



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**ATIVAÇÃO PELA MYD88 AUMENTA NÍVEIS DE QUINURENINA E  
MODULA RESPOSTA DE CÉLULAS T EM MALÁRIA**

**RAFAELLA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**MANAUS-AMAZONAS**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**RAFAELLA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**ATIVAÇÃO PELA MYD88 AUMENTA NÍVEIS DE QUINURENINA E  
MODULA RESPOSTA DE CÉLULAS T EM MALÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientador: Dr. Pritesh Jaychand Lalwani**

**MANAUS – AMAZONAS**

**2016**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237a Santos, Rafaella Oliveira dos  
Ativação pela MYD88 aumenta níveis de quinurenina e modula  
resposta de células T em Malária / Rafaella Oliveira dos Santos.  
2016  
89 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Pritesh Jaychand Lalwani  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Malária. 2. Células T reguladoras. 3. Triptofano. 4.  
Quinurenina. 5. Indoleamina 2,3-dioxigenase. I. Lalwani, Pritesh  
Jaychand II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**RAFAELLA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**ATIVAÇÃO PELA MYD88 AUMENTA NÍVEIS DE QUINURENINA E  
MODULA RESPOSTA DE CÉLULAS T EM MALÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. Pritesh Jaychand Lalwani, Presidente  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ**

---

**Dr. Paulo Afonso Nogueira, Membro Externo  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ**

---

**Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza, Membro Externo  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ**

## ***DEDICATÓRIA***

Primeiramente a Deus, que me guiou para as melhores escolhas da minha vida. E aos meus pais ***Maria Vallene*** e ***Francisco Roberto***, que sempre acreditaram em mim, mesmo na minha descrença.

## ***IN MEMORIAN***

A minha amada irmã ***Ravena Oliveira***, que está sempre comigo em todos os momentos da minha vida me dando força e conforto, mesmo na sua ausência carnal. E ao meu tio Dr. Valmir Oliveira, que é a pessoa pela qual me inspirei para chegar até aqui. Vocês são o pedacinho do céu que levo comigo

## AGRADECIMENTOS

“Você não sabe o quanto eu caminhei, para chegar até aqui. Percorri milhas e milhas antes de dormir, eu não cochilei”

Enfim esse momento chegou, foram dias e noites incansáveis para concluir o tão sonhado mestrado. Hoje eu só tenho a agradecer, nada a pedir. Essa conquista não é só minha, tem um pedacinho de cada pessoa que me ajudou, direta ou indiretamente.

Primeiramente agradeço a **Deus**, por ser o guia da minha vida. Obrigada por estar ao meu lado sempre senhor.

Aos meus pais, **Maria Vallene** e **Francisco Roberto** por todo o incentivo e auxílio necessário quando mais precisei. Tudo que eu faço é para vocês.

Ao meu orientador, **Dr. Pritesh Lalwani** que abriu meus olhos para o mundo da pesquisa, acreditou no meu potencial e investiu seu tempo no meu aprendizado. Obrigada por tudo mestre.

Aos meus avós, **Herculana Santos**, **Maria da Conceição** e **Francisco Brito** que me ensinaram que o estudo é a certeza mais valiosa do meu futuro. Obrigada por todo apoio e compreensão, amo vocês.

À minha afilhada, **Clara Rafaella** que é o amor da vida da dindinha. Te amo minha princesa, obrigada por compreender a ausência da dinda.

À minha irmã de coração, **Sônia Regina** que sempre acreditou no meu sucesso. Baby te amo muito.

Aos meus **tios (as)**, **primos (as)** e **amigos da família**, que sempre torceram para o meu sucesso e vibraram com as minhas conquistas. Obrigada “seus malas”, amo vocês.

Aos meus amigos da **EJNS**, por todas as orações e o incentivo diário. Vocês são maravilhosos.

Às minhas amigas **Divas**, que sempre acompanharam minhas alegrias e tristezas e nunca deixaram de estar presente. Obrigada meninas, somos todas divas.

Aos meus amigos do grupo **IDI**: **Maria**, **Nadielle**, **Juliana**, **Renato**, **Adriane**, **Tiago**, **Fabio** e minha querida amiga **Bárbara**, por toda ajuda, apoio e risadas durante o mestrado. Vocês foram maravilhosos.

À minha amiga, **Amanda Araújo**, pelo companheirismo, carinho e ajuda nas coletas. Obrigada amiga você foi essencial nessa caminhada, te amo.

À minha amiga, **Aguyda Rayany** que sempre me ajudou no projeto de mestrado e me apoiou quando precisei. Obrigada curica, amo você.

Aos meus amigos de mestrado, **Péricles** e **Marjorie**, que me ajudaram a superar os obstáculos da imunologia. Obrigada gente.

Aos amigos e professores do **LAVERAN**, que me proporcionaram uma experiência única e inesquecível.

A todos do PPGIBA: **Amigos, funcionários, professores e coordenadores** que foram incentivadores durante essa caminhada.

Aos colegas **Yury Chaves** e **Allyson Guimarães**, pela ajuda durante momentos cruciais das minhas análises.

Aos colaboradores da gerência de malária, em especial a **Dra. Stefanie Lopes** que me ajudou em todos os procedimentos de extração dos eritrócitos infectados.

Ao **Dr. Marcus Lacerda** por permitir minhas coletas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT-AM.

À **Dra. Jaila Lalwani** por compartilhar seu conhecimento durante meu estágio em docência.

À **Dra. Adriana Malheiro** por ceder seus equipamentos para o desenvolvimento do meu projeto.

Ao **Dr. Emerson Silva** que cedeu seu laboratório para as análises no HPLC.

A todos os **Pacientes** da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas que aceitaram participar do meu estudo.

À plataforma de citometria de fluxo do ILMD-FIOCRUZ

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** pela bolsa de mestrado e o **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD (FIOCRUZ)** por disponibilizar materiais e equipamentos para o desenvolvimento do projeto

À **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** por investir no futuro de seus alunos e ceder sua estrutura para o desenvolvimento do projeto.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que conheci durante esse mestrado. De nada valeria a pena se tudo isso não fosse partilhado.

## RESUMO

A malária ainda representa um problema de saúde pública mundial. No Brasil mais de 90% dos casos são causados por *Plasmodium vivax*. Estudos demonstraram um aumento nos níveis de IL-10 e de células T reguladoras em infecções por *Plasmodium*, em humanos e camundongos. No entanto os mecanismos que levam a este aumento são pouco estudados. Em vista disso, nosso objetivo teve como entender o papel da resposta imune inata e os fatores que levam a este aumento. Nossos resultados mostraram um elevado nível de quinurenina (KYU), medida através do HPLC, em pacientes infectados por *P.vivax* (Pv), sendo acompanhado com um aumento de citocinas IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  quantificados por CBA. *In vitro* a estimulação de PBMCs por extrato de eritrócitos infectados por Pv, elevou os níveis de quinurenina e citocinas IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no sobrenadante, aumentando também a expressão da enzima indoleamina 2,3 – dioxigenase (IDO-1) em células CD14<sup>+</sup>. Além disso, nós observamos através da citometria de fluxo uma redução na ativação de células T e aumento de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> estimuladas por Pv. O aumento da quinurenina pode ser bloqueado por adição de inibidores da IDO e MyD88. Bloqueando IDO e MyD88 nós conseguimos mostrar que após a inibição houve uma redução de quinurenina, citocinas, células Tregs e um aumento de células T ativadas. Em conclusão, nossos dados mostram pela primeira vez que o aumento da quinurenina induzido por IDO, leva a uma maior frequência de células T regs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> e uma redução na ativação de células T efetoras.

**Palavras Chave:** Malária; células T reguladoras; triptofano; quinurenina; Indoleamina 2,3 – dioxigenase; MyD88.

## ABSTRACT

Malaria remains one of the world's worst health problems. In Brazil more than 90% of the infections are caused by *Plasmodium vivax*. Recent evidence demonstrates an increase in IL-10 and T regulatory cells (Tregs, CD4+CD25+CD127-Foxp3+) in *Plasmodium* infections in humans and mice. However, the mechanisms that lead to this increase are poorly understood. In view of this, our goal was to understand the role of the innate immune response and the factors that lead to increase in Tregs. We observed elevated level of kynurenine (KYU) and indoleamine 2,3 - dioxygenase (IDO) activity, measured by HPLC and an increase in IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$  quantified by CBA in patients infected with *P. Vivax*. *In vitro* stimulation of PBMCs by extract of *P.vivax* infected-erythrocytes (Pv) increased IDO-1 expression in CD14+ cells that was accompanied by an increase in kynurenine and, cytokines IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . In addition, we observed by flow cytometry a reduction in the activation of T cells and an increase in frequency of Tregs upon Pv stimulation. The increase of kynurenine was blocked by addition of IDO and MyD88 inhibitors. Blocking IDO and MyD88, we also observed a reduction in kynurenine, cytokines and Treg cells and an increase in activated CD4+T cells. In conclusion, we demonstrate for the first time that increased IDO activity increases frequency of Tregs, which suppresses T effector cell response in malaria.

**Key Words:** Malaria; T regulatory cells; Kynurenine; Indoleamine 2,3 – dioxygenase; MyD88.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Demonstração hipotética para o aumento de Tregs.....	19
<b>Figura 2:</b> Distribuição Mundial da Malária em 2013.....	21
<b>Figura 3:</b> Classificação segundo os riscos da malária.....	23
<b>Figura 4:</b> Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .....	25
<b>Figura 5:</b> Ativação dos Monócitos/Macrófagos por diferentes PAMPs ligados ao parasita.....	28
<b>Figura 6:</b> Vias de degradação do Triptofano.....	35
<b>Figura 7:</b> O controle metabólico de células Tregs e T efectoras via IDO.....	36
<b>Figura 8:</b> Ligação entre imunidade inata, IDO e células Tregs, ainda não compreendida na malária.....	36
<b>Figura 9:</b> Local de coleta das Amostras.....	40
<b>Figura 10:</b> Esquema de contagem de células em câmara de Neubauer .....	43
<b>Figura 11:</b> Exemplo dos picos de KYU e TRP no padrão e nas amostras.....	45
<b>Figura 12:</b> Níveis de quinurenina (KYU) e parâmetros clínicos em pacientes com <i>P. vivax</i> e grupo controle.....	49
<b>Figura 13:</b> Níveis elevados de atividade da enzima IDO na primo-infecção.....	51
<b>Figura 14:</b> Níveis de atividade da enzima IDO comparados com dias febris.....	52
<b>Figura 15:</b> Níveis elevados de citocinas séricas em pacientes com <i>P. vivax</i> .....	54
<b>Figura 16:</b> Estimulação de PBMCs por extrato de eritrócitos infectados por <i>P. vivax</i> (Pv) aumenta a produção de Quinurenina (KYU).....	55
<b>Figura 17:</b> Estimulação de PBMC por Pv, aumenta níveis de quinurenina e citocinas .....	56
<b>Figura 18:</b> Expressão da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO-1) é elevada em PBMCs estimulados com Pv.....	58
<b>Figura 19:</b> Expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) com o uso do inibidor 1-Metil-Triptofano (1-MT).....	59
<b>Figura 20:</b> Expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) com o uso do inibidor da proteína adaptadora MyD88.....	60
<b>Figura 21:</b> Frequência de células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ativadas em PBMCs estimulados com <i>P. vivax</i> .....	61
<b>Figura 22:</b> Frequência de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> em PBMCs estimulados com <i>P. vivax</i> .....	63
<b>Figura 23:</b> Frequência de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> após o uso dos inibidores da IDO e MyD88.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estudos com células T reguladoras na malária humana.....	32
<b>Tabela 2:</b> Descrição de marcação, anticorpo, fluorocromo, clone e marca.....	44
<b>Tabela 3:</b> Dados demográficos e epidemiológicos dos pacientes com <i>P.vivax</i> e grupo controle.....	47
<b>Tabela 4:</b> Dados hematológicos de pacientes com <i>P.vivax</i> e grupo controle.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHR	Receptor de Hidrocarboneto Aromático
APCs	Células apresentadoras de antígeno
A <sub>Trat</sub>	Antes do Tratamento
CD	Grupos de diferenciação
CTLA-4	Linfócito T Citotóxico Associado à Proteína 4
DC	Célula Dendrítica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D <sub>Trat</sub>	Depois do tratamento
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FACS	Fluorescence Absorbing Cell Sorting
FITC	Isocianato de Fluoresceína
FMT	Fundação de Medicina Tropical
FoxP3	Fator de Transcrição Caixa Forkhead P3
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase
IL	Interleucina
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
IPA	Incidência Parasitária Anual
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
KYU	Quinurenina
mL	Mililitro
NLR	Receptor do tipo NOD
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PBS	Solução Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Clorofilpiridina
<i>P.falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
Pv	<i>Plasmodium vivax</i>
RLR	Receptor do tipo Rig
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tregs	Linfócitos T reguladores
TRP	Triptofano
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Malária .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Epidemiologia.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Ciclo parasitário .....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Diagnóstico e tratamento .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Resposta imune inata .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6 Células T reguladoras.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7 Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO).....</b>	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>38</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Tipo de estudo.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Critérios de inclusão e exclusão .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 Comitê de ética.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 Recrutamento dos pacientes .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5 Coleta das amostras .....</b>	<b>41</b>
<b>4.6 Diagnóstico da malária.....</b>	<b>41</b>
<b>4.7 Separação e preparação do extrato de eritrócitos infectados por P.vivax .....</b>	<b>41</b>
<b>4.8 Separação de PBMCs .....</b>	<b>42</b>
<b>4.9 Cultura celular .....</b>	<b>42</b>
<b>4.10 Dosagem de citocinas por CBA .....</b>	<b>43</b>
<b>4.11 Imunofenotipagem celular por citometria de Fluxo .....</b>	<b>43</b>

4.12 Identificação e Quantificação de Triptofano (TRP) e Quinurenina (KYU) por HPLC .....	44
4.13 Análises Estatísticas .....	45
5. RESULTADOS.....	47
5.1 Dados demográficos e características clínico-epidemiológicas.....	47
5.2 Níveis elevados de quinurenina (KYU) em pacientes com malária.....	48
5.3 Citocinas pró-inflamatórias em níveis elevados em pacientes infectados por <i>P.vivax</i> .....	53
5.4 Em malária o aumento da quinurenina (KYU) é mediado pela enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e ativação da resposta inata.....	55
5.5 Quinurenina (KYU) inibe a ativação de células T CD4 <sup>+</sup> .....	61
5.6 Níveis elevados de quinurenina (KYU) levam ao aumento de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> .....	62
6. DISCUSSÃO .....	66
7. CONCLUSÃO .....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXO.....	84

---

*Introdução e  
Revisão Bibliográfica*

## INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças infecciosas mais antigas da humanidade. É causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo o *Plasmodium vivax* (*P.vivax*) e o *Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) os agentes etiológicos mais importantes na malária humana. O *Plasmodium* infecta e mata milhões de indivíduos por ano, principalmente na África Sub-Saariana (FERREIRA; SILVA-NUNES, 2010; KOCHAR et al., 2005; PARISE, 2009; SILVA et al., 2013; WHO, 2014).

No Brasil, a malária se restringe a áreas da região Amazônica, com casos isolados ocorrendo em outras localidades do país (BRASIL, 2011; OLIVEIRA-FILHO; MARTINELLI, 2009; PARISE, 2009).

A transmissão da malária ocorre a partir da inoculação do *Plasmodium sp.* através da picada pelo mosquito vetor anofelino. Os esporozoítas inoculados migram para o fígado, onde invadem os hepatócitos. Nos hepatócitos o parasita sofre esquizogonia, multiplicando-se dando origem a inúmeros merozoítas que serão liberados nos capilares hepáticos. No sangue o parasita invade, por sua vez, os eritrócitos onde se diferenciam em trofozoítos e multiplicam-se dando origem a inúmeros merozoítas que serão liberados quando do rompimento do eritrócito e irão invadir novos eritrócitos. Os parasitas podem se diferenciar em gametócitos femininos e masculinos que ao serem ingerido pelo mosquito darão continuidade ao ciclo. Durante suas diferentes fases evolutivas, os parasitas podem ativar a resposta inata e adaptativa. Na malária a resposta imune inata e adaptativa tem papel fundamental na eliminação do parasita ou diminuição da carga parasitária (MEDZHITOV, 2007; WHO, 2013; OLIVEIRA-FILHO; MARTINELLI, 2009).

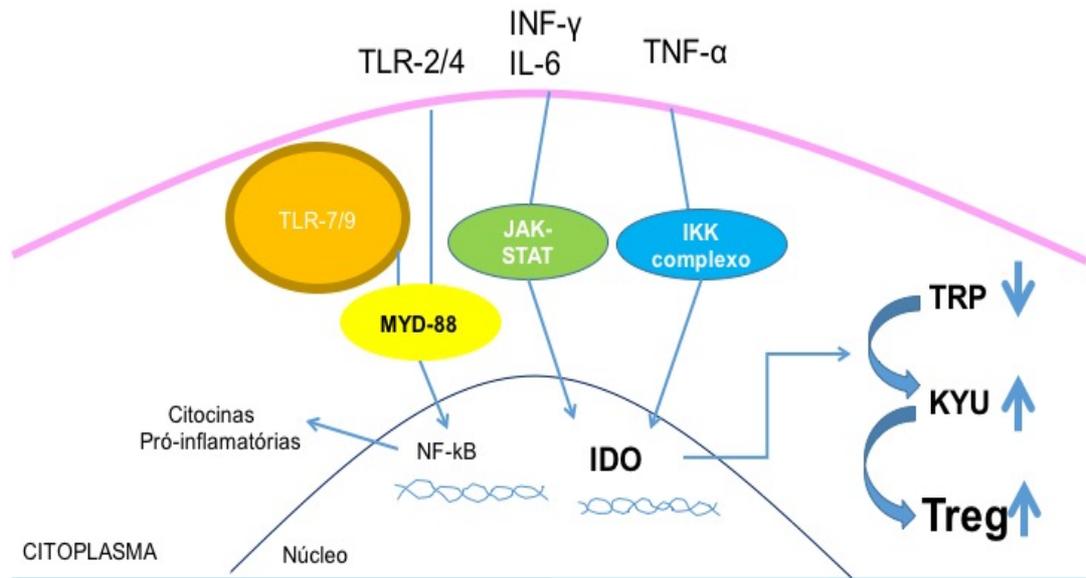
A imunidade inata na malária funciona como a primeira barreira de defesa do organismo ao parasita, ativa monócitos/macrófagos e células dendríticas (DCs). Essas dão início aos mecanismos de defesa através do reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), tais como, receptores semelhantes à Toll (TLR), receptores Nod-like (NLRs), lectina do tipo C e RIG-like (RLR). Induzindo a produção de citocinas, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, gerando uma resposta inflamatória rápida (CHUA et al., 2013; MEDZHITOV, 2007; ROPERT; FRANKLIN; GAZZINELLI, 2008; TAKEDA, 2004; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Porém a resposta imune inata na maioria dos casos não chega a ser suficiente para deter o parasita, necessitando assim de uma resposta

imune adaptativa, a qual é importante para manter o controle da infecção e impedir o agravamento da doença (CHUA et al., 2013).

A resposta imune adaptativa é desencadeada devido a não eliminação do parasita através da resposta imune inata, a participação das células T se faz necessária para a produção de citocinas (BUENO et al., 2010; HAFALLA; COCKBURN; ZAVALA, 2006). Estudos revelam que as células T reguladoras (Tregs)  $CD4^+ CD25^{high} FoxP3^+ CD127^{low}$  tem desempenhado um papel importante no equilíbrio entre o controle da infecção e a prevenção da imunopatologia (ARTAVANIS-TSAKONAS; TONGREN; RILEY, 2003; SAKAGUCHI; POWRIE, 2007). No entanto, na infecção pelo *Plasmodium*, o aumento no número de células Tregs tem gerado resposta inversa, contribuindo para o desenvolvimento da infecção, levando a taxas elevadas de citocinas reguladoras como interleucina 10 (IL-10), que conduzem para a diminuição das respostas inflamatórias mediadas por interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (FINNEY; RILEY; WALTHER, 2010a; MINIGO et al., 2009; TODRYK et al., 2008; TORRES et al., 2014; WALTHER et al., 2005).

O mecanismo celular e molecular que regula essa resposta imune do hospedeiro a infecções parasitárias é complexo. Entender essa complexidade continua a ser uma questão fundamental em malária, para a melhor compreensão do sistema imunológico durante a infecção e futuramente contribuir para o desenvolvimento de vacinas. Diversos estudos utilizando modelos murinos têm investigado o papel das células Tregs na malária, porém poucos são os estudos realizados em humanos. Desta forma definir a ligação entre a resposta imune inata e o aumento das células Tregs é de fundamental importância na malária humana.

Diante do exposto, a hipótese de nosso trabalho é se o aumento das células Tregs na malária está relacionado a uma maior conversão de triptofano em quinurenina, pela ação da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO). Neste sentido, os antígenos do *P. vivax*, como âncoras de glicosilofosfatidilinositol, hemozoína e DNA, seriam reconhecidos pelos TLRs 2, 4 e 9 presentes em monócitos e induziriam a produção de citocinas. Estas citocinas por sua vez seriam reconhecidas pelos receptores de citocinas que ativariam a IDO para que a mesma catalisasse a conversão do triptofano em quinurenina, levando a um aumento de quinurenina e a proliferação de células Tregs (**Figura 1**).



**Figura 1: Hipótese do estudo**

Ativação da resposta imune inata pode levar a aumento de citocinas pró-inflamatórias e produção da enzima IDO. A IDO é responsável por converter triptofano em quinurenina. Um elevado nível de quinurenina pode interferir em ativação de células T e levar aumento de células Treguladoras na Malária.

A fim de estabelecer um conhecimento real sobre o papel da quinurenina na malária, este projeto teve como propósito definir o mecanismo e via de sinalização ligados ao aumento da quinurenina bem como, das células Tregs. Com isso definir possíveis biomarcadores de evolução para malária.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Malária

A malária é uma doença parasitária que ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais, levando a problemas econômicos e sociais em mais de 100 países (WHO, 2013; PARISE, 2009). A transmissão da malária se restringe a regiões intertropicais como nos continentes Africano, Asiático e Americano, em sua maioria nas áreas rurais, com poucos registros em áreas urbanas (BRASIL, 2011). Nos últimos anos foram testemunhados esforços sem precedentes no controle e prevenção da malária em todo o mundo (ALONSO; TANNER, 2013).

As estratégias utilizadas para esse controle e prevenção estão focadas em controlar o vetor através da utilização de redes de mosquiteiros impregnados com inseticida, pulverização residual de interiores, controle de larvas e aumento no número de unidades de saúde voltadas para o diagnóstico e fornecimento de antimaláricos (DA SILVA-NUNES et al., 2012; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Entretanto as medidas de controle da malária esbarram em algumas barreiras, dentre estas uma

das mais importantes é a resistência aos antimaláricos pelos parasitas. Por exemplo, a resistência à cloroquina, um medicamento muito utilizado no tratamento de infecções por *P. vivax*, foi identificada pela primeira vez na Papua Nova Guiné e tem se expandido para outras áreas endêmicas de malária (RUNGSIHIRUNRAT et al., 2015).

Um forte apoio na prevenção da malária é o desenvolvimento de uma vacina chamada RTS S/AS01, elaborada pela GlaxoSmithKline (GSK), cujo alvo é a proteína circunsporozoíta do parasita *P. falciparum*, presente na fase pré-eritrocítica. Esta vacina ainda está na fase três, e está sendo testada em crianças e lactantes, para que possa ser disponibilizada no mercado. No entanto não será eficiente contra o *P. vivax*, que é a espécie prevalente no Brasil. E dessa forma, caso seja aprovada, terá sua implantação reservada principalmente à África. Dados da fase dois revelaram que a proteção após imunização não é completa, mas pode ter um grande impacto, visto que reduz em cerca de 40% os casos de malária grave (AGNANDJI et al., 2010; ASANTE et al., 2011; WHO, 2014).

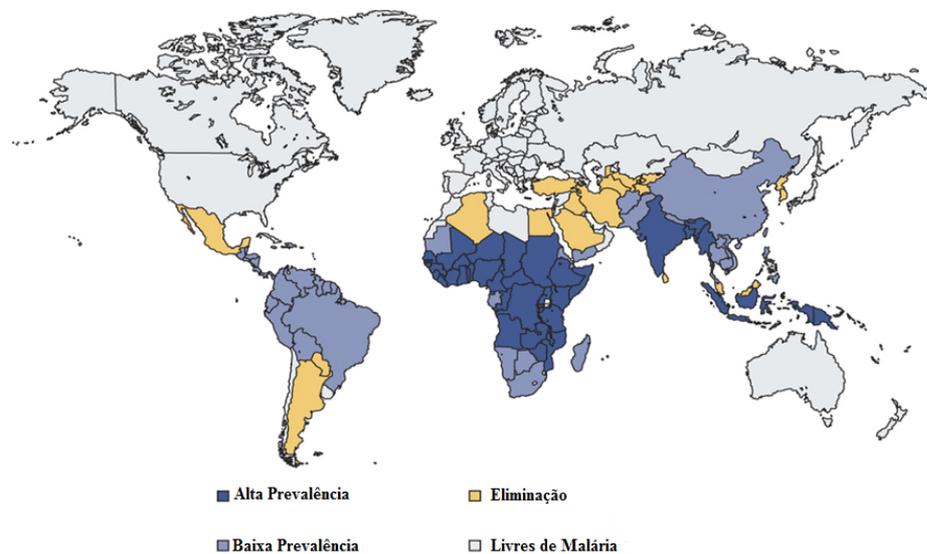
Dados epidemiológicos são de grande importância para elaboração de novas medidas de controle, prevenção e elaboração de métodos de eliminação do parasita, por isso a notificação da malária se faz necessária e as informações exigidas são: locais da infecção, intensidade da transmissão, características dos vetores, variabilidade genética e prevalência dos parasitas. Informações como essas contribuem para ensaios com novos medicamentos e elaboração de novas vacinas (BARRY, 2005; WHO, 2013; OWUSU-AGYEI et al., 2009).

## **2.2 Epidemiologia**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que cerca de 3,3 bilhões de pessoas correm o risco de serem infectados por malária e desenvolver a doença e que no ano de 2015 ocorreram 214 milhões de casos em todo o mundo, desses 438.000 levaram a morte. Dos infectados a maioria são crianças menores de cinco anos (que representam 78% de todas as mortes) e gestantes residentes na África Sub-saariana. De acordo com o relatório mais recente da OMS, 106 países e territórios são endêmicos para malária, desses 43 fazem parte do continente Africano (WHO, 2015).

Os 106 países e territórios endêmicos estão localizados em três continentes: Africano, Asiático e Americano (WHO, 2015). O mapa abaixo demonstra os países que possuem alta prevalência, baixa prevalência, livres de malária e países que já conseguiram eliminar e estão controlando para que não ocorram mais casos

(ALONSO; TANNER, 2013) (**Figura 2**). Globalmente o número de casos de malária diminuiu de 262 milhões em 2000 para 214 milhões em 2015, uma relativa melhora no diagnóstico e no tratamento contribuiu para essa redução (32% mundialmente e 43% em regiões da África) (WHO, 2015)



**Figura 2: Distribuição Mundial da Malária em 2013** Fonte: (ALONSO; TANNER, 2013)

No continente Americano cerca de 112 milhões de pessoas correm o risco de se infectar por malária em 24 países e territórios. Houve uma diminuição significativa do ano de 2000 com 1.2 milhões de casos para 427.000 casos que foram diagnosticados em 2013, sendo o Brasil responsável por cerca de 42% dos casos das Américas (WHO, 2015).

A malária é uma infecção causada por parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa da família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*, sendo transmitida através da picada do mosquito *Anopheles* fêmea, infectado (BRASIL, 2005a; BRASIL, 2006; LANGHORNE et al., 2008). São reconhecidos pela OMS cinco plasmódios capazes de infectar seres humanos, sendo eles, *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malarie*, *P. ovale* e *P. vivax*. Porém no Brasil a prevalência se restringe ao *P. vivax* e *P. falciparum* e poucos casos de *P. malarie* (LEE et al., 2015; OLIVEIRA-FILHO; MARTINELLI, 2009; WHO, 2015).

No Brasil a espécie *P. vivax* é responsável por aproximadamente 84% dos casos de malária, enquanto que os 16% restantes são atribuídos a *P. falciparum*, essa porcentagem pode variar a cada ano. A área de transmissão é extensa, mas a maioria dos casos registrados da doença está presente na região Amazônica, com casos isolados em outras regiões (DA SILVA-NUNES et al., 2012; OLIVEIRA-FILHO;

MARTINELLI, 2009).

Essa infecção parasitária é um problema no Brasil desde o final da década de 1930, quando ocorreu um surto de malária grave, com a taxa de mortalidade alcançando 13%. No entanto, no final dos anos cinquenta a OMS organizou uma campanha, que ganhou força no país e contribuiu para a diminuição da malária, que chegou a níveis mais baixos em 1960, quando foram registrados apenas 36,9 mil casos (DANIEL-RIBEIRO; LACERDA; OLIVEIRA-FERREIRA, 2008). A partir de 1960 o Brasil passou por um processo de migração desordenado entre Brasil e Senegal e esse movimento levou a um aumento progressivo do número de casos e uma rápida disseminação da doença na região Amazônica (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Na Amazônia a prevalência dessa infecção é sustentada por mosquito do gênero *Anopheles* do subgênero *Nyssorhynchus*, no qual o *Anopheles darlingi* desempenha o papel principal, isso se deve ao fato da Amazônia dispor de um habitat abundante em larvas e adequado para o crescimento e desenvolvimento de vários mosquitos, inclusive o *An. darlingi* (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; PINA-COSTA et al., 2014).

O *An. darlingi* circulante no Brasil está presente em cerca de 80% do país, mas os casos são praticamente restritos à Bacia Amazônica (constituída pelos estados do Amazonas, Acre, Roraima, Amapá, Pará, Tocantins, Rondônia e partes do Mato Grosso e Maranhão). Em 2014, 45 municípios foram classificados como de alto risco (alta densidade de vetores/anofelinos), 82 de médio risco (menor densidade de vetores), 370 de baixo risco (baixa transmissão da doença) e áreas Não-Endêmicas (IPA=Zero) correndo nenhum risco da infecção por malária, segundo estimativas do Índice Parasitário Anual (BRASIL, 2015) (**Figura 3**).

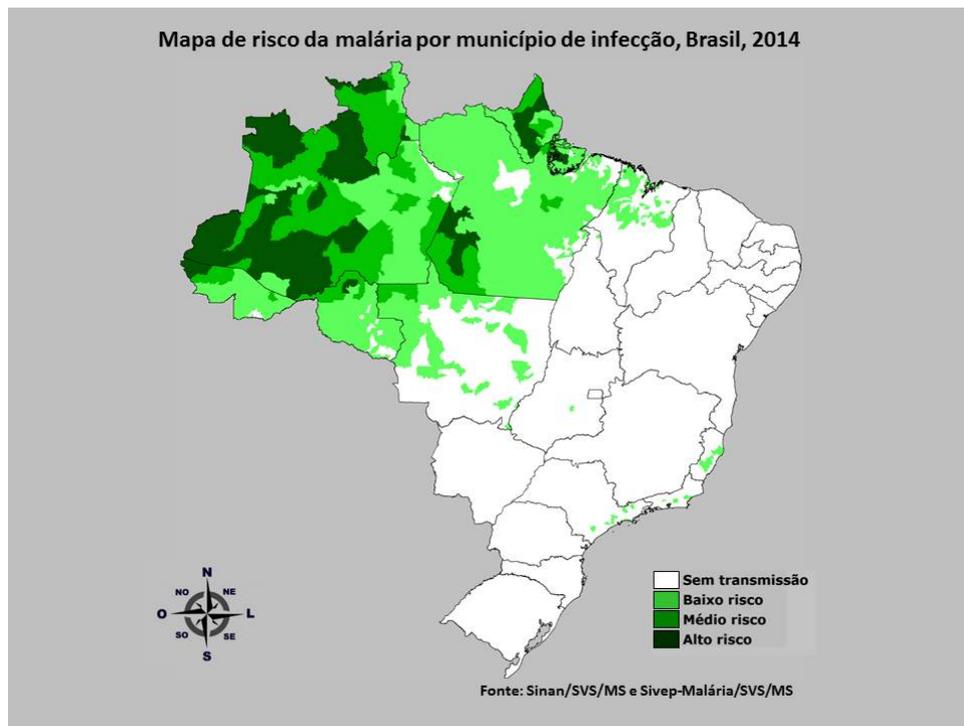


Figura 3: Classificação segundo os riscos Fonte: (BRASIL, 2015)

Na Amazônia o *P. vivax* é responsável pela maioria dos casos e a prevalência de infecção assintomática é muito alta (ANDRADE et al., 2010). Segundo dados do SIVEP-Malária de janeiro de 2015 até maio de 2016, aproximadamente 100 mil casos foram registrados, desses 74.327 ocorridos no Amazonas, sendo 87% das infecções por *P. vivax* e 13% por *P. falciparum*..

Em infecções por *P. vivax* a carga parasitária é menor e casos complicados são mais raros, por isso a grande maioria dos estudos em malária focaram em *P. falciparum*, sendo a pesquisa em *P. vivax* deixada de lado frente ao enorme problema causado por *P. falciparum*. No entanto, estudos realizados em todo mundo inclusive na Amazônia Brasileira tem reforçado associação entre casos de malária grave e morte à *P. vivax* (ANDRADE et al., 2010; GETHING et al., 2012).

### 2.3 Ciclo Parasitário

O ciclo de vida do parasita é dividido em duas fases: a fase sexuada, que ocorre no hospedeiro artrópode (*Anopheles darlingi*), e a fase assexuada (que ocorre no hospedeiro vertebrado) iniciada logo após a picada do mosquito e posterior inoculação dos esporozoítos (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006).

Os vetores são mais abundantes nos horários crepusculares, ao entardecer e ao amanhecer (BRASIL, 2005b). O mosquito *Anopheles* fêmea injeta esporozoítos que através da corrente sanguínea migram para o fígado, em seguida, invadem os

hepatócitos e se multiplicam por reprodução assexuada (esquizogonia), originando esquizontes teciduais que amadurecem e liberam milhares de merozoítos hepáticos (KROTOSKI, 1985). Ocorre a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea, que infectam e invadem as hemácias, iniciando a esquizogonia eritrocítica. Nas hemácias ocorre a transformação do parasita em trofozoíto gerando esquizontes, que ao romperem as hemácias liberam merozoítos na corrente sanguínea que irão invadir novas hemácias podendo dar continuidade ao ciclo ou se diferenciar em gametócitos masculinos e femininos, que ao serem ingeridos pelo *Anopheles* dão continuidade ao ciclo no vetor (CROMPTON et al., 2014; LANGHORNE et al., 2008; MILLER et al., 2002) **(Figura 4)**.

Em infecções por *P. vivax*, alguns esporozoítos podem originar formas intra-hepáticas conhecidas como hipnozoítos, onde o parasita fica em estado de dormência, podendo assim causar episódios de recaídas (GETHING et al., 2012; KROTOSKI, 1985).

A fase seguinte do ciclo, chamada esporogonia, ocorre no mosquito. Onde o *Anopheles darlingi* ingere os gametócitos durante o repasto sanguíneo. Após alguns minutos ocorre a exflagelação de gametócitos masculinos, o qual induz a formação de 6 a 8 gametas masculinos ou microgametas, enquanto isso os gametócitos femininos transformam-se em macrogametas. Uma fusão entre os microgametas e macrogametas gera um estágio móvel chamado oocineto. O oocineto ao penetrar o estômago do mosquito, se transforma em oocisto (onde ocorre a formação dos esporozoítos). Após a ruptura do oocisto, inúmeros esporozoítos são liberados e estes migram para as glândulas salivares dos mosquitos e estão prontos para infectar novos hospedeiros vertebrados (MATUSCHEWSKI, 2006) **(Figura 4)**.

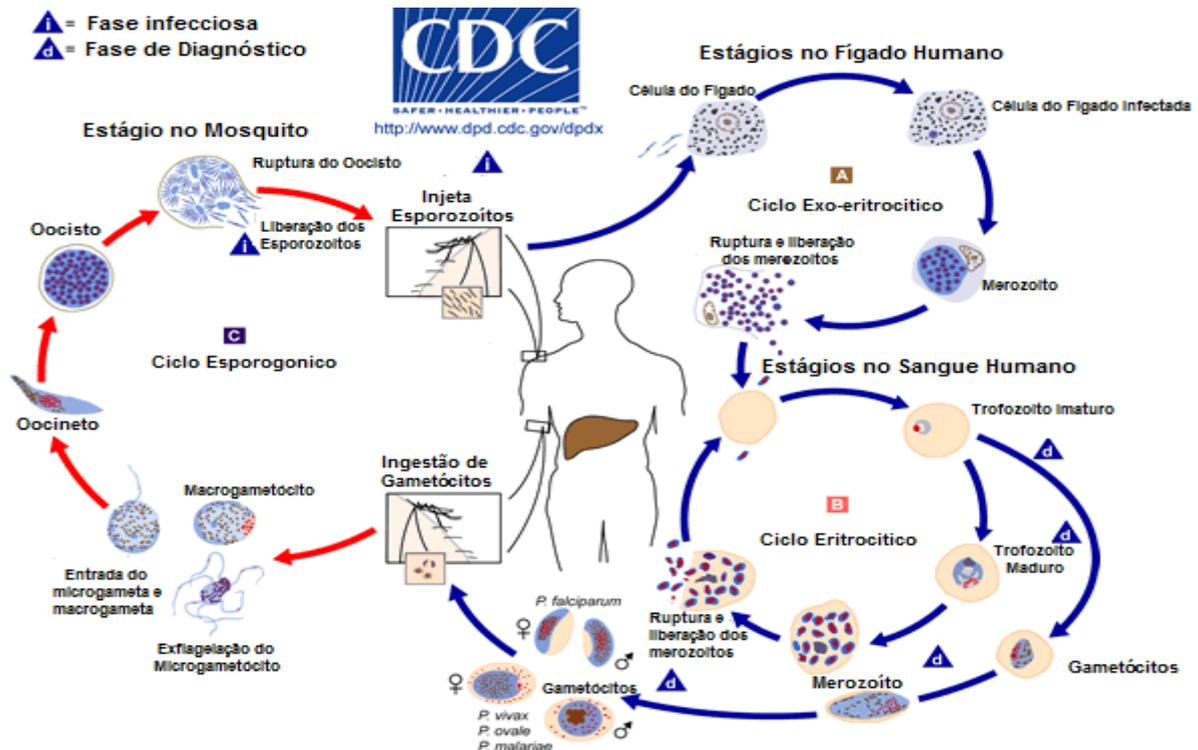


Figura 4: Ciclo de vida do Plasmodium Fonte: CDC

## 2.4 Diagnóstico e Tratamento da Malária

Para o diagnóstico da malária é realizado o método da gota-espessa, considerado o padrão ouro a ser aplicado nas áreas endêmicas. Esse método de diagnóstico requer um pessoal treinado e capacitado, além de uma estrutura que seja capaz de disponibilizar a eficácia no diagnóstico (ALEXANDER et al., 2010; BOWERS et al., 2009; COLEMAN et al., 2002).

Após o diagnóstico realizado por meio do exame de gota espessa dá-se início ao tratamento já preconizado pelo Ministério da Saúde, que consiste em esquemas terapêuticos designados para cada espécie de *Plasmodium*, utilizando fármacos como a primaquina (utilizado para matar hipnozoítos), cloroquina (destrói o parasita na fase eritrocítica), mefloquina (agem aumentando a acidez do parasita, facilitando assim sua eliminação), artesunato (utilizado em pacientes com malária grave por *P. falciparum*), entre outros (BRASIL, 2010). Para a eficácia no tratamento a utilização correta dos medicamentos é fundamental (KREMSNER; KRISHNA, 2004; ROCHA, 2008).

## 2.5 Resposta Imune Inata a Malária

O reconhecimento dos microorganismos patogênicos é um elemento essencial para ativar resposta inata, onde os PAMPs são reconhecidos pelos PRRs, os quais incluem principalmente receptores semelhantes à TLR, NLRs, lectina do tipo C e RLR. Além disso, a imunidade inata também é importante para a ativação da imunidade adaptativa, a qual é responsável pelos perfis de resposta imune celular e humoral (KAWAI; AKIRA, 2011; ROPERT; FRANKLIN; GAZZINELLI, 2008; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Um dos principais PRRs envolvidos na imunidade inata à malária são os TLRs, que tem a capacidade de reconhecer moléculas derivadas do *Plasmodium* (CAMPOS *et al.*, 2001). Esses receptores estão presentes em células da imunidade inata, tais como, DCs e monócitos/macrófagos que desempenham um papel indispensável durante a infecção (CAMPOS *et al.*, 2001; CHIMMA *et al.*, 2009; CHUA *et al.*, 2013).

Os TLRs reconhecem PAMPs relacionados ao *Plasmodium*, há um grande esforço para chegar a um consenso sobre qual PAMP da malária é responsável por ativar a produção de citocinas em células do sistema imunológico humano, porém esse objetivo ainda não foi alcançado. No entanto é sabido que âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), hemozoína e DNA derivados do parasita ativam a resposta imunológica (COBAN *et al.*, 2007; DE LEORATTI *et al.*, 2012; GAZZINELLI; DENKERS, 2006; KELLER *et al.*, 2006).

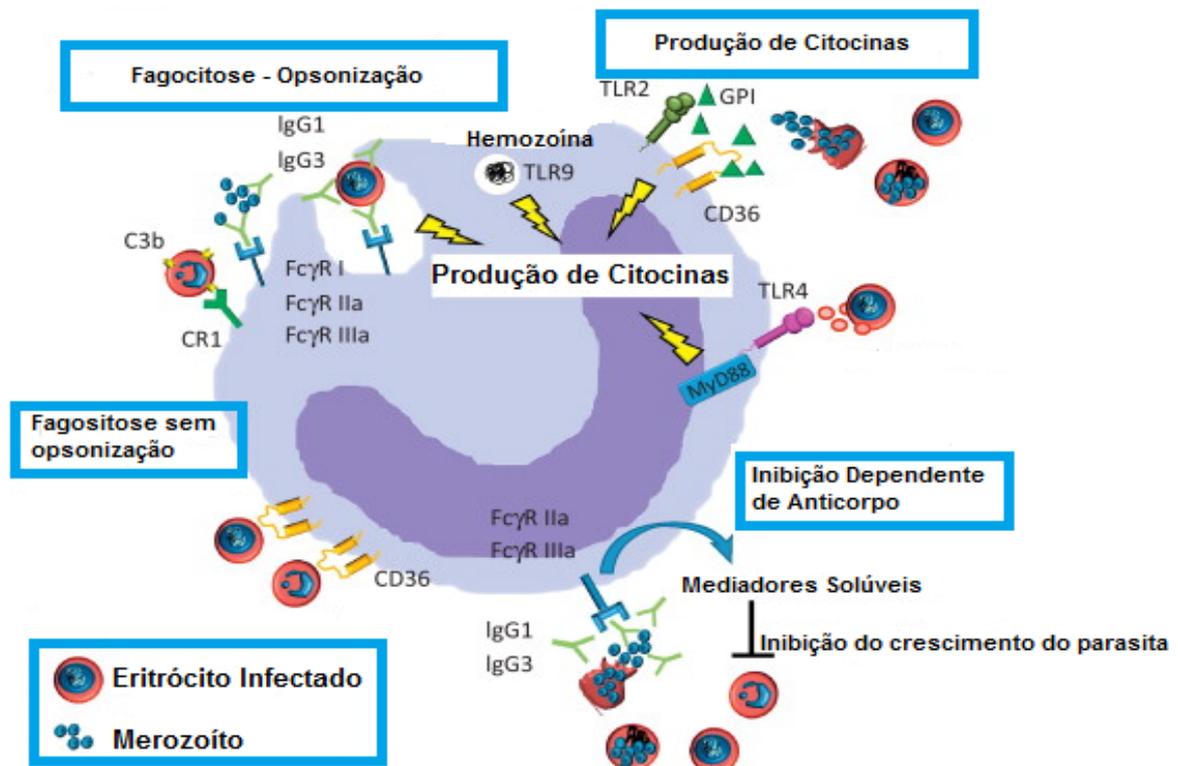
Os GPIs são encontrados em grande abundância em protozoários, produzindo atividade imunoestimulante. A estrutura básica dos GPIs compreende uma etanolamina substituída com fosfato, uma porção conservada de oligossacárideo ligada a um grupo fosfatidilinositol. Ele induz respostas celulares, através de receptores TLRs via proteína adaptadora MyD88. (FERGUSON *et al.*, 1999; ROPERT; GAZZINELLI, 2000).

Já a hemozoína também chamada pigmento malárico é formada a partir da digestão da hemoglobina pelo *Plasmodium* durante seu desenvolvimento intraeritrocítico. Ao digerir a hemoglobina é liberado o grupo heme tóxico e o parasita para detoxificar o produto de seu metabolismo forma um dímero cristalino de hematina  $\alpha$ , complexada a lípidios e proteínas (STEPHENS *et al.*, 2000). A hemozoína é liberada quando ocorre ruptura dos eritrócitos parasitados, podendo atingir altas concentrações na circulação, sendo fagocitada por monócitos e neutrófilos circulantes, bem como por macrófagos presentes nos tecidos (ARESE; SCHWARZER, 1997; NEWTON; TAYLOR; WHITTEN, 1998).

Estudos in vitro têm demonstrado que na malária, tanto por *P. vivax* como por *P. falciparum* a GPI via TLR4 e hemozoína podem estimular monócitos e macrófagos a sintetizar citocinas envolvidas na resposta inata (COBAN et al., 2007; DE LEORATTI et al., 2012; GAZZINELLI; DENKERS, 2006; KELLER et al., 2006). Alguns estudos verificaram também que a hemozoína pode ser reconhecida pelo TLR9, provavelmente complexada ao DNA (COBAN et al., 2005; GRIFFITH et al., 2009; PARROCHE et al., 2007).

No entanto, a capacidade de TLR reconhecer a hemozoína ainda é controversa, levando a outras pesquisas para tentar elucidar quais outros receptores estão envolvidos neste reconhecimento. Neste sentido, um estudo observou que NLRs podem estar relacionados ao reconhecimento do pigmento malárico, ativando componentes do inflamassoma e liberando citocinas pró-inflamatórias. O inflamassoma NLRP3 (que possui o domínio pirínico), composto pelo NLR, adaptador ASC e caspase-1, envolvido na inflamação desencadeada pela hemozoína é o de maior interesse, devido à produção da citocina IL-1 $\beta$ , relacionada a processos inflamatórios observados durante a infecção por *Plasmodium* (DOSTERT et al., 2009; TIEMI SHIO et al., 2009).

Os componentes do parasita contribuem direta ou indiretamente para ativar os fatores imunes do hospedeiro (CHUA et al., 2013) (**Figura 5**). Após a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, grandes transformações são induzidas incluindo a expressão de proteínas do parasita na membrana do eritrócito que podem interagir com os PRRs presentes na superfície dos monócitos. Eritrócitos infectados podem ainda levar a ativação do complemento, resultando em deposição do fragmento C3b contribuindo para sua eliminação. Ainda, após a ruptura dos eritrócitos o número de parasitas pode ser reduzido pela ação da fagocitose com opsonização ou sem opsonização (COUPER et al., 2010; SILVER et al., 2010). A ruptura provoca ainda a liberação de merozoítos que também são alvos de anticorpos e ativam monócitos/macrófagos via receptores Fc $\gamma$ R e CD36 (CHUA et al., 2013; DASARI et al., 2012).



**Figura 5: Ativação dos Monócitos/Macrófagos por diferentes PAMPs ligados ao parasita** Fonte: Adaptado de (CHUA et al., 2013)

São várias as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo hospedeiro durante a infecção por *Plasmodium*, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) - $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, e IFN- $\gamma$ , que tem funções importantes em controlar o crescimento do parasita. Por outro lado, se a ativação desses mediadores inflamatórios for excessiva pode ser prejudicial e causar condições patológicas para o hospedeiro, como por exemplo, disfunção cerebral (BRANT et al., 2014; GAZZINELLI; DENKERS, 2006; GOWDA, 2007; STEVENSON; RILEY, 2004).

Na malária as citocinas IL-12 e IL-18 produzidas pelos monócitos na fase inicial da infecção, tem a função de diminuir a carga parasitária e ativar a produção do IFN- $\gamma$  (TORRE, 2009). Citocinas como o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  tem uma função fundamental em mediar amplamente respostas imunes no estágio sanguíneo, atuando também em sinergia para otimizar a produção de óxido nítrico, que pode levar a morte do parasita (BUENO et al., 2010). Segundo (GIRIBALDI et al., 2011) a hemozoína está envolvida na produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de quimiocinas como MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  e  $\beta$ , que contribui para um aumento da resposta inflamatória.

De acordo com um estudo realizado por (GUIMARÃES DA COSTA et al., 2014) pacientes infectados por *P. vivax* na cidade de Coari/AM apresentaram níveis

elevados de IL-6, CXCL-8, IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-10 e níveis baixos de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-2, comparados a indivíduos saudáveis. O aumento das citocinas IL-6 e IL-10 foram relacionadas à carga parasitária elevada. Citocinas reguladoras, tais como IL-10 e TGF- $\beta$ , são necessárias para reduzir o risco de doença grave, contanto que ocorra um equilíbrio com as citocinas inflamatórias, isto contribui para uma resposta à malária eficiente (GONÇALVES et al., 2012).

A imunidade inata raramente elimina parasita, mas pode inibir o crescimento com sucesso enquanto ocorre o recrutamento de células T (específicas para o antígeno) que se diferenciam em células efetoras para impedir a infecção (VELAVAN; OJURONGBE, 2011). As células TCD4<sup>+</sup> podem se diferenciar em células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> que tem sido associada a um importante equilíbrio entre o controle da infecção e a prevenção da imunopatologia (BUENO et al., 2010). No entanto, um número elevado dessas células pode contribuir para o aumento da carga parasitária e desenvolvimento da infecção, devido à supressão da resposta imune (TORRES et al., 2014; WALTHER et al., 2005).

## 2.6 Células T reguladoras

As populações de Tregs CD4<sup>+</sup> são divididas em duas populações distintas: que ocorrem naturalmente (nTreg) e constituem aproximadamente 10% das células T e são derivadas do timo, e a célula adaptativa ou induzida (iTreg) que é derivada da periferia, em resposta a estímulos antigênicos específicos (MILLS, 2004; SAKAGUCHI, 2005).

Em indivíduos normais as células Tregs expressam alto nível de CD25 (receptor da IL-2) e baixos níveis de CD127 (HANSEN; SCHOFIELD, 2010; SAKAGUCHI; POWRIE, 2007; SCHMETTERER; NEUNKIRCHNER; PICKL, 2012). As Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> são caracterizadas por expressar o CTLA-4 (linfócito T citotóxico associado à proteína 4) e o FoxP3 (fator de transcrição caixa forkhead 3), que desempenha um papel importante no controle das respostas imunitárias aos antígenos (GONÇALVES et al., 2010; HANSEN; SCHOFIELD, 2010; SCHMETTERER; NEUNKIRCHNER; PICKL, 2012). São ativadas e iniciam suas atividades a partir da exposição às citocinas, sendo os macrófagos os principais responsáveis pela indução da diferenciação dessas células (HANSEN; SCHOFIELD, 2010; SEHRAWAT; ROUSE, 2011).

As células Tregs desempenham um papel muito importante no controle da resposta imune, fazem parte de uma subpopulação de células especializadas na supressão imunológica, mas em alguns casos, podem desenvolver um controle regulador excessivo, o que permite a replicação do parasita e compromete o hospedeiro (ADALID-PERALTA et al., 2011; SAKAGUCHI, 2000). Essas células limitam a amplitude da resposta imunológica celular, devido à produção de fatores solúveis, tais como, TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-35, podendo resultar na incapacidade de controlar adequadamente a infecção (BELKAID; TARBELL, 2009; BUENO et al., 2010; SEHRAWAT; ROUSE, 2011).

As células Tregs na malária atuam na supressão de diferentes tipos de células tais como, células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>, T CD8<sup>+</sup>, linfócitos B, natural killer (NK), monócitos, DCs e neutrófilos (JANSSENS et al., 2003; LEWKOWICZ et al., 2006; MISRA et al., 2004; TAAMS et al., 2005; TRZONKOWSKI et al., 2004; VENET et al., 2006). Segundo (HISAEDA et al., 2004) a ativação de células Tregs na malária contribui para a evasão imune do parasita. Seu grupo realizou um trabalho com modelo murino e identificou que camundongos infectados com *Plasmodium spp.* apresentaram um aumento significativo de células Tregs com atividade supressora, ao realizar uma depleção das células Tregs, foi possível observar que os camundongos conseguiram sobreviver a infecção com *Plasmodium yoelii* (estirpe letal) deixando claro que a supressão imune observada na malária está associada à ativação de Tregs.

A indução de células Tregs durante a malária pode ser dependente da citocina IL-10 e TGF- $\beta$  (WU et al., 2007). Durante a estimulação das células T específicas para controlar a malária, o TGF- $\beta$  pode regular a expressão de FoxP3 (fator essencial para a indução, diferenciação, sobrevivência e função de Tregs) levando ao desenvolvimento de Tregs (ADALID-PERALTA et al., 2011; VELAVAN; OJURONGBE, 2011).

Em estudo in vitro com *P. falciparum* foi observado uma indução de FoxP3 necessário para a produção de TGF- $\beta$  e IL-10, as células T apresentaram os fenótipos CTLA-4<sup>+</sup>, CD127 em níveis baixos e CD39<sup>+</sup> (SCHOLZEN et al., 2009). Estudos mostraram que em infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* houve aumento sistêmico de IL-10 e TGF- $\beta$  que se correlacionaram com a prevalência das células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> (BUENO et al., 2010; JANGPATARAPONGSA et al., 2008a; WALTHER et al., 2005).

Vários estudos têm demonstrado que células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> estão aumentadas na malária e possuem uma atividade altamente supressora. Em

infecções humanas com *P. vivax* e *P. falciparum* houve uma significativa expansão de células Tregs que expressam o CTLA-4 (GONÇALVES et al., 2010). Em teste realizado com camundongo deficiente de CTLA-4 verificou-se que a estimulação de TGF- $\beta$  não é capaz de converter as células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> em Tregs (ADALID-PERALTA et al., 2011; VELAVAN; OJURONGBE, 2011).

Uma pesquisa desenvolvida por (SCHOLZEN et al., 2009) descreveu que as células Tregs podem ser resultado de interações indiretas na malária, os autores propõe que essas células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> estão sendo induzidas independentes da apresentação por MHCII, e sugerem que fatores solúveis, tais como, IL-2, IL-10 e TGF- $\beta$  contribuam para essa indução. Alguns trabalhos em humanos verificaram o aumento na indução de células Tregs (**Tabela 1**), no entanto nenhum verificou se o aumento está relacionado à atuação da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) na conversão do triptofano em quinurenina.

**Tabela 1:** Estudos com células T reguladoras na malária humana

MALÁRIA	LOCAL DO ESTUDO	ESTUDOS EX VIVO OU IN VITRO	POPULAÇÃO DE ESTUDO	POPULAÇÃO DE Treg	CITOCINAS Avaliadas	NOTA	REFERÊNCIA
Malária	Papua Nova Guiné e Espanha	Ex vivo / nTreg	Mulheres grávidas e não grávidas	CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD127 <sup>baixo</sup>	TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ e IL-10	Os níveis de Treg foram menores em mulheres grávidas, em ambos os países	(REQUENA et al., 2015)
<i>P. falciparum</i>	Peru - Iquitos	Ex Vivo / iTregs	Adultos Sintomáticos / n=15 Assintomáticos/ n=11 Controle / n=7	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>Baixo</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	--	Os grupos sintomáticos, assintomáticos e controle, apresentaram números semelhantes de Treg e esse número não foi associado ao nível de parasitemia	(TORRES et al., 2014)
<i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	Indonésia - Ilha de Flores	Ex vivo / iTreg	Crianças Assintomáticas n=16	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> TNFR11 <sup>+</sup>	TNF, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-10	TNFR11 é um marcador de ativação de Tregs, sua expressão foi maior durante a infecção e diminuiu após o tratamento.	(WAMMES et al., 2013)
<i>P. falciparum</i>	Gâmbia	In vitro / iTreg Lisado (Extrato de esquizonte de <i>P. falciparum</i> )	--	CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>	--	Na presença de nTreg o lisado induz a conversão de células T de memória em Treg. O aumento na dose de antígeno, eleva a indução de Tregs	(FINNEY et al., 2012)
<i>P. falciparum</i>	Benin e Tanzânia	Ex vivo / iTreg	Gestantes Benin / Tanzânia Infectados / n=62 / 20 Controles / n=69 / 18	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>	--	Infecções crônicas tiveram uma escassez de célula Treg. Acredita-se no deslocamento de Treg para a placenta	(IBITOKOU et al., 2012)
<i>P. falciparum</i> e Coinfectados com <i>S. haematobium</i>	África Ocidental - Mali	In vitro / iTreg	Crianças com malária ou coinfectadas com <i>S. haematobium</i> e sem infecção / n=52	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>alto</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD69 <sup>-</sup> CD19 <sup>-</sup>	IL-2, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ e IL-10	O níveis elevados de Tregs em crianças infectadas somente com malária, foi associado à supressão de citocinas Th1 e alta parasitemia.	(LYKE et al., 2012)
<i>P. falciparum</i>	Austrália	In vitro / iRBC iTreg	--	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>alto</sup> CD127 <sup>Baixo</sup> FoxP3 <sup>alto</sup> CD39 <sup>+</sup> ICOS <sup>+</sup> TNFR11 <sup>+</sup>	IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ 1 e IL-10	Ocorreu indução de Tregs e verificou-se que essa indução é independente de TCR e requer IL-2, IL-10 e TGF- $\beta$	(SCHOLZEN et al., 2009)
<i>P. vivax</i>	Brasil - Manaus	Ex vivo / iTreg	Adultos N=30	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>	TGF- $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ e IL-17	Aumento de Treg associado à carga parasitária	(BUENO et al., 2010)

MALÁRIA	LOCAL DO ESTUDO	ESTUDOS EX VIVO OU IN VITRO	POPULAÇÃO DE ESTUDO	POPULAÇÃO DE Treg	CITOCINAS Avaliadas	NOTA	REFERÊNCIA
Malária	Gâmbia	Ex vivo / iTreg In vitro / Esquizontes	Adultos / n=28	CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>	--	CD25 deve ser usado como marcador de ativação de Treg e não de definição	(FINNEY; RILEY; WALTHER, 2010b)
Malária	Gâmbia	Ex vivo / iTreg	Mulheres grávidas e Recém nascidos – cordão umbilical	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	TGF-β, IL-2, IL-4, IL-17, IL-10, TNF-α e IFN-γ	Aumento de Treg em cultura realizada com células do cordão umbilical de mães com Malária Placentária, em comparação com não infectados	(FLANAGAN et al., 2010)
<i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	Brasil - Remansinho	Ex vivo / iTreg	Adultos <i>P. vivax</i> / n=43 <i>P. falciparum</i> / n=19	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>	IL-10, IFN-γ e TNF-α	Na malária aguda não complicada, ambas as espécies induziram a expansão de Treg, sendo relacionada à carga parasitária.	(GONÇALVES et al., 2010)
--	Gâmbia	Ex vivo / nTreg	Adultos saudáveis (área endêmica)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD127 <sup>Baixo/-</sup>	--	Treg foi mais elevada em indivíduos que residem em aldeia rural com alta transmissão para malária do que em indivíduos que moram na área urbana, onde raramente ocorre casos de malária	(FINNEY et al., 2009)
<i>P. falciparum</i>	Indonésia	Ex vivo / nTreg In vitro / iTreg	Adultos Não grave / n=17 Grave / n=16 Controle / n=10	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD127 <sup>Baixo/-</sup> TNFR11 <sup>+</sup>	TNF, TGF-β IL-10	Os níveis de Tregs foram significativamente maior em pacientes com malária grave e não grave, do que pacientes controle.	(MINIGO et al., 2009)
<i>S. mansoni</i> e <i>P. falciparum</i> (Coinfecção)	Quênia	Ex vivo / iTreg	Crianças (8-10 anos) n=153	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>alto</sup>	--	O nível médio de Treg em ambas as crianças foi semelhante, no entanto Treg de memória expressando o CD45RO <sup>+</sup> foi menor em crianças coinfectadas do que crianças apenas com esquistossomose.	MUOK et al., 2009
<i>P. falciparum</i>	Gâmbia	Ex vivo / iTreg	Crianças Complicados / n=59 Não Complicados / n=65 Controle / n=20	CD4 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> CD127 <sup>Baixo</sup>	TNF-α, IFN-γ e IL-10	Nível de Tregs foi elevado e semelhante em crianças com malária no dia 0 e no dia 28	(WALTHER et al., 2009)
<i>P. vivax</i>	Tailândia - Tak	Ex vivo / iTreg	Adultos Infectados / n=17 Controle / n=15	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	IL-10	Aumento significativo de Treg em paciente infectados quando comparados a não infectados	(JANGPATARAPONG SA et al., 2008)

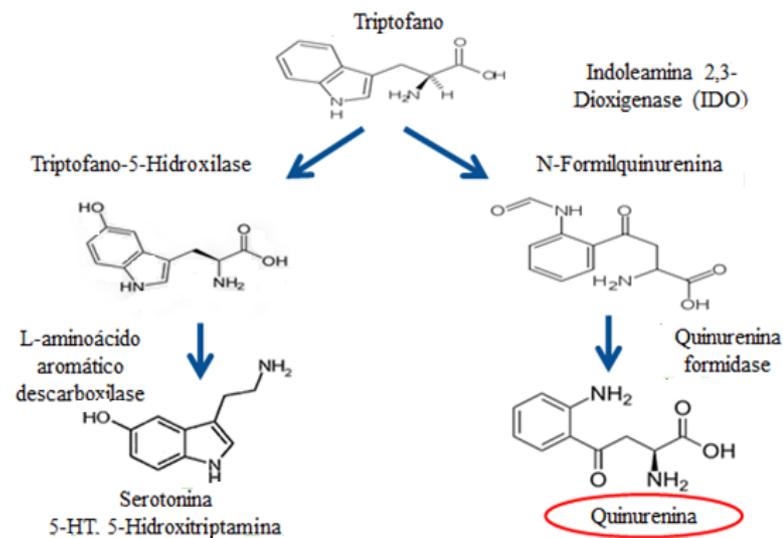
## 2.7 Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)

Estudos tem mostrado o papel fundamental da IDO no mecanismo de regulação da resposta imune em infecções (FRIBERG et al., 2002; MUNN et al., 2004; MUNN; MELLOR, 2007; POTULA et al., 2005). A IDO é uma enzima envolvida no catabolismo do triptofano (um aminoácido essencial) em um metabólito imunossupressor denominado quinurenina e essa conversão tem sido demonstrada como a principal atividade realizada pela IDO (MUNN et al., 2004).

Em vertebrados a IDO é classificada em dois genes distintos, a IDO1, IDO2 e triptofano 2,3 dioxigenase (TDO), sendo que a IDO1 apresenta uma maior afinidade com o L-triptofano, a IDO2 dispõe de uma baixa afinidade e o TDO está presente no fígado, rins e cérebro (BALL et al., 2007; METZ et al., 2007; YUASA et al., 2007). A IDO1 no princípio foi descrita como uma molécula de defesa natural do hospedeiro contra infecções patogênicas, porém com o decorrer dos estudos essa enzima foi identificada como um imunoregulador essencial, inibindo respostas de células T e contribuindo para a tolerância imunológica (ADAMS et al., 2004; FRUMENTO et al., 2002; PANTOJA et al., 2000; PFEFFERKORN, 1984; TERNESS et al., 2002).

A expressão da IDO está restrita as células mielóides, como macrófagos e células dendríticas (DCs), no início da resposta imune. A indução dessa expressão ocorre através da ligação das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, também conhecidas como B7-1 e B7-2, respectivamente, ou podem ser induzidas por citocinas, como o IFN- $\gamma$ . Suspeita-se que o IFN- $\gamma$  proveniente da ativação das células T possa ser o sinal para a indução da IDO. A ativação da enzima leva a uma diminuição na concentração de triptofano e consequente supressão da ativação, proliferação e diferenciação de células T efetoras (CHIMMA et al., 2009; MELLOR; MUNN, 2004; MUNN et al., 1999; MUNN; MELLOR, 2013; PETROFF et al., 2003).

A IDO é a única enzima capaz de degradar triptofano em quinurenina e contribuí para a regulação imune metabólica. Originalmente, a via de degradação do triptofano foi descrita como um mecanismo de defesa da imunidade inata do hospedeiro contra a infecção, no entanto a via mostrou-se ativa em vários contextos imunológicos (MUNN; MELLOR, 2013). O triptofano é um metabolito essencial proveniente da dieta, metabolizado em duas vias comuns, a via da serotonina e da quinurenina. A via da quinurenina compreende a conversão do triptofano em N-formilquinurenina através da ação da IDO, que por sua vez faz a clivagem oxidativa do anel pirrolidínico, com isso a N-formilquinurenina é rapidamente convertida em quinurenina (FALLARINO; GROHMANN; PUCETTI, 2012; SAITO; HEYES, 1996) (**Figura 6**).



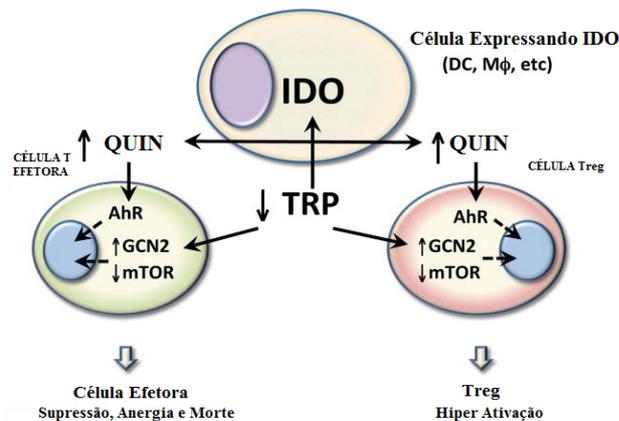
**Figura 6: Vias de degradação do Triptofano**

Em um estudo realizado com camundongos infectados por *Leishmania major*, houve supressão de células T devido à expressão induzida da enzima IDO (MAKALA et al., 2011). Já na malária, em estudo com camundongos infectados por *P. yoelii* e *P. berguei* foi verificado um aumento na produção da enzima IDO que pode ser explicado devido a altos níveis de IFN- $\gamma$ . Foi mostrado ainda que a inibição da IDO in vivo protegeu parcialmente os camundongos contra infecção letal e que um hiper-catabolismo do triptofano pode suprimir a imunidade e também gerar respostas imunes prejudiciais (HANSEN; SCHOFIELD, 2010; TETSUTANI et al., 2007). Apesar dos estudos com IDO, a relação com as Tregs na malária humana ainda não é conhecida.

As células Tregs interagem com macrófagos e células dendríticas, que expressam a enzima IDO, isso contribui para a proliferação de células Tregs durante a infecção (FALLARINO; GROHMANN; PUC CETTI, 2012; MELLOR; MUNN, 2004; MUNN et al., 1999). A geração de células Tregs por DCs que expressam a IDO pode ser um mecanismo potente, uma vez que essas células Tregs podem induzir outras DCs tolerogênicas através da expressão de IDO por interação com CTLA-4 e TGF- $\beta$  (MELLOR; MUNN, 2004; PALLOTTA et al., 2011).

A enzima IDO modifica as respostas imunitárias da seguinte forma: através da produção da quinurenina, que se liga ao receptor de hidrocarboneto aromático (Ahr)

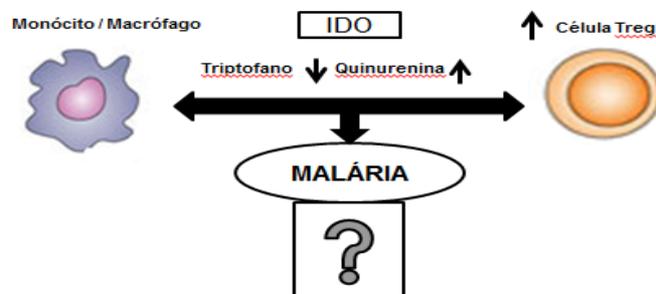
e pela diminuição do triptofano que aciona as vias de transdução dos sinais de aminoácidos. Com isso ocorre hiper-ativação de células Tregs, supressão, anergia e morte de células T efetoras (MUNN et al., 1999; MUNN; MELLOR, 2013; PALLOTTA et al., 2011) (**Figura 7**).



**Figura 7: O controle metabólico de células Tregs e T efetoras via IDO** Fonte: (MUNN; MELLOR, 2013)

Foi demonstrado em um estudo que o catabolismo do triptofano induzido por IDO promove a diferenciação de células T em células Tregs (CHUNG et al., 2009). E que em infecções pelo HIV-1, a alteração de Tregs está relacionada a um aumento da atividade da IDO via sinalização de IFN- $\gamma$  e ligação ao TLR. Indicando que a atividade elevada da IDO está associada à progressão mais rápida de doença (FAVRE et al., 2010).

Essa ligação entre a imunidade inata, IDO e células Tregs na malária ainda não é compreendida (**Figura 8**) (MUNN et al., 1999; MUNN; MELLOR, 2013; VELAVAN; OJURONGBE, 2011).



**Figura 8: Ligação entre imunidade inata, IDO e células Tregs, ainda não compreendida na malária.**

---

---

# *Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel do metabolismo do triptofano através daIDO e sua influência na modulação de resposta de células T em infecção por *Plasmodium vivax*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar e correlacionar níveis de citocinas e quinureninas em pacientes infectados por *P. vivax*
- Determinar o papel da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) na produção de quinurenina, frequência de células Tregs e ativação de células T *in vitro* por extrato de eritrócitos infectados por Pv
- Investigar o papel dos PRRs e vias de sinalização envolvidos na produção de quinurenina, frequência de células Tregs e ativação de células T.

---

## *Material e Métodos*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de Estudo

O estudo é do tipo descritivo transversal para caracterização da resposta imunológica de pacientes com malária (infectados por *P. vivax*). As amostras foram coletadas na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT) localizada em Manaus, Amazonas no período de junho a agosto de 2015. A seleção de pacientes aconteceu após o diagnóstico de Malária.



Figura 9: FMT-HVD local de coleta das amostras, Manaus, Brasil

### 4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Como critérios de inclusão: Participaram do estudo indivíduos com idade acima de 18 anos, ambos os sexos, que apresentaram resultado do teste de gota espessa positivo para malária e todos os selecionados que participaram das coletas antes e após o tratamento. No caso dos critérios de exclusão: Indivíduos que apresentaram coinfeções por *P.falciparum* e dengue.

### 4.3 Comitê de Ética

Projeto aprovado pelo CEP - CAAE: 36936614.3.0000.5020 (**ANEXO 1**)

### 4.4 Recrutamento dos Pacientes

Todas as pessoas diagnosticadas com Malária (*P. vivax*) na FMT, foram abordadas, quem concordou em participar, primeiramente assinou o TCLE (**ANEXO 2**), em seguida foi aplicado um questionário (**ANEXO 3**) para conhecimento prévio da

situação do paciente, com itens como: Nome do participante, n°. de registro, idade, sexo, dados epidemiológicos referentes às doenças tropicais, aspectos clínicos como sintomatologia e parasitemia.

#### **4.5 Coleta das Amostras**

Foram coletados 25mL de sangue venoso periférico em tubos com sistema a vácuo, contendo EDTA como anticoagulante. A amostragem foi baseada no quantitativo de *P. vivax*; Antes de começar o tratamento ( $A_{\text{Trat}}$ ) n=60, depois do tratamento ( $D_{\text{Trat}}$ ) n=27 e foram recrutadas 15 pessoas saudáveis moradoras de Manaus, para compor o grupo controle.

#### **4.6 Diagnóstico da Malária**

Para a confirmação da espécie, foi realizada a revisão de gota espessa, com contagem de parasitemia diferencial (estágios sexuais e assexuais) em 200 leucócitos.

#### **4.7 Separação e preparação do extrato de eritrócitos infectados por *P.vivax* (iPV-RBC)**

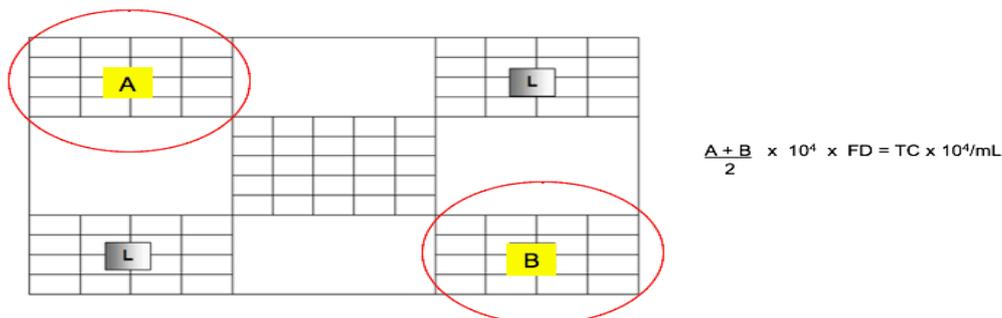
Foi coletado sangue de 14 pacientes em dias alternados, que apresentaram estágio maduro do parasita (trofozoíto e esquizonte) no sangue, visualizados no esfregaço sanguíneo. Primeiramente o sangue foi lavado 3 vezes com meio RPMI, em seguida foi aplicado à uma coluna com celulose, para separar as hemácias dos leucócitos e plaquetas (estes possuem afinidade pela celulose). Após a filtração o pellet com hemácias foi lavado 3 vezes com RPMI, em seguida foi resuspenso em meio RPMI e adicionou-se a um tubo contendo percoll 45% (45% de percoll, 45% de H<sub>2</sub>O filtrada e 10% de RPMI 10X). Foram levados a centrifuga por 15 min (0 de aceleração, 0 de desaceleração, 1500 RPM a 4<sup>0</sup>C) para separação de iPV-RBC. Após a centrifugação retirou-se o alo contendo parasita e transferiu-se para outro tubo. O pellet foi lavado com RPMI por 3 vezes. Para definir a porcentagem de eritrócitos infectados foi feito um esfregaço sanguíneo do pellet, onde contaram-se 500 eritrócitos, em seguida a quantidade de eritrócitos foi dividida pela quantidade de eritrócitos parasitados, gerando a porcentagem de iPV-RBC.

Na preparação do extrato de eritrócitos infectados, foi feito um pool com o iPV-RBC de todos os pacientes. Em seguida esse pool foi congelado a -80°C, no dia

seguinte o microtubo contendo o iPv-RBC foi descongelado e congelado novamente, este procedimento foi repetido por mais três vezes para lisar todas as hemácias.

#### 4.8 Separação de PBMC

Foram coletados 25 ml de sangue de doadores saudáveis, sem queixa de doença no último mês. Primeiramente o sangue foi diluído em PBS 1X (1:1), em seguida adicionou-se o mesmo em dois tubos falcons contendo Ficoll Plaque-Plus (2:1 respectivamente) (GE lifescience). Os tubos foram levados a centrifuga por 35 min (3 de aceleração, 0 de desaceleração, 450 RCF a 25<sup>0</sup>C). Após a centrifugação, retirou-se o alo contendo PBMC (células mononucleares do sangue periférico) para transferi-lo a outro tubo e adicionou-se PBS 1X (1:1), foi novamente centrifugado (8 de aceleração, 8 de desaceleração, 1200 RPM a 25<sup>0</sup>C). O pellet com células foi resuspenso em 10 ml de PBS 1X para realizar a contagem das células. Foram contadas na câmara de Neubauer (dois campos opostos), em uma diluição 2:2 (20µl de azul de triphan mais 20µl células) em seguida foi realizado o cálculo (**Figura 10**).



**Figura 10: Esquema de contagem de células em câmara de Neubauer.**

FD = Fator de diluição (Azul de triphan + Células) / TC = Células totais

#### 4.9 Cultura Celular

Foi realizada a separação de PBMC (citado anteriormente), em seguida as células foram colocadas em cultura em placas de 48 e 96 poços, por um máximo de 6 dias. Extrato de eritrócitos infectados por Pv foi usado em uma concentração equivalente a dois Pv por célula mononuclear (PBMC). A mesma concentração de extrato de eritrócito não infectado foi usada como controle negativo.

O 1-Methyl-D-tryptophan (1-MT) (Ref: 452483; Lote: MKBQ3449V; SIGMA-ALDRICH), inibidor da enzima IDO foi diluído em metanol, como controle negativo foi utilizado Metanol. Também foi sintetizado o peptídeo inibidor que contém uma sequência do domínio de homodimerização da MyD88-TIR

(DRQIKIWFQNRRMKWKKRDVLPGT) e o peptídeo controle (DRQIKIWFQNRRMKWKK). Monômero Myd88 se liga ao peptídeo inibidor e bloqueia a homodimerização da proteína MYD88 (GenOne, Rio de Janeiro, Brasil), inibindo a sinalização.

#### 4.10 Dosagem de citocinas por CBA

A dosagem de citocinas das amostras de soro dos pacientes e sobrenadante da cultura de células foi realizada pela técnica de CBA (Cytometric Bead Array) por citometria de fluxo com o uso do kit BD™ Human T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 Cytokine (Cat. N°551809, Lot.5288523), seguindo as orientações informadas no kit. As citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

O kit utiliza micropartículas (beads) com tamanho e fluorescência conhecida. O mesmo detecta simultaneamente as diferentes citocinas solúveis. Cada bead está conjugada com um tipo de anticorpo específico para cada citocina. A detecção é realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE), o qual fornece um sinal fluorescente de acordo com a proporção de citocina presente em cada amostra. Essas amostras foram então passadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fiocruz Amazônia, onde a intensidade da fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para o cálculo das concentrações em pg/mL e intensidade média de fluorescência (MFI) foi utilizado o software FCAP Array™ (V3.0.1)

#### 4.11 Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo

Os PBMCs cultivados e estimulados foram fixados e marcados com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (**Tabela 2**). Em seguida foi feita caracterização imunofenotípica, através da citometria de fluxo.

Neste estudo foram realizados 4 experimentos para 3 diferentes tipos de marcação (**Tabela 2**), a primeira para evidenciar o aumento de IDO, a segunda a porcentagem de células T ativadas e a última para evidenciar o aumento de Tregs.

**Tabela 2:** Descrição de marcação, anticorpo, fluorocromo, cat., clone e marca.

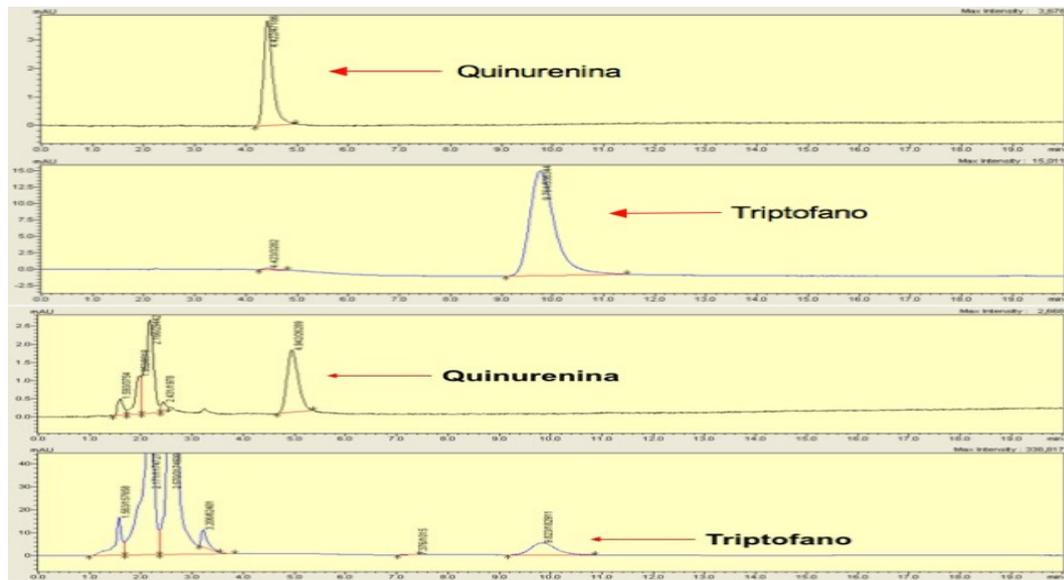
Painel	Anticorpo	Fluorocromo	Cat.	Clone	Marca
IDO	CD3	PECy7	557851	SK7	BD
	CD14	PE	555398	M5E2	BD
	HLA-DR	APC	559866	G46-6	BD
	IDO	PerCP efluor 710	46-9477	eyedio	eBioscience
Treg	CD4	APC H7	560158	RPA-T4	BD
	CD25	PECy7	557741	M-A251	BD
	CD127	PE	561028	HIL-7R-M21	BD
	FoxP3	AF647	560045	259D/C7	BD
Ativação	CD69	PE	513819	FN50	Exbio Praha
	CD8	FITC	555634	HIT8a	BD
	CD4	APC H7	560158	RPA-T4	BD

Inicialmente as células das placas foram transferidas para os tubos contendo Paraformaldeído a 2% gelado e foram incubadas por 20 min a 4°C. Após a fixação as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X. Estas foram homogeneizadas, logo adicionou-se os anticorpos de marcação extracelular de acordo com os respectivos painéis (**Tabela 2**). Foram incubadas por 40 min a temperatura ambiente na ausência de luz. Após a marcação, as mesmas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e novamente foi realizada a fixação (BD Cytotfix/Cytoperm; Cat. 51-6896KC; Lot. 4204631). Em seguida as células foram permeabilizadas (BD Perm/Wash; Cat, 51-6897KC; Lot. 4213877). Os tubos foram novamente homogeneizados e adicionou-se os anticorpos de marcação extracelular (Anti-IDO e Anti-FoxP3). Estes tubos foram incubados por 40 min a temperatura ambiente. Passado a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1800 RPM por 7 min, em seguida desprezou-se o sobrenadante e foi adicionado 100uL de PBS para a leitura no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fiocruz Amazônia, com sistema de detecção de seis cores.

#### **4.12 Identificação e quantificação de Triptofano (TRP) e Quinurenina (KYU) por HPLC**

O soro de pacientes e o sobrenadante da cultura de células, foram submetidos ao tratamento com 8% de ácido perclórico, para a precipitação de proteínas e a extração de TRP e KYU. Essa mistura foi agitada em vórtex (até que se obtivesse um aspecto leitoso) e centrifugada a 5.000 RPM por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante para em seguida ser analisado em Cromatografia Líquida

de Alta Eficiência (HPLC). Para tal, foram injetados 20  $\mu\text{L}$  em coluna de fase reversa Luna C-18 (N<sup>o</sup>. AJO-8368; Gemini-NX C18 4x3; Allcrom), o tempo de corrida foi de 20 min com um fluxo de fase móvel (tampão de Acetonitrila, acetato de sódio com pH=4) de 1 mL/min. O triptofano e a quinurenina foram separados e analisados pelos detectores fluorescência e UV, respectivamente (**Figura 11**). Os picos foram identificados após adicionar o comprimento de onda no HPLC, sendo 360nm para KYU e 278nm para TRP. Para identificar os picos, as amostras foram comparadas aos tempos de retenção do padrão previamente analisado no HPLC em diferentes concentrações (100/10 $\mu\text{M}$ ; 50/5 $\mu\text{M}$ ; 25/2,5 $\mu\text{M}$ ; 12,5/1,25 $\mu\text{M}$ ; 6,75/0,675 $\mu\text{M}$ ). E assim anotou-se a área para realizar o cálculo (equação gerada no GraphPadPrism a partir da concentração do padrão) e obter a concentração de TRP e KYU nas amostras analisadas.



**Figura 11: Exemplo dos picos de KYU e TRP no padrão e nas amostras.**

Tempo de retenção da KYU: 4.422 min; Tempo de retenção do TRP: 9.560. Os dois gráficos acima demonstram os picos de padrões, e os dois gráficos abaixo são representativos de dois pacientes.

#### 4.13 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism (versão 6.0). Nossos dados foram apresentados em distribuição não normal e portanto testes não paramétricos, *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney* foram realizados. Para as correlações foram realizados testes de regressão linear e para as análises pareadas foi utilizado teste T pareado *Wilcoxon*. Para todos os testes foram considerados valores de  $p < 0.05$ . Nas análises iniciais da citometria de fluxo, foi utilizado o programa FlowJo (versão 9.1).

---

---

# *Resultados*

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Dados Demográficos e características clínico-epidemiológicas

Foram coletadas amostras de pacientes infectados por *P.vivax*, antes do tratamento (A<sub>Trat</sub>, n=60), após o tratamento (D<sub>Trat</sub>, n=27) e 15 amostras de pessoas saudáveis moradores de Manaus, como grupo controle.

Todos os dados dos questionários com relação as características clínico-epidemiológicas estão descritas na **(Tabela 3)**. A faixa etária no grupo controle foi menor que no grupo de pacientes. A faixa de idade foi menor e teve um predomínio de indivíduos do sexo feminino no grupo controle em comparação com os pacientes infectados por *P.vivax*. Há um predomínio de indivíduos do sexo masculino infectados por malária, sendo observado o inverso no grupo controle. Com relação a parasitemia a maioria dos pacientes (75%) apresentaram parasitemia com duas cruzes (++; 501-10.000 parasitas) **(Tabela 3)**. Já no número de infecções prévias a maioria (65%) apresentou pelo menos uma infecção por *Plasmodium* antes da inclusão no estudo. O grupo de pacientes foi dividido também pelo tempo de dias febris, sendo que a maior parte (62%) apresentou pelo menos 6 dias com febre **(Tabela 3)**. Com relação às características hematológicas, houve uma diminuição na porcentagem de hematócrito. Observou-se também uma diminuição significativa no número de leucócitos (WBC), volume globular médio (MCV) e plaquetas, além do aumento no volume plaquetário médio (MPV) **(Tabela 4)**.

**Tabela 3:** Dados demográficos e epidemiológicos dos pacientes com *P.vivax* e grupo controle

Características	Controle (n=15)	<i>P. Vivax</i> (n=60)
Sexo (Feminino, %)	9 (60%)	13 (21%)
Idade (Média ± DP)	25,07 ± 4,5	38,9 ± 13,46
Parasitemia (Parasitas/mm <sup>3</sup> )	1-500 (<+)	10 (17%)
	501-10.000 (++)	45 (75%)
	10.000-100.000 (+++)	5 (8%)
Número de Infecções	Primo-infectado	21 (35%)
	>1 infecção	39 (65%)
Dias Febris (com sintomas)	>6 dias	23 (38%)
	<6 dias	37 (62%)

**Tabela 4:** Dados hematológicos de pacientes com *P. vivax* e grupo controle

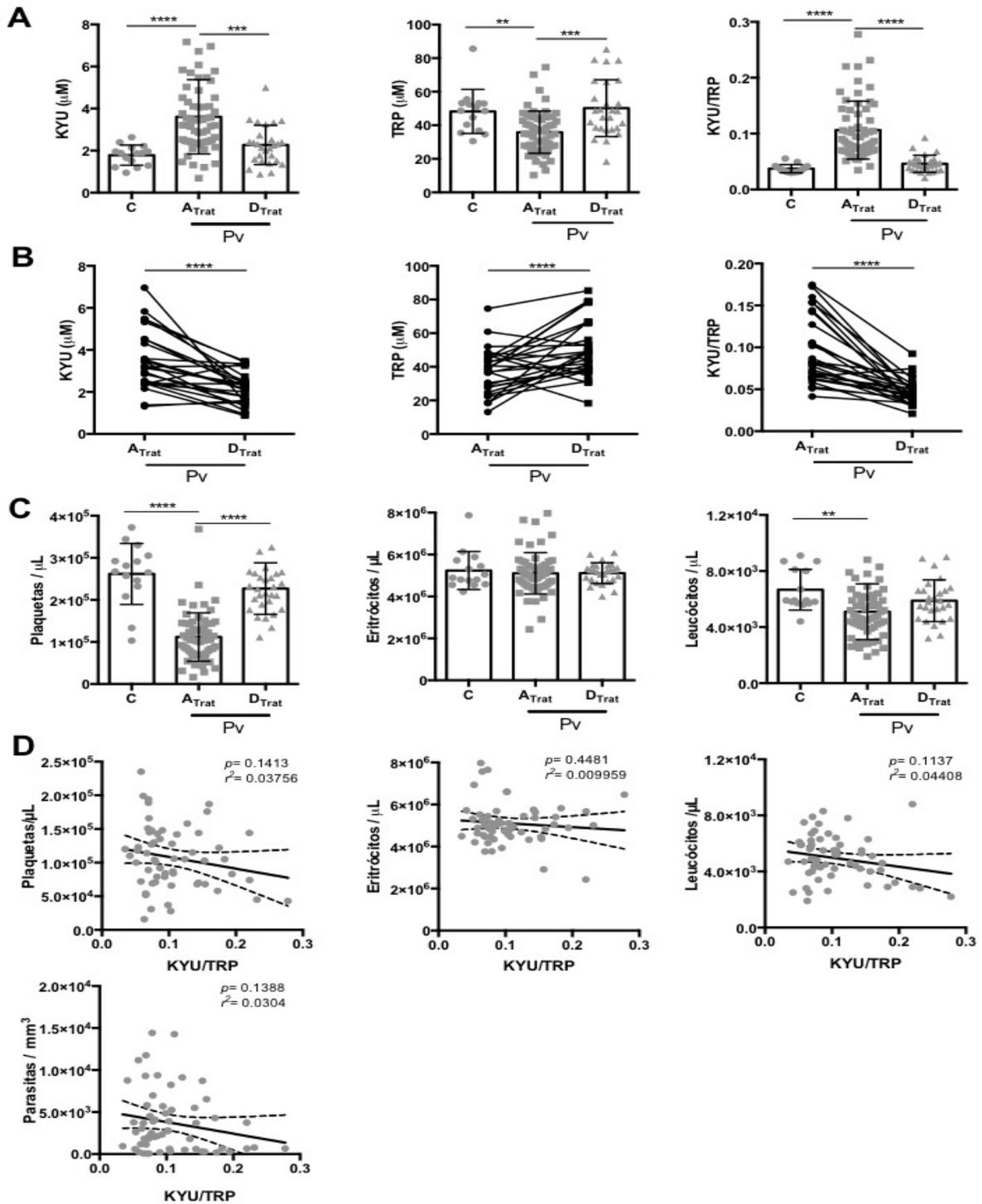
Parâmetros Hematológicos (Média ± DP)	Controle (n=15) <sup>A</sup>	<i>P. vivax</i>		<i>p value</i> <sup>AB</sup>	<i>p value</i> <sup>BC</sup>
		A <sub>Trat</sub> (n=60) <sup>B</sup>	D <sub>Trat</sub> (n=27) <sup>C</sup>		
Hematócrito (%)	46,35 ± 6,9	41,43 ± 6,9	46,50 ± 1,9	0.0039**	<0.0001****
Níveis de Hemoglobina g/dL	18,9 ± 18,13	14,08 ± 2,6	14,11 ± 1,3	>0,9999	0.8316
WBC (unid.x10 <sup>3</sup> /μL)	6,6 ± 1,4	5,1 ± 1,8	5,9 ± 1,49	0.0021**	0.0272*
RBC (unid.x10 <sup>6</sup> /μL)	5,23 ± 0,90	5,09 ± 0,97	5,08 ± 0,49	>0.9999	>0.9999
MCV (fL)	89,27 ± 4,5	87,25 ± 3,4	89,27 ± 3,2	0.0398*	0.0081**
MCH (pg)	27,6 ± 1,4	27,89 ± 2,4	27,78 ± 1,4	>0.9999	>0.9999
MCHC (pg)	261 ± 72,4	109 ± 58,0	226 ± 61,2	0,0001****;	0.0001****
PLT (unid.x10 <sup>3</sup> /μL)	261 ± 72,4	109 ± 58,0	226 ± 61,2	0,0001****;	0.0001****
MPV (fL)	9,28 ± 0,9	10,51 ± 1,1	9,8 ± 1,1	0,0011**;	0.1037

Antes do tratamento (A<sub>Trat</sub>); Após o tratamento (D<sub>Trat</sub>); leucócitos (WBC), volume globular médio (MCV); volume plaquetário médio (MPV)

## 5.2 Níveis elevados de Quinurenina (KYU) em pacientes com malária

Os níveis de KYU e TRP foram analisados nos pacientes com malária A<sub>Trat</sub>, D<sub>Trat</sub> e no grupo controle. Ao avaliar os níveis de KYU, observou-se um aumento significativo nos pacientes A<sub>Trat</sub>, tanto em comparação com o grupo controle, como em comparação com D<sub>Trat</sub>. Como nem todos os pacientes consomem a mesma quantidade de TRP um aminoácido essencial, o gráfico da razão KYU/TRP é utilizado como um confirmatório, afirmando assim que a KYU está realmente elevada nesses pacientes sendo também ilustrativo da atividade enzimática da IDO (**Figura 12A**). Ao analisar as amostras pareadas dos pacientes A<sub>Trat</sub> e D<sub>Trat</sub> fica explícita a diminuição nos níveis de KYU e aumento nos níveis de TRP, após o tratamento já preconizado para infecções por *P. vivax* (**Figura 12B**).

Em relação aos parâmetros clínicos, é possível observar uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de plaquetas e leucócitos de pacientes A<sub>Trat</sub>. Já com relação aos níveis de eritrócitos não se observou diferença entre os grupos (**Figura 12C**). Ao analisar a correlação entre os parâmetros clínicos e razão KYU/TRP é possível observar uma fraca correlação entre eles (**Figura 12D**).



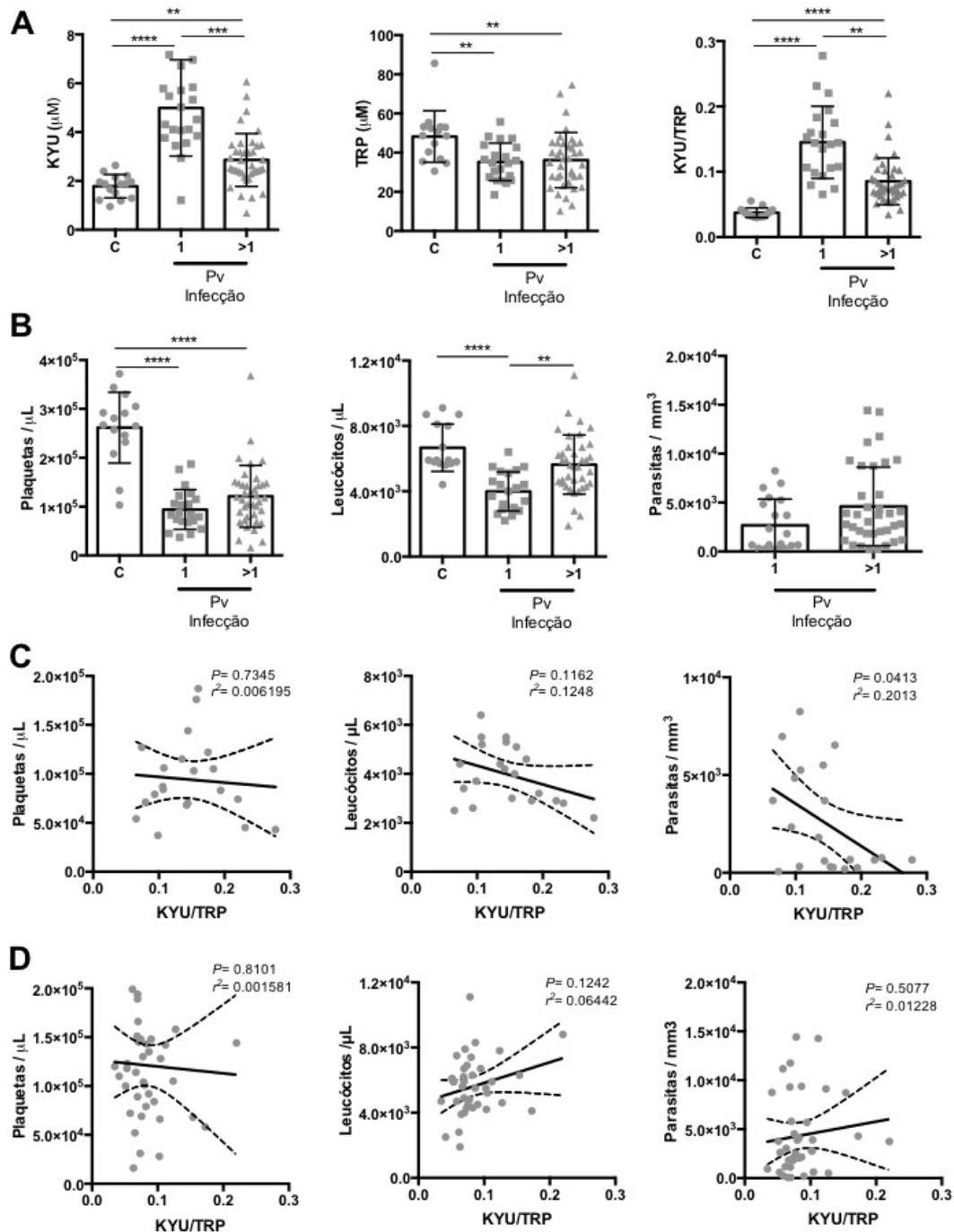
**Figura 12: Níveis de quinurenina (KYU) e parâmetros clínicos em pacientes com *P.vivax* e grupo controle.**

**A:** Demonstra os níveis de KYU, TRP e atividade da enzima IDO (KYU/TRP) no soro dos pacientes antes tratamento (A<sub>Trat</sub>, n=60), depois tratamento (D<sub>Trat</sub>, n=27) e grupo controle com indivíduos saudáveis (n=15) medido por HPLC **B:** Amostras pareadas dos pacientes A<sub>Trat</sub> e D<sub>Trat</sub> **C:** Comparação entre os parâmetros clínicos dos pacientes, sendo eles, plaquetas, eritrócitos e leucócitos **D:** Correlação entre parâmetros clínicos e KYU/TRP. Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando os valores referente a cada paciente. Para os valores significativos foram estabelecidos valores de  $p < 0.05$ . Foram utilizados teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, teste T pareado *Wilcoxon*. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Para compreender melhor as diferenças entre pacientes, os mesmos foram divididos em primo-infectados (1) e com mais de uma infecção (>1). Assim foram avaliadas as diferenças de níveis de KYU, TRP e KYU/TRP em cada grupo, mostrando que há um aumento significativo de KYU em indivíduos que se infectaram pela primeira vez em comparação com pessoas que apresentaram mais de uma infecção **(Figura 13A)**.

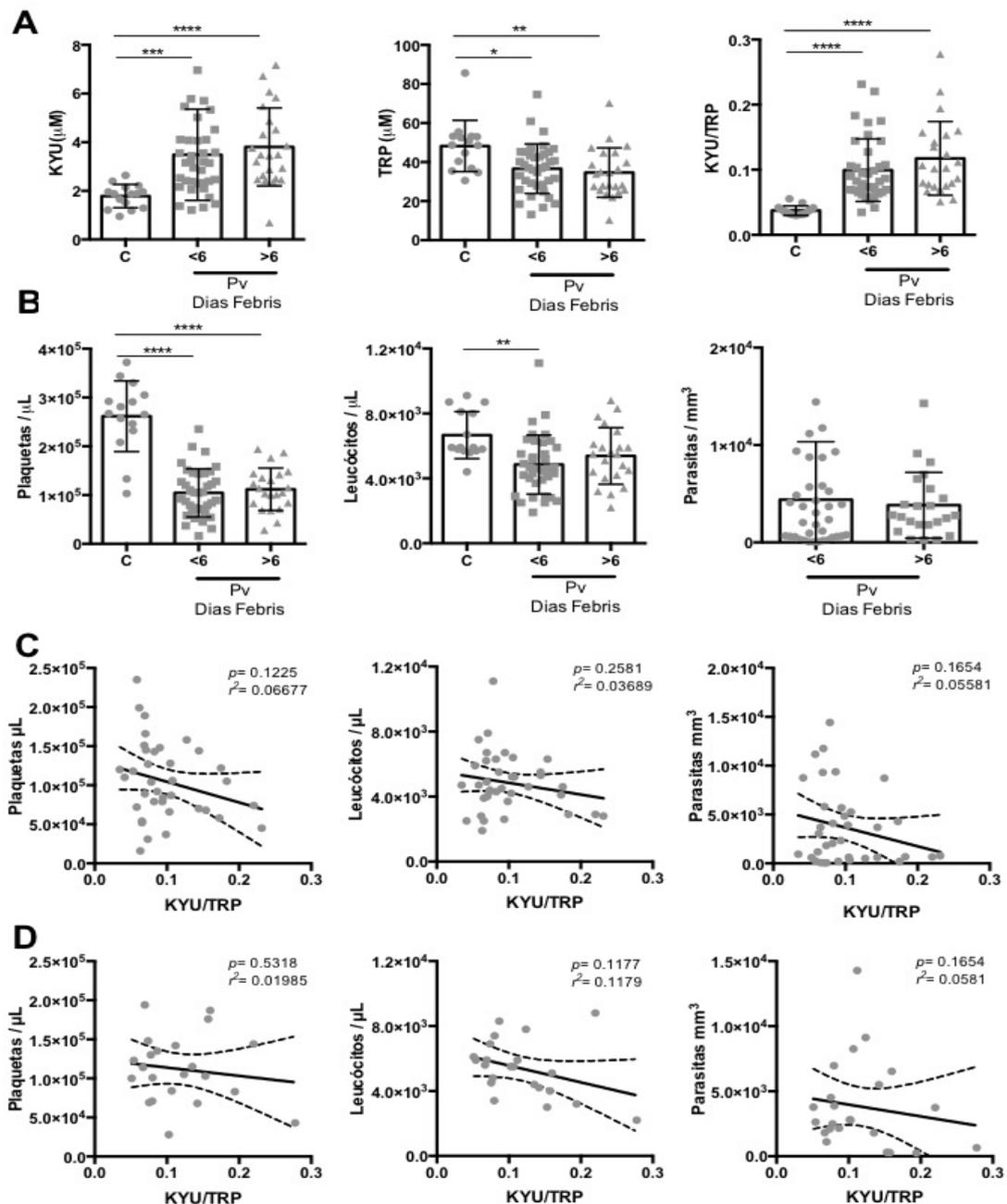
Com relação aos níveis de plaquetas e parasitemia não houve diferença significativa entre os grupos. Mas em comparação com os leucócitos, ocorreu uma diminuição nos pacientes primo-infectados, em relação aos pacientes com >1 infecção **(Figura 13B)**. Houve uma correlação entre leucócitos e KYU/TRP, sendo que em pacientes primo-infectados a correlação foi negativa e em pacientes com >1 infecção a correlação foi positiva, no entanto esses dados não foram estatisticamente significativos. Já a correlação parasitemia e KYU/TRP em pacientes primo-infectados foi negativa, com valores de  $p$  estatisticamente significativos **(Figura 13C e 13D)**.

Para analisar as diferenças entre os pacientes por dias de sinais febris dividimos os indivíduos em dois grupos, com <6 e >6 dias de febre, assim foi possível observar algumas diferenças nas correlações **(Figura 14C e 14D)**. No entanto nenhum dado foi estatisticamente significativo **(Figura 14)**.



**Figura 13: Níveis elevados de atividade da enzima IDO na primo-infecção.**

Os pacientes com malária foram categorizados com base no número de infecções (primo-infectados= 1; mais de uma infecção= >1). **A:** Demonstra os níveis de KYU, TRP e atividade da enzima IDO (KYU/TRP) nos diferentes grupos medidos por HPLC **B:** Níveis de plaquetas, leucócitos e parasitemia em ambos os grupos **C:** Correlação entre parâmetros clínicos e KYU/TRP, em pacientes primo-infectados. **D:** Correlação entre parâmetros clínicos e KYU/TRP, em pacientes com >1 infecção. Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando os valores referente a cada paciente. Para os valores significantes foram estabelecidos valores de  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* e para as correlações foram utilizados testes de regressão linear. \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



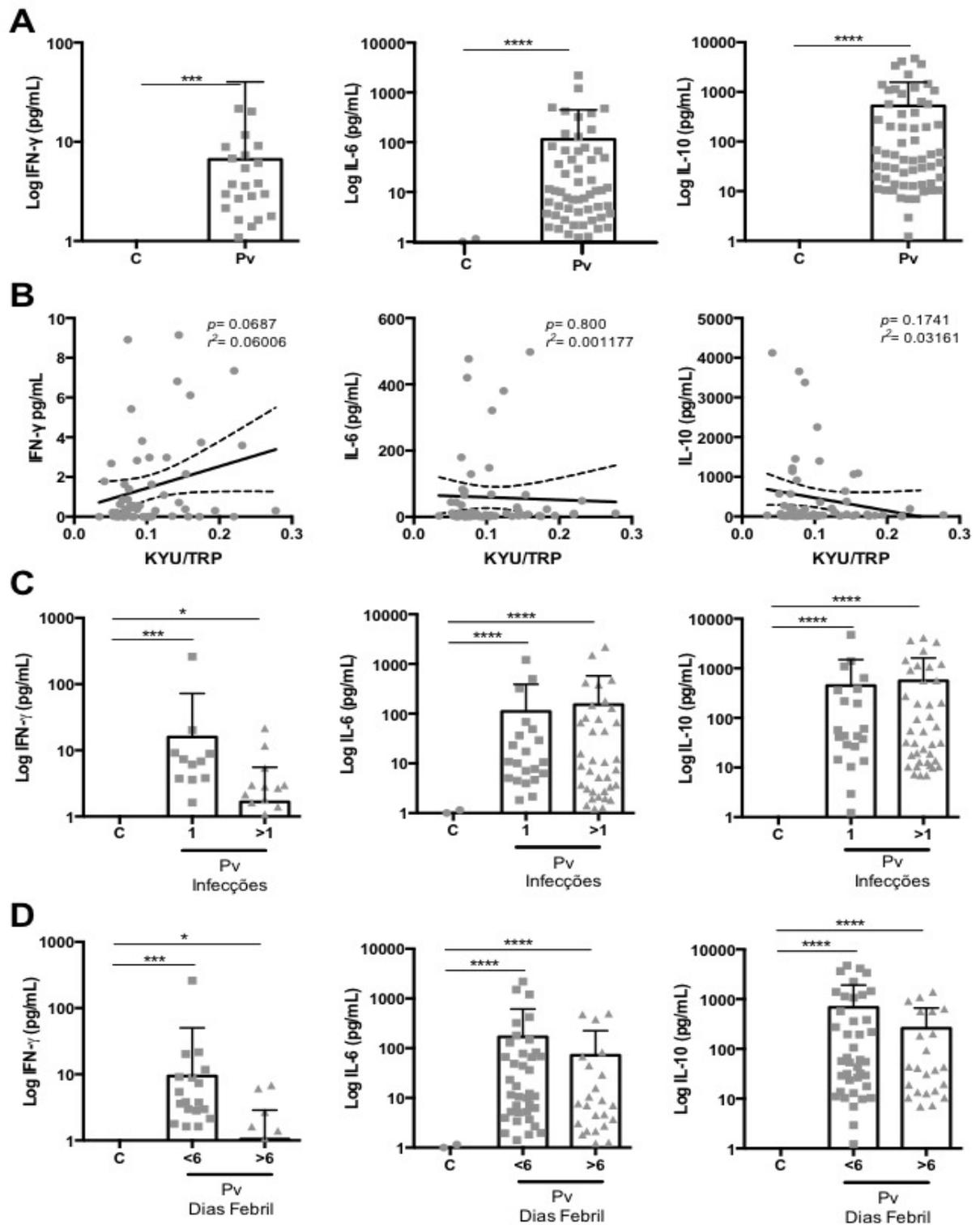
**Figura 14: Níveis de atividade da enzima IDO comparados com dias febris.**

Os pacientes com malária foram categorizados com base no número de dias febris (menos de 6 dias= <6; e mais de 6 dias= >6). **A:** Demonstra os níveis de KYU, TRP e atividade da enzima IDO (KYU/TRP) nos diferentes grupos medidos por HPLC **B:** Níveis de plaquetas, leucócitos e parasitemia em ambos os grupos **C:** Correlação entre parâmetros clínicos e KYU/TRP, em pacientes em pacientes com <6 dias febris. **D:** Correlação entre parâmetros clínicos e KYU/TRP, em pacientes com >6 dias febris. Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando os valores referente a cada paciente. Para os valores significantes foram estabelecidos valores de  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* e para as correlações foram utilizados testes de regressão linear. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 5.3 Citocinas pró-inflamatórias em níveis elevados em pacientes infectados por *P.vivax*

Foram avaliadas citocinas séricas de perfil Th1 e Th2 nos pacientes com malária comparados aos indivíduos saudáveis, são elas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A **Figura 15A** mostra os níveis elevados das citocinas IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  demonstradas em escala logarítmica. Já a **Figura 15B** demonstra as correlações em escala linear. Embora as correlações não sejam estatisticamente significativas, podemos observar uma correlação positiva entre IFN- $\gamma$  e uma correlação negativa entre IL-10 quando relacionado aos níveis de KYU/TRP. A citocinas IL-2, IL-4 e TNF- $\alpha$  não apresentou níveis detectáveis no soro de pacientes (dados não mostrados).

Ainda com relação as citocinas, foram analisados os dois grupos de primo-infectados e >1 infecção. Onde é possível observar claramente o aumento de IFN- $\gamma$  em pacientes com primo-infecção, quando comparado a >1 infecção (**Figura 15C**). Essa mesma diferença é notada ao compararmos os níveis de IFN- $\gamma$  nos pacientes <6 e >6 dias febris.

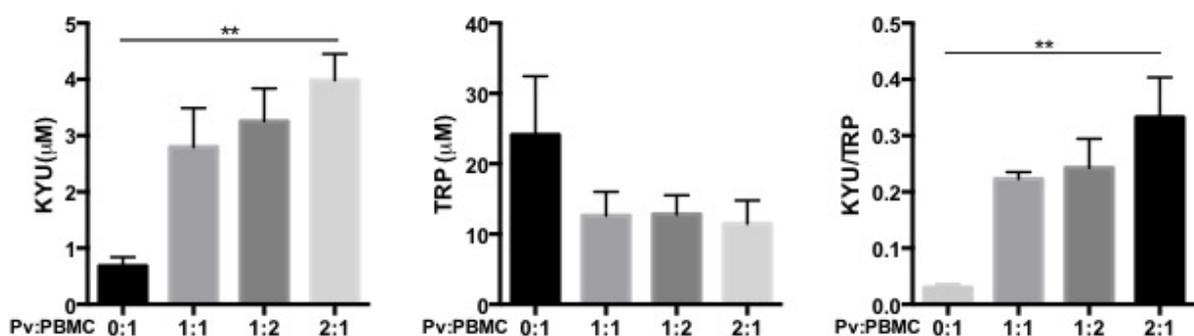


**Figura 15: Níveis elevados de citocinas séricas em pacientes com *P. vivax*.**

Foi utilizado teste CBA para quantificar as concentrações de IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$ . **A:** Níveis de citocinas descritos em escala logarítmica dos controle (C) indivíduos saudáveis e paciente com *P. vivax* antes tratamento para **B:** Correlações entre as citocinas e razão de KYU/TRP dos pacientes **C:** Níveis de citocinas comparados entre C, primo-infectados e >1 infecção **D:** Níveis de citocinas comparados entre C, em pacientes com <6 e >6 dias febris. Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando os valores referente a cada paciente. Para os valores significantes foram estabelecidos valores de  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* e Teste *T Mann-Whitney*, para as correlações foram utilizados testes de regressão linear. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 5.4 Em malária o aumento da quinurenina (KYU) é mediado pela enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e ativação da resposta imune inata

Foram realizados primeiramente testes in vitro para identificar a quantidade ideal de extrato de eritrócito infectado por *P.vivax* (Pv) como estímulo de PBMC. Na **Figura 16** é possível observar que a concentração 2:1 (dois Pv para um PBMC) respondeu melhor, aumentando assim os níveis de KYU e atividade da IDO (KYU/TRP) quando comparado ao grupo controle.

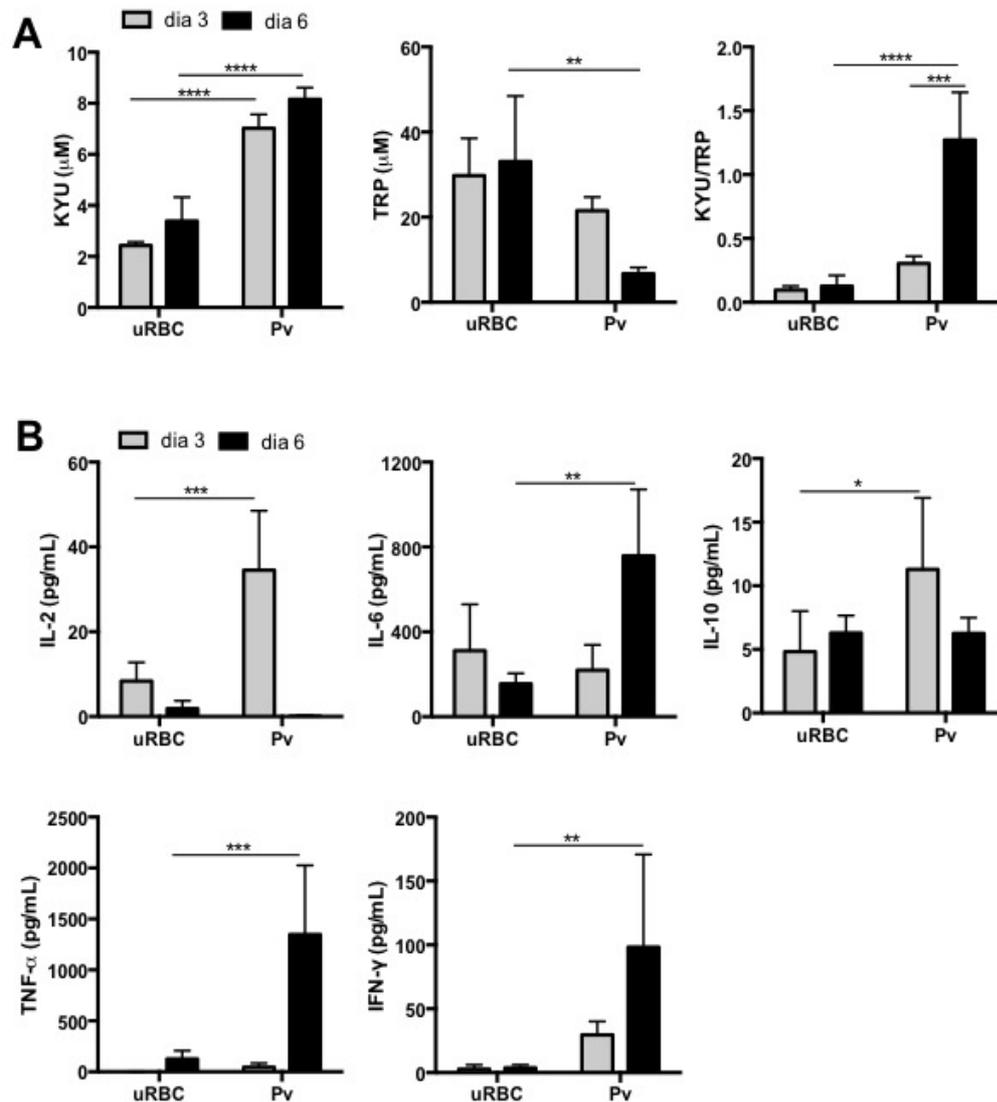


**Figura 16: Estimulação de PBMCs por extrato de eritrócitos infectados por *P.vivax* (Pv) aumenta a produção de Quinurenina (KYU).**

Níveis de KYU, TRP e KYU/TRP foram medidos em PBMCs estimulados por extrato de eritrócitos infectados por *P.vivax* (Pv) em diferentes quantidade. A imagem é representativa de um doador, medidas foram feitas em quadruplicata. Resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. ( $n=4$ ,  $**p < 0.001$ )

Durante a infecção observou-se um aumento de KYU após a estimulação pelo extrato do parasita. Esse aumento foi comprovado ao realizar o mesmo procedimento com igual número de eritrócitos não infectados (uRBC) que foi usado como controle (**Figura 17A**). O teste foi realizado em placas de 96 poços divididos em 3 e 6 dias de infecção, com diferentes doadores saudáveis. Na **Figura 17A** é possível observar que há um aumento estatisticamente significativo da quantidade de KYU nas células estimuladas com o extrato do parasita no dia 3 e dia 6 em relação as células estimuladas com extrato de eritrócitos não infectados.

Com relação as citocinas apresentadas na **Figura 17B** é possível observar níveis elevados de citocinas IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Quanto a IL-2 no dia pós estímulo podemos observar um elevado aumento de sua produção no dia 3 pós estímulo, enquanto que no dia 6 não houve detecção desta citocina. Já as citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  estão em baixos níveis no dia 3 e elevados no dia 6. A IL-10 assume o oposto, apresenta níveis elevados no dia 3 e declínio no dia 6.



**Figura 17: Estimulação de PBMC por Pv, aumenta níveis de quinurenina e citocinas.**

**A:** Níveis de KYU, TRP e KYU/TRP foram medidos por HPLC nos dias 3 e 6. **B:** Citocinas medidas por CBA em PBMCs estimulados por 2:1 (eritrócitos não infectado (uRBC) ou extrato de eritrócitos infectados por *P.vivax* (Pv) : PBMC). Imagem representativa de um doador, medidas feitas em quadruplicata. Resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste two-way ANOVA. ( $n=4$ , \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

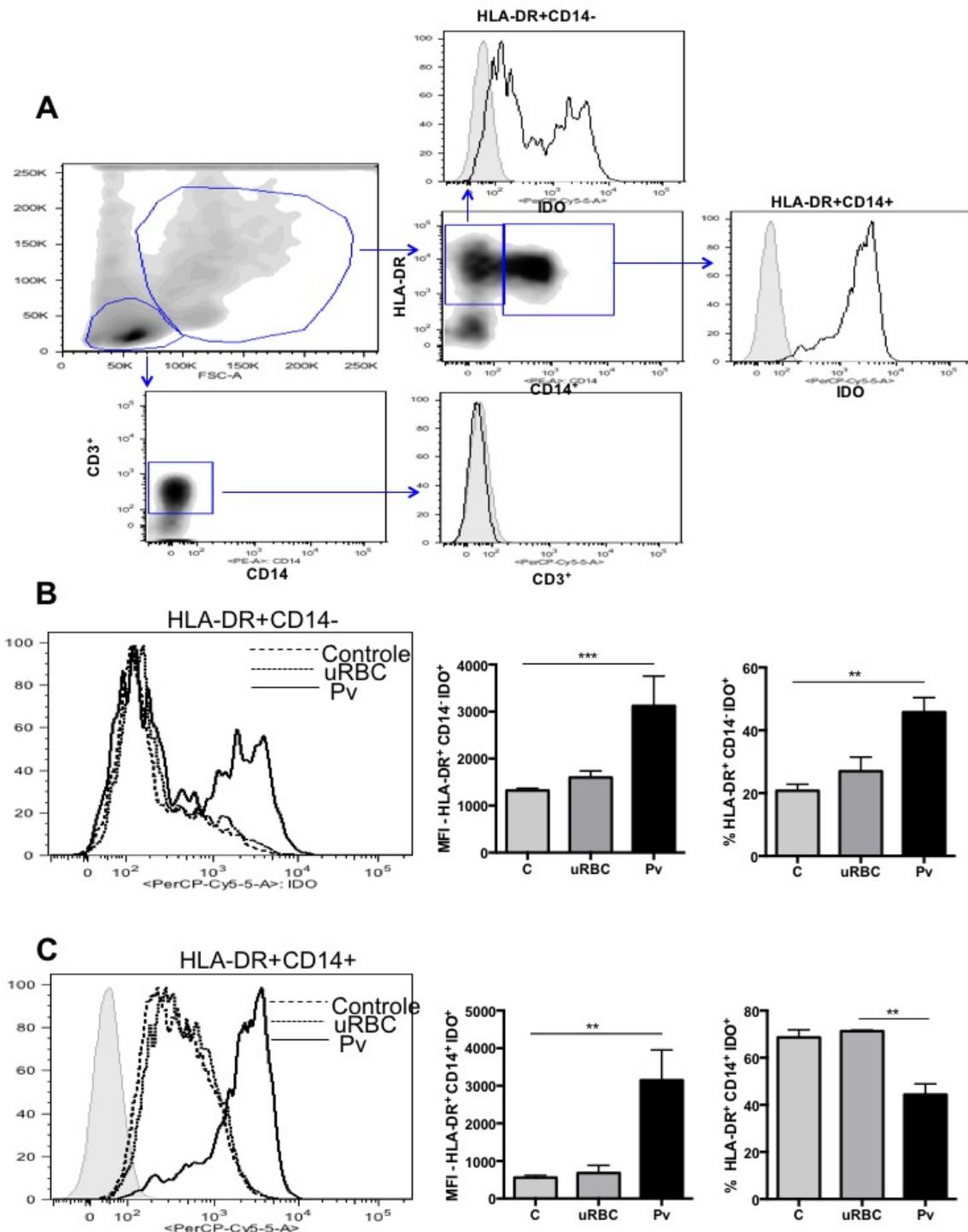
Para estabelecer o papel da IDO no aumento da KYU, nós analisamos por citometria de fluxo a expressão da enzima. Como observado na **Figura 18A** foram estabelecidas *gates* nas populações analisadas, sendo possível observar a expressão de IDO em duas diferentes populações, HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>. A imagem mostra também que não há expressão de IDO na população de células T CD3<sup>+</sup>.

Sobrepondo os histogramas de controle, uRBC e Pv nota-se que nas células estimuladas com extrato de Pv há um aumento na expressão da enzima (**Figura 18B e 18C**). Os gráficos foram descritos com intensidade média de fluorescência (MFI),

onde é observado um aumento na expressão de IDO em ambas populações. Já com relação a porcentagem de células expressando a enzima, está aumentada na população de células CD14<sup>-</sup> e reduzida em células CD14<sup>+</sup>. (**Figuras 18B e 18C**)

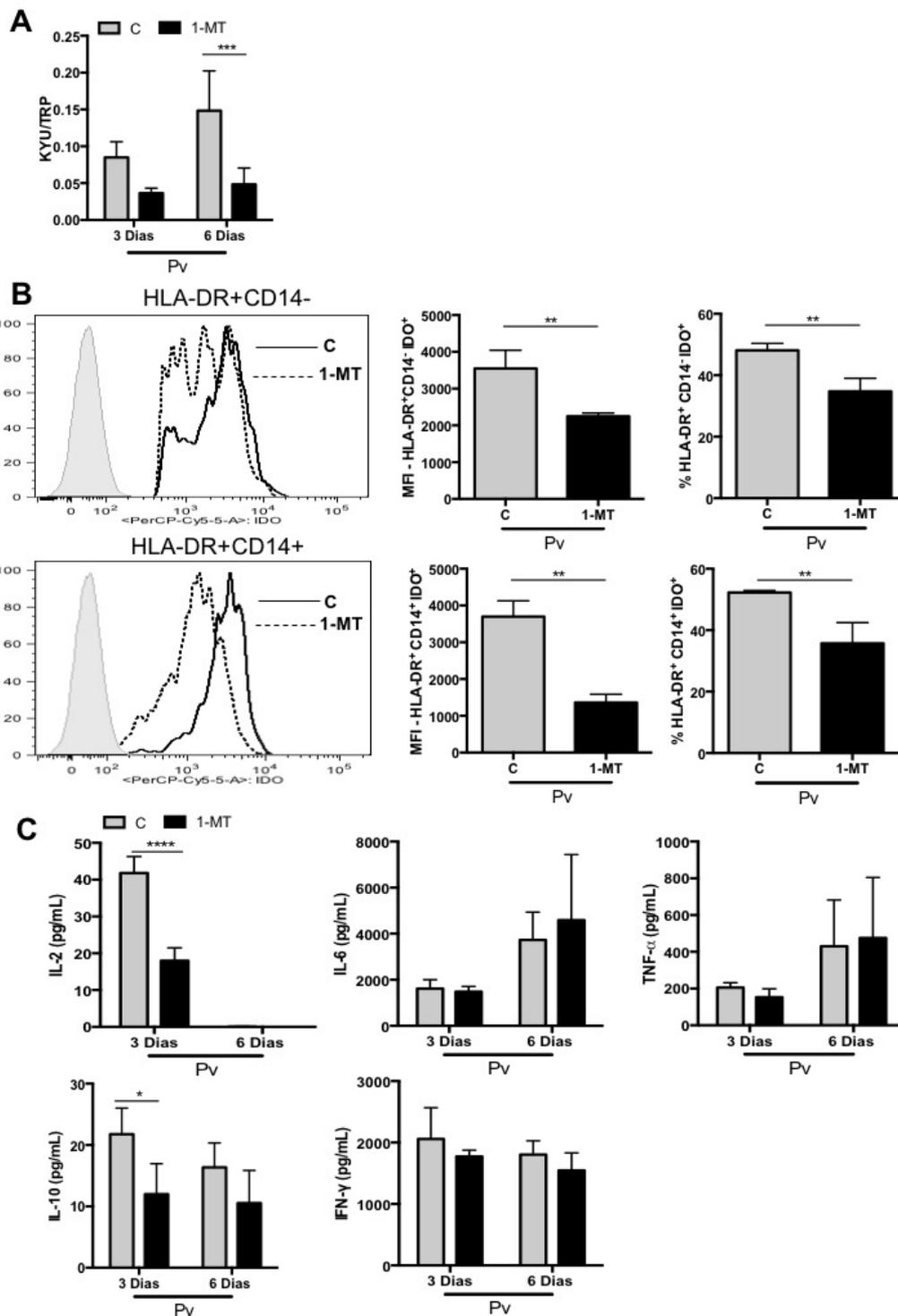
Para confirmar que realmente a enzima está atuando no aumento da KYU, nós utilizamos o 1-metil-triptofano (1-MT), bloqueador/inibidor da enzima que compete com o TRP e bloqueia a ativação da IDO. O 1-MT inibiu a ação da enzima, reduzindo os níveis de KYU/TRP tanto no dia 3 quanto no dia 6, após a estimulação com Pv (**Figura 19A**). A **Figura 19B** mostra a redução na expressão da IDO-1 e na porcentagem de células que expressam a enzima. Ao avaliar as citocinas, houve uma redução significativa nos níveis das citocinas IL-2 e IL-10 no dia 3 (**Figura 19C**).

A expressão de IDO é controlada por ativação de PRRs e citocinas, que levam ao aumento de NF- $\kappa$ B e subsequente aumento de IDO. Com intuito de caracterizar ainda mais o papel da resposta inata, nós utilizamos o bloqueador da proteína adaptadora MyD88 que reduziu níveis de KYU tanto no dia 3 como no dia 6, após estimulação por Pv (**Figura 20A**). Para afirmar que a MyD88 atua na expressão da enzima IDO, foi realizada citometria de fluxo, mostrando que ocorre uma redução em níveis de expressão da IDO-1 quando se utiliza o bloqueador da proteína MyD88 (**Figura 20B**). Apontando a atuação da imunidade inata na produção de KYU. Com relação aos níveis de citocinas, é possível observar uma diminuição significativa das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em ambos os dias, já em relação a IL-10 a diminuição é notada apenas no dia 3 (**Figura 20C**).



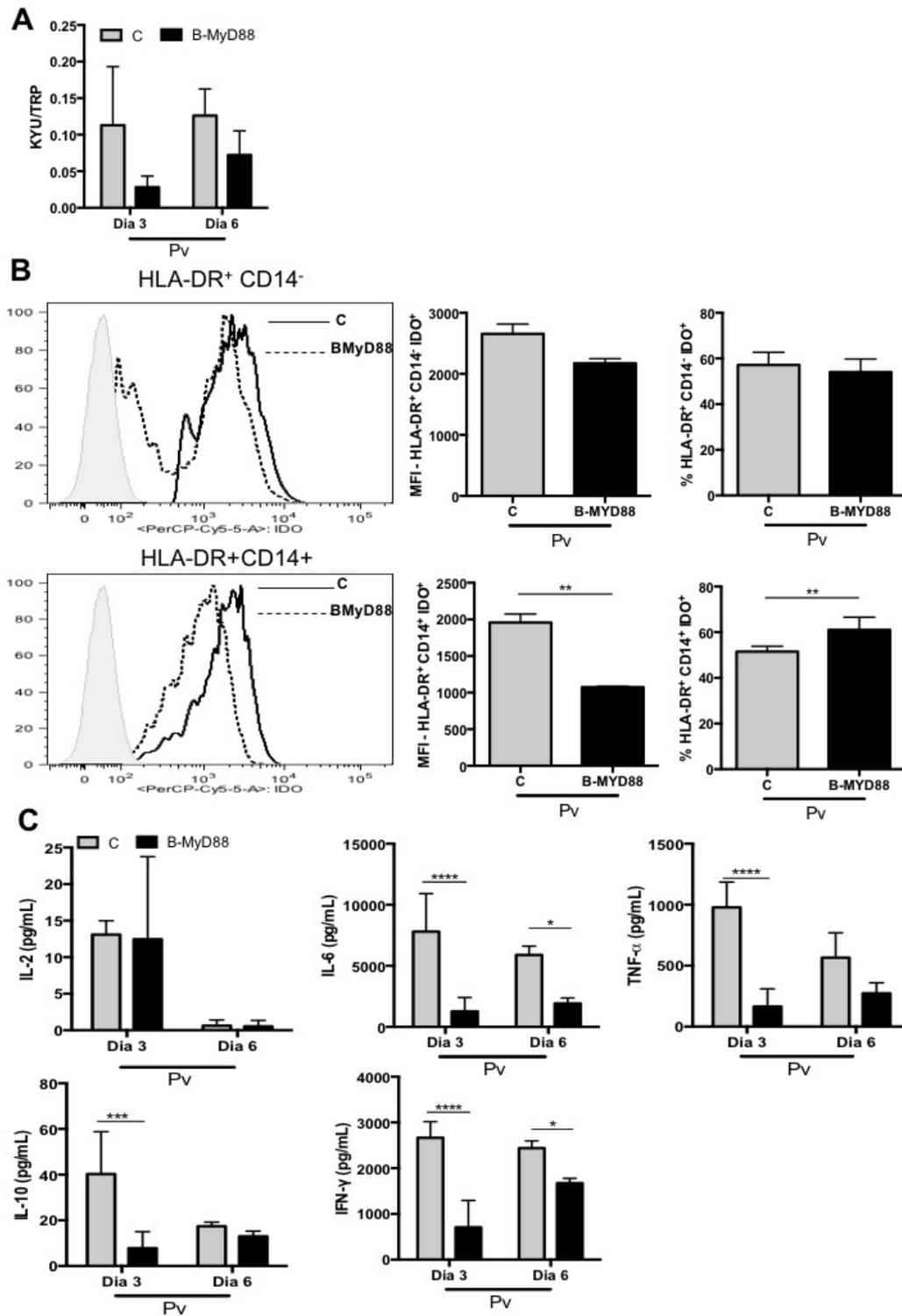
**Figura 18: Expressão da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO-1) é elevada em PBMCs estimulados com Pv.**

PBMCs foram estimulados por 3 dias 2:1 (eritrócitos não infectados (uRBC) ou extrato de eritrócitos infectados por *P.vivax* (Pv) : PBMC) as células foram marcadas por anticorpos e imunofenotipadas por citometria de fluxo. **A:** Demonstra estratégia de *gating* para avaliar as populações expressando IDO. **B:** Representa expressão IDO em células HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> por histograma, imagem é representativa de um doador, medidas foram feitas em quadruplicata representadas por porcentagem de células positivas e MFI. **C:** Representa expressão IDO em células HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> por histograma, imagem é representativa de um doador, medidas foram feitas em quadruplicata representadas por porcentagem de células positivas e MFI. Resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste two-way ANOVA. (n=4, \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



**Figura 19: Expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) com o uso do inibidor 1-Metil-Triptofano (1-MT).**

PBMCs foram estimulados por 3 e 6 dias 2:1 (extrato de eritrócitos infectados por *P.vivax* (Pv) : PBMC) onde houve a adição do bloqueador da enzima o 1-MT. **A:** Demonstra os níveis de atividade da enzima IDO (KYU/TRP) no controle e com o bloqueador, medidos por HPLC. **B:** Representa a expressão de IDO com o bloqueador 1-MT em células HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> por histograma, imagem é representativa de um doador, medidas foram feitas em quadruplicata representadas por porcentagem de células positivas e MFI. **C:** Níveis de citocinas IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$  antes e após o bloqueio, medidos por CBA. Resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste two-way ANOVA e teste T não paramétrico *Mann Whitney* ( $n=4$ , \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

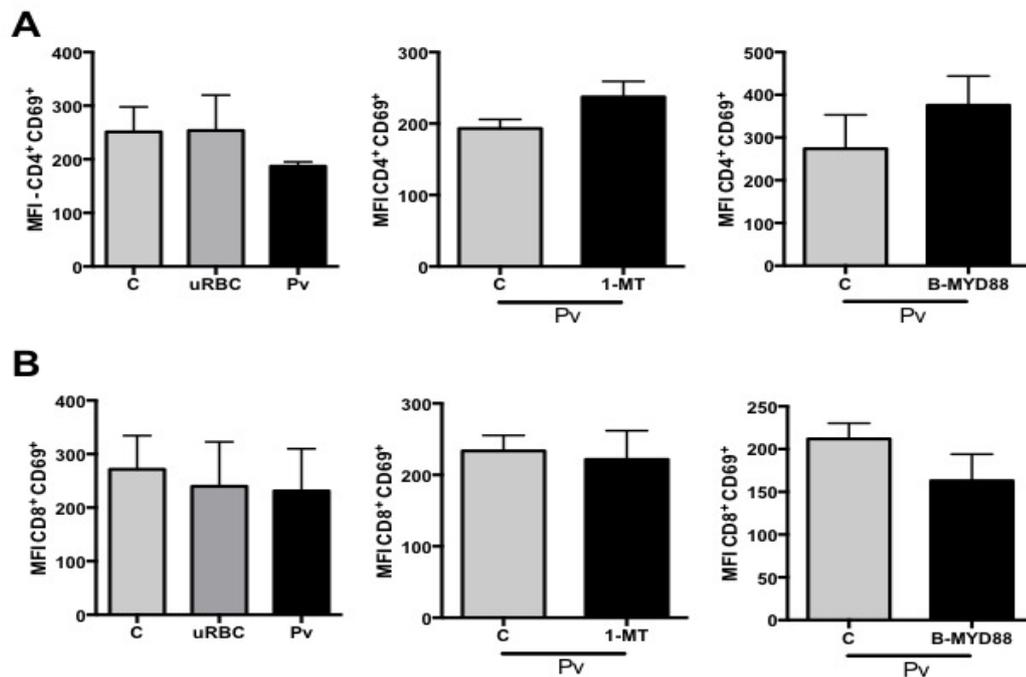


**Figura 20: Expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) com o uso do inibidor da proteína adaptadora MyD88.**

PBMCs foram estimulados por 3 e 6 dias 2:1 (extrato de eritrócitos infectado por *P.vivax* (Pv) : PBMC) onde houve a adição do bloqueador da proteína adaptadora MyD88. **A:** Demonstra os níveis de atividade da enzima IDO (KYU/TRP) no controle e com o bloqueador da MyD88, medidos por HPLC. **B:** Representa a expressão de IDO com o bloqueador da MyD88 em células HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> por histograma, imagem é representativa de um doador, medidas foram feitas em quadruplicata representadas por porcentagem de células positivas e MFI. **C:** Níveis de citocinas IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$  antes e após o bloqueio, medidos por CBA. Resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste two-way ANOVA e teste T não paramétrico *Mann Whitney* ( $n=4$ , \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

### 5.5 Quinurenina (KYU) inibe a ativação de células T CD4<sup>+</sup>

Foi caracterizada através da citometria de fluxo as populações de células ativadas durante a estimulação por extrato de Pv. Onde observou-se uma diminuição na ativação de células CD4<sup>+</sup>, demonstrada na **Figura 21A**. Ao utilizar os inibidores da IDO e da proteína MyD88 após a ativação por Pv, houve um aumento na ativação dessas células (**Figura 21A**). Já em relação a população de células CD8<sup>+</sup> não houve uma diminuição tão clara. Esses dados confirmam a atuação da KYU na ativação de células T.

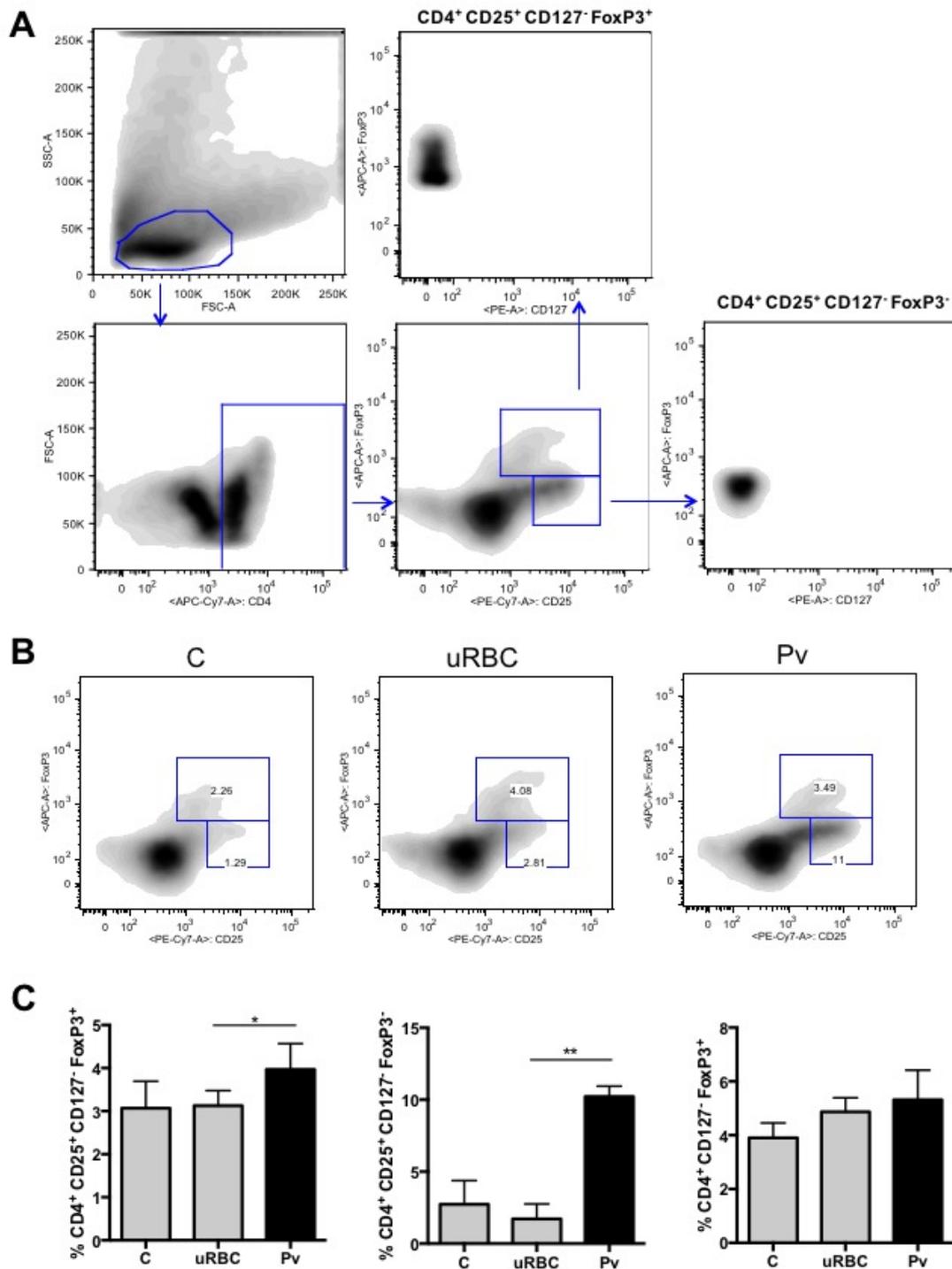


**Figura 21: Frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativadas em PBMCs estimulados com *P.vivax***  
 Teste realizado em cultura de 6 dias com PBMC de 4 doadores, estimulados na concentração 2:1 (extrato de eritrócitos infectado por *P.vivax* (Pv) : PBMC), com adição dos bloqueadores da IDO e MyD88. **A:** Níveis de células CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>, expressão dessas células com o uso dos bloqueadores 1-MT e da MyD88, medidos através da citometria de fluxo. **B:** Níveis de células CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>, expressão dessas células com o uso dos bloqueadores 1-MT e da MyD88. Foi utilizado teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* e teste T não paramétrico *Mann Whitney*.

## 5.6 Níveis elevados de quinurenina (KYU) levam ao aumento de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup>

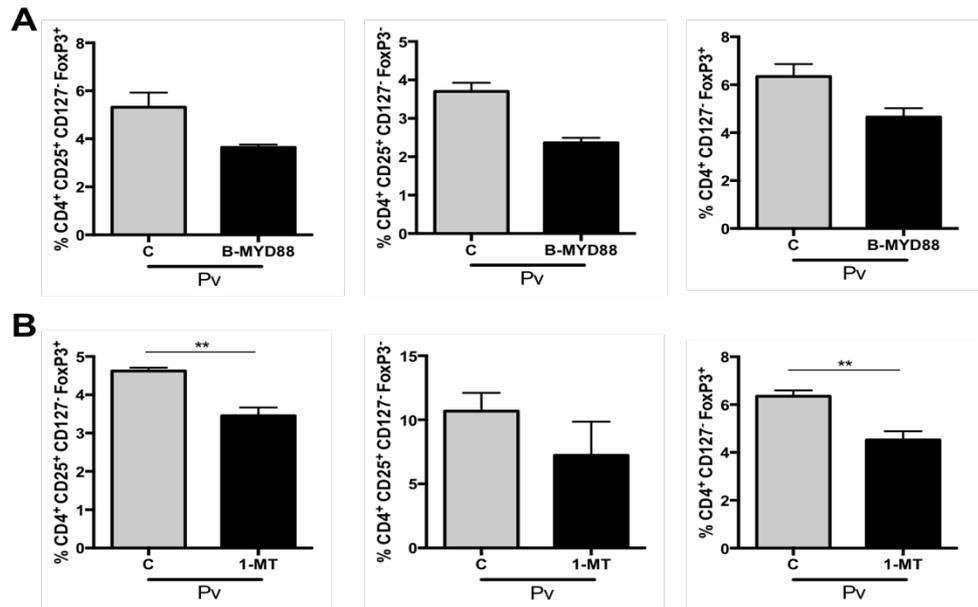
Para a melhor compreensão da atuação da KYU nas células T, avaliamos também a população de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup>. Para tanto as populações de células foram divididas em CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> (**Figura 22A e 22B**). Ao analisar essas populações podemos observar um aumento estatisticamente significativo em duas populações celulares, a população de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> e a de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> (**Figura 22C**).

Em presença do inibidor da proteína MyD88 em PBMCs estimuladas com Pv, observamos uma diminuição de todas as populações celulares, no entanto os dados não foram significativos (**Figura 23A**). Em comparação, ao se utilizar o inibidor daIDO é possível observar uma redução significativa de células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> (**Figura 23B**). Mostrando claramente a influência da KYU na ativação dessas células.



**Figura 22: Frequência de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> em PBMCs estimulados com *P.vivax***

Teste realizado em cultura de 6 dias com PBMC de 4 doadores, estimulados na concentração 2:1 (extrato de eritrócitos infectado por *P.vivax* (Pv) : PBMC). **A:** Gates mostrando as populações de células analisadas. **B:** Gates de controle, uRBC e Pv das populações de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup>. **C:** Frequência de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>. Imagens representativas de um doador. Resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. (n=4, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



**Figura 23: Frequência de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> após o uso dos inibidores da IDO e MyD88**  
 Teste realizado em cultura de 6 dias com PBMC de 4 doadores, estimulados na concentração 2:1 (extrato de eritrócitos infectado por *P. vivax* (Pv) : PBMC). **A:** Frequência de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> antes e após o uso do inibidor da proteína adaptadora MyD88. **B:** Frequência de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> antes e após o uso do inibidor da IDO. Resultados estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ . Foi utilizado teste T não paramétrico *Mann Whitney*. (n=4, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

---

---

## ***Discussão***

## 6. DISCUSSÃO

A infecção por *Plasmodium* pode causar doença grave, devido à uma resposta insuficiente para eliminar o parasita, ou a incapacidade do hospedeiro em controlar a inflamação, resultando em imunopatologia. As células T reguladoras (Tregs) são mediadores importantes da homeostase imune e estão elevadas na malária humana (BUENO et al., 2010; KHO et al., 2016; LAU et al., 2014; TORRES et al., 2014; WAMMES et al., 2013) e murina (KESWANI et al., 2016; SHAN et al., 2013; WANG et al., 2013), mas os mecanismos que levam o aumento e indução dessas células ainda são pouco entendidos. Neste estudo, demonstramos que a ativação da resposta imune inata leva ao aumento da enzimaIDO, para converter triptofano (TRP) em quinurenina (KYU), responsável pela indução de células Tregs e inibição da ativação de células T efetoras.

A via da quinurenina (Via-KYU) é responsável pelo metabolismo de aproximadamente 95% do TRP. A enzimaIDO e a TDO catabolizam a conversão de TRP em KYU. Portanto, a atividade enzimática daIDO é representada pela razão KYU/TRP. Na infecção por malária em camundongo a atividade enzimática daIDO foi elevada e isso teve relação com o aumento da patologia cerebral (HANSEN et al., 2004, 2016; MIU et al., 2009). Além disso, estudos em camundongos infectados por *P. yoelii* demonstraram um aumento na proliferação de células, produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> e redução de carga parasitaria em camundongo *knockout* paraIDO ou inibição daIDO por 1-Metil-Triptofano (1-MT) (HANSEN et al., 2004; TETSUTANI et al., 2007). Mas ainda não há estudos com infecções pelo *Plasmodium* em humanos que mostre o papel daIDO.

Neste estudo, observamos um aumento de KYU e atividade daIDO em fase aguda de pacientes infectados por *P. vivax*. Além disso, estimulação *in vitro* de PBMCs com extrato do parasita levou a uma maior expressão da enzima em células CD14<sup>+</sup> e KYU em sobrenadante. Também observamos um aumento significativo de atividade deIDO (KYU/TRP) em pacientes primoinfectados comparados com pacientes com mais de uma infecção por *Plasmodium*. Camundongos infectados por *P. yoelii* e *P. berguei* apresentaram elevada produção da enzimaIDO sendo relacionada ao aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  (HANSEN et al., 2004; HANSEN; SCHOFIELD, 2010; TETSUTANI et al., 2007). O que é claramente comprovado no nosso estudo e em outros já publicados, onde mostra que há um aumento de IFN- $\gamma$ , tanto nos pacientes como nos PBMCs estimulado *in vitro*.

Neste trabalho, os pacientes em fase aguda apresentaram altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IFN- $\gamma$  quando comparados ao grupo controle. O fato de TNF- $\alpha$  não ter sido detectado em pacientes, se explica por não termos pacientes incluídos nos primeiros dias com febre. Esses dados corroboram com dados já publicados na literatura (BUENO et al., 2010; CHAVES et al., 2016; GUIMARÃES DA COSTA et al., 2014). Além disso, observamos uma correlação positiva com IFN- $\gamma$  e negativa com IL-10 quando comparado a atividade daIDO, em pacientes infectados com *P. vivax*. Ao inibirmos a IDO com 1-MT houve redução nos níveis de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10 em PBMC estimulado por Pv.

A IDO não é expressa constitutivamente. A ativação de diversas vias de sinalização imunológicas, induzem fatores de transcrição que se ligam *upstream* a sequencias específicas de nucleotídeos, como os *interferon sequence response-like elements* (ISRE), *palindromic gamma-activated sequences* (GAS), além da via não canônica do NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells), presentes na região promotora da IDO-1 que controlam a tradução da versão metabolicamente ativa da enzima (MBONGUE et al., 2015).

Na malária a ativação da resposta inata pela MyD88 (DURAI; GOVINDARAJ; CHOI, 2013; KRISHNEGOWDA et al., 2005) e inflamassoma (SANTOS et al., 2016) leva a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B (COBAN et al., 2007; DE LEORATTI et al., 2012; GAZZINELLI et al., 2014; GAZZINELLI; DENKERS, 2006; KELLER et al., 2006). Nossos dados mostram que a inibição da resposta imune inata através do bloqueador da proteína MyD88 induz a redução na expressão da enzima IDO em células CD14<sup>+</sup> e redução de KYU em sobrenadante. A baixa expressão da enzima IDO também foi acompanhada por redução nos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 após bloqueio da MyD88. Com isso, demonstramos que em infecções por *P. vivax* a expressão e atividade da enzima IDO é aumentada pela ativação via MyD88 e citocinas pró-inflamatórias.

Metabólitos da via da KYU induzem a supressão imune por reduzir proliferação de células Th1 ou induzindo apoptose das mesmas (HANSEN et al., 2004; HUNT et al., 2016; MIU et al., 2009; TETSUTANI et al., 2007). Além disso, esses metabólitos podem ligar-se diretamente a receptores aryl-hidrocarbon (AhR) em células CD4<sup>+</sup> virgens e diferenciá-las no fenótipo Treg FOXP3<sup>+</sup>, as quais podem produzir mais IL-10 e TGF $\beta$ , fatores solúveis associados a uma limitação da resposta imunológica na malária (BUENO et al., 2010; GUIMARÃES DA COSTA et al., 2014; HANSEN; SCHOFIELD, 2010; SEHRAWAT; ROUSE, 2011). Essa ligação pode acabar

causando anergia e morte em células T efetoras e uma maior ativação de células Tregs (MUNN; MELLOR, 2013; PALLOTTA et al., 2011). Um estudo em camundongo *knockout* para AhR infectado por *P.yoelli* demonstrou um aumento significativo na patologia cerebral desses animais, quando comparados a camundongos *wild type* (BRANT et al., 2014). Contudo, a ligação entre AHR, KYU e Treg ainda não é esclarecida em malária.

Na malária há vários relatos comprovando níveis elevados de células Tregs em humanos infectados por *P.vivax* (BUENO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; JANGPATARAPONGSA et al., 2008b; WAMMES et al., 2013) e por *P.falciparum* (GONÇALVES et al., 2010; IBITOKOU et al., 2012; LYKE et al., 2012; MINIGO et al., 2009; TORRES et al., 2014), também já foi relatado em camundongos infectados por *P.yoelli*, *P.berguei* e *P.chabaudi* (HISAEDA et al., 2004; KESWANI et al., 2016; KESWANI; BHATTACHARYYA, 2014; SHAN et al., 2013; WANG et al., 2013). Além da indução de iTreg e nTreg mostrados em PBMCs estimulado *in vitro* por extrato de eritrócitos infectados por *P.falciparum* (FINNEY et al., 2012; FINNEY; RILEY; WALTHER, 2010b; SCHOLZEN et al., 2009). Todavia o papel das células Tregs na patologia humana em infecções por malária ainda não é claro.

Apenas um estudo realizado em Manaus, mostrou que o aumento de células Tregs na malária vivax pode ter correlação com alta parasitemia (BUENO et al., 2010). Em Papua um estudo com adultos infectados por *P.falciparum* mostrou uma correlação entre a carga parasitária e frequências de Treg na malária grave, mas não em malária não complicada (SCHOLZEN et al., 2009). Em crianças gambianas, no entanto, a correlação foi observada em ambas as categorias de doenças, mas parasitemias superiores a 100.000 parasitas por ml de sangue foram observadas tanto nas crianças com doença grave, como sem complicações (WALTHER et al., 2009). Enquanto que em adultos na Papuásia níveis elevados foram encontrados apenas na malária grave (MINIGO et al., 2009). Isto sugere que uma carga parasitaria precisa ser atingida para provocar a indução ou a expansão de células Tregs em humanos. Mas os fatores imunológicos e parasitários que contribuem para malária grave em vivax são pouco conhecidos.

No presente estudo, observamos um aumento significativo na frequência de células Tregs CD4+CD25+CD127-Foxp3+ e CD4+CD127-Foxp3+ *in vitro* com PBMC estimulado por extrato de eritrócitos infectados por Pv, como observado em estimulação por *P. Falciparum* (FINNEY et al., 2012; FINNEY; RILEY; WALTHER, 2010b; SCHOLZEN et al., 2009). Observamos também um aumento grande na

frequência de células CD4+CD25+CD127-Foxp3- após estimulação por Pv *in vitro*. Um estudo mostrou que em pacientes infectados por *P.falciparum* as células Tregs CD4+CD25+Foxp3- não clássicas foram apresentadas como a única fonte substancial de IL-10 durante uma infecção aguda da malária (WALTHER et al., 2009). O bloqueio daIDO por 1-MT, reduziu significativamente a frequência de células Tregs CD4+CD25+CD127-Foxp3+ e CD4+CD25+CD127-. Alguns estudos mostraram um aumento de células Tregs CD4+CD25+ relacionadas a alta parasitemia em humanos infectados por *P.falciparum* (LYKE et al., 2012; WALTHER et al., 2005). Indicando também que a indução *in vitro* de células T CD4+CD25+Foxp3+ por *P. falciparum* é dependente da concentração do extrato do parasita (FINNEY et al., 2012; FINNEY; RILEY; WALTHER, 2010b; SCHOLZEN et al., 2009).

A depleção de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> aumenta a proliferação de células e produção de IFN- $\gamma$  em PBMCs estimulados por antígenos da malária (FINNEY et al., 2012; SCHOLZEN et al., 2009). Em nosso estudo, observamos que o bloqueio daIDO por 1-MT aumentou a ativação de células T CD4<sup>+</sup>. Este aumento foi em conjunto com elevados níveis de IFN- $\gamma$  e IL-2, sugerindo que a KYU tem impacto negativo na proliferação de células T em *P. vivax*. No entanto, não houve diferença na ativação de células T CD8<sup>+</sup>.

Ao compararmos os níveis de leucócitos totais obtidos no exame hematológico dos pacientes em fase aguda com o grupo controle, ficou evidente a diminuição dos níveis dessas células. Induzindo ao pensamento de que existe uma supressão de leucócitos, dados similares foram observados na literatura (MCKENZIE et al., 2005; TCHINDA et al., 2012). Também em outras doenças já foi demonstrado que células Treg são capazes de induzir IDO em células dendríticas via interação de CTLA-4 com B7, construindo um *feedback* positivo na imunossupressão mediada por IDO (CHEN et al., 2008; CHUNG et al., 2009). Como um desfecho global, o *Plasmodium* aumenta a ativação de IDO e leva a indução de células Treg resultando na supressão antígeno específica da resposta imune, com inibição seletiva e depleção de células T CD4<sup>+</sup> ativadas.

Este estudo proporciona novos questionamentos, que não foram possíveis ser esclarecidos durante o mestrado, como por exemplo, quais receptores da imunidade inata ou PAMPs do *Plasmodium* estão levando a essa maior expressão de IDO pelo MyD88. Precisamos investigar também, outras vias de sinalização envolvidas, como NLRP3 no reconhecimento da hemozoína (DOSTERT et al., 2009) e o papel de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no aumento de Tregs em *vivax*. Também, precisamos

demonstrar que Tregs induzidas pelo Pv *in vitro* tem atividade de supressão na proliferação de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (CFSE ou pelo marcador Ki67). Igualmente, precisamos medir TGF- $\beta$  no soro, além da expressão do AhR, expressão da IDO e frequência de Tregs em PBMCs de pacientes infectados com Vivax e correlacionar com os níveis de KYU e carga parasitaria. Para assim, afirmar que *Plasmodium* induz imunossupressão como mecanismo de evasão da resposta imune.

Infecção por falciparum em humano causa maior patologia em comparação com vivax, mas os mecanismos moleculares que causam essas diferenças entre Plasmodium spp. é pouco estudado. Em nosso estudo piloto, observamos a atividade da IDO muito elevada em PBMC estimulado por falciparum, quando comparado com vivax (dados não publicados). Não se sabe ao certo os mecanismos que levam a hiper-ativação das células Tregs e diferenças entre infecção por vivax e falciparum em humano, e a influência disso na parasitemia e imunopatologia. No entanto, vários trabalhos com outras doenças como câncer e HIV já publicaram a ligação entre aumento de KYU e células Tregs e que esse aumento foi relacionado a uma tolerância imunológica (FAVRE et al., 2010; MOON et al., 2015).

Resumindo, pela primeira vez demostramos um mecanismo que leva ao aumento de células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> na malária humana. Mecanismo esse, onde PAMPS do Pv ativam a resposta inata via MyD88 levando a altos níveis de IFN- $\gamma$  e expressão da enzima IDO. A elevada atividade da enzima induz ao aumento de KYU que atua na indução de células Tregs e inibição da ativação de células T efectoras, podendo levar a uma imunossupressão.

---

---

*Conclusão*

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados suportam um papel da IDO na indução de células Tregs e imunossupressão. Estudos futuros são necessários para compreender como a IDO modula a resposta imune *in vivo* e qual o impacto sobre a gravidade da doença em infecções por *Plasmodium* em humano.

---

---

## ***Referências Bibliográficas***

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADALID-PERALTA, L. et al. **Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections** *International Journal of Biological Sciences*, 2011.
- ADAMS, O. et al. Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Alpha/Beta and Gamma Interferon-Mediated Antiviral Effects against Herpes Simplex Virus Infections. **Journal of Virology**, v. 78, n. 5, p. 2632–2636, 1 mar. 2004.
- AGNANDJI, S. T. et al. Evaluation of the Safety and Immunogenicity of the RTS,S/AS01 E Malaria Candidate Vaccine When Integrated in the Expanded Program of Immunization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 7, p. 1076–1087, out. 2010.
- ALEXANDER, N. et al. Assessing agreement between malaria slide density readings. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 4, 2010.
- ALONSO, P. L.; TANNER, M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 150–155, 6 fev. 2013.
- ANDRADE, B. B. et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 13, 2010.
- ARESE, P.; SCHWARZER, E. Malarial pigment (haemozoin): a very active “inert” substance. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 91, n. 5, p. 501–516, 1997.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 133, n. 2, p. 145–152, ago. 2003.
- ASANTE, K. P. et al. Safety and efficacy of the RTS,S/AS01E candidate malaria vaccine given with expanded-programme-on-immunisation vaccines: 19 month follow-up of a randomised, open-label, phase 2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 741–749, 2011.
- BALL, H. J. et al. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. **Gene**, v. 396, n. 1, p. 203–213, 2007.
- BARRY, A. E. Malaria epidemiology: Insights from the genome of the malaria parasite. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. 1, n. 2, p. 76–86, 2005.
- BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (\*). **Annual review of immunology**, v. 27, p. 551–589, 2009.
- BOWERS, K. M. et al. Inter-rater reliability of malaria parasite counts and comparison of methods. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 267, 2009.
- BRANT, F. et al. Role of the aryl hydrocarbon receptor in the immune response profile and development of pathology during Plasmodium berghei Anka infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 8, p. 3127–3140, 2014.
- BUENO, L. L. et al. Plasmodium vivax: Induction of CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells during Infection Are Directly Associated with Level of Circulating Parasites. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9623, 10 mar. 2010.
- CAMPOS, M. A. S. et al. Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 416–423, 1 jul. 2001.
- CHAVES, Y. O. et al. Immune response pattern in recurrent Plasmodium vivax malaria.

**Malaria journal**, v. 15, n. 1, p. 445, 31 dez. 2016.

CHEN, W. et al. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 8, p. 5396–404, 15 out. 2008.

CHIMMA, P. et al. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009.

CHUA, C. L. L. et al. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 26–34, jan. 2013.

CHUNG, D. J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. **Blood**, v. 114, n. 3, p. 555–563, 2009.

COBAN, C. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 1, p. 19–25, 2005.

COBAN, C. et al. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. **International immunology**, v. 19, n. 1, p. 67–79, 2007.

COLEMAN, R. E. et al. Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in Western Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 2 SUPPL., p. 141–144, 2002.

COUPER, K. N. et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, 2010.

CROMPTON, P. D. et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 157–87, 2014.

DA SILVA-NUNES, M. et al. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta Tropica**, v. 121, n. 3, p. 281–291, 2012.

DANIEL-RIBEIRO, C. T.; LACERDA, M. V. G.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 101, n. 3, p. 243–248, 2008.

DE LEORATTI, F. M. S. et al. Neutrophil paralysis in plasmodium vivax malaria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

DOSTERT, C. et al. Malarial Hemozoin Is a Nalp3 Inflammasome Activating Danger Signal. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6510, 4 ago. 2009.

DURAI, P.; GOVINDARAJ, R. G.; CHOI, S. Structure and dynamic behavior of Toll-like receptor 2 subfamily triggered by malarial glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum. **The FEBS journal**, v. 280, n. 23, p. 6196–212, dez. 2013.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; PUC CETTI, P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. **European journal of immunology**, v. 42, n. 8, p. 1932–7, ago. 2012.

FAVRE, D. et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the

- balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. **Science translational medicine**, v. 2, n. 32, p. 32ra36, 2010.
- FERGUSON, M. A. J. et al. The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2–3, p. 327–340, out. 1999.
- FERREIRA, M. U.; DA SILVA-NUNES, M. Evidence-based public health and prospects for malaria control in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 9, p. 533–545, 4 out. 2010.
- FINNEY, O. C. et al. Homeostatic regulation of T effector to Treg ratios in an area of seasonal malaria transmission. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 5, p. 1288–1300, 2009.
- FINNEY, O. C. et al. Freeze-thaw lysates of Plasmodium falciparum-infected red blood cells induce differentiation of functionally competent regulatory T cells from memory T cells. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 7, p. 1767–1777, 2012.
- FINNEY, O. C.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. Regulatory T cells in malaria--friend or foe? **Trends in immunology**, v. 31, n. 2, p. 63–70, 2010a.
- FINNEY, O. C.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. Phenotypic analysis of human peripheral blood regulatory T cells (CD4+FOXP3+CD127lo/-) ex vivo and after in vitro restimulation with malaria antigens. **European journal of immunology**, v. 40, n. 1, p. 47–60, 2010b.
- FLANAGAN, K. L. et al. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 4, p. 1062–1072, 2010.
- FRIBERG, M. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. **International Journal of Cancer**, v. 101, n. 2, p. 151–155, 2002.
- FRUMENTO, G. et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 4, p. 459–468, 2002.
- GAZZINELLI, R. T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744–57, nov. 2014.
- GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895–906, 2006.
- GETHING, P. W. et al. A Long Neglected World Malaria Map: Plasmodium vivax Endemicity in 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, 2012.
- GIRIBALDI, G. et al. Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  mediates Matrix Metalloproteinase-9 enhancement in human adherent monocytes fed with malarial pigment. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 12, p. 925–930, 2011.
- GONÇALVES, R. M. et al. 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**, v. 78, n. 11, p. 4763–4772, 2010.
- GONÇALVES, R. M. et al. Cytokine Balance in Human Malaria: Does Plasmodium vivax Elicit More Inflammatory Responses than Plasmodium falciparum? **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44394, 4 set. 2012.
- GOWDA, D. C. **TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs** Trends in

**Parasitology**, 2007.

GRIFFITH, J. W. et al. Pure Hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 8, p. 5208–5220, 2009.

GUIMARÃES DA COSTA, A. et al. The Robust and Modulated Biomarker Network Elicited by the Plasmodium vivax Infection Is Mainly Mediated by the IL-6/IL-10 Axis and Is Associated with the Parasite Load. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

HAFALLA, J. C. R.; COCKBURN, I. A.; ZAVALA, F. Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 1–2, p. 15–24, jan. 2006.

HANSEN, A. M. et al. Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localised to the vascular endothelium. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1309–19, nov. 2004.

HANSEN, A. M. et al. Communications in Free Radical Research Tissue distribution of indoleamine 2, 3-dioxygenase in normal and malaria-infected tissue Short refereed paper and malaria-infected tissue. v. 2, n. September, 2016.

HANSEN, D. S.; SCHOFIELD, L. Natural Regulatory T Cells in Malaria: Host or Parasite Allies? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000771, 29 abr. 2010.

HISAEDA, H. et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Nature medicine**, v. 10, n. 1, p. 29–30, 2004.

HUNT, N. H. et al. The kynurenine pathway and parasitic infections that affect CNS function. **Neuropharmacology**, 26 fev. 2016.

IBITOKOU, S. et al. Peripheral Blood Cell Signatures of Plasmodium falciparum Infection during Pregnancy. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

JANGPATARAPONGSA, K. et al. Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 10, p. 2697–2705, 2008a.

JANGPATARAPONGSA, K. et al. Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. **European journal of immunology**, v. 38, n. 10, p. 2697–705, out. 2008b.

JANSSENS, W. et al. CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 9, p. 4604–4612, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. **Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity**, 2011.

KELLER, C. C. et al. Acquisition of Hemozoin by Monocytes Down-Regulates Interleukin-12 p40 (IL-12p40) Transcripts and Circulating IL-12p70 through an IL-10-Dependent Mechanism: In Vivo and In Vitro Findings in Severe Malarial Anemia. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 5249–5260, 1 set. 2006.

KESWANI, T. et al. Role of TGF- $\beta$  and IL-6 in dendritic cells, Treg and Th17 mediated immune response during experimental cerebral malaria. **Cytokine**, v. 88, p. 154–166, 12 set. 2016.

KESWANI, T.; BHATTACHARYYA, A. Differential role of T regulatory and Th17 in Swiss mice infected with Plasmodium berghei ANKA and Plasmodium yoelii. **Experimental parasitology**, v. 141, p. 82–92, jun. 2014.

- KHO, S. et al. Characterization of blood dendritic and regulatory T cells in asymptomatic adults with sub-microscopic *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* infection. **Malaria journal**, v. 15, p. 328, 2016.
- KOCHAR, D. K. et al. *Plasmodium vivax* Malaria. v. 11, n. 1, p. 132–135, 2005.
- KREMSNER, P. P. G.; KRISHNA, P. S. **Antimalarial combinations** **Lancet**, 2004.
- KRISHNEGOWDA, G. et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8606–16, 4 mar. 2005.
- KROTOSKI, W. A. Announcement. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. IFC, jan. 1985.
- LACERDA, M. V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 12, 2012.
- LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature immunology**, v. 9, n. 7, p. 725–732, 2008.
- LAU, L. S. et al. CD8+ T Cells from a Novel T Cell Receptor Transgenic Mouse Induce Liver-Stage Immunity That Can Be Boosted by Blood-Stage Infection in Rodent Malaria. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004135, maio 2014.
- LEE, P. et al. Molecular detection of human *Plasmodium* species in Sabah using PlasmoNex™ multiplex PCR and hydrolysis probes real-time PCR. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 28, 2015.
- LEWKOWICZ, P. et al. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 10, p. 7155–7163, 2006.
- LYKE, K. E. et al. Reduced T regulatory cell response during acute *Plasmodium falciparum* infection in malian children co-infected with *Schistosoma haematobium*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
- MAKALA, L. H. C. et al. *Leishmania major* Attenuates Host Immunity by Stimulating Local Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 5, p. 715–725, 1 mar. 2011.
- MATUSCHEWSKI, K. **Getting infectious: Formation and maturation of plasmodium sporozoites in the Anopheles vector** **Cellular Microbiology**, 2006.
- MBONGUE, J. et al. The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. **Vaccines**, v. 3, n. 3, p. 703–729, 10 set. 2015.
- MCKENZIE, F. E. et al. White blood cell counts and malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 2, p. 323–30, 15 jul. 2005.
- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819–826, 2007.
- MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 10, p. 762–74, out. 2004.
- METZ, R. et al. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. **Cancer Research**, v. 67, n. 15, p. 7082–7087, 2007.

- MILLER, L. H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 7 fev. 2002.
- MILLS, K. H. G. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 11, p. 841–855, 2004.
- MINIGO, G. et al. Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, 2009.
- MISRA, N. et al. Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 8, p. 4676–4680, 2004.
- MIU, J. et al. Effect of indoleamine dioxygenase-1 deficiency and kynurenine pathway inhibition on murine cerebral malaria. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 3, p. 363–70, fev. 2009.
- MOON, Y. W. et al. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 3, p. 51, 2015.
- MUNN, D. H. et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 9, p. 1363–1372, 1999.
- MUNN, D. H. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 280–290, 2004.
- MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1147–1154, 1 maio 2007.
- MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. **Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses** *Trends in Immunology*, 2013.
- NEWTON, C. R. J. C.; TAYLOR, T. E.; WHITTEN, R. O. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 5, p. 673–683, 1998.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview Review. **Malaria Journal**, p. 1–15, 2010.
- OLIVEIRA-FILHO, A. B.; MARTINELLI, J. M. Casos notificados de malária no Estado do Pará, Amazônia Brasileira, de 1998 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 18, n. 3, p. 277–284, 2009.
- ORGANIZATION, W. H. **malariaWorld Malaria Report 2013**. [s.l.: s.n.].
- OWUSU-AGYEI, S. et al. Epidemiology of malaria in the forest-savanna transitional zone of Ghana. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 220, 2009.
- PALLOTTA, M. T. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nature immunology**, v. 12, n. 9, p. 870–878, 2011.
- PANTOJA, L. G. et al. Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6478–6481, 2000.
- PARISE, É. V. Malária grave em Palmas, Estado do Tocantins: Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 463–468, 2009.
- PARROCHE, P. et al. 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 of the United States of**

**America**, v. 104, n. 6, p. 1919–1924, 2007.

PETROFF, M. G. et al. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1496–1504, 2003.

PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 3, p. 908–912, 1984.

PINA-COSTA, A. DE et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–633, ago. 2014.

POTULA, R. et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in an animal model of HIV-1 encephalitis. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2382–2390, 2005.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849–856, 2006.

REQUENA, P. et al. Proinflammatory Responses and Higher IL-10 Production by T Cells Correlate with Protection against Malaria during Pregnancy and Delivery Outcomes. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 7, p. 3275–3285, 1 abr. 2015.

ROCHA, M. D. N. A. **Adesão ao tratamento da malária: Um estudo em comunidades do entorno da usina hidrelétrica de Tucuruí - Pará**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, 2008.

ROPERT, C.; FRANKLIN, B. S.; GAZZINELLI, R. T. Role of TLRs/MyD88 in host resistance and pathogenesis during protozoan infection: lessons from malaria. **Seminars in Immunopathology**, v. 30, n. 1, p. 41–51, fev. 2008.

ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 395–403, ago. 2000.

RUNGSIHIRUNRAT, K. et al. *Plasmodium vivax* drug resistance genes; *Pvmdr1* and *Pvcrt-o* polymorphisms in relation to chloroquine sensitivity from a malaria endemic area of Thailand. **The Korean journal of parasitology**, v. 53, n. 1, p. 43–9, 2015.

SAITO, K.; HEYES, M. P. Kynurenine pathway enzymes in brain. Properties of enzymes and regulation of quinolinic acid synthesis. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 398, p. 485–492, 1996.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 455–458, 2000.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature immunology**, v. 6, n. 4, p. 345–352, 2005.

SAKAGUCHI, S.; POWRIE, F. Emerging Challenges in Regulatory T Cell Function and Biology. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 627–629, 3 ago. 2007.

SANTOS, M. L. S. et al. Contribution of inflammasome genetics in *Plasmodium vivax* malaria. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 40, p. 162–6, jun. 2016.

SCHMETTERER, K. G.; NEUNKIRCHNER, A.; PICKL, W. F. **Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation**The FASEB Journal,

2012.

SCHOLZEN, A. et al. Plasmodium falciparum-mediated induction of human CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>hi</sup> CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGF $\beta$ ?? **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, 2009.

SEHRAWAT, S.; ROUSE, B. T. **Tregs and infections: on the potential value of modifying their function***Journal of Leukocyte Biology*, 2011.

SHAN, Y. et al. Age-related CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T-cell responses during Plasmodium berghei ANKA infection in mice susceptible or resistant to cerebral malaria. **The Korean journal of parasitology**, v. 51, n. 3, p. 289–95, jun. 2013.

SILVA, A. L. T. et al. Plasmodium vivax infection induces expansion of activated naïve/memory T cells and differentiation into a central memory profile. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 12, p. 837–843, 2013.

SILVER, K. L. et al. **Complement driven innate immune response to malaria: Fuelling severe malarial diseases***Cellular Microbiology*, 2010.

STEPHENS, P. W. et al. No Title. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 307–310, 16 mar. 2000.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 3, p. 169–180, 2004.

TAAMS, L. S. et al. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Human Immunology**, v. 66, n. 3, p. 222–230, 2005.

TAKEDA, K. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 22 nov. 2004.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010.

TCHINDA, G. G. et al. Impact of Malaria on Hematological Parameters in People Living with HIV/AIDS Attending the Laquintinie Hospital in Douala, Cameroon. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40553, 10 jul. 2012.

TERNESS, P. et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 4, p. 447–457, 2002.

TETSUTANI, K. et al. Malaria parasite induces tryptophan-related immune suppression in mice. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 7, p. 923–930, 2007.

TIEMI SHIO, M. et al. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, 2009.

TODRYK, S. M. et al. Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T cells with susceptibility in Kenyans. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, 2008.

TORRE, D. **Early production of gamma-interferon in clinical malaria: role of interleukin-18 and interleukin-12.***Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 15 maio 2009. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/598508>>

TORRES, K. J. et al. Relationship of regulatory T cells to Plasmodium falciparum malaria symptomatology in a hypoendemic region. **Malaria journal**, v. 13, p. 108, 2014.

TRZONKOWSKI, P. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8<sup>+</sup> and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. **Clinical Immunology**, v. 112, n. 3, p. 258–267, 2004.

- VELAVAN, T.; OJURONGBE, O. Regulatory T Cells and Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–8, 2011.
- VENET, F. et al. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 9, p. 6540–6547, 2006.
- WALTHER, M. et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. **Immunity**, v. 23, n. 3, p. 287–296, 2005.
- WALTHER, M. et al. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, 2009.
- WAMMES, L. J. et al. Asymptomatic plasmodial infection is associated with increased tumor necrosis factor receptor II-expressing regulatory T cells and suppressed type 2 immune responses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 10, p. 1590–1599, 2013.
- WANG, G.-G. et al. Plasmodium chabaudi AS: distinct CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cell responses during infection in DBA/2 and BALB/c mice. **Parasitology international**, v. 62, n. 1, p. 24–31, fev. 2013.
- WU, Y. et al. Plasmodium yoelii: distinct CD4(+)CD25(+) regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. **Experimental parasitology**, v. 115, n. 3, p. 301–304, 2007.
- YUASA, H. J. et al. Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 65, n. 6, p. 705–714, 2007.

---

***Anexo***

## Anexo 1: Parecer do comitê de Ética em Pesquisa – CEP – UFAM

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA																																																							
<p><b>- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA</b></p> <p><b>Título da Pesquisa:</b> Avaliação da resposta imune em paciente com Malária-Dengue co-infecção  <b>Pesquisador Responsável:</b> Pritesh Jaychand Lalwani  <b>Área Temática:</b>  <b>Versão:</b> 2  <b>CAAE:</b> 36938614.3.0000.5020  <b>Submetido em:</b> 08/12/2014  <b>Instituição Proponente:</b> Faculdade de Ciências Farmaceuticas  <b>Situação da Versão do Projeto:</b> Aprovado  <b>Localização atual da Versão do Projeto:</b> Pesquisador Responsável  <b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio</p> <div style="text-align: right;">  </div> <p style="text-align: right;">Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_320326</p>																																																							
<p><b>+ DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA</b></p>																																																							
<p><b>- LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Apreciação ↕</th> <th>Pesquisador Responsável ↕</th> <th>Versão ↕</th> <th>Submissão ↕</th> <th>Modificação ↕</th> <th>Situação ↕</th> <th>Exclusiva do Centro Coord. ↕</th> <th>Ações</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PO</td> <td>Pritesh Jaychand Lalwani</td> <td>2</td> <td>08/12/2014</td> <td>22/12/2014</td> <td>Aprovado</td> <td>Não</td> <td>   </td> </tr> </tbody> </table>								Apreciação ↕	Pesquisador Responsável ↕	Versão ↕	Submissão ↕	Modificação ↕	Situação ↕	Exclusiva do Centro Coord. ↕	Ações	PO	Pritesh Jaychand Lalwani	2	08/12/2014	22/12/2014	Aprovado	Não	   																																
Apreciação ↕	Pesquisador Responsável ↕	Versão ↕	Submissão ↕	Modificação ↕	Situação ↕	Exclusiva do Centro Coord. ↕	Ações																																																
PO	Pritesh Jaychand Lalwani	2	08/12/2014	22/12/2014	Aprovado	Não	   																																																
<p><b>+ HISTÓRICO DE TRÂMITES</b></p>																																																							
<p><b>LEGENDA:</b></p> <p><b>(*) Apreciação</b></p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>PO = Projeto Original de Centro Coordenador</td> <td>POp = Projeto Original de Centro Participante</td> <td>POc = Projeto Original de Centro Coparticipante</td> </tr> <tr> <td>E = Emenda de Centro Coordenador</td> <td>Ep = Emenda de Centro Participante</td> <td>Ec = Emenda de Centro Coparticipante</td> </tr> <tr> <td>N = Notificação de Centro Coordenador</td> <td>Np = Notificação de Centro Participante</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p><b>(*) Formação do CAAE</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Ano de submissão do Projeto</th> <th colspan="3">Tipo do centro</th> <th colspan="4">Código do Comitê que está analisando o projeto</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>n</td><td>n</td><td>a</td><td>a</td><td>.</td><td>d</td><td>v</td><td>.</td><td>t</td><td>x</td><td>x</td><td>x</td><td>.</td><td>l</td><td>l</td><td>l</td><td>l</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Sequencial para todos os Projetos submetidos para apreciação</td> <td colspan="3">Digito verificador</td> <td colspan="4">Sequencial, quando estudo possui Centro(s) Participante(s) e/ou Coparticipante(s)</td> <td colspan="4">Código do Comitê que está analisando o projeto</td> </tr> </tbody> </table>								PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante	E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante	N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante		Ano de submissão do Projeto		Tipo do centro			Código do Comitê que está analisando o projeto				n	n	a	a	.	d	v	.	t	x	x	x	.	l	l	l	l	Sequencial para todos os Projetos submetidos para apreciação		Digito verificador			Sequencial, quando estudo possui Centro(s) Participante(s) e/ou Coparticipante(s)				Código do Comitê que está analisando o projeto			
PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante																																																					
E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante																																																					
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante																																																						
Ano de submissão do Projeto		Tipo do centro			Código do Comitê que está analisando o projeto																																																		
n	n	a	a	.	d	v	.	t	x	x	x	.	l	l	l	l																																							
Sequencial para todos os Projetos submetidos para apreciação		Digito verificador			Sequencial, quando estudo possui Centro(s) Participante(s) e/ou Coparticipante(s)				Código do Comitê que está analisando o projeto																																														

## Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

### Termo de Consentimento livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa chamada: "**Avaliação da resposta Imune em paciente com Malária-Dengue co-infecção**", realizada por pesquisadores da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

A Malária e a Dengue são um crescente problema de saúde pública no Brasil e, em especial na região Amazônica, estão associadas ao aumento da morbidade e mortalidade. A influência da co-infecção na resposta imunológica de doenças não está clara, sendo assim, o objetivo deste projeto é tanto obter informações e dados para diferencia-las clinicamente e biologicamente das infecções sozinhas, assim como, determinar os mecanismos e a via de sinalização em células e identificar biomarcadores em pacientes co-infectados para Malária e Dengue, e compará-los às infecções sozinhas. Estes estudos terão impacto no conhecimento básico desses patógenos humanos e, também, serão primordiais para a criação de novas terapias e vacinas eficazes contra doenças transmissíveis por artrópodes.

A sua participação nesta pesquisa consiste em permitir a coleta de 60mL de sangue da veia, em três momentos: dia 0 (quando apresentam sintomas e incluídos no estudo), dias 8-10 e dias 25-28 com o uso de agulha e seringa descartáveis, além de responder a um questionário com dados epidemiológicos. O seu sangue será analisado nos laboratórios da UFAM e poderá ser guardado para futuras pesquisas, se você permitir. Os exames realizados no seu sangue servem para detecção de infecções, marcadores da resposta imunológica e genéticos do patógeno e do hospedeiro. O FMT dará a você o resultado dos testes para dengue e malária.

Os riscos relacionados com sua participação são a dor causada pela picada da agulha e um pequeno sangramento que pode acontecer após a coleta de sangue. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado e experiente na coleta de sangue e com a adoção rigorosa dos procedimentos padrão de biossegurança para a coleta de sangue. O único benefício relacionado com a sua participação é o de nos ajudar a conhecer essa doença no seu município e as situações de risco para sua transmissão, além do conhecimento gerado concorrerem para tal desfecho.

A sua participação neste estudo é voluntária, não implicando em qualquer custo para você. A qualquer momento você pode desistir de participar e isso não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a UFAM. Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento.

Solicitamos sua autorização para armazenamento de suas amostras de sangue por dez anos, e se o Sr(a) autorizar ela poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores:

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores.

Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde e doenças infecciosas.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados

Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Nome \_\_\_\_\_  
 Endereço \_\_\_\_\_  
 E-mail \_\_\_\_\_  
 Celular/ telefone \_\_\_\_\_

O Sr(a) receberá uma via deste termo, que será assinado pelo Sr(a) e o pesquisador responsável. Logo abaixo, você tem o nome, telefone e o endereço do pesquisador principal e CEP/UFAM que poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação quando você desejar.

**Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.**

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do Pesquisador responsável

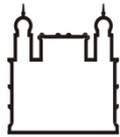
\_\_\_\_\_  
 Assinatura do Participante

**Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani**  
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
 Universidade Federal do Amazonas  
 Rua Alexandre Amorin, 330 - Aparecida  
 Manaus-AM-Brasil CEP 69010-300  
 Fone: +55 92 3305 1181 (Ramal 207)  
 E-mail: pritesh@ufam.edu.br



Assinatura alternativa  
 (Impressão do dedo polegar)

### Anexo 3: Questionário apresentado ao paciente



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Leônidas e Maria Deane

### QUESTIONÁRIO

ID paciente: \_\_\_\_\_

Nome:

\_\_\_\_\_

1. Endereço: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

2. Bairro/ Comunidade: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

3. Há quanto tempo você mora nesta área? \_\_\_\_\_

4. Idade: \_\_\_\_\_ Gênero/Sexo:  Masculino  Feminino

5. Qual seu Grupo Sanguíneo: \_\_\_\_\_ RH:  Positivo  Negativo

6. Como você classifica a cor de sua pele/raça?

Branco  Negro  Pardo  Amarelo  Indígena

Negro x índio  Branco x índio  Branco x negro

7. Qual o seu nível de escolaridade?

Analfabeto  Ensino fundamental completo

Alfabetizado  Ensino médio completo

1ª a 4ª série do ensino fundamental  Superior incompleto

5ª a 8ª série do ensino fundamental  Superior completo

1ª a 3ª série do ensino médio  Não sabe

8. Renda Familiar:  até 1 salário  2 salários  3 salários  4 salários  5 ou mais salários

9. Você trabalha?  Sim  Não

10. Nos últimos 12 meses, qual foi sua principal ocupação? [Entrevistador: com a ajuda do entrevistado, classifique a ocupação no grupo ocupacional mais adequado]

Não tinha. Estavas desempregado (a)

Altos funcionários do governo, dirigentes, gerentes ou altos funcionários de empresa

Profissionais de nível superior

Profissionais das artes

- Profissionais ou técnicos de nível médio
- Trabalhadores de serviços administrativos
- Trabalhadores da prestação de serviços e comerciários
- Trabalhadores de serviços domésticos
- Trabalhadores agropecuários, florestais de caça e pesca
- Trabalhadores manuais (produção de bens e serviços industriais)
- Trabalhadores manuais da construção civil
- Trabalhadores manuais de reparação e manutenção
- Membros das forças armadas, policiais e bombeiros militares
- Ocupações mal especificadas do trabalho informal (ambulante, manobrista, guardador de carro...)
- Autônomo: \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_

11. Você já teve Malária?  Sim  Não **Se sim, quantos episódios?**

\_\_\_\_\_

12. Quando foi a última malária?  <2 meses  2-6 meses  6-12 meses  >1 ano

13. Já apresentou alguns dos sintomas abaixo durante algum episódio da malária?

Pele Amarelada  Urina escura  Não

14. Tempo da doença atual? \_\_\_\_\_

15. Já está em uso de antimalárico?  Sim  Não

Se sim, qual antimalárico? \_\_\_\_\_

16. Você tem: Diabetes, Hipertensão, Lúpus, Câncer ou outra doença?  Sim  Não

\_\_\_\_\_

**Quanto tempo?**

\_\_\_\_\_

17. Está tomando algum outro medicamento?  Sim  Não

**Se sim, qual outro medicamento?**

\_\_\_\_\_

18. Você já teve Dengue?  Sim  Não

\_\_\_\_\_

**Se sim, Quando?**  <2 meses  2-6 meses  6-12 meses  >1 ano

19. Você já tomou vacina contra Febre Amarela?  Sim  Não  Não

sabe

**Informações adicionais:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

---

---

**Análise Laboratorial****20. Malaria**

**Gota espessa:**       Positivo       Negativo      **Fase do**

**plasmódios:** \_\_\_\_\_

**Plasmodium Spp.**     Vivax     Falciparum     Ovale     Malariae

**Parasitemia:** \_\_\_\_\_

**21. Dengue:**  IgM       NS1       PCR      **Dengue tipo:**  1     2     3     4

**22. Outros** \_\_\_\_\_

**23. Leucócitos totais:** \_\_\_\_\_

**24. Eritrócitos:** \_\_\_\_\_

**25. Plaquetas:** \_\_\_\_\_

**26. Hemoglobina:** \_\_\_\_\_

**27. Neutrófilos:** \_\_\_\_\_

**28. Eosinófilos:** \_\_\_\_\_

**29. Basófilos:** \_\_\_\_\_

**30. Temperatura Corporal:** \_\_\_\_\_