

**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Modulação da resposta imunológica por moléculas regulatórias durante a infecção  
pelo *Plasmodium vivax***

por

PEDRO AUGUSTO CARVALHO COSTA

**Belo Horizonte  
2017**

**TESE DCS-CPqRR P.A.C. COSTA 2017**

PEDRO AUGUSTO CARVALHO COSTA

**Modulação da resposta imunológica por moléculas regulatórias durante a infecção  
pelo *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

**Belo Horizonte  
2017**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C837m

2017

Costa, Pedro Augusto Carvalho.

Modulação da resposta imunológica por moléculas regulatórias durante a infecção pelo *Plasmodium vivax* / Pedro Augusto Carvalho Costa. – Belo Horizonte, 2017.

xv, 98 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 84 – 99

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária vivax/genética 2. *Plasmodium vivax*/imunologia 3. Biomarcadores/análise I. Título. II. Antonelli, Lis Ribeiro do Valle (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

**Pedro Augusto Carvalho Costa**

**Modulação da resposta imunológica por moléculas regulatórias durante a infecção  
pelo *Plasmodium vivax***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (CPQRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (CPQRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Flora Satiko Kano (CPQRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Walderez Ornelas Dutra (UFMG) Titular

Prof. Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar (UFBA) Titular

Dra. Fernanda Fortes de Araújo (CPQRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 06/03/2017

Dedico esse trabalho a todos que me apoiaram  
incondicionalmente.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar diariamente novos desafios dos quais eu superei.

Aos meus pais pela credibilidade, confiança, suporte e todo sacrifício que fazem por mim. Quando me via desmotivado era de lá que vinham minhas forças.

A Lis, por todo o ensinamento durante esses seis anos, período que entrei com cabelo e saí careca, mas que saio mais maduro devido a toda sua dedicação comigo, como por exemplo ao sentar ao meu lado e falar: Pedro, leia em voz alta! Ou nas madrugadas que ficamos no *sorting*! Isso são apenas exemplos de sua dedicação com seus alunos que fazem a diferença.

Aos colegas do laboratório pelos ensinamentos, paciência, viagens a áreas endêmicas e discussões, em especial, Fabi, Marta, Suelen, Ana, Luara, Bruno Rocha, Bruno Galvão. Todos dos quais eu pude conviver um pouco desses seis anos, no qual eu pude sorrir e passar raiva! Foi divertido!

O que seria de 99% dos experimentos sem perguntar para Clécia, onde estão os reagentes, ou também, de diferentes maneiras que nos socorreu em Porto Velho e Belo Horizonte!

A toda a plataforma de citometria, com a Tiza, Lorena, Simone e Bruna por toda ajuda nos *sortings* e aquisições no Fortessa e Verse.

A plataforma de citometria da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Dr. Ricardo Gazzinelli, Dr. Mauro Tada e Dr. Dhelio Batista, que permitiram e contribuíram para a realização deste trabalho.

A toda colaboração científica e oportunidades de participar em diferentes projetos da Dra. Andrea Teixeira e do Dr. Olindo Assis.

A todos os grupos nos quais fui bem recebido: o GIPB, IDV, IP e ao BIP.

Em Porto Velho, lugar onde eu pude conhecer um Brasil no qual os brasileiros não conhecem e pude fazer bons amigos que ainda tenho contato e que sem ajuda deles este trabalho não teria sido realizado.

Aos meus amigos de BH, Campo Belo, Ouro Preto, em especial da Dominakana, aos meus amigos do Célia Xavier e de todos os outros laboratórios que eu pude conhecer tantas pessoas que foram importantes em minha vida de alguma maneira. Uma delas, meu HD externo (Marcela)! Todas essas pessoas muito me ajudaram de algum modo.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPq, FAPEMIG, FIOCRUZ, INCTV

## RESUMO

No Brasil a malária ainda é considerada um grande problema de saúde pública e o *Plasmodium vivax* é considerado o principal agente causador, com 88% de incidência. Sabe-se que a resposta contra esse parasito depende da resposta de células T e a ativação dessas envolve, além da sinalização através do receptor de célula T (TCR), a sinalização secundária, como por exemplo, a desencadeada por moléculas reguladoras. A combinação das interações mediadas por esse conjunto de moléculas regula a extensão, qualidade e duração da ativação de células T e, portanto, influencia significativamente o curso das respostas imunes. O objetivo desse trabalho é avaliar o padrão leucocitário, o perfil de expressão de receptores inibidores como morte programada-1 (PD-1), antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), domínios de mucina e imunoglobulina de célula T (TIM-3) e gene 3 de ativação linfocitária (LAG-3) em populações de células T, além da influencia da expressão destes receptores na modulação da produção de citocinas em pacientes infectados pelo *P. vivax*. Para isso, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram coletadas de pacientes infectados pelo *P. vivax* em Porto Velho, RO e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados demonstram que a infecção pelo *P. vivax* desencadeia aumento da expressão de receptores inibitórios em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, principalmente em subpopulações de memória e em células de T reguladoras (Treg). Importante mencionar que ensaios funcionais, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para CTLA-4, PD-1, TIM-3, confirmaram a função moduladora desses receptores levando ao aumento da produção de citocinas por células antígeno-específicas. As células Treg também apresentam capacidade prejudicada durante a malária. Apesar da expressão aumentada de PD-1, não foi estabelecido uma relação direta entre a expressão deste e da perda da modulação pelas Treg. No entanto, a expressão aumentada de PD-1 é coincidente com a diminuição da expressão de Foxp3 e Helios, e com o aumento de Tbet, e consequentemente com o aumento da produção de IFN- $\gamma$ . Nossos dados corroboram nossa hipótese de que o aumento da expressão de receptores inibitórios durante a infecção pelo *P. vivax* prejudica funções efetoras de células T. Novas abordagens precisam ser exploradas para confirmarmos se a expressão de PD-1 por Treg é apenas um biomarcador de perda de função, ou se essa molécula influencia diretamente a função efetora dessa célula durante a malária vivax.

Palavras – chave: Imunoregulação, *Plasmodium vivax*, células T

## ABSTRACT

In Brazil malaria is still considered a major public health problem being the *Plasmodium vivax* the main causative agent, with 88% incidence. T cell activation occurs due a combination of signaling through the T cell receptor (TCR) along with a secondary signal, triggered, for example, by regulatory molecules. The combination of all these interaction determines the nature, quality and duration of T cell activation, affecting the course of the immune responses. The aim of this study is to evaluate the leukocyte compartments and the expression of inhibitory receptors such as programmed death-1 (PD-1), cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4), T cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3) and lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) by T cell populations. Moreover, we assessed the ability of these receptors to modulate the cytokine production by antigen-specific cells from patients infected with *P. vivax*. To do so, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested from *P. vivax*-infected patients from Porto Velho, RO, and analyzed by flow cytometry. The results demonstrate that *P. vivax* infection triggers increased expression of the inhibitory receptors analyzed on both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, particularly on the memory subpopulations and in regulatory T cells (Treg). Importantly, functional assays using monoclonal antibodies specific for CTLA-4, PD-1 and TIM-3 were able to restore the cytokine production upon antigen-specific stimulation, confirming the role of these molecules during malaria. Treg cells also present impaired immunomodulatory ability during malaria. However, despite the upregulation of PD-1 on these cells, we could not directly demonstrate the relation between PD-1 expression and an impairment of regulatory function. Nevertheless, the expression of PD-1 coincides with the decrease in the levels of Foxp3 and Helios and increase in the expression of Tbet and production of IFN- $\gamma$ . Our data support our hypothesis that increased expressions of inhibitory receptors during infection by *P. vivax* affect T cell effector functions. New strategies need to be explored to confirm whether the expression of PD-1 on Treg cells can be considered a dysfunctional biomarker or PD-1 directly influences the regulatory function of Treg cells during *P. vivax* infection.

Keywords: Immunoregulation, *Plasmodium vivax*, T cells



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa representativo das regiões de maiores incidências de óbito por malária.....	17
Figura 2: Distribuição espacial do <i>Plasmodium vivax</i> no mundo.....	18
Figura 3: Ciclo do parasito no hospedeiro.....	22
Figura 4: Ciclo biológico do parasito no vetor.....	23
Figura 5: Resposta imune ao <i>Plasmodium sp.</i> .....	31
Figura 6: Estratégia de <i>gate</i> para avaliação de leucócitos de sangue circulantes.....	53
Figura 7: Viabilidade das populações celulares avaliadas no PBMC.....	54
Figura 8: Frequência das populações celulares no PBMC.....	55
Figura 9: Pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> apresentam diminuição do número absoluto de linfócitos.....	55
Figura 10: Produção de anticorpos anti-PvAMA-1.....	56
Figura 11: Estratégia de <i>gate</i> para caracterização de células T de memória, <i>naive</i> e efetora.....	57
Figura 12: Avaliação da frequência de células de memória, <i>naive</i> e efetora.....	58
Figura 13: Avaliação da frequência de receptores inibitórios em células T CD4 <sup>+</sup> de memória, <i>naive</i> e efetora.....	59
Figura 14: Avaliação da frequência de receptores inibitórios em células T CD8 <sup>+</sup> de memória, <i>naive</i> e efetora.....	60
Figura 15: Bloqueio simultâneo de CTLA-4, PD-1 e TIM-3 aumentam a produção de citocinas durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> .....	61
Figura 16: Estratégia de <i>gate</i> para seleção de células Treg.....	63
Figura 17: Aumento na frequência de células Treg em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> .....	64
Figura 18: Expressão de CTLA-4 por células Treg é induzida em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> .....	64
Figura 19: Expressão de PD-1 por células Treg é induzida em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> .....	65
Figura 20: Expressão simultânea de CTLA-4 e PD-1 por células Treg é induzida em pacientes infectados pelo <i>Plasmodium vivax</i> .....	65
Figura 21: Níveis de bilirrubinas correlacionam com expressão de CTLA-4 em células Treg durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> .....	66
Figura 22: Níveis de bilirrubinas correlacionam com expressão de PD-1 em células Treg durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> .....	67
Figura 23: Níveis de bilirrubinas correlacionam com expressão simultânea de CTLA-4 e PD-1 em células Treg durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> .....	68
Figura 24: Influência de células Treg, Treg PD-1 <sup>+</sup> e Treg PD-1 <sup>-</sup> na produção de IFN- $\gamma$ por pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> .....	70
Figura 25: A influência de células Treg antes e após tratamento com drogas anti-maláricas na proliferação de células T CD4 <sup>+</sup> .....	71
Figura 26: Subpopulações de células Treg apresentam diferentes níveis de Foxp3.....	72
Figura 27: Expressão de Helios, Tbet e a produção de IFN- $\gamma$ estão associadas à expressão de PD-1 em células Treg de pacientes infectados pelo <i>P. vivax</i> .....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Lista de anticorpos utilizados para citometria de fluxo, experimentos funcionais e sua função.....</b>	<b>43</b>
<b>Tabela 2: População do estudo. Dados laboratoriais e clínicos de pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i>.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ALT – alanina aminotransferase (do inglês *alanine aminotransferase*)  
APC – célula apresentadora de antígenos (do inglês *antigen-presenting cell*) APC – alofococianina  
ART – tratamento anti-retroviral (do inglês *antiretroviral treatment*)  
CBA – ensaio de esferas por citometria (do inglês *cytokine bead array*)  
CD – grupos de diferenciação (do inglês *cluster of differentiation*)  
CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono (do inglês *carbon dioxide*)  
CTLA-4 – antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)  
DNA – ácido desoxirribonucléico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)  
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)  
FITC – isotiocianato de fluoresceína (do inglês *fluorescein isothiocyanate*)  
G6PD – glicose-6-fosfato desidrogenase (do inglês *glucose-6-phosphate dehydrogenase*)  
GPI – glicosilfosfatidilinositol (do inglês *glycosylphosphatidylinositol*)  
HbS – hemoglobina S (do inglês *hemoglobin S*)  
HCV – vírus da hepatite C (do inglês *hepatitis C virus*)  
HIV – vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*)  
ICAM 1 – molécula de adesão intercelular 1 (do inglês *Intercellular Adhesion Molecule 1*)  
ICOS – co-estimulador induzível de células T (do inglês *inducible T-cell costimulatory*)  
ICOS-L – ligante do co-estimulador induzível de células T (do inglês *inducible T-cell costimulatory ligand*)  
Ig – imunoglobulina (do inglês *immunoglobulin*)  
IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$   
IL – interleucina (do inglês *interleukin*)  
IRIS – síndrome inflamatória de imunorreconstituição (do inglês *immune reconstitution inflammatory syndrome*)  
IR – índice de reatividade (do inglês *reactivity index*)  
iTreg – T reguladora induzida (do inglês *induced T regulatory*)  
LAG-3 – gene 3 de ativação linfocitária (do inglês *lymphocyte-activation gene 3*)  
MHC – complexo de histocompatibilidade principal (do inglês *major histocompatibility complex*)  
NK – matadoras naturais (do inglês *natural killer*)  
NKT – T matadoras naturais (do inglês *T natural killer*)  
NO – óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)  
nTreg – T reguladora natural (do inglês *natural T regulatory*)  
PBMC – células mononucleares de sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cells*)  
PBS – tampão salina fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)  
PD-1 – morte programada-1 (do inglês *Programmed death-1*)  
PD-L1 – morte programada-ligante 1 (*Programmed death – ligand 1*)  
PD-L2 – morte programada-ligante 2 (*Programmed death – ligand2*)  
pH – potencial de hidrogênio (do inglês *potential of hydrogen*)

**PE** – Ficoeritrina (do inglês *phycoerythrin*)  
**PI3K** – fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês *phosphatidylinositol 3-kinase*)  
***P. vivax*** – *Plasmodium vivax*  
**ROS** – espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)  
**SOD-1** – Superóxido dismutase 1 (do inglês *Superoxide dismutase 1*)  
**TCR** – receptor de célula T (do inglês *T cell receptor*)  
**Tfh** – T folicular auxiliar (do inglês *T follicular helper*)  
**Th** – T auxiliar (do inglês *T helper*)  
**TIM-3** – domínios de mucina e imunoglobulina de célula T (do inglês *T cell immunoglobulin domain, mucin domain-3*)  
**TLR** – receptores do tipo *Toll* (do inglês *Toll like receptors*)  
**Treg** – T reguladora (do inglês *T regulatory*)  
**Tr1** – células T reguladoras 1 (do inglês *T regulatory cells 1*)  
**T  $\gamma\delta$**  – T gamma delta  
**VCAM 1** – Molécula de adesão vascular celular 1 (do inglês *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*)  
**V $\delta$ <sup>+</sup>** – domínio variável dois da cadeia delta do receptor de célula T (do inglês *variable domain two delta chain T cell receptor*)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
1.1	Malária.....	17
1.2	Ciclo biológico do Parasito.....	21
1.3	Resposta imune na malária.....	23
1.3.1	Resposta imune nos momentos iniciais do ciclo parasitário.....	24
1.3.2	Resposta imune na fase tardia do ciclo parasitário.....	27
1.4	Moléculas reguladoras.....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
2.1	Objetivo geral.....	37
2.2	Objetivos específicos.....	37
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1	Pacientes - critérios de inclusão.....	40
3.2	Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	40
3.3	Obtenção de PBMC.....	41
3.4	Caracterização fenotípica de células T.....	41
3.5	Avaliação dos níveis dos anticorpos anti-AMA-1 por ELISA.....	43
3.6	Obtenção de reticulócitos.....	44
3.6.1	Obtenção de reticulócitos infectados.....	44
3.6.2	Obtenção de reticulócitos saudáveis.....	45
3.7	Avaliação da influência de receptores inibitórios na produção de citocinas.....	46
3.8	Ensaio de proliferação celular por CFSE.....	46
3.9	Purificação das subpopulações de Treg e preparo de culturas para avaliação da função de células Treg na malária.....	46
3.10	Avaliação da produção de citocinas intracelulares e proliferação celular.....	47
3.11	Quantificação dos níveis de citocinas por CBA.....	48
3.12	Análise estatística.....	49

3.13 Avaliação por comitês de ética.....	49
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1 Caracterização da população de estudo.....	51
4.2 Caracterização da população leucocitária.....	53
4.2.1 Avaliação da viabilidade e frequência das populações leucocitárias.....	54
4.3 Produção de anticorpos contra antígeno do <i>Plasmodium vivax</i> (Pv-AMA-1).....	55
4.4 Alterações do compartimento linfocitário durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> .....	56
4.4.1 Expressão de receptores inibitórios é aumentada em células de memória durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> em relação aos demais subtipos avaliados.....	58
4.5 Influência de receptores inibidores na produção de citocinas.....	60
4.6 Estratégia de gate para avaliação de células Treg.....	62
4.7 Influência do <i>P. vivax</i> na frequência de células Treg circulantes e na indução de receptores inibitórios.....	63
4.8 Correlação das subpopulações de células Treg e receptores inibidores com parâmetros bioquímicos.....	66
4.9 Co-cultura de PBMC de pacientes infectados com células Treg e suas subpopulações.....	68
4.10 Co-cultura de Treg de pacientes durante a infecção pelo <i>P. vivax</i> ou após o tratamento e células efectoras de pacientes após a cura.....	71
4.11 Avaliação da expressão dos níveis de Foxp3.....	71
4.12 Caracterização fenotípica de fatores de transcrição em células Treg.....	72
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>

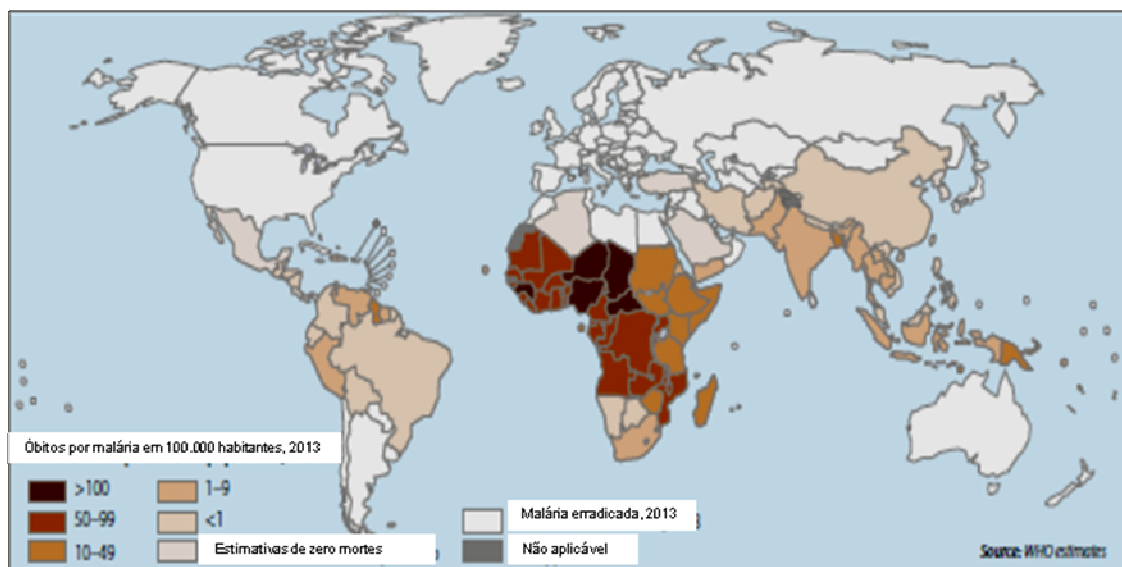
<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>
<b>Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>101</b>
<b>Anexo 2 - Artigo científico contendo parte dos resultados do projeto de doutorado.....</b>	<b>102</b>

## **1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**



### 1.1 Malária

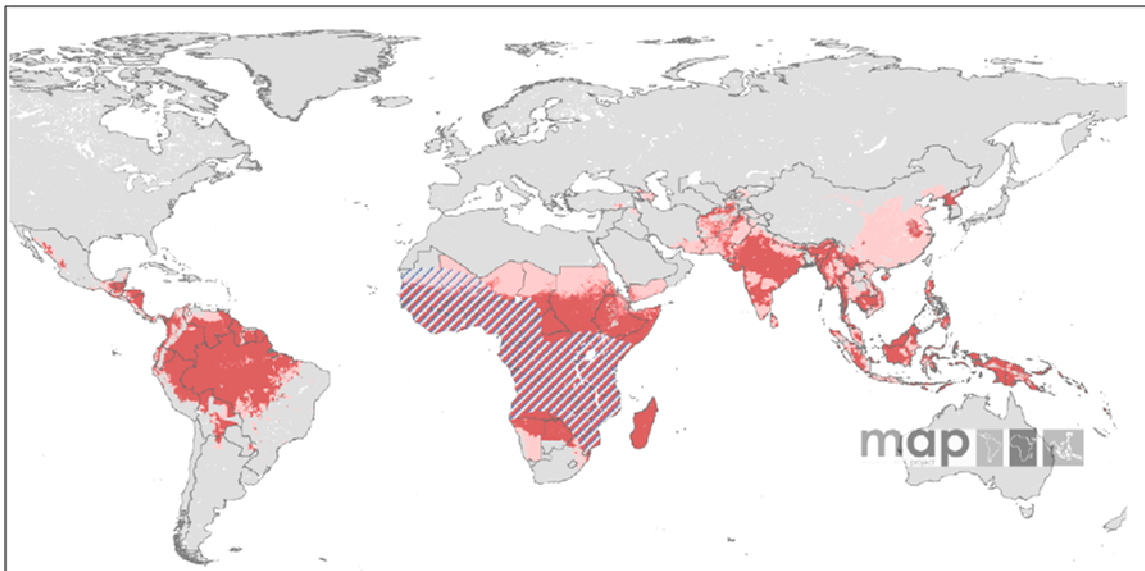
A malária ainda é um grande problema de saúde pública, devido aos altos fundos investidos a malária causada pelo *P. falciparum* não é considerada negligenciada, diferente da malária vivax, apesar dos investimentos ainda é considerada uma das maiores endemias do mundo e grande obstáculo ao desenvolvimento econômico de comunidades e nações. No ano de 2015 foram notificados 212 milhões de casos de malária no mundo e 429 mil óbitos, sendo que aproximadamente 70% dos óbitos relatados são de crianças menores que cinco anos. A maior letalidade da malária ocorre na região da África Subsaariana com 90% dos óbitos relatados, seguida pela região asiática com 9% e por último a região das Américas com apenas 1% (Who, 2016) (Figura 1).



**Figura 1: Mapa representativo das regiões de maiores incidências de óbito por malária.** As regiões mais escuras representam áreas de maior incidência de casos ao passo que as áreas mais claras indicam regiões com menor número de óbitos (Who, 2014).

Atualmente são conhecidas cinco espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* capazes de infectar células humanas, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* (Cox-Singh *et al.*, 2008). A infecção por *P. falciparum*, predominante no continente Africano, é considerada a mais letal. A infecção por *P. vivax*, embora considerada menos grave, encontra-se mais difundida mundialmente: a África com o equivalente a 1 milhão de casos; a Ásia (somando as regiões do Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental) com sete milhões de casos e

as Américas com 500 mil casos, demonstrando assim a ampla distribuição geográfica do *P. vivax* (Who, 2016). Apesar disso, apenas 4% da população mundial foi diagnosticada com malária vivax no ano de 2015, provavelmente pelo fato da grande quantidade de indivíduos não possuírem o receptor *Duffy*, um ligante essencial para entrada do *P. vivax* em reticulócitos (Ntumngia *et al.*, 2016). Foi demonstrado que aproximadamente 95% da população africana, em 31 países ao sul do Saara, não expressam esse receptor (Miller *et al.*, 1976; Guerra *et al.*, 2010). Essa poderia ser uma das explicações para a alta incidência de *P. falciparum* e a baixa incidência de *P. vivax* no mundo, visto que a maioria dos casos de malária ocorre na África. Por outro lado, as infecções por *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* são menos frequentes (Who, 2016).



**Figura 2: Distribuição espacial do *Plasmodium vivax* no mundo.** As áreas em rosa escuro apresentam maior endemicidade e rosa claro menor endemicidade para malária vivax. A região hachurada representa região com alta proporção de pessoas *Duffy*-negativa (Guerra *et al.*, 2010).

No Brasil, segundo dados de 2015, a população contabilizava aproximadamente 207 milhões de habitantes, dentre esses, 15% se encontram em regiões endêmicas, se dividindo em dois grupos de transmissão, alta e baixa. 6,47 milhões, ou seja, 3% residiam em áreas de alta transmissão e 26,36 milhões, ou seja, 12% habitavam áreas de baixa transmissão. No Brasil, a principal espécie transmitida é o *P. vivax* com 88% dos casos, já o *P. falciparum* é responsável por 11% dos casos de malária. Foram relatados 143.162 casos da doença no ano de 2015 e 37 óbitos. Seus principais vetores de transmissão são *Anopheles darlingi*, *Anopheles albicans* e *Anopheles Aquasalis* (Who, 2016). Como mostrado no mapa da Figura 2, a maioria dos casos de malária ocorrem na região amazônica brasileira. Desde o início do

nosso estudo na área endêmica no ano de 2010, foi observada queda no número de casos de malária na região. Em 2010, foram notificados 23.257 casos de malária em Porto Velho-RO, em contrapartida, no ano de 2016 foram notificados 1.849 casos até setembro. A redução significativa do número de casos provavelmente se deve à intensificação de melhorias na distribuição de drogas anti-maláricas e à diminuição das obras em usinas hidrelétricas. O tratamento pode ser longo ou curto, o primeiro tratamento são quatro comprimidos de cloroquina (150mg) no primeiro dia, três comprimidos de cloroquina seguidos de três comprimidos de cloroquina no terceiro dia. A cloroquina é associada desde o primeiro dia com um comprimido de primaquina (15mg) por quatorze dias. O tratamento curto segue a mesma recomendação da cloroquina, no entanto devem ser tomados duas primaquinas por sete dias (Saúde, 2016).

No Brasil, a avaliação da gota espessa é adotada como método oficial para o diagnóstico da malária. Mesmo após o desenvolvimento de outras técnicas, esse exame continua sendo o de escolha em função de ser um método simples, eficaz, de baixo custo e de fácil realização. Esse método se baseia na visualização do parasito através de microscopia óptica, por profissionais experientes, após coloração com corante vital (azul de metileno e Giemsa), permitindo a diferenciação específica dos parasitos a partir da análise morfológica e pelos estágios de desenvolvimento do parasito encontrados no sangue periférico (Ms, 2006). Este método é eficiente em áreas endêmicas, no entanto em regiões não endêmicas, onde médicos e o laboratoristas nem sempre estão atentos para a associação entre os sintomas e a suspeita da infecção pelo *Plasmodium sp.*.

Durante a fase sintomática inicial da malária, os pacientes sentem mal-estar generalizado caracterizado por cefaleia, cansaço, artralgia e mialgia. Geralmente tais sintomas precedem a febre característica da malária. O acesso malárico se inicia com calafrios que duram de 15 minutos a uma hora, seguidos por fase febril, com temperatura corpórea podendo atingir 41°C ou mais. Passado um período de duas a seis horas, a febre diminui e o paciente apresenta sudorese profusa e pode apresentar fraqueza intensa (Ms, 2006).

Após a fase inicial, a febre assume caráter intermitente, dependente do tempo da duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* e 72 horas para *P. malariae*. Entretanto, a constatação dessa regularidade é pouco comum nos dias atuais. O quadro clínico, dependendo da espécie infectante, pode evoluir para formas clínicas de malária grave, destacando-se forte cefaleia, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões (na malária cerebral), edema pulmonar agudo, insuficiência renal aguda, hipoglicemia, disfunção hepática, hemoglobinúria e choque, que podem levar a óbito.

Em exames hematológicos e sorológicos é comum observar quadro de leucopenia, linfopenia, plaquetopenia e danos hepáticos caracterizados pela liberação de transaminases hepáticas no sangue (Ms, 2006). No baço, há acúmulo de células vermelhas infectadas, desse modo ocorre uma ativação de macrófagos e monócitos, levando a consequente produção de citocinas, que serão responsáveis pela febre. Durante a malária há aumento da eritropoiese, para que haja repopulação de células vermelhas, entretanto, há adesão de eritrócitos em tecidos e o rompimento de células vermelhas infectadas, causando anemia e consequentemente aumento dos níveis sorológicos de bilirrubinas. Com o sequestro de parasitos há ativação de células endoteliais vasculares que leva ao aumento da expressão de moléculas de adesão e aderência de eritrócitos infectados. A inflamação pode levar ao aumento da permeabilidade vascular e consequente infiltração de leucócitos para o parênquima. Esse extravasamento celular é um dos responsáveis pela malária cerebral, placentar, diminuição da função renal e síndrome do estresse respiratório (Schofield e Grau, 2005; Gazzinelli *et al.*, 2014).

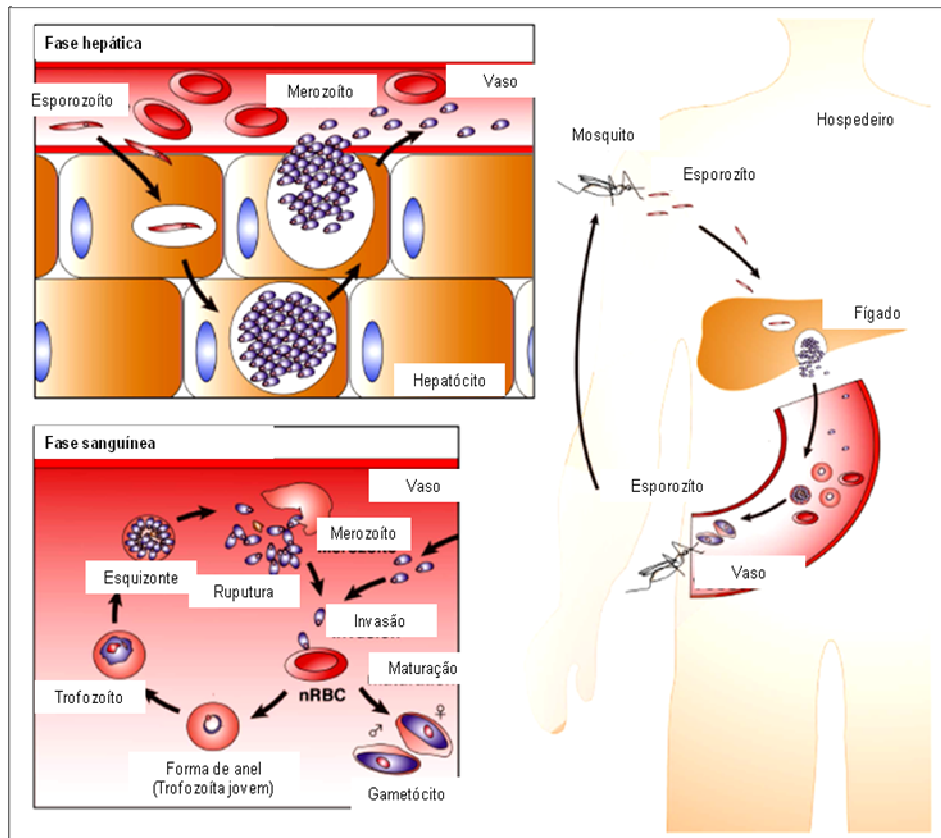
A malária é uma doença evitável e tratável desde que medidas profiláticas recomendadas sejam implementadas: assistência ideal ao paciente e sua família; exame de gota espessa; visitas domiciliares ou comparecimento do paciente à unidade de saúde a fim de assegurar a cura; tratamento imediato de casos confirmados; orientação da população quanto à doença; uso de repelentes; distribuição de cortinados; uso de telas em portas e janelas; investigação entomológica e busca ativa de focos endêmicos para controle vetorial; utilização de nebulizações espaciais de piretróides e borrifações intradomiciliares; além de atividades como saneamento ambiental que poderão ser empregadas, caso haja indicação visando a eliminação de criadouros de anofelinos (drenagem, retificação de cursos d'água, pequenos aterros, etc) (Ms, 2006).

Para o controle da malária vale ressaltar que o *P. falciparum* apresenta aproximadamente 100 mil anos, assim como a espécie humana, o que pode sugerir uma coevolução parasito/hospedeiro. O início da expansão da população humana recente poderia ter fornecido o elemento-chave para o crescimento das populações de parasitos (Mu *et al.*, 2002). Devido à alta pressão seletiva imposta pela expressiva mortalidade de crianças e mulheres grávidas infectadas pelo *P. falciparum*, a malária teve grande impacto no genoma humano. Um dos melhores exemplos dessa pressão evolutiva é o polimorfismo da hemoglobina S (HbS). No estado homozigoto, HbS resulta em anemia falciforme que apresenta alta morbidade e mortalidade para os indivíduos. No entanto, o polimorfismo HbS é mantido a uma frequência de 10% em indivíduos da África, pois no estado heterozigoto a HbS confere proteção contra a malária grave (Kwiatkowski, 2005). Outra pressão seletiva é a

deficiência da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), que atua na defesa contra o estresse oxidativo dentro do eritrócito. A deficiência da G6PD mantém a glutatona na forma reduzida e protege contra a malária grave. A caracterização da G6PD é relevante para o tratamento contra o *P. vivax*, pois o uso de anti-maláricos, como a primaquina pode induzir anemia hemolítica nos indivíduos portadores de sua deficiência (Kwiatkowski, 2005).

## 1.2 Ciclo biológico do Parasito

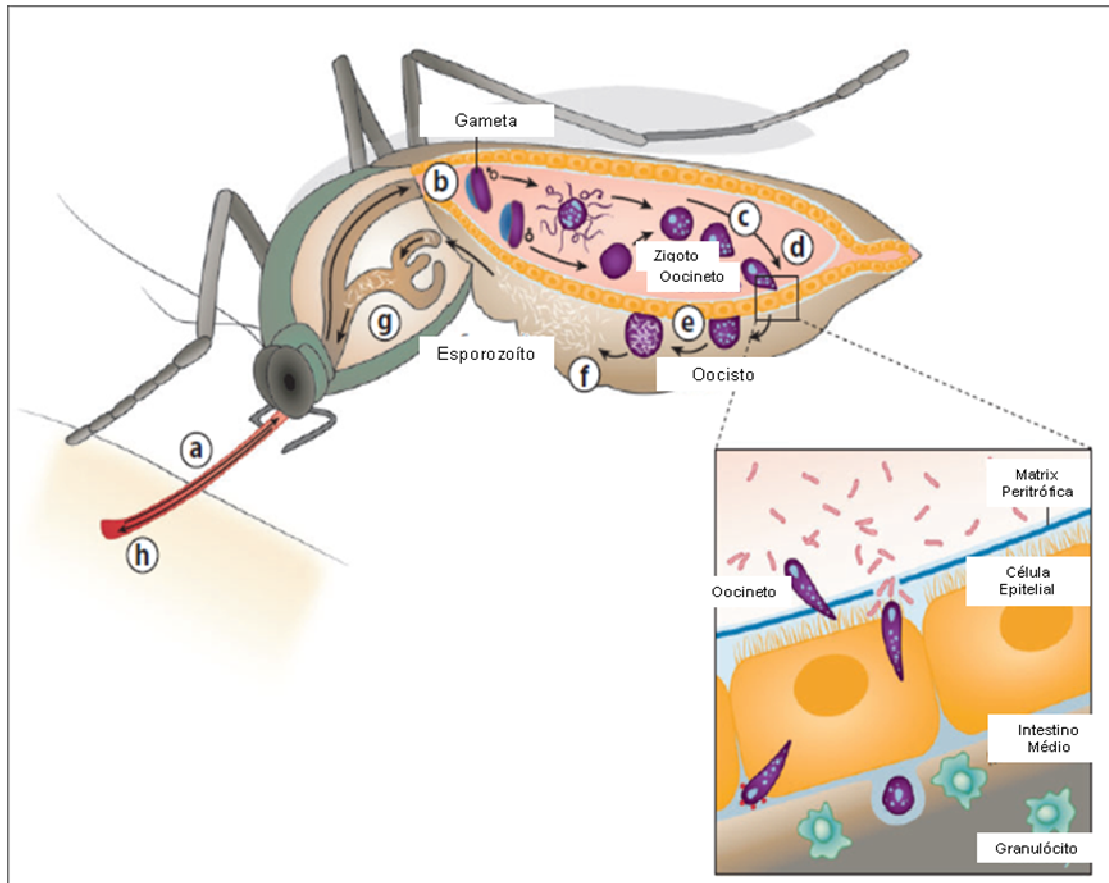
O ciclo se inicia durante o repasto sanguíneo do vetor *Anopheles sp.*, onde formas esporozoítas do parasito do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao filo Apicomplexa, são inoculadas na epiderme e migram para a corrente sanguínea ou para os vasos linfáticos (Amino *et al.*, 2006). Os parasitos que entram no fígado invadem hepatócitos e iniciam o ciclo exo-eritrocítico. Normalmente, 30 a 45 minutos após a picada, poucos hepatócitos são invadidos pelas formas esporozoítas. Em média cada hepatócito infectado desenvolve aproximadamente 30.000 formas merozoítas. Na malária causada pelo *P. vivax* há a formação de formas hipnozoítas que se encontram dormentes no fígado do paciente de maneira que o sistema imune não os reconhece e são responsáveis pelas recaídas que podem acontecer anos após a infecção (Mueller *et al.*, 2009). Ao final de cinco a seis dias, as formas merozoítas são liberadas através do rompimento do hepatócito causado pelo processo de esquizogonia. Os merozoítas liberados no sangue podem invadir células vermelhas usando várias proteínas de superfície e iniciam o ciclo eritrocítico (Good e Doolan, 2010). Após invadirem novos eritrócitos, os merozoítas podem seguir dois caminhos, se tornarem gametócitos masculinos ou femininos para que haja a continuação do ciclo, ou trofozoíto jovem, em forma de anel, e que por sua vez vai se diferenciar em trofozoíto aumentando seu citoplasma, e consequentemente em esquizonte, se acumula no eritrócito formando novos merozoítas (Figura 3).



**Figura 3: Ciclo do parasito no hospedeiro.** Após infecção pelo anofelino, esporozoítos migram e infectam células hepáticas, se diferenciam em merozoítos e migram para o sangue, fase sanguínea, para infectar eritrócitos e se diferenciarem na forma sexuada ou continuar o ciclo de invasão a novos eritrócitos por novos merozoítos (Inoue *et al.*, 2013).

A fase sanguínea ou eritrocítica possui dois estágios, o estágio sexuado e o estágio assexuado. No estágio sexuado, são formados gametócitos masculinos e femininos. Os gametócitos maduros de *P. falciparum* aparecem, na corrente sanguínea, geralmente entre o sétimo e o décimo quinto dias após a infecção, ou seja, durante a fase sintomática da doença e duram em média três a seis dias na corrente sanguínea. Diferente dos gametócitos de *P. falciparum*, os de *P. vivax* aparecem na circulação antes da fase sintomática, o que facilita sua transmissão para novos anofelinos, pois não coincide com a fase do tratamento por anti-maláricos (Bousema e Drakeley, 2011). Além disso, o processo de esporogonia do *P. vivax* é de até um dia e meio mais curto quando comparado ao *P. falciparum*, o que aumenta as chances da produção dos esporozoítos de *P. vivax* (Bousema e Drakeley, 2011). Durante o repasto sanguíneo, o vetor não infectado ingere gametócitos masculinos e femininos que vão se encontrar em aproximadamente uma hora após o repasto para que ocorra a fertilização. Para que ocorra a fecundação é necessária a exflagelação do gametócito masculino. Cada zigoto se transforma em um oocineto móvel que atravessa a parede do intestino médio e invade o epitélio do vetor. Nessa fase assexuada, cada oocineto se diferencia em um oocisto e

se divide assexuadamente para produzir milhares de esporozoítas que são liberados na hemocele e posteriormente migram para as glândulas salivares. Desse modo, os esporozoítos estão prontos para serem inoculadas em um novo hospedeiro. O tempo entre a alimentação dos gametócitos e a transmissão de esporozoítas leva em média quatorze dias (Pollitt *et al.*, 2010) (Figura 4).



**Figura 4: Ciclo biológico do parasito no vetor.** Após infecção do anofelino com os gametas na fase sexuada ocorre a reprodução sexuada no intestino. O parasito se diferencia, atravessa a barreira epitelial do anofelino e ocorre a migração de esporozoítos pela hemocele até a probóscide do mosquito (Crompton *et al.*, 2014).

### 1.3 Resposta imune na malária

A virulência do parasito, intensidade de transmissão, fatores econômicos e sociais e variações genéticas influenciam a suscetibilidade do hospedeiro e conseqüentemente o prognóstico da doença. Indivíduos que nunca foram expostos ao protozoário geralmente desenvolvem fortes sintomas após a exposição ao *Plasmodium spp.* Estimativas apontam que em áreas de alta endemicidade um terço das mortes de crianças seja por malária, pois essas são mais susceptíveis à infecção (Snow *et al.*, 2001). Entretanto, após a exposição contínua ao

parasito, crianças acima de cinco anos e adultos desenvolvem certa proteção contra sintomas graves e morte por malária. Em regiões onde a malária é altamente endêmica, a maioria das infecções causada pelo *Plasmodium spp.* é silenciosa, sugerindo que indivíduos residentes nessas regiões possuem a habilidade de desenvolver resposta imune efetora durante a infecção, controlando o parasito de maneira não estéril. Essa adaptação que leva à ativação controlada do sistema imune, por outro lado, pode representar um mecanismo de escape do parasito, que permanece no hospedeiro e favorece sua transmissão a outros vetores que mantêm o seu ciclo evolutivo (Alves *et al.*, 2005). Quando não existe tal coadaptação, os indivíduos infectados apresentam manifestações clínicas que, em sua maioria, são debilitantes e podem se tornar graves. A intensidade dessas manifestações depende da idade do indivíduo e de exposições prévias ao parasito (Baird *et al.*, 1998; Rtavanis-Tsakonas *et al.*, 2003). Além disso, a imunidade à malária é caracterizada por ser espécie e estágio-específica.

### 1.3.1 Resposta imune nos momentos iniciais do ciclo parasitário

Atualmente muitos estudos têm se concentrado na resposta imune inata ao *Plasmodium spp.* já que o desenvolvimento desta induz os sintomas da doença, auxilia no controle do parasito e influencia diretamente a resposta imune adaptativa do hospedeiro. Durante a fase hepática, a conexão com a resposta imune inata é feita pela produção de IFN- $\gamma$  (Interferon-gama), que é essencial na eliminação do parasito e ocorre principalmente por células NKT (*natural killer lymphocyte T*) e NK (*natural killer*) na infecção por esporozítos de *P. yoelli* (Miller *et al.*, 2014). Durante a resposta contra hemácias infectadas pelo *P. falciparum in vitro*, há maior produção de IFN- $\gamma$  por células NK do que por células T, porém as células T possuem papel primordial na secreção de IL-2 (Interleucina-2), que é essencial na ativação de NK nos momentos iniciais da infecção (Horowitz *et al.*, 2010). É importante salientar o papel de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na produção de citocinas, especialmente das células de memória que produzem concomitantemente IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral-alfa). Além disso, tais células induzem a produção de anticorpos após duas semanas da imunização endovenosa com esporozoítos atenuados de *P. falciparum* em humanos (Seder *et al.*, 2013). Células T CD8<sup>+</sup> possuem papel primordial na eliminação de merozoítos dentro de hepatócitos (Cockburn *et al.*, 2013). Durante a fase hepática, a persistência do antígeno de esporozoítos observada em órgãos linfoides periféricos é importante para a apresentação antigênica por células apresentadoras de antígenos (APC). A presença do antígeno no organismo por um período prolongado aumenta a magnitude da apresentação para células T



CD8<sup>+</sup> e conseqüentemente sua capacidade de resposta, induzindo aumento na produção de citocinas (Cockburn *et al.*, 2010).

As células NK juntamente com as células T CD8<sup>+</sup> são importantes para a produção de IFN- $\gamma$  nos momentos iniciais da infecção (Hansen *et al.*, 2007) e essa citocina pode atuar diretamente no desenvolvimento da malária cerebral causada por *P. berghei* ANKA (Hafalla *et al.*, 2012). Após a infecção por *P. falciparum*, as células T  $\gamma\delta$ , não tem sua frequência alterada (Hviid *et al.*, 1996). Contudo, foi demonstrado que uma subpopulação de células T  $\gamma\delta$ , as V $\delta$ 2<sup>+</sup>, diminuem sua funcionalidade e apresentam frequência reduzida após repetidas infecções por *P. falciparum* (Jagannathan, Kim, *et al.*, 2014).

Os merozoítos são responsáveis pela fase sanguínea da malária e pela ativação de receptores do tipo *Toll* (TLR - *Toll like receptors*), receptores que reconhecem padrões moleculares, denominados PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), que possuem um papel fundamental no início da resposta imune inata. Algumas moléculas de GPI (glicosilfosfatidilinositol), encontradas no *P. falciparum* contribuem diretamente para a patogênese da malária devido à sua capacidade de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Krishnegowda *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a sinalização de GPI é mediada pelos heterodímeros TLR-1 e TLR-2 ou TLR-2 e TLR-6, além da ativação pelo homodímero TLR-4 em menor intensidade (Gazzinelli *et al.*, 2014). Essa produção de citocinas mediada por TLR é dependente de MyD88 (Krishnegowda *et al.*, 2005). Essa ativação leva ao aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e NO (*nitric oxide*) por macrófagos estimulados por âncoras de GPI (Zhu *et al.*, 2005). Além disso, GPI induz aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM 1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), VCAM 1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) e E-selectina (Schofield *et al.*, 1996). Durante a fase eritrocítica da infecção, o parasito realiza a digestão da hemoglobina, o que leva à formação de um resíduo extremamente tóxico, o heme. Para evitar dano oxidativo devido a esses resíduos, o parasito desenvolveu um mecanismo que converte heme em cristal insolúvel, a hemozoína (Francis *et al.*, 1997). A hemozoína envolvida pelo DNA do parasito pode ser reconhecida pelo TLR-9, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (Parroche *et al.*, 2007). O bloqueio de TLR-9 leva à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (Franklin, Ishizaka, *et al.*, 2011). Exercendo um papel semelhante, os imunocomplexos de pacientes com malária se ligam aos receptores Fc e são internalizados, secretando DNA do parasito no fagolisossomo e subseqüentemente no citosol dos monócitos, sendo responsáveis pela ativação de TLR-9 (Hirako *et al.*, 2015).

Dado a importância clínica e econômica da malária vivax, esforços têm sido feitos para a identificação de novos biomarcadores para prognóstico, tais como, altos níveis de ácidos nucleicos circulantes no plasma de pacientes infectados pelo *P. vivax* (Franklin, Vitorino, *et al.*, 2011). Também no plasma de pacientes, foi caracterizado o aumento de micropartículas ativadas durante a infecção pelo *P. vivax*, cujos níveis correlacionam diretamente com o estado febril dos pacientes durante a fase aguda (Campos *et al.*, 2010). Outro biomarcador estudado é a SOD-1 (Superóxido Dismutase 1), uma enzima que cliva ROS (*Reactive Oxygen Species*) em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que será clivado pela catalase. A SOD-1 é encontrada em níveis elevados no plasma de pacientes com quadro mais grave de malária vivax (Andrade *et al.*, 2010).

Nosso grupo demonstrou que monócitos e neutrófilos encontram-se ativados durante a malária e que monócitos se mostraram a principal fonte das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , em resposta ao estímulo por agonistas de TLRs durante a fase aguda da doença. Os neutrófilos por sua vez, apresentaram baixa produção de citocinas apesar de demonstrarem aumento da atividade fagocítica e redução da capacidade de migração, *in vitro*, em direção a gradiente de quimiocinas (Leoratti *et al.*, 2012). Nosso grupo observou também que a subpopulação de monócitos, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, apresenta maior atividade fagocítica, produção de ROS total e mitocondrial, produção de TNF- $\alpha$ , expressão de moléculas de ativação como VCAM-1 e ICAM-1 em relação às subpopulações celulares CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>. Desse modo foi demonstrado importante papel para a população de monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> durante a malária vivax (Antonelli *et al.*, 2014). As citocinas produzidas e secretadas na fase aguda da infecção determinam o perfil pró-inflamatório da malária (Mccall *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrada a importância de monócitos inflamatórios, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, em pacientes infectados pelo *P. falciparum*. Esse trabalho mostra que monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> fagocitam mais eficientemente eritrócitos infectados pelo *P. falciparum* quando opsonizados por IgG na presença de complemento e evidencia a importância de CD16 na fagocitose (Zhou *et al.*, 2015). Um mecanismo de escape do parasito à fagocitose é a expressão de CD47. Foi observada menor parasitemia em camundongos deficiente para CD47. Tal observação pode ser explicada pelo ensaio comparativo de fagocitose entre células F4/80<sup>+</sup> de animais C57BL/6 deficientes em CD47, sendo que células de animais C57BL/6 apresentaram menor fagocitose em relação às células dos animais deficientes (Banerjee *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Resposta imune na fase tardia do ciclo parasitário

A resposta imune celular à forma sanguínea do parasito *Plasmodium spp.* se desenvolve de maneira incompleta e vagarosa (Gupta *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 2013). Até o momento existem poucos estudos caracterizando a existência de populações de células T antígeno-específicas em pacientes residentes em áreas endêmicas após o tratamento da infecção pelo *P. vivax* (Bueno *et al.*, 2010; Zeeshan *et al.*, 2013; Changrob *et al.*, 2015). Isso se deve ao fato da existência de poucos antígenos proteicos bem definidos necessários para a análise de respostas adaptativas antígeno-específicas e principalmente pela falta de um método de cultivo eficaz do *P. vivax*.

Considerando a resposta imune celular, tanto células T CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup> são ativadas durante a fase sanguínea da infecção por *P. chabaudi* (Suss *et al.*, 1988). Além disso, a realocação de células T ativadas e a apoptose mediada por Fas (CD95) são alguns mecanismos atribuídos às funções prejudicadas da célula T e linfopenia observada durante a malária falciparum (Elhassan *et al.*, 1994; Kern *et al.*, 2000). Corroborando essa hipótese, foi demonstrado que uma significativa proporção de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas morre ou perde sua função por via dependente de IFN- $\gamma$  após infecção pelo *P. berghei* (Xu *et al.*, 2002). Em contrapartida as células T CD4<sup>+</sup> que permanecem no hospedeiro são de grande valia. Walther e colaboradores descreveram que IL-10 e IFN- $\gamma$  são produzidos por células T CD4<sup>+</sup> de crianças de área endêmica durante a infecção por *P. falciparum* (Walther *et al.*, 2009). Corroborando este dado, foi descrita a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 por células T CD4<sup>+</sup> estimuladas por hemácias parasitadas em crianças infectadas pelo *P. falciparum*. Nesse trabalho, foi demonstrada a importância da população de células de memória efetora CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> produtora de citocinas (Jagannathan, Eccles-James, *et al.*, 2014). Foi descrito também que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> apresentaram produção significativa de IL-10 sete dias após o tratamento para malária causada pelo *P. falciparum*. Além disso, células T CD4<sup>+</sup> de crianças infectadas pelo *P. falciparum*, sete dias após o tratamento, são capazes de produzirem simultaneamente IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em resposta ao estímulo *in vitro* por com hemácias parasitadas (Portugal *et al.*, 2014). Durante infecção pelo *P. vivax*, foi avaliada presença de IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-10, além de níveis ínfimos de IL-4 no sobrenadante de cultura quando estimulada por reticulócitos infectados, indicando uma resposta Th1. Além disso, foi demonstrada a importância do perfil Th1 em animais *inducible T-cell costimulatory* (ICOS) deficiente, que apresentaram elevada produção de IFN- $\gamma$  e expressão de Tbet em

células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, o que sugere a importância de ICOS na regulação de Th1 durante a infecção pelo *P. chabaudi* (Wikenheiser *et al.*, 2015).

Outra subpopulação celular de células T são as células Tfh (*T follicular helper*) que são responsáveis pela ativação de células B no centro germinativo induzindo-as a se diferenciar em B de memória e plasmócitos produtores de anticorpos (Crotty, 2011). Apesar da expressão de ICOS não ser essencial nos momentos iniciais para diferenciação de Tfh ou não influenciar na produção de anticorpos, esta molécula é necessária para manutenção da resposta de anticorpos de alta afinidade na infecção pelo *P. chabaudi* (Wikenheiser *et al.*, 2015). Além disso, em pacientes infectados pelo *P. falciparum* foi observado citocinas do perfil Th1, no entanto suas células Tfh, que apresentaram maior capacidade de ativação de células B foram células que não expressam CXCR3. Apesar de essas células ativarem linfócitos B, não foi observada correlação com a produção de anticorpos (Obeng-Adjei *et al.*, 2015). Essa subpopulação de célula T é fundamental no desenvolvimento da resposta imune humoral, na ativação de células B (Crotty, 2011) para consequente produção de anticorpos (Wipasa *et al.*, 2010) e nos mecanismos capazes de eliminar o parasito como a fagocitose mediada por anticorpos, que na maioria das vezes apenas controla a parasitemia, não sendo capaz de eliminar de maneira estéril o parasito (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2015). Os linfócitos B foram caracterizados na malária causada pelo *P. falciparum* podendo ser subdivididos em células B de memória, que são as ativadas, clássicas ou atípicas (apresentam perfil disfuncional), células B *naive*, células B imaturas e plasmócitos (Weiss *et al.*, 2009).

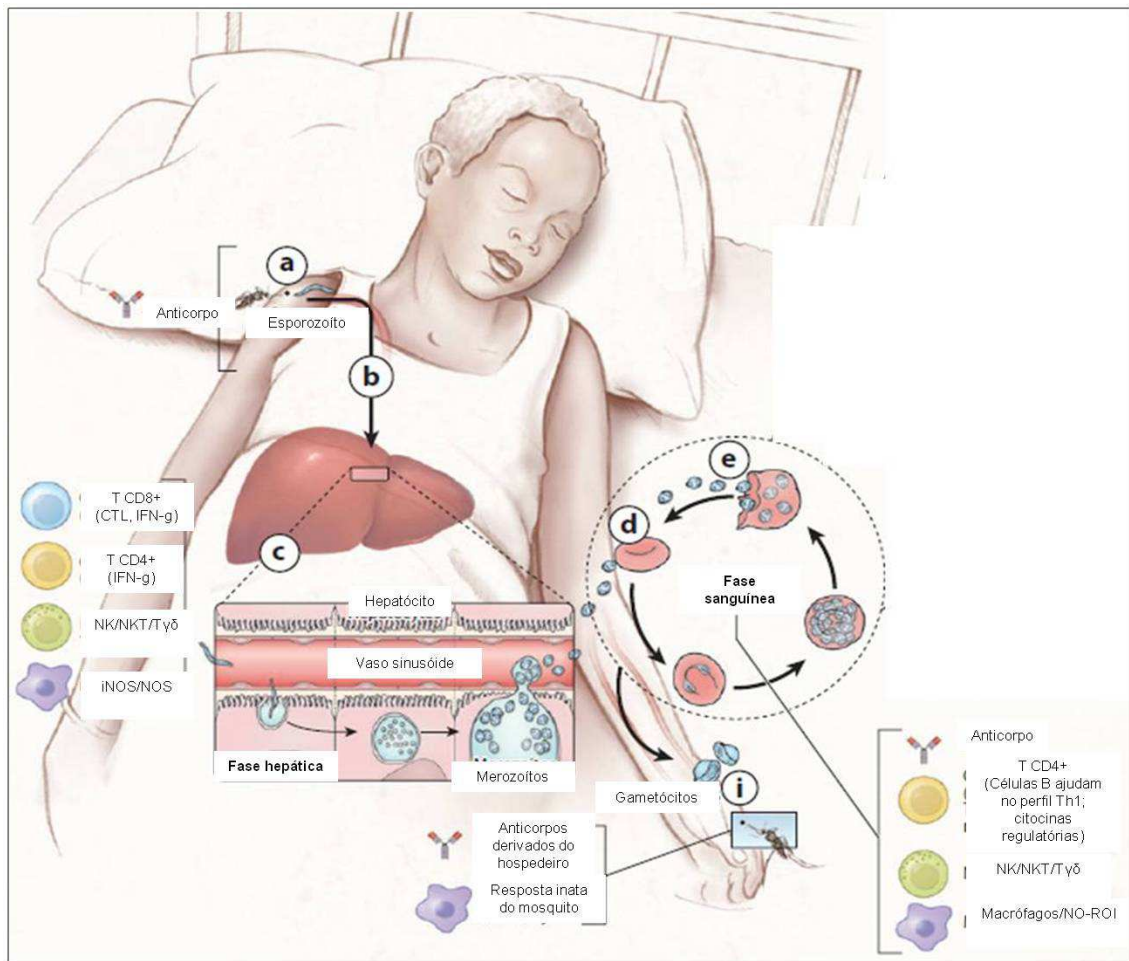
As células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas, desempenham papel fundamental para que células T sejam devidamente ativadas. No entanto, foi descrito anteriormente, que tanto a infecção pelo *P. falciparum* quanto pelo *P. vivax* leva à diminuição das células dendríticas (Goncalves *et al.*, 2010). Uma possível explicação seria a presença de altas parasitemias, característica da fase aguda da malária, que levaria à apoptose dessas células (Elliott *et al.*, 2007). A maturação de células dendríticas ocorre após o contato direto célula-célula, além da fagocitose de hemácias parasitadas, o que resulta no aumento da expressão de MHC classe II, moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86), e produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  (Seixas *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010). Entretanto, a maturação de células dendríticas é diminuída em função do aumento da quantidade de hemácias parasitadas pelo *P. falciparum* (Urban *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2007). Os subtipos de células dendríticas podem influenciar o perfil de células T geradas. Foi demonstrado que células dendríticas plasmocitoides estimuladas por CpG ODN via TLR9 causam diferenciação de células *naive*

em células T reguladoras (Moseman *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrada a importância de TLRs para ativação de Treg em camundongos TLR9<sup>-/-</sup> infectados com *P. yoelli* (Hisaeda *et al.*, 2008). Esse cenário poderia influenciar diretamente o aumento da proporção de células T reguladoras com o intuito de modular a resposta imune na malária vivax, uma vez que a ativação de TLR9 pelo DNA ligado à hemozoína induz inflamação. As infecções pelos *P. falciparum* e *P. vivax* são caracterizadas pelo aumento na frequência de células Treg, o que sugere a participação dessas células na doença (Jangpatarapongsa *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2010). O aumento na produção de IL-10, citocina moduladora da resposta imune, também é observado em pacientes com malária (Urban *et al.*, 2001; Leoratti *et al.*, 2012).

As células Treg podem ser naturais (nTreg), induzidas (iTreg) ou Tr1. As nTreg são um subtipo celular no qual é necessária a apresentação antigênica da célula dendrítica para a célula T no timo. Essas células produzem IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 e expressam Foxp3 (Sakaguchi, 2005; Belkaid *et al.*, 2006; Collison *et al.*, 2010). Já as iTreg são formadas através da apresentação antigênica para células T *naive* por células dendríticas semi-maduras em órgãos linfoides periféricos através do estímulo antigênico. As iTreg produzem IL-10 e TGF- $\beta$  e expressam Foxp3 (Lutz e Schuler, 2002; Mills, 2004; Belkaid, 2008). As células Tr1, também produtoras de IL-10, são células *naive* que são diferenciadas na presença das citocinas TGF- $\beta$  e IL-27 ou na presença de vitamina D3 e dexametasona (Battaglia *et al.*, 2006; Apetoh *et al.*, 2010). Foi demonstrado que células de memória de pacientes que tiveram episódios de malária nos últimos cinco meses na presença de nTreg, estimuladas com o extrato de esquizonte de *P. falciparum* se convertem em células iTreg (Finney *et al.*, 2012). As células Treg podem ser subdivididas em nTreg e iTreg. Duas subpopulações que se diferenciam através da expressão de Helios (Thornton *et al.*, 2010). Helios, um membro da família Ikaros, uma molécula característica de células Treg apresenta controvérsias sobre seu papel na diferenciação dessas populações. nTreg é considerada uma população que expressa Helios, no entanto, foi descrita uma população de nTreg que não expressa Helios e outro trabalho demonstrou que a expressão de Helios independe de sua origem, e sim de seu estímulo, desse modo células iTreg estimuladas *in vitro* também expressaram Helios (Akimova *et al.*, 2011; Himmel *et al.*, 2013; Shevach e Thornton, 2014; Elkord, 2016). Helios foi caracterizado como molécula de ativação de células Treg que é encontrado na região promotora do gene de transcrição de Foxp3 (Getnet *et al.*, 2010; Akimova *et al.*, 2011). Pacientes infectados pelo *P. falciparum* apresentam maior ativação de células Treg, representada pela expressão de TNFR2 em pacientes assintomáticos em relação aos mesmos após o tratamento (Wammes *et al.*, 2013). Além disso, o aumento de TNFR2 indica

gravidade durante a malária causada pelo *P. falciparum* (Minigo *et al.*, 2009). Recentemente foi demonstrada a diminuição da frequência de células Treg ativadas em crianças e adultos assintomáticos infectados pelo *P. vivax* em relação aos indivíduos saudáveis e aos indivíduos sintomáticos (Kho *et al.*, 2015). Em modelos murinos, foi demonstrada a importância das células Treg diminuindo a migração de células efetoras para o cérebro e no controle da parasitemia da infecção pelo *P. berghei* (Haque *et al.*, 2010). A maioria dos trabalhos publicados caracterizando as células Treg na malária vivax não utiliza o receptor de IL-7 (CD127) na sua definição, podendo levar à contaminação com células T CD4<sup>+</sup> de memória e ativadas (Liu *et al.*, 2006; Bueno *et al.*, 2010; Goncalves *et al.*, 2010). Em respostas do tipo Th1, células Treg aumentam a expressão de Tbet, passando a expressar moléculas deste perfil (Koch *et al.*, 2009; Koch *et al.*, 2012). Sabendo da importância do perfil Th1 na malária, ainda não há relatos sobre essa caracterização na regulação da resposta imune desta população na doença.

Outra possibilidade para a regulação da resposta imune desencadeada contra o *Plasmodium spp.* seria a expressão de receptores inibidores por células T antígeno-específicas, descrita por nosso grupo, em modelos experimentais da malária e recentemente *in vitro* em PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* (Butler *et al.*, 2012; Hafalla *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2015). O estudo da expressão e função dessas moléculas moduladoras no contexto da malária nos auxilia no entendimento da capacidade prejudicada do hospedeiro de produzir citocinas e executarem outras possíveis respostas efetoras (Costa *et al.*, 2015). Recentemente foi demonstrado que a expressão de *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4* (CTLA-4) e *programmed cell death protein-1* (PD-1) em células T efetoras de pacientes infectados pelo *P. falciparum* são capazes de modular a resposta imune de outras células T (Mackroth *et al.*, 2016).



**Figura 5: Resposta imune ao *Plasmodium sp.*** A resposta imune inata e adaptativa é mostrada na figura dependente da fase na qual o parasito se encontra: hepática ou sanguínea. Adaptado de Crompton et al, 2014 (Crompton *et al.*, 2014).

#### 1.4 Moléculas reguladoras

As células T podem ser induzidas a um estágio disfuncional após serem fortemente ativadas. Entretanto, para chegarem nesse fenótipo, a célula T deve reconhecer um antígeno, primeiro sinal, e interagir com moléculas coestimulatórias (CD28/CD80 ou CD86), segundo sinal (Turka *et al.*, 1990; Linsley e Ledbetter, 1993). Além da apresentação antigênica intensa, sinalização via receptores de citocinas como IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 e IFN- $\alpha$  podem levar a expressão de moléculas associadas a perda de função efetora de células T (Gallimore *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2008; Kinter *et al.*, 2008). A expressão de moléculas reguladoras, como, PD-1, ICOS, CTLA-4, *T cell immunoglobulin domain, mucin domain-3* (TIM-3) e *lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3) indica ativação celular e possivelmente comprometimento de sua função efetora (Greenwald *et al.*, 2005; Grosso *et al.*, 2009; Fourcade *et al.*, 2010). A função de células T é dependente da quantidade de receptores

inibitórios expressos, ou seja, quanto maior a expressão de receptores inibitórios, menor a capacidade funcional dessas células (Blackburn *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2011). Como células disfuncionais, as células anérgicas também apresentam marcadores reguladores como CTLA-4 e PD-1 (Wells *et al.*, 2001; Tsushima *et al.*, 2007). No entanto, é importante lembrar que disfunção difere de anergia, uma vez que durante o reconhecimento de antígenos por células que se tornarão anérgicas não acontece o segundo sinal nem a sinalização pelo receptor de IL-2 (CD25) (Valdor e Macian, 2013). Além disso, a anergia leva a alteração da expressão de quatorze genes (GRG4, IKAROS, JUMONJI, RPTP $\alpha$ , RPTP $\kappa$ , GBP-3, RGS-2, CASPASE-3, SOCS-2, DAGK $\alpha$ , LDHA $\alpha$ , CD98, 4-1BB-L e FasL), sendo que doze possuem expressão diminuída (apenas Caspase-3 e FasL apresentaram aumento) (Macian *et al.*, 2002; Wherry *et al.*, 2007).

O aumento de moléculas reguladoras em células T disfuncionais é observado em vários cenários. Um exemplo é a expressão de PD-1 em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV). Sua expressão é diretamente ligada à viremia dos pacientes e o bloqueio da interação PD-1/PD-L1 aumenta a produção de IFN- $\gamma$  (Day *et al.*, 2006). Após o início da terapia anti-retroviral (ART), pacientes HIV positivos apresentaram altos níveis de marcadores reguladores, como CTLA-4, ICOS, LAG-3 e PD-1, e a expressão exacerbada de PD-1 em particular acontece em células T de indivíduos que desenvolvem a síndrome inflamatória de imunorreconstituição (IRIS) em relação aos que não desenvolveram a síndrome (Antonelli *et al.*, 2010).

Doenças causadas por protozoários também podem levar à expressão de receptores reguladores. Na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, o uso de camundongos PD-1<sup>-/-</sup> revela papel importante de PD-1 no controle da miocardite (Gutierrez *et al.*, 2011). Em infecções induzidas pelo *Toxoplasma gondii* foi demonstrado que a exaustão de células T CD8<sup>+</sup> ocorre apesar do controle da parasitemia durante o início da fase crônica. Na fase crônica tardia, essas células se tornam disfuncionais, levando ao aumento da carga parasitária e mortalidade dos animais. Tal disfunção é caracterizada por aumento na expressão de PD-1 em células T CD8<sup>+</sup> em órgãos linfoides e não linfoides. O bloqueio do PD-1 resulta no controle da carga parasitária e prevenção da mortalidade de animais cronicamente infectados (Bhadra *et al.*, 2011). Entretanto, em pacientes com leishmaniose visceral há aumento da expressão de CTLA-4 e PD-1, mas o bloqueio dessas moléculas em células sanguíneas *in vitro* não restaura a capacidade responsiva nem diminui a carga parasitária (Gautam *et al.*, 2013). Foi demonstrado que durante a infecção por *Leishmania donovani* o bloqueio de PD-1 diminui a parasitemia *in vivo* e *in vitro* em modelos murinos (Joshi *et al.*, 2009).



Esse cenário também acontece durante a infecção por *Plasmodium spp.*, que correlaciona o aumento de parasitemia com produção de citocinas como IL-6 e IL-10 (Da Costa *et al.*, 2014). Na malária humana causada pelo *P. falciparum* ocorre aumento da expressão de receptores inibitórios como PD-1 em pacientes sete dias após o tratamento em relação aos indivíduos durante o período de seca, fase na qual os indivíduos não apresentam parasitemia (Butler *et al.*, 2012; Zander *et al.*, 2015). Em diferentes tribos africanas foi descrito aumento da frequência de receptores inibidores como LAG-3 e PD-1 em pacientes infectados pelo *P. falciparum* (Illingworth *et al.*, 2012). Em modelos murinos, a infecção não letal e letal pelo *P. yoelli* é influenciada de maneira diferente pela expressão do CTLA-4. Na infecção letal há aumento da morte dos camundongos após o bloqueio com CTLA-4. Entretanto, nenhum efeito é observado no modelo não letal. Uma possível explicação é o aumento de TNF- $\alpha$  no modelo letal após o bloqueio com CTLA-4 (Lepenes *et al.*, 2007). Durante a infecção com o *P. yoelli* ocorre aumento da frequência de PD-1 e LAG-3. Mediante o bloqueio simultâneo dessas moléculas ocorre diminuição da parasitemia e aumento da frequência de células produtoras de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, foi demonstrado que o bloqueio de PD-1 e LAG-3 induz aumento do número de células Tfh e plasmócitos. Consequentemente, há maior interação T-B no centro germinativo, aumento da produção de anticorpos e da troca de classe de imunoglobulinas (Butler *et al.*, 2012).

Por outro lado foi demonstrado em modelo murino pela infecção com *P. berghei* ANKA que o bloqueio de PD-1 ou CTLA-4 aumenta os sintomas da malária cerebral e a mortalidade de animais. Foi observado, por microscopia intravital, aumento da carga parasitária após o bloqueio com PD-L1 ou CTLA-4 no cérebro e da carga parasitária sistêmica desses animais. O bloqueio desses receptores causa aumento da produção de citocinas, sendo IFN- $\gamma$  produzida por células T CD8<sup>+</sup> a citocina mais relevante nesse modelo para a sintomatologia, uma vez que o bloqueio de IFN- $\gamma$  e PD-1 ou CTLA-4 leva à diminuição dos sintomas de malária (Hafalla *et al.*, 2012). A infecção pelo *P. chabaudi* aumenta a expressão de PD-1 em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e animais PD1<sup>-/-</sup> controlam a parasitemia mais rapidamente. Isso possivelmente ocorre devido as células T CD8<sup>+</sup>, uma vez que durante a fase crônica há aumento da ativação e produção de IFN- $\gamma$  por essas células em animais PD1<sup>-/-</sup>, mas não há alteração na diferenciação de Tfh nem alteração da resposta de células B, como demonstrado anteriormente com o bloqueio de duas moléculas inibitórias, LAG-3 e PD-1 (Butler *et al.*, 2012; Horne-Debets *et al.*, 2013). Recentemente foi descrito aumento da molécula de ativação, OX40, na infecção pelo *P. yoelli*. Esse trabalho demonstra

que o bloqueio de PD-1 e o uso do agonista de OX40 diminuem a interação de Tfh e células B no centro germinativo favorecendo o perfil Th1 (Zander *et al.*, 2015).

Nosso grupo demonstrou que durante a infecção pelo *P. vivax* há aumento na expressão de receptores inibitórios em células T, o que compromete suas funções efetoras (Costa *et al.*, 2015). Relatos prévios demonstram a função de moléculas reguladoras em células Treg na malária são de natureza descritiva. Recentemente foi realizado um trabalho no qual se observou aumento de CTLA-4 em células Treg durante infecção pelo *P. vivax* em relação aos indivíduos saudáveis de área endêmica (Goncalves-Lopes *et al.*, 2016). Outra molécula inibitória, o PD-1, foi demonstrado em células Treg capazes de expressar PD-1 em doenças autoimunes como o vitiligo (Tembhre *et al.*, 2015). Além disso, a expressão de CTLA-4 em células Treg é constitutiva e participa da sinalização via transendocitose. O CTLA-4 se liga aos receptores CD80/CD86 que são internalizados nas vesículas lisossomais de células T e a célula apresentadora de antígeno torna-se transitoriamente incapaz de apresentar antígeno para outra célula T. Desse modo, CTLA-4 torna-se uma molécula importante no mecanismo de regulação nos momentos iniciais que atua no bloqueio de Akt após a ativação da fosfatase PP2A (Parry *et al.*, 2005; Fife e Bluestone, 2008; Qureshi *et al.*, 2011; Shevach e Thornton, 2014). Apesar de serem membros da mesma família de receptores, CTLA-4 e PD-1, família B7 (Greenwald *et al.*, 2005), o PD-1 (CD279) possui seus ligantes próprios, PD-L1 (CD274) e PD-L2 (CD273) e atua na fase tardia da regulação da resposta imune em células T bloqueando PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) após sua ativação (Fife e Bluestone, 2008). Entretanto, esses mecanismos foram descritos apenas em modelo de tolerância e não na função de células Treg. Foi demonstrado que a desmetilação no locus *Pdcd1* é um mecanismo epigenético responsável pela regulação do PD-1. Isto foi caracterizado em células de memória e células exaustas, demonstrando que a desmetilação aumentaria a expressão de PD-1 nessas células, o que também poderia ocorrer em células Treg (Youngblood *et al.*, 2015). Foi demonstrado que a frequência de Foxp3 em células Treg diminui quando PD-1 é bloqueado em cultura em células de pacientes com melanoma (Wang *et al.*, 2009). No entanto, foi observada menor frequência de células Treg PD-1<sup>+</sup> que expressam Foxp3 em relação às Treg PD-1<sup>-</sup> além de que o bloqueio de PD-1 aumenta a expressão de Foxp3 no modelo de lúpus (Wong *et al.*, 2013). Como pode ser observado, o papel de PD-1 em células Treg é bastante controverso na literatura. Foi descrito que a via PD1/PD-L1 é importante na ativação e desenvolvimento de células Treg por células dendríticas (Wang *et al.*, 2008; Francisco *et al.*, 2009). Além disso, o bloqueio de PD-L1 restaura a capacidade proliferativa de células Treg de pacientes infectados pelo HIV, apesar

do aumento da proliferação de Treg, a capacidade reguladora de células Treg não é influenciada pela expressão de PD-1 (Peligero *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que o aumento de PD-1 em células Treg e a interação com PD-L1 em células efetoras pode ser uma possível razão para a diminuição da produção de IFN- $\gamma$  e menor capacidade proliferativa de células efetoras no modelo do vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) (Park *et al.*, 2015). Por outro lado, foi demonstrado que a expressão de PD-1 por células Treg de pacientes com vírus da hepatite C (HCV) diminui a sua função de regulação (Franceschini *et al.*, 2009). Do mesmo modo, foi observado que o bloqueio associado de PD-L1 aumenta a frequência de células Treg e seu estado de ativação caracterizado pela expressão de CD43 no modelo do vírus Friend (Joedicke *et al.*, 2014).

Como podemos observar a maioria dos trabalhos em malária, descritos até o desenvolvimento desse estudo, que abordam o papel de moléculas reguladoras no desenvolvimento da resposta imunológica efetora e de memória são de natureza descritiva. A caracterização da expressão e função de moléculas inibitórias por diferentes subpopulações de células T na malária nos trarão informações de como essas moléculas podem modular o curso da resposta imune durante a infecção pelo *Plasmodium vivax*. Desse modo a hipótese de nosso trabalho é que as moléculas reguladoras que são expressas em altos níveis em células T e suas subpopulações durante a infecção pelo *P. vivax* modulam suas funções efetoras.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão das moléculas inibitórias CTLA-4, LAG-3, PD-1 e TIM-3 e sua influência na função efetora de subpopulações de células T durante a malária causada pelo *P. vivax*.

## 2.2 Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Avaliar alterações de leucócitos de sangue periférico de pacientes portadores de malária causada pelo *P. vivax* quanto suas populações e subpopulações celulares e expressão de moléculas inibitórias :

- avaliar a frequência de células CD45<sup>+</sup> expressando CD14, CD19, CD56, CD3 e seus subtipos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> durante a infecção pelo *P. vivax* e após o tratamento com Cloroquina (150 mg) e Primaquina (15 mg) na posologia preconizada pelo Ministério da Saúde;
- avaliar a frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetoras (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>), de memória central (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) e memória efetora (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) expressando CTLA-4, PD-1, TIM-3 e LAG-3 durante a infecção pelo *P. vivax* e após o tratamento;
- avaliar a frequência de células Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup>) em pacientes infectados pelo *P. vivax* e após o tratamento;
- avaliar o padrão de expressão de moléculas inibitórias (PD-1 e CTLA-4) em células Treg durante a infecção pelo *Plasmodium vivax* e após o tratamento;
- avaliar a expressão de Foxp3 em células Treg, Treg CTLA-4<sup>+</sup>, Treg CTLA-4<sup>-</sup>, Treg PD-1<sup>+</sup> e Treg PD-1<sup>-</sup> em pacientes infectados pelo *P. vivax* e após o tratamento;
- avaliar fenotipicamente a frequência de células expressando Helios e Tbet em células Treg, Treg PD-1<sup>+</sup> e Treg PD-1<sup>-</sup> durante a infecção pelo *Plasmodium vivax* e após o tratamento.

**Objetivo específico 2:** Avaliar os níveis de anticorpos plasmáticos:

- avaliar os níveis plasmáticos de IgG e IgM contra a proteína AMA-1 em pacientes durante a infecção pelo *P. vivax* e após o tratamento.

**Objetivo específico 3:** Avaliar a capacidade das moléculas inibitórias modularem as funções efetoras de leucócitos de pacientes infectados pelo *P. vivax*:

- avaliar os níveis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17) em sobrenadante da cultura de leucócitos de paciente com malária após o bloqueio simultâneo das moléculas inibitórias CTLA-4, PD-L1 e TIM-3.

**Objetivo específico 4:** Avaliar a capacidade de PD-1 alterar as funções das células T reguladoras na malária causada pelo *P. vivax*:

- correlacionar a frequência de células Treg, Treg CTLA-4<sup>+</sup>, Treg PD-1<sup>+</sup> e Treg CTLA-4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> e parâmetros bioquímicos, como bilirrubinas diretas, bilirrubinas indiretas e bilirrubinas totais avaliados em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*;

- avaliar a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> de pacientes após o tratamento quando cultivadas na presença de células Treg de pacientes após o tratamento ou de pacientes durante a malária;

- avaliar a frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  quando cultivadas na presença de células Treg e suas subpopulações, PD-1<sup>+</sup> ou PD-1<sup>-</sup> durante a malária;

- avaliar a frequência de células Treg e suas subpopulações, PD-1<sup>+</sup> ou PD-1<sup>-</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  quando cultivadas na presença de células efetoras durante a malária.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Pacientes - critérios de inclusão**

Os pacientes participantes residentes em Porto Velho- RO foram selecionados em colaboração com o grupo de pesquisadores e médicos do CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical) e CEMETRON (Centro de Medicina Tropical de Rondônia) e Fiocruz-RO. Todos os pacientes incluídos nesse estudo foram examinados pelos médicos responsáveis e assinaram o termo de consentimento redigido em português de acordo com as normas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil (Anexo 1). Os pacientes foram informados, detalhadamente dos objetivos e metodologias do estudo antes da coleta de sangue. Os pacientes que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa foram informados sobre a possibilidade de se retirarem do estudo quando assim o desejassem, sem prejuízo ou dano no atendimento clínico e tratamento terapêutico. O tratamento foi realizado com o uso de cloroquina (150mg) e primaquina (15mg) nas dosagens preconizadas pelo Ministério da Saúde usando o tratamento longo.

Amostras de sangue periférico foram coletadas de pacientes residentes em área endêmica, em fase aguda da infecção por *P. vivax*. Foram incluídos no estudo indivíduos adultos (idade  $\geq 18$  anos), que não apresentavam nenhuma outra infecção aguda ou crônica ou gravidez e não estavam em tratamento com drogas imunossupressoras. Os indivíduos apresentavam exame de gota espessa e reação em cadeia da polimerase (PCR) positivos para *P. vivax*. Indivíduos apresentando co-infecção com outras espécies do plasmódio foram excluídos. Os mesmos indivíduos retornaram ao CEPEM 30-45 dias após o início do tratamento para reavaliação clínica e uma segunda coleta de sangue.

### **3.2 Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos**

A avaliação hematológica consistiu na realização do hemograma para avaliação de hemácias, plaquetas e leucócitos. Foi realizada a contagem global e diferencial de leucócitos, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Para realização do procedimento, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A glicose foi avaliada em amostras sanguíneas coletadas na presença de fluoreto de sódio e EDTA, e bilirrubinas, sódio, potássio, uréia,



creatinina, e as enzimas hepáticas, transaminase glutâmico oxalacética e transaminase glutâmico pirúvica, foram medidas após coleta em tubos secos (sem anticoagulante).

### 3.3 Obtenção de PBMC

As amostras sanguíneas coletadas em tubos na presença de heparina foram utilizadas para obtenção do PBMC. O sangue foi diluído em solução salina 0,9% estéril (vol/vol). Trinta mL do sangue diluído foram adicionados delicadamente em um tubo contendo 15 mL de Ficoll Hypaque (GE) e as amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 300xg. Realizamos a coleta da camada de PBMC, que foi transferida para um tubo cônico de 50 mL. As PBMC foram lavadas por três vezes em baixa rotação, 300xg, por 10 minutos e sua concentração celular foi determinada com a utilização de câmara de Neubauer e ajustada para o congelamento em soro fetal bovino a 10% DMSO.

### 3.4 Caracterização fenotípica de células T

A caracterização fenotípica foi realizada com a utilização de PBMC congeladas em Porto Velho, transportado a Belo Horizonte em gelo seco e mantidas em nitrogênio líquido. Aproximadamente  $5 \times 10^6$  células, contidas em cada frasco, foram descongeladas rapidamente na presença de 10 mL de RPMI contendo 20  $\mu\text{g/mL}$  de benzonase nuclease (Novagen). As células foram lavadas por duas vezes com PBS a 300xg por 10 minutos para remoção de qualquer proteína e incubadas com reagente para avaliação de viabilidade celular (*Live/Dead Fixable Dead Cell Stains*), conforme recomendado pelo fabricante (Invitrogen). A suspensão celular foi marcada com três painéis contendo combinações distintas de anticorpos, para a avaliação de células de T de memória e receptores inibidores, subpopulações leucocitárias e células T reguladoras e receptores inibidores. O painel para a avaliação das células T de memória e receptores inibidores foi composto por anticorpos contra as moléculas de superfície diluídos em PBS contendo 0,1% de BSA e 2 mM de azida (tampão de FACS): anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD27, anti-CD45RO, anti-LAG-3, anti-TIM-3, anti-ICOS e anti-PD-1 conjugados respectivamente com Qdot655, Qdot605, eFluor780, Ax700, PerCP-eFluor710, FITC, PE, PECy7 e APC (Tabela 1). A incubação, com os anticorpos extracelulares, foi realizada por 20 minutos e as células foram então lavadas duas vezes por centrifugação por 4 minutos a 300xg com tampão de FACS (PBS, 0,1% BSA, 2mM azida). Além disto, a suspensão celular foi fixada e permeabilização para a avaliação de CTLA-4 intracelular, utilizando-se anticorpo biotilado. Foi realizada uma nova lavagem por 4

minutos a 300xg e posterior incubação por 15 minutos com estroptoavidina QD525. Para fixação e permeabilização foram utilizados os tampões da eBioscience (*Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer*), de acordo com as especificações do fabricante.

Para marcação de populações leucocitárias o painel foi composto por anticorpos contra as moléculas de superfície diluídos tampão de FACS: anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD14 e anti-CD56, conjugados respectivamente com FITC, QD655, QD605, eFluor780, PECy7, PE e APC. A incubação, com os anticorpos extracelulares, foi realizada por 20 minutos e as células foram então lavadas duas vezes por centrifugação por 4 minutos a 300xg com tampão de FACS.

O painel para a avaliação das células Treg e receptores inibidores foi composto por anticorpos contra as moléculas de superfície diluídos em tampão de FACS: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127, anti-CD45RO e anti-PD-1 conjugados respectivamente com Qdot655, eFluor780, PECy7, PE, FITC e APC. A incubação, com os anticorpos extracelulares, foi realizada por 20 minutos à temperatura ambiente (TA) e as células foram então lavadas duas vezes por centrifugação por 4 minutos a 300xg com tampão de FACS. A suspensão celular foi fixada e permeabilização para a avaliação da expressão de marcadores intracelulares, Foxp3 e CTLA-4, sendo os anticorpos conjugados respectivamente com PECy5 e biotina. Após incubação com anticorpo contra os marcadores intracelulares foi realizada uma nova lavagem por 4 minutos a 300xg para a realização da incubação por 15 minutos da estroptoavidina QD605 para a revelação da biotina conjugada ao anticorpo anti-CTLA-4. Para avaliar os fatores de transcrição em células Treg utilizamos os seguintes anticorpos: contra as moléculas de superfície foram diluídos em tampão de FACS: anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127, e anti-PD-1 conjugados respectivamente com Qdot605, Ax700, eFluor780 e APC. Após marcação extracelular, as células foram lavadas, fixadas e permeabilizadas como descrito acima para a marcação intracelular com os anticorpos anti-Helios, anti-CD3, anti-Tbet e anti-Foxp3 conjugados respectivamente com eFluor450, Qdot655, PE-CF594 e PercpCy5.5. Para fixação e permeabilização foram utilizados os tampões da eBioscience (*Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer*), de acordo com as especificações do fabricante. As células foram adquiridas no citômetro LSR Fortessa (BD Pharmingen). Para análise dos dados foi utilizado o programa *FlowJo 10 (TreeStar)*. A tabela abaixo caracteriza os anticorpos utilizados no estudo.

Tabela 1: Lista de anticorpos utilizados para citometria de fluxo, fenotipagem e experimentos funcionais.

<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Função</b>
LIVE/DEAD	Violeta		Invitrogen	Utilizado para exclusão de morte celular
LIVE/DEAD	Acqua		Invitrogen	Utilizado para exclusão de morte celular
CD3	Qd655	S4.1	Invitrogen	Marcador de células T
CD4	Qdot605	S3.5	Invitrogen	Define subpopulação de célula T
CD4	eF780	RPA-T4	eBioscience	Define subpopulação de célula T
CD8	eFluor780	RPA-T8	eBioscience	Define subpopulação de célula T
CD14	PE	HCD14	Biologend	Marcador de monócitos
CD19	PECy7	SJ25C1	eBioscience	Caracteriza população de células B
CD25	Ax700	M-A251	BD	Receptor de IL-2
CD25	PECy	BC96	eBioscience	Receptor de IL-2
CD27	Ax700	0323	eBioscience	Define células naive e de memória
CD45	FITC	HI30	BD	Expresso em leucócitos
CD45RO	PerCP-eFluor710	UCHL1	eBioscience	Define células de memória e ativadas
CD45RO	FITC	UCHL1	eBioscience	Define células de memória e ativadas
CD56	APC	B159	BD	Marcador de células NK
CD127	PE	R34.34	Beckman Coulter	Receptor de IL-7
CD127	Ax780	eBioRDR5	eBioscience	Receptor de IL-7
CTLA-4	Biotina	14D3	eBioscience	Membro da família B7 que compete com CD80 e CD86 com maior afinidade. Atua nos momentos iniciais da resposta imune.
CTLA-4	Purified	BNI3	BD	Bloqueador de CTLA
Estreptavidina	Qdot525		Invitrogen	-----
Estreptavidina	Qdot605		Invitrogen	-----
Foxp3	PerCPy5.5	PCH101	eBioscience	Fator de transcrição expresso em altos níveis em células Treg
Helios	eFluor450	22F6	eBioscience	Molécula expressa em células Treg
ICOS	PECy7	ISA-3	eBioscience	Molécula regulatória que modula Th1
IFN-g	eF450	45.B3	eBioscience	Citocina característica do perfil Th1
Ki67	PERCPy5.5	B56	BD	Indicador de proliferação celular
LAG-3	FITC	Polyclonal	R&D Systems	Molécula inibitória que compete diretamente com CD4 e CD8 na região de ligação de MHC
PD-1	APC	EF12.2H7	Biologend	Membro da família B7 que possui seus ligantes próprios, atua em momentos tardios inibindo a via PIK3.
PD-L1	Purified	29E.2A3	Biologend	Bloqueador de PD-L1
TIM-3	PE	344823	R&D Systems	Glicoproteína inibitória expressa principalmente no perfil Th1 que se liga ao TIM-3-L
Tbet	PE-CF594	O4-46	BD	Fator de transcrição característico do perfil Th1
TIM-3	Purified	F38.2E2	Biologend	Bloqueador de TIM-3

### 3.5 Avaliação dos níveis dos anticorpos anti-AMA-1 por ELISA

O antígeno AMA-1, na concentração padronizada de 100 ng/poço (1 µg/mL), foi distribuído em placas de ELISA de 96 poços e incubado *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas por três vezes com PBS-*Tween* 0,05% e bloqueadas com leite desnatado por uma hora a 37°C. O plasma foi diluído na concentração padronizada de 1:100 em PBS-*Tween* 0,05% + leite desnatado 3%. As placas foram lavadas novamente por três vezes com PBS-*Tween* 0,05%, os plasmas diluídos foram adicionados às placas e incubados por uma hora a 37°C.

Após incubação, o soro foi descartado e as placas lavadas por dez vezes com PBS-*Tween* 0,05%. Uma solução contendo anticorpo de cabra anti-humano, IgG ou IgM (Sigma), específicos para região Fc, na diluição de 1:500, conjugado com peroxidase foi incubada por uma hora a 37°C. Depois de lavado com PBS-*Tween* 0,05% foi adicionada uma solução de estreptoavidina (Sigma) na diluição de uso 1:2000. A reação enzimática de revelação foi iniciada após lavagem da placa com PBS-*Tween* 0,05% e posterior adição de tetrametilbenzidina (Sigma) na concentração de 10 mg/mL, em tampão citrato-fosfato pH=5, contendo peróxido de hidrogênio (0,03% [vol/vol]). Após 20 minutos de reação em temperatura ambiente, a reação foi parada com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Para obtenção dos resultados, a placa foi lida no leitor de placas *VERSAmax microplate reader* com uma densidade ótica (OD) de 450 nm. Os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR), que é caracterizado pela divisão dos valores da OD de cada amostra pelo *cut-off*. O *cut-off* foi determinado com a soma da média da OD mais três vezes o desvio padrão da média de 24 indivíduos que nunca foram expostos a malária. Os valores considerados positivos obtiveram IR acima de 1,0.

### **3.6 Obtenção de reticulócitos**

#### **3.6.1 Obtenção de reticulócitos infectados**

Após a separação por gradiente de Ficoll, as papas de hemácias foram reunidas em um único tubo e lavadas por duas vezes por 8 minutos a 400xg. O volume da papa de hemácias foi criopreservado na razão de 1/1 em Glycerolite 57 (Baxter). Apenas os pacientes que apresentaram parasitemia de 501 parasitos/mm<sup>3</sup> até 100.000 parasitos/mm<sup>3</sup> tiveram suas hemácias congeladas. Para o descongelamento das hemácias foi realizado um gradiente salino, a fim de evitar hemólise. Após o descongelamento das hemácias em banho-maria a 37°C e transferir o volume para um tubo falcon de 50 mL, foi adicionado 20% do volume de hemácias de solução NaCl 12% e realizada incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 10 mL de NaCl 1,6% e a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, 600xg, TA. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de NaCl 0,9% Dextrose 0,2%, e centrifugado por 10 minutos, 600xg, TA. O sobrenadante foi descartado com pipeta. Para cada tubo descongelado, 10 mL do meio McCoy (Gibco) de cultivo foi preparado em placa de Petri (meio McCoy 70%, 25% soro humano AB (Cellgro), 0,5% glicose (solução 20x)). O cultivo foi feito em dissecador em estufa a 37°C por 20 horas (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) (o que

chamamos de maturação de reticulócitos). Após a maturação, o volume da placa foi centrifugado por 300xg por 5 min a TA. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de RPMI. Preparou-se o Percoll (Sigma Aldrich) a 45% (80 mL percoll 100% + 20 mL RPMI 5X sem bicarbonato para preparo de percoll 80%; 100 mL percoll 80% + 6,4 mL NaHCO<sub>3</sub> + 71,3 mL RPMI 1X para preparo de Percoll 45%). 5mL de percoll 45% foi acrescentado em tubo de 15 mL. Os 5 mL do sedimento ressuspensionado foram adicionados vagarosamente sobre o Percoll 45% e centrifugado a 1830xg por 10 min (aceleração 9 e sem freio). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi feita a coleta do anel de reticulócitos infectados para um tubo novo. Foram realizadas duas lavagens com RPMI por duas vezes a 600xg por 5 min, TA (Ihalamulla e Mendis, 1987; Carvalho *et al.*, 2010; Noulín *et al.*, 2013).

### 3.6.2 Obtenção de reticulócitos saudáveis

Para obtenção de reticulócitos saudáveis, foram coletados 8 tubos de indivíduos de área não endêmica e realizado gradiente de ficoll gelado. Os neutrófilos foram coletados com pasteur de vidro e a papa de hemácias foi completada para 20 mL de RPMI 1% soro humano. Preparou-se o Percoll 65% (80 mL percoll 100% + 20 mL RPMI 5X sem bicarbonato para preparo de percoll 80%; 100 mL percoll 80% + 4,4 mL NaHCO<sub>3</sub> + 18,6 mL RPMI 1X para preparo de Percoll 65%). 20 mL de percoll 65% foi acrescentado em tubo de 50 mL. Os 20 mL de papa ressuspensionados foram adicionados vagarosamente sobre o Percoll 65% e centrifugado a 1830xg por 10 min (aceleração 9 e sem freio). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi feita a coleta do anel de reticulócitos não infectados para um tubo novo. Foram realizadas duas lavagens com RPMI por duas vezes a 600xg por 5 min, TA.

### 3.7 Avaliação da influência de receptores inibitórios na produção de citocinas

PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços em uma proporção de 1 ( $2,5 \times 10^5$  células) PBMC para 3 ( $7,5 \times 10^5$  células) reticulócitos infectados pelo *P. vivax* ou saudáveis/poço. As PBMC foram adicionalmente cultivadas com anti-CD3 (1 µg/mL, clone HIT3a) e anti-CD28 (0,5 µg/mL, clone CD28.2) (BD Pharmingen) e na ausência de estímulo. Reticulócitos infectados e não infectados foram co-cultivados com PBMC na presença de co-estímulo, anti-CD28. RPMI 10% (RPMI 1640, 10% FCS, 100 mg/mL estreptomicina, 100 U/mL penicilina) foi utilizado nas culturas. Para avaliar o efeito de moléculas reguladoras, as células foram incubadas com uma mistura dos

anticorpos bloqueadores, anti-CTLA-4, anti-PD-L1 e anti-TIM-3. Os sobrenadantes foram coletados após 96 horas de cultura e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até dosagem de citocinas.

### 3.8 Ensaio de proliferação celular por CFSE

Células efectoras T  $\text{CD4}^{+}$  sorteadas foram marcadas com 1,25 $\mu\text{M}$  CFSE (Molecular Probes) por 8 minutos e logo após foram lavadas três vezes com RPMI suplementado com soro fetal bovino 10%. Células efectoras marcadas com CFSE foram cultivadas com Treg na presença de anti-CD3/CD28. As células foram mantidas em cultura por cinco dias, marcadas com CD4 e CD3, conjugados respectivamente com Bv605 e Qd655. Células mortas foram excluídas usando o marcador de morte celular (Life Technologies).

### 3.9 Purificação das subpopulações de Treg e preparo de culturas para avaliação da função de células Treg na malária

Sangue de pacientes infectados com *P. vivax* foi coletado em área endêmica e enviado para Belo Horizonte – MG, e o processamento iniciou-se no máximo 24 horas após a coleta. Imediatamente após recebimento foi realizado o gradiente de Ficoll, coletado o anel de PBMC e a papa de hemácias para purificação de reticulócitos infectados. A separação de células por *sorting* pode ser baseada nas propriedades funcionais, bioquímicas ou morfológicas das células. As mesmas não sofreram danos mensuráveis durante o processo e as populações obtidas foram posteriormente utilizadas em ensaio *in vitro*, já que todo o processo foi realizado sob condições estéreis. Basicamente o que ocorre no processo de *sorting* é a aplicação de vibrações ultrassônicas à suspensão celular (*flow cell*) favorecendo a formação de gotas (*droplets*). As gotas que possuem no seu interior as células de interesse passarão por um pulso elétrico onde elas podem permanecer sem carga ou receber uma carga positiva ou negativa de acordo com os critérios pré-estabelecidos no software. Em seguida, as gotas carregadas passam por entre duas placas elétricas onde, de acordo com a polaridade, as gotas vão ser defletidas para a esquerda ou para a direita caindo em tubos coletores. As populações podem ser separadas com uma pureza de até 98% na primeira passagem. Se maiores graus de pureza são desejados a suspensão purificada pode ser submetida ao *sorting* novamente. Foi realizado *sorting* para separar a população de monócitos, usando anticorpos anti-CD14 e anti-CD4, conjugados respectivamente com APC, Ax700. Nesta primeira separação foram coletadas as células  $\text{CD14}^{+}$ ,  $\text{CD4}^{+}$  e as células  $\text{CD14}^{-}\text{CD4}^{-}$ . Para o segundo *sorting* foi

realizada a marcação com os anticorpos anti-CD25, anti-CD127 e anti-PD-1, conjugados respectivamente com os fluoróforos PECy7, Ax780 e APC. Como resultado da segunda separação obtivemos células  $CD25^+CD127^{dim}PD-1^+$ ,  $CD25^+CD127^{dim}PD-1^-$ ,  $CD25^+CD127^+$ . As células Treg totais foram definidas como a soma da mesma quantidade de células  $CD25^+CD127^{dim}PD-1^+$  e  $CD25^+CD127^{dim}PD-1^-$ . Denominou-se PBMC pós-sorting a suspensão celular depletada de Treg e monócitos (PBMC-Mon-Treg) e essas foram utilizadas nas culturas. A razão de PBMC-Mon-Treg e Treg (e suas subpopulações) foi de 4:1. Após definir a quantidade PBMC-Mon-Treg, 25% de monócitos foi adicionado às culturas. Três reticulócitos infectados foram acrescentados para cada monócito. As culturas foram realizadas na presença de 10% de plasma de um paciente selecionado infectado. Além disso, foi realizado sorting de PBMC congelado de pacientes durante a fase aguda da malária e após o tratamento, a fim de separar células efectoras T  $CD4^+$  e células Treg. Para esta separação foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD66b, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127 conjugados respectivamente com PE, Qdot605, PECy7 e Ax780. Foram utilizadas células efectoras T  $CD4^+$  de indivíduos após o tratamento cultivados com as células Treg do mesmo indivíduo após o tratamento ou durante a fase aguda da malária. A razão de células efectoras T  $CD4^+$  e Treg foi de 4:1. As células foram cultivadas em presença de anti-CD3 e anti-CD28. As culturas foram mantidas por cinco dias em estufa de  $CO_2$  a  $37^\circ C$  para avaliação de citocinas e proliferação celular.

### **3.10 Avaliação da produção de citocinas intracelulares e proliferação celular**

Anteriormente às culturas as PBMC-Mon-Treg foram incubados com CFSE por 8 minutos, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente para avaliar-se a proliferação celular ao final de 5 dias de cultura. No quarto dia e meio de cultura, brefeldina A (Golgi Stop, BD) foi adicionada à cultura por 8 horas (*overnight*) para interrupção da secreção de citocinas. As células foram lavadas por duas vezes com PBS, sendo centrifugadas a  $300\times g$  por 10 minutos, para remoção de qualquer proteína solúvel no meio de cultura, e incubadas com reagente de viabilidade celular (*Live/Dead Fixable Dead Cell Stains*), conforme recomendado pelo fabricante (Invitrogen). A suspensão celular foi marcada com painéis contendo combinações distintas de anticorpos, para a avaliação de citocinas e proliferação de células T. O painel para a avaliação das células T foi composto por anticorpos contra as moléculas de superfície diluídos em tampão de FACS: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 e anti-PD-1 conjugados respectivamente com, Qdot605, Ax700, PECy7 e APC. A incubação, com os anticorpos

extracelulares, foi realizada por 20 minutos e as células foram então lavadas duas vezes com tampão de FACS e centrifugação por 4 minutos a 300xg. A suspensão celular foi fixada e permeabilizada para marcação com anti-IFN-gama, anti-CD3, anti-Foxp3, conjugados respectivamente com eF450, Qdot655 e PercPCy5.5. Para fixação e permeabilização foram utilizados os tampões da eBioscience (*Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer*), de acordo com as especificações do fabricante.

### 3.11 Quantificação dos níveis de citocinas por CBA

A quantificação dos níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A foi realizada utilizando-se o sistema citofluorométrico com microesferas fluorescentes (CBA – *Cytometric Bead Array*, BD Pharmingen). Esse sistema emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas de interesse. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Antes de iniciar o processo da avaliação das citocinas do plasma, foi realizada uma incubação da reação das sete esferas com o tampão de enriquecimento destas (*Serum Enhancement Buffer*) como indicado pelo fabricante. Resumidamente, 50  $\mu$ L da mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais foram transferidas para placas de cultura celular de 96 poços, fundo redondo, destinados ao controle negativo e às amostras a serem testadas. Em seguida, 50  $\mu$ L do diluente G, denominação dada pelo fabricante, e das amostras a serem testadas foram adicionados aos seus respectivos poços. As misturas foram incubadas por 90 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas por duas vezes com 150  $\mu$ L da solução tampão (PBS) e centrifugadas a 200xg, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. As esferas de captura foram então incubadas por 90 minutos, ao abrigo da luz, com um coquetel de anticorpos monoclonais contra antígenos humanos marcadas com 15  $\mu$ L de PE (*Human Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent*). Após a incubação, as esferas foram novamente lavadas, o sobrenadante descartado, e 200  $\mu$ L de solução tampão adicionados para ressuspensão das esferas e posterior aquisição das amostras no FACSVerse. Foi utilizado o software FACSSuite e o *Calibrate Beads* da BD com o objetivo de ajustar o equipamento. Para cada amostra processada foram adquiridos 2100 eventos dentro de região pré-estabelecida (300 eventos por parâmetro testado). O cálculo dos níveis de citocinas foi realizado com a utilização do software FCAP Array (BD Pharmingen).



### **3.12 Análise estatística**

Para a avaliação da normalidade dos dados foi utilizado o teste de *D'Agostino e Pearson*. Para comparação dos pacientes antes e após o tratamento foi utilizado o teste de *Wilcoxon* e Teste T Pareado. Para as correlações entre os dados foi utilizado teste de *Spearman*. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados como significativos. O software *GraphPad Prism 5* foi utilizado para análise dos dados.

### **3.13 Avaliação por comitês de ética**

Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz (Carta de aprovação número 19/2011-CEP/CPqRR/FIOCRUZ/MS).

## **4 RESULTADOS**

#### **4.1 Caracterização da população de estudo**

Para realização desse estudo foram utilizadas amostras de PBMC de quatorze pacientes para imunofenotipagens, sendo doze indivíduos do sexo masculino e dois do sexo feminino, com uma média de idade de 41,17 anos  $\pm$  9,69, que variou de 26 a 62 anos. Desses pacientes, três eram primo infectados, quatro tiveram até cinco infecções e o restante mais que cinco episódios de malária. Durante a infecção pelo *P. vivax* foi observado redução no hematócrito (\*, $01 < P < ,05$ ; pelo teste de *Wilcoxon*), e no número de plaquetas (\*\*, $001 < P < ,01$ ; pelo teste de *Wilcoxon*) e aumento dos níveis de ALT (alanina transaminase) (\*, $01 < P < ,05$ ; pelo teste de *Wilcoxon*). No entanto, não observamos diferença durante a infecção e após o tratamento nos níveis de hemoglobina, hemácias, leucócitos, creatinina e AST (aspartato aminotransferase). Além disso, 12 pacientes apresentaram mialgia, 10 pacientes reportaram cefaléia e 10 pacientes apresentaram calafrios como sintomas maláricos (Tabela 2).

Tabela 2. População do estudo. Dados laboratoriais e clínicos de pacientes infectados com *Plasmodium vivax*.

ID do Paciente	Gênero	Idade	# Casos de Malária			Dados hematológicos								Sintomas		
			1st	<5	≥5	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	Hemácias $\times 10^6/\text{mm}^3$	Leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$	Plaquetas $\times 10^3/\text{mm}^3$	Creatinina mg/dL	AST U/L	ALT U/L	Mialgia	Cefaleia	Calafrios
P26 Pv*	Masculino	41			X	14,2	41,6	4,70	6,1	112	1,00	31	20	Sim	Não	Sim
P26 AT**	Masculino	41				14,0	47,7	4,82	5,0	121	0,55	29	20	Não	Não	Não
P28 Pv	Feminino	41			X	13,8	40,2	4,45	7,7	120	0,70	12	16	Sim	Sim	Sim
P28 AT	Feminino	41				13,3	40,9	4,53	7,0	171	0,90	20	15	Não	Não	Não
P31 Pv	Masculino	28			X	14,4	43,7	4,98	4,7	41	0,30	39	31	Sim	Não	Sim
P31 AT	Masculino	28				15,5	46,9	5,54	6,5	177	0,49	40	38	Não	Não	Não
P33 Pv	Masculino	34			X	13,1	37,6	4,31	5,1	151	0,60	11	15	Sim	Sim	Sim
P33 AT	Masculino	34				13,6	39,1	4,51	8,0	249	0,90	16	15	Não	Não	Não
P36 Pv	Masculino	44		X		14,3	42,0	4,82	6,9	ND	0,07	47	20	Sim	Sim	Não
P36 AT	Masculino	44				15,8	45,3	5,14	5,5	189	0,70	13	12	Não	Não	Não
P37 Pv	Masculino	38	X			13,6	41,4	5,24	4,0	52	0,83	85	68	Sim	Sim	Sim
P37 AT	Masculino	38				15,9	47,7	5,82	6,9	238	0,40	14	15	Não	Não	Não
P38 Pv	Masculino	45		X		13,3	41,9	4,42	5,1	65	1,00	64	35	Sim	Sim	Sim
P38 AT	Masculino	45				17,4	50,6	5,35	4,9	195	0,90	23	42	Não	Não	Não
P39 Pv	Masculino	37	X			13,6	39,1	4,84	2,5	30	1,09	172	178	Sim	Sim	ND
P39 AT	Masculino	37				14,5	43,1	5,2	4,7	94	1,09	25	21	Não	Não	Não
P42 Pv	Masculino	46	ND	ND	ND	11,1	32,2	3,6	2,0	44	0,73	22	31	ND	ND	ND
P42 AT	Masculino	46				14,7	42,6	4,63	3,8	101	0,90	24	22	Não	Não	Não
P43 Pv	Masculino	ND***		X		6,7	23,1	2,62	3,4	220	0,80	20	36	Sim	Sim	Sim
P43 AT	Masculino	ND				13,2	41,0	4,59	5,8	161	0,70	23	19	Não	Não	Não
P48 Pv	Masculino	ND			X	14,2	43,1	4,89	4,1	179	0,70	38	51	Sim	Sim	Sim
P48 AT	Masculino	ND				11,9	38,5	4,4	5,7	201	1,00	26	23	Não	Não	Não
P110 Pv	Masculino	26		X		14,2	41,0	4,9	7,5	119	0,80	28	37	Sim	Sim	Sim
P110 AT	Masculino	26				13,3	37,0	4,1	6,0	201	0,70	23	19	Não	Não	Não
P111 Pv	Feminino	62			X	13,0	40,0	5,5	10,0	155	1,00	27	45	Sim	Sim	Sim
P111 AT	Feminino	62				14,4	45,8	5,8	7,5	255	0,70	13	14	Não	Não	Não
P112 Pv	Masculino	52	X			14,2	40,3	4,85	5,0	53	ND	ND	ND	Não	Não	Não
P112 AT	Masculino	52				14,6	40,7	4,71	5,5	176	1,16	23	39	Não	Não	Não

\* Pv: *Plasmodium vivax*

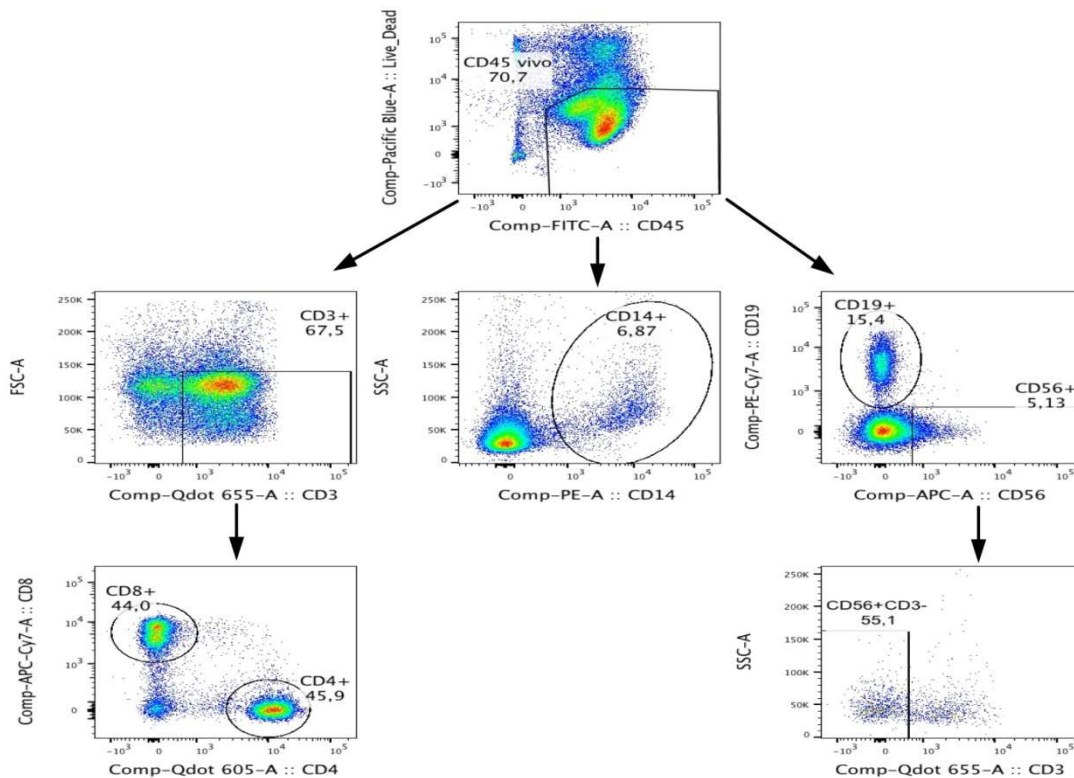
\*\*AT: Após tratamento

\*\*\*ND: Não determinado

## 4.2 Caracterização da população leucocitária

Após descongelamento das PBMC, a viabilidade celular foi avaliada pela incorporação de *Live/Dead*, marcador que permeia membranas de células que perderam a integridade. Esse marcador reage com aminas livres no interior e sobre a superfície da célula, resultando em coloração intensa de células mortas. Em contraste, em células viáveis, apenas as aminas da superfície estão disponíveis para reagir com a sonda, resultando em coloração relativamente fraca, a fim de caracterizar a população leucocitária que se encontra viável. O marcador CD45 foi utilizado para a seleção de leucócitos. O *gate* inicial foi feito, portanto em leucócitos viáveis ( $CD45^{+}Live/dead^{dim}$ ) (Figura 6, painel superior). Dentro desse *gate* foram selecionadas células T ( $CD3^{+}$ ), monócitos ( $CD14^{+}$ ), células B ( $CD19^{+}$ ) e células  $CD56^{+}$  (Figura 6, painéis intermediários).

Os linfócitos T foram subdivididos em duas subpopulações celulares,  $CD4^{+}$  e  $CD8^{+}$  (Figura 6, painel inferior à esquerda). Para a análise das células NK  $CD56^{+}$ , foi realizada a exclusão de células expressando CD3 (Figura 6, painel inferior à direita).

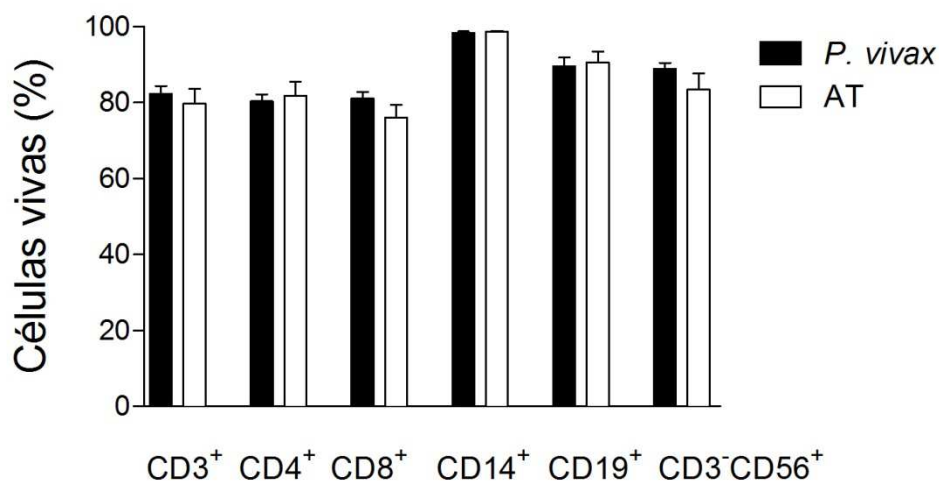


**Figura 6:** Estratégia de *gate* para avaliação de leucócitos de sangue circulantes. Seleção de leucócitos viáveis ( $CD45^{+}live/dead^{dim}$ , dot plot superior). Seleção de células  $CD3^{+}$ ,  $CD14^{+}$ ,  $CD19^{+}$  e  $CD56^{+}$  dentre eventos  $CD45^{+}$  viáveis (painéis intermediários, dot plots da esquerda para a direita). Seleção das células T,

CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (painel inferior à esquerda) e de células CD56<sup>+</sup>, com a exclusão de células CD3<sup>+</sup> (painel inferior à direita).

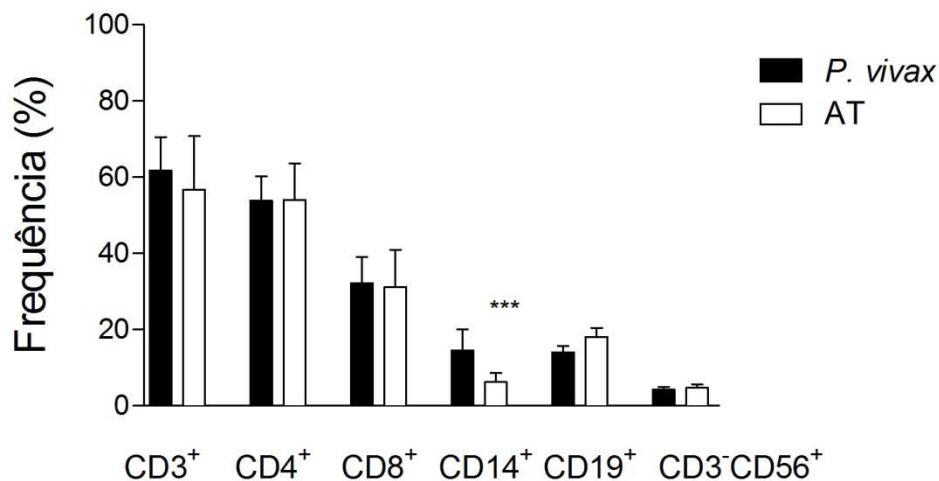
#### 4.2.1 Avaliação da viabilidade e frequência das populações leucocitárias

A imunofenotipagem de populações de leucócitos e subpopulações de células T foi realizada com células congeladas de pacientes na fase aguda da malária e após tratamento por medicamentos preconizados pelo Ministério da Saúde. A viabilidade foi demonstrada no painel de leucócitos caracterizando os principais subtipos celulares encontrados no PBMC. Na imunofenotipagem foram caracterizadas células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>. Não foi observada diferença na viabilidade dessas células na fase aguda da malária e após o tratamento (Figura 7).



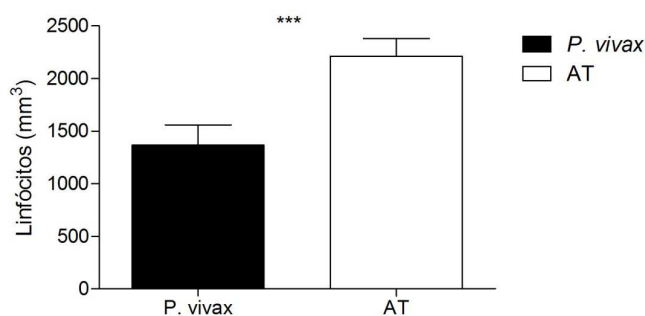
**Figura 7: Viabilidade das populações celulares avaliadas no PBMC.** A frequência de células T totais, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup> vivas foi avaliada após o descongelamento de PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* e após o tratamento (AT) por citometria de fluxo pela incorporação do marcador de viabilidade celular (*Live/dead*). Barras indicam os valores das médias e erro padrão. (n=12)

Foram avaliadas as frequências das células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> em pacientes durante a malária e após o tratamento (AT). Não foi observada alteração nas frequências de subpopulações de linfócitos T ou B ou células expressando CD56. A única alteração encontrada foi na proporção de células CD14<sup>+</sup> (Figura 8).



**Figura 8: Frequência das populações celulares no PBMC.** Frequência de células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> em PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* após o tratamento (AT) após descongelamento. Barras indicam os valores das médias e erro padrão. n=12 \*\*\* P < 0,001, pelo teste de Wilcoxon.

Apesar de não observarmos alteração nas proporções de linfócitos durante a fase aguda da malária, observamos redução no número de linfócitos totais nesses pacientes quando comparados aos mesmos após o tratamento (AT) (Figura 9).

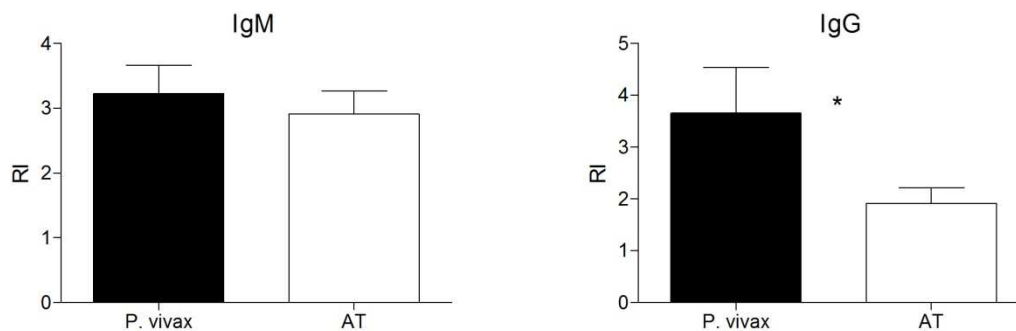


**Figura 9: Pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam diminuição do número absoluto de linfócitos.** Número absoluto de linfócitos avaliado em pacientes infectados pelo *P. vivax* e após o tratamento (AT). Barras indicam os valores das médias e erro padrão. (n=14) \*\*\* P < 0,001, pelo teste de Wilcoxon.

### 4.3 Produção de anticorpos contra antígeno do *Plasmodium vivax* (Pv-AMA-1)

Uma das principais respostas do hospedeiro ao parasito da malária é a produção de anticorpos antígeno-específicos por células B para citotoxicidade dependente de anticorpos e fagocitose mediada por anticorpos, que são mecanismos capazes de controlar o parasito (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2015).

Nossos resultados mostram que não houve diferença nos índices de reatividade de IgM contra PvAMA-1 entre fase aguda e após o tratamento da malária. Entretanto, os níveis de IgG foram maiores na fase aguda da malária em relação aos mesmos pacientes após o tratamento (Figura 10).



**Figura 10: Produção de anticorpos anti-PvAMA-1.** O índice de reatividade de IgM e IgG específicos para AMA-1 avaliado em pacientes infectados pelo *P. vivax* após o tratamento (AT). As barras representam a mediana e o erro padrão. (n=12) \*0,01 < P < 0,05, pelo teste de *Wilcoxon*.

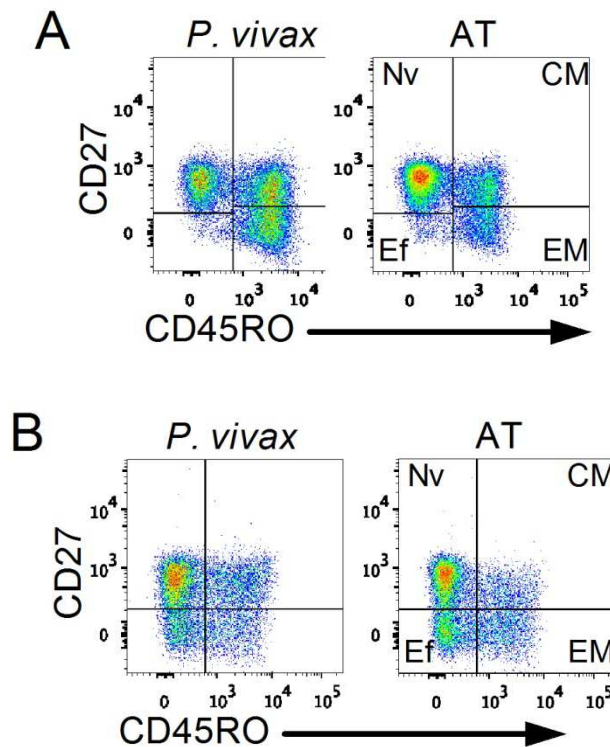
#### 4.4 Alterações do compartimento linfocitário durante a infecção pelo *P. vivax*

Para caracterizar as populações das células T efetoras e de subpopulações de memória foram utilizados os marcadores CD27 e CD45RO. O CD27 é um receptor da família dos receptores de TNF, que possui função co-estimulatória, tendo como ligante a molécula CD70. Seu ligante é presente em células T, B e células dendríticas ativadas, encontradas no centro germinativo e na medula do timo (Tesselaar *et al.*, 2003). O CD27 é importante na caracterização de células de memória antígeno-específicas e na caracterização de células *naive* (Hamann *et al.*, 1997). Várias isoformas da família CD45, que se diferenciam pela glicosilação, foram descritas na literatura até o momento. Em nosso trabalho, avaliamos a expressão da isoforma CD45RO, que é característica de células T de memória e ativadas. Em células *naives* são encontradas as isoformas mais longas, CD45RA (Summers *et al.*, 1994). As células de memória central possuem um papel fundamental na resposta imune, pois são responsáveis pela autorrenovação das células de memória do sistema imunológico, produção de IL-2 e são encontradas em órgãos linfóides secundários e sangue. As células de memória efetora são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , em maiores níveis que as células de memória central. Essas células são geradas a partir da renovação das células



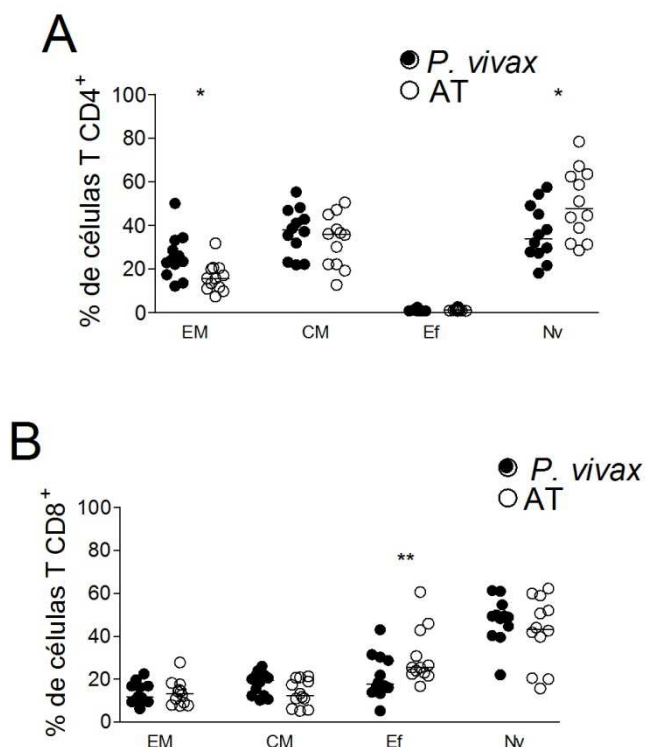
de memória central e são as responsáveis pela rápida resposta imune a antígenos já apresentados ao nosso organismo (Farber *et al.*, 2014).

A Figura 11 representa como foram analisadas as frequências de células T CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) de memória central (CM), memória efetora (EM), células T *naive* (Nv) e efetoras (Ef) de pacientes antes do tratamento (*P. vivax*) e após o tratamento (AT) da doença baseando-se na expressão de CD27 e CD45RO.



**Figura 11: Estratégia de *gate* para caracterização de células T de memória, *naive* e efetora.** *Dot plots* representativos mostram a expressão de CD45RO e CD27 em células T CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) para a caracterização de células T de memória central (CD27<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, CM), memória efetora (CD27<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>, EM), *naive* (CD27<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>, Nv) e efetora (CD27<sup>-</sup>CD45RO<sup>-</sup>, Ef).

Não houve diferença entre as frequências de células T CD4<sup>+</sup> de memória central (CD27<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) ou efetoras (CD27<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) na fase aguda da doença e após o tratamento (Figuras 11A e 12A). Entretanto, foi observado aumento na frequência de células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora (CD27<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) e diminuição na frequência de células *naive* (CD27<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>) durante a malária quando comparado aos mesmos indivíduos após o tratamento (AT) (Figuras 11 e 12A). No compartimento de células T CD8<sup>+</sup> a única alteração observada foi a diminuição na frequência de células efetoras durante a fase aguda da infecção quando comparado aos mesmos pacientes após o tratamento (AT) (Figura 11B e 12B).

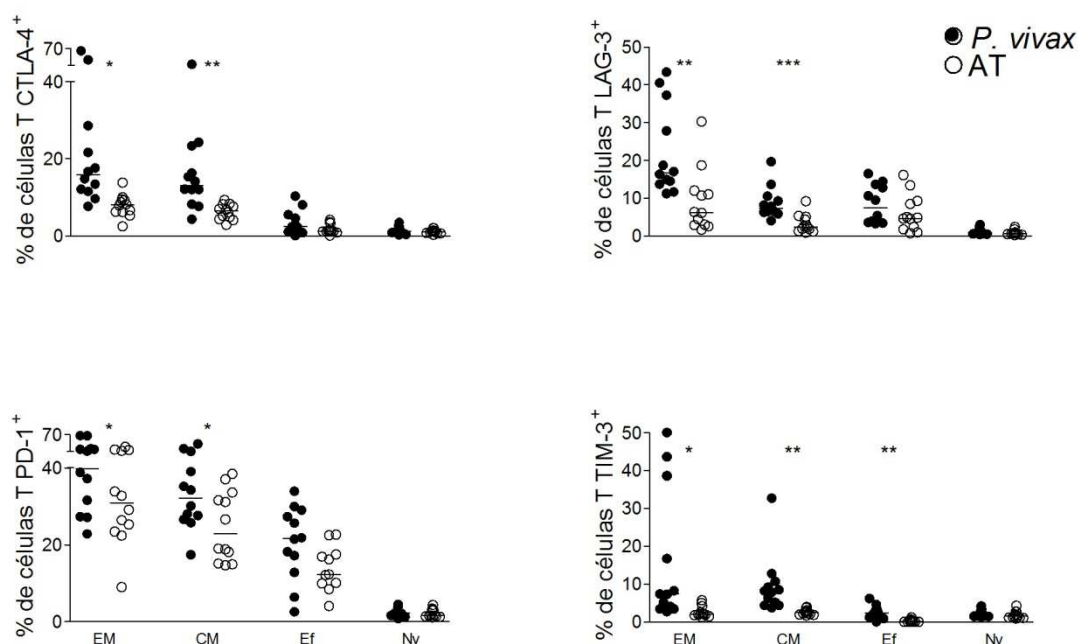


**Figura 12: Avaliação da frequência de células de memória, *naive* e efetora.** A porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B) de EM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), CM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), Ef (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) e Nv (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) foi avaliada durante a infecção pelo *P. vivax* (●) e após o tratamento (○). Símbolos representam pacientes individuais e linhas representam a mediana de cada grupo. Asteriscos representam as comparações entre ● e ○. (n=12) \*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01, pelo teste de *Wilcoxon*.

#### 4.4.1 Expressão de receptores inibitórios é aumentada em células de memória durante a infecção pelo *P. vivax* em relação aos demais subtipos avaliados

A avaliação da expressão de receptores inibitórios foi realizada durante a realização de minha dissertação de mestrado. Demos continuidade a análises mais detalhadas, levando-se em consideração quatro das possíveis subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, de memória efetora e central, além de células *naive* e efetoras durante a infecção pelo *P. vivax* (Figuras 13 e 14). Foi observado aumento das frequências de células T CD4<sup>+</sup> expressando CLTA-4, LAG-3, PD-1 e TIM-3 nos compartimentos de células de memória efetora e central durante a infecção quando comparado aos mesmos indivíduos após o tratamento (Figura 13). Também foi observada frequência aumentada de células T CD4<sup>+</sup> efetoras expressando TIM-3 durante a fase aguda da infecção comparada com indivíduos após o tratamento (Figura 13).

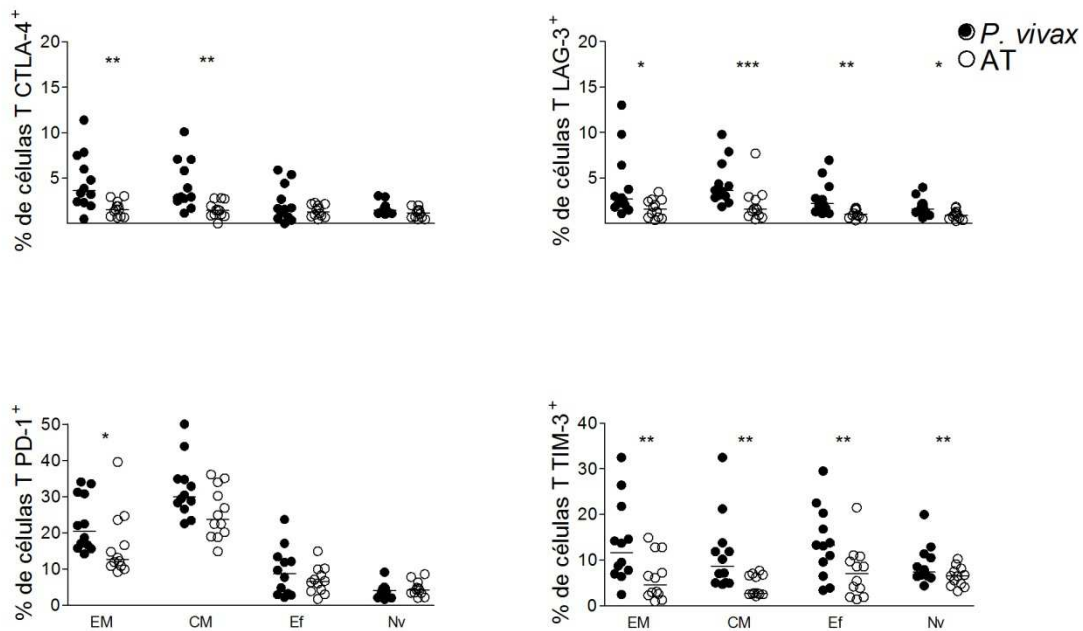
A



**Figura 13: Avaliação da frequência de receptores inibitórios em células T CD4<sup>+</sup> de memória, *naive* e efetora.** A porcentagem de receptores inibitórios em células T CD4<sup>+</sup> EM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), CM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), Ef (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) e Nv (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) foi comparada durante a infecção pelo *P. vivax* (●) e após o tratamento (○). Linhas representam as medianas de cada grupo. Símbolos representam pacientes individuais e linhas representam a mediana de cada grupo. Asteriscos representam as comparações entre ● e ○. (n=12) \*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001, pelo teste de Wilcoxon.

Além disso, foi observado aumento das frequências de células T CD8<sup>+</sup> expressando CLTA-4, LAG-3, PD-1 e TIM-3 no compartimento de células de memória efetora durante a infecção pelo *P. vivax* (Figura 14). A presença do parasito também levou ao aumento das frequências de células T CD8<sup>+</sup> expressando CLTA-4, LAG-3 e TIM-3 no compartimento de células de memória central. Por fim, houve aumento da frequência de células T CD8<sup>+</sup> *naive* e efetoras expressando TIM-3 e LAG-3 durante a fase aguda da malária (Figura 14).

B

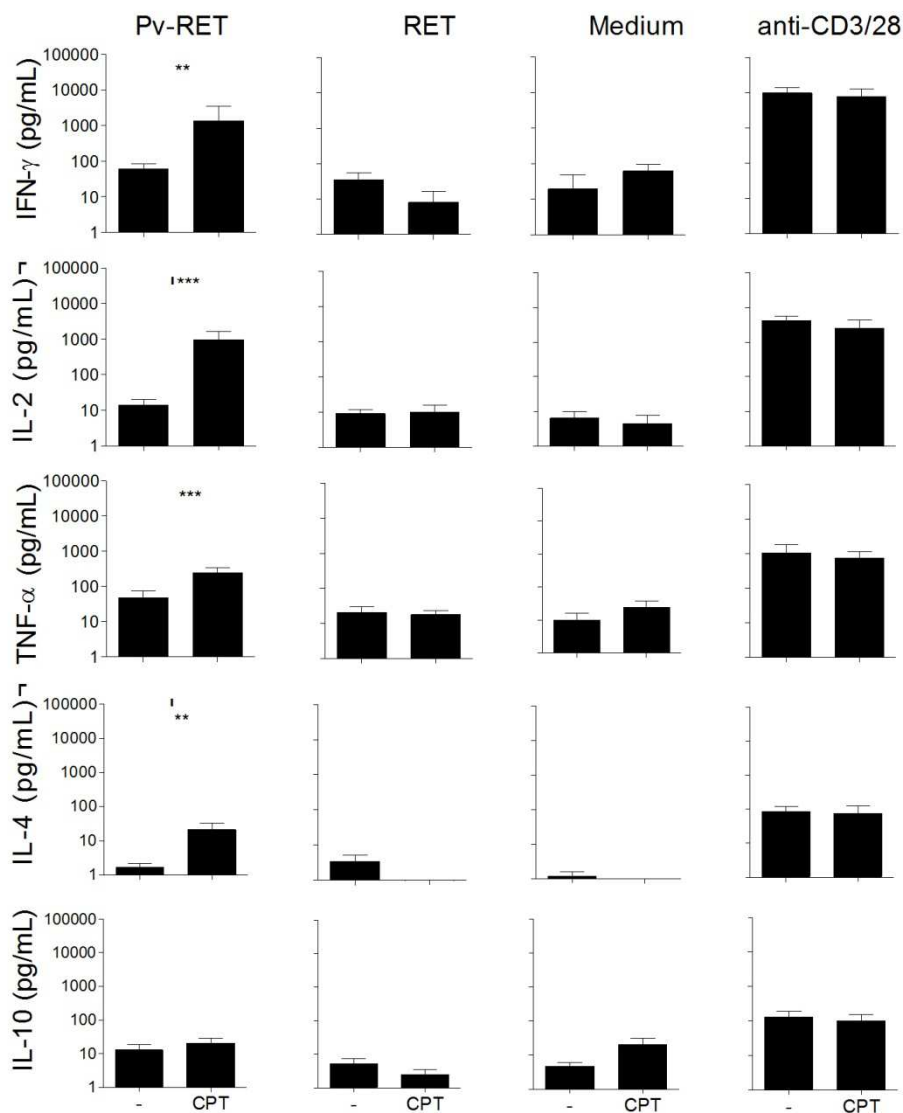


**Figura 14: Avaliação da frequência de receptores inibitórios em células T CD8<sup>+</sup> de memória, *naive* e efetora.** A porcentagem de receptores inibitórios em células T CD8<sup>+</sup> EM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), CM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), Ef (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) e Nv (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) foi comparada durante a infecção pelo *P. vivax* (●) e após o tratamento (○). Linhas representam as medianas de cada grupo. Símbolos representam pacientes individuais e linhas representam a mediana de cada grupo. Asteriscos representam as comparações entre ● e ○. (n=12) \*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001, pelo teste de Wilcoxon.

#### 4.5 Influência de receptores inibidores na produção de citocinas

A fim de avaliar a função de receptores inibitórios na modulação da resposta imunológica, reticulócitos parasitados foram maturados, enriquecidos e colocados em cultura com PBMC de pacientes infectados. A sinalização através das moléculas CTLA-4, PD-1 e TIM-3 foram bloqueadas com a utilização de anticorpos monoclonais durante o estímulo antigênico e a produção de citocinas foi avaliada. PBMC de pacientes infectados com o *P. vivax* foram adicionalmente colocados em cultura com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, com reticulócitos não infectados e na ausência de estímulos. Quando as células foram cultivadas com os reticulócitos infectados pelo *P. vivax* na presença dos anticorpos bloqueadores houve aumento na produção de IFN- $\gamma$  (59,78 pg/mL vs 1353,54 pg/mL; P = ,005), IL-2 (14,11 pg/mL vs 969,51 pg/mL; P = ,030), TNF- $\alpha$  (46,95 pg/mL vs 244,21 pg/mL; P = ,001) e IL-4 (1,68 pg/mL vs 21,41 pg/mL; P = ,007). Apenas não foi observado aumento nos níveis de IL-10 (13,03 pg/mL vs 20,90

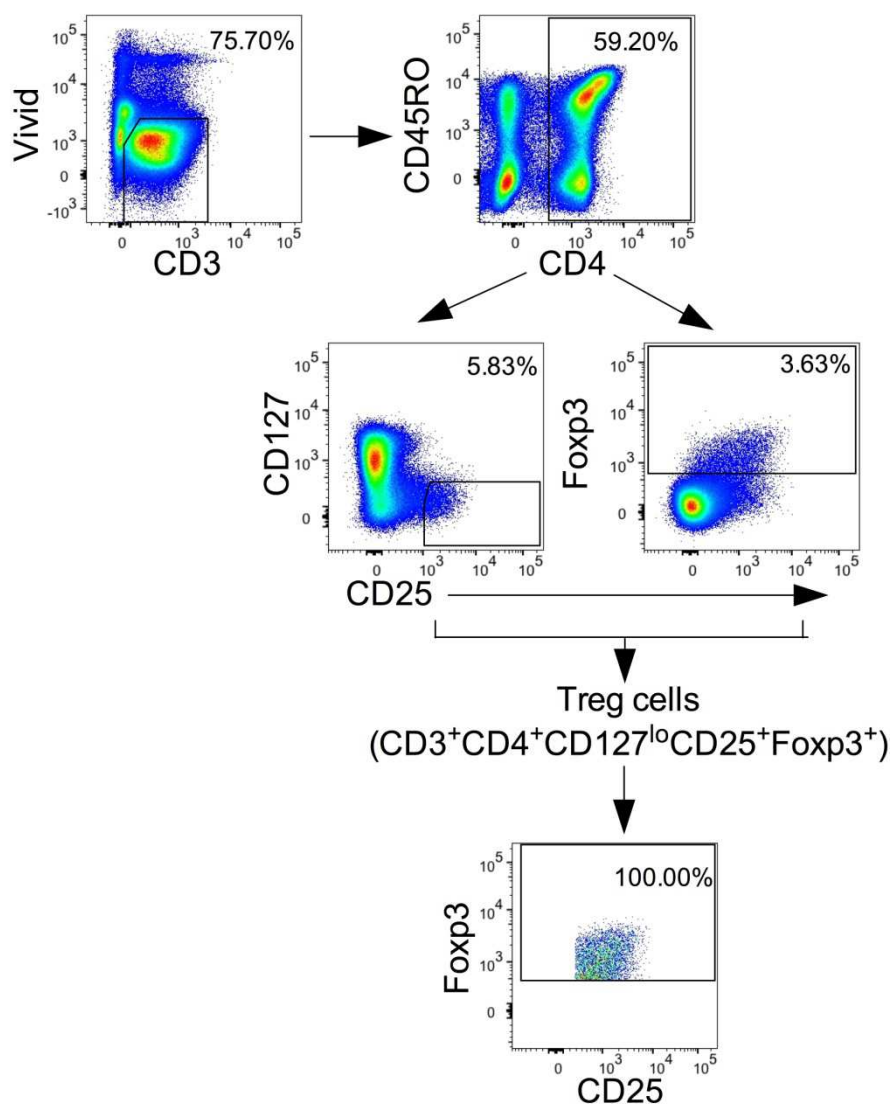
pg/ mL;  $P = ,110$ ).O bloqueio dos receptores inibitórios não alterou os níveis de citocinas quando as PBMC foram cultivadas na presença de reticulócitos não infectados, na presença de anti-CD3/CD28 ou na ausência de estímulos (Figura 15).



**Figura 15: Bloqueio simultâneo de CTLA-4, PD-1 e TIM-3 aumentam a produção de citocinas durante a infecção pelo *P. vivax*.** PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* foram cultivados na presença de reticulócitos infectados (Pv-RET), reticulócitos não infectados (RET), na ausência de estímulo (Meio) e com anti-CD3/anti-CD28 (anti-CD3/28) (da esquerda para direita), na ausência (-) ou presença de anticorpos bloqueadores anti-CTLA-4, anti-PD-L1 e anti-TIM-3 (CPT). Sobrenadante foi coletado 96 horas após cultura e os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 foram avaliados por CBA. Barras indicam os valores das médias e as linhas o erro padrão de valores coletados em três experimentos independentes. (n = 12). \*\* $0,001 < P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ , pelo teste de Wilcoxon.

#### 4.6 Estratégia de gate para avaliação de células Treg

Para a seleção de células T reguladoras (Treg), primeiramente foi realizado a exclusão de grumos celulares e monócitos através do *gate forward scatter area* (FSC-A) versus *forward scatter height* (FSC-H) (*singlets*). Foram realizados *gates* considerando-se todas as combinações possíveis de fluoróforos para exclusão de grumos celulares e de anticorpos, e, finalmente, a aquisição foi visualizada em função do tempo para certificarmos da ausência de interrupção de fluxo durante a aquisição da amostra. Em seguida foi criado o *boolean gate* (interseção entre diferentes *gates*) para caracterização de células Treg. Foi definida uma matrix de compensação com o uso de *beads* não marcadas e *beads* marcadas com cada fluoróforos individualmente. Na Figura 16 podemos observar a estratégia para avaliação de Treg. Foi realizada a seleção de células CD3<sup>+</sup> viáveis, com a exclusão de células mortas (painel superior, *dot plot* a esquerda). Dentro da população de células T viáveis foi selecionada a subpopulação de células CD4<sup>+</sup> (painel superior, *dot plot* a direita). Seguindo a hierarquia, dentro da população de células T CD4<sup>+</sup> foi realizado o *boolean gate* para definir as células Treg, caracterizadas pela expressão de CD25, baixa expressão de CD127 (painel inferior, *dot plot* a esquerda) e expressão de Foxp3 (painel inferior, *dot plot* a direita), que resulta na seleção de células Treg CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Alguns trabalhos na malária avaliam a população de células Treg sem o uso do marcador CD127 (Liu *et al.*, 2006; Bueno *et al.*, 2010; Goncalves *et al.*, 2010).

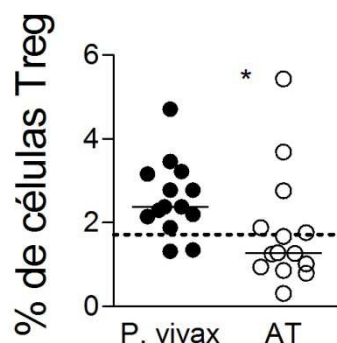


**Figura 16: Estratégia de *gate* para seleção de células Treg.** Células mortas foram excluídas, sendo selecionadas apenas células CD3<sup>+</sup> viáveis. A subpopulação de Treg foi definida através da expressão de CD4 e a expressão simultânea de FcγR3, CD25 e baixa ou negativa para CD127.

#### 4.7 Influência do *P. vivax* na frequência de células Treg circulantes e na indução de receptores inibitórios

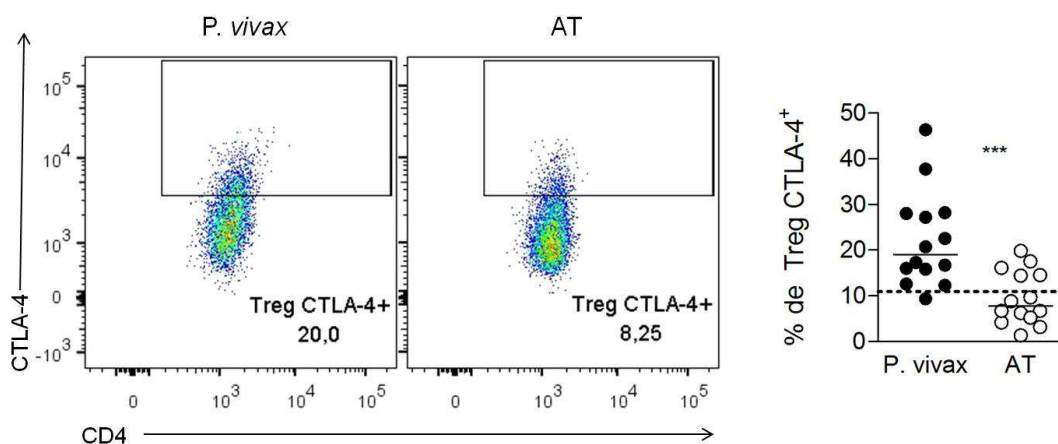
A infecção pelo *P. vivax* induz a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Leoratti *et al.*, 2012). Desse modo é necessário que células do sistema imune atuem para modular respostas potencialmente nocivas. O sistema imunológico pode exercer essa função de várias maneiras, por exemplo, com a atuação de células Treg, através da produção de citocinas e contato célula-célula (Mills, 2004). Durante a

infecção pelo *P. vivax* observamos um aumento da frequência de células Treg em relação aos indivíduos após o tratamento e os indivíduos saudáveis (Figura 17).



**Figura 17: A infecção pelo *Plasmodium vivax* leva ao aumento na frequência de células Treg.** A frequência de células Treg foi avaliada em pacientes infectados pelo *P. vivax* antes (●) e após o tratamento (○). Linha tracejada a mediana dos indivíduos saudáveis de área endêmica. Símbolos representam pacientes individuais e linhas representam a mediana de cada grupo. (n=14). \*0,01 < P < 0,05, pelo teste de *Wilcoxon*.

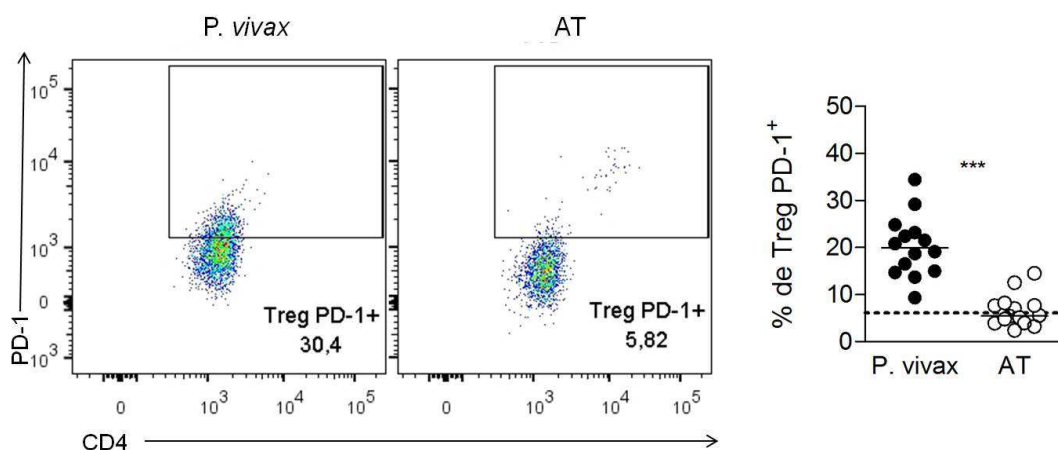
Após identificação das populações das células T CD4, como descrito acima, foram avaliadas as moléculas reguladoras expressas por células Treg. Os níveis de expressão de CTLA-4 por células de pacientes infectados pelo *P. vivax* e dos mesmos após tratamento com antimaláricos foram avaliados. Foi observado aumento da frequência de células Treg CTLA-4<sup>+</sup> durante a malária aguda em comparação com os mesmos pacientes após o tratamento (Figura 18). Sendo assim, observamos que a infecção desencadeia o aumento da expressão de CTLA-4 em células Treg.



**Figura 18: Expressão de CTLA-4 por células Treg é induzida em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*.** Dot plots representativos mostram as frequências de linfócitos Treg expressando CTLA-4 de pacientes infectados pelo *P. vivax* (painel à esquerda e gráfico de dispersão (●)) e após o tratamento (painel à direita e gráfico de dispersão (○)). Símbolos representam pacientes individuais e linhas representam a mediana de cada grupo. A linha tracejada representa indivíduos saudáveis de área endêmica. (n=14). \*\*0,001 < P < 0,01, pelo teste de *Wilcoxon*.

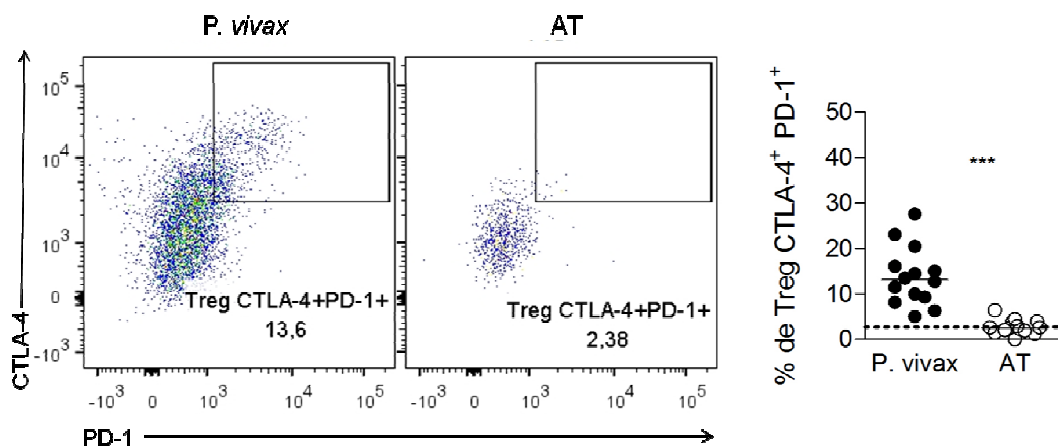


Além da indução da expressão de CTLA-4, avaliamos os níveis de expressão de PD-1 em células Treg de pacientes infectados pelo *P. vivax* e dos mesmos após tratamento com antimaláricos (Figura 19). Foi observado aumento da frequência de células Treg PD-1<sup>+</sup> nos pacientes infectados em relação aos mesmos pacientes após tratamento e em relação aos indivíduos saudáveis (Figura 19).



**Figura 19: Expressão de PD-1 por células Treg é induzida em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*.** Dot plot representativo mostra a frequência de células Treg expressando PD-1 de pacientes infectados pelo *P. vivax* (painel à esquerda e gráfico de dispersão (●)) e após o tratamento (painel à direita e gráfico de dispersão (○)). Símbolos representam pacientes individuais e linhas representam a mediana de cada grupo. A linha tracejada representa indivíduos saudáveis de área endêmica. (n=14). \*\*\* p < 0,01, pelo teste de *Wilcoxon*.

Após caracterização individual da expressão dos marcadores de interesse, como demonstrado acima, foi avaliada a co-expressão de CTLA-4 e PD-1 em Treg de pacientes infectados pelo *P. vivax* em comparação com os mesmos pacientes depois do tratamento e em relação aos indivíduos saudáveis (Figura 20).

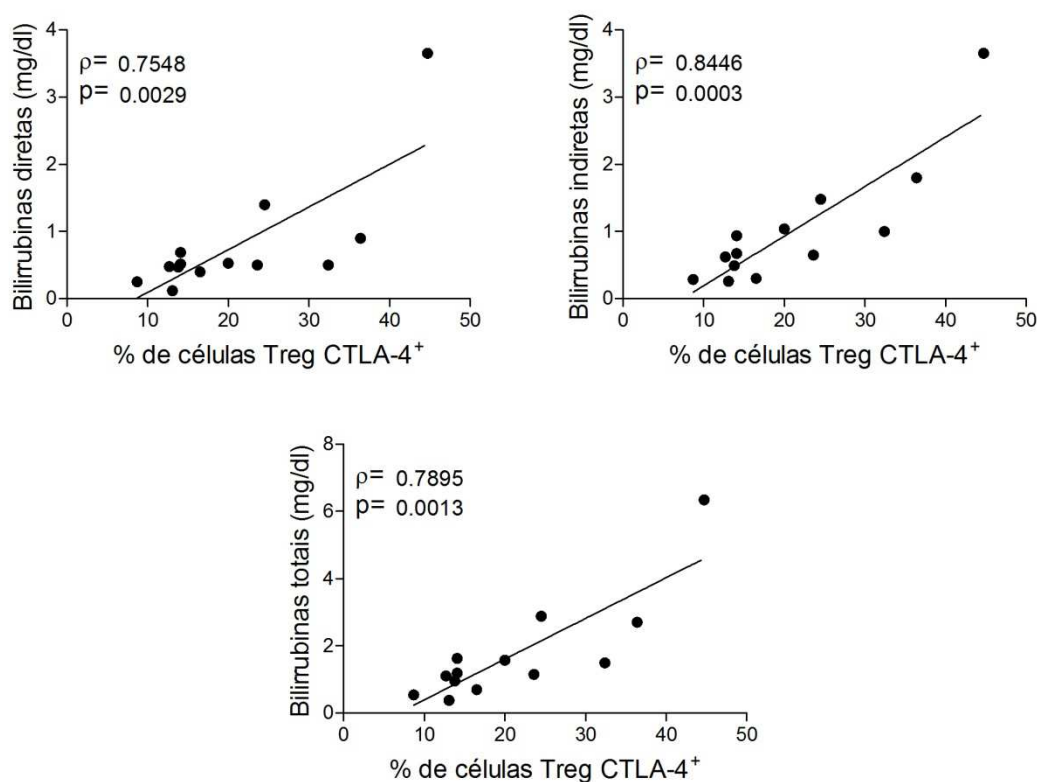


**Figura 20: Expressão simultânea de CTLA-4 e PD-1 por células Treg é induzida em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax*.** Dot plot representativo mostra a frequência de células Treg

expressando CTLA-4 e PD-1 de pacientes infectados pelo *P. vivax* (painel à esquerda e gráfico de dispersão (●)) e após o tratamento (painel à direita e gráfico de dispersão (○)). Símbolos representam pacientes individuais e linhas representam a mediana de cada grupo. A linha tracejada representa indivíduos saudáveis de área endêmica. (n=14). \*\*\*  $p < 0,01$ , pelo teste de *Wilcoxon*.

#### 4.8 Correlação das subpopulações de células Treg e receptores inibidores com parâmetros bioquímicos

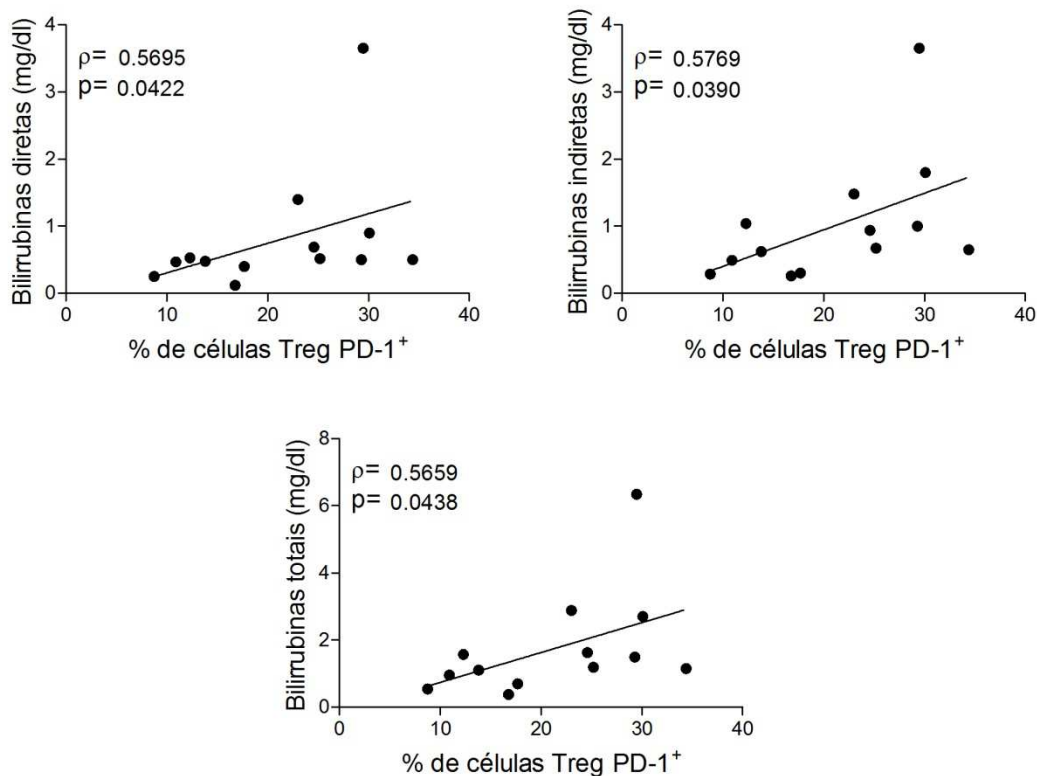
A fim de demonstrar que os marcadores avaliados estão associados às manifestações clínicas na malária, foram realizadas correlações entre as frequências de células Treg expressando os marcadores de interesse e os níveis de bilirrubina dos pacientes infectados pelo *P. vivax*. Observamos que o aumento na frequência de células Treg expressando CTLA-4 correlaciona com aumento nos níveis circulantes de bilirrubinas diretas ( $\rho=0,7548$  e  $p=0,0029$ ), indiretas ( $\rho=0,8446$  e  $p=0,0003$ ) e totais ( $\rho=0,7895$  e  $p=0,0013$ ) (Figura 21).



**Figura 21:** Níveis de bilirrubinas correlacionam com expressão de CTLA-4 em células Treg durante a infecção pelo *P. vivax*. Proporções de células Treg expressando CTLA-4, representadas no eixo X, e níveis de bilirrubinas diretas, indiretas e totais (mg/dl), representados no eixo Y, de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Símbolos representam pacientes individuais e retas representam regressão linear. (n=12).

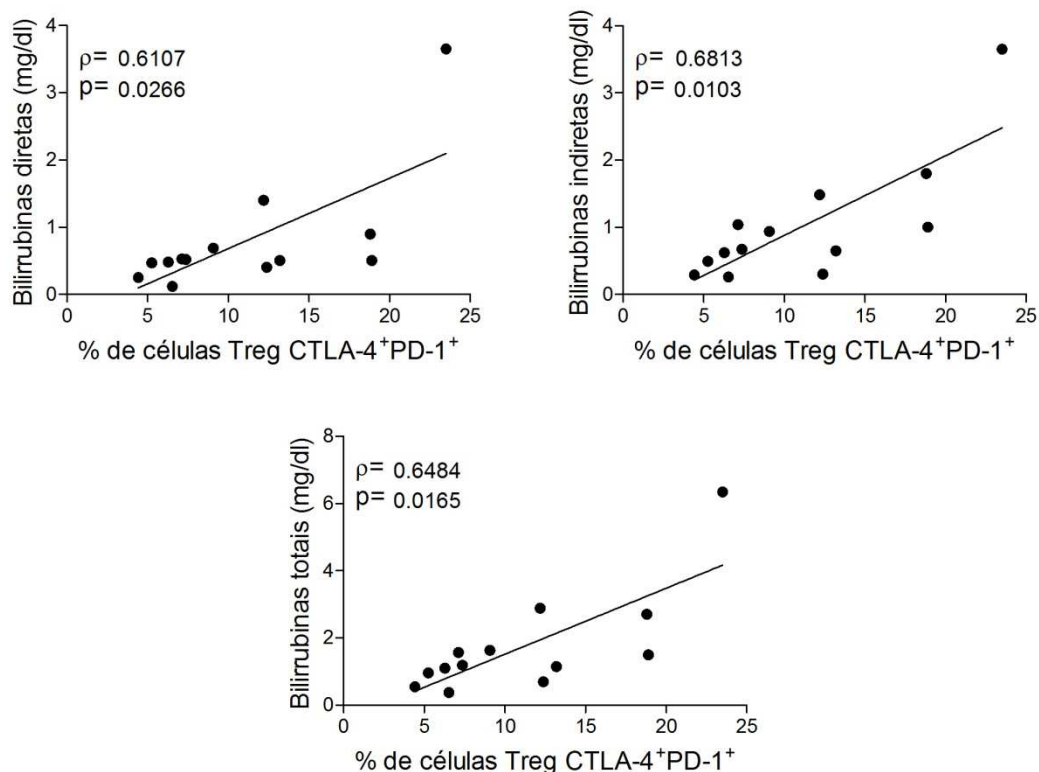
Nossos resultados mostraram que não há correlação entre a frequência das células Treg totais e os níveis de bilirrubinas circulantes durante a malária (dado não mostrado). No entanto, a correlação aparece se considerarmos a expressão de PD-1.

Assim, quanto maior a frequência de células Treg expressando PD-1, maiores os níveis de bilirrubinas diretas ( $\rho=0,5695$  e  $p=0,0422$ ), indiretas ( $\rho=0,5769$  e  $p=0,0390$ ) e totais ( $\rho=0,5659$  e  $p=0,0438$ ) (Figura 22).



**Figura 22: Níveis de bilirrubinas correlacionam com expressão de PD-1 em células Treg durante a infecção pelo *P. vivax*.** Proporções de células Treg expressando PD-1, representadas no eixo X, e níveis de bilirrubinas diretas, indiretas e totais (mg/dl), representados no eixo Y, de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Símbolos representam pacientes individuais e retas representam regressão linear. (n=13).

Além da avaliação individual de cada molécula, observamos que quanto maior a frequência de células Treg expressando simultaneamente CTLA-4 e PD-1, maiores os níveis de bilirrubina diretas ( $\rho=0,6107$  e  $p=0,0266$ ), indiretas ( $\rho=0,6813$  e  $p=0,0103$ ) e totais ( $\rho=0,6484$  e  $p=0,0165$ ) dos pacientes infectados pelo *P. vivax* (Figura 23).

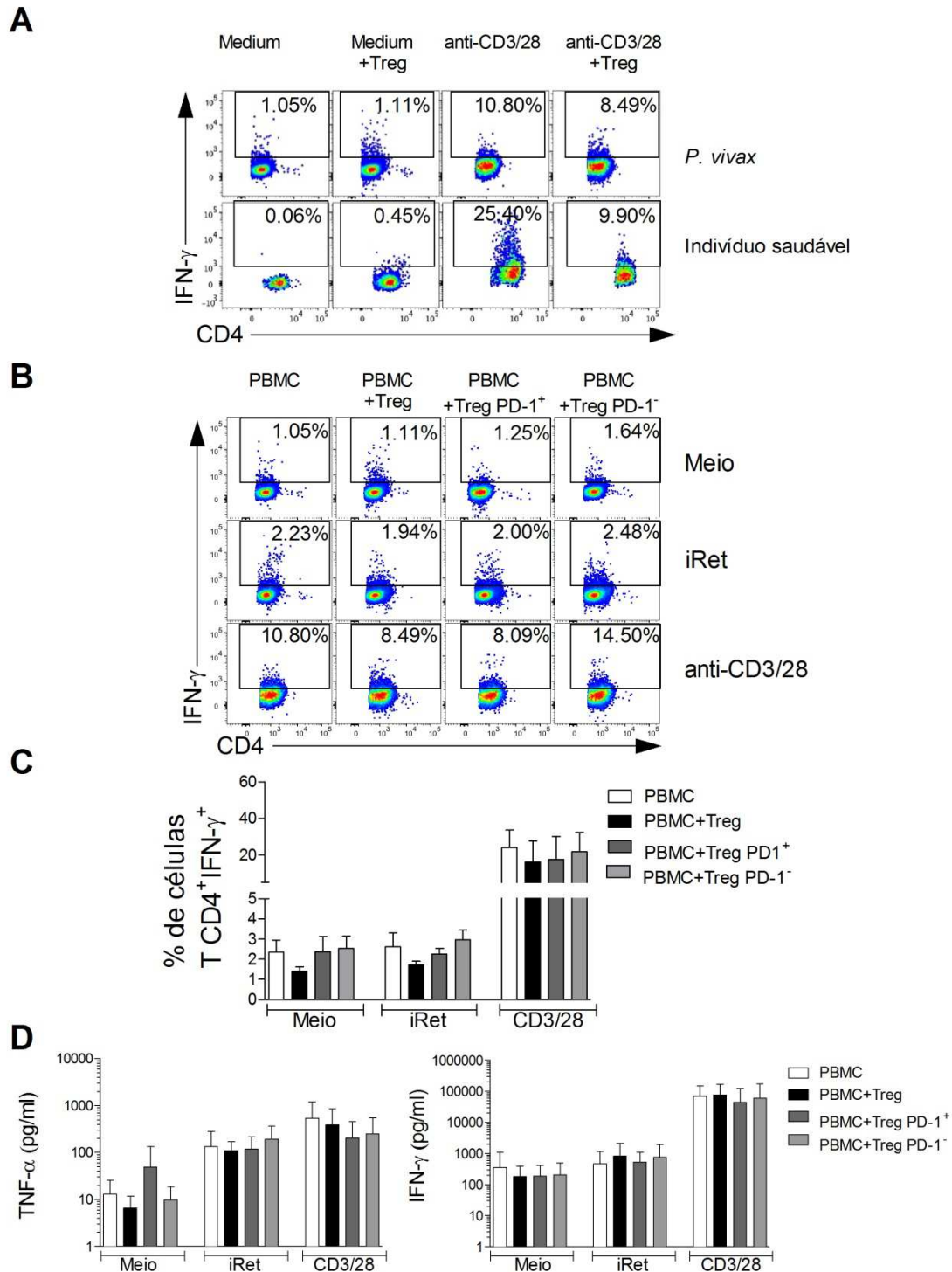


**Figura 23:** Níveis de bilirrubinas correlacionam com expressão simultânea de CTLA-4 e PD-1 em células Treg durante a infecção pelo *P. vivax*. Proporções de células Treg expressando CTLA-4 e PD-1, representadas no eixo X, e níveis de bilirrubinas diretas, indiretas e totais (mg/dl), representados no eixo Y, de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Símbolos representam pacientes individuais e retas representam regressão linear. (n=13).

#### 4.9 Co-cultura de PBMC de pacientes infectados com células Treg e suas subpopulações

Ensaio imunomodulatório foram realizados para avaliar a influência das células Treg na resposta imune. As células efetoras de pacientes infectados pelo *P. vivax* (Figura 24 A, painel superior) e de indivíduo saudável (Figura 24 B, painel inferior) foram cultivadas na presença e ausência de células Treg, com e sem estímulo (anticorpos anti-CD3 e anti-CD28). Avaliamos a produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> a fim de medir a capacidade reguladora das células Treg. A capacidade das células Treg em modular a resposta imune foi confirmada em indivíduos saudáveis (Figura 24A, painel inferior). Contudo, as células Treg dos pacientes infectados com *P. vivax* não modularam a resposta imune (Figura 24A, painel superior). A fim de demonstrar a influência de PD-1 em células Treg durante a malária, culturas foram preparadas com PBMC de pacientes na fase aguda da malária, depletados de monócitos e de células Treg, e acrescidas de números conhecidos de monócitos, subpopulações de Treg (total, PD-1<sup>+</sup> ou PD-1<sup>-</sup>) e diferentes estímulos (meio, iRet ou anti-CD3/28) (Figura 24 B e C). Independente da

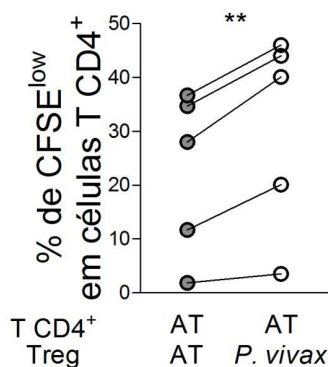
subpopulação de células Treg utilizadas nos experimentos, não observamos alteração nos níveis de IFN- $\gamma$  avaliados. Células T CD4<sup>+</sup> foram avaliadas, pois são importantes na produção de IFN- $\gamma$  durante a fase sanguínea da malária, enquanto T CD8<sup>+</sup> possui função efetora destacada durante a fase hepática da doença (Cockburn *et al.*, 2013; Jagannathan, Eccles-James, *et al.*, 2014). Adicionalmente foram avaliados os níveis de citocinas no sobrenadante de cultura após cinco dias. Do mesmo modo, independente da subpopulação de células Treg utilizadas, não observamos alteração nos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Figura 24D).



**Figura 24: Influência de células Treg, Treg PD-1<sup>+</sup> e Treg PD-1<sup>-</sup> na produção de IFN- $\gamma$  por pacientes infectados pelo *P. vivax*.** PBMC de pacientes infectados (A, painel superior) e de pacientes saudáveis (A, painel inferior) foram cultivados na presença de células Treg em meio ou anti-CD3/anti-CD28. PBMC de pacientes infectados pelo *P. vivax* foram depletados de monócitos e células T reguladoras, reconstituídos com número conhecido de monócitos, e cultivados com meio (B, dot plots superiores e C e D), reticulócitos infectados (iRet) (B, dot plots intermediários e C e D) e anti-CD3/anti-CD28 (B, dot plots inferiores e C e D), na ausência (n=6) ou presença de células Treg (n=4), Treg PD-1<sup>+</sup> (n=6) e Treg PD-1<sup>-</sup> (n=6) (B, da esquerda para direita e C e D). As barras representam médias e linhas representam erro padrão.

#### 4.10 Co-cultura de Treg de pacientes durante a infecção pelo *P. vivax* ou após o tratamento e células efetoras de pacientes após a cura.

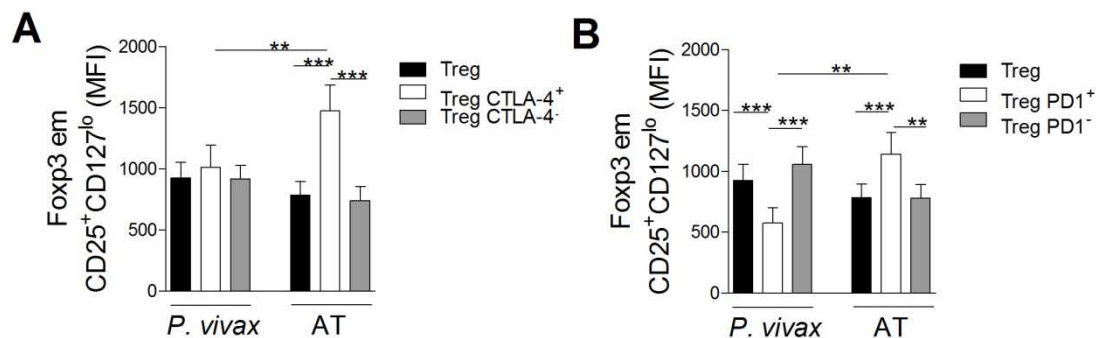
Células efectoras T CD4<sup>+</sup> marcadas com CFSE, provenientes de indivíduos após o tratamento foram cultivadas em número pré-estabelecido com células Treg dos mesmos pacientes após o tratamento ou células Treg dos mesmos durante a infecção pelo *P. vivax*, na presença de anti-CD3/28. As células efectoras T CD4<sup>+</sup> apresentaram maior capacidade proliferativa na presença de células Treg de indivíduos durante a infecção pelo *P. vivax* (Figura 25D).



**Figura 25:** A influência de células Treg antes e após tratamento com drogas anti-maláricas na proliferação de células T CD4<sup>+</sup>. Células efectoras T CD4<sup>+</sup> de indivíduos após o tratamento com drogas anti-maláricas marcadas com CFSE foram cultivadas na presença de células Treg de pacientes após o tratamento (●) ou de células Treg dos mesmos pacientes infectados pelo *P. vivax* (○). (n=5) \*\*0,001 < P < 0,01, pelo teste T Pareado.

#### 4.11 Avaliação da expressão dos níveis de Foxp3

Para melhor compreender a influência de moléculas inibidoras, avaliamos o quanto a expressão dessas moléculas pode afetar a expressão de uma molécula essencial para a célula Treg: o Foxp3. Em primeiro lugar, avaliamos a MFI (intensidade média de fluorescência) de Foxp3 em células Treg expressando CTLA-4 e PD-1 de pacientes durante a infecção pelo *P. vivax* e após o tratamento (AT) (Figura 26A e 26B). Nossos resultados mostram que os maiores níveis de expressão de Foxp3 são encontrados nas Treg que expressam CTLA-4 (AT), mas esses níveis de expressão diminuem nos indivíduos infectados pelo *P. vivax* (Figure 26A). Por outro lado, a expressão de Foxp3 está diminuída nas células Treg PD-1 em comparação às células Treg e Treg PD-1<sup>-</sup> (Fig 26B). Observou-se também diminuição da expressão de Foxp3 dos pacientes durante a infecção em relação aos indivíduos após o tratamento quando as células Treg expressam PD-1 (Figura 26B).

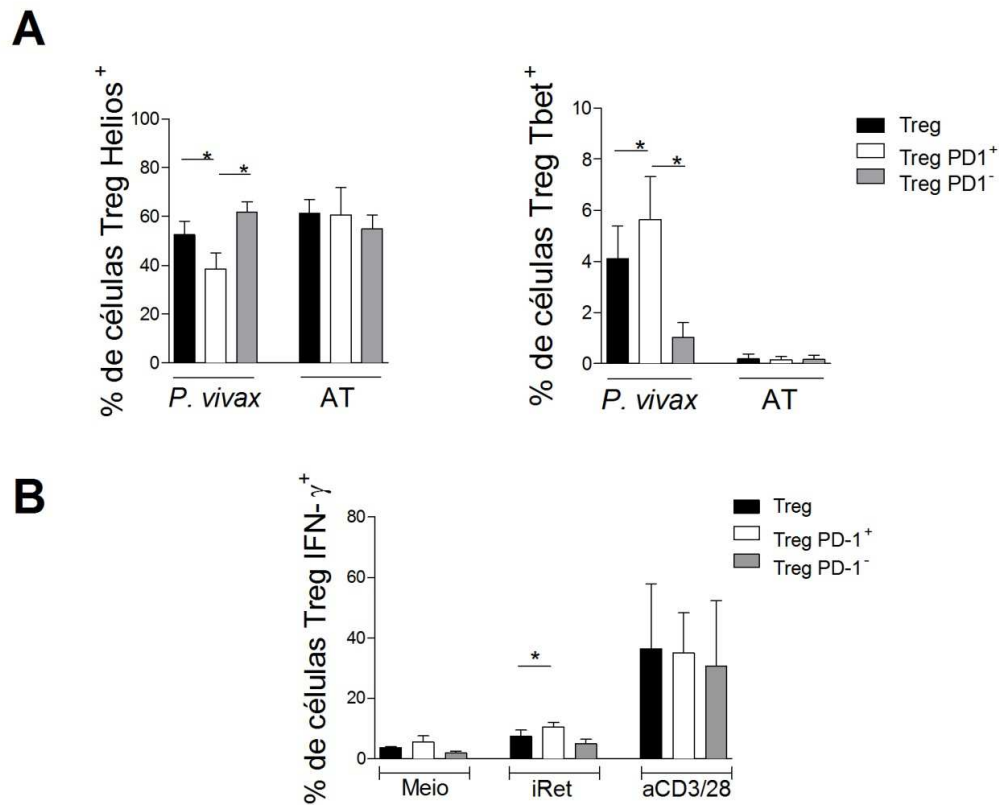


**Figura 26: Subpopulações de células Treg apresentam diferentes níveis de Fxp3.** A expressão de Fxp3 (MFI) foi caracterizada em células Treg, Treg CTLA-4<sup>+</sup> e Treg CTLA-4<sup>-</sup> (A) ou Treg, Treg PD-1<sup>+</sup> e Treg PD-1<sup>-</sup> (B) durante a infecção (*P. vivax*) ou após o tratamento (AT). As barras representam médias e linhas representam erro padrão de quatorze pacientes. (n=14) \*\*0,001 < P < 0,01 e \*\*\* P < 0,001 pelo teste de *Wilcoxon*.

#### 4.12 Caracterização fenotípica de fatores de transcrição em células Treg

Nosso próximo passo foi avaliar se a expressão de PD-1 poderia estar associada a alteração na expressão de fatores de transcrição por células Treg durante a malária. Analisamos a frequência de Helios e Tbet em células Treg dos pacientes durante a infecção pelo *P. vivax* e após o tratamento (Figuras 27A). A proporção de células Treg expressando Helios é menor em Treg PD-1<sup>+</sup> quando comparada à Treg e Treg PD-1<sup>-</sup> durante a infecção (Figura 27A). No entanto, a frequência de células Treg que expressam Tbet aumenta dentro às células Treg PD-1<sup>+</sup> quando comparada às células Treg e Treg PD-1<sup>-</sup> durante a infecção (Figura 27A). No entanto, não foi observada diferença na frequência da expressão de fatores de transcrição em células Treg e subpopulações de pacientes após tratamento da doença (Figura 27A). A fim de confirmar os resultados anteriores, avaliamos a produção IFN- $\gamma$  por células Treg e suas subpopulações de células provenientes de pacientes infectados pelo *P. vivax*. Foi observado maior produção de IFN- $\gamma$  por células Treg PD-1<sup>+</sup> em relação às células Treg na presença de estímulo antígeno-específico (Figura 27B).





**Figura 27: Expressão de Helios, Tbet e a produção de IFN- $\gamma$  estão associadas à expressão de PD-1 em células Treg de pacientes infectados pelo *P. vivax*. A expressão de Helios e Tbet foi avaliada em células Treg, Treg PD-1<sup>+</sup> e Treg PD-1<sup>-</sup> durante a infecção (*P. vivax*) ou após o tratamento (AT) (A) (n=5). A produção de IFN- $\gamma$  foi avaliada em células Treg (n=4), Treg PD-1<sup>+</sup> (n=6) e Treg PD-1<sup>-</sup> (n=6) durante a infecção (*P. vivax*), em diferentes condições de cultura; ausência de estímulo (meio), reticulócitos infectados (iRet) e anti-CD3/anti-CD28 (B). As barras representam médias e linhas representam erro padrão de cinco pacientes. \*0,01 < P < 0,05, pelo teste de Wilcoxon.**

## **5 DISCUSSÃO**

## Discussão

---

Porto Velho, cidade de aproximadamente 370 mil habitantes, vem apresentando queda significativa nos casos de malária, mas ainda apresenta diferentes riscos à população, como dengue, hepatite, leishmaniose e doenças fúngicas (Saúde, 2016). Durante a malária o paciente desenvolve sintomas que pode ser confundida com outras doenças tropicais. A trombocitopenia, fenômeno também observado na malária, pode ser explicada pela fagocitose e lise de plaquetas. O aumento do baço teria papel nesse fenômeno visto que a esplenectomia de camundongos infectados pelo *P. chabaudi* ocasiona aumento da contagem de plaquetas nesses animais (Watier *et al.*, 1992). Além disso, foi relatada uma possível relação entre trombocitopenia e fagocitose em pacientes infectados pelo *P. vivax* (Coelho *et al.*, 2013). Por fim, o aumento de ALT pode indicar dano hepático ocasionado pela infecção pelo *P. vivax*. Adicionalmente, foram avaliadas as frequências de linfócitos T e suas subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>). Além de avaliar a frequência de células da imunidade inata, como os monócitos (CD14<sup>+</sup>) e as células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) em pacientes durante a malária e após o tratamento (AT). Estamos cientes que somente a expressão de CD56 não é suficiente para a caracterização da população de células NK. Marcadores como CD57 e CD16 também seriam importantes para essa caracterização, no entanto trabalhos que não diferenciam as subpopulações de células NK utilizam apenas CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> (Horowitz *et al.*, 2010). Não foi observada alteração nas frequências de subpopulações de linfócitos T, B ou células expressando CD56. No entanto a única alteração encontrada foi na proporção de células CD14<sup>+</sup> (Figura 8). Como já descrevemos anteriormente, a infecção pelo *P. vivax* desencadeia o aumento da frequência de monócitos circulantes (Antonelli *et al.*, 2014). A linfopenia é um fenômeno clássico da malária (Hviid e Kemp, 2000), no entanto não observamos diminuição da frequência de linfócitos por citometria, por outro lado foi possível observar a linfopenia em hemogramas dos pacientes (Figura 9).

Em nosso trabalho foram avaliados os níveis plasmáticos de IgM e IgG contra o antígeno PvAMA-1 e PvMSP-1, que já foi utilizado como antígeno vacinal em modelo murino (Gentil *et al.*, 2010). Apenas o antígeno AMA-1 foi demonstrado, pois o não houve diferença significativa entre durante a infecção e após o tratamento utilizando o antígeno MSP-1. Sabe-se que os níveis de IgM estão aumentados na fase aguda de

doenças tropicas, incluindo a malária (Fakunle e Greenwood, 1976). Entretanto, nossos resultados demonstraram que não houve diferença nos níveis de IgM de pacientes na fase aguda em relação aos mesmos após o tratamento (Figura 10). Esse fato pode ser explicado devido ao curto período de tempo no qual foram comparados os momentos de durante e após o tratamento com drogas anti-maláricas. Altos níveis de IgG começam a ser produzidos durante a fase aguda da malária e continuam a ser produzidos por longos períodos (Wipasa *et al.*, 2010). Nós observamos que os níveis de IgG são maiores na fase aguda da malária em relação a após o tratamento, no entanto os níveis de anticorpos não foram acompanhados por longo período. A diminuição dos anticorpos 30 dias após o tratamento pode ser explicada em termos de populações de células B secretoras de anticorpos de curta duração (de 2-10 dias) que teria diminuído após o tratamento e de longa duração (de 3-9 anos) que seriam as responsáveis pela produção de IgG (White *et al.*, 2014).

Acredita-se que na malária ocorre uma falha no desenvolvimento de células de memória, pois indivíduos apresentam repetidas infecções pela mesma espécie do *Plasmodium spp.* Alguns indivíduos são assintomáticos, tornando-se reservatórios para repasto de novos anofelinos. Uma vez que esses indivíduos deixem áreas altamente endêmicas, perdendo a exposição frequente, eles podem voltar a apresentar sintomas da doença quando re-expostos. Durante a infecção pelo *P. vivax*, observamos aumento de células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora e uma diminuição de células *naive* (Figura 11 e 12A). Apesar de esse resultado mostrar alterações relativas, ele sugere que durante a infecção aguda ocorre alteração no compartimento de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas, que mediante a exposição antigênica, entra em expansão clonal com a finalidade de controlar o parasito. Células T CD4<sup>+</sup> desempenham papel fundamental no controle da doença, produzindo mediadores inflamatórios capazes de ativar células fagocitárias (Jagannathan, Eccles-James, *et al.*, 2014) além de auxiliarem na produção de anticorpos por células B (Crotty, 2011). Já foi demonstrado que indivíduos apresentando doenças que comprometem o compartimento de células T auxiliares perdem a capacidade de produzirem anticorpos (Mount *et al.*, 2004). Em células T CD8<sup>+</sup> foi caracterizada a diminuição na frequência de células efetoras durante a malária (Figura 11 e 12B). Ainda não é bem definida a participação das células T CD8<sup>+</sup> durante a fase sanguínea da infecção pelo *Plasmodium spp.*, no entanto, essas células são essenciais no controle do parasito durante a fase hepática do ciclo parasitário (Hafalla *et al.*, 2012; Cockburn *et al.*, 2013). Apesar disso, observamos que células T CD8<sup>+</sup>

expressam vários marcadores de ativação ainda na fase eritrocitária (Hafalla *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2015), sugerindo seu envolvimento nessa fase da infecção.

No compartimento linfocitário de memória central e efetora foi observado um aumento de CTLA-4, PD-1, PD-1 e TIM-3 durante a infecção (Figura 13 e 14). Apesar da expressão dos receptores inibitórios diminuírem em células de memória efetora e central após a infecção, ainda assim essas células apresentam substancial aumento em relação às demais subpopulações avaliadas. Esse aumento de moléculas inibitórias no compartimento de memória, durante a fase aguda da malária, poderia alterar alguma via de sinalização o que explicaria o comprometimento na geração de memória imunológica na malária. A expressão relativamente aumentada dessas moléculas em células do compartimento de memória, mesmo após o tratamento, corrobora com a nossa hipótese. A expressão de moléculas inibitórias durante a fase aguda da malária pode ser uma possível explicação pela falha no desenvolvimento de uma resposta de memória após exposições ao parasito, pois já está bem estabelecido em outras doenças que a expressão simultânea de mais de uma molécula inibitória (CTLA-4, PD-1, TIM-3 e LAG-3) caracteriza o estágio de exaustão celular (Blackburn *et al.*, 2009). A fim de demonstrar a importância de moléculas inibitórias durante a malária, realizamos ensaios funcionais de bloqueio da sinalização de alguns desses receptores e avaliamos a produção de citocinas (Figura 15). Esses resultados demonstram que a expressão de receptores inibitórios prejudica a produção de citocinas durante a infecção pelo *P. vivax*, pois essa produção pode ser restaurada mediante estímulo antígeno-específico, quando a sinalização dessas moléculas é interrompida por anticorpos monoclonais. Desse modo, as moléculas inibitórias podem impedir que o hospedeiro monte uma resposta imune eficiente ao parasito e a expressão destas moléculas podem modular a resposta imune.

Outra célula importante em manter a homeostase do sistema imune é a Treg, sobretudo na malária, doença caracterizada por desencadear a “tempestade de citocinas” (Vignali *et al.*, 2008; Crompton *et al.*, 2014; Gazzinelli *et al.*, 2014). A frequência aumentada indica que células Treg desempenha função reguladora da resposta imune durante a malária. Outros trabalhos já descreveram o aumento de células Treg na fase aguda da malária humana, mas nenhum dos deles descrevem fazendo uma comparação da frequência de células Treg do mesmo paciente durante a fase aguda e após o tratamento (Bueno *et al.*, 2010; Goncalves *et al.*, 2010) (Figura 17). Na literatura é descrito que quanto mais moléculas inibitórias uma única célula T expressa, maior o prejuízo de sua função. Esse fenômeno foi demonstrado para células T CD4<sup>+</sup> auxiliares

(Blackburn *et al.*, 2009). Além disso, nosso trabalho descreve esse fenômeno de disfunção celular durante a malária pelo *P. vivax* (Costa *et al.*, 2015). Desse modo, uma de nossas hipóteses é que a célula Treg, como outras subpopulações de células T, pode expressar receptores inibitórios que alteram a sua função reguladora. Nossos resultados mostram aumento da expressão de CTLA-4 e PD-1 em células Treg durante a infecção pelo *P. vivax*. A infecção também induz a coexpressão de PD-1 e CTLA-4, o que poderia alterar as funções das células Treg (Figura 18-20). Apesar de agirem por vias diferentes, a coexpressão de CTLA-4 e PD-1 poderia causar prejuízo na função de células Treg na produção de citocinas e outras moléculas reguladoras que atuam no controle da expansão e função de células T efetoras.

O CTLA-4 possui função de transendocitar as moléculas CD80/CD86 e diminuir a apresentação de antígenos por células apresentadoras, o que impacta na produção de citocinas pró-inflamatórias (Salomon *et al.*, 2000; Vignali *et al.*, 2008; Ahmadzadeh *et al.*, 2009; Qureshi *et al.*, 2011), podendo levar consequentemente ao aumento da parasitemia e aumento da lise de células vermelhas, que tem como produto a bilirrubina. Gonçalves-Lopes e colaboradores em 2016 demonstraram o aumento da frequência de células Treg expressando CTLA-4 durante a infecção pelo *P. vivax*. Além disso, observamos correlação positiva entre o aumento da expressão de PD-1 em células Treg com os níveis de bilirrubina. Já foi descrito o aumento de PD-1 no vitiligo, doença autoimune na qual, células do sistema imune reagem contra melanócitos e impedem a produção de melanina. Apesar de existir correlação entre a área do corpo atingida e a frequência de células Treg, não se observou correlação com a expressão PD-1 por células Treg (Tembhre *et al.*, 2015) (Figura 21-23).

Pelo fato de termos observado aumento da frequência de células Treg expressando moléculas inibitórias em células Treg, a investigação da nossa hipótese de que as células Treg possuíam função prejudicada durante a malária foi o próximo passo a ser investigado. Recentemente, demonstramos que células T de pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam menor capacidade de produzir citocinas, em resposta ao estímulo antigênico, quando expressam moléculas inibitórias (Costa *et al.*, 2015). No entanto, observamos que células Treg de pacientes infectados pelo *P. vivax* não são capazes de modular a produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>, diferente de células de pacientes saudáveis (Figura 24A). Já foi demonstrado que a expressão de PD-1 é importante na diminuição da capacidade regulatória de células Treg durante a infecção pelo vírus da hepatite C (Franceschini *et al.*, 2009). Por outro lado, foi demonstrado que

um dos mecanismos de regulação de células T CD8<sup>+</sup> ocorre através da via PD-1/PD-L1, com as células Treg, durante a infecção pelo vírus da coriomeningite linfocítica (Park *et al.*, 2015). Sabendo da importância de PD-1 em células Treg em diferentes modelos, avaliamos sua influência da sua expressão nessas células na malária. No entanto, o que pudemos observar é que a expressão de PD-1 não influencia a produção de IFN- $\gamma$  (avaliada dentro as células T CD4<sup>+</sup> ou em sobrenadante de cultura de PBMC) (Figura 24B-D). Corroborando nossos resultados, já foi demonstrado que o bloqueio da via PD-1 em células Treg aumenta sua capacidade proliferativa em diferentes modelos, como o vírus Friend e HIV (Joedicke *et al.*, 2014; Peligero *et al.*, 2015), no entanto a capacidade reguladora dessas células não foi alterada (Peligero *et al.*, 2015).

Apesar de PD-1 não apresentar influência na modulação de células Treg durante a malária, nossos resultados demonstraram que as células Treg não possuem a capacidade de modular a produção de citocinas por células efetoras durante a infecção pelo *P. vivax* (Figura 24A). A fim de demonstrar que células Treg falham na capacidade reguladora durante a malária através de outras vias, co-cultivamos células T efetoras (purificadas de pacientes 3 dias após tratamento, AT) com suas células Treg (AT) ou com as células Treg deles mesmos coletadas durante a fase aguda da infecção (*P. vivax*). Desse modo, nesse experimento foi possível observar a influência das células Treg em suas respectivas células efetoras em diferentes tempos. Nesse contexto, as células efetoras cultivadas na presença de células Treg de pacientes durante a infecção pelo *P. vivax* apresentaram maior capacidade proliferativa, o que nos indica que as células Treg durante a fase aguda da malária, não são capazes de modular a proliferação celular de células efetoras da mesma forma que as células Treg após a cura da doença (Figura 25). Isso indica que as células Treg apresentam função comprometida durante a fase aguda da infecção, não necessariamente devido a expressão de PD-1. Recentemente foi demonstrado que células T efetoras que expressam simultaneamente CTLA-4 e PD-1 possuem capacidade de modular a proliferação celular de outras células T na malária pelo *P. falciparum* (Mackroth *et al.*, 2016). Um estudo realizado com pacientes infectados pelo *P. vivax*, por outro lado, demonstrou que as células Treg possuem capacidade de modular a proliferação celular. No entanto, os autores selecionaram previamente pacientes que apresentavam resposta proliferativa quando suas células foram cultivadas com o antígeno recombinante AMA-1 (Bueno *et al.*, 2010). Essa pré-seleção poderia explicar a discrepância com os dados obtidos pelo nosso grupo.

Para associar a expressão de CTLA-4 e PD-1 com a função efetora de células Treg avaliamos a expressão de Foxp3 nessas células. Apesar de Foxp3 ser expresso transientemente em células T CD4<sup>+</sup> ativadas, a sua expressão é constitutiva em células Treg e esse fator de transcrição interage com AML1 e NFAT definindo o fenótipo e função das células Treg (Ono *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Nossos resultados demonstraram que durante a infecção as células Treg PD-1<sup>+</sup> possuem expressão de Foxp3 diminuída, no entanto a expressão de Foxp3 não está relacionada com a expressão de CTLA-4 (Figura 26 A e B). Além disso, os níveis de Foxp3 foram menores em células Treg que expressam CTLA-4 e PD-1 durante a infecção em relação após o tratamento (Figura 26 A e B). Nossos resultados indicam que apesar de não influenciar diretamente na modulação da resposta imune (Figura 24 B-D), a expressão de PD-1 está relacionada, de alguma maneira, à resposta das células Treg na malária *vivax*. Foi demonstrado que a frequência de Foxp3 em células Treg diminui quando PD-1 é bloqueado em cultura (Wang *et al.*, 2009). No entanto, foi observada menor frequência de células Treg PD-1<sup>high</sup> que expressam Foxp3 em relação às Treg PD-1<sup>dim</sup> no modelo de lúpus (Wong *et al.*, 2013).

Nossos resultados mostraram diminuição de Foxp3 em células Treg. Para confirmar tal resultado, avaliamos a frequência de células Treg Helios<sup>+</sup>. Helios é uma molécula característica de células Treg e se encontra na região promotora do gene de Foxp3 (Getnet *et al.*, 2010; Shevach e Thornton, 2014). Desse modo, a expressão de Helios está diretamente associada com Foxp3. Nossos resultados corroboraram tal associação, pois mediante o aumento da expressão PD-1 em células Treg houve diminuição dos níveis Foxp3 e Helios. Além disso, células Treg expressando PD-1 possuem expressão aumentada de Tbet durante a malária *vivax* (Figura 27A). A plasticidade de células Treg está relacionada à expressão Tbet e outras moléculas do perfil Th1, como CXCR3, responsável pela migração e produção de IFN- $\gamma$  (Koch *et al.*, 2009; Koch *et al.*, 2012). Por fim, para confirmar se a expressão de Tbet por células Treg PD-1<sup>+</sup> leva a alterações funcionais dessas, nós avaliamos a produção de IFN- $\gamma$ , citocina característica de células Th1 (Szabo *et al.*, 2000). Nossos resultados mostram que Treg PD-1<sup>+</sup> de pacientes infectados pelo *P. vivax* possuem proporção aumentada de células produtoras de IFN- $\gamma$ .

Desse modo, nossos dados mostram que apesar de não termos conseguido mostrar diretamente que a expressão de PD-1 altera a função de células Treg, as



alterações de fenótipo e função dessas células estão diretamente associadas a expressão dessa molécula durante a malária vivax.

## **6 CONCLUSÃO**

## ***Conclusão***

---

A infecção pelo *P. vivax* induz aumento da expressão de moléculas inibitórias em subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (naive/efetora/memória) e em células Treg. O bloqueio dessas moléculas regulatórias, restaura a capacidade de células antígeno-específicas em produzir citocinas. No entanto, a expressão de PD-1 não influencia diretamente o papel de células Treg na modulação da resposta imune, todavia a expressão de PD-1 está associada a diminuição da expressão de Foxp3 e Helios e aumento da expressão de Tbet e da produção de IFN- $\gamma$  por Treg PD-1<sup>+</sup>.

## **REFERÊNCIAS**

AHMADZADEH, M. et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. **Blood**, v. 114, n. 8, p. 1537-1544, 8/20/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19423728> >.

AKIMOVA, T. et al. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e24226, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918685> >.

ALVES, F. P. et al. Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. **J.Med.Entomol.**, v. 42, n. 5, p. 777-779, 9/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16363160> >.

AMINO, R. et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nat.Med.**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2/2006 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429144> >.

ANDRADE, B. B. et al. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. **PLoS.Negl.Trop.Dis.**, v. 4, n. 4, p. e650, 2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386593> >.

ANTONELLI, L. R. et al. The CD14+CD16+ Inflammatory Monocyte Subset Displays Increased Mitochondrial Activity and Effector Function During Acute Plasmodium vivax Malaria. **PLoS.Pathog.**, v. 10, n. 9, p. e1004393, 9/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233271> >.

ANTONELLI, L. R. et al. Elevated frequencies of highly activated CD4+ T cells in HIV+ patients developing immune reconstitution inflammatory syndrome. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3818-3827, 11/11/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20660788> >.

APETOH, L. et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. **Nat.Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 854-861, 9/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676095> >.

BAIRD, J. K. et al. Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to Plasmodium falciparum. **J.Infect.Dis.**, v. 178, n. 2, p. 592-595, 8/1998 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697752> >.

BANERJEE, R. et al. CD47 regulates the phagocytic clearance and replication of the Plasmodium yoelii malaria parasite. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 112, n. 10, p. 3062-3067, 3/10/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713361> >.

BATTAGLIA, M. et al. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. **Semin.Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 120-127, 4/2006 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16464609> >.

BELKAID, Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. **Eur.J.Immunol.**, v. 38, n. 4, p. 918-921, 4/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395860> >.

BELKAID, Y.; BLANK, R. B.; SUFFIA, I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. **Immunol.Rev.**, v. 212, p. 287-300, 8/2006 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903921> >.

BHADRA, R. et al. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 108, n. 22, p. 9196-9201, 5/31/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576466> >.

BLACKBURN, S. D. et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. **Nat.Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 29-37, 1/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043418> >.

BOUHAROUN-TAYOUN, H. et al. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages. **J.Exp.Med.**, v. 182, n. 2, p. 409-418, 8/1/1995 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7629503> >.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clin.Microbiol.Rev.**, v. 24, n. 2, p. 377-410, 4/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482730> >.

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, 2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224778> >.

BUTLER, N. S. et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. **Nat.Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 188-195, 2/2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22157630> >.

CAMPOS, F. M. et al. Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection. **Malar J**, v. 9, p. 327, Nov 16 2010. ISSN 1475-2875 (Electronic) 1475-2875 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080932> >.

CARVALHO, B. O. et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. **J.Infect.Dis.**, v. 202, n. 4, p. 638-647, 8/15/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617923> >.

CHANGROB, S. et al. Naturally-acquired cellular immune response against Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 paralog antigen. **Malar.J.**, v. 14, n. 1, p. 159, 4/15/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889175> >.

CHO, H. Y. et al. Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-alpha-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1779, n. 12, p. 811-819, 12/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18771758> >.

COCKBURN, I. A. et al. In vivo imaging of CD8+ T cell-mediated elimination of malaria liver stages. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 110, n. 22, p. 9090-9095, 5/28/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674673> >.

COCKBURN, I. A. et al. Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8+ T cell responses against malaria liver stage parasites. **PLoS.Pathog.**, v. 6, n. 5, p. e1000877, 5/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463809> >.

COELHO, H. C. et al. Thrombocytopenia in Plasmodium vivax malaria is related to platelets phagocytosis. **PLoS.One.**, v. 8, n. 5, p. e63410, 2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23723981> >.

COLLISON, L. W. et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. **Nat.Immunol.**, v. 11, n. 12, p. 1093-1101, 12/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20953201> >.

COSTA, P. A. et al. Induction of Inhibitory Receptors on T Cells During Plasmodium vivax Malaria Impairs Cytokine Production. **J.Infect.Dis.**, v. 212, n. 12, p. 1999-2010, 12/15/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26019284> >.

COX-SINGH, J. et al. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clin.Infect.Dis.**, v. 46, n. 2, p. 165-171, 1/15/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171245> >.

CROMPTON, P. D. et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 32, p. 157-187, 2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655294> >.

CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). **Annu.Rev.Immunol.**, v. 29, p. 621-663, 2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314428> >.

DA COSTA, A. G. 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. **J.Immunol.Res.**, v. 2014, p. 318250, 2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741587> >.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 350-354, 9/21/2006 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921384> >.

ELHASSAN, I. M. et al. Evidence of endothelial inflammation, T cell activation, and T cell reallocation in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 51, n. 3, p. 372-379, 9/1994 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7524374> >.

ELKORD, E. Helios Should Not Be Cited as a Marker of Human Thymus-Derived Tregs. Commentary: Helios(+) and Helios(-) Cells Coexist within the Natural FOXP3(+) T Regulatory Cell Subset in Humans. **Front Immunol**, v. 7, p. 276, 2016. ISSN 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27456241> >.

ELLIOTT, S. R. et al. Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. **Infect.Immun.**, v. 75, n. 7, p. 3621-3632, 7/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470539> >.

FAKUNLE, Y. M.; GREENWOOD, B. M. Metabolism of IgM in the tropical splenomegaly syndrome. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, v. 70, n. 4, p. 346-348, 1976 1976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1006767> >.

FARBER, D. L.; YUDANIN, N. A.; RESTIFO, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 14, n. 1, p. 24-35, 1/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336101> >.

FIFE, B. T.; BLUESTONE, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. **Immunol.Rev.**, v. 224, p. 166-182, 8/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18759926> >.

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. **Eur.J.Immunol.**, v. 42, n. 7, p. 1767-1777, 7/2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22585585> >.

FOURCADE, J. et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. **J.Exp.Med.**, v. 207, n. 10, p. 2175-2186, 9/27/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819923> >.

FRANCESCHINI, D. et al. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. **J.Clin.Invest**, v. 119, n. 3, p. 551-564, 3/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19229109> >.

FRANCIS, S. E.; SULLIVAN, D. J., JR.; GOLDBERG, D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Annu.Rev.Microbiol.**, v. 51, p. 97-123, 1997 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343345> >.



FRANCISCO, L. M. et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. **J.Exp.Med.**, v. 206, n. 13, p. 3015-3029, 12/21/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008522> >.

FRANKLIN, B. S. et al. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 108, n. 9, p. 3689-3694, 3/1/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303985> >.

FRANKLIN, B. S. et al. Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of Plasmodium vivax malaria. **PLoS.One.**, v. 6, n. 5, p. e19842, 2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21611202> >.

FREEMAN, G. J. et al. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. **J.Exp.Med.**, v. 203, n. 10, p. 2223-2227, 10/2/2006 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17000870> >.

GALLIMORE, A. et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. **J.Exp.Med.**, v. 187, n. 9, p. 1383-1393, 5/4/1998 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9565631> >.

GAUTAM, S. et al. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. **J.Infect.Dis.**, v. 209, n. 2, p. 290-299, 8/22/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922369> >.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 14, n. 11, p. 744-757, 11/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324127> >.

GENTIL, F. et al. A recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6183-6190, 8/31/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20654667> >.

GETNET, D. et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **Mol.Immunol.**, v. 47, n. 7-8, p. 1595-1600, 4/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226531> >.

GONCALVES-LOPES, R. M. et al. Surface expression of inhibitory (CTLA-4) and stimulatory (OX40) receptors by CD4+ regulatory T cell subsets circulating in human malaria. **Microbes Infect**, v. 18, n. 10, p. 639-648, Oct 2016. ISSN 1769-714X (Electronic) 1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27320393> >.

GONCALVES, 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? **Infect.Immun.**, v. 78, n. 11, p. 4763-4772, 11/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713627> >.

GOOD, M. F.; DOOLAN, D. L. Malaria vaccine design: immunological considerations. **Immunity.**, v. 33, n. 4, p. 555-566, 10/29/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029965> >.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 23, p. 515-548, 2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771580> >.

GROSSO, J. F. et al. Functionally distinct LAG-3 and PD-1 subsets on activated and chronically stimulated CD8 T cells. **J.Immunol.**, v. 182, n. 11, p. 6659-6669, 6/1/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454660> >.

GUERRA, C. A. et al. The international limits and population at risk of Plasmodium vivax transmission in 2009. **PLoS.Negl.Trop.Dis.**, v. 4, n. 8, p. e774, 2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689816> >.

GUPTA, S. et al. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. **Nat.Med.**, v. 5, n. 3, p. 340-343, 3/1999 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10086393> >.

GUTIERREZ, F. R. et al. Regulation of Trypanosoma cruzi-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. **Infect.Immun.**, v. 79, n. 5, p. 1873-1881, 5/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357717> >.

HAFALLA, J. C. et al. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitory Pathways Independently Regulate Host Resistance to Plasmodium-induced Acute Immune Pathology. **PLoS.Pathog.**, v. 8, n. 2, p. e1002504, 2/2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319445> >.

HAMANN, D. et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. **J.Exp.Med.**, v. 186, n. 9, p. 1407-1418, 11/3/1997 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348298> >.

HANSEN, D. S.; D'OMBRAIN, M. C.; SCHOFIELD, L. The role of leukocytes bearing Natural Killer Complex receptors and Killer Immunoglobulin-like Receptors in the immunology of malaria. **Curr.Opin.Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 416-423, 8/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17702559> >.

HAQUE, A. et al. CD4+ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. **PLoS.Pathog.**, v. 6, n. 12, p. e1001221, 2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21170302> >.

HIMMEL, M. E. et al. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. **J Immunol**, v. 190, n. 5, p. 2001-8, Mar 01 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359504> >.

HIRAKO, I. C. et al. DNA-Containing Immunocomplexes Promote Inflammasome Assembly and Release of Pyrogenic Cytokines by CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD64<sup>high</sup> CD32<sup>low</sup> Inflammatory Monocytes from Malaria Patients. **MBio**, v. 6, n. 6, p. e01605-15, Nov 17 2015. ISSN 2150-7511 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26578679> >.

HISAEDA, H. et al. Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. **J.Immunol.**, v. 180, n. 4, p. 2496-2503, 2/15/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250459> >.

HORNE-DEBETS, J. M. et al. PD-1 Dependent Exhaustion of CD8 T Cells Drives Chronic Malaria. **Cell Rep.**, v. 5, n. 5, p. 1204-1213, 12/3/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316071> >.

HOROWITZ, A. et al. Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J.Immunol.**, v. 184, n. 11, p. 6043-6052, 6/1/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427769> >.

HVIID, L.; KEMP, K. What is the cause of lymphopenia in malaria? **Infect.Immun.**, v. 68, n. 10, p. 6087-6089, 10/2000 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11203040> >.

HVIID, L. et al. The gamma/delta T-cell response to Plasmodium falciparum malaria in a population in which malaria is endemic. **Infect.Immun.**, v. 64, n. 10, p. 4359-4362, 10/1996 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8926112> >.

IHALAMULLA, R. L.; MENDIS, K. N. Plasmodium vivax: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, v. 81, n. 1, p. 25-28, 1987 1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3328333> >.

ILLINGWORTH, J. et al. Chronic Exposure to Plasmodium falciparum Is Associated with Phenotypic Evidence of B and T Cell Exhaustion. **J.Immunol.**, v. 190, n. 3, p. 1038-1047, 12/21/2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264654> >.

INOUE, S. et al. Roles of IFN-gamma and gammadelta T Cells in Protective Immunity Against Blood-Stage Malaria. **Front Immunol.**, v. 4, p. 258, 2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009610> >.

JAGANNATHAN, P. et al. IFNgamma/IL-10 Co-producing Cells Dominate the CD4 Response to Malaria in Highly Exposed Children. **PLoS.Pathog.**, v. 10, n. 1, p. e1003864, 1/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24415936> >.

JAGANNATHAN, P. et al. Loss and dysfunction of Vdelta2<sup>+</sup> gammadelta T cells are associated with clinical tolerance to malaria. **Sci.Transl.Med.**, v. 6, n. 251, p. 251ra117, 8/27/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25163477> >.

JANGPATARAPONGSA, K. et al. Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. **Eur.J.Immunol.**, v. 38, n. 10, p. 2697-2705, 10/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18825754> >.

JOEDICKE, J. J. et al. The phenotype and activation status of regulatory T cells during Friend retrovirus infection. **Virol.Sin.**, v. 29, n. 1, p. 48-60, 2/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452537> >.

JOSHI, T. et al. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. **PLoS.Pathog.**, v. 5, n. 5, p. e1000431, 5/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436710> >.

KERN, P. et al. Increased levels of soluble Fas ligand in serum in Plasmodium falciparum malaria. **Infect.Immun.**, v. 68, n. 5, p. 3061-3063, 5/2000 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10769016> >.

KHO, S. et al. Preserved dendritic cell HLA-DR expression and reduced regulatory T cell activation in asymptomatic Plasmodium falciparum and P. vivax infection. **Infect.Immun.**, 6/1/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26034211> >.

KINTER, A. L. et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. **J.Immunol.**, v. 181, n. 10, p. 6738-6746, 11/15/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981091> >.

KOCH, M. A. et al. T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor beta2. **Immunity**, v. 37, n. 3, p. 501-10, Sep 21 2012. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960221> >.

KOCH, M. A. et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. **Nat Immunol**, v. 10, n. 6, p. 595-602, Jun 2009. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19412181> >.

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. **J.Biol.Chem.**, v. 280, n. 9, p. 8606-8616, 3/4/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15623512> >.

KWIATKOWSKI, D. P. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. **Am.J.Hum.Genet.**, v. 77, n. 2, p. 171-192, 8/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16001361> >.

LEORATTI, F. M. et al. Neutrophil paralysis in Plasmodium vivax malaria. **PLoS.Negl.Trop.Dis.**, v. 6, n. 6, p. e1710, 2012 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745844> >.

LEPENIES, B. et al. CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal Plasmodium yoelii infections. **Microbes.Infect.**, v. 9, n. 6, p. 687-694, 5/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17398134> >.

LINSLEY, P. S.; LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 11, p. 191-212, 1993 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386518> >.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **J.Exp.Med.**, v. 203, n. 7, p. 1701-1711, 7/10/2006 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818678> >.

LUTZ, M. B.; SCHULER, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? **Trends Immunol.**, v. 23, n. 9, p. 445-449, 9/2002 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200066> >.

MACIAN, F. et al. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. **Cell**, v. 109, n. 6, p. 719-731, 6/14/2002 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086671> >.

MACKROTH, M. S. et al. Acute Malaria Induces PD1+CTLA4+ Effector T Cells with Cell-Extrinsic Suppressor Function. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 11, p. e1005909, Nov 2016. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802341> >.

MCCALL, M. B. et al. Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. **J.Immunol.**, v. 179, n. 1, p. 162-171, 7/1/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579034> >.

MILLER, J. L. et al. Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. **Cell Rep.**, v. 7, n. 2, p. 436-447, 4/24/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24703850> >.

MILLER, L. H. et al. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **N.Engl.J.Med.**, v. 295, n. 6, p. 302-304, 8/5/1976 1976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/778616> >.

MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat.Rev.Immunol.**, v. 4, n. 11, p. 841-855, 11/2004 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516964> >.

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.Pathog.**,

v. 5, n. 4, p. e1000402, 4/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390618> >.

MOSEMAN, E. A. et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. **J.Immunol.**, v. 173, n. 7, p. 4433-4442, 10/1/2004 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383574> >.

MOUNT, A. M. et al. Impairment of humoral immunity to Plasmodium falciparum malaria in pregnancy by HIV infection. **Lancet**, v. 363, n. 9424, p. 1860-1867, 6/5/2004 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183624> >.

MS. Malária. In: (Ed.). **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 6. Brasília, 2006. cap. 47, p.210-218.

MU, J. et al. Chromosome-wide SNPs reveal an ancient origin for Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 418, n. 6895, p. 323-326, 7/18/2002 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12124624> >.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect.Dis.**, v. 9, n. 9, p. 555-566, 9/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695492> >.

NOULIN, F. et al. 1912-2012: a century of research on Plasmodium vivax in vitro culture. **Trends Parasitol.**, v. 29, n. 6, p. 286-294, 6/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623759> >.

NTUMNGIA, F. B. et al. A Novel Erythrocyte Binding Protein of Plasmodium vivax Suggests an Alternate Invasion Pathway into Duffy-Positive Reticulocytes. **MBio**, v. 7, n. 4, Aug 23 2016. ISSN 2150-7511 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27555313> >.

OBENG-ADJEI, N. et al. Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. **Cell Rep**, v. 13, n. 2, p. 425-39, Oct 13 2015. ISSN 2211-1247 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26440897> >.

ONO, M. et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. **Nature**, v. 446, n. 7136, p. 685-9, Apr 5 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17377532> >.

PARK, H. J. et al. PD-1 upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8+ T cell immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8+ T cells. **J.Immunol.**, v. 194, n. 12, p. 5801-5811, 6/15/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25934860> >.

PARROCHE, P. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9.

**Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 104, n. 6, p. 1919-1924, 2/6/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261807> >.

PARRY, R. V. et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. **Mol.Cell Biol.**, v. 25, n. 21, p. 9543-9553, 11/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16227604> >.

PELIGERO, C. et al. PD-L1 Blockade Differentially Impacts Regulatory T Cells from HIV-Infected Individuals Depending on Plasma Viremia. **PLoS.Pathog.**, v. 11, n. 12, p. e1005270, 12/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26633181> >.

POLLITT, L. C. et al. Investigating the evolution of apoptosis in malaria parasites: the importance of ecology. **Parasit.Vectors.**, v. 3, p. 105, 2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080937> >.

PORTUGAL, S. et al. Exposure-dependent control of malaria-induced inflammation in children. **PLoS.Pathog.**, v. 10, n. 4, p. e1004079, 4/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743880> >.

QURESHI, O. S. et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 600-603, 4/29/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474713> >.

RTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clin.Exp.Immunol.**, v. 133, n. 2, p. 145-152, 8/2003 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869017> >.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat.Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 345-352, 4/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785760> >.

SALOMON, B. et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. **Immunity.**, v. 12, n. 4, p. 431-440, 4/2000 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10795741> >.

SAÚDE, M. D. SIVEP - Malária. 2016. Disponível em: < <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&hiddensections=header%2Cpath%2CdockTop%2CdockLeft%2Cfooter&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&Server=srvbipdf03&Project=DMMalaria&> >.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 5, n. 9, p. 722-735, 9/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138104> >.

SCHOFIELD, L. et al. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite

cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. **J.Immunol.**, v. 156, n. 5, p. 1886-1896, 3/1/1996 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596041> >.

SEDER, R. A. et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. **Science**, v. 341, n. 6152, p. 1359-1365, 9/20/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23929949> >.

SEIXAS, E. et al. The interaction between DC and Plasmodium berghei/chabaudi-infected erythrocytes in mice involves direct cell-to-cell contact, internalization and TLR. **Eur.J.Immunol.**, v. 39, n. 7, p. 1850-1863, 7/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19585512> >.

SHEVACH, E. M.; THORNTON, A. M. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. **Immunol.Rev.**, v. 259, n. 1, p. 88-102, 5/2014 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712461> >.

SNOW, R. W.; TRAPE, J. F.; MARSH, K. The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 12, p. 593-597, 12/2001 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756044> >.

SUMMERS, K. L.; O'DONNELL, J. L.; HART, D. N. Co-expression of the CD45RA and CD45RO antigens on T lymphocytes in chronic arthritis. **Clin.Exp.Immunol.**, v. 97, n. 1, p. 39-44, 7/1994 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8033417> >.

SUSS, G. et al. Roles of CD4- and CD8-bearing T lymphocytes in the immune response to the erythrocytic stages of Plasmodium chabaudi. **Infect.Immun.**, v. 56, n. 12, p. 3081-3088, 12/1988 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903123> >.

SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655-69, Mar 17 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10761931> >.

TEMBHRE, M. K. et al. Alteration in regulatory T cells and programmed cell death 1-expressing regulatory T cells in active generalized vitiligo and their clinical correlation. **Br.J.Dermatol.**, v. 172, n. 4, p. 940-950, 4/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25376752> >.

TESSELAAR, K. et al. Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo. **J.Immunol.**, v. 170, n. 1, p. 33-40, 1/1/2003 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496380> >.

THORNTON, A. M. et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. **J.Immunol.**, v. 184, n. 7, p. 3433-3441, 4/1/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181882> >.



TRAN, T. M. et al. An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to Plasmodium falciparum infection. **Clin.Infect.Dis.**, v. 57, n. 1, p. 40-47, 7/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23487390> >.

TSUSHIMA, F. et al. Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 180-185, 7/1/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289811> >.

TURKA, L. A. et al. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. **J.Immunol.**, v. 144, n. 5, p. 1646-1653, 3/1/1990 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155264> >.

URBAN, B. C. et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, v. 400, n. 6739, p. 73-77, 7/1/1999 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403251> >.

URBAN, B. C.; WILLCOX, N.; ROBERTS, D. J. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 98, n. 15, p. 8750-8755, 7/17/2001 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11447263> >.

VALDOR, R.; MACIAN, F. Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. **Semin.Immunol.**, v. 25, n. 4, p. 313-320, 11/15/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24211041> >.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 8, n. 7, p. 523-532, 7/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566595> >.

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.Pathog.**, v. 5, n. 4, p. e1000364, 4/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343213> >.

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. **J.Infect.Dis.**, v. 207, n. 10, p. 1590-1599, 5/15/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23408847> >.

WANG, J. et al. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 1, p. 129-38, Jan 2007. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17154262> >.

WANG, L. et al. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 105, n. 27, p. 9331-9336, 7/8/2008 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599457> >.

WANG, W. et al. PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells. **Int.Immunol.**, v. 21, n. 9, p. 1065-1077, 9/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651643> >.

WATIER, H. et al. T-cell-dependent immunity and thrombocytopenia in rats infected with Plasmodium chabaudi. **Infect.Immun.**, v. 60, n. 1, p. 136-142, 1/1992 1992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729178> >.

WEISS, G. E. et al. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. **J.Immunol.**, v. 183, n. 3, p. 2176-2182, 8/1/2009 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592645> >.

WELLS, A. D. et al. Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy. **J.Clin.Invest**, v. 108, n. 6, p. 895-903, 9/2001 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560959> >.

WHERRY, E. J. et al. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. **Immunity.**, v. 27, n. 4, p. 670-684, 10/2007 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950003> >.

WHITE, M. T. et al. Dynamics of the antibody response to Plasmodium falciparum infection in African children. **J Infect Dis**, v. 210, n. 7, p. 1115-22, Oct 01 2014. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24719471> >.

WHO. **World Malaria Report 2014**. 2014. 2014

\_\_\_\_\_. World Malaria Report 2016  
2016.

WIKENHEISER, D. J. et al. The Costimulatory Molecule ICOS Regulates Host Th1 and Follicular Th Cell Differentiation in Response to Plasmodium chabaudi chabaudi AS Infection. **J.Immunol.**, 12/14/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667167> >.

WIPASA, J. et al. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **PLoS.Pathog.**, v. 6, n. 2, p. e1000770, 2/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20174609> >.

WONG, M.; LA, C. A.; HAHN, B. H. Blockade of programmed death-1 in young (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice promotes the suppressive capacity of CD4+ regulatory T cells protecting from lupus-like disease. **J.Immunol.**, v. 190, n. 11, p. 5402-5410, 6/1/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636058> >.

WU, X. et al. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. **J.Immunol.**, v. 184, n. 8,

p. 4338-4348, 4/15/2010 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231693> >

XU, H. et al. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. **J.Exp.Med.**, v. 195, n. 7, p. 881-892, 4/1/2002 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927632> >.

YAMAMOTO, T. et al. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection. **Blood**, v. 117, n. 18, p. 4805-4815, 5/5/2011 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398582> >.

YOUNGBLOOD, B.; HALE, J. S.; AHMED, R. Memory CD8 T cell transcriptional plasticity. **F1000Prime.Rep.**, v. 7, p. 38, 2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26097712> >.

ZANDER, R. A. et al. PD-1 Co-inhibitory and OX40 Co-stimulatory Crosstalk Regulates Helper T Cell Differentiation and Anti-Plasmodium Humoral Immunity. **Cell Host.Microbe**, 4/15/2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891357> >.

ZEESHAN, M.; BORA, H.; SHARMA, Y. D. Presence of Memory T Cells and Naturally Acquired Antibodies in Plasmodium vivax Malaria-Exposed Individuals Against a Group of Tryptophan-Rich Antigens With Conserved Sequences. **J.Infect.Dis.**, v. 207, n. 1, p. 175-185, 1/2013 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23087432> >.

ZHOU, J. et al. CD14(hi)CD16+ monocytes phagocytose antibody-opsonised Plasmodium falciparum infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. **BMC.Med.**, v. 13, p. 154, 2015 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149666> >.

ZHU, J.; KRISHNEGOWDA, G.; GOWDA, D. C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. **J.Biol.Chem.**, v. 280, n. 9, p. 8617-8627, 3/4/2005 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611045> >.



## **Anexo 1**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Determinação da contribuição de moléculas co-estimulatórias e receptores inibitórios na modulação da resposta imunológica durante a malária”, sob responsabilidade da Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli. Você foi selecionado porque tem mais que 18 anos e é infectado com o plasmódio, causador da malária. A sua participação nessa pesquisa não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com o Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz. O trabalho tem como objetivo conhecer as funções de células de defesa do organismo na malária.

Caso você aceite participar, serão colhidos 90mL de sangue, que equivalem aproximadamente a seis colheres de sopa, com materiais individuais e estéreis, por uma pessoa treinada para isso. A coleta de sangue venoso pode ocasionar um pequeno desconforto temporário e um pequeno hematoma no local da punção venosa. Os riscos serão minimizados por colhedores devidamente treinados. Pela sua participação nesse estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número. O material coletado será utilizado apenas para os objetivos propostos neste protocolo de pesquisa.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP - CPqRR, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

---

Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Endereço e telefone institucional do Pesquisador Principal:  
Laboratório de Imunopatologia - LAIM – CPqRR - FIOCRUZ  
Avenida Augusto de Lima, 1715 Barro Preto CEP 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil  
Fone 55 31 33497767

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - CPqRR:  
Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002)  
Secretária: Lorena – TeleFax: (31) 3349 7825

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

---

Sujeito da pesquisa

## Anexo 2

## Artigo científico contendo parte dos resultados do projeto de doutorado

MAJOR ARTICLE

## Induction of Inhibitory Receptors on T Cells During *Plasmodium vivax* Malaria Impairs Cytokine Production

Pedro A. C. Costa,<sup>1</sup> Fabiana M. S. Leonati,<sup>1</sup> Maria M. Figueiredo,<sup>3</sup> Mauro S. Tada,<sup>2</sup> Dheila B. Pereira,<sup>2</sup> Caroline Junqueira,<sup>3</sup> Irene S. Soares,<sup>2</sup> Daniel L. Barber,<sup>4</sup> Ricardo T. Gazzinelli,<sup>1,5</sup> and Lis R. V. Antonelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunopatologia, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Belo Horizonte, Minas Gerais; <sup>2</sup>Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Rondônia, Porto Velho; and <sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>T-lymphocyte Biology Unit, Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; and <sup>5</sup>Departamento de Biociências e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

The function and regulation of the immune response triggered during malaria is complex and poorly understood, and there is a particular paucity of studies conducted in humans infected with *Plasmodium vivax*. While it has been proposed that T-cell effector responses are crucial for protection against blood-stage malaria in mice, the mechanisms behind this in humans remain poorly understood. Experimental models of malaria have shown that the regulatory molecules, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4), lymphocyte activation gene-3 (LAG-3), and programmed death-1 (PD-1) are involved in the functional impairment of T cells during infection. Our goal was to define the role of these molecules during *P. vivax* malaria. We demonstrate that infection triggers the expression of regulatory molecules on T cells. The pattern of expression differs in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Higher frequencies of CD4<sup>+</sup> express more than 1 regulatory molecule compared to CD8<sup>+</sup> T cells. Moreover, lower proportions of CD4<sup>+</sup> T cells coexpress regulatory molecules, but are still able to proliferate. Importantly, simultaneous blockade of the CTLA-4, PD-1, and T-cell immunoglobulin and mucin-3 signaling restores the cytokine production by antigen-specific cells. These data support the hypothesis that upregulation of inhibitory receptors on T cells during *P. vivax* malaria impairs parasite-specific T-cell effector function.

**Keywords:** malaria; *Plasmodium vivax*; regulatory molecules; T cells.

Malaria caused by *Plasmodium vivax* is widely distributed and causes serious morbidity and economical problems in developing countries [1]. Innate and acquired immune responses have been shown to be important for host control of parasite replication during malaria [2–4]. However, the immune system is unable to eliminate the parasite, and malaria patients may succumb to infection, or eventually, remain asymptomatic for long periods [5, 6]. Indeed, the generation of an

adaptive immune response against *Plasmodium* is often delayed and not sterilizing, suggesting an inadequate host response or evasion of immunity by the parasite. Furthermore, both B- and T-cell responses are rapidly lost in individuals that leave endemic areas, indicating that the continuous exposure to *Plasmodium* antigens is needed for the maintenance of effector and memory lymphocytes [7]. Therefore, it remains unclear why complete protection against infection is not achieved [8, 9].

Parasite-infected red blood cells have been described to interfere in the generation of memory T cells and antibody production. Their ability to alter T-cell activation by dendritic cells is a controversial issue [10–12]. High antigen dose during malaria might trigger dendritic cell apoptosis, decreasing CD4<sup>+</sup> T-cell activation and memory development. Moreover, malnutrition of activated T cells and Fas-mediated apoptosis are some mechanisms

Received 11 February 2015; accepted 21 May 2015; electronically published 22 May 2015.

Correspondence: Lis R. V. Antonelli, PhD, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Laboratório de Imunopatologia, CP118-00012, Avenida Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, 31056-027, Brazil (antonelli@cpqrr.fiocruz.br).

The Journal of Infectious Diseases • Volume 211, 1001–1009

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Disease Society of America. All rights reserved. For Permissions, please visit: [journals.pubserv.com/permissions](http://journals.pubserv.com/permissions)

DOI: 10.1093/infdis/jiv006

that also have been attributed to the impaired T-cell functions and the lymphopenia observed during malaria [13, 14]. In fact, a significant proportion of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells die or lose function after *Plasmodium* infection [15].

A complex regulatory network that inhibits the generation of exacerbated immune responses has an important role to prevent immune-mediated pathology during infections (doses, including malaria [16–19]). While interferon (IFN)- $\gamma$  mediates immune protection against *Plasmodium* [20], experimental models of malaria have shown that both IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  are also key elements in disease pathogenesis [21–23]. Among other functions, cytokines have been shown to induce the expression of programmed death-1 (PD-1) and its ligand [24], limiting T-cell-effector function [25]. Indeed, in experimental models of malaria, the expression of regulatory molecules by antigen-specific T cells is essential to regulate the immune response triggered against *Plasmodium* [23, 26–28].

It has been described that high levels of PD-1 and lymphocyte-activating gene-3 (LAG-3) are expressed on T cells from *P. falciparum*-infected patients [26, 29]. A recent study [26] showed that *P. falciparum*-infected humans displayed higher expression of PD-1. In the same study, the authors showed in an experimental model that *in vivo* blockade of the PD-1 ligand 1 and the LAG-3 reduces CD4<sup>+</sup> T-cell function, leading to a rapid parasite clearance [26]. Furthermore, another group [29] showed higher expression of PD-1 and LAG-3 on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in patients from a high *P. falciparum*-endemic village.

Given the importance of regulatory molecules in the development of the immune response and the consequent control of immunopathology, we have explored the hypothesis that the upregulation of regulatory molecules on T cells during *P. vivax* infection inhibits parasite-specific T-cell-effector functions. To address this question, we assessed the expression of several regulatory molecules and their impact on T-cell-effector functions in *P. vivax*-infected individuals before treatment (BT) and after successful antimalarial treatment (AT). Here, we demonstrated that the expression of cytotoxic T-lymphocyte attenuator-4 (CTLA-4), LAG-3, PD-1, and T-cell immunoglobulin and mucin-3 (TIM-3) is elevated on T cells during acute malaria and a proportion of these cells coexpress the activation marker inducible costimulator (ICOS) and the proliferation marker KI-67. Importantly, we found that the simultaneous blockade of CTLA-4, PD-1, and TIM-3 signaling pathways in cells from *P. vivax*-infected patients leads to the production of higher levels of cytokines upon antigen-specific stimulation.

## PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

### Patients

*P. vivax*-infected patients with uncomplicated malaria were enrolled in this study at Centro de Pesquisa de Medicina Tropical de Roraima (CEPEM) in Porto Velho, Roraima, a malaria-

endemic area in the Amazon, Brazil. A total of 100 mL of peripheral blood was collected from each patient after confirmation of *P. vivax* infection by thick blood smear film, and again 30–45 days AT and polymerase chain reaction (PCR) conducted [30] ( $n = 25$ , ranging from 20 to 62 years old [ $38 \pm 10.97$ ]) (Supplementary Table 2). Patients were treated according to the Brazilian Ministry of Health. Hematological and clinical data of each patient included in the study are shown in Supplementary Table 2. Identification of the 3 species of human malaria parasites was done by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit ribosomal RNA gene. Immunoglobulin (Ig)M and IgG anti-splenic-membrane-antigen-1 were measured in the plasma of malaria patients and positive reaction was observed for all subjects BT and/or AT (Supplementary Table 3).

### Ethics Statement

These studies were performed under protocols reviewed and approved by the Ethical Commission on Human Experimentation from Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqRR 24/2011). Only adults, 18 years or older, were enrolled in the study, and all patients provided written informed consent.

### T-cell Immunophenotyping and Intracellular Cytokine Measurement

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared from heparinized peripheral blood by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (GE Healthcare Life Sciences), and cells were frozen in fetal calf serum (FCS) 20% dimethyl sulfoxide (SIGMA). PBMCs were thawed in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich) with 10% FCS and benzocaine nuclease (20 U/mL; Novagen). Cells were washed in phosphate-buffered saline, incubated with Live/Dead (Invitrogen) for dead cell exclusion, and with monoclonal antibodies, washed, fixed, and permeabilized (FoxP3 staining buffer set, eBioscience) according to manufacturer's instructions. Antibodies used for analyzing leukocytes are listed in Supplementary Table 1. Cells were acquired on an LSR-FORTESSA. For analysis, a forward scatter area (FSC-A) versus forward scatter height (FSC-H) gate was used to remove doublets, and then cells were gated in function of time versus FSC-A and combinations of fluorochromes to exclude debris and possible interference of flux interruptions. Nonviable cells were excluded using a Live/Dead gate versus CD3. T-cell subpopulations were gated on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> events. More detailed analysis of naive and memory subpopulations were done based on CD27/CD45RO expression: effector memory (EM-CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), central memory (CM-CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), effector (EF-CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), and naive (Nv-CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) cells. In each T-cell subset, frequencies of regulatory molecules, ICOS, KI-67-expressing cells, and the coexpression of these molecules were evaluated. The frequencies of the regulatory molecules were also assessed in each naive and

memory subpopulations. GraphPad Prism V5.0 (GraphPad software) and FlowJo V9.4.11 (TreeStar) were used for data analysis and graphic presentation.

#### Culture of PBMCs and *P. vivax*-infected Reticulocytes

PBMCs from healthy donor (HD) and *P. vivax*-infected patients were plated in 96-well cell culture plates at a final proportion of 1 ( $2.5 \times 10^5$  cells) PBMC to 3 ( $7.5 \times 10^6$  cells) *P. vivax*-infected reticulocytes/well. Uninfected reticulocytes and CD3 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , clone HIT3a) CD28 (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , clone CD28.2) (BD Pharmingen) were used as negative and positive controls in RPMI 1640 (10% FCS and 100  $\text{ng}/\text{mL}$  streptomycin, 100 U/mL penicillin). For parasite maturation, cryopreserved blood was thawed and cultured in McCoy's 5A Medium (Gibco), human AB Serum (Caltag), and glucose (Sigma) overnight. *P. vivax*-infected reticulocytes were enriched with a 45% Percoll (Sigma Aldrich) gradient [31–33]. Uninfected reticulocytes were enriched with a 65% Percoll gradient followed by a Ficoll-Hypaque density gradient to remove leukocytes. To evaluate the effect of the regulatory molecules, cells were incubated with a mix of blocking antibodies, listed in Supplementary Table 1. Supernatants were harvested after 96 hours of culture and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until cytokine measurement.

#### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism V5.0. Differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.05$ . Results were analyzed using 2-tailed paired *t* test. Wilcoxon test was used when data did not fit a Gaussian distribution to paired samples. Representative pie charts were done using Illustrator-CCM14.

## RESULTS

#### *P. vivax* Triggers the Expression of Regulatory Molecules on T Cells

We investigated the expression of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3, regulatory molecules known to be upregulated after antigen stimulation and related to impaired T-cell functions [34]. Expression of regulatory molecules was assessed on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> (Figures 1 and 3) T cells. Higher frequencies of CTLA-4, PD-1, and TIM-3 expressing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were found in *P. vivax*-infected patients when compared with the same individuals AT (Figures 1A and 3A). Although there were no differences in the frequencies of LAG-3<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> T cells from malaria patients, higher proportions of LAG-3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were observed upon infection. The expression of the molecules assessed on T cells from malaria patients reached the levels found in HD when analyzed AT, as represented by the dashed lines in each graph (Figure 1 and Figure 3). Thus, T cells from *P. vivax*-infected patients exhibit a distinct phenotype that suggests impairment of effector functions.

No differences were found in the proportions of lymphocytes during malaria infection BT and AT (Supplementary Table 3). However, alterations in the frequencies of EM and naive CD4<sup>+</sup> T cells were observed during acute malaria when compared to the same patients AT (Figure 2A and 2B). The expression of the regulatory molecules was also assessed on each naive and memory T-cell subpopulation (Figure 2C). Higher frequencies of CTLA-4<sup>+</sup>, LAG-3<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>, and TIM-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were observed among effector and CM subpopulations. Moreover, higher frequencies of inhibitory molecules expressing CD4<sup>+</sup> memory T cells were observed during acute infection compared to the same patients AT. CD4<sup>+</sup> effector T lymphocytes express higher proportion of TIM-3<sup>+</sup> cells in patients BT than AT. Almost no expression of inhibitory molecules was observed among the naive subset (Figure 2C).

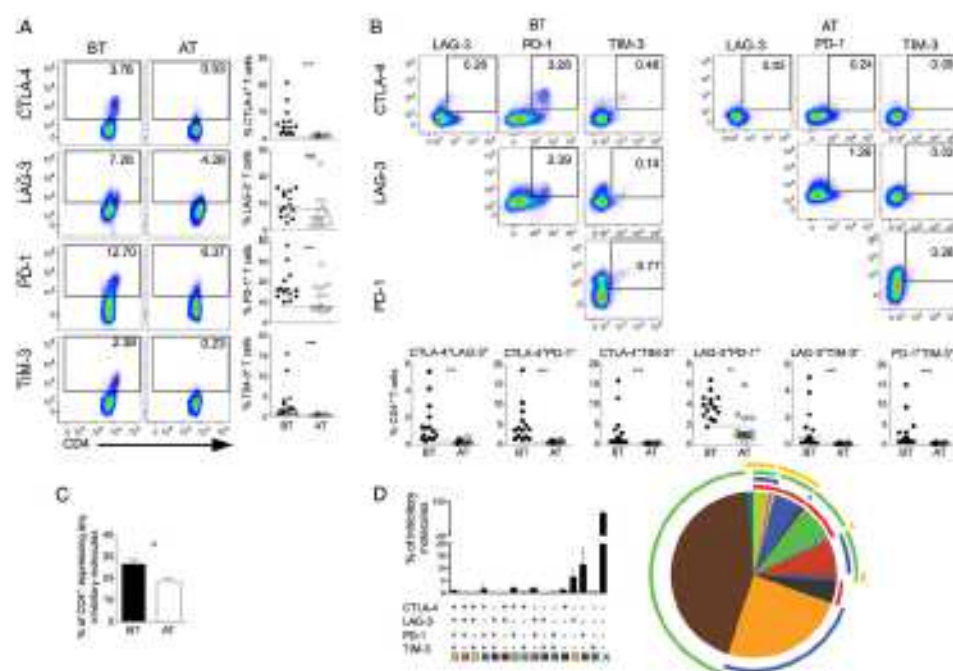
We also evaluated the coexpression of regulatory molecules on T cells from *P. vivax*-infected patients. Significantly higher coexpression of any 2 regulatory molecules is observed in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> (Figure 1B and 3B) T cells from malaria patients when compared to the same individuals AT. During acute infection, almost all CD4<sup>+</sup> T cells that express CTLA-4 also express PD-1 (Figure 1B). The same is not true when the expression of CTLA-4 or PD-1 was simultaneously analyzed with LAG-3 and TIM-3. In fact, only a very small proportion of CD4<sup>+</sup> T cells coexpress PD-1 and TIM-3. In general, higher frequencies of regulatory molecules expressing cells are observed among CD4<sup>+</sup> T cells than among CD8<sup>+</sup> T cells (Figures 1 and 3). The differential coexpression of more than 1 regulatory molecule in a single T cell indicates that distinct population of T cells might have their effector functions modulated differently during malaria.

Malaria infection did not alter the proportions of memory and naive subsets on CD8<sup>+</sup> T-cell compartment (Figure 4A and 4B). A decrease in the frequencies of effector CD8<sup>+</sup> T cells was observed BT than AT (Figure 4A and 4B). Higher frequencies of CTLA-4<sup>+</sup>, LAG-3<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>, and TIM-3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were observed among EM subpopulation from *P. vivax*-infected patients when compared to the same patients AT. Higher frequencies of CTLA-4<sup>+</sup>, LAG-3<sup>+</sup>, and TIM-3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were also observed among CM lymphocytes. An increase in the frequencies of LAG-3 and TIM-3 expressing effector and naive CD8<sup>+</sup> T cells was observed in patients upon *P. vivax* infection (Figure 4C).

#### Pattern of Coexpression of Regulatory Molecules Is Altered During *P. vivax* Infection

The molecular pathways involved in T-cell regulation remain poorly understood, and reports show that this regulation can be a consequence of the coexpression of multiple regulatory molecules [35]. To further address this issue, we evaluated the expression of a unique molecule or the coexpression of several regulatory molecules on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells using a Boolean gating analysis. The percentage of T cells expressing any of the

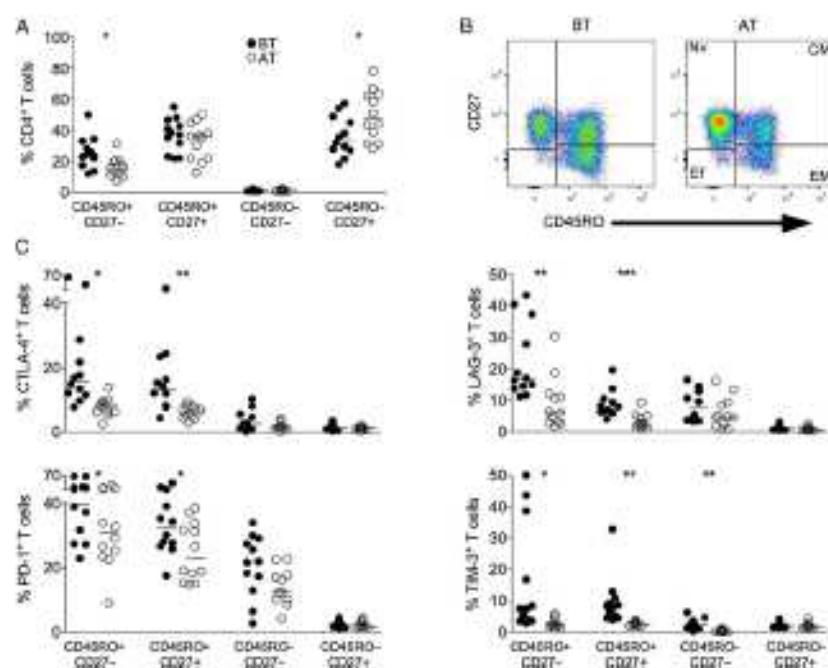




**Figure 1.** *P. vivax* infection triggers the expression of regulatory molecules on CD4<sup>+</sup> T cells. PBMCs from *P. vivax*-infected patients were analyzed ex vivo ( $n=14$ ). **A**, Representative density plots showing proportion of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3 expressing CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (top to bottom) from a single *P. vivax*-infected patient BT (left plots) and 30–45 days AT (right plots) (left panel). Percentage of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3 within CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in *P. vivax*-infected patients measured BT (filled circles) and AT (open circles) (top to bottom). Dotted lines represent median values of the given measurements in HD. **B**, Representative density plots showing frequency of CD4<sup>+</sup> T cells expressing the combination of 2 of the regulatory molecules analyzed (CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3) from a single *P. vivax*-infected patient BT (left plots) and AT (AT, right plots) (top panel). The proportion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from *P. vivax*-infected patients BT (filled circles) and AT (open circles) cosuppressing any 2 of the regulatory molecules described above (bottom panel). Lines represent median values of the given measurement in each group. \*\* $0.01 < P < 0.1$  and \*\*\* $P < 0.01$ . Dotted lines represent median values of the given measurements in HD. **C**, Cosuppression of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3 assessed in T cells from *P. vivax*-infected patients. Bars indicate mean values and lines represent standard error (left panel). Pie charts represent different grouped populations according to the number of regulatory molecules cosuppressed by CD4<sup>+</sup> T cells from malaria patients. The combination of gates shows 15 distinct subpopulations. The expression of 4, 3, 2, or 1 regulatory molecule is depicted in different colors and distributed clockwise. Each pie slice represents one of these CD4<sup>+</sup> T-cell subpopulations, and red, blue, green, and yellow arcs represent the total proportions of CD4<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3, respectively (right panel). Abbreviations: AT, after successful antimalarial treatment; BT, before treatment; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte attenuator-4; HD, healthy donor; LAG-3, lymphocyte activation gene-3; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PD-1, programmed death-1; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-3.

regulatory markers during malaria was  $26.73\% \pm 2.07\%$  (standard error of the mean) and  $26.43\% \pm 2.40\%$  of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, respectively, and this proportion decreased to  $10.02\% \pm 2.14\%$  and  $15.46\% \pm 1.65\%$  AT. Frequencies of T-cell subsets expressing 4, 3, 2, or 1 of the regulatory molecules were analyzed in BT and AT patients (Figure 1C and 2C). Considering the cells that express the regulatory markers assessed in this study, 3.16%, 6.90%, and 16.11% of CD4<sup>+</sup> T cells from patients BT coexpress respectively 4, 3, and 2 regulatory molecules. AT, the frequencies of CD4<sup>+</sup> T cells expressing more than 1 regulatory molecule

significantly decreased. In the absence of infection, 0.08%, 0.46%, and 7.56% of CD4<sup>+</sup> T cells coexpress respectively 4, 3, and 2 molecules (Figure 1C). Despite that coexpression of regulatory molecules appeared to be less frequent in CD8<sup>+</sup> T cells, a similar pattern was observed (0.22%, 2.06%, and 13.54% of CD8<sup>+</sup> T cells from BT patients coexpress respectively 4, 3, and 2 regulatory molecules). Similar to CD4<sup>+</sup> T cells, AT, the frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells expressing more than 1 regulatory molecule significantly decreased: 0.01%, 0.21%, and 4.02% of CD8<sup>+</sup> T cells coexpress respectively 4, 3, and 2 molecules (Figure 3C). Most of the



**Figure 2.** *P. vivax* infection triggers the expression of regulatory molecules predominantly within the memory compartment of CD4<sup>+</sup> T cells. PBMCs from *P. vivax*-infected patients were analyzed ex vivo ( $n = 12$ ). **A** The percentage of BM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), CM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), Eff (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), and Nv (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) cells within CD4<sup>+</sup> T cells was measured BT (open circles) and AT (filled circles) (left panel). Representative density plots show the proportion of BM, CM, Eff, and Nv CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from a single *P. vivax*-infected patient BT (left plots) and AT (right plots) (right panel). **B** Percentage of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3 within BM, CM, Eff, and Nv CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in *P. vivax*-infected patients measured BT (filled circles) and AT (open circles) (top to bottom). Lines represent median values of the given measurement in each group. \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; and \*\*\* $P < 0.001$ . Abbreviations: AT, after successful antimalarial treatment; BT, before treatment; CM, central memory; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte attractor-4; Eff, effector; BM, effector memory; LAG-3, lymphocyte activation gene-3; Nv, naive; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PD-1, programmed death-1; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-3.

CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from malaria patients express only 1 regulatory molecule BT and AT.

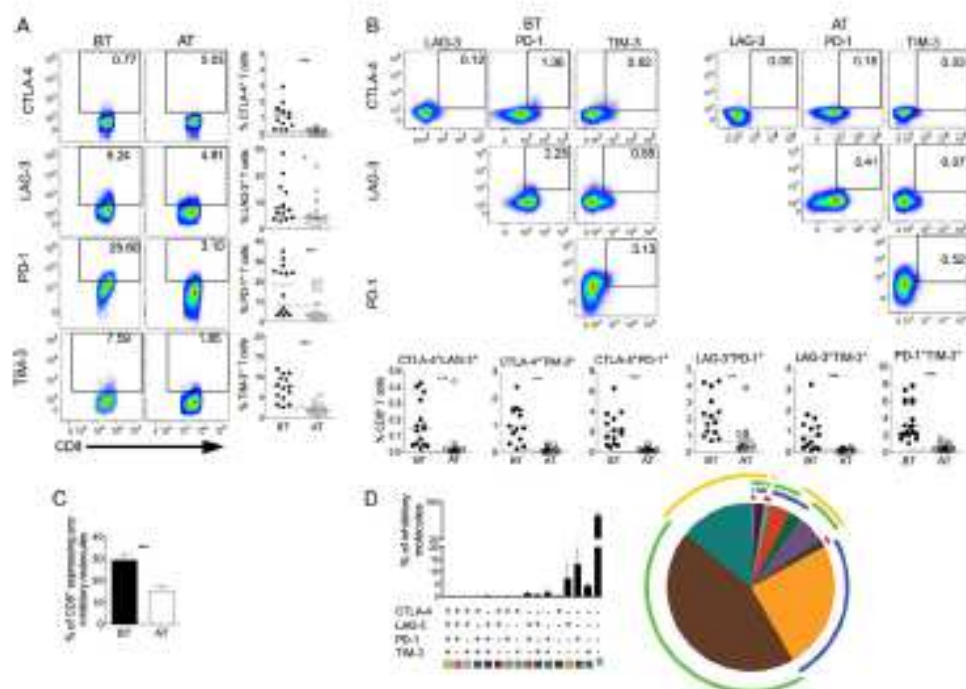
#### During *P. vivax* Infection a Proportion of Inhibitory Receptor Expressing T Cells Are Proliferating *In Vivo* and Express the Activating Receptor ICOS

The expression of ICOS and Ki-67 was assessed in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from malaria patients (Figure 5A and 5B). Higher frequencies of ICOS and Ki-67 expressing T cells were found during acute infection. Ki-67 antigen is a nuclear protein that is expressed in cells in the late G1, S, G2, and M phases of the cell cycle and is therefore used as a marker of proliferation [36]. Respectively, around 80% and 40% of Ki-67 expressing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells coexpress ICOS (Figure 5D). We next asked if the cells expressing Ki-67 were also able to express the regulatory receptors. Most of the Ki-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells did not

express LAG-3 or TIM-3 (Figure 5C and 5D). Only percent of Ki-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells coexpress CTLA-4, and the majority of Ki-67<sup>+</sup> cells simultaneously express PD-1 (Figure 5C and 5D). On the other hand, the proportion of CD8<sup>+</sup> T cells coexpressing Ki-67 and regulatory molecules were lower than CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 5C and 5D). Very few Ki-67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells coexpressed CTLA-4 or LAG-3 or TIM-3, and around 50% expressed PD-1 (Figure 5C and 5D). All together, these data indicate that a proportion of cells that express regulatory molecules still hold the ability to proliferate in response to infection.

#### Blockade of CTLA-4, PD-1, and TIM-3 Pathways Enhances Cytokine Production During Malaria

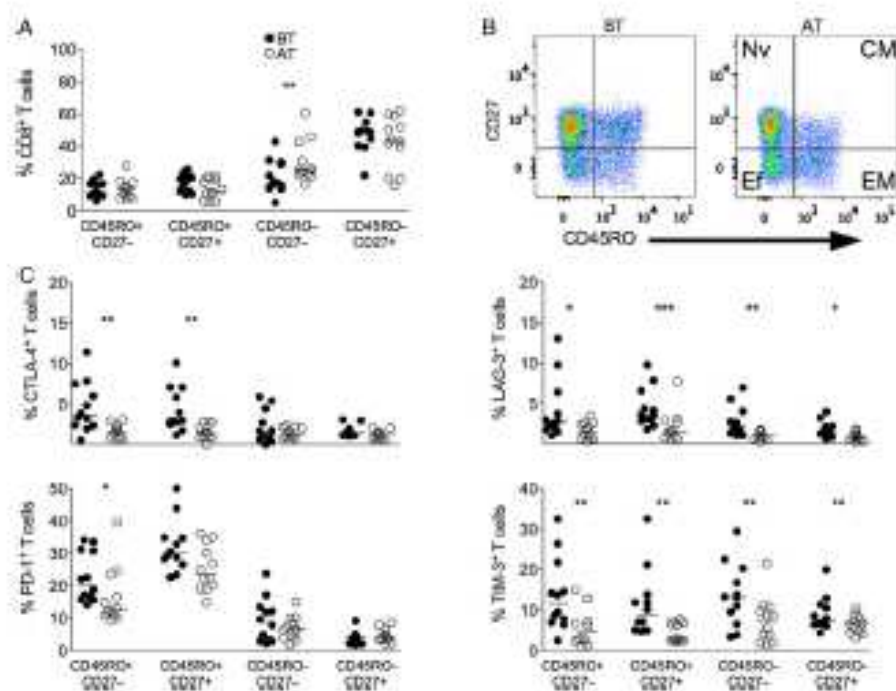
Studying antigen-specific T-cell effector function in *P. vivax* infection is hindered by the inability to maintain the parasite *in vitro* and the lack of defined antigens [37]. In this study, we



**Figure 3.** *P. vivax* infection triggers the expression of regulatory molecules on CD8<sup>+</sup> T cells. PBMCs from *P. vivax*-infected patients were analyzed ex vivo ( $n = 14$ ). **A**, Representative density plots showing proportion of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3 expressing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (top to bottom) from a single *P. vivax*-infected patient BT (left plots) and AT (right plots) (left panel). Percentage of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3 within CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in *P. vivax*-infected patients measured BT (filled circles) and AT (open circles) (top to bottom). Dotted lines represent median values of the given measurements in HD. **B**, Representative density plots showing frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing the combination of 2 of the regulatory molecules analyzed (CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3) from a single *P. vivax*-infected patient BT (left plots) and AT (right plots) (top panels). The proportion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from *P. vivax*-infected patients BT (filled circles) and AT (open circles) coexpressing any 2 of the regulatory molecules described above (bottom panels). Lines represent median values of the given measurement in each group. \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; and \*\*\* $P < 0.001$ . Dotted lines represent median values of the given measurements in HD. **C**, Coexpression of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3 assessed in T cells from *P. vivax*-infected patients. Bars indicate mean values and lines represent standard error ( $n = 14$ ) (left panel). **D**, Pie chart represents different grouped populations according to the number of regulatory molecules coexpressed by CD8<sup>+</sup> T cells from malaria patients. The combination of gates shows 15 distinct subpopulations. The expression of 4, 3, 2, or 1 regulatory molecule is depicted in different colors and distributed clockwise. Each pie slice represents one of these CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations, and red, blue, green, and yellow arcs represent the total proportions of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3, respectively (right panel). Abbreviations: AT, after successful antimalarial treatment; BT, before treatment; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte attenuator-4; HD, healthy donor; LAG-3, lymphocyte activation gene-3; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PD-1, programmed death-1; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-3.

isolated *P. vivax*-infected reticulocytes to use as a source of parasite antigen for functional assays. To examine the functional role of inhibitory receptors during malaria, we tested whether blocking CTLA-4, PD-1, and TIM-3 signaling would alter the cytokine production in response to antigen stimulation (Figure 6). PBMCs from HD and *P. vivax*-infected patients were cultured in medium alone or with *P. vivax*-infected reticulocytes or anti-CD3/anti-CD28, in the presence or absence of blocking antibodies. When anti-CTLA-4, anti-PD-1, and anti-TIM-3 were added simultaneously in the cultures of

PBMCs submitted to an antigen-specific stimulation, increased levels of IFN- $\gamma$  (59.78 pg/mL vs 135.54 pg/mL;  $P = .005$ ), interleukin (IL)-2 (14.11 pg/mL vs 969.51 pg/mL;  $P = .030$ ), TNF- $\alpha$  (46.95 pg/mL vs 244.21 pg/mL;  $P = .001$ ), IL-4 (1.68 pg/mL vs 21.41 pg/mL;  $P = .007$ ), and IL-10 (13.03 pg/mL vs 20.90 pg/mL;  $P = .110$ ) were observed (Figure 6). When PBMCs were cultivated in medium alone or uninfected reticulocytes or anti-CD3/anti-CD28 (Figure 6) in the presence of blocking antibodies, no alterations were observed in cytokine levels. Levels of cytokines were also analyzed when PBMCs from HD were



**Figure 4.** *P. vivax* infection triggers the expression of regulatory molecules predominantly within the memory compartment of CD8<sup>+</sup> T cells. PBMCs from *P. vivax*-infected patients were analyzed ex vivo ( $n = 12$ ). **A**, The percentage of EM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), CM (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), Ef (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), and Nv (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) cells within CD8<sup>+</sup> T cells was measured BT (open circles) and AT (filled circles) (left panel). **B**, Representative density plots showing proportion of EM, CM, Ef, and Nv CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from a single *P. vivax*-infected patient BT (left plots) and AT (right plots). **C**, Percentage of CTLA-4, LAG-3, PD-1, and TIM-3 within EM, CM, Ef, and Nv CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in *P. vivax*-infected patients measured BT (filled circles) and AT (open circles) (top to bottom). Lines represent median values of the given measurement in each group. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; and \*\*\* $P < .001$ . Abbreviations: AT, after successful antimalarial treatment; BT, before treatment; CM, central memory; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte attractor-4; Ef, effector; EM, effector memory; LAG-3, lymphocyte activation gene-3; Nv, naive; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PD-1, programmed death-1; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-3.

cultured in the same conditions, but no differences were found (data not shown).

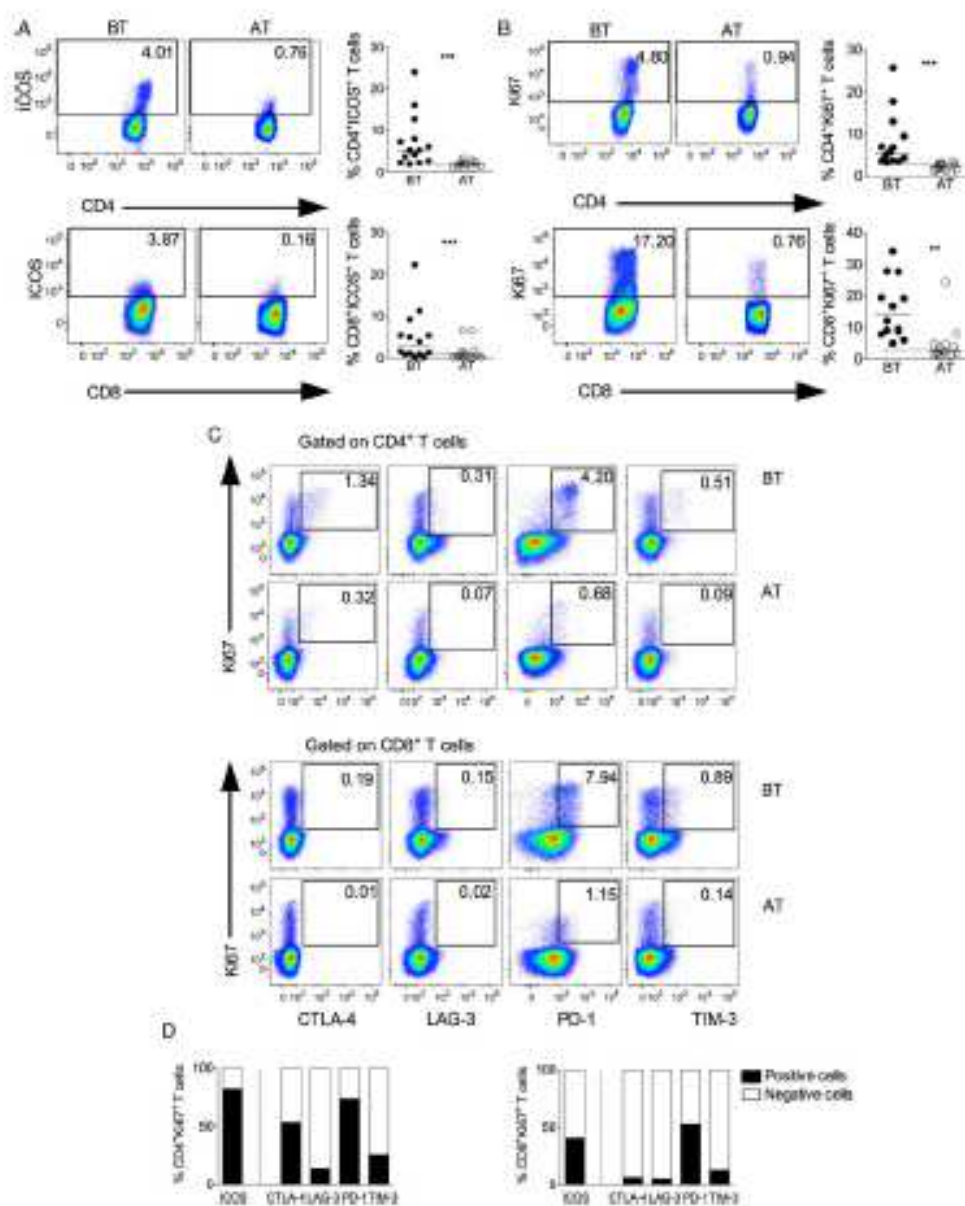
Taken together, our results indicate that the induction of regulatory molecules during *P. vivax* infection leads to impaired T-cell function, which could be an important consequence to the development of immune mechanisms dependent on T cells.

## DISCUSSION

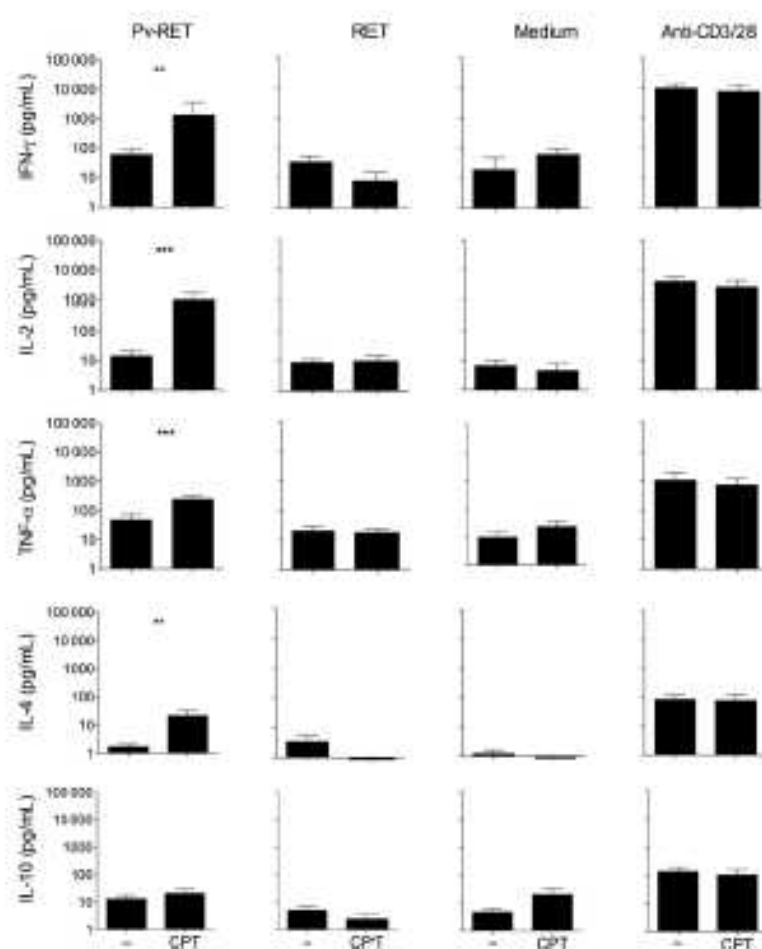
Although T-cell effector function is suggested to be crucial for protective immunity against blood-stage malaria in mice, the mechanisms of protection in humans are unclear. An increasing number of studies have been shown that regulatory molecules are involved in exhaustion of T lymphocytes during viral and bacterial infections, and more recently during experimental malaria [18, 27, 34, 38–40]. However, the role of regulatory

molecules in regulating the T-cell response to *P. vivax* malaria had not been examined. The findings reported here demonstrate that *P. vivax* infection triggers the expression of molecules involved in regulation of T-cell function. Moreover, simultaneous blockade of the signaling pathway of 3 important regulatory molecules, CTLA-4, PD-1, and TIM-3, restores cytokine production upon antigen-specific stimulation.

Cytokine signaling and continuous antigen stimulation through the T-cell receptor [24, 41–45] are known to trigger the expression of the regulatory molecules assessed in this study. We correlated the levels of IL-10 and IL-6 (cytokines important during malaria) and parasite burden. Positive correlations were observed between the levels of circulating cytokines and number of DNA copies of *P. vivax* (Supplementary Figure 1A), corroborating existing data. As malaria is an inflammatory disease and many of the symptoms are due to the



**Figure 5.** Concurrent expression of Ki-67 and regulatory receptors in T lymphocytes during vivax malaria. Representative density plots (left panel) and scattered plots (right panel) showing proportion of ICIS<sup>+</sup> (A) and Ki-67<sup>+</sup> (B) expressing CD4<sup>+</sup> (upper panel) and CD8<sup>+</sup> (lower panel) T lymphocytes from *P. vivax*-infected patients BT (left panel) and AT (right panel). Flow cytometry plots represent a single patient, and circles indicate individual patients ( $n = 14$ ). Lines represent median values of the given measurement in each group. \*\* $P < .01$  and \*\*\* $P < .001$ . Dotted lines represent median values of the given measurements in HD. C, Representative density plots showing proportion of Ki-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (upper panel) and Ki-67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (lower panel) T cells expressing CTLA-4, LAG-3, PD-1, or TIM-3 from a single *P. vivax*-infected patient BT and AT. D, Proportion of cells expressing (filled bars) or not (open bars) ICIS



**Figure 6.** Blockade of CTLA-4, PD-1, and TIM-3 signaling during *P. vivax* infection enhances cytokine production. PBMCs from *P. vivax*-infected patients were cultured with *P. vivax*-infected reticulocytes (Pv-RET), uninfected reticulocytes (RET), medium alone, and anti-CD28 (or anti-CD28) from left to right) in the absence (-) or presence of anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 plus TIM-3 binding antibodies (CPT). Supernatant was collected after 96 hours of culture, and the levels of IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-10 were measured by cytometric bead array. Bars indicate mean values, and lines represent standard error from 12 patients pooled from 3 independent experiments ( $n = 12$ ). \*\* $0.01 < P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . Abbreviations: CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte attenuator-4; IFN, interferon; IL, interleukin; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PD-1, programmed death-1; PD-L1, programmed death ligand 1; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-3; TNF, tumor necrosis factor.

proinflammatory mediators produced during the syndrome [46], the induction of inhibitory molecules might be an attempt to control immunopathology. However, a consequent

regulation of antigen-specific functions could impair parasite control and favor subsequent infections. Indeed, along with higher parasitemia, higher proportions of CTLA-4, LAG-3,

Figure 5 continued and regulatory molecules within Ki-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (left) and Ki-67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (right) T cells ( $n = 14$ ). Abbreviations: AT, after successful antimalarial treatment; BT, before treatment; CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte attenuator-4; HD, healthy donor; ICOS, inducible costimulator; LAG-3, lymphocyte activation gene-3; PD-1, programmed death-1; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-3.

PD-1, and TIM-3 expressing T cells were found in malaria patients. It is also interesting to note a positive correlation between the expression of regulatory/activation markers on T cells and tissue damage and decreased platelet counts (Supplementary Figure 1B and 1C). *Plasmodium* infection induced the expression of regulatory molecules in both T-cell subsets, but distinct proportions of receptors expressing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes were observed. For example, the expression of LAG-3 was only upregulated on CD8<sup>+</sup> T cells.

Induction of PD-1 expression was previously described in Malian children exposed to *P. falciparum*. It was also shown in the experimental model of malaria that *P. yoelii* induces PD-1 and LAG-3 expression on CD4<sup>+</sup> T cells and that the blockade of PD-1 ligand and LAG-3 restored T-cell function, enhanced the antibody titer, and induced a rapid clearance of blood-stage malaria in mice. More recently, higher proportions of PD-1 and/or LAG-3 expressing T cells were found in children persistently exposed to *P. falciparum* compared with naive children and those from an area where the levels of malaria transmission has declined, Kenya. Similarly, our data demonstrate that *P. vivax* exposure leads to an important increased expression of regulatory molecules on both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.

Several studies have demonstrated that T-cell dysfunction during chronic infection is mediated by the coexpression of more than 1 inhibitory receptor [40, 47]. In this context, the majority of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD8<sup>+</sup> T cells exhibit an immature phenotype and express PD-1, CD160, and 2B4 but not LAG-3, and the blockade of both PD-1 and 2B4 signaling restores CD8<sup>+</sup> T-cell functions during infection [48]. Furthermore, a study [35] using a chronic model of lymphocytic choriomeningitis virus showed that exhausted CD8<sup>+</sup> T cells are subject to complex layers of negative regulation resulting from the coexpression of multiple inhibitory receptors. The coexpression of multiple distinct inhibitory receptors is associated with greater T-cell exhaustion and more severe infection. Moreover, simultaneous blockade of PD-1 and LAG-3 synergistically improved T-cell responses and diminished viral load in vivo. Coexpression of 2 regulatory molecules is also observed among T cells from *P. vivax*-infected patients. Moreover, a significant proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from *P. vivax*-infected patients express 4 regulatory molecules simultaneously. Lower frequencies of regulatory molecule-expressing cells were observed after malaria cure, and the levels of expression reached that observed in HD, following the lower cytokine levels and the absence of parasitemia.

PD-1 has received attention for being a marker of exhaustion of CD8<sup>+</sup> T cells [4], but in some situations, PD-1 expressing T cells do not display defects in effector functions [12, 41–43]. Indeed, along with the expression of the regulatory molecules, T cells from *P. vivax*-infected patients displayed significantly higher proportions of T cells expressing the costimulatory molecule ICOS and Ki-67. The majority of CD4<sup>+</sup> T cells expressing

Ki-67, which are able to proliferate, also express ICOS. Interestingly, most of the cells that express Ki-67 also express PD-1. The coexpression of ICOS, Ki-67, and PD-1 is seen in both T-cell subsets during acute malaria, but it is even more evident among CD4<sup>+</sup> T cells. On the other hand, lower proportions of Ki-67<sup>+</sup> T cells coexpress the regulatory molecules LAG-3 and TIM-3. Different patterns of expression is seen within the populations of Ki-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and Ki-67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. Much higher frequencies of regulatory molecules are observed in Ki-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells compared to Ki-67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. Moreover, a 3-times higher proportion of Ki-67-expressing cells are observed among CD8<sup>+</sup> T cells when compared to CD4<sup>+</sup> T cells.

As previously reported in other infections [26, 35, 38], the blockade of a single inhibitory receptor does not alter the production of cytokines by T cells during malaria. However, in *P. vivax* infection, the simultaneous blockade of CTLA-4, PD-1, and TIM-3 signaling increased IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , and IL-4 production upon antigen-specific stimulation. However, a strong stimulus can overcome T-cell exhaustion during *vivax* malaria as previously observed in HIV infection [40]. In the murine model of malaria, the blockade of CTLA-4 or PD-1 led to cerebral malaria due to increased cytokine production triggered by *P. berghei* [23]. On the other hand, blockade of PD-L1 and LAG-3 cleared established blood-stage *Plasmodium* infection in a different model of the disease. In the latter, the protection was associated with the generation of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> and IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>CD49d<sup>hi</sup>CD137<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> T cells [25]. Association of more than 1 blockade was done in several models of infectious diseases and also to restore antitumor immunity [49, 50]. These data further corroborate that coexpression of regulatory molecules on T cells from *P. vivax*-infected patients impairs their function. However, we are aware that because our study was limited to peripheral blood, it is unclear if the same differences would be observed in other relevant tissues.

In conclusion, our study shows that *P. vivax*-infected patients have a higher proportion of activated and exhausted T cells. The simultaneous expression of regulatory molecules during malaria strongly indicates T-cell exhaustion, which was confirmed by the restoration of cytokine production by the CTLA-4, PD-1, and TIM-3 signaling blockade. Identification of this mechanism that is able to regulate T-cell responses during malaria provides important information on protection against *Plasmodium* and may provide novel insights in immunotherapy against this infection.

## Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online (<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiv001>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not certified. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the author. Questions or comments regarding errors should be addressed to the author.

## Notes

**Acknowledgments.** We are grateful to Anália Teófilo for reviewing this manuscript, to Dr Luis Hildebrand Pereira da Silva for supporting the development of this work in the endemic area of Porto Velho, and to the nurses for excellent technical assistance. We acknowledge the Program for Technological Development in Tools for Health-PIVTO-PROCELII, for the use of its facilities.

**Financial support.** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (403099/2011-6), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (CBE-PPM-00426-13), the National Institute of Science and Technology for Vaccines (CNPq-573547/2005-6/FAPEMIG/MG-CBE-APQ-0077-09) and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). L. R. V. A. and R. T. G. are CNPq fellows (FQ). D. L. B. was supported by the Immunological research program of the National Institutes of Health/National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIH/NIAID).

**Potential conflict of interest.** D. L. B. has patents and receives patent royalties related to programmed death-1. All other authors report no potential conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

- Guerra CA, Howe RL, Pfaller AP, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:e774.
- Reveron M, M. Elly JM. Inborn immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:109-20.
- Corruption PD, Modhij J, Pringali S, et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into conserved molecules of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:157-87.
- García del Rey F, Kalkstein F, Ringwald KA, Gelfand EB. In situ selection of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:766-57.
- Trindade, Koron KA, Wagner GL, et al. Frequent and persistent, asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. *J Infect Dis* 2001; 183:796-804.
- Kanungo S, Gil LH, Yada MS, et al. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in endemic areas of Porto Velho, Rondonia, in the Amazon region of Brazil. *PLoS One* 2010; 5:e9245.
- Langhorne J, Ndung'u JM, Spence AM, Muth K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat Immunol* 2008; 9:225-32.
- Clark IA, Alves IM, Mills AC, Cowden WB. Pathogenesis of malaria in dually similar conditions. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:508-39, table.
- Miler LJ, Baruch AI, Marsh K, De Souza GK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415:673-9.
- Elliot SR, Spack 77, Doherty JM, et al. Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun* 2007; 75:3021-32.
- Wima E, Gross C, Quinn S, Langhorne J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Int J Immunol* 2001; 31:2970-8.
- Spence AM, Calderon ET, Vainiro C, et al. Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. *J Exp Med* 2006; 203:1427-35.
- Thiawan IM, Hovel L, Seth G, et al. Evidence of endothelial inflammation, T cell activation, and T cell maturation in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51:573-9.
- Kim F, Dietrich M, Hennessy C, Willingham N. Increased levels of soluble Fas ligand in serum in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2000; 68:5051-3.
- Xu H, Wilson J, Yin H, et al. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD8(+) T cells in malaria infection. *J Exp Med* 2002; 195:881-92.
- Yu SJ, West SP, Anli K, Smith KA, Ahmed R. Manipulating both the inhibitory and stimulatory immune systems toward the success of therapeutic vaccination against chronic viral infection. *Immunity Rev* 2008; 22:317-33.
- Eich EJ, Isakgaard R, Marthas FA, Jones DE, Freeman CA. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol* 2013; 191:5542-50.
- Gutierrez PR, Martins FJ, Oliveira C, et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by programmed death-1 receptor 1. *Infect Immun* 2011; 79:1875-81.
- Sharma R, Gajjar JF, Wain LM, Khan IA. Control of *Toxoplasma* reactivation by means of dysfunction of CD8(+) T-cell response via PD-1/PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:196-201.
- Marino-Tokman E, Tongan JJ, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immune regulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 2005; 133:145-52.
- Gou GE, Rajend LJ, Piquet PJ, Allet B, Lambert PH, Vassalli R. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 1987; 237:1210-2.
- Kannawara N, Gou GE, Garma F, Carter R, Mandy SN. Dynamics of liver and spleen levels of tumor necrosis factor are closely associated during clinical parasitemia in *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:5200-3.
- Hofels J, Glaser C, Cooper KN, et al. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host responses to *Plasmodium*-induced acute immune pathology. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002504.
- Kirch AL, Goddeeris JJ, McMillin JF, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligand 1. *J Immunol* 2008; 181:670-66.
- Reber DL, Wherry EJ, Murogan PJ, et al. Restoring function to exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439:922-7.
- Baker NS, Moskova J, Poes JL, et al. Therapeutic blockade of PD-1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infections. *Nat Immunol* 2012; 13:108-95.
- Hernandez JM, Balas E, Karamanlis DK, et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8 T cells drives chronic malaria. *Cell Rep* 2013; 5:1204-13.
- Lopez de Castro F, Gaveretti I, Tarré S, Langhorne J, Hatcher R, Jacobs T. CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of merozoite and lethal *Plasmodium* yeast infections. *Mucosal Infect* 2007; 6:67-94.
- Ilanigumth J, Butler MS, Kostycký S, et al. Chronic exposure to *Plasmodium falciparum* in non-diseased with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. *J Immunol* 2012; 190:1038-47.
- Ermi M, Karako G, Li H, et al. Identification of the host species of human malaria parasites by nested PCR that targets unique sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int* 1997; 46:91-5.
- Carvalho RO, Lopez SC, Nogueira FA, et al. On the cytomaturation of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 2010; 202:638-47.
- Iskandari EI, Mandy SN. *Plasmodium vivax* infection of murine splenic stroma and gametocytes from infected human blood by colostrum mice (*Peromyscus crinitus*). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81:25-8.
- Neuhart E, Berlin C, van den EF, et al. Cryopreserved reticulocytes derived from human polycythemic stem cells can be invaded by cryopreserved *Plasmodium vivax* trophozoites. *PLoS One* 2012; 7:e40798.
- Day CL, Kaufmann DE, Kapiganda P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 439:910-4.
- Wachsmuth IK, Shin H, Haining WN, et al. Coexpression of CD137 and T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009; 10:29-37.
- Gerde J, Lambie H, Balch JJ, Walker IH, Schweb U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133:1710-5.
- Neuhart E, Berlin C, Van Den A, D'Almeida U, Echara A. 1912-2012: a century of research on *Plasmodium vivax* in stem cells. *Trends Parasitol* 2013; 29:286-94.
- Gutierrez S, Kumar R, Singh N, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2013; 208:290-9.



39. Nakamoto N, Cho JL, Shikata A, et al. Synergistic reversal of hepatitis C virus-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000333.
40. Jones RS, Ndlovu LC, Bekele JI, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly skewed frequency in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 2008; 205:2763-79.
41. Sanmiquel D, Borik N, Hamelin N, Teitel F. Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II. *Immunogenetics* 1998; 48:116-24.
42. Cho HY, Lee SW, Seo SE, Choi DK, Choi J, Lee SW. Interferon- $\alpha$ -induced response element is mainly responsible for IFN- $\alpha$ -induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779:81-9.
43. Gong JH, Zhang M, Modlin RL, et al. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 response and CTLA-4 expression. *Infect Immun* 1996; 64:915-8.
44. Nakao S, Yoshida Y, Sato H, Gold SJ. Phenotypic difference between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 2007; 81:1258-65.
45. Said EA, Dupuy FF, Trussman L, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med* 2010; 16:652-9.
46. Andrade EA, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* 2010; 9:15.
47. McMahon EE, Golden-Mason L, Nathman ME, et al. Tim-3 expression on PD-1+ HIV-specific human CD8 is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* 2010; 120:656-67.
48. Yamamoto T, Price DA, Casazza JF, et al. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection. *Blood* 2011; 117:4805-15.
49. Sakurai E, Apantaku I, Sullivan JM, Blum RE, Kiechel VE, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010; 207:1187-94.
50. Bourcelet J, Sun Z, Bendallam M, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* 2010; 207:2175-86.