

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE MEDICINA

**INFLUÊNCIA DO PERFIL DE CITOCINAS E DA SUPERÓXIDO  
DISMUTASE SOBRE A CARGA PARASITÁRIA NA INFECÇÃO  
AGUDA POR *Plasmodium vivax***

DANIEL MONTE FREIRE CAMELO

São Luís

2015

DANIEL MONTE FREIRE CAMELO

**INFLUÊNCIA DO PERFIL DE CITOCINAS E DA SUPERÓXIDO  
DISMUTASE SOBRE A CARGA PARASITÁRIA NA INFECÇÃO  
AGUDA POR *Plasmodium vivax***

Trabalho de conclusão do Curso da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do grau de Médico.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Co-orientador: Prof . Ms. Bruno de Paulo Ribeiro

São Luís

2015

Camelo, Daniel Monte Freire

Influência do perfil de citocinas e da superóxido dismutase sobre a carga parasitária na infecção aguda por *Plasmodium vivax*/Daniel Monte Freire Camelo. – São Luís, 2015.

76.f

Orientador (a): Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Co-Orientador: Prof. Ms. Bruno de Paulo Ribeiro

Monografia (Graduação em Medicina) –Universidade Federal do Maranhão, 2015.

1.Malária 2.*Plasmodium vivax* 3.Estresse oxidativo4.Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (orientador) II. Título.

CDU 619.935

DANIEL MONTE FREIRE CAMELO

**INFLUÊNCIA DO PERFIL DE CITOCINAS E DA SUPERÓXIDO  
DISMUTASE SOBRE A CARGA PARASITÁRIA NA INFECÇÃO  
AGUDA POR *Plasmodium vivax***

Trabalho de conclusão do Curso da Universidade  
Federal do Maranhão para obtenção do grau de  
Médico.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel Fernandes do  
Nascimento

Co-orientador: Prof . Ms. Bruno de Paulo Ribeiro

Aprovado em: ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento – Orientadora  
Universidade Federal do Maranhão**

---

**Examinador 1  
Universidade Federal do Maranhão**

---

**Examinador 2  
Universidade Federal do Maranhão**

---

**Examinador 3  
Universidade Federal do Maranhão**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter sido tão bondoso comigo nos últimos 22 anos, ter proporcionado saúde a mim e à minha família e forças nessa caminhada na medicina, principalmente nesses últimos meses de luta na confecção desse trabalho. Obrigado Senhor por não me abandonar!

À minha mãe Terezinha de Jesus, que sempre foi pai-mãe para mim e lutou pela minha formação dia após dia, nunca medindo esforços para me fazer feliz. Obrigado por toda a entrega, dedicação, exemplo, amor, carinho e por ter sido o maior exemplo de garra, coragem e humanidade que tive na vida! Você é o pilar central que me sustenta!

Às minhas segundas-mães Lucivânia, Fernanda e Creuza que são exemplos de mulheres guerreiras, por me ensinarem os valores que carregarei comigo pelo resto da vida em cada provação futura.

Ao meu pai Josimar, pelo exemplo de caridade e bondade dado na área da saúde e por ter ajudado financeiramente em minha formação.

Ao meu tio Valdeci, por ter sido um homem presente durante toda a minha vida, por ter ensinado valores que me ajudaram a ser quem sou hoje e por todo apoio dado no meu sonho de ser médico.

À minha namorada Camila, por ter sido uma companheira paciente mesmo nos meus dias de maior estresse, por me fazer sorrir nos dias em que quis chorar e sempre me incentivar em todos os momentos. Obrigado por estar sempre ao meu lado nessa luta com seu amor incondicional. Obrigado!

À família LIF, minha segunda família, por ter sido tão acolhedora quando entrei há 2 anos, por toda a paciência em ensinar desde às técnicas mais básicas, como pipetar, até toda a didática apresentada nos seminários semanais que me ajudaram a formar um pensamento crítico na pesquisa. Obrigado por serem mais que colegas de laboratório, obrigado por serem família. Agradeço especialmente a Johnny, Isabel, Prof. Lucilene, Prof. Ana Paula, Thiare, Wanderson, Paulo Vitor, Gustavo, Artur e Agny.

Ainda no LIF, agradeço a Bruno Ribeiro, meu co-orientador, por ter iniciado esse projeto e tê-lo conduzido de maneira única, sempre com paciência e disposição a ensinar e discutir resultados. Você foi um exemplo de pesquisador e um grande amigo que ganhei!

À Dalila Cysne, por ter sido minha “amiga de iniciação” e hoje irmã-científica. Sempre paciente em cada experimento realizado me ajudou nos primeiros contatos com a ciência,

apesar do pânico que vivenciamos várias vezes. Sempre solícita para discutir resultados e me ajudar a encontrar os artigos que precisava. Obrigado!

E para fechar com chave de ouro o LIF, minha orientadora-amiga, exemplo de pesquisadora e mãe-científica, Flávia Nascimento. Profa. Flávia, a senhora merece muito mais que um singelo “obrigado”. Em meus quase 5 anos de medicina, poucas foram as pessoas que me estenderam a mão e deram tantas oportunidades quanto a senhora, o que torna a palavra obrigado insuficiente. A senhora me mostrou que eu posso ir além do que jamais imaginei ir, a palavra “superação” não poderia faltar, pois esse foi o maior ensinamento que tive ao passar esses últimos anos como seu estudante. Obrigado por ser mais que uma orientadora, obrigado pelos puxões de orelha dados, pelos elogios, por cada sorriso, pelas palavras de incentivo e principalmente pelas críticas construtivas. Obrigado por enxergar um potencial que eu não sabia que tinha e que só a senhora viu! Obrigado!

À turma 93, uma turma inédita e nota 10. Obrigado por ser família, por tornar essa estrada longa e cansativa, um pouco mais leve e agradável! Obrigado pelas risadas, pela ajuda, pelo incentivo, pelo companheirismo, pelo exemplo que cada um dos integrantes desta turma me deu! Obrigado por ser 93.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMA pelos recursos fornecidos.

À Universidade Federal do Maranhão, pela oportunidade de realizar o presente trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição mundial dos casos de malária .....	15
<b>Figura 2.</b> Mapa de risco de malária por município no Brasil.....	17
<b>Figura 3.</b> Número de casos de malária notificados e diferença percentual entre 2011 e 2014 .....	18
<b>Figura 4.</b> Número de casos de malária por <i>P. falciparum</i> + malária mista, com infecção na Região Amazônica e diferença percentual entre 2011 e 2014 .....	19
<b>Figura 5.</b> Casos de malária notificados por estado e percentual de participação no total de casos notificados na Região Amazônica entre 2011 e 2014 .....	20
<b>Figura 6.</b> Número de casos de malária notificados e diferença percentual entre 2011 e 2014 no Maranhão .....	20
<b>Figura 7.</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp .....	21
<b>Figura 8.</b> Fluxograma para tratamento da malária segundo espécie de <i>Plasmodium</i> e condição clínica do indivíduo .....	30
<b>Figura 9.</b> Reação de redução de espécies reativas de oxigênio .....	39
<b>Figura 10.</b> Avaliação da parasitemia de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> .....	48
<b>Figura 11.</b> Influência da idade na parasitemia de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> .....	48
<b>Figura 12.</b> Influência do sexo na parasitemia de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> .....	49
<b>Figura 13.</b> Perfil de citocinas de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> . .....	51
<b>Figura 14.</b> Influência da idade no perfil de citocinas de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> ...51	
<b>Figura 15.</b> Influência do sexo no perfil de citocinas de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> ...53	
<b>Figura 16.</b> Quantificação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> .....	55
<b>Figura 17.</b> Influência da idade na atividade da SOD de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> ...55	
<b>Figura 18.</b> Influência do sexo na atividade da SOD de pacientes infectados com <i>P. vivax</i> ...56	
<b>Figura 19.</b> Correlações entre parasitemia, citocinas, SOD, idade de pacientes infectados por <i>Plasmodium vivax</i> .....	57

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Avaliação semiquantitativa e quantitativa da densidade parasitária por plasmódio na gota espessa de sangue .....	26
<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos grupo Malária e Controle quanto sexo e idade.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD: Grupo de diferenciação (do inglês: Cluster of differentiation)  
Células NK: Células Natural Killer  
COX-2: Cicloxigenase 2  
CREDIP: Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias  
CSP: Proteína Circunsporozoita (do inglês: Circumsporozoite Protein)  
IFN- $\gamma$ : Interferon gama  
IgG: Imunoglobulina G  
iNOS: Óxido nítrico sintase induzida  
IL: Interleucina  
M1: Macrófagos M1  
M2: Macrófagos M2  
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: Major histocompatibility complex)  
mL: Mililitro  
MyD88: Fator 88 de Diferenciação Mielóide (do inglês: Myeloid differentiation primary response 88)  
PBMC: Células mononucleares de sangue periférico (do inglês: Peripheral Blood Mononuclear Cells)  
PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês: Polymerase Chain Reaction)  
Pf-HRP2: Proteína 2 rica em histidina específica de *P. falciparum* (do inglês: *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 )  
pg: Picograma  
pLDH: Lactato desidrogenase  
PNCM- Programa Nacional de Controle da Malária  
TGF- $\beta$ : Fator de crescimento e transformação  $\beta$  (do inglês: Transforming growth factor-beta)  
Th1: Linfócito T Helper 1  
Th2: Linfócito T Helper 2  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (do inglês: Tumor necrosis fator alpha)  
WHO- Organização Mundial de Saúde (do inglês: World Health Organization)

## RESUMO

A malária causada por *Plasmodium vivax* foi considerada por um longo tempo como autolimitada e benigna quando comparado à infecção por *Plasmodium falciparum*, porém atualmente tem sido associada a complicações graves e morte. O quadro clínico depende de um balanço delicado de citocinas pró- e anti-inflamatórias e do estresse oxidativo desencadeados, porém a literatura é escassa quanto aos mecanismos imunológico da malária *vivax*. O objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil de citocinas e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de pacientes infectados com *P. vivax* e avaliar a participação de fatores do hospedeiro e do parasito neste perfil. Os 25 pacientes do estudo foram provenientes dos municípios de São Luís, Cedral e Buriticupu e tiveram confirmação da infecção por gota espessa. Os 9 voluntários do grupo controle foram provenientes de São Luís. Todos os indivíduos inseridos na pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e passaram por uma entrevista para obtenção de dados. O sangue coletado foi encaminhado para o Laboratório de Imunofisiologia da UFMA e processado para separação do plasma, das células mononucleares de sangue periférica (PBMC) e das hemácias. As PBMCs foram colocadas em cultura por 48 horas e o plasma e hemácias foram alíquotados e congelados para posteriores análises de citocinas por CBA, atividade da SOD e carga parasitária por PCR tempo real. Nesse estudo prevaleceram pacientes do sexo masculino entre 20-39 anos de idade, as citocinas a IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  foram estatisticamente significativas no plasma dos pacientes, estando as duas primeiras aumentadas e a última reduzida em relação ao grupo controle. A IL-6 e IL-10 se mostraram fortemente correlacionadas entre si e também com a parasitemia. No sobrenadante de cultura das PBMC apenas IL-10 e TNF- $\alpha$  foram estatisticamente significativas, sendo a primeira aumentada e a segunda reduzida em relação ao grupo controle. Quanto à idade, a IL-6 e a IL-10 foram maiores acima de 40 anos. Em relação ao sexo, IL-6 e IL-10 se mostraram aumentadas no sexo masculino e esse grupo apresentou parasitemia significativamente maior que o grupo do sexo feminino. Quanto a atividade da SOD, houve aumento no grupo dos pacientes e se correlacionou com o aumento de TGF- $\beta$  no plasma. Não foi evidenciada correlação estatística entre a SOD e a parasitemia. No presente trabalho houve predominância de um padrão anti-inflamatório e atividade aumentada da enzima SOD no plasma de pacientes infectados por *P. vivax*, com modificação para um padrão pró-inflamatório nas culturas de PBMC, podendo-se concluir que o parasito promove uma imunoregulação para um perfil menos inflamatório, e esse perfil sofre influência da idade e sexo.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium vivax*, resposta imune, estresse oxidativo

## ABSTRACT

Malaria caused by *Plasmodium vivax* was previously described as self-limited, benign disease compared to *Plasmodium falciparum* infection, although recent evidence has reinforced the association between *vivax* malaria, severe complications, and death. Most of the clinical outcome seems to be a consequence of pathological activation of the immune system, cytokine release and oxidative burst, but poor is known about the immune response of malaria *vivax*. The aim of this study was to determine the cytokine profile and superoxide dismutase activity of patients infected by *P. vivax*, establishing correlations with host and parasite factors. 25 patients diagnosed by the thick blood film method from São Luís, Cedral and Buritcupu were in the study. The control group was composed of 9 volunteers from São Luís. All participants signed a free informed consent and underwent an interview to obtain data. Patient's bloods were sent to Laboratório de Imunofisiologia at UFMA. We proceeded to obtain the plasma, mononuclear cells of peripheral blood (PBMC) and red blood cells. PBMCs were placed in 48 hours culture and plasma and red blood cells were frozen for later analysis of cytokines by CBA, SOD activity and parasite load by real-time PCR. In this study prevailed male patients between 20-39 years old. IL-6 and IL-10 cytokines were increased in the plasma of the patients, while TGF- $\beta$  showed decreased concentrations ( $p \leq 0.05$ ). IL-6 and IL-10 were also strongly correlated with each other and with parasitemia. In the PBMC supernatant culture, IL-10 were found to be increased, while TNF- $\alpha$  was decreased in patients. Furthermore, IL-6 and IL-10 showed increased concentrations in patients over 40 years old and both IL-6 and IL-10 were also higher in male patients, group that also presented higher parasite load compared to female patients. Sod activity was increased in patients plasma and was also directly related to TGF- $\beta$  concentrations. There was no correlation between SOD and parasitaemia. In this study there was a an anti-inflammatory profile and increased activity of SOD enzyme in the plasma of patients infected with *P. vivax*, with PBMC cultures cytokine profile changed toward a proinflammatory pattern. And it may be concluded that the parasite promotes immunoregulation to a less inflammatory profile, and this profile is influenced by age and gender.

**Keywords:** malaria, *Plasmodium vivax*, immune response, oxidative burst

# SUMÁRIO

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	15
2.1 Epidemiologia da malária	15
2.2 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i>	20
2.3 Quadro clínico	23
2.4 Diagnóstico	26
2.5 Tratamento	27
2.6 Aspectos gerais da resposta imune do hospedeiro na malária	30
2.7 Aspectos gerais da atividade da enzima superóxido dismutase na malária	38
<b>3 OBJETIVOS</b>	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
<b>4 MÉTODOS</b>	43
4.1 Áreas de estudo	43
4.2 Perfil amostral	43
4.3 Obtenção do plasma e das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)	43
4.4 Cultura das PBMC	44
4.5 Quantificação do perfil de citocinas	44
4.6 Quantificação da carga parasitária por PCR Real Time	45
4.7 Dosagem enzimática Superóxido Dismutase	45
4.8 Análise estatística	46
<b>5 RESULTADOS</b>	47
5.1 Caracterização da amostra quanto ao sexo e idade	47
5.2 Caracterização da parasitemia de pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i>	47
5.3 Perfil de citocinas de pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i>	49
5.4. Quantificação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) de pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i> .	54
5.5. Correlações entre parasitemia, citocinas, SOD, idade de pacientes infectados por <i>Plasmodium vivax</i> .	56
<b>6 DISCUSSÃO</b>	58
<b>7 CONCLUSÕES</b>	64
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	65
<b>ANEXOS</b>	75

## 1. INTRODUÇÃO

A malária humana é uma doença parasitária causada por diferentes espécies de um protozoário intracelular obrigatório do gênero *Plasmodium* tais como: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*. A transmissão aos humanos ocorre pela picada da fêmea do mosquito pertencente ao gênero *Anopheles* (COX-SINGH et al, 2008; BASSAT E ALONSO, 2011), e trata-se de uma questão de saúde pública de relevância mundial, responsável por cerca de 198 milhões de casos confirmados e cerca de 584 mil mortes, só no ano de 2013 (WHO, 2014).

No Brasil, estima-se que ocorreram 135.172 casos de malária em 2014, sendo 99,5% destes atribuídos a áreas da Amazônia legal (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte dos estados do Mato Grosso e Maranhão) (SIVEP-MALÁRIA/SVS; WHO, 2014). Dentre as 5 espécies de *Plasmodium* causadores da malária humana somente *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* são encontradas em nosso país, sendo que *Plasmodium vivax* foi responsável por aproximadamente 82% dos casos e *P. falciparum* por 18% no ano de 2013 (WHO, 2014). O Maranhão foi o 7º estado da Amazônia legal em número de notificações no ano de 2014 com 1367 casos evidenciando uma redução significativa de 31% no número de notificações em relação ao ano anterior (SIVEP-MALÁRIA/SVS).

A infecção por *P. vivax* foi considerada por um longo tempo como uma infecção autolimitada e benigna quando comparado à infecção por *P. falciparum* (ANSTEY et al, 2009), porém atualmente diversos estudos têm associado a presença de complicações graves à malária *vivax*, como trombocitopenia (RAZA et al, 2014), malária cerebral (OZEN et al, 2006), injúria renal aguda (DAS, 2008) e disfunção pulmonar (ANSTEY et al, 2007).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na infecção por *P. falciparum* são bem descritos pela literatura envolvendo o sequestro de hemácias parasitadas para a microvasculatura, adesão celular e fenômenos isquêmicos mediados pelo aumento da produção de citocinas e recrutamento de células do sistema imune (CROMPTON et al, 2010). Apesar dos estudos com *P. vivax* terem sido negligenciados por muito tempo, nos últimos anos, com a descrição de casos graves de malária *vivax* (DANIEL-RIBEIRO et al, 2008) e a emergência de resistência ao esquema terapêutico convencional para esta espécie (WHO, 2012) vários estudos sobre a imunopatogenia tem sido realizados com o objetivo de identificar fatores relacionados à severidade da infecção.

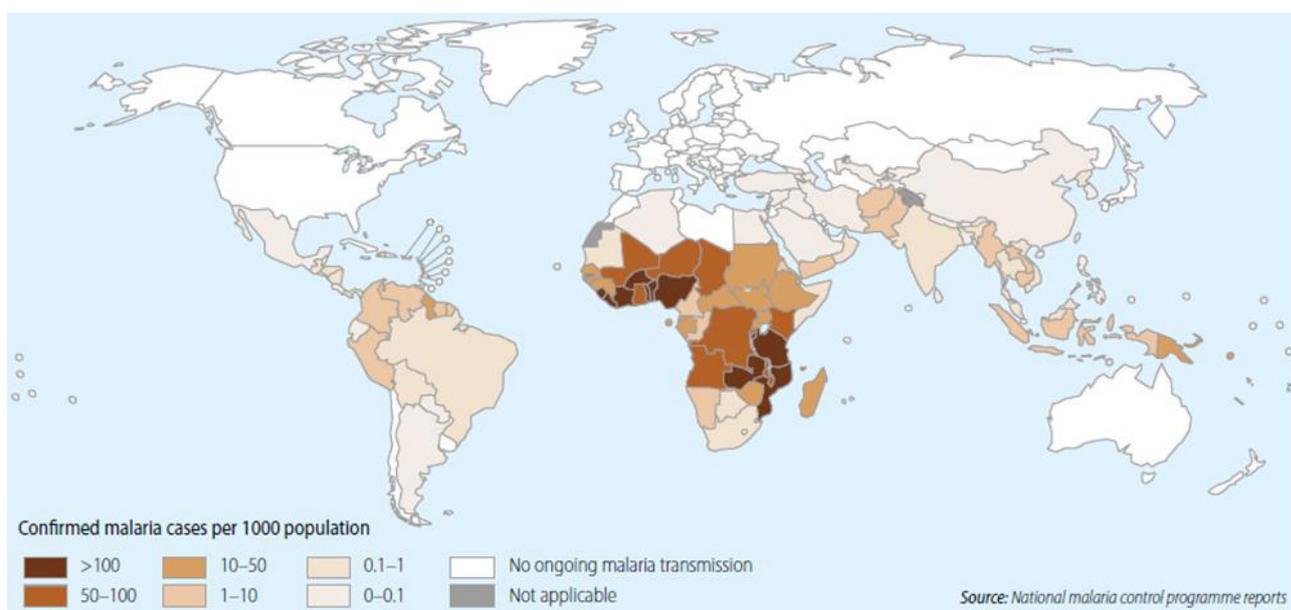
Assim como em diversas infecções sistêmicas, muito da fisiopatogenia da malária *vivax* está ligada a uma intensa atividade inflamatória e ao estresse oxidativo desencadeados. Sabe-se que a infecção por *Plasmodium* induz um aumento e diferenciação de linfócitos T, ativação de macrófagos, células NK, produção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e imunoglobulinas e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ANDRADE et al, 2010 HAFALLA et al, 2011; PEREZ-MAZLIAH e LANGHORNE, 2015). Esses fatores são determinantes no controle da parasitemia e do espectro clínico da doença, porém a literatura carece de estudos avaliando esses fatores na malária *vivax*, já que a maior parte destes utiliza infecção por *P. falciparum* ou modelos murinos com espécies de *Plasmodium* que muitas vezes não são infectantes para o ser humano (OMER et al, 2003; KOBAYASHI, 2007; ZHANG et al, 2014).

Frente ao panorama observado na malária *vivax* de escassez de informações, resistência medicamentosa, emergência de quadros graves e alta prevalência no Brasil e no Maranhão, a avaliação da resposta imune, mais especificamente a avaliação da produção de citocinas e da atividade da superóxido dismutase (SOD), pode fornecer substrato para uma melhor compreensão da resposta imunológica, embasando o desenvolvimento de futuras propostas terapêuticas para a malária.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1- Epidemiologia da malária

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 3.2 bilhões de pessoas em 97 países e territórios presentes nas regiões tropicais e sub-tropicais estão em risco de serem infectados e desenvolverem malária. Desses, 1.2 bilhões se encontram em áreas de alto risco (maior que 1 em 1000 chances de contrair malária em um ano) (Figura 1). As últimas estimativas indicam a ocorrência de aproximadamente 198 milhões de casos (variando de 124-283 milhões de casos), dos quais cerca de 584 mil evoluíram para óbitos. Os piores índices são provenientes das regiões africanas, onde ocorreram 90% dos casos de óbitos, sendo a maioria em crianças menores de 5 anos em decorrência de infecções por *P. falciparum*, espécie responsável por mais de 90% das infecções nessa região (WHO, 2014).



**Figura 1: Distribuição mundial dos casos de malária.**

Fonte: WHO, 2014

Apesar dos elevados índices de prevalência e alta taxa de mortalidade, esses dados mostram avanços no combate à doença. Em 2005, 244 milhões de casos de malária e 985 mil óbitos foram notificados, caindo para 216 milhões de casos e 655 mil óbitos em 2010, chegando aos últimos dados de 198 milhões de pessoas e 584 mil óbitos no ano de 2013 (WHO, 2011; WHO, 2012; WHO, 2014).

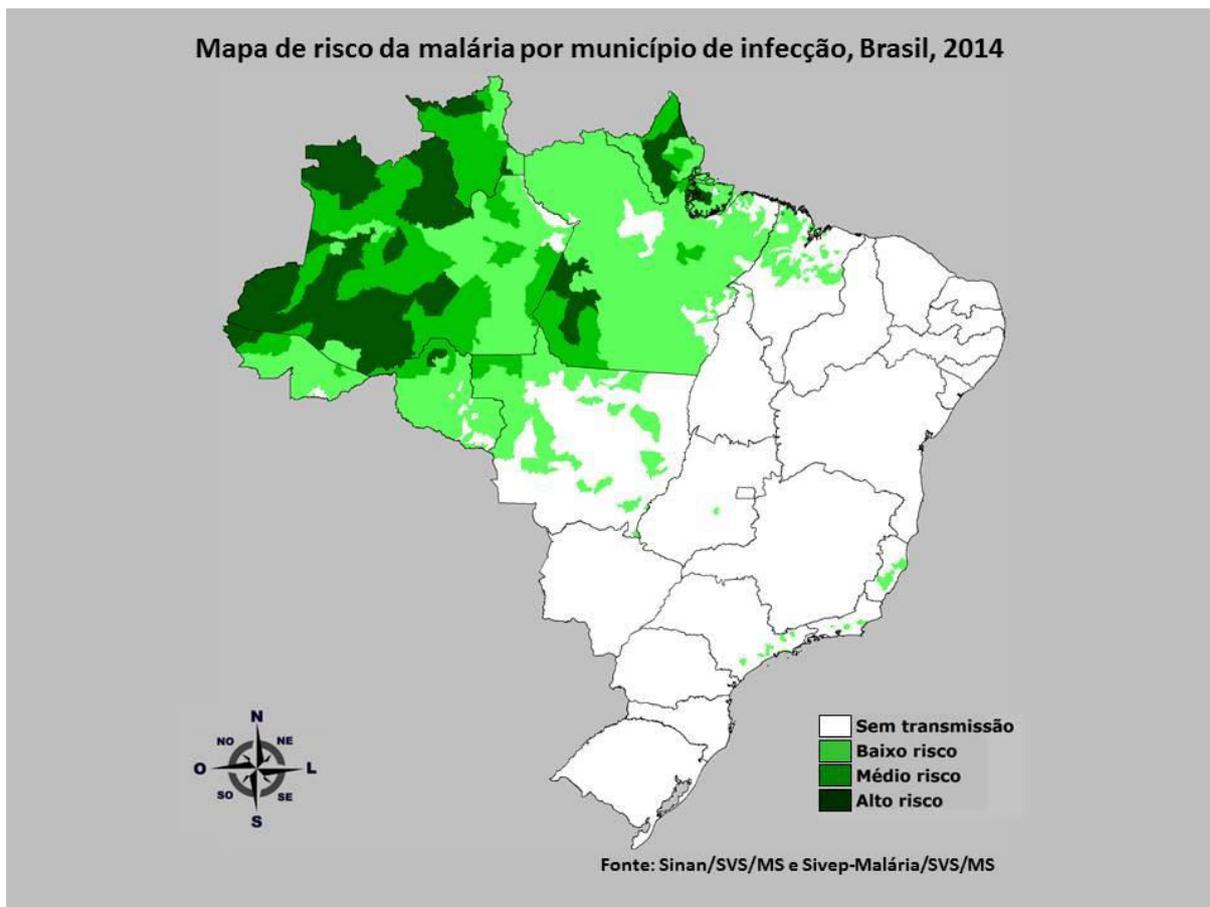
Estes avanços podem ser relacionados ao aumento de recursos financeiros destinados a programas de controle de doenças, com destaque para o Fundo Internacional para Controle da Malária que atingiu US\$ 2.7 bilhões investidos no controle e tratamento em 2013. Entretanto, apesar do aumento dos investimentos, os valores ainda se situam aquém do

estipulado pela Organização Mundial de Saúde, que estipulou o valor de US\$ 5 bilhões anuais para o período compreendido entre os anos 2010 e 2015 (WHO, 2014).

O desenvolvimento da malária no Brasil nos remete ao final do século XIX, quando era distribuída em todo o território brasileiro, especialmente ao longo da costa, do planalto central e das regiões da Amazônia (CAMARGO, 2003). A ocorrência de dois movimentos migratórios na Amazônia iniciou a transição de distribuição dessa doença no território nacional: a primeira em decorrência da expansão da extração do látex e a segunda pela construção da estrada de ferro Madeira Mamoré, que levaram trabalhadores, sem contato imunológico e cultural prévios, a entrarem em contato com o protozoário, resultando em uma explosão de casos que culminou em milhares de mortes (CAMARGO, 2003).

Embora a colonização da Amazônia tenha começado efetivamente em 1940, somente no final da década de 1970 e início da década de 1980 houve uma mudança epidemiológica que levaria a Amazônia a se tornar a principal área malarígena brasileira, situação que persiste até hoje. Muitos migrantes se deslocaram de áreas onde não existia a doença ou, já havia sido eliminada, para a região amazônica, o que resultou novamente na exposição de um número muito grande de indivíduos não imunes à doença, culminando na transformação da Amazônia brasileira no principal foco de malária da América Latina (BARATA, 1995).

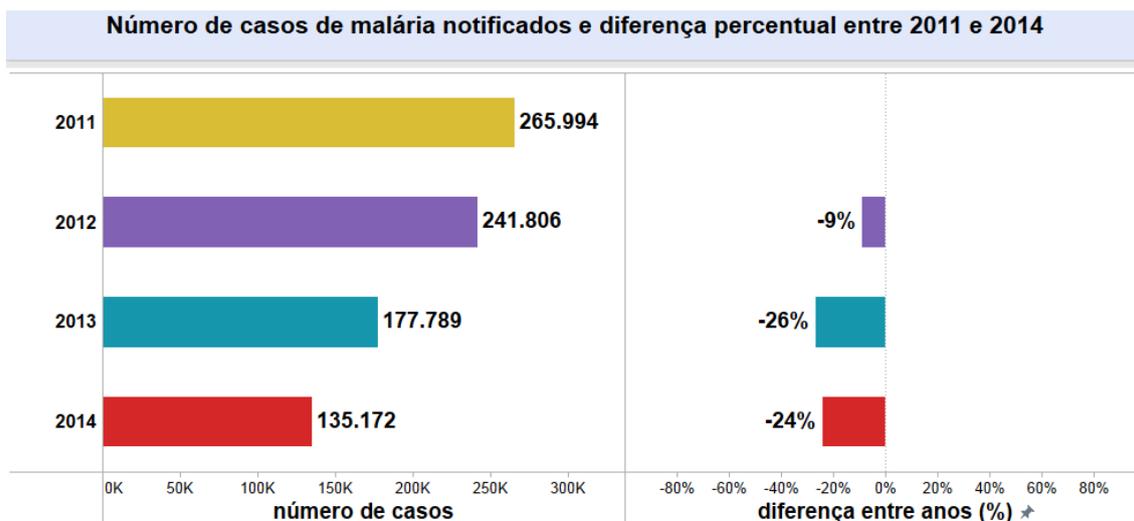
Como resultado do processo histórico, temos hoje uma distribuição heterogênea da malária no território nacional (Figura 2), sendo 99,5% dos casos de malária no Brasil e 60% dos casos da América do Sul atribuídos a áreas da Amazônia legal (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte dos estados do Mato Grosso e Maranhão) (ARÉVALO-HERRERA et al, 2012). No Brasil, das 5 espécies de parasitos causadores da malária humana, somente *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* são encontrados, tendo sido a espécie *Plasmodium vivax* responsável por aproximadamente 82% dos casos e *P. falciparum* por 18% no ano de 2013 (WHO, 2014).



**Figura 2: Mapa de risco de malária por município no Brasil**

Fonte: SIVEP- MALÁRIA/SVS- Ministério da Saúde

O Ministério da Saúde, no período de 2000-2013, registrou uma média de 392.600 casos de malária por ano no Brasil, mas o número de casos vem caindo ano após ano e os valores reportados nos anos mais recentes demonstram bem essa redução: 265.994 casos em 2011, 241.806 em 2012 (uma redução de 9%), 177.789 casos em 2013 (26,% redução em relação ao ano anterior) e mais recentemente 135.172 casos em 2014 (uma redução de 24% em relação a 2013) (Figura 3) (SIVEP-MALÁRIA/SVS).



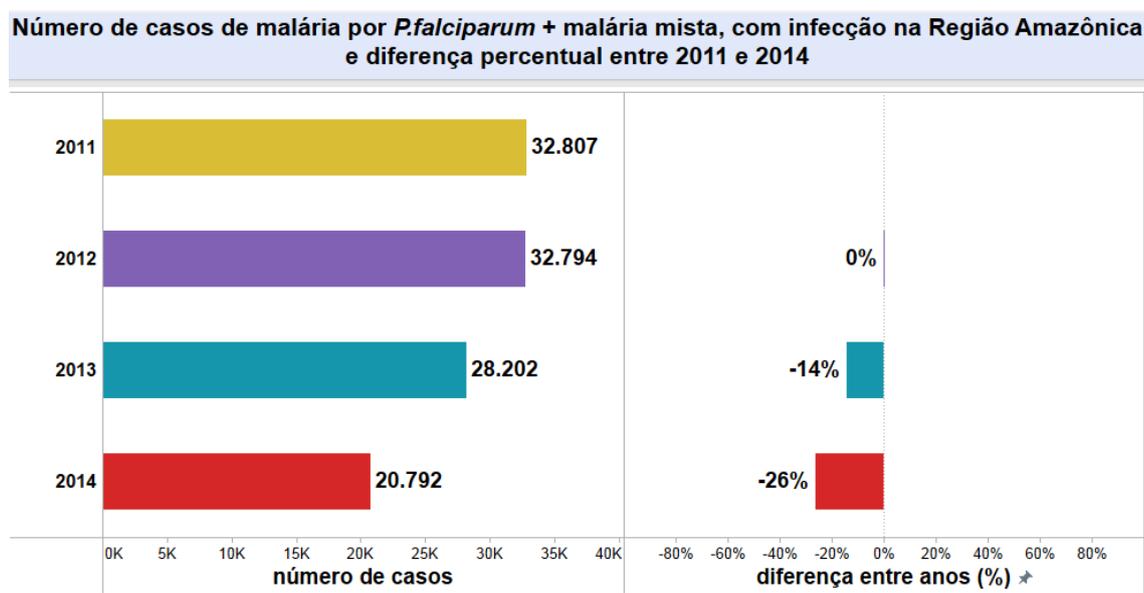
**Figura 3: Número de casos de malária notificados e diferença percentual entre 2011 e 2014.**

Fonte: SIVEP- MALÁRIA/SVS- Ministério da Saúde

A morbidade e mortalidade vêm reduzindo nos últimos anos. Em 2000 foram relatados 21.288 internações e 243 óbitos, enquanto que em 2013 houve 2.365 internações e 41 óbitos (SIVEP-MALÁRIA/SVS). Esta redução deve-se principalmente ao diagnóstico precoce e as políticas de tratamento imediato, principais objetivos do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) a partir de 2003. Em 2013, 40% dos casos foram diagnosticados nas primeiras 24 horas e 60% nas 48 horas após o início dos sintomas (Brasil, 2003).

As estratégias do PNCM visam prevenir mortes e a emergência de formas graves da doença, reduzir o número de casos e as fontes de infecção e, conseqüentemente, a transmissão da malária. A conclusão que o PNMC obteve após análises desses dados foi que essa redução ocorreria principalmente pelo controle das infecções por *P. falciparum* (Brasil, 2003) (Figura 4).

Esta diferença quanto a sensibilidade às intervenções da PNMC tem sido relacionada a características inatas a cada espécie: os gametócitos de *P. falciparum* se desenvolvem tardiamente no curso da infecção, quando comparados aos gametócitos de *P. vivax*, o *P. vivax* apresentar uma fase hepática latente, que pode resultar em novos surtos após o tratamento (BRASIL, 2003; WHITE, 2011), e apresenta uma maior receptividade ecológica, já que essa desenvolve nos mosquitos em temperaturas mais baixas que a espécie *P. falciparum*. Além das diferentes entre as espécies, a menor adesão ao tratamento da malária *vivax* tem sido apontada como importante fator: a primaquina, droga disponível para tratamento da forma latente, requer um tratamento mais longo (7-14 dias), resultando em menor eficácia terapêutica e abandono do tratamento (WHITE, 2011).

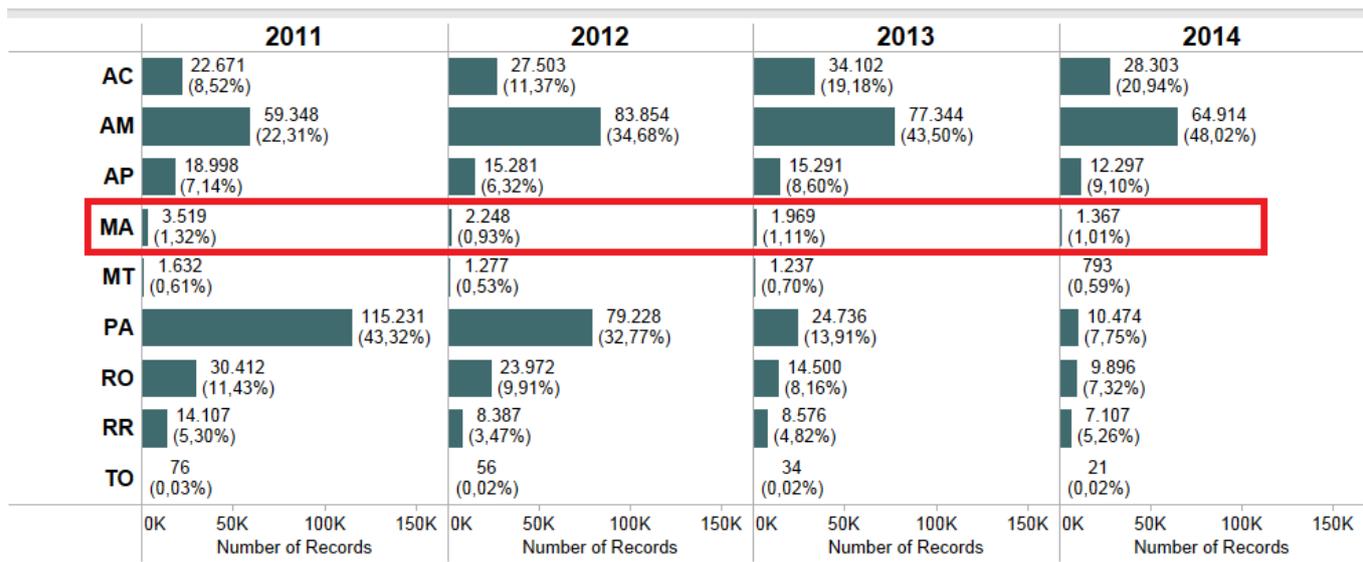


**Figura 4: Número de casos de malária por *P. falciparum* + malária mista, com infecção na Região Amazônica e diferença percentual entre 2011 e 2014.**

Fonte: SIVEP- MALÁRIA/SVS- Ministério da Saúde

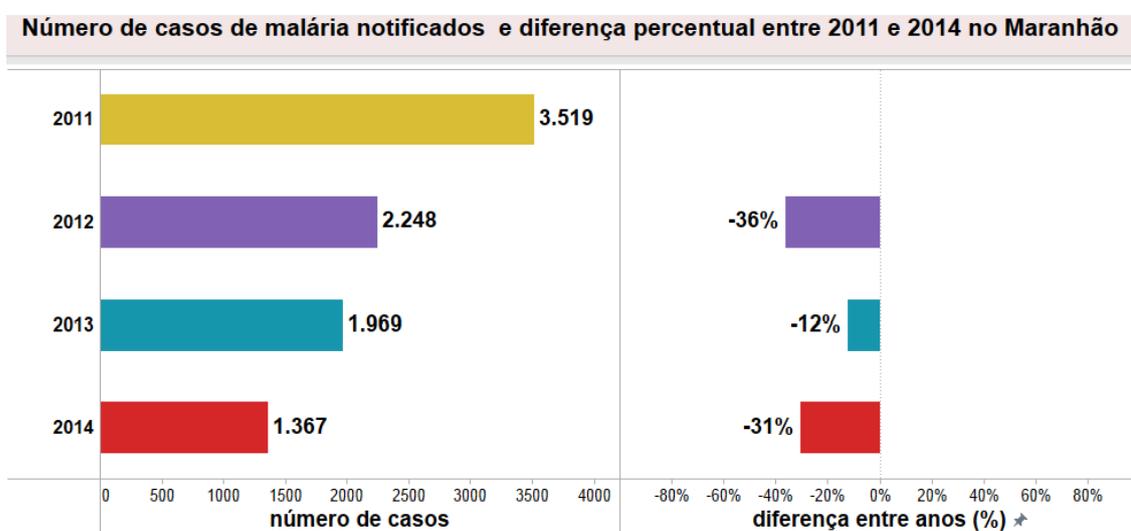
No caso do Maranhão, um dos piores anos malarígenos de sua história foi o ano de 1987, em que 54% dos casos da doença eram por *P. falciparum*. Atualmente a situação maranhense melhorou em relação à malária, apenas 3% dos casos reportados apresentavam infecção por *P. falciparum* e hoje é o terceiro estado da região amazônica com menos casos de malária, com apenas 1% dos casos documentados, a frente apenas do Mato Grosso e Tocantins em número de casos (Figura 5). O avanço no controle da malária no estado é bem evidente quando se analisa a queda do número de casos ano após ano: foram notificados 3.519 casos em 2011, 2.248 em 2012 (uma redução de 36%), 1.969 em 2013 (uma redução de 12% em relação ao ano anterior) e mais recentemente 1.367 casos em 2014 (Figura 6) (SIVEP-MALÁRIA/SVS).

**Casos de malária notificados por estado e percentual de participação no total de casos notificados na região Amazônica entre 2011 e 2014**



**Figura 5: Casos de malária notificados por estado e percentual de participação no total de casos notificados na Região Amazônica entre 2011 e 2014.**

Fonte: SIVEP- MALÁRIA/SVS- Ministério da Saúde



**Figura 6: Número de casos de malária notificados e diferença percentual entre 2011 e 2014 no Maranhão.**

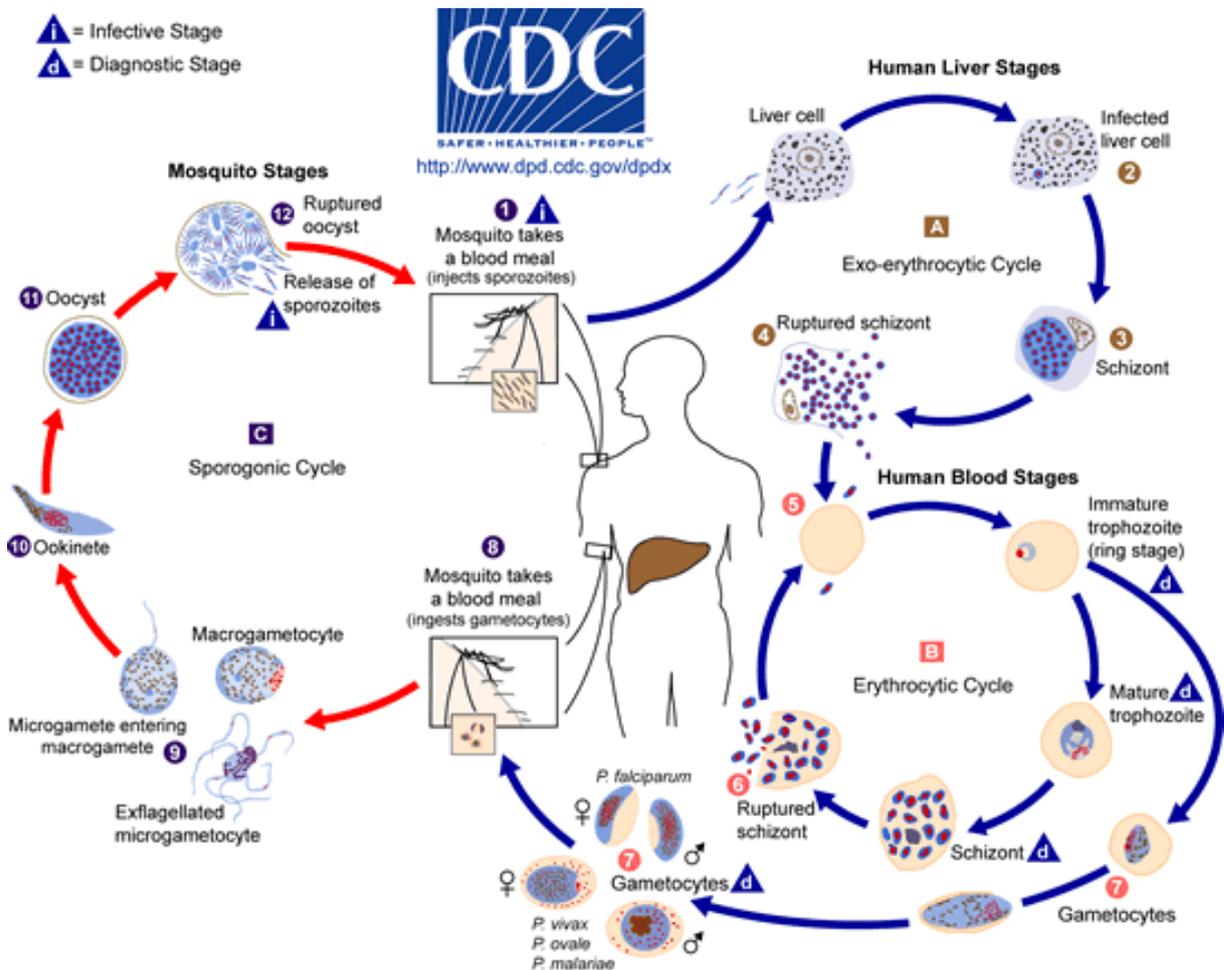
Fonte: SIVEP- MALÁRIA/SVS- Ministério da Saúde

## 2.2 Ciclo biológico de *Plasmodium*

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

Os plasmódios se reproduzem por dois processos distintos: a reprodução assexuada ou esquizogonia, que se desenvolve no hospedeiro vertebrado, e a reprodução sexuada ou esporogonia, que ocorre no hospedeiro invertebrado, o mosquito, com destaque epidemiológico para o vetor *Anopheles darlingi* por sua grande distribuição no território nacional, pelo alto grau de antropofilia e endofagia, adaptando-se perfeitamente ao ecossistema amazônico e dificultando seu controle (DEANE, 1986).

No hospedeiro vertebrado, a esquizogonia pode ser dividida em 2 fases: a fase pré-eritrocítica ou hepática e a fase eritrocítica, conforme descritas a seguir (Figura 7).



**Figura 7: Ciclo de vida de *Plasmodium* sp.**

Fonte: Centers for disease control and prevention (CDC) <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

O ciclo pré-eritrocítico, clinicamente silencioso, se inicia quando a fêmea infectada de *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, inocula os esporozoítos na pele. A maioria desses migra para os capilares sanguíneos e chegam rapidamente, 30 a 45 minutos, ao fígado onde parasitam os hepatócitos (REY, 2011).

Os esporozoítos que penetraram nos hepatócitos originam trofozoítos teciduais que iniciam um processo de maturação e divisão, culminando na formação dos esquizontes

teciduais, que logo irão se romper e liberar merozoítos na corrente sanguínea (SILVIE et al, 2008). Há de se ressaltar que os esporozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* podem evoluir para uma fase estacionária denominada hipnozoíto e permanecerem latentes durante meses e anos, dando origem aos esquizontes teciduais em um período variável de tempo, responsáveis pelas recidivas da doença (CHEN et al, 2007).

Os merozoítos, liberados na circulação pela ruptura do hepatócito, dão início ao ciclo eritrocítico. Eles têm tropismo para os eritrócitos, sendo que os protozoários da espécie *P. vivax* infectam preferencialmente reticulócitos, enquanto os da espécie *P. falciparum* são capazes de infectar eritrócitos em qualquer fase de maturação (ANSTEY et al, 2009). Nesta fase do ciclo, cada merozoíto se diferencia na forma de um anel denominada trofozoíto, o qual se desenvolve, divide seu núcleo por esquizogonia e transforma-se no esquizonte eritrocítico. O esquizonte dá origem, segundo a espécie, a um número variável (8-32) de merozoítos, que em determinado momento, rompe o eritrócito parasitado com liberação desses merozoítos que parasitarão outros eritrócitos, reiniciando o ciclo eritrocítico (STEVENSON e RILEY, 2004; REY, 2011).

O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale* ou a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae* (GREENWOOD et al, 2005). A cada ciclo eritrocitário, a liberação de diversas substâncias tóxicas, como o heme livre, enzimas líticas, radicais livres e a hemozoína (HANSCHEID et al, 2008), induz ativação do sistema imunológico com secreção de diversas substância, como as citocinas, e desencadeamento de estresse oxidativo, culminando no aparecimento dos sintomas, notadamente o paroxismo febril, caracterizado por calafrio, febre e sudorese em caráter cíclico em intervalos dependentes da duração do ciclo eritrocítico de cada espécie (REY, 2011).

Alguns merozoítos resultantes da esquizogonia sanguínea se diferenciam em gametócitos, formas sexuadas responsáveis pela infecção do vetor e início da fase sexuada do ciclo. No interior do hospedeiro invertebrado, os gametas, após a fecundação, formam o zigoto, que na luz do estômago do mosquito modifica sua forma, passando a ter mobilidade, e recebe a designação de oocineto, que migra até a parede do estômago onde se encista, sendo denominado oocisto. No interior do oocisto, os parasitos se multiplicam por esporogonia formando os esporozoítos. Após a ruptura do oocisto, os esporozoítos migram para as glândulas salivares e, por ocasião do repasto da fêmea do mosquito anofelino serão inoculados no homem reiniciando novamente o ciclo (PESSOA e MARTINS, 1982; MUELLER et al, 2009).

### 2.3 Quadro clínico

Em todo o mundo, a maioria das infecções por plasmódios são clinicamente assintomáticas, refletindo a habilidade dos mecanismos imunológicos adaptativos em prevenir suas manifestações (GREENWOOD et al, 2005). Em indivíduos não-imunes, contudo, as infecções são clinicamente evidentes, traduzindo-se na sua forma mais frequente, a forma não-grave, em uma síndrome febril aguda indiferenciada (GROBUSCH e KREMSNER, 2005).

Como descrito anteriormente, o ciclo de vida do parasito no hospedeiro humano possui uma fase hepática e outra sanguínea, sendo a primeira fase clinicamente silenciosa, e a fase intraeritrocítica, na qual ocorre o período de esquizogonia sanguínea, a responsável pelo aparecimento dos sintomas (YAMAUCHI et al, 2007; GOLDBERG e COWMAN, 2010). As manifestações clínicas se iniciam após um período de incubação variável dependente da espécie de plasmódio causadora da infecção (média de 12 dias para *P. vivax*, 15 dias para *P. falciparum* e 30 dias para *P. malariae*) e pode variar entre os indivíduos infectados a depender da imunidade do hospedeiro, tempo de doença e carga parasitária (BRASIL, 2006). Sintomas prodrômicos como mal-estar, fraqueza, sonolência, cefaléia, mialgia e náuseas podem ocorrer antes que surja o paroxismo febril (calafrio, febre e sudorese) característico da doença (REY, 2011; DE SOUZA et al, 2000).

Após a fase de pródromos, a febre assume um caráter intermitente, dependente do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* (malária terçã) e 72 horas para *P. malariae* (malária quartã). Atualmente a visualização desse padrão de febre intermitente é rara em decorrência do início precoce do tratamento, iniciado ainda na fase de assincronismo das esquizogonias sanguíneas, a existência de infecção por populações distintas de plasmódios e o retardo da resposta imune específica em primo-infecções (BRASIL, 2010).

Frequentemente, a febre está associada a outros sintomas como: esplenomegalia (58% dos casos), hepatomegalia (53%), palidez cutaneomucosa (36%), icterícia (34%), vômitos (30%), cefaleia (24%), diarreia (22%), e dispneia (7%). (Da Silva-Nunes, 2007).

Além do quadro de síndrome febril, a infecção pelo gênero *Plasmodium* pode se apresentar como malária grave, quadro clínico de maior gravidade e alta letalidade, classicamente relacionadas a indivíduos adultos não imunes, crianças e gestantes infectadas pelo *P. falciparum* e com altos níveis de parasitemia. Hipoglicemia, convulsões, vômitos de repetição, hiperpirexia, icterícia e distúrbio da consciência, são indicadores de pior

prognóstico e podem preceder às seguintes formas clínicas da malária grave e complicada (FUNASA, 2001):

**Malária cerebral:** ocorre em 30% dos casos de malária grave. Os principais sintomas são uma forte cefaleia, delírium, convulsões, sonolência e coma, podendo ser encontrado no exame neurológico hiper-reflexia tendinosa e sinal de Babinski bilateral (MARSH et al, 1996; FERREIRA, 2005). O quadro é resultado de uma isquemia cerebral difusa precipitada, principalmente, por um bloqueio microvascular causado pela citoaderência das hemácias infectadas por *P. falciparum* (TRAMPUZ et al, 2003). A letalidade nesses casos oscila entre 20-50% dos casos (ALVES et al, 2007).

**Malária renal:** ocorre em 65% dos casos de malária grave, sendo mais frequente em adultos que em crianças. Quadro clínico marcado por oligúria- diurese inferior a 400 ml/ 24 horas – e elevação sérica de escórias nitrogenadas. Diversos são os fatores que atuam sobre o rim provocando injúria renal, tais como eventos tromboembólicos (em decorrência da citoaderência das hemácias infectadas), ativação endotelial com vasoconstricção e liberação de catecolaminas, hipovolemia, deposição de imunocomplexos nos glomérulos (BARSOUM, 2000; DONDORP et al, 2008); nos casos mais graves, a diálise pode ser necessária.

**Malária hepática:** O envolvimento hepático na malária grave é um evento comum, expressando-se, na maioria dos casos, na forma de icterícia, à custa de elevação da bilirrubina direta, hepatomegalia e discreta elevação dos níveis séricos das aminotransferases. No exame histopatológico, pode-se encontrar proliferação de células reticuloendoteliais, congestão, infiltração periportal, infiltração e dilatação sinusoidal e, nos casos mais graves, necrose centrolobular. A insuficiência hepática na malária é rara (BAHETI et al, 2003).

**Malária pulmonar:** Complicação mais grave e rara, com taxa de letalidade superior a 80% (BOULOS et al, 1993). A disfunção pulmonar manifesta-se inicialmente como taquipnéia (aumento da frequência respiratória) que habitualmente evolui para edema pulmonar não-cardiogênico, com formação de membrana hialina e hemorragia intra-alveolar, caracterizando a síndrome do desconforto respiratório do adulto (SDRA) e necessitando de ventilação mecânica (MAGUIRE et al, 2007).

**Hipoglicemia:** Complicação frequente e um dos fatores que mais contribui para a elevação da morbimortalidade na malária grave. Em crianças a hipoglicemia se deve ao comprometimento hepático, comprometendo o processo de gliconeogênese, enquanto no adulto está usualmente associada à hiperinsulinemia resultante da estimulação de células pancreáticas por fatores derivados de *Plasmodium*. A hipoglicemia é de difícil detecção, pois suas manifestações se assemelham com outras alterações presentes na malária grave, tais

como ansiedade, dispnéia, taquicardia, sudorese, coma e convulsões generalizadas. (TRAMPUZ et al, 2003).

Acidose láctica: A acidose metabólica resulta do aumento do metabolismo anaeróbico da glicose, decorrente da hipóxia tecidual associada à anemia e aumento da demanda nutricional pelos eritrócitos parasitados, da inibição da oxidação da glicose na mitocôndria dos eritrócitos parasitados causada pela deficiência de tiamina, febre e o consequente aumento de citocinas pró-inflamatórias, além da diminuição da depuração do lactado pelo fígado devido à redução do fluxo sanguíneo hepático (AGBENYEGA et al, 2008). A combinação dos fatores leva à mudança do metabolismo aeróbio predominantemente nas condições fisiológicas para o anaeróbio levando ao aumento do lactato.

Além das complicações já citadas, vale destacar a ocorrência de anemia, coagulação intravascular disseminada e a sepse por bactérias Gram-negativas.

A malária grave, por estar associada a alta letalidade principalmente em áreas tropicais, tem sido alvo da maior parte dos estudos sobre a doença em questão. Classicamente, a malária grave é descrita como resultado da infecção por *P. falciparum* marcada por uma elevada parasitemia, mais de 2% das hemácias parasitadas no primoinfectado e mais de 5% das hemácias parasitadas nos casos de recorrência. Essa correlação com *P.falciparum* era atribuída a fatores relacionados a virulência dos plasmódios como sua maior capacidade de multiplicação: cada esporozoítio de *P. falciparum* que penetra em um hepatócitos, formam-se cerca de 40.000 merozoítos, enquanto que na infecção por *P. vivax*, formam-se cerca de 10.000; *P. falciparum* forma aproximadamente 24 novos merozoítos/hemácia rompida a cada ciclo, enquanto que *P.vivax* forma aproximadamente 15 merozoítos e *P. falciparum* infecta hemácias em todas as idades, enquanto *P. vivax*, preferencialmente, reticulócitos ( FUNASA, 2001).

Classicamente, considerada uma infecção relativamente benigna quando comparada à infecção por *P. falciparum*, a malária causada por *P. vivax* tem sido recentemente associada com quadros de malária grave e morte: estudos na Índia (BARCUS et al, 2007), Nova Guiné (GENTON et al, 2008), Indonésia (TJITRA et al, 2008) e Brasil (DANIEL-RIBEIRO et al, 2008) têm mostrado a ocorrência de casos graves ocasionados por *P. vivax*, com taxas de incidência e mortalidade muitas vezes semelhantes às decorrentes da infecção por *P. falciparum*. O conhecimento sobre os fatores determinantes da gravidade da malária causada pelo *P. vivax* ainda é escasso e apenas recentemente tem recebido devida atenção (ANSTEY et al, 2009; MUELLER et al, 2009). E para tanto, o conhecimento da resposta imune e o

papel das citocinas e da enzima superóxido dismutase na malária *vivax* não-grave são imprescindíveis e por isso estimularam a realização do presente estudo.

## 2.4 Diagnóstico

Como descrito anteriormente, a malária geralmente se apresenta na forma de uma síndrome febril com sinais e sintomas pouco específicos. A ausência de parâmetros clínicos específicos que permitam realizar um diagnóstico de certeza justifica a necessidade do diagnóstico laboratorial em pacientes com suspeita de infecção, principalmente naqueles que residem em áreas endêmicas (BRASIL, 2001).

O padrão-ouro para diagnóstico da malária é o exame da gota espessa, método simples, eficaz e de baixo custo que se baseia na observação direta do parasito por microscopia ótica, após coloração com corante vital (azul de metileno e Giemsa), e permite a partir da análise morfológica, a determinação da espécie e estágio de desenvolvimento dos parasitos encontrados no sangue periférico, além de apresentar boa sensibilidade na detecção de baixas parasitemias (5- 10 parasitos por  $\mu\text{L}$  de sangue) (BRASIL, 2010).

O exame padrão da gota espessa se baseia na análise de hemácias em 100 campos microscópicos, examinados com aumento de 600-700 vezes, e seu resultado é expresso em cruces, de forma semiquantitativa. Os 100 campos microscópicos equivalem a 0,2  $\mu\text{L}$  de sangue, possibilitando estimar a quantidade de parasitos por  $\text{mm}^3$  (FUNASA, 2001) (Quadro 1).

**Quadro 1. Avaliação semiquantitativa e quantitativa da densidade parasitária por plasmódio na gota espessa de sangue.**

Número de parasitos contados/campo	Parasitemia qualitativa	Parasitemia quantitativa (por $\text{mm}^3$ )
40 a 60 po 100 campos	+/2	200-300
1 por campo	+	301-500
2-20 por campo	++	501-10.000
21-200 por campo	+++	10.001-100.000
200 ou mais por campo	++++	> 100.000

Fonte: BRASIL, 2005

Outro método empregado é o esfregaço sanguíneo, que permite a visualização de mais detalhes da morfologia dos plasmódios, facilitando a identificação da espécie, porém, há uma redução da sua sensibilidade de cerca de dez vezes, quando comparado a gota espessa

(BRASIL, 2006); métodos baseados em amplificação de material genético por reação em cadeia de polimerase, que possuem maior sensibilidade e especificidade do que a microscopia, também podem ser usados, mas dependem de mais infra-estrutura que a microscopia, reduzindo sua aplicabilidade em áreas endêmicas (COSTA et al, 2008).

Os testes rápidos imunocromatográficos, que se baseiam na detecção de antígenos dos parasitos por anticorpos monoclonais e policlonais contra a proteína Pf-HRP2 (Proteína 2 rica em histidina, que é específica de *P. falciparum*) e contra a enzima lactato desidrogenase (pLDH, produzida por todas as espécies de plasmódio), são outras opções. São de fácil execução e interpretação de resultados, dispensam o uso de microscópio e de treinamento prolongado, mas em contrapartida não distinguem a espécie de plasmódio responsável pela infecção, não medem o nível de parasitemia e seus custos são ainda mais elevados que o da gota espessa, sendo indicados em localidades onde o acesso ao diagnóstico microscópico é dificultado por distância geográfica ou incapacidade local do serviço de saúde (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010).

## 2.5 Tratamento

A quimioterapia específica para a malária tem um papel central no que se refere à assistência às pessoas diagnosticadas como portadoras da infecção pelo plasmódio. O tratamento imediato e adequado objetiva a prevenção de formas graves da doença, a redução da mortalidade, além de eliminar a fonte de infecção para o mosquito e, conseqüentemente, reduzir a transmissão da doença (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010).

Atualmente, a terapêutica da malária tem 3 alvos: interromper a esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção, combater as formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale* para evitar recidivas e interromper a propagação do parasito e impedindo o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (gametócitos) (BRASIL, 2010).

Quanto a escolha do esquema terapêutico, a espécie parasitária, a idade do paciente, história de infecção anterior, condições associadas (gravidez e co-morbidades) e a gravidade do quadro, são informações determinantes na escolha da terapia mais adequada (BRASIL, 2010). Vale ressaltar que o tratamento da malária é realizado geralmente em nível ambulatorial, porém algumas situações clínicas podem requerer internação hospitalar: idade menos que 1 ano ou maior que 70 anos; gestantes; pacientes imunodeprimidos; pacientes com sinais de perigo para malária grave: febre > 41°C, convulsões, parasitemia > 200.000

parasitos/mm<sup>3</sup>, oligúria, dispneia, anemia intensa, icterícia, hemorragia e hipotensão arterial (BRASIL, 2010).

Em termos práticos, é muito útil conhecer os medicamentos antimaláricos segundo suas características químicas e segundo o local de ação no ciclo biológico do parasito; de acordo com suas características químicas, os medicamentos antimaláricos podem ser classificados:

- 4-aminoquinolinas: cloroquina e amodiaquina;
- 8 aminoquinolinas: primaquina;
- Quinolinometanóis naturais: quinina;
- Quinolinometanóis sintéticos: mefloquina;
- Fenantrenometanóis: halofantrina;
- Lactonas sesquiterpênicas: derivados da artemisinina;
- Naftacenos: tetraciclina (doxiciclina);
- Lincosaminas: clindamicina.

Quanto o local de ação no ciclo biológico, podem ser classificados em:

- Esquizonticidas sanguíneos: agem nos estágios eritrocíticos do parasita, produzindo uma cura clínica ou supressão da infecção por cepas suscetíveis das espécies de plasmódio, mas sem atuar nas formas latentes das malárias *vivax* ou *ovale* (BRASIL, 2001; SWEETMAN, 2005);
- Esquizonticidas teciduais: agem nos estágios exoeritrocíticos do parasita e são utilizados para evitar a invasão das células sanguíneas, ou para promover a cura radical das malárias *vivax* e *ovale* (BRASIL, 2001; SWEETMAN, 2005);
- Gametocitocidas: agem nas formas sexuadas do parasita, interrompendo a transmissão do homem para o inseto vetor (BRASIL, 2001; SWEETMAN, 2005);
- Esporonticidas: não têm efeito direto sobre os gametócitos no hospedeiro, mas previnem a esporogonia no mosquito vetor (BRASIL, 2001; SWEETMAN, 2005).

Uma descrição sucinta dos principais medicamentos antimaláricos em uso para o tratamento da malária será feita, sendo em seguida mostrado um fluxograma que mostra de maneira simplificada a terapêutica em uso para malária, de acordo com a espécie do parasito e a condição clínica do indivíduo.

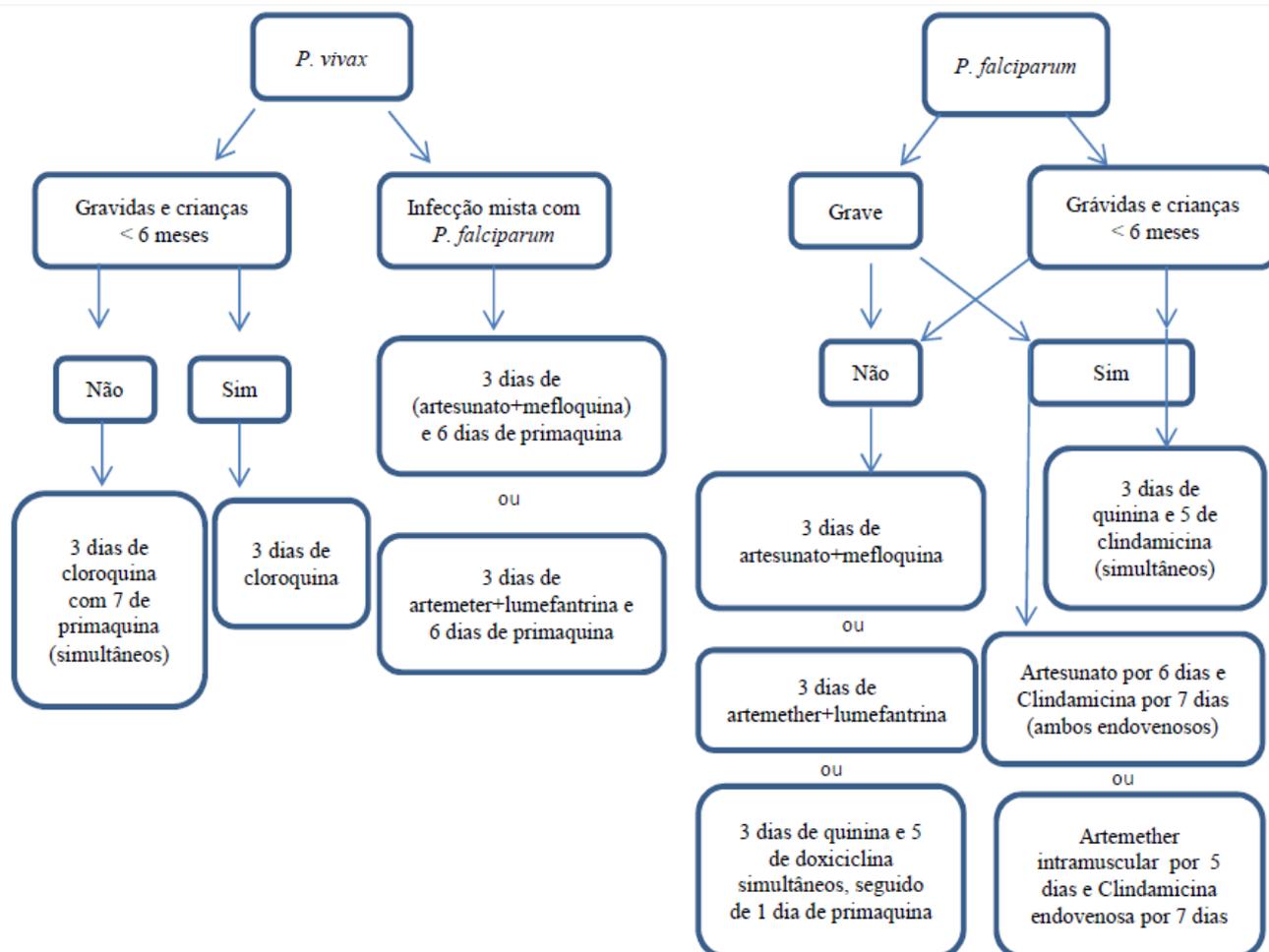
Cloroquina é um representante do grupo de 4-aminoquinolinas com rápida atividade esquizonticida para todas as espécies e gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*. Não tem

ação contra as formas hepáticas e além de seu efeito antimalárico, a mesma tem também ação antipirética e anti-inflamatória. Atualmente, poucas cepas de *P. falciparum* são sensíveis a esse medicamento (BRASIL, 2001). Por via oral, é absorvida rapidamente e quase completamente no trato gastrointestinal, sendo extensamente metabolizada no fígado, formando monodesetilcloroquina como metabólito principal. A cloroquina é capaz de atravessar a barreira placentária, além de ser distribuída para o leite materno. Metade de sua dose é excretada inalterada na urina e cerca de 10% da dose é excretada como monodesetilcloroquina (SWEETMAN, 2005).

A primaquina é um fármaco capaz de evitar recidivas, atuando nos estágios tissulares (exo-eritrocítos) do *P. vivax* e *P. ovale* para evitar e curar a malária recidivante, por ser ativa contra os hipnozoítos (TRACY e WEBSTER, 2003); a não utilização em infecções por essas espécies causa índices de recidivas que vão de 5 a 80%. Possui também ação gametocitocida para esterilização das infecções por *P. falciparum* em pessoas que se mudam para áreas onde o parasito foi eliminado. A primaquina é prontamente absorvida do trato gastrointestinal, metabolizada no fígado, sendo o seu principal metabólito a carboxiprimaquina, e uma pequena quantidade do fármaco inalterado é excretado na urina. Normalmente é bem tolerada, mas pode causar hemólise intravascular em pacientes com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (TRACY e WEBSTER, 2003).

A mefloquina é um 4-quinolinometanol, sendo um potente esquizonticida sanguíneo, de ação prolongada contra *P. falciparum* resistente às 4-aminoquinolinas e também altamente ativa contra *P. vivax* e *P. malariae*. A mefloquina é bem absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo metabolizada no fígado com uma pequena parte excretada na urina. Uma pequena quantidade é distribuída para o leite materno. Atualmente recomendada para uso oral exclusivamente na profilaxia e na quimioterapia da malária *falciparum* resistente à cloroquina ou multi-resistente (TRACY e WEBSTER, 2003).

A artemisinina e seus derivados são esquizonticidas sanguíneos potentes e de ação rápida, provocando a eliminação do parasito e melhora clínica dentro de 1 a 3 dias, entretanto não possuem ação hipnozoitocida. Seus derivados diferem entre si pela lipossolubilidade, sendo o artesunato mais solúvel em água e o artemeter em óleo. Visando evitar o desenvolvimento de resistência e consequente redução da eficácia desse grupo, o Ministério da Saúde recomenda seu uso apenas para as formas graves em áreas de multirresistência de *P. falciparum*, não recomendando seu uso para o tratamento das demais espécies (BRASIL, 2001).



**Figura 8. Fluxograma para tratamento da malária segundo espécie de *Plasmodium* e condição clínica do indivíduo.**

Fonte: Ribeiro (2013)

## 2.6 Aspectos gerais da resposta imune do hospedeiro na malária

O desenvolvimento de uma resposta imune contra um determinado patógeno é um processo complexo que resulta da interação de fatores do hospedeiro e do parasito. Na malária não é diferente, fatores como diversidade antigênica do parasito, estágio do ciclo biológico, coinfeções, maturidade do sistema imunológico do hospedeiro, nível de endemicidade da região e fatores genéticos tanto do hospedeiro quanto do parasito são determinantes dessa relação (SMITH et al, 2002; WIRIA et al, 2010).

Um exemplo clássico dessa interação de fatores é a premunicação. A premunicação foi inicialmente descrita em áreas africanas endêmicas em infecções por *P. falciparum*, porém a alta prevalência de malária assintomática no Brasil demonstra que esse fenômeno também ocorre em nosso país e nas demais espécies de plasmódio (HISAEDA et al, 2005). Esse fenômeno consiste na aquisição parcial de uma imunidade clínica capaz de limitar a carga

parasitária a níveis baixos, reduzindo a gravidade dos sintomas e complicações da doença, tornando o hospedeiro assintomático em grande parte dos casos. Apesar de reduzir drasticamente a parasitemia, a premunicação não é capaz de erradicar o parasito e é adquirida lenta e progressivamente após estímulos antigênicos constantes, determinados por infecções repetidas pelo mesmo parasito, sendo descrita como uma imunidade espécie-específica, cepa-específica e estágio-específica. (DRUILHE e PERIGNON, 1997; HISAEDA et al, 2005; HAFALLA et al, 2011).

Ao longo de seu ciclo, o plasmódio infecta células diferentes e sofre alterações em sua morfologia. Cada estágio possui antígenos diferentes resultando em respostas imunes estágio-específicas sendo interessante o estudo da resposta imune e dos mediadores inflamatórios nas diferentes fases da infecção (SMITH et al, 2002).

#### Estágio pré-eritrocítico e a imunidade protetora

Como descrito anteriormente, o estágio pré-eritrocítico se inicia com a inoculação do esporozoíto na pele até a formação dos merozoítos que infectarão as hemácias. A fêmea do *Anopheles* infectada injeta-os na pele, mais especificamente na derme e não diretamente na circulação como se pensava anteriormente. Em média, um único mosquito injeta entre 10 e 100 esporozoítos, dos quais 20% conseguem entrar no sistema linfático e chegar ao linfonodo drenante e apenas 10% atinge o fígado diretamente pela corrente sanguínea. Os fatores determinantes do número de esporozoítos que chegarão ao sistema linfático são a capacidade de adesão a substratos celulares e sua capacidade de se deslocar através das células, impulsionados pelo motor de actina-miosina (YAMAUCHI et al, 2007; AMINO, 2008; MENARD, 2001).

Durante seu deslocamento, o esporozoíto promove rompimento celular e extravasamento de material citosólico, o que desencadeará uma resposta do hospedeiro. Os esporozoítos que não atingem o sistema linfático, não permanecem muito tempo na derme, células fagocíticas CD11b+ (macrófagos e células dendríticas) promovem sua remoção, segundo experimentos *in vitro* (AMINO, 2006); além disso, a saliva do mosquito induz a degranulação de mastócitos e a infiltração de neutrófilos no sítio de inoculação, fato que auxiliará na destruição parcial dos parasitos (DEMEURE et al, 2005). Essa resposta parcial, incapaz de eliminar todos os parasitos, tem sido relacionada em parte a elevada proporção de células T regulatórias (T-reg) que poderiam induzir uma tolerância imunológica, permitindo que a infecção passe para o próximo estágio (GUILBRIDE et al, 2010; HAFALLA et al, 2011).

Os parasitos que consegue atingir o linfonodo são degradados por células dendríticas CD11c+ e justamente com os fagócitos CD11b+ apresentarão antígenos para células efectoras que irão combater os parasitos que porventura cheguem no fígado (AMINO, 2008).

A transmigração celular do parasito que permitiu a saída de célula da derme, também é importante na movimentação no fígado. O lúmen do sinusóide hepático é separado do hepatócito por uma camada de células endoteliais e células de Kupffer (macrófagos hepáticos), e para que ocorra a invasão desses hepatócitos há grande participação da proteína circunsporozoíta que se liga ao grupamento sulfato de proteoglicanas de heparan-sulfato presentes na matriz extracelular permitindo a passagem do parasito através das células de Kupffer e invasão dos hepatócitos, induzindo a elevação de títulos de anticorpos (em especial IgG) e resposta mediada por células T que serão discutidos mais a frente. (ISHINO et al, 2005; FREVERT et al, 2008; HAFALLA et al, 2011).

O extravasamento de material celular decorrente da migração do parasito pelos hepatócitos promove ativação da via mediada pelo Fator 88 de Diferenciação Mielóide (MyD88) que auxilia na contenção da infecção através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B resultando na produção de óxido nítrico via óxido nítrico sintase (iNOS), que tem um papel importante na contenção das formas exo-eritrocíticas do parasito (TORGLER et al, 2008; HAFALLA et al, 2011). A lise da célula infectada, com consequente liberação de material parasitário, também estimula a infiltração de macrófagos e neutrófilos para essa área culminando na formação de um pequeno granuloma objetivando a contenção dos esquizontes antes de atingirem a corrente sanguínea e iniciarem a fase eritrocítica (BAER et al, 2007).

No entanto, é o linfócito T CD8+ que parece assumir um papel de destaque no estágio pré-eritrocítico da malária: sabe-se que o fígado é sítio primário dotado de grande quantidade dessas células e não há obrigatoriedade da presença de células apresentadoras de antígenos para que a resposta se inicie. Estudos em modelos murinos propõem um modelo que se inicia pela ativação de células T CD8+ após interação com peptídeos derivados do parasito, apresentados via MHC classe I presente nos hepatócitos infectados. A ativação dessas células resultaria na produção de IFN- $\gamma$ , que estimularia a produção de interleucina 12 (IL-12) e essa ativaria células “natural killer” (células NK), que produziriam mais IFN- $\gamma$ , resultando em um mecanismo amplificador da produção dessa citocina. Os elevados níveis de IFN- $\gamma$ , por sua vez ativam a NO-sintase e a via da L-arginina dependente de NO<sub>2</sub> resultando em última instância na produção de óxido nítrico e eliminação dos hepatócitos infectados e dos parasitos intra-hepáticos (DOOLAN e HOFFMAN, 2000; HAFALLA et al, 2011).

A participação de outras células no estágio hepático ainda não está bem estabelecida, alguns estudos sugerem que a resposta no estágio pré-eritrocítico não seja dependente de células TCD4+, porém outros atribuem grande importância por essa ser crucial no recrutamento, ativação e amplificação da resposta mediada por células B e TCD8+. Estudos murinos com esporozoítos atenuados citam que a ativação das células T CD4+ ocorreria pela interação com complexo MHC classe II presente nos hepatócitos infectados. Já ativados os linfócitos TCD4+ produziram IL-4 que ativaria a STAT 6, um membro da família de fatores de transcrição, que seria indispensável para a proliferação e diferenciação de linfócitos em TCD8+ e linfócitos B. (CARVALHO et al, 2002; PEREZ-MAZLIAH e LANGHORNE, 2015). Entretanto, participação dos linfócitos B, através da formação de anticorpos IgG, e das células NK ainda não foi bem estabelecida nesse estágio (HAFALLA et al, 2011).

Apesar dos grandes avanços obtidos nas últimas décadas e do crescimento do número de estudos voltados para os mecanismos envolvidos no estágio pré-eritrocítico, ainda permanecem muitas dúvidas, reforçando a necessidade de estudos nessa área.

#### Imunidade no estágio eritrocítico

Se clinicamente a fase hepática se caracteriza por apresentar nenhum ou poucos sintomas, esta fase é marcada pelos sinais e sintomas da síndrome febril. Como descrito anteriormente, a fase eritrocítica se inicia com a liberação dos merozoítos na corrente sanguínea e através de um processo que envolve ligação a moléculas de superfície eritrocitárias ocorre infecção das hemácias. Estudos anteriores identificaram participação de moléculas de superfícies das hemácias que são usados como sítios de ligação para invasão pelos merozoítos. No caso de infecção por *P. falciparum* foi identificado o ácido siálico e as glicoforinas A, B, e C (HAFALLA et al, 2011). Por outro lado, *P. vivax* utiliza como principal ligante para invasão eritrocitária o antígeno Duffy (MENARD et al, 2010).

Na fase eritrocítica do ciclo, o sistema imune do hospedeiro desenvolve uma resposta marcada pela ativação e recrutamento de elementos celulares que resultam em interações de diferentes mecanismos efetores com elevada produção de citocinas. Estudos em modelo murino e em humanos, principalmente com *P. falciparum*, apontam que as células NK, células T, citocinas, macrófagos e imunoglobulinas são determinantes tanto no controle da infecção malárica, quanto no espectro clínico da doença, sendo o equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 um aspecto central no desenvolvimento dos quadros graves da infecção (HAFALLA et al, 2011; OLIVIER et al, 2014; PEREZ-MAZLIAH e LANGHORNE, 2015).

As células NK vêm sendo apontadas como a ligação entre a imunidade inata e a imunidade adquirida. Nas fases mais recentes da infecção sanguínea as células dendríticas periféricas produzem IL-12 que estimula células NK e células T $\gamma\delta$  a produzirem IFN- $\gamma$ . As células NK seriam a primeira fonte significativa de IFN- $\gamma$  quando expostas a hemácias infectadas por *P. falciparum* (WATANABE et al, 2003; KOBAYASHI et al, 2007) e os níveis elevados de IFN- $\gamma$  estariam relacionados a um clareamento aumentado do plasmódio e consequentemente a uma atividade protetora nas fases iniciais da infecção (OTHORO et al, 2008). Entretanto a confirmação e a relevância dessa atividade protetora ainda não são bem estabelecidas.

O IFN- $\gamma$  e a IL-12 produzidos são importantes estímulos para a diferenciação de linfócitos T CD4+ no subtipo Th1 que por sua vez passaria a produzir citocinas pró-inflamatórias que ativariam células dendríticas, linfócitos e macrófagos, aumentando sua capacidade fagocítica, além de estimular diferenciação de novos linfócitos em subtipo Th1 (ABBAS, 2012; OLIVIER et al, 2014).

As citocinas pró-inflamatórias produzidas principalmente por linfócitos T helper 1, constituem um perfil relacionado a um maior clareamento parasitário e a quadros clínicos com uma sintomatologia mais exuberante (OLIVIER et al, 2014). Esse é o grupo de citocinas que mais tem sido estudado, porém grande parte dos dados é proveniente de observações de infecções por *P. falciparum* ou malária murina.

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória que já fora relacionada à gravidade da malária (KWIATHOWSKI et al, 1990), porém atualmente é mais relacionada como um dos mediadores da febre no paroxismo malárico e na adesão de hemácias infectadas por *P. falciparum* no endotélio vascular (MARTINEY et al, 2000; OLIVIER et al, 2014). Apesar de poder ser produzida por células dendríticas e NK, alguns estudos tem correlacionado sua produção aos macrófagos, possivelmente através da ativação do complexo proteico do inflamassoma (estrutura formada pela fusão do fagossoma, que contem o parasito, e do lisossoma, contendo enzimas e produtos metabólicos capazes de destruir os patógenos fagocitados) após estímulo da hemozoína (DOSTERT et al, 2009; OLIVIER et al, 2014).

A IL-6, no contexto da malária, parece tanto possuir ações diretas no controle da infecção, quanto estar envolvida no espectro clínico da doença, tendo sido descrita correlação entre a severidade do estágio eritrocítico e os níveis circulantes de IL-6 (ZEYREK et al, 2006; WUNDERLICH et al, 2014). Concentrações de IL-6 no soro de pacientes com malária foram associados a ativação policlonal de células B na malária *falciparum* (DONATI et al, 2004),

aos níveis de TNF- $\alpha$ , à parasitemia (CLARK et al, 2006) e às manifestações letais da malária, como no caso da trombocitopenia, situação na qual essa citocina induz uma trombocitose reativa, aumentando o número de plaquetas circulantes, e acarretando em aumento do risco de coagulação intravasacular disseminada seguido da ocorrência de fenômenos hemorrágicos na vigência de um quadro inflamatório com a participação de outras citocinas, como TNF- $\alpha$ . (RAZA et al, 2014).

A IL-12 também tem sua participação na malária, tendo sido apontada como determinante da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e inversamente associada à parasitemia. Esses dados apontam para a importância da IL-12 na manutenção de uma resposta Th1 sustentada contribuindo para o clareamento do parasito (DODOO et al, 2002), importância enfatizada no estudo de Perkins et al (2000) e Malaguarnera et al (2002) em que crianças africanas com infecção severa por *P. falciparum* e altas parasitemias apresentavam baixas concentrações de IL-12, fator que ajudou a compor a gravidade do quadro.

O IFN- $\gamma$ , como citado acima, tem sua produção relacionada aos níveis de IL-12, estando seus níveis associados à resistência do hospedeiro à reinfecções por *P. falciparum*, ativação de macrófagos e aumento da produção de NO por esses, levando a eliminação do parasito por agir sinergicamente com o TNF- $\alpha$  (D'OMBRAIN, 2008). Porém, também tem sido relatado que os altas concentrações dessa citocina estariam correlacionadas com a gravidade da doença (ANDRADE et al, 2010) através da indução da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 (HAFALLA et al, 2011), participando da gênese da febre de maneira indireta.

TNF- $\alpha$  é uma das citocinas mais estudadas, sendo a mais implicada no desenvolvimento das formas graves da doença e descrita como importante preditor de gravidade na malária (ANDRADE et al, 2010). Raza et al (2014), em um estudo realizado no sul do Paquistão, encontraram direta correlação entre o grau de trombocitopenia e as concentrações dessa citocina; uma das explicações atribuídas a este fenômeno é a aderência e o consumo dessas plaquetas pelo endotélio ativado tanto nas infecções por *P. falciparum* (BRIDGES et al, 2010) quanto por *P. vivax* (RAZA et al, 2014). Estudos na malária *falciparum* também correlacionam as concentrações de TNF- $\alpha$  ao desenvolvimento da forma cerebral da malária por participar da ativação endotelial e estimular a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM -1 e E-selectina) que facilitam o ancoramento de hemácias parasitadas e a ocorrência de eventos vaso-oclusivos (ARMAH et al, 2005).

O principal sintoma decorrente dessas citocinas inflamatórias é a febre. O rompimento das hemácias pelos merozoítos, no estágio em questão, libera inúmeras

substâncias, dentre elas a hemozoína. Esse pigmento, resultante da metabolização da hemoglobina pelo parasito, induz a ativação de células dendríticas e macrófagos por um mecanismo dependente de receptor Toll-like-9, MyD88 e NF- $\kappa$ B, culminando na secreção de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-1, que induz a enzima cicloxigenase 2 (COX-2) a produzir prostaglandinas, culminando no aparecimento da febre e calafrios (SCHUMANN, 2007; HAFALLA et al, 2011).

As citocinas anti-inflamatórias também parecem ter importância na resposta imune contra *Plasmodium*. Essas citocinas formam um perfil relacionado à supressão da resposta inflamatória e estímulo da resposta humoral, portanto, também são determinantes no equilíbrio entre proteção e progressão da doença.

A IL-4 é um importante componente da resposta imune, capaz de induzir a diferenciação das células T CD4+ para um perfil de resposta Th2, inibindo a resposta Th1 pela supressão da produção do IFN- $\gamma$  e contribuindo para a produção de anticorpos por células B (MOSMANN e COFFMAN, 1989), porém sua real participação na malária ainda não foi estabelecida.

A IL-10 é uma das principais citocinas anti-inflamatórias estudadas na malária, tendo um papel imunoregulador importante na infecção por *P. vivax* e *P. falciparum*, reduzindo os efeitos nocivos que as citocinas produzidas por células Th1 e TCD8+ possam produzir quando em concentrações exacerbadas (MEDINA et al, 2011; SILVA et al, 2014). Andrade et al (2010) associou os níveis elevados de IFN- $\gamma$  e as baixas concentrações de IL-10 com a severidade da infecção; porém o predomínio de IL-10 está relacionado com menor controle da parasitemia (MENDONÇA et al, 2013) por atuar reduzindo a secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  sendo proposto que *P. vivax* seria capaz de induzir um aumento da produção dessa IL-10 por linfócitos T regulatórios como mecanismo de tolerância e escape (SILVA et al, 2014).

O TGF- $\beta$  é uma citocina produzida por um subtipo de célula TCD4+ que expressa CD25, CD4 e FOXP3, conhecida por linfócito T regulador (T reg), essa denominação foi atribuída por sua capacidade de controlar doenças autoimunes em ratos, quando foi inicialmente caracterizado (SAKAGUCHI et al, 1995). Na malária murina, a regulação da resposta Th1, mediada pelo TGF- $\beta$  e IL-10, tem sido descrita como essencial para limitar uma resposta exacerbada. Essas citocinas promovendo redução do clareamento parasitário e da intensidade das manifestações clínicas (OMER et al, 2003), e em humanos a depleção de linfócitos T reguladores nas fases iniciais da infecção restauram os níveis de IFN- $\gamma$  por retirar o

fator inibitório para a produção inicial dessa citocina por células NK, reduzindo a parasitemia e levando ao surgimento de sintomas (HISAEDA et al, 2005).

IL17 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos Th17, subtipo que vem ganhando destaque desde que o paradigma Th1/Th2 passou a ser insuficiente para explicar algumas evidências e por conta de sua participação em doenças autoimunes, inflamação crônica e participação na resposta extracelular contra bactérias e fungos (CHEN et al, 2007). Na malária murina, observou-se ativação de linfócitos Th17 na fase aguda de infecções por *P. yoelli* e *P. berghei* (KESWANI e BHATTACHARYYA, 2014), e que não haveria associação entre o curso da doença em ratos infectados por *P. berghei* e a deficiência de IL-17 (ISHIDA et al, 2010). Apesar da ativação dessas células, o papel e a importância da IL-17 e dos linfócitos Th17 ainda não foram definidos nas infecções por *Plasmodium*.

Os macrófagos parecem apresentar um papel de destaque no caso da malária, participam do controle da infecção por meio da fagocitose e secreção de fatores solúveis, como as citocinas, fator estimulatório de colônia de granulócitos e macrófagos, espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Essas funções parecem ser alteradas pelo microambiente gerado pela presença de diversas substâncias, o acúmulo de hemozoína, por exemplo, contribui para ativação dessas células e para o desenvolvimento de uma resposta imune mais contundente (OLIVIER et al, 2014).

A produção de imunoglobulinas parece estar relacionada a ativação de células dendríticas plasmocitárias, que reconhecem o patógeno e seus produtos via receptor Toll-like 9 e ativam o intermediário adaptador MyD88 e por meio da ativação subsequente do NF- $\kappa$ B estimularia a produção de imunoglobulinas, que apesar de não conferirem imunidade são capazes de suprimir as manifestações clínicas em infecções agudas (CROMPTON et al, 2011). Alguns estudos apontam que a transferência passiva de imunoglobulinas G (IgG) purificadas do soro de indivíduos imune pode promover uma redução significativa da parasitemia dos indivíduos receptores (RICHARDS et al, 2010; QUELHAS et al, 2011), porém ainda é controverso essa questão.

Vários são os mecanismos pelos quais os anticorpos atuam: nos merozoítos, bloqueiam as proteínas de superfície que iniciam a interação com as hemácias, impedindo sua invasão (MITCHELL et al, 2004); impedindo o reconhecimento, invasão e ruptura dos eritrócitos por inibição de eventos importantes, tais como a liberação de protease pelo parasito (ERSMARK et al, 2004); opsonizando merozoítos e facilitando sua fagocitose por macrófagos, através de anticorpos IgG1 e IgG3. Além de atuar nos merozoítos, impedem a

degradação da hemoglobina pelo parasito, principal fonte de nutrientes e neutralizam toxinas liberadas após a lise das hemácias (BANERJEE et al, 2002).

## 2.7 Aspectos gerais da atividade da enzima superóxido dismutase na malária

A função primordial dos eritrócitos é transportar oxigênio dos pulmões para os diversos órgãos e tecidos. A hemoglobina corresponde a 95% das proteínas situadas no citosol e tem capacidade de se ligar reversivelmente ao oxigênio, permitindo seu transporte para os tecidos; esse processo, entretanto promove uma lenta oxidação em que ocorre conversão do  $Fe^{2+}$  da hemoglobina em  $Fe^{3+}$ , não sendo mais capaz de se ligar ao oxigênio.

Em um eritrócito com sua membrana intacta há uma série de enzimas que promovem a redução da hemoglobina oxidada, restaurando sua função transportadora e complementarmente, as espécies reativas de oxigênio (o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênios) são neutralizados por um sistema antioxidante composto de moléculas não enzimáticas (vitamina E e ácido ascórbico) e de enzimas, incluindo superóxido-dismutase, catalase, glutatona-peroxidase e peroxiredoxina-2 (RIFKIND et al, 2015).

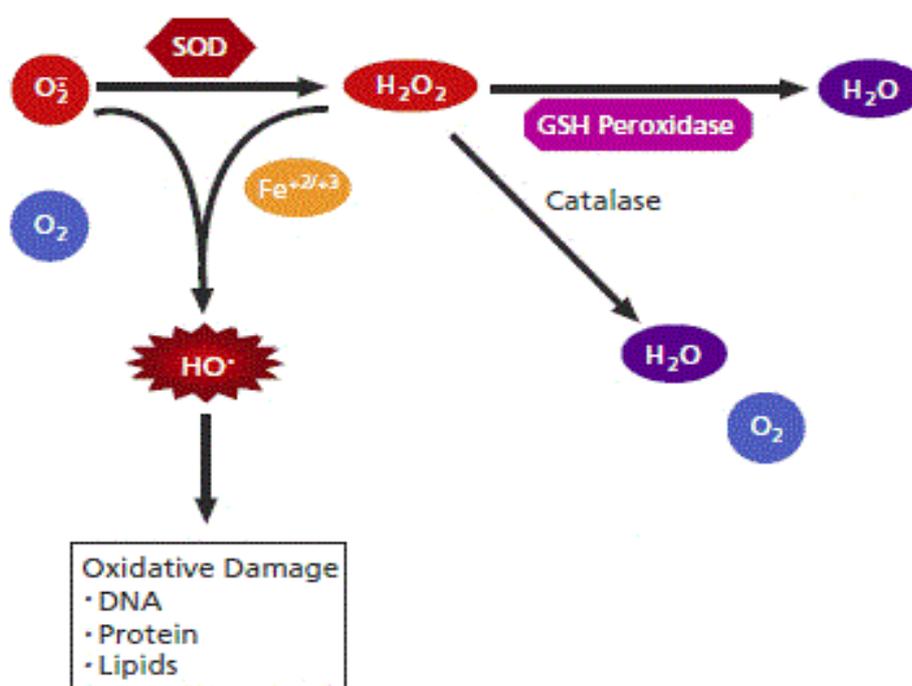
Como descrito anteriormente, durante seu ciclo evolutivo *P. vivax* infecta principalmente as formas jovens das hemácias (os reticulócitos) e após a lise dos eritrócitos ocorre liberação dos gametócitos na corrente sanguínea e concomitante liberação de hemoglobina dessas hemácias (ANSTEY et al, 2009).

A hemoglobina será oxidada por espécies reativas de oxigênio em metahemoglobina, liberando heme livre. Quando em altas concentrações plasmáticas, o heme livre é tóxico para o endotélio, promovendo exposição da matriz extracelular (o que predispõe formação de trombos na circulação do hospedeiro), estimulando uma resposta inflamatória exacerbada com recrutamento de neutrófilos que irão iniciar a resposta imune estimulando ainda mais a produção de espécies reativas de oxigênio. Um ciclo então se estabelece, quanto mais heme livre, maior a resposta inflamatória e, conseqüentemente, mais espécies reativas de oxigênio que reagirão com a hemoglobina, liberando assim mais heme livre na circulação sanguínea (ORJIH, 1997; FERREIRA et al, 2008). Além disso, *Plasmodium* produz uma molécula a partir do heme livre chamada hemozoína, que também atua como um agonista pró-inflamatório que acentua ainda mais a formação de espécies reativas de oxigênio, e tem sido associado com as formas graves de malária (HÄNSCHEID et al, 2008).

Essas espécies reativas de oxigênio, principalmente o ânion superóxido, estão associadas com o combate e extermínio do parasita a nível celular, entretanto quando em níveis elevados promovem danos teciduais, e para evitar propagação da lesão tecidual, o ânion

superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio, uma forma menos danosa às células, pela enzima superóxido dismutase (SOD) e posteriormente resultará na formação de água e oxigênio (FERREIRA et al, 2008; DIVE et al, 2003).

A SOD é uma metaloenzima que atua convertendo o radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que então será convertido pela catalase e pela glutathiona-peroxidase em água e oxigênio (Figura 9). Sabe-se que existem três isoenzimas da SOD, sendo duas intracelulares (a SOD1, citoplasmática, também chamada de Cu/Zn SOD; a SOD2, mitocondrial, conhecida como Mn SOD), e uma extracelular (SOD extracelular, também chamada de SOD EC) (TURKSEVEN e KRUGER, 2005).



**Figura 9. Reação de redução de espécies reativas de oxigênio (adaptada).**

FONTE: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/cellular-derived-blood/cell-figure-1-v1a5.gif>

Estudos em animais e humanos têm correlacionado a atividade da SOD1 com danos tissulares e preditor de gravidade em infecções por diferentes agentes etiológicos. Golenser et al (1998) em um estudo com ratos com aumento na expressão da SOD-1 observaram maior susceptibilidade a infecções por *Plasmodium berghei* e maior grau de lesão tecidual induzida por estresse oxidativo.

Marikovsky et al (2003) avaliaram a influencia da atividade da SOD-1 no processo inflamatório. Os autores ativaram, *in vitro*, os macrófagos peritoneais de murinos utilizando LPS, o que resultou em aumento dos níveis de SOD-1 na cultura desses macrófagos, e

observaram que o aumento da expressão dessa enzima se relacionava com aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , fator de crescimento vascular endotelial e quimionas, sendo importante variável no estabelecimento da resposta imune.

Andrade et al (2010a), em um estudo na Amazônia brasileira compararam a enzima SOD-1 com a citocina TNF- $\alpha$  como preditor de gravidade em pacientes com malária *vivax*. Tanto os níveis da SOD-1 quanto do TNF- $\alpha$  estavam elevados no grupo dos pacientes quando comparados ao grupo controle; quando os autores estratificaram os pacientes de acordo com a gravidade das manifestações clínicas e laboratoriais (assintomáticos, infecção média e infecção severa) observaram direta relação entre a condição clínica e os níveis de SOD-1. Ao correlacionarem a atividade da enzima com os valores de creatinina e alanina aminotransferase (usados como marcadores de disfunção orgânica) observaram que os valores da SOD-1 eram mais sensíveis a alterações desses parâmetros, sendo um preditor mais sensível e específico para determinar sinais de gravidade que o TNF- $\alpha$ , marcador rotineiramente utilizado para avaliar a resposta imune-inflamatória na malária.

Em outro estudo, Andrade et al (2010b) correlacionaram a presença de heme livre, atividade da SOD-1 com os níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  em pacientes com malária assintomática, média e severa. Seus resultados mostraram uma correlação linear entre a concentração da SOD-1 e a severidade da infecção, e que as concentrações de TGF- $\beta$  e prostaglandina E<sub>2</sub> estavam aumentadas nos pacientes quando comparados aos controles, atribuindo esse resultado a ativação de macrófagos que expressam CD14, evidenciando que pacientes com malária severa apresentavam menores níveis dessas moléculas anti-inflamatórias quando comparados aos pacientes com malária média, atribuindo a essa resposta pró-inflamatória sustentada o colapso sistêmico observado nos casos de malária grave.

Khoury et al (2014), além de correlacionarem a atividade da SOD-1 com o quadro clínico de pacientes portadores de leishmaniose cutânea limitada e leishmaniose cutânea difusa, também correlacionaram com a resposta ao tratamento. Observaram que os pacientes com a forma difusa apresentavam atividade da SOD-1 elevada quando comparados aos portadores da forma limitada e aos controles (sendo um marcador de gravidade) e que os níveis de SOD-1 eram mais elevados em pacientes refratários ao tratamento (sendo um marcador de falha terapêutica e um possível alvo terapêutico nas formas cutâneas da leishmaniose).

É bem estabelecido que a inflamação, a hemólise e o estresse oxidativo são elementos chaves na malária *falciparum*. Pesquisas voltadas para os mecanismos

fisiopatogênicos da malária *vivax* ainda são escassas e muito fragmentadas na literatura e apesar de ser atribuída à enzima superóxido dismutase um importante papel na evolução da doença, seu exato mecanismo e suas interações não está bem elucidado, o que instigou o presente trabalho a avaliar sua correlação com o perfil de citocinas e carga parasitária.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar o perfil de citocinas e avaliar sua relação com a atividade da superóxido dismutase e carga parasitária de pacientes infectados com *P. vivax*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Caracterizar o perfil de citocinas no plasma e no sobrenadante de cultura das PBMC dos pacientes e dos controles;

Correlacionar o perfil de citocinas dos padrões Th1, Th2 e Th17 com a carga parasitaria, idade e sexo de pacientes agudamente infectados com *P. vivax*;

Quantificar a concentração da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no plasma dos pacientes e correlacionar com as citocinas e carga parasitaria.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Áreas de estudo

O presente estudo iniciou-se na cidade de São Luís, Maranhão, onde se localiza o Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CREDIP), com estrutura para suporte clínico aos pacientes. A seguir, o estudo foi expandido para os municípios de Cedral e Buriticupu, cidades que apresentaram surtos de malária no período deste estudo.

### 4.2 Perfil amostral

25 pacientes virgens de tratamento obtidos por conveniência, de ambos os sexos, com idade entre 3 e 58 anos, que tiveram gota espessa positiva para *Plasmodium vivax*, que não relataram co-morbidades e aceitaram participar do estudo por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido integraram o estudo (grupo Malária) (TCLE-anexo 2). O tratamento a todos os pacientes, inclusive aos que não aceitaram participar do estudo, foi assegurado. Após a assinatura do TCLE, os pacientes tiveram uma amostra de sangue coletada. O grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis e clinicamente negativos para *Plasmodium* sp, oriundos de São Luís- MA (grupo Controle). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Maranhão (Nº de protocolo: 23115 008013/ 2010-07- anexo 1).

### 4.3 Obtenção do plasma e das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

8 a 10 mL de sangue foram colhidos por punção venosa em tubos *Vacutainer*® com anticoagulante EDTA. Este material foi processado para obtenção das PBMC, do plasma e das hemácias. Inicialmente foram retiradas 2 alíquotas de 500 uL do plasma, que foram congeladas à -20°C para posterior análise de citocinas e superóxido dismutase. Então, aproximadamente 7 mL do sangue restante foram diluídos com solução fisiológica e colocados sobre o mesmo volume de Ficoll-Paque™ PLUS. Este material foi centrifugado à 1500 rpm por 40 minutos, ocasionando a separação da amostra em 4 fases distintas: células vermelhas misturadas com polimorfonucleares, da qual se obteve 1 alíquota de 500 uL de eritrócitos para quantificação da carga parasitária, Ficoll, anel de PBMC e resto de plasma diluído. O anel de PBMC foi coletado em tubo separado. Em seguida, foi adicionada solução fisiológica 0,9% à suspensão de PBMC, em um volume 3x superior ao obtido de células. O material foi então levado para centrifugação à 1000 rpm por 10 minutos, sob refrigeração à 5°C. O sobrenadante foi descartado e foram feitas mais duas lavagens, porém com

centrifugação à 800 rpm por 10 minutos. Após isto, o sobrenadante foi novamente descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 (*Sigma*) suplementado com 2 mM de L-glutamina (*Sigma*), 1% de estreptomicina (100 µg/mL, *Merck*), penicilina G (100 U/mL, *Sigma*) e 10% de soro fetal bovino (*Sigma*). Uma alíquota das células foram coradas com azul de tripan e quantificadas em câmara de Neubauer. A seguir, foram levadas para cultura como descrito posteriormente.

#### 4.4 Cultura das PBMC

Alíquotas da suspensão de PBMC contendo  $2 \times 10^6$  células em meio RPMI 1640, foram transferidas para placa de 48 poços de fundo chato em duplicata e tiveram o volume completado para 1000 µL, resultando em uma concentração final de  $2 \times 10^6$  cels/mL. As células foram cultivadas por 48 h à 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o sobrenadante da cultura foi coletado e congelado à -20°C para posterior análise de citocinas.

#### 4.5 Quantificação do perfil de citocinas

Para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e TGF- $\beta$  foi utilizada a técnica de Ensaio Citométrico de Esferas Ordenadas (CBA). Todos os reagentes utilizados foram provenientes do kit para citocinas humanas Th1/Th2/Th17, obtido da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, EUA), exceto pelo TGF- $\beta$ , proveniente do kit TGF- $\beta$ 1 Single Plex Flex (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os plasmas e os sobrenadantes de cultura foram centrifugados à 1500 rpm por 10 min à temperatura ambiente para precipitação de debris. Foram colocados 50 µL/poço das proteínas padrão reconstituídas e diluídas nas concentrações de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:264 ou das amostras a serem testadas. Em seguida, cada poço recebeu 50 µL do mix de beads (esferas recobertas com anticorpos específicos contra as citocinas a serem dosadas) e 50µL de anticorpo conjugado a ficoeritrina (PE). A placa foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas protegida da luz. Após o período de incubação, as amostras foram ressuspensas com 100 µL do tampão de lavagem e a placa foi centrifugada à 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e as amostras foram ressuspensas em 120 µL de solução tampão para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A calibração do citômetro foi realizada utilizando “setup beads” fornecidas pelo fabricante, incubadas previamente com FITC (Isotilcianato de Fluoresceína), ou PE conforme as recomendações do kit. Após a leitura da curva padrão e das amostras, os dados foram

analisados no software FCAP Array Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

#### 4.6 Quantificação da carga parasitária por PCR Real Time

O DNA plasmodial foi extraído de uma alíquota dos eritrócitos utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN- Hilden, Alemanha), conforme orientações do fabricante. A PCR quantitativa em tempo real foi desenvolvida utilizando-se o kit comercial Máxima SYBR Green (Fermentas, Lituânia), preparando um mix de reação com um volume final de 15 µL que continha: 7,5 µL de Maxima SYBR Green master mixture, 0,5 µM de cada primer, 4,0 µL de água DNAase free e 2 µL de DNA genômico. O primer gênero-específico P1 (5'-ACGATCAGATACCGTCGTAATCTT-3') foi combinado com um oligonucleotídeo iniciador espécie-específico para *P. vivax*, V1 (5'-CAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAA-3'). Estes *primers* permitiram a amplificação de um fragmento espécie-específico de 100 pb do gene 18S rRNA.

Os ensaios foram realizados em triplicata no aparelho Mastercycler Realplex Gradiente Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) consistindo da desnaturação do DNA molde a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, com aquisição de fluorescência ao final de cada passo da extensão. A amplificação foi imediatamente seguida por uma curva de dissociação que consistiu de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C e um passo de aumento de temperatura gradual de 0,2°C.s<sup>-1</sup> até 95°C, com aquisição de fluorescência a cada transição de temperatura. O resultado obtido pelo software é dado em número de cópias do genoma plasmodial em uma amostra de DNA, que permite estimar o número correspondente de parasitos na amostra tomando por base a curva padrão construída com 10 pontos a partir da diluição seriada (1:10) da solução plasmodial com número conhecido de cópias da sequência alvo.

#### 4.7 Dosagem enzimática de atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

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

Foram colocados 200 µL/poço da solução de trabalho WST previamente preparada. Nos poços das amostras acrescentamos 20 µL dos plasmas a serem testados e 20 µL da solução de trabalho da enzima. No poço do branco 1 adicionamos 20 µL de água destilada e 20 µL da solução de trabalho da enzima. No poço do branco 2 foram acrescentados 20 µL dos

plasmas a serem testados e 20  $\mu$ L do tampão de diluição. No branco 3 adicionou-se 20  $\mu$ L de água destilada e 20  $\mu$ L do tampão de diluição. A placa foi incubada à 37° C por 20 minutos e teve sua absorbância lida à 450 nm. Os resultados foram expressos na forma de atividade da SOD.

#### **4.8 Análise estatística**

Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 ®. Para determinar se a variabilidade de nossas amostras seguiu um padrão de distribuição normal foi usado o teste de D' Agostino-Pearson. A significância das diferenças observadas nas citocinas e SOD entre pacientes e controle foi determinada utilizando-se teste bi-caudal de Mann-Whitney. Para as análises de correlação foi utilizado o teste de Spearman. A comparação do padrão de citocinas, da parasitemia e da SOD entre as diversas faixas etárias, e entre os sexos foi realizada utilizando teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização da amostra quanto ao sexo e idade.

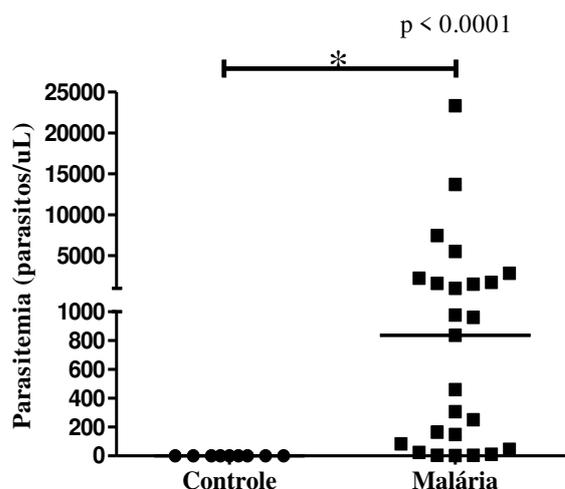
Em relação à idade, a população de estudo foi distribuída entre 3 e 64 anos, sendo as médias de idade do grupo Malária ( 32,28 anos) e do grupo Controle (29,44 anos) similares. Em relação ao gênero, houve o predomínio do sexo masculino tanto no grupo Malária (76%), quanto no grupo Controle (67%).

**Tabela 1. Distribuição dos grupos Malária e Controle quanto sexo e idade.**

	Controle		Malária	
	N	%	N	%
<b>SEXO</b>				
Masculino	6	67	19	76
Feminino	3	33	6	24
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>100</b>	<b>25</b>	<b>100</b>
<b>IDADE</b>				
< 19 anos	0	0	5	20
20 – 29 anos	7	77,7	5	20
30- 39 anos	1	11,1	8	32
>40 anos	1	11,1	7	28
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>100</b>	<b>25</b>	<b>100</b>

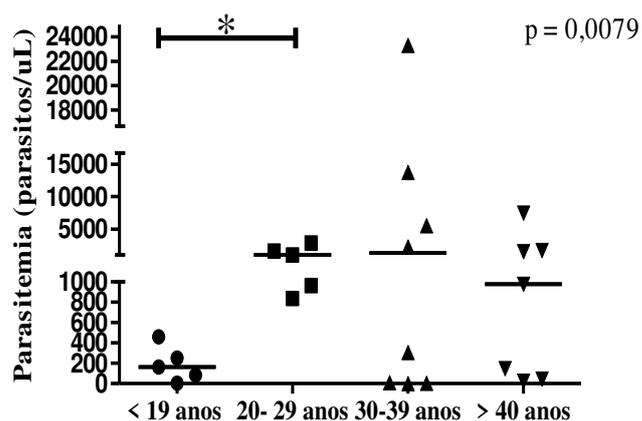
### 5.2 Caracterização da parasitemia de pacientes infectados com *Plasmodium vivax*

Quanto a parasitemia, o grupo Malária apresentou mediana igual a 837,0 parasitos/ $\mu$ L, sendo a parasitemia significativamente maior que no grupo Controle, que teve todos os seus valores iguais a zero (Figura 10). Realizou-se então avaliação da influência da idade e sexo na parasitemia.



**Figura 10. Avaliação da parasitemia de pacientes infectados com *P. vivax*.** A parasitemia foi determinada por PCR real-time. A linha representa a mediana dos grupos (n=25 pacientes e 9 controles).

A avaliação da carga parasitária em relação à idade demonstrou que houve diferença estatística apenas no grupo 20-29 anos quando comparado ao grupo < 19 anos. A concentração mediana da parasitemia foi 164,0 parasitos/  $\mu\text{L}$  no < 19 anos; 1002 parasitos/  $\mu\text{L}$  no grupo 20-29 anos, 1288 parasitos/  $\mu\text{L}$  no grupo 30-39 anos e 977,0 parasitos/  $\mu\text{L}$  no grupo > 40 anos; sendo o grupo 20-29 anos significativamente maior que < 19 anos (Figura 11).

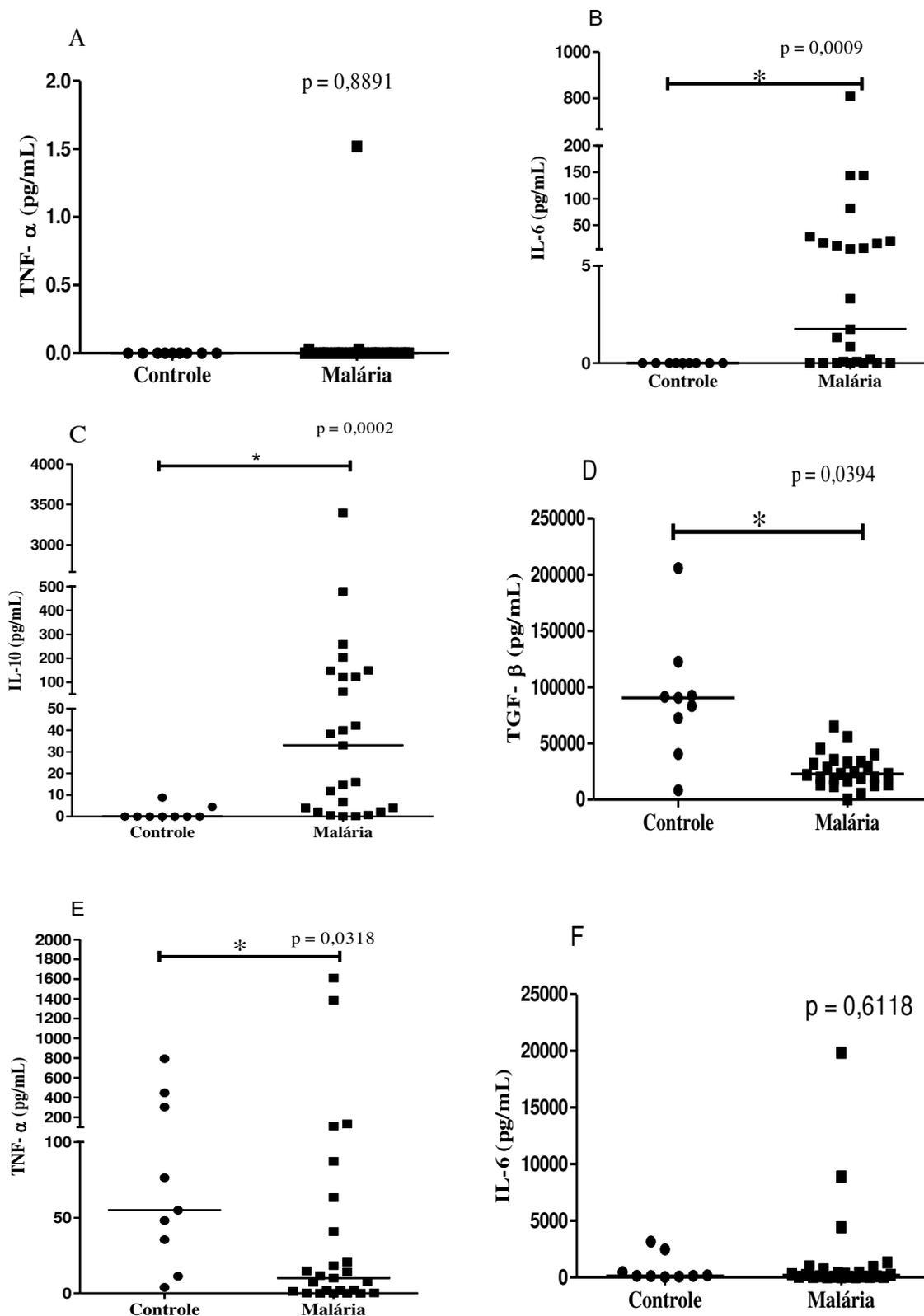


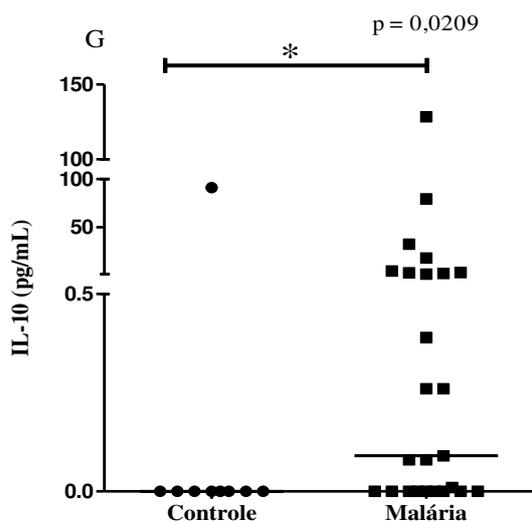
**Figura 11. Influência da idade na parasitemia de pacientes infectados com *P. vivax*.** A parasitemia foi determinada por PCR real-time. A linha representa a mediana dos grupos. (n = 5 no grupo < 19 anos, n = 5 no grupo 20-29 anos, n = 8 no grupo 30-39 e n = 7 no grupo >40 anos).

Para avaliar se o sexo é uma variável que interfere na parasitemia, o grupo malária foi estratificado em dois grupos, Homens e Mulheres, tendo os homens apresentados parasitemias estatisticamente mais elevada que as mulheres. A concentração mediana da



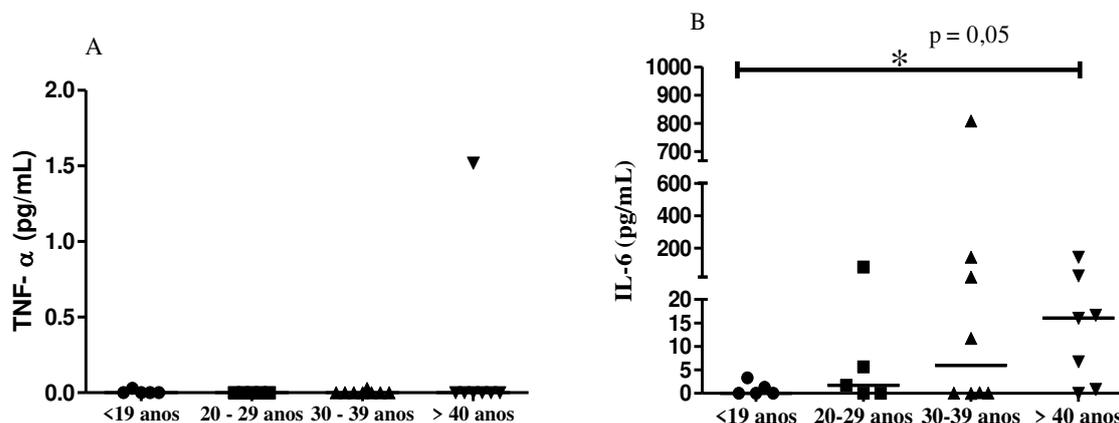
grupo Controle, enquanto que para o TNF- $\alpha$  a mediana foi de 10,02 pg/mL e 54,98 pg/mL, para o grupo Malária e Controle, respectivamente.

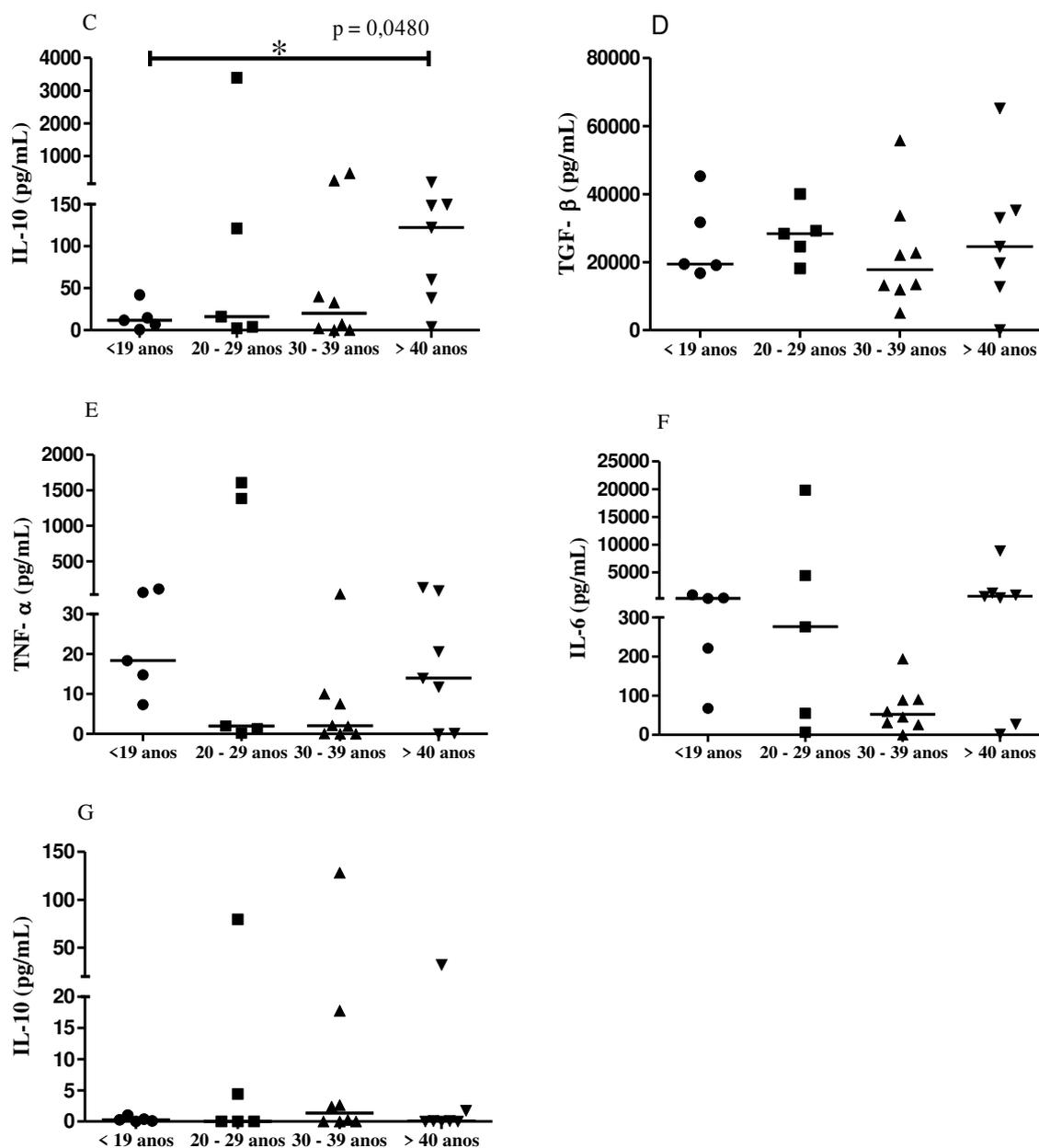




**Figura 13. Perfil de citocinas de pacientes infectados com *P. vivax*.** As citocinas foram quantificadas por CBA. A linha representa a mediana dos grupos. Em A, Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); em B Interleucina 6 (IL-6); em C, Interleucina 10 (IL-10); em D Fator  $\beta$  de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ); em E, Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ); em F, Interleucina 6 (IL-6); em G, Interleucina 10 (IL-10) (A, B, C e D foram quantificadas no plasma; E,F e G foram quantificadas no sobrenadante de cultura das PBMC) (n= 25 no grupo Malária e n = 9 no grupo Controle).

Para verificar se a idade influenciou o perfil de citocinas, o grupo Malária foi estratificado em quatro grupos (< 19 anos, 20-29 anos, 30-39 anos e > 40 anos). Apenas a IL-6 e IL-10 no plasma apresentaram diferença estatística, ambas mais elevadas no grupo > 40 anos que no grupo < 19 anos (Figura 14 B e C, respectivamente). A concentração mediana de IL-6 foi 0,00 pg/mL; 1,750 pg/mL, 5,96 pg/mL e 16,06 pg/mL nos grupos < 19 anos, 20-29 anos, 30-39 e > 40 anos, respectivamente; já para IL-10 a mediana foi 11,82 pg/mL; 16,13 pg/mL, 20,05 pg/mL e 122,4 pg/mL nos grupos < 19 anos, 20-29 anos, 30-39 e > 40 anos, respectivamente. Não houve diferença estatística para as demais citocinas no plasma e no sobrenadante de culturas de PBMC.

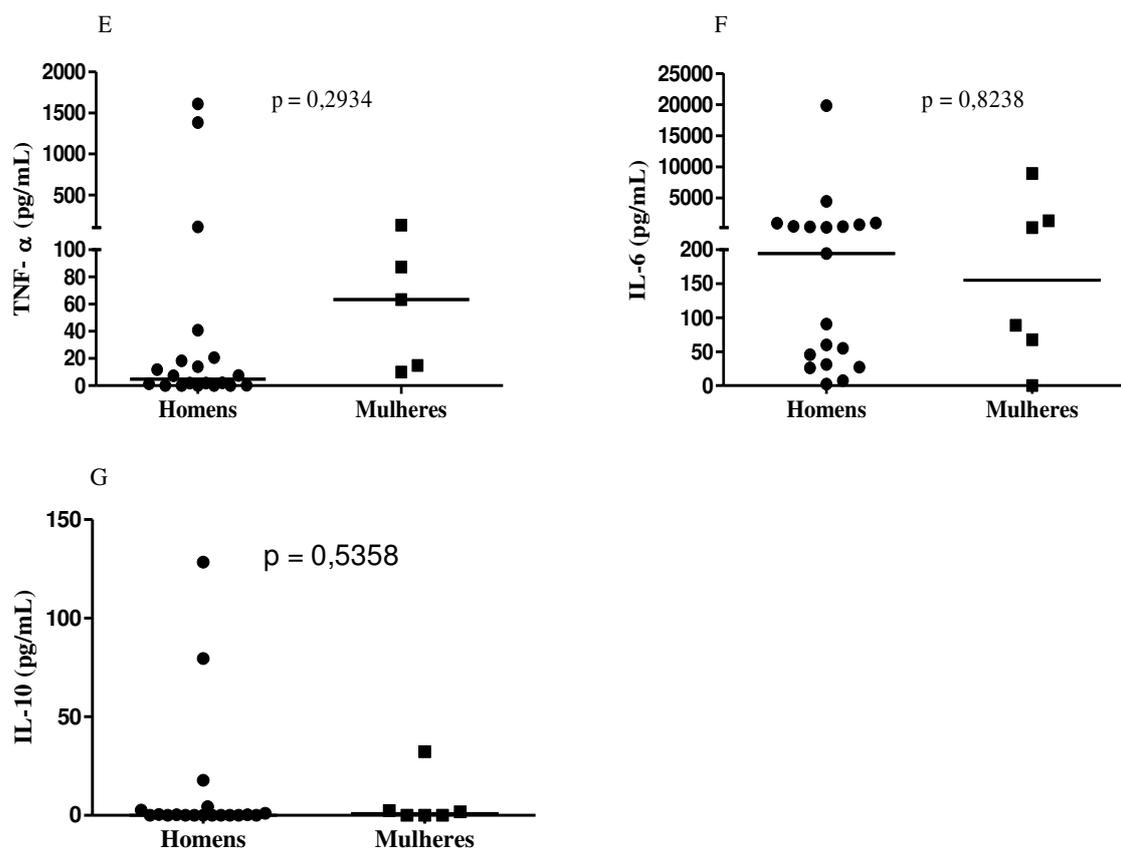




**Figura 14. Influência da idade no perfil de citocinas de pacientes infectados com *P. vivax*.** . As citocinas foram quantificadas por CBA. A linha representa a mediana dos grupos. Em A, Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); em B Interleucina 6 (IL-6); em C, Interleucina 10 (IL-10); em D Fator  $\beta$  de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ); em E, Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ); em F, Interleucina 6 (IL-6); em G, Interleucina 10 (IL-10) (A, B, C e D foram quantificadas no plasma; E,F e G foram quantificadas no sobrenadante de cultura das PBMC). (n = 5 no grupo < 19 anos, n = 5 no grupo 20-29 anos, n= 8 no grupo 30-39 e n = 7 no grupo >40 anos).

Para avaliar se o sexo é uma variável que interferiu no padrão de citocinas, o grupo Malária foi estratificado em 2 grupos, Homens e Mulheres). Houve maior produção de IL-6 e IL-10 plasmáticas nos homens quando comparados às mulheres (Figura 15 B e C, respectivamente). A concentração mediana de IL-6 foi 5,67pg/mL e 0,04 pg/mL para os

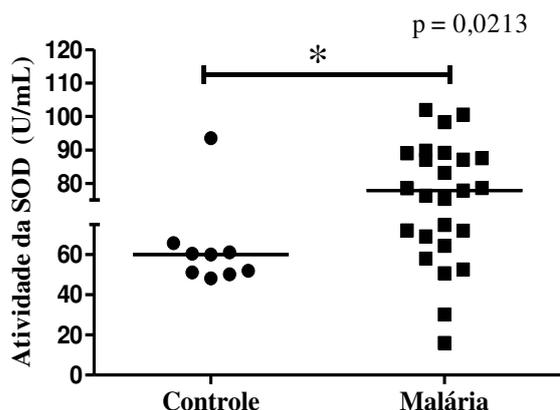




**Figura 15. Influência do sexo no perfil de citocinas de pacientes infectados com *P. vivax*.** As citocinas foram dosadas por CBA. A linha representa a mediana dos grupos. Em A, Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); em B Interleucina 6 (IL-6); em C, Interleucina 10 (IL-10); em D Fator  $\beta$  de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ); em E, Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ); em F, Interleucina 6 (IL-6); em G, Interleucina 10 (IL-10) (A, B, C e D foram quantificadas no plasma; E, F e G foram quantificadas no sobrenadante de cultura das PBMC). (n= 19 no grupo Homens e n= 6 no grupo Mulheres).

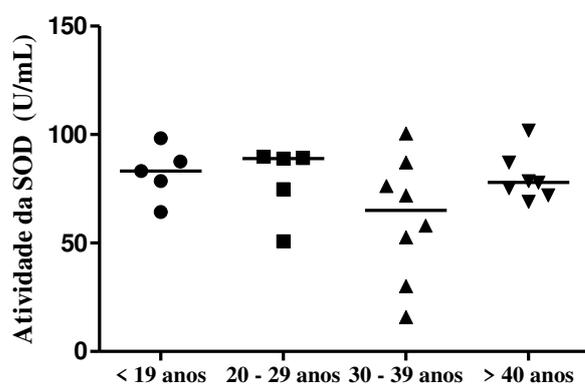
#### 5.4. Quantificação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) de pacientes infectados com *Plasmodium vivax*.

Na avaliação da atividade enzimática da SOD, o grupo Malária apresentou aumento da atividade da SOD plasmática em relação ao grupo Controle (concentração mediana da atividade da SOD no grupo Controle 60.0 pg/mL e no grupo Malária igual a 77.88 pg/mL) (Figura 16).



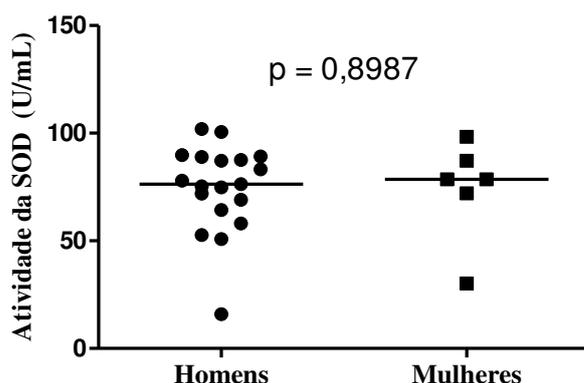
**Figura 16. Quantificação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) de pacientes infectados com *P. vivax*.** A atividade da SOD no foi quantificada no plasma através do kit de Ensaio da SOD. O traço representa a mediana dos grupos. (n=25 pacientes e 9 controles).

Para avaliar a influência da idade na atividade da SOD estratificou-se o grupo Malária em 4 grupos (< 19 anos, 20-29 anos, 30-39 anos e > 40 anos), não tendo sido evidenciado diferença de sua atividade enzimática entre os grupos (Figura 17).



**Figura 17. Influência da idade na atividade da SOD de pacientes infectados com *P. vivax*** A atividade da SOD foi quantificada no plasma através do kit de Ensaio da SOD. O traço representa a mediana dos grupos. (n = 5 no grupo < 19 anos, n = 5 no grupo 20-29 anos, n= 8 no grupo 30-39 e n = 7 no grupo >40 anos).

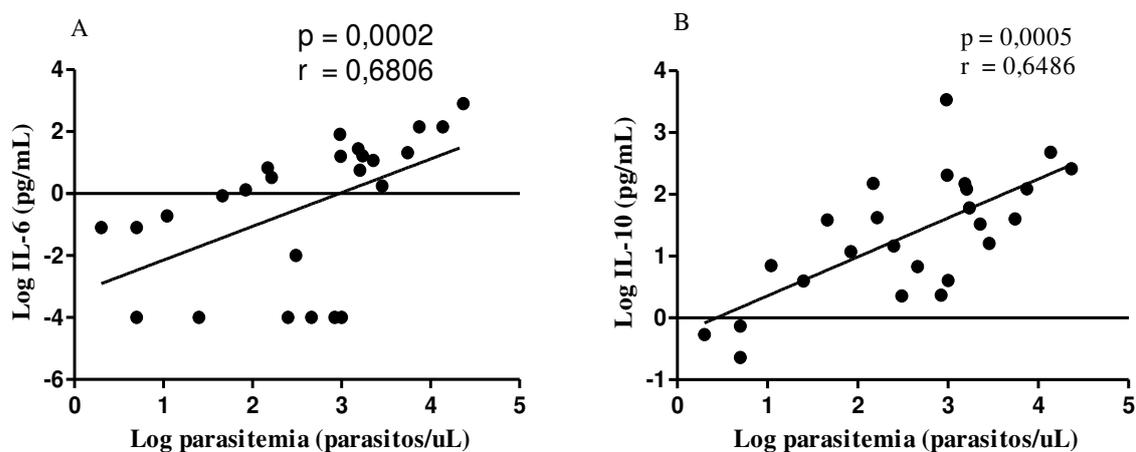
Quanto a influência do sexo, estratificou-se o grupo Malária em 2 grupos, Homens e Mulheres. Não houve diferença de atividade enzimática entre os grupos.

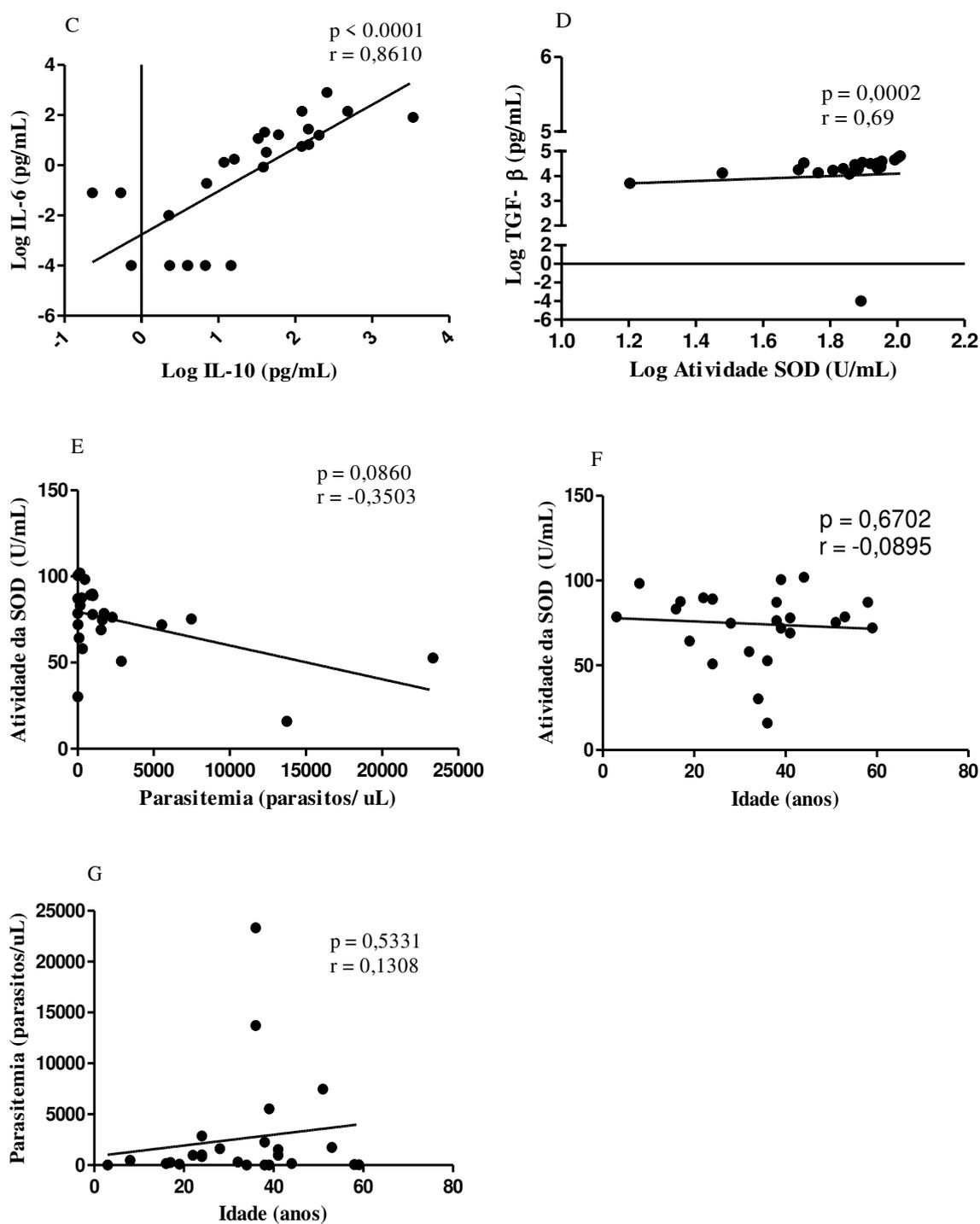


**Figura 18. Influência do sexo na atividade da SOD de pacientes infectados com *P. vivax*.** A atividade da SOD foi quantificada no plasma através do kit de Ensaio da SOD. O traço representa a mediana dos grupos. (n= 19 no grupo Homens e n= 6 no grupo Mulheres).

### 5.5. Correlações entre parasitemia, citocinas, SOD, idade de pacientes infectados por *Plasmodium vivax*.

As variáveis parasitemia, citocinas, atividade da SOD, sexo e idade foram correlacionadas entre si para uma melhor caracterização do perfil de resposta do grupo Malária. As citocinas IL-6 e IL-10 apresentaram uma correlação positiva e estatisticamente significativa com a parasitemia (Figura 19 A e B, respectivamente) e entre si (Figura 19 C); enquanto o TGF- $\beta$  apresentou correlação negativa com a atividade da enzima superóxido dismutase (Figura 19 D). Não foram identificadas correlações estatisticamente significativas entre as variáveis, parasitemia e SOD e SOD e idade, parasitemia e idade (Figura 19 F,G e H, respectivamente), e nem quaisquer outras correlações envolvendo as variáveis analisadas.





**Figura 19. Correlações entre parasitemia, citocinas, SOD, idade de pacientes infectados por *Plasmodium vivax*.** As correlações entre as variáveis foram realizadas utilizando-se o teste de Spearman. Valores mostrados em suas formas logarítmicas. (n= 25 pacientes).

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho vem no intuito de auxiliar no preenchimento das lacunas remanescentes da resposta imune na malária por abordar a malária *vivax* em uma infecção humana, já que a maioria dos dados referentes a resposta imunológica na malária são provenientes de estudos com *P. falciparum* ou malária murina e foram realizados em diversas localidades ao redor do mundo, já tendo sido descrito que esses dados diferem entre si a depender da espécie (GONÇALVES et al, 2012) e da região de ocorrência da infecção (SINHA et al, 2010). Outro diferencial a ser considerado diz respeito ao número de variáveis estudadas: a maioria dos estudos se restringe a uma citocina específica ou a um pequeno grupo de citocinas, sendo poucos os estudos que abordam a malária em um contexto que correlacione citocinas, níveis de parasitemia e estresse oxidativo, representando pela enzima superóxido dismutase.

Quanto ao padrão de citocinas no presente estudo, detectou-se IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  no plasma dos pacientes, porém apenas as três últimas tiveram diferença estatística em relação ao grupo controle. As demais citocinas não foram detectadas no plasma dos pacientes. A presença de citocinas pró e anti-inflamatórias corrobora a ideia que a resposta imune na malária *vivax* necessita de um balanço entre citocinas que, ao exercerem efeitos antagônicos, promovem um clareamento do parasito minimizando os danos ao hospedeiro (MENDONÇA et al, 2013; COSTA et al, 2014).

Neste trabalho, a citocina pró-inflamatória detectada no plasma de quase todos os pacientes foi a IL-6. Este resultado discorda do observado por outros autores que mostraram presença de IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  (RAZA et al, 2014; ANDRADE et al, 2010; RICCIO et al, 2013). A IL-6 é produzida por vários tipos celulares, dentre os quais, os macrófagos e age diretamente na gênese da febre, além de ser uma citocina importante na determinação da polarização dos macrófagos pela via clássica para um perfil mais inflamatório (macrófagos M1), importantes numa fase mais precoce da infecção que requer um controle inicial da parasitemia (GUERRERO et al, 2012). O papel da IL-6 no controle da carga parasitária também foi visto em nosso estudo, havendo direta relação entre as concentrações dessa citocina e a parasitemia, dado semelhante ao encontrado por Costa et al (2014) que em estudo realizado no Amazonas com pacientes infectados por *P. vivax* encontrou a IL-6 e IL-10 como determinantes da carga parasitária.

A ausência de TNF- $\alpha$  e as baixas concentrações de IFN- $\gamma$  encontradas em nosso estudo podem ser atribuídas ao momento do ciclo em que os pacientes se encontravam no

momento da coleta e ao grau de comprometimento clínico dos pacientes estudados, uma vez que, em nosso estudo, não foi evidenciado nenhum caso de malária grave no momento da coleta, Andrade et al (2010) encontraram uma direta relação entre IFN- $\gamma$  e a gravidade da infecção por *P. vivax* dentre os pacientes estudados.

Além da ausência de quadros graves, a presença da citocina reguladora IL-10, que assim como a IL-6 apresentou associação com a parasitemia, corrobora com a ideia de que nas fases iniciais da infecção os níveis mais elevados de parasitemia induzem uma resposta pró-inflamatória inicial seguida de uma resposta reguladora. A IL-10, neste caso, agiria como um mecanismo de escape do parasito por reduzir o clareamento do parasito e mecanismo de regulação da atividade pró-inflamatória, o que explicaria os níveis de IL-6 estarem diretamente relacionados aos níveis de IL-10 no presente trabalho (CLARK et al, 2006; ANDRADE et al, 2010; GONÇALVES et al, 2012; MENDONÇA et al, 2013).

Dada a importância da IL-10 no curso das infecções, questiona-se a possível célula produtora desta citocina na malária *vivax*. Walther et al (2005; 2009) atribuíram a células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (células T reguladoras) a produção de IL-10, associada a produção de TGF- $\beta$ . Em situações diversas a ação dessas células acaba sendo vantajosa tanto para parasito, uma vez que a ação dessas células reduz a resposta celular e humoral, permitindo a persistência da infecção, quanto para o hospedeiro, evitando as consequências clínicas das citocinas pró-inflamatórias e permitindo a formação de uma memória imunológica e aquisição de certa resistência a infecção (BELKAID et al, 2002; OMER et al, 2003). Entretanto, a ativação destas células não pode ser precoce no estágio eritrocítico, pois a supressão muito precoce de uma resposta mediada por citocinas pró-inflamatórias poderia permitir a proliferação desenfreada do parasito e a evolução da doença para quadros mais severos (HISAEDA et al, 2004).

Os linfócitos T reguladores são dependentes de IL-2 para permanecerem na periferia (COUPER et al, 2008) e a ausência desta citocina associada a produção reduzida de TGF- $\beta$  no plasma do grupo Malária em relação ao grupo Controle sugerem que as concentrações de IL-10 observadas não podem ser explicadas, exclusivamente, pela produção desse tipo celular, necessitando de alguma via independente de IL-2 e TGF- $\beta$ , como por exemplo, a produção por células dendríticas ou macrófagos que fagocitaram hemácias infectadas pelo parasito.

Leoratti et al (2012) atribuem aos monócitos e macrófagos uma grande importância na produção de citocinas na malária *vivax*, podendo ser essas células as fontes da IL-10 encontrada em nosso estudo. Deshpande et al (2004) avaliaram o efeito da hemozoína na

modulação da função de macrófagos e monócitos, observando que essas células não secretam IL-10 de maneira contínua, e sim durante o aumento da parasitemia, quando estas células fagocitam mais hemozoína, e há um aumento da IL-10 no soro. Antonelli et al (2014), por sua vez, demonstraram que pacientes infectados por *Plasmodium vivax* apresentam aumento no número de monócitos circulantes de todos os subtipos, monócitos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> (inflamatório), monócitos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> (clássico) e CD14<sup>lo</sup> CD16<sup>+</sup> (“patrolling”) e que o subtipo inflamatório foi o de melhor capacidade fagocítica, secretor de espécies reativas de oxigênio e produtor de citocinas pró- (IL-6 e IL-8) e anti-inflamatórias (IL-10), justificando que células efetoras altamente ativadas podem adquirir características reguladoras, em uma fase posterior, como mecanismo preventivo de dano tecidual grave.

Esta possível participação de macrófagos como responsáveis pela produção de IL-10 é reforçada ainda mais pelos resultados obtidos nas culturas de PBMC: nas culturas foram detectadas IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e TGF- $\beta$ , não sendo detectada apenas IL-4; dessas citocinas, apenas IL-10, que persistiu mais elevada no grupo Malária, porém sofreu uma expressiva queda de sua concentração em relação ao plasma, e TNF- $\alpha$ , que estava reduzida no grupo Malária, porém com aumento das suas concentrações em relação aos valores plasmáticos, foram estatisticamente significativos.

Na cultura de PBMC temos, em linhas gerais, um ambiente sem os estímulos imunogênicos provenientes do parasito. Na ausência do parasito foi observada uma redução exuberante dos níveis de IL-10 e discreto aumento do TNF- $\alpha$ , reforçando a teoria de que a presença de *P. vivax* poderia induzir uma resposta reguladora no hospedeiro como mecanismo de escape com polarização de macrófagos para um perfil menos inflamatório (macrófagos ativados pela via alternativa, ou macrófagos M2) e menos agressivo para sua sobrevivência.

Em síntese, na presença do parasito houve a indução de um perfil marcadamente anti-inflamatório e diretamente relacionado com a parasitemia, sem a presença de IL-2 e com baixas concentrações de TGF- $\beta$ , levantando a possibilidade da origem da IL-10 vir de uma fonte diferente das células T reguladoras. Sugerindo que a ausência do parasito, nas culturas de PBMC, reduz o perfil regulador, o que reafirma a importância de *P. vivax* na determinação do perfil imune.

Tendo-se caracterizado o perfil de citocinas, investigou-se, então, se variáveis inerentes ao hospedeiro (sexo e idade) poderiam interferir no perfil de citocinas encontrado.

Quanto a idade, observou-se que as concentrações de IL-6 e IL-10 estavam mais elevadas nos pacientes acima de 40 anos que nos demais grupos, sendo estatisticamente maior

que no grupo com menos de 19 anos. A literatura não apresenta muitas informações sobre essa relação entre citocinas e idade; sabe-se que quanto mais jovem, maior a susceptibilidade às formas graves da malária *vivax* (ANDRADE et al, 2010) e que ao longo de sucessivas exposições ao *Plasmodium* adquire-se uma imunidade parcial que limitaria os níveis parasitários, fenômeno da premunicação. Wengala et al (2015) investigou o perfil de quimiocinas e a produção de anticorpos em crianças e adultos com infecção grave e não-grave por *P. falciparum* e observou um perfil pró-inflamatória nas crianças quando comparado aos adultos, sugerindo que ao longo de sucessivas exposições ocorre uma evolução da resposta imune reguladora que geraria um balanço dessa resposta pró- e anti-inflamatória capaz de prevenir a progressão da patogenia na malária.

Em nosso estudo, a parasitemia foi significativamente mais elevada no grupo 20-29 anos em relação aos menores de 19 anos, porém a parasitemia do grupo maior que 40 anos teve a mediana cerca de dez vezes maior que a mediana da parasitemia do grupo menor que 19 anos, podendo esse maior contingente de parasitos um dos responsáveis pelo aumento da IL-6 e da IL-10 nesse grupo, apesar de não ter sido evidenciado diferença estatística da parasitemia entre os grupos ou correlação entre a idade e a parasitemia. Como discutido anteriormente, houve direta correlação entre as concentrações de IL-6 e IL-10 e entre essas citocinas e a parasitemia, podemos então pensar que a carga parasitária elevada no grupo maior de 40 anos inicialmente determinou uma elevação da IL-6 e no momento da coleta, essa citocina vinha reduzindo progressivamente por conta do aumento da IL-10, por esse grupo apresentar uma resposta imune reguladora mais desenvolvida que o grupo menor que 19 anos.

Quanto ao sexo, o grupo Homens apresentou concentrações de IL-6 e IL-10 estatisticamente mais elevados que o grupo Mulheres. Vale ressaltar que a mediana do grupo Homens foi aproximadamente 5 vezes o valor da mediana do grupo Malária para a IL-6, suscitando uma resposta inflamatória mais intensa que o visualizado no grupo formado por todos os pacientes. As concentrações de IL-10 também foram maiores que do grupo Malária, porém não na mesma magnitude que ocorrera com a IL-6, e possivelmente ocorreu em resposta aos níveis de IL-6, como mecanismo induzido pelo parasito para evitar o aumento da resposta pró-inflamatória (GONÇALVES et al, 2012).

Assim como na influência da idade, a literatura também é escassa no aspecto relacionado a influência de hormônios sexuais na resposta imune, seja malária ou outras doenças. Legorreta-Herrera et al (2015) avaliaram a modulação exercida pelos hormônios sexuais na resposta imune em camundongos infectados por *P. berghei* através da realização de gonadectomia. Os autores compararam o efeito desse procedimento, que promoveria uma

drástica redução dos níveis de testosterona e estradiol, na produção de citocinas, nos níveis parasitários e na produção de imunoglobulinas e concluíram que os hormônios sexuais femininos regulam negativamente a produção de citocinas e imunoglobulinas, uma vez que na ausência desses, houve aumento do TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IgG1, IgG2 e IgG3.

O resultado do estudo anterior conflui com o do presente trabalho, sendo uma das hipóteses para justificar o aumento da IL-6 e da IL-10 encontrado. Outro dado importante diz respeito à parasitemia, pois o grupo Homens apresentou parasitemias significativamente maiores que o grupo Mulheres, o que poderia ter suscitado uma resposta imunológica mais intensa, e conseqüentemente, maiores níveis de IL-6, seguido da indução do aumento da IL-10 em resposta a essa citocina pró-inflamatória.

Além da análise do perfil de citocinas, a investigação do estresse oxidativo desponta como um promissor aspecto para um melhor entendimento da fisiopatologia da malária. Como citado anteriormente, monócitos e macrófagos são células cuja função primária é a fagocitose, e um dos mecanismos pelos quais destroem parasitos intracelulares é através de um sistema microbicida dependente de oxigênio. Sabe-se que é de vital importância o controle redox desse ambiente para um bom funcionamento celular e, para tanto, desenvolveu-se um mecanismo intracelular de defesa para assegurar um balanço apropriado entre moléculas pró e antioxidantes (MARIKOVSKY et al, 2003).

A enzima superóxido dismutase-1 (SOD-1) é a enzima chave na dismutação do ânion superóxido, produto do metabolismo celular oxidativo, em peróxido de hidrogênio. Como um estado inflamatório cursa com ativação de macrófagos e nossos resultados discutidos anteriormente apontam para uma importante participação dessas células, investigou-se a participação dessa enzima no processo infeccioso causado pelo *P. vivax*.

Em humanos, alterações oxidativas resultantes do processo infeccioso da malária são importantes na elaboração de uma resposta protetora contra o parasito e na determinação do espectro clínico da infecção (ZHANG et al, 2014). Estudos em malária experimental e humana têm demonstrado elevação da atividade da SOD (RIFKIND et al, 2015; ANDRADE et al, 2010) e mais ainda, a atividade dessa enzima tem se mostrado um preditor de gravidade muito sensível, inclusive mais sensível que o preditor clássico, o TNF- $\alpha$ , na malária *vivax* (ANDRADE et al, 2010).

O presente trabalho encontrou aumento da atividade da enzima superóxido dismutase no grupo Malária em relação ao grupo Controle em acordo com outros trabalhos envolvendo essa enzima e *P. vivax* (ANDRADE et al, 2010; ZHANG et al, 2014). Entretanto não houve correlação significativa da atividade da SOD-1 com a parasitemia. Este resultado discorda do

obtido por Andrade et al (2010) que demonstraram essa correlação e que a SOD-1 pode ser um preditor de gravidade. A parasitemia costuma ser usada como uma medida indireta da quantidade de hemozoína, um dos principais estímulos a produção de espécies reativas de oxigênio, e que é liberada após a ruptura das hemácias parasitadas (JARAMILLO et al, 2005). Neste estudo tivemos parasitemias variando de 2 a 23.333 parasitos por microlitro enquanto que Andrade et al (2010a) obtiveram parasitemias de até 60.000 parasitos por microlitro de sangue, logo a menor variação da parasitemia em nosso trabalho pode não ter determinado uma alteração significativa nos níveis de hemozoína o que explicaria a ausência de correlação entre os níveis de parasitemia e da atividade da SOD-1.

Quanto a relação da atividade da SOD-1 e das citocinas, a mesma foi diretamente proporcional aos níveis de TGF- $\beta$ , e como é enzima antioxidante, estaria exercendo um efeito regulador da atividade inflamatória através da redução do ânion superóxido, espécie reativa de oxigênio altamente danosa às células em grande quantidade.

Os resultados deste trabalho mostraram que para entender melhor as variáveis envolvidas na resposta a malária *vivax* é necessária uma melhor caracterização dos tipos celulares envolvidos, com destaque para os macrófagos, e das variáveis envolvidas na relação parasito-hospedeiro como: tempo de infecção, momento do ciclo na coleta e caracterização clínica de cada indivíduo. Assim, futuros estudos incluindo um número maior de indivíduos, imunofenotipagem, para definição dos tipos celulares presentes, e caracterização clínica e laboratorial dos pacientes podem ajudar a esclarecer melhor os mecanismos fisiopatológicos da infecção por *P. vivax*. Uma atenção especial foi dada à malária *vivax* devido a sua importância epidemiológica no Brasil e a aparente negligência com que vinha sido abordada nos trabalhos experimentais, havendo lacunas a cerca desse tema. A caracterização das variáveis envolvidas na resposta imune da malária é de fundamental importância para o direcionamento de futuras intervenções profiláticas e terapêuticas, e o presente trabalho é mais um passo dado na caminhada para a caracterização dessas variáveis.

## 7. CONCLUSÕES

- No plasma dos indivíduos infectados com *P. vivax* identificou-se concentrações mais elevadas de IL-6 e IL-10 e níveis reduzidos de TGF- $\beta$  que no grupo Controle, com predominância de um padrão anti-inflamatório. A ausência do parasito nas culturas de PBMC promoveu uma mudança do perfil de citocinas em direção a um padrão pró-inflamatório, com queda na concentração de IL-10 e aumento de TNF- $\alpha$  quando comparados ao plasma;

- As concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 no plasma dos pacientes infectados por *P. vivax* foram diretamente proporcionais a parasitemia, sugerindo que parasitemias mais elevadas promovam uma maior produção de IL-10 como mecanismo de escape das concentrações mais elevadas de citocinas pró-inflamatórias;

- Indivíduos do sexo masculino e indivíduos maiores de 40 anos apresentaram uma maior produção de IL-6 e IL-10, sugerindo que a imunoregulação exercida pelo parasito sofre influência da idade e sexo do hospedeiro;

- A atividade da enzima superóxido dismutase encontrava-se aumentada no grupo dos pacientes infectados por *P. vivax*, não tendo sido identificada correlação com a parasitemia e apresentando correlação positiva com a citocina TGF- $\beta$  no plasma de indivíduos infectados por *P. vivax*.

## 8. REFERÊNCIAS

Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai, SHIV. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012

Agbenyega T, Angus BJ, Bedu-Addo G, Baffoe-Bonnie B, Guyton T, Stacpoole PW, Krishna S. Glucose and lactate kinetics in children with severe malaria. **J Clin Endocrinol Metab**. 2008 ;85(4):1569-7

Alves A, Martins A, Adolphsson S, Bockorny B, Carleti G, Cabral G. Malária grave importada: relato de caso. **Rev Bras Ter Intensiva**. 2007; 19(2):231-6.

Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, Prévost MC, Ishino T, Yuda M, Ménard R. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. **Cell Host Microbe** 2008; 3:88–96.

Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat Med** 2006; 12:220–224

Andrade BB, Araújo-Santos T, Luz NF, Khouri R, Bozza MT, Camargo LM, Barral A, Borges VM, Barral-Netto M. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. **J Immunol** 2010b; 185(2):1196-204.

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Raffaele-Netto I, Camargo LMA, Barral A, Barral-Netto MI. Plasma Superoxide Dismutase-1 as a Surrogate Marker of *Vivax* Malaria Severity. **PLoS Negl Trop Dis** 2010a; 4(4): 650

Andrade BB, Souza-Neto SM, Raffaele-Netto I, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, Barral-Netto M: Severe *Plasmodium vivax* malária exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal** 2010; 9:13.

Anstey NM, Handojo T, Pain MC, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, Maguire GP: Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolarcapillary inflammation. **J Infect Dis** 2007; 195:589-596.

Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN: The pathophysiology of vivax malaria. **Trends Parasitol** 2009; 25: 220-227.

Antonelli LRV, Leoratti FMS, Costa PAC, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, et al. The CD14+CD16+ Inflammatory Monocyte Subset Displays Increased Mitochondrial Activity and Effector Function During Acute *Plasmodium vivax* Malaria. **PLoS Pathog** 2014; 10(9): 1004393.

Arévalo-Herrera M, Quiñones ML, Guerra C, Céspedes N, Giron S, Ahumada M, Piñeros JG, Padilla N, Terrientes Z, Rosas A, Padilla JC, Escalante AA, Beier JC, Herrera S. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. **Acta Trop** 2012; 121: 303-314.

Armah H, Wiredu EK, Dodoo AK, Adjei AA, Tettey Y, Gyasi R. Cytokines and Adhesion Molecules Expression in the Brain in Human Cerebral Malaria. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 2005; 2(1):123-131.

Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevort U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. **PLoS Pathog** 2007; 3:171.

Baheti R, Laddha P, Gehlot RS. Liver involvement in *falciparum* malária – A histopathological analysis. **J Indian Acad Clin Med**. 2003; 4(1):34-8.

Banerjee R, Liu J, Beatty W, Pelosof L, Klemba M, Golberg DE. Four plasmepsin are active in the *Plasmodium* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. **Proc Natl Acad U S A** 2002; 99, 990-995.

Barata RCB. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. **Cad Saude Publica** 1995; 11: 128-136.

Barcus MJ, Basri H, Picarima H, Manyakori C, Sekartuti, Elyazar I, Bangs MJ, Maguire JD, Baird JK: Demographic risk factors for severe and fatal *vivax* and *falciparum* malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua. **Am J Trop Med Hyg** 2007; 77:984-991.

Barsoum RS. Malaria acute renal failure. **J Am Soc Nephrol**. 2000; 11(11):2147-54.

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

Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature** 2002; 420, 502–507.

Boulos M, Costa JM, Tosta CE. Comprometimento pulmonar na malária (revisão). **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 1993; 35(1): 93-102.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Terapêutica da Malária. 6ª edição. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da malária : manual para profissionais de saúde na atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2006.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária- Série A. Normas e Manuais Técnicos. 1ª Edição. 2005

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

Bridges DJBJ, van Mourik JA, Grau G, Preston RJ, Molyneux M, Combes V, O'Donnell JS, de Laat B, Craig A: Rapid activation of endothelial cells enables *Plasmodium falciparum* adhesion to platelet-decorated von Willebrand factor strings. **Blood** 2010; 115:1472–1474.

Camargo EP. Malária, maleita, paludismo. **Cienc Cult** 2003; 55: 26-32.

Carvalho LH, Sano G-I, Hafalla JCR, Morrot A, Curotto de Lafaille MA, Zavala F. IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T – cell responses against malaria liver stages. **NatMed** 2002; 8(2):166–70.

Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. **Journal of Infectious Diseases** 2007; 195: 934–41.

Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. **Semin Immunol** 2007; 19(6):400–8.

Christian E. Demeure, Karima Brahimi, Ferial Hacini, Françoise Marchand, Roger Péronet, Michel Huerre, Pierre St.-Mezard, Jean-François Nicolas, Paul Brey, Guy Delespesse, and Salaheddine Mécheri. *Anopheles* Mosquito Bites Activate Cutaneous Mast Cells Leading to a Local Inflammatory Response and Lymph Node Hyperplasia. **J Immunol** 2005; 174:3932-3940.

Clark IA, Budd ACB, Allewa LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria Journal** 2006; 5:85.

Costa AG, Antonelli LRV, Costa PAC, et al., The Robust and Modulated Biomarker Network Elicited by the *Plasmodium vivax* Infection Is Mainly Mediated by the IL-6/IL-10 Axis and Is Associated with the Parasite Load. **Journal of Immunology Research**, 2014; 318250: 11.

Costa, MR.; Vieira, PP.; Ferreira CDE, O; Lacerda, MV; Alecrim, WD; Alecrim, MG. Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region. **Rev Soc Bras Med Trop** 2008; 41(4): 381-85.

Cox-singh J, Davis TME, Lee K, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases** 2008; 46: 165-171.

Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE et al. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 2010; 107: 6958–6963.

D'Ombrain MC, Robinson LJ, Stanicic DI, Taraika J, Bernard N, Michon P, Muleller I, Schofield L. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. **Clin Infect Dis** 2008; 47, 1380-1387.

DA Silva-Nunes, M.; Ferreira, M.U. Clinical spectrum of uncomplicated malária in semi-immune Amazonias: beyond the “symptomatic” vs “assymptomatic” dichotomy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2007; 102: 341-47.

Daniel-Ribeiro CT, Lacerda MV, Oliveira-Ferreira J: [Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses]. **Bull Soc Pathol Exot** 2008; 101:243-48.

Das BS: Renal failure in malaria. **J Vector Borne Dis** 2008; 45:83-97.

De Souza JM, Calvosa VSP, Ventura AMRS, Pinto AYN, Silva RSU, Libonati RMF. Malária. In: TONELLI E & FREIRE LMS. **Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência**. Rio de janeiro: Medsi; 2000; 2:1271-1296

Deane LM: Malaria vectors in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1986; 81:5-14.

Deshpande P, Shastry P. Modulation of cytokine profiles by malaria pigment—hemozoin: role of IL-10 in suppression of proliferative responses of mitogen stimulated human PBMC. **Cytokine**. 2004; 28 (6): 205-13.

Dive D, Gratepanche S, Yera H, Becuwe P, Daher W, et al. Superoxide dismutase in Plasmodium: a current survey. **Redox Rep** 2003; 8: 265–267.

Doodoo D, Omer, FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. **J Infect Dis** 2002; 185, 971-979.

Donati D, Zhang LP, Chene A, Chen Q, Flick K, Nystrom M, et al. Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. **Infect Immun** 2004; 72:5412–5418.

Dondorp AM, Ince C, Charunwatthana P, Hanson J, van Kuijen A, Faiz MA, et al. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. **J Infect Dis**. 2008; 197(1):79-84.

Doolan DL, Hoffman SL. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. **J Immunol** 2000; 165:1453–1462.

Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. **PLoS One** 2009; 4:6510.

Druilhe, P; Perignon, JL. A hypothesis about the chronicity of malaria infection. **Parasitol Today** 1997; 13(9): 353-57.

Ersmark K, Feierberg I, Bjelic S, Hamelink E, Hackett F, Blackman MJ, Hultén J, Samuelsson B, Aqvist J, Hallberg A. Potent inhibitors of the *Plasmodium falciparum* enzymes plasmepsin I and II devoid of cathepsin D inhibitory activity. **J Med Chem** 2004; 47, 110-112.

Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **J Mol Med (Berl)** 2008; 86(10):1097–111.

Ferreira MS. Patologia, fisiopatologia, quadro clínico e diagnóstico. In: Focaccia R, editor. Veronesi: **Tratado de infectologia**. 3° ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu; 2005; p. 1613-22.

Frevert U, Usynin I, Baer K, Klotz C. *Plasmodium* sporozoite passage across the sinusoidal cell layer. **Subcell Biochem** 2008; 47:182–197.

Genton B, D'Acremont V, Rare L, Baea K, Reeder JC, Alpers MP, Muller I: *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Med** 2008; 5:127.

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

Golenser J, Peled-Kamar M, Schwartz E, Friedman I, Groner Y, et al. Transgenic mice with elevated level of CuZnSOD are highly susceptible to malaria infection. **Free Radic Biol Med** 1998; 24: 1504–1510.

Gonçalves RM, Scopel KK, Bastos MS, Ferreira MU. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than Plasmodium falciparum?. **PLoS One**. 2012; 7(9):44394.

Greenwood, BM.; Bojang, K; Whitty, CJ; Targett, GA. Malaria. **Lancet**, 2005; 365: 9469, 1487-1498.

Grobusch MP, Kremsner PG. Uncomplicated malária. **Curr Trop Microbiology Immunology** 2005; 295:83-104

Guerrero R, Uchida K, Nakajima H et al., Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice, **Journal of Neuroinflammation** 2012; 9:40.

Guilbride DL, Gawlinski P, Guilbride PD. Why functional pre-erythrocytic and blood stage malaria vaccines fail: a meta-analysis of fully protective immunizations and novel immunological model. **PLoS One**. 2010; 5:10685.

Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews** 2011; 240: 297–316.

Hanscheid, T; Langin, M; Lell, B; Potschke, M.; Oyakhirome, S; Kremsner, PG; Grobusch, MP. Full blood count and haemozoin-containing leukocytes in children with malaria: diagnostic value and association with disease severity. **Malar J** 2008; 7:109.

Hisaeda H., Maekawa Y., Iwakawa D., Okada H., Himeno K., Kishihara K., Tsukumo S., and Yasutomo K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Nat. Med** 2004; 10, 29–30.

Hisaeda H; Yasutomo K; Himeno K. Malaria: immune evasion by parasites. **Int J Biochem Cell Biol** 2005; 37(4): 700-706.

Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, et al. Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. **Biochem Biophys Res Commun** 2010; 402(4):790–5.

Ishino T, Chinzei Y, Yuda M. A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. **Cell Microbiol** 2005; 7:199–208.

Jaramillo M, Godbout M, Olivier M. Hemozoin induces macrophage chemokine expression through oxidative stress-dependent and -independent mechanisms. **J Immunol.** 2005; 174(1):475-84.

Keswani T, Bhattacharyya A. Differential role of T regulatory and Th17 in Swiss Mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA and *Plasmodium yoelii*. **Exp Parasitol** 2014; 141:82–92.

Khoury R, Santos GS, Soares G, Costa JM, Barral A, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. SOD1 Plasma Level as a Biomarker for Therapeutic Failure in Cutaneous Leishmaniasis. **J Infect Dis** 2014.

Klein I, Crispe IN. Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver. **J Exp Med** 2006; 203:437–447.

Kobayashi F, Niikura M, Waki S, Matsui T, Fujino T, Tsuruhara T, Kamiya S. *Plasmodium berghei* XAT: contribution of gammadelta T cells to host defense against infection with blood-stage nonlethal malariae parasite. **Exp Parasitol** 2007; 117: 368-375.

Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum*: relationship to disease outcome. **Br J Haematol** 1990; 119: 839-847.

Legorreta-Herrera M, Mosqueda-Romo NA, Nava-Castro KE, Morales-Rodríguez AL, Buendía-González FO, Morales-Montor J. Sex hormones modulate the immune response to *Plasmodium berghei* ANKA in CBA/Ca mice. **Parasitol Res** 2015.

Leoratti FM, Trevelin SC, Cunha FQ, Rocha BC, Costa PA, et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Negl Trop Dis** 2012; 6: 1710.

Maguire GP, Handojo T, Pain MC, Kenangalem E, Price RN, Tjitra E, Anstey NM. Lung injury in uncomplicated and severe *falciparum* malaria: a longitudinal study in Papua Indonesia. **J Infect Dis.** 2007; 192(11):1966-74.

Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci M, Simpore J & Musumeci S. Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-12 in *Plasmodium falciparum* malaria. **Parasite Immunol** 2002; 24: 489–492.

Marikovskiy M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. **J Immunol** 2003; 170(6):2993-3001.

Marsh K, English M, Crawley J, Peshu N. The pathogenesis of severe malaria in African children. **Ann Trop Med Parasitol** 1996; 90(4):395-402.

Martiney JA, Sherry B, Metz CN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, *et al.* Macrophag emigration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. **Infect Immun** 2000; 68:2259–67.

Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, Vallinoto AC, Póvoa MM, Silva JS, Cunha MG. Increased interleukin-10 and interferon- $\gamma$  levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. **Malaria Journal** 2011; 10: 264.

Menard D, *et al.* *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy negative Malagasy people. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:5967–5971

Menard R. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. **Cell Microbiol** 2001; 3:63–73.

Mendonca VR, Queiroz AT, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal** 2013; 12:69.

Ministério da Saúde - Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM/DASIS/SVS) SIVEP-MALÁRIA/SVS-MINISTÉRIO DA SAÚDE.

Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infect Immun** 2004; 72: 154-158.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol** 1989; 7:145-73.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, Portillo HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infectious Diseases** 2009; 9: 555-566.

Ohmori Y, Hamilton TA: STAT6 is required for the anti-inflammatory activity of interleukin-4 in mouse peritoneal macrophages. **J Biol Chem** 1998, 273:29202–29209.

Olivier M, Van Den Ham K, Shio MT, Kassa FA and Fougerey S Malarial pigment hemozoin and the innate inflammatory response. **Front Immunol** 2014; 5:25.

Omer, F.M., de Souza, J.B., and Riley, E.M. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. **J Immunol** 2003; 171: 5430–5436.

Orjih AU. Heme polymerase activity and the stage specificity of antimalarial action of chloroquine. **J Pharmacol Exp Ther** 1997; 282(1):108–12.

Othoro C, Moore JM, Wannemuehler KA, Moses S, Lal A, Otieno J, Nahlen B, Sultsker L, Shi YP. Elevated gamma interferon-producing NK cells, CD45RO memory-like T cells and CD4 T cells are associated with protection against malaria infection in pregnancy. **Infect Immun** 2008; 76, 1678-1685.

Ozen M, Gungor S, Atambay M, Daldal N: Cerebral malaria owing to *Plasmodium vivax*: case report. **Ann Trop Paediatr** 2006; 26:141-144.

Perez-Mazliah D and Langhorne J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. **Front.Immunol** 2015; 5:671.

Perkins DJ, Weinberg JB & Kremsner PG. Reduced interleukin- 12 and transforming growth factor- $\beta$ 1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. **J Infect Dis** 2000; 182: 988–992.

Pessoa SB, Martins AV. Gênero *Plasmodium* - Parasitas da malária. In :\_\_\_\_\_ **Parasitologia Médica**. 11<sup>a</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982; 11: 280-291.

Quelhas D, Jiménez A, Quintó L, Serra-Casas E, Mayor A et al. IgG against *Plasmodium falciparum* variant surface antigens and growth inhibitory antibodies in Mozambican children receiving intermittent preventive treatment with sulfadoxine-pyrimethamine. **Immunobiology** 2011; 216: 793–802.

Raza AGN, Sarwar Zubairi AB, Raheem A, Nizami S, Beg M: Tumor necrosis factor - $\alpha$ , interleukin-10, intercellular and vascular adhesion molecules are possible biomarkers of disease severity in complicated *Plasmodium vivax* isolates from Pakistan. **PLoS One** 2013; 8:81363.

Raza A, Khan MS, Ghanchi NK, Raheem A, Beg MA. Tumour necrosis factor, interleukin-6 and interleukin-10 are possibly involved in *Plasmodium vivax*-associated thrombocytopaenia in southern Pakistani population. **Malaria Journal** 2014; 13:323.

Rey L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2011

Ribeiro BP. Citocinas na malária vivax: influência das variantes moleculares do parasito ou das características do hospedeiro? Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Maranhão, 84f, 2013.

Riccio EK, Totino PR, Pratt-Riccio LR. Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-119 malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. **Malaria Journal** 2013; 12:326.

Richards JS, Stanisic DI, Fowkes FJI, Tavul L, Dabod E. Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. **Clin Infect Dis** 2010; 51: 50–60

Rifkind JM, Mohanty JG and Nagababu E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. **Front.Physiol** 2015; 5:500.

Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior J da C, e Fonseca B de P, Antas PR, Baldez A, Storer FL, Santos F, Banic DM, de Oliveira-Ferreira J. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2014; 109(2):154-62.

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

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

Silvie O, Mota MM, Matuschewski K, Prudencio M. Interactions of the malária parasite and its mammalian host. **Curr Opin Microbiol** 2008; 11, 352-359.

Sinha S, Qidwai T, Kanchan K, Jha GN, Anand P, Pati SS, Mohanty S, Mishra SK, Tyagi PK, Sharma SK, Awasthi S, Venkatesh V, Habib S. Distinct cytokine profiles define clinical immune response to falciparum malaria in regions of high or low disease transmission. **Eur Cytokine Netw** 2010; 2: 232-240

Smith TG, Ayi K, Serghides L, McAllister CD, Kain KC. Innate immunity to malaria caused by *Plasmodium falciparum*. **Clin Invest Med** 2002; 25: 262-272.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol** 2004; 4: 169-180.

Sweetman, SC. Martindale: The complete drug reference. **London: Pharmaceutical Press** 2005; 34: 444-463.

Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN: Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Med** 2008; 5:128.

Torgler R, Bongfen SE, Romero JC, Tardivel A, Thome M, Corradin G. Sporozoite mediated hepatocyte wounding limits Plasmodium parasite development via MyD88- mediated NF-kappa B activation and inducible NO synthase expression. **J Immunol** 2008; 180:3990–3999.

Tracy, JW, Webster JR, Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários Malária. In: HARDMAN, J.G.; LIMBRID,L.E.(ED.) **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Mac GrawHill, 2003. p. 803-822.

Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. **Crit Care** 2003; 7(4):315-23.

Turkseven S, Kruger A. Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2005; 289(2):701-7.

Walther M, et al. Distinct roles of FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. **PLOS Pathog** 2009; 5:1000364.

Walther M, et al. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. **Immunity** 2005; 23:287–296

Wangala B, Vovor A, Gantin RG, Agbeko YF, Lechner CJ, Huang X, Soboslay PT, Köhler C. Chemokine levels and parasite- and allergen-specific antibody responses in children and adults with severe or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Eur J Microbiol Immunol** 2015 Mar; 5(1):131-41.

Watanabe H, Weerasinghe A, Miyaji C, Toyabe S, Mannor MK, Morshed SR, Halder RC, Kobayashi J, Toma H, Sato Y, Iwai K, Matsouda H, Abo T. Expansion of unconventional T cells with natural killer markers in malaria patients. **Parasitol Int** 2003; 52:61-70.

Weisser SB, McLaren KW, Kuroda E, Sly LM. Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages. *Basic Cell Culture Protocols* 2013; 946: 225-239.

White NJ 2011. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malar J** 10: 1-35

WHO - World Health Organization 2011. **World Malaria Report 2011**

WHO - World Health Organization 2012. **World Malaria Report 2012**

WHO - World Health Organization 2014. **World Malaria Report 2014**.

Wiria AE, Prasetyani MA, Hamid F, Wammes LJ, Lell B, Ariawan I, Uh HW, Wibowo H, Djuardi Y, Wahyuni S, Sutato I, May L, Luty AJ, Verweji JJ, Sartono E, Yazdanbakhsh M, Supali T. Does treatment of intestinal helminth infections influence malaria? Background and methodology of a longitudinal study of clinical, parasitological and immunological parameters in Nangapanda, Flores, Indonesia. **BMC infect Dis** 2010, 10:77.

Wunderlich F, Al-Quraishy S, Dkhil MA. Liver-inherent immune system: its role in blood-stage malaria. **Front Microbiol** 2014; 5:559.

Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology** 2007; 9(5): 1215–1222.

Zeyrek FY, Kurcer MA, Zeyrek D & Simsek Z. Parasite density and serum cytokine levels in *Plasmodium vivax* malaria in Turkey. **Parasite Immunology** 2006; 28:201–207.

Zhang G, Skorokhod OA, Khoo S-K, et al. Plasma advanced oxidative protein products are associated with anti-oxidative stress pathway genes and malaria in a longitudinal cohort. **Malaria Journal** 2014; 13:134.

## ANEXOS

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

## ANEXO I



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

## PARECER CONSUBSTANCIADO

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

## I - Identificação:

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

## II - Objetivos:

## Geral:

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

## Específico:

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

## III - Sumário do projeto:

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

Nome \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Testemunha \_\_\_\_\_

Pesquisadores responsáveis:

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

Universidade Federal Do Maranhão

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

Telefone: 98 33018548

E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br