necessários para a compreensão de como esses fatores podem influenciar a gravidade e o prognóstico da doença.

### REFERÊNCIAS

1. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R. The role of FOXP3 isoforms in the generation of human CD4<sup>+</sup> Tregs. *J. Clin. Invest* 2005; 115: 3276–84.
2. Belkaid, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7 (11):875-88.
3. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 551-589.
4. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* 1995; 182: 409-418.
5. Bueno LL, Morais CG, Araujo FF, Gomes JA, Correa-Oliveira R, Soares IS, et al. *Plasmodium vivax*: induction of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One* 2010. Disponível em: URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224778>.
6. Bueno LL. Resposta imune celular e humoral de indivíduos infectados por *Plasmodium vivax* frente ao antígeno 1 de membrana apical (AMA-1). [Tese de doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.
7. Busse M, Krech M, Meyer-Bahlburg A, Henig C, Hansen G. ICOS mediates the generation and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells conveying respiratory tolerance. *J. Immunol* 2012; 189: 1975–1982.
8. Cérvolo IP. Caracterização Imunológica e molecular da Duffy Binding Protein do *Plasmodium vivax* em áreas de Transmissão de Malária a Região Amazônica e Extra-Amazônica Brasileira [Tese de doutorado]. Belo Horizonte: Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (IRR, FIOCRUZ); 2007.
9. Chagas ECDS, Nascimento CTD, Santana FSED, Bã'tto-Menezes CH, Martinez-Epinosa FE. Malária durante a gravidez: efeito sobre o curso da gestação na região amazônica. *Rev Pan de Saúde Pública* 2009; 26: 203-208.
10. Costa PAC. Caracterização de moléculas reguladoras durante a malária *vivax*. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
11. Gonçalves RM, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? *Infect Immun* 2010; 78:4763-4772.
12. Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M. OX40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 1998; 161: 6510-6517.
13. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, et. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest* 2008; 118: 1266-1276.
14. Hananantachai H, Patarapotikul J, Ohashi J, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K. Polymorphisms of the HLA-B and HLADRB1 genes in Thai malaria patients. *Jpn. J. Infect* 2005; 58: 25–28.



- 15 Hisaeda H, Hamano S, Mitoma-Obata C, Tetsutani K, Imai T, et al. Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection. Eur J Immunol 2005; 35: 3516–3524.
- 16 Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. Clinical and Vaccine Immunology 2006; 13: 376-379.
- 17 Kornete M, Sgouroudis E, Piccirillo CA. Icos dependent homeostasis and function of FOXP3 regulatory T cells in islets of non obese diabetic mice. J Immunol 2012; 188: 1064-1074.
- 18 Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. Lancet Infect Dis 2002; 2: 472-478.
- 19 Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. Am J. Trop Med Hyg 2001; 64(1, 2): 97–106.
- 20 Mount AM, Mwapasa V, Elliott SR, Beeson JG, Tadesse E, Lema VM, et al. Impairment of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy by HIV infection. Lancet 2004; 363: 1860-1867.
- 21 Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C. GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. Eur J Immunol 2007; 37: 1165– 1169.
- 22 Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. Malar J 2010; 115: 9-11.
- 23 Roetyneck S. Natural killer cells and malaria. Immunological Reviews 2006; 214: 251–263.
- 24 Saraiva, MDGAG, Amorim RDS, Moura MANSI, Martinez-Espinosa FE, Barbosa MDGAV. Expansão urbana e distribuição espacial da malária no município de Manaus, Estado do Amazonas. Soc Brasil de Med Tropical 2009; 42: 515-522.
- 25 Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J Exp Med 2006; 203:1693-700.
- 26 Shevach EM, Dipaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton, AM. The lifestyle of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. Immunol Rev 2006; 212:60-73.
- 27 So T, Croft M. OX40 inhibits TGF-beta and antigen-drive conversion of naïve CD4 T cells into CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells. J Immunol 2007; 179: 1427-1430.
- 28 Steverson MM, Riley M. Innate immunity to malaria. Natl Rev Immunol 2004; 4: 169–180.
- 29 Taylor-Robinson AW, Philips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY. The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. Science 1993; 260: 1931-1934.
- 30 Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, et al. Reciprocal regulation of Th1- and Th2- cytokine producing T cells during clearance of parasitemia in *Plasmodium falciparum* malaria. Infect Immun 1998; 66: 6040-6044.
- 31 Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, et al. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. PLoSPathog 2010. Disponível em: URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20174609>.

- 32 World Health Organization (WHO). Monitoring Antimalarial Drug Resistance. WHO/CDS/CSR/EPH/.Geneva, 2014.
- 33 Xiao X, Gong W, Demirci G, Liu W, Spoerl S, Chu X, et al. New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo. J Immunol 2012; 188: 892-901.
- 34 Karunaweera, Nadira D. et al. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. Trends in Parasitology 2003, Volume 19, Issue 4, 188-193.

**\*Autor para correspondência:**

Marcos Grisotto

**E-mail:** marcos.grisotto@gmail.com