

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE MEDICINA  
COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

QUESSI IRIAS BORGES

**Análise dos linfócitos em pacientes com malária  
*vivax* e sua relação com a anexina-A1 e citocinas**

Cuiabá – MT  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE MEDICINA  
COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

QUESSI IRIAS BORGES

**Análise dos linfócitos em pacientes com malária  
*vivax* e sua relação com a anexina-A1 e citocinas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Cuiabá, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de concentração Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Amílcar Sabino Damazo

Cuiabá – MT  
2013

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

B732a Borges, Quessi Irias.  
Análise dos linfócitos em pacientes com malária vivax e sua  
relação com a anexina-A1 e citocinas / Quessi Irias Borges. -- 2013  
36 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Amílcar Sabino Damazo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso,  
Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde, Cuiabá, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Plasmodium vivax. 2. Anexina-A1. 3. IL-10. 4. T CD4+. 5. T  
CD8+. I. Título.

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

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**

## DEDICATÓRIA

*A Deus pelo dom da vida e por me sustentar em cada passo dessa caminhada  
me amparando nos momentos difíceis,  
me dando força interior para superar as dificuldades,  
mostrando os caminho nas horas incertas e  
suprindo todas as minhas necessidades.*

*Aos meus pais, Antônio Ferreira Borges e Paula Irias dos Anjos  
por todas as manifestações de amor e apreço, pela transmissão dos alicerces  
que forjaram meu caráter e pelas oportunidades que me proporcionaram.*

*A você Renato Alves dos Santos, companheiro no amor,  
na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou nas horas difíceis  
e compartilhou comigo as alegrias.*

# **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Amílcar Sabino Damazo**, que dedicou seu tempo e compartilhou sua experiência para que minha formação fosse também um aprendizado de vida, por seu exemplo profissional, competência, dedicação e disponibilidade irrestrita.

À Universidade Federal de Mato Grosso e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Agradeço aos professores do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde que tantas vezes ofereceram apoio e oportunidade à troca de experiências e informações.

Aos professores componentes da banca, pela dedicação, atenção e sugestões que ofereceram a esta pesquisa.

A minha (*super-*)amiga, Donata Norman Paulino Brandão Silva, pela amizade fiel, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida, e por acreditar naquilo que eu posso vir a ser e a instigar-me a sê-lo realmente! ... E, como diria Vinicius de Moraes, “*A gente não faz amigos, reconhece-os*”.

Aos amigos do mestrado Afonso Bezerra Ribeiro, Caroline Marques Caloi, Helen Lemes da Silva e Samantha Soares pela amizade que tornaram todos os momentos, até mesmo os mais difíceis, mais agradáveis no decorrer dos últimos dois anos.

À Joselina Maria da Silva e Luis Cáceres, pela disponibilidade que sempre me demonstraram nas atividades experimentais, pelas conversas, pelas risadas e pela amizade sempre sincera.

Meus agradecimentos a CAPES pelo apoio financeiro durante os dois anos do curso e ao CNPq pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

A todos que ouviram os meus desabafos; que presenciaram e respeitaram o meu silêncio; que me acompanharam, riram e participaram. As alegrias de hoje também são suas, pois seus estímulos e carinhos foram armas para essa minha vitória. **MUITO OBRIGADA!**

*“Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te”.*

*Charles Chaplin*

# SUMÁRIO

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

## RESUMO

## ABSTRACT

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 9  |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>  | 11 |
| 2.1 O ciclo do <i>Plasmodium</i> spp   | 11 |
| 2.2 Características do <i>Plasmodium vivax</i>   | 12 |
| 2.3 Resposta imune contra <i>Plasmodium</i>  | 13 |
| 2.4 ANXA1 e o sistema imune  | 16 |
| <b>3. MÉTODOS</b>  | 18 |
| 3.1 Pacientes e controles  | 18 |
| 3.2 Coleta de sangue   | 18 |
| 3.3 Diagnóstico parasitológico   | 19 |
| 3.4 Determinação de citocinas (ELISA)  | 19 |
| 3.5 Teste de imunofluorescência indireta para T CD4+, T CD8+ e Treg                              | 19 |
| 3.6 Análise estatística  | 20 |
| <b>4. RESULTADOS</b>   | 21 |
| 4.1 Perfil hematológico e parasitológico da população estudada                                   | 21 |
| 4.2 Níveis plasmáticos das citocinas de acordo com a parasitemia e<br>exposição prévia a malária | 22 |
| 4.3 Quantificação da Expressão de ANXA1 em Linfócitos CD4+, CD8+<br>e Treg                       | 23 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>  | 25 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>  | 29 |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b>  | 30 |

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 1</b> | Imunorreação para ANXA1 e CD4+ em pacientes infectados com <i>P. vivax</i>  | 24 |
| <b>Tabela 1</b> | Descrição da população estudada por parâmetros hematológicos  | 21 |
| <b>Tabela 2</b> | Comparação das concentrações plasmáticas das citocinas no plasma de indivíduos infectados <i>P. vivax</i> , distribuídos de acordo com o nível de parasitos circulantes e o número de episódios prévios | 22 |
| <b>Tabela 3</b> | Relação entre expressão de ANXA1 com a parasitemia e o número de episódios prévios em pacientes infectados com <i>P. vivax</i>  | 24 |



## RESUMO

### Introdução

A malária é a doença parasitária de maior prevalência no mundo. No Brasil, os casos de malária são concentrados nos estados da Amazônia Legal, onde o *Plasmodium vivax* é responsável por mais de 80% dos casos. O objetivo do presente estudo foi verificar a expressão da ANXA1 nos linfócitos TCD4+, TCD8+, células T reguladoras (Treg) e a quantificação de citocinas no plasma de pacientes com malária *vivax*. Desta forma, o entendimento da relação entre a ativação dos linfócitos e liberação de moléculas imunorreguladoras poderá contribuir para o entendimento da resposta imune durante esta parasitose.

### Métodos

A quantificação plasmática das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1, e TNF- $\alpha$  de pacientes infectados com *P. vivax* e de controles saudáveis foram avaliados por *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). A determinação da expressão da ANXA1 nas células T CD4+, T CD8+ e Treg dos pacientes e controles saudáveis foi determinada pela técnica de imunofluorescência. Todos os resultados foram relacionados com o número de parasitos circulantes e com o número de episódios prévios de malária.

### Resultados

O nível plasmático das citocinas IL-4, IL-13, IL-17 e TGF- $\beta$ 1 reduziu em todos os pacientes primoinfectados com parasitemia baixa e alta. Já a IL-10 aumentou sua concentração plasmática nos infectados com parasitemia baixa e mais de um episódio prévio de malária ( $915,1 \pm 119,6$  pg/mL) quando comparado ao grupo controle ( $326,1 \pm 40,1$  pg/mL), também se constatou uma redução dessa citocina em indivíduos primoinfectados com parasitemia baixa e alta ( $451,8 \pm 37,7$  pg/mL e  $402,9 \pm 99,9$  pg/mL, respectivamente) quando comparado com indivíduos de parasitemia baixa e mais de um episódio de malária ( $915,1 \pm 119,6$  pg/mL). Na quantificação da expressão da ANXA1 observou-se uma redução dessa proteína em células T CD4+ e T CD8+ em pacientes primoinfectados com parasitemia baixa e alta, enquanto que nas células Treg houve um aumento em pacientes primoinfectados com baixa parasitemia ( $151,5 \pm 4,6$  U.A.) quando comparados com pacientes com alta parasitemia e infecção prévia ( $103,3 \pm 3,1$  U.A.).

### Conclusão

A ANXA1 é expressa diferentemente nos subtipos de linfócitos e pode ter uma ação distinta na proliferação linfocitária. Além disso, a ANXA1 pode estar contribuindo com a elevação dos níveis de IL-10 no plasma desses pacientes.

Palavras chave: *Plasmodium vivax*, Anexina-A1, IL-10, T CD4+, T CD8+, Treg.

# ABSTRACT

## Background

Malaria is the most prevalent parasitic disease in the world. In Brazil, malaria cases are concentrated in the states of the Legal Amazon, where *Plasmodium vivax* is responsible for over 80% of cases. The aim of this study was to investigate the expression of ANXA1 in CD4+, CD8+ and regulatory T cells (Treg) and quantification of cytokines in plasma of patients with *vivax* malaria. Thus, understanding the relationship between lymphocyte activation and release of immunoregulatory molecules may contribute to the understanding of the immune response during this parasitosis.

## Methods

The plasmatic quantification of IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  in patients infected with *P. vivax* and healthy controls were evaluated by *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). The determination of the expression of ANXA1 in CD4+, CD8+ and Treg cells from patients and healthy controls was determined by immunofluorescence staining. All results were related with the number of circulating parasites and the number of previous episodes of malaria.

## Results

The plasma level of IL-4, IL-13, IL-17 and TGF- $\beta$ 1 decreased in all patients primoinfected with low and high parasitaemia. Since IL-10 increased plasma concentrations in infected with low parasitaemia and more than one previous episode of malaria ( $915.1 \pm 119.6$  pg/mL) compared to the control group ( $326.1 \pm 40.1$  pg/mL) also found a reduction of this cytokine in patients primoinfected with low and high parasitaemia ( $451.8 \pm 37.7$  pg/mL and  $402.9 \pm 99.9$  pg/mL, respectively) when compared to individuals of low parasitaemia and more than one episode of malaria ( $915.1 \pm 119.6$  pg/mL). In quantifying the expression of ANXA1 observed a reduction of this protein in CD4+ and CD8+ in patients primoinfected with low and high parasitaemia, while Treg cells was increased in patients primoinfected with low parasitaemia ( $151.5 \pm 46$  A.U.) compared with patients with high parasitaemia and previous infection ( $103.3 \pm 3.1$  A.U.).

## Conclusion

The ANXA1 is expressed differently in lymphocyte subtypes and may have a different action on lymphocyte proliferation. Furthermore, ANXA1 may be contributing to increased levels of IL-10 in plasma of these patients.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, Annexin-A1, IL-10, CD4+, CD8+, Treg.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a quase totalidade dos casos de malária (98%) concentra-se nos estados da Amazônia Legal. No período entre 2005 e 2009 o número de casos caiu pela metade, passando de 607.801 para 306.908 mil casos. Também foi observada redução semelhante, de 52.5%, no número de óbitos: de 122 para 58 apontando também queda na taxa de incidência de malária, de 25.6 para 12,1 casos por mil habitantes. No ano de 2011 a doença atingiu 263.323 pessoas [1]. Fora desta região, o risco de transmissão é pequeno ou inexistente [2]. Em Mato Grosso, a doença é predominantemente focal, sendo endêmica apenas no norte do Estado [3], sendo que no ano de 2010 foram notificados 2.161 casos [4].

A infecção causada por *Plasmodium vivax* há muito tempo tem sido considerada uma doença benigna, principalmente quando comparada às infecções causadas por *Plasmodium falciparum* [5]. Porém recentemente a literatura tem demonstrado que houve um aumento na virulência dessa parasitose, sendo que os sintomas mais comuns dessas complicações são anemia severa, distúrbio respiratório e lesão pulmonar aguda, coma, entre outras manifestações [6,7]. A crescente resistência aos medicamentos e as complicações decorrentes desta parasitose necessitam de esforços conjuntos para a sua melhor compreensão e resolução.

Evidências sugerem que, durante a infecção, a malária provoca a ativação e disfunção das células T e linfopenia [8]. As células T CD8<sup>+</sup> e as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  conferem proteção contra os parasitos pré-eritrocitários do *Plasmodium* dentro dos hepatócitos [9], enquanto que as células T CD4<sup>+</sup> restringem o crescimento de parasitos eritrocitários do *Plasmodium* através da secreção de citocinas, ativação de macrófagos e da direção da imunidade humoral [10]. Recentemente, a participação das células T reguladoras em infecção causada por *P. vivax* foi demonstrado [11], sugerindo que o equilíbrio entre as citocinas pró e antiinflamatória é necessária para controlar as alterações relacionadas à malária [12].

Além das citocinas, outros fatores podem modular a diferenciação dos linfócitos T helper, como, por exemplo, a afinidade do antígeno por um receptor de células T (TCR). Antígenos com baixa afinidade geralmente induzem uma resposta Th2, enquanto que a alta afinidade induz a diferenciação para uma resposta Th1 [13,14]. A anexina-A1 (ANXA1), é uma proteína endógena que modula positivamente a

sinalização do TCR, tornando-se um alvo molecular importante na diferenciação e proliferação dos linfócitos. Esta proteína é um importante mediador antiinflamatório, dotada de potente atividade anti-migratória de leucócitos, garantindo o caráter transitório da resposta inflamatória [15,16]. Nos linfócitos a ANXA1 tem sido caracterizada como uma proteína antiproliferativa [17].

Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar a expressão da ANXA1 nos linfócitos T CD4+, T CD8+, células T reguladoras (Tregs) e a quantificação de citocinas no plasma de pacientes com malária causada por *Plasmodium vivax*. Desta forma, o entendimento da relação entre a ativação dos linfócitos e liberação de moléculas imunorreguladoras poderá contribuir para o entendimento da dinâmica da resposta imune durante esta parasitose.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O ciclo do *Plasmodium spp*

O ciclo do parasito no hospedeiro invertebrado se inicia quando macrogametócitos e microgametócitos são ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles* sp. durante o repasto sanguíneo no homem. Inicia-se então uma fase sexuada no interior de seu estômago, resultando na fecundação e formação de um ovo ou zigoto (oocineto). Posteriormente, o zigoto migra através da camada única de células do estômago do mosquito, posicionando-se entre esta e sua membrana basal. Assim, por esporogonia, resultam centenas de formas infectantes (esporozoítos) que migram para as glândulas salivares do mosquito vetor, as quais poderão, no momento da picada, serem inoculadas no homem [18].

A infecção no homem tem início nesse momento, quando os esporozoítos são inoculados juntamente com a saliva na circulação sanguínea e/ou no tecido subcutâneo do hospedeiro. Apenas uma proporção dos parasitos entra nos capilares sanguíneos enquanto outros são drenados para os vasos linfáticos, atingindo os linfonodos. Os esporozoítos que atingem os linfonodos podem se desenvolver como formas exo-eritrocíticas, porém, são degradados por leucócitos. Apenas aqueles que atingem a circulação sanguínea são capazes de se desenvolverem após infectarem os hepatócitos. Antes de invadir as células hospedeiras, os esporozoítos migram por várias células do hospedeiro, danificando a membrana plasmática nesse processo (transmigração do esporozoíto). Algumas células são capazes de reparar o dano enquanto outras morrerão por necrose em poucos minutos [19,20]. Essa passagem pelas células hospedeiras antes de atingirem os hepatócitos parece ser fundamental para o ciclo de vida dos plasmódios, induzindo a secreção do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), a qual torna tais células mais susceptíveis à infecção [19,21].

Após invasão dos hepatócitos, os esporozoítos se multiplicam por reprodução assexuada dando origem a milhares de merozoítos (ciclo exo-eritrocítico). O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente uma semana, para o *P. falciparum* e *P. vivax*, e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, durante a fase exo-eritrocítica, podem surgir formas latentes denominadas hipnozoítos que permanecem nas células do fígado por tempo variável, causando recaídas da doença [22].

Os merozoítos formados durante a fase exo-eritrocítica são liberados do fígado para a circulação sanguínea por meio de estruturas vesiculares denominadas merossomos. Esses merossomos se deslocam para os sinusóides hepáticos garantindo a liberação de merozoítos vivos diretamente na circulação sanguínea. Os merozoítos intra-hepáticos consomem o cálcio intracelular e previnem desta forma, a exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática de hepatócitos parasitados, protegendo-os assim da fagocitose por células de Küpffer e outras células fagocíticas presentes nos sinusóides hepáticos [23]. Estima-se que cada hepatócito parasitado libera até 40.000 merozoítos [24,25] que infectarão eritrócitos e começarão um novo ciclo de reprodução assexuada. Neste ritmo, um eritrócito é lisado a cada 48-72 horas (ciclo eritrocítico), de acordo com a espécie de plasmódio envolvida. Esse sincronismo é o que causa o cenário de febres cíclicas em infecções estabelecidas. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, uma pequena proporção destes parasitos se diferencia em estágios sexuais, os gametócitos, que originarão esporozoítos no inseto vetor, após novo repasto sanguíneo. Ainda não se sabe ao certo qual o estímulo ou mensagem responsável pela produção de gametócitos, mas existem duas hipóteses: a primeira sugere que os merozoítos já estão predeterminados a evoluírem em formas assexuadas ou sexuadas antes de invadirem a hemácia; a outra, ao contrário, sugere que fatores ambientais ou estresse determinem a diferenciação dos merozoítos em gametócitos [26].

## **2.2 Características do *Plasmodium vivax***

O *Plasmodium vivax* é a espécie causadora de malária humana com maior distribuição geográfica, respondendo por cerca de 80 milhões de casos anuais [27]. Essa espécie possui uma diversidade fenotípica extraordinária, sendo encontrada em uma variedade enorme de ecótopos, desde a Rússia até as regiões tropicais da Ásia, do Pacífico, e Américas Centrais e do Sul [28]. *P. vivax* é o maior responsável pela introdução de malária em áreas não endêmicas [29].

A habilidade deste parasito de completar o seu ciclo esporogônico em temperaturas relativamente baixas (em torno de 16°C) tem contribuído substancialmente para o seu sucesso em estabelecer focos estáveis de transmissão não só em zonas tropicais quanto em localidades de zonas temperadas [30]. Apesar de a malária causada por *P. vivax* ser considerada benigna, ou seja, raramente causa a morte do hospedeiro, a infecção é uma causa importante de morbidade e de perdas sócio-econômicas. A sua

presença tem uma forte correlação negativa com o crescimento econômico [28]. As mortes relacionadas a essa espécie são associadas a danos pulmonares e problemas respiratórios [31,32], e também à ruptura do baço [33].

Uma característica particular do *P. vivax* é a sua capacidade de causar recaídas, ou seja, a ocorrência de ciclos pré-eritrocíticos e eritrocíticos devido à esquizogonia tardia de parasitos “dormentes” (hipnozoítos) no interior dos hepatócitos, gerando novamente os sintomas da malária. Este fenômeno biológico ainda não está totalmente elucidado, porém aparenta ser totalmente independente da resposta imune do hospedeiro infectado [34]. Acredita-se que a recaída ocorra a partir da mesma população inoculada, ou seja, no curso do ciclo, parte dos esporozoítos continua o curso normal da infecção e parte transformar-se em hipnozoítos [35].

### **2.3 Resposta imune contra *Plasmodium***

A resposta imune contra *Plasmodium* pode ser desenvolvida especificamente contra cada um dos estágios do parasito [25]. Tem sido demonstrado em modelos experimentais que a sobrevivência à malária é ligada à habilidade de controlar a reprodução dos estágios sanguíneos do parasito nas primeiras semanas após a infecção [36]. A imunidade à malária envolve tanto a resposta celular como a humoral. As células T são essenciais na regulação da produção de anticorpos e na indução da imunidade celular. Os esporozoítos irradiados são capazes de induzir imunidade protetora contra a malária, sendo esta, espécie e estágio-específica. A aquisição de imunidade humoral e celular específica à espécie ou ao estágio do parasito aumenta com a idade [41-43].

Fundamentalmente, é no ciclo eritrocítico que o sistema imune do hospedeiro responde aos antígenos parasitários ou ainda a mitógenos policlonais levando à resposta imune efetiva contra o parasito ou à imunopatologia. Entretanto, os parasitos da malária são conhecidos por perturbar o perfil normal de células imunes no sangue periférico. Por exemplo, a contagem total de leucócitos (WBC), total de linfócitos, de células NK, de células T  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ , e de células B e de proporção de células T são afetadas pela infecção de *P. falciparum* e de *P. vivax*. Kassa e colaboradores (2006) constaram que a contagem de leucócitos em pacientes infectados por *P. falciparum* é inferior à contagem de leucócitos em pacientes infectados por *P. vivax* o que pode indicar que a imunopatogenese é mais importante na malária causada pelo *P. falciparum* do que a

causada pelo *P. vivax*. A alteração da migração celular pode estar relacionada a expressão aumentada de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) nos leucócitos do sangue e na superfície de células endoteliais (ECAM-1) durante a infecção por malária [39].

Riccio e colaboradores (2003) demonstraram que as infecções por *P. falciparum* ou *P. vivax* podem resultar em uma amplificação consistente da apoptose de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Por um lado, é compreensível que este fenômeno pode ser essencial para a regulação da resposta imune que ocorre como consequência da ativação de células B periféricas associada com a infecção pelo parasito da malária. Por outro, uma consequência da morte celular pode ser a redução das respostas imunes críticas aos antígenos do plasmódio. Sob esse ponto de vista, a apoptose poderia atuar como um mecanismo de evasão à resposta imune do hospedeiro e estar envolvida na persistência bem sucedida do parasito em seu hospedeiro [40].

Respostas proliferativas de células T a vários antígenos da malária são comumente mais elevadas em indivíduos não-imunes do que em imunes, isto é, respostas de células T a antígenos são reguladas em função da exposição ao parasito. Um estudo conduzido no Sri Lanka mostrou uma baixa resposta proliferativa de células T malária-específicas em adultos que eram recorrentes de malária aguda por *P. vivax* e que vivenciaram repetidas infecções em épocas de pico de ocorrência da doença. O mecanismo responsável pela baixa resposta das células T em indivíduos expostos a ativação antigênica por longos períodos é incerto. A exposição permanente do sistema imune a antígenos do *Plasmodium* pode induzir níveis aumentados de apoptose de células mononucleares que causam supressão de células T reativas, como descritos para superantígenos. Isso resulta em menor proliferação de PBMC em resposta a pressão antigênica específica [45].

Uma caracterização fenotípica dos linfócitos periféricos durante a infecção aguda revelou que uma grande fração dos linfócitos carregava os fenótipos  $\gamma\delta$  sugerindo um papel destas células na resposta precoce contra o *P. vivax*. Foram encontrados níveis muito baixos de anticorpos específicos ao *P. vivax*. Isto pode sugerir que a imunidade celular pode desempenhar um papel maior no desenvolvimento da proteção naturalmente adquirida contra a infecção do *P. vivax* [46].

A infecção da malária geralmente leva a um desequilíbrio na relação normal entre células Th e Treg que regulam a função dos linfócitos B, e isto, por sua vez, leva a uma produção aumentada de imunoglobulinas. Estudos demonstraram tal desequilíbrio



(números relativamente baixos de CD8<sup>+</sup> levando a uma relação CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> significativamente maior) entre indivíduos com malária *P. vivax* quando eles foram testados ao diagnóstico. A imunidade humoral aparenta ser reconstruída mais rapidamente após o tratamento, do que a imunidade celular [47].

Células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são afetadas em extensão comparável em pacientes infectados por *P. falciparum* e por *P. vivax*. No entanto, quando comparamos os valores de apoptose em indivíduos infectados e não infectados verifica-se que as células T CD4<sup>+</sup> são mais suscetíveis do que células T CD8<sup>+</sup> [40]. A proporção de células T CD4<sup>+</sup> é alta durante a infecção aguda por *P. vivax*. Isto está em contraste com o que normalmente é visto durante as infecções por *P. falciparum*, onde a resposta imune parasito-específico encontra-se suprimida. É provável que o *P. vivax* induza uma menor supressão imunológica do que o *P. falciparum* [46].

Linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm sido implicados como células efetoras críticas na proteção contra a fase pré-eritrocítica da malária. O alvo das células T CD8<sup>+</sup> malária-específicas é o hepatócito infectado, o qual apresenta, na sua superfície, epítomos derivados do parasito em associação com moléculas de MHC de classe I. As células T CD8<sup>+</sup> posteriormente secretam IFN- $\gamma$  que elimina os hepatócitos infectados ou inativa o parasito intracelular [48-52].

A estabilidade temporal da função da célula T periférica e a influência da exposição antigênica prolongada sobre a resposta da célula T são fatores pouco estudados que podem influenciar a resposta imune do hospedeiro na malária [45]. A produção de reduzida INF- $\gamma$  está associada com a proteção da infecção da malária, esta citocina produzida por células T CD8 e/ou células NK inibe o desenvolvimento do parasito, contribuindo assim para a proteção contra o estágio pré-eritrocítico de ambos *P. falciparum* e *P. vivax*. Entretanto, há estudos mostrando a indução de IL-10 em pacientes com malária, sugerindo que a via Th2 também pode estar envolvida na imunidade da malária [53].

Exposição contínua a mosquitos infectados em áreas hiperendêmicas pode levar a regulação diminuída da função das células T contra os antígenos da malária. O antígeno de superfície predominante em esporozoítos maduros é a proteína circunsporozoite (CS), presente em todas as espécies de *Plasmodium* [54,55]. Os níveis de INF- $\gamma$  em resposta a proteínas CS também são baixos entre indivíduos continuamente expostos [45].

Outro tipo celular que está relacionado à supressão da imunidade celular e humoral durante a infecção aguda de *P. vivax* é a célula Treg. A frequência aumentada deste tipo celular pode beneficiar a sobrevivência do parasito no hospedeiro. Evidências indicam que Treg pode suprimir respostas de células T através da produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , ao passo que eles podem suprimir a maturação de células B e a diferenciação direta ou indiretamente através regulação da produção de IL-2 ou IL-4. Isto pode explicar o baixo nível de anticorpo parasito-específico visto em pacientes *P. vivax* [56-58].

A resposta gerada contra infecção malárica é similar a vários outros patógenos, no que se refere a resposta imune efetora pró-inflamatória gerada para eliminar o parasito, e essa resposta é também propícia a causar danos no tecido do hospedeiro [7,56,57]. O sistema imune do hospedeiro evoluiu de forma que uma variedade de mecanismos, coletivamente chamado de regulação, atue ativamente para controlar essa resposta imune pró-inflamatória exacerbada e evitar danos ao hospedeiro. Alguns estudos têm demonstrado uma imunossupressão transiente durante a infecção aguda de malária, e isso afeta a resposta celular e humoral frente a aloantígenos, patógenos, toxinas de bactérias e mitógenos. Altas concentrações de hemozoína no *P. vivax* levam à ativação de *Toll-like receptor 9*, contribuindo com resposta inflamatória contra o parasito [5,7]. Além disso, está associada a uma maior incidência de infecções bacterianas e virais, reduzindo também a resposta vacinal durante a malária grave [37,59]. A compreensão a respeito do desenvolvimento da imunorregulação e imunopatologia na malária permanece incompleta. As células dendríticas, células T reguladoras, além de produção de citocinas imunossupressoras podem ter papel fundamental nessa regulação da resposta imune pró-inflamatória exacerbada que ocorre em indivíduos que desenvolvem malária grave [7,56-58].

#### **2.4 ANXA1 e o sistema imune**

A ANXA1 atua de forma parácrina e autócrina regulando a resposta inflamatória no microambiente celular. A expressão da ANXA1 pode ser aumentada dependendo do estímulo celular. Por exemplo, um dos mecanismos antiinflamatórios dos glicocorticóides é a produção da ANXA1 em alguns tipos celulares, como os macrófagos e os mastócitos. Porém, os linfócitos respondem inversamente, reduzindo a

produção de mRNA e proteína da ANXA1 [60]. Esta é a base para uma ação sutil de regulamentação dessa proteína sobre a interação dos sistemas imune inato e adaptativo.

Enquanto que, no sistema imune inato, a ANXA1 regula a migração celular e a produção de citocinas nos macrófagos, PMN e mastócitos, no sistema imune adaptativo, esta proteína apresenta-se baixamente expressa em células linfocíticas. Pouco se sabe sobre a função de ANXA1 em linfócitos, embora alguns trabalhos apontem um efeito supressor da proliferação de células T antígeno-específico [61,62].

Estudos recentes demonstraram que quando as células estão em condições Th0, a presença da hrANXA1 induz a diferenciação para Th1 via aumento da sinalização de TCR pela ativação do receptor FPRL-1. De outro modo, células deficientes para a proteína ANXA1, sob as mesmas condições levam a alta produção de citocinas Th2 (D'ACQUISTO et al., 2007b, 2008c). Além disso, estes trabalhos também demonstram que a ANXA1 leva a diferenciação de linfócitos Th17 [63]. Resultados demonstram que ANXA1 é um “sintonizador” molecular da sinalização TCR e sugerem que esta proteína pode representar um novo alvo para o desenvolvimento de drogas direcionadas a patologias onde uma resposta Th1/Th2 desequilibrada ou uma ativação aberrante de células T é o maior fator etiológico [64].

Em conclusão, se considerarmos os efeitos diferentes da ANXA1 sobre a resposta imune inata e adaptativa, é possível hipotetizar que a promoção de uma resposta imune Th1 protetora induzida pela ANXA1 pode contribuir para o efeito antiinflamatório dessa proteína na resolução de inflamações [36].

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Pacientes e controles

Amostras de sangue foram coletadas de 69 pacientes com infecção aguda por *P. vivax* atendidos no Ambulatório de Malária do Hospital Universitário Julio Müller da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), localizado em Cuiabá – MT. O diagnóstico de infecção por *P. vivax* foi baseado no exame de gota espessa coradas com Giemsa. A idade, quantidade de episódios de malária anteriores, e a história de outras doenças infecciosas de cada um dos participantes foram registradas usando um questionário padrão. Foram excluídos deste estudo pacientes que já iniciaram algum tipo de tratamento antimalárico. O grupo controle foi composto de 37 indivíduos saudáveis. Os controles saudáveis foram selecionados a partir do laboratório do Hospital Geral Universitário, Cuiabá – MT, sendo elegíveis para o estudo pacientes sem parasitemia ou história de malária. O termo de consentimento escrito informativo foi obtido de todos os participantes antes da coleta das amostras. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Júlio Müller (Protocolo nº 633/CEP-HUJM/09), e foi desenvolvido segundo os termos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Os indivíduos do estudo foram pareados por sexo e idade, sendo que a idade média dos pacientes com malária era de  $33,7 \pm 1,9$  anos e dos controles era de  $37,6 \pm 2,2$  anos.

#### 3.2 Coleta de sangue

Foram coletadas duas amostras de sangue de cada paciente. Um esfregaço de ponta do dedo foi levado para o diagnóstico parasitológico, e, em seguida, cerca de 5 ml de sangue venoso foi colhido para a análise da expressão de ANXA1 e de citocinas. O sangue foi coletado assepticamente em tubos Vacutainer® (Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA), e centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O soro foi separado e as amostras foram alíquotadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem ensaiadas.

### 3.3 Diagnóstico parasitológico

Esfregaços de gota espessa foram corados com solução de Giemsa 5% e examinados para espécies de *Plasmodium* por dois microscopistas. A parasitemia foi avaliada contando o número de parasitos por 200 leucócitos. Se nove ou menos parasitos fossem encontrados, 300 leucócitos adicionais eram contados. A parasitemia final dos pacientes foi ajustada / $\mu$ l de sangue, de cada indivíduo. Optou-se por conduzir todas as investigações relacionando as variáveis de estudo com o número de parasitos circulantes e o número de episódios prévios de malária. Os pacientes foram divididos quanto ao nível da parasitemia (parasitemia baixa (n=36) até 750 parasitos/ $\mu$ l e parasitemia alta (33) acima de 752.5 parasitos/ $\mu$ l) e quanto ao número de episódios prévios de malária ( $\emptyset$  episódio – nenhum episódio prévio de malária ou primoinfectados e  $> 1$  episódio – mais de um episódio prévio de malária).

### 3.4 Determinação de citocinas (ELISA)

Os níveis plasmáticos das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1, e TNF- $\alpha$  de pacientes *P. vivax* e controles saudáveis foram avaliados por *enzyme-linked immunosorbent assay* indireto (ELISA), utilizando pares de anticorpos monoclonais citocina-específicos fornecidos pelo teste comercialmente disponível (BD, Biosciences - Pharmingen, San Diego, CA, EUA). Todos os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Cada placa inclui uma curva padrão de citocina recombinante humana em paralelo com as amostras, a atividade enzimática final foi medida por um leitor de microplacas automático, V-Max (Dispositivos Moleculares, Sunnyvale, EUA), a 405 nm. Todas as amostras foram medidas em duplicata, e a média dos dois valores de densidade óptica foi utilizado para todas as análises.

### 3.5 Teste de imunofluorescência indireta para T CD4+, T CD8+ e Treg

Foram utilizados esfregaços sanguíneos de pacientes infectados com *P. vivax* e controles saudáveis. As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente [65] com água por 5 min, e posteriormente, com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% diluídos em metanol por 1 h. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato (PBS), permeabilizadas com Tween 20 a 0,4% durante 15 min e bloqueadas com albumina

sérica bovina (BSA – Sigma) a 5% por 30 min. Todas as lâminas foram incubadas overnight, a 4°C, em câmara úmida com anticorpo primário rabbit anti-ANXA1 (Invitrogen, USA). Para identificar o subtipo de linfócito um segundo anticorpo foi utilizado: mouse anti-CD8, anti-CD4, anti-CD25 e anti-FOXP3 (Invitrogen, USA) (1:200), com BSA 1% em PBS. As lâminas foram lavadas com BSA 1% (15 min) e incubadas com anticorpo secundário (goat anti-rabbit, conjugado com fluorocromo ALEXAFLUOR 488<sup>®</sup> e com goat anti-mouse, conjugado com fluorocromo ALEXAFLUOR 546<sup>®</sup>, na diluição de 1:50 em BSA a 1%) e com o marcador de núcleos DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante 1 h à temperatura ambiente e em câmara escura. As lâminas foram lavadas em PBS, montadas com uma solução de PBS e glicerol 1:1 e as células imunomarcadas foram identificadas no microscópio AxioScopeA1 (Carl Zeiss, GR). Para a quantificação das células T CD4+, T CD8+ e Treg (CD4+/CD25+/FOXP3+) e a imunomarcação para a ANXA1, foram avaliados 20 campos distintos no esfregaço sanguíneo de cada indivíduo. A proteína ANXA1 foi quantificada por densidade óptica média (MOD) com o auxílio do analisador de imagens (Software AXIOVISION). O Software quantificou a expressão da proteína ANXA1, conferindo valores, que variaram pelo espectro de cor, de 0 a 255 unidades arbitrárias (U.A.).

### 3.6 Análise estatística

A análise estatística foi determinada pelo programa GraphPad PRISM 5 (La Jolla, CA, USA) (média do grupo e desvio padrão). Para comparar as características da população estudada foi utilizado o teste U de Mann-Whitney e o teste t de Student. Para comparar dados referentes aos níveis de citocinas entre grupo infectado por *P. vivax* e controle, bem como a expressão de ANXA1 nos linfócitos T CD4+, T CD8+ e Treg, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância oneway (ANOVA), com pós teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Perfil hematológico e parasitológico da população estudada

As características gerais da população de estudo de acordo com os parâmetros hematológicos estão detalhadas na tabela 1.

**Tabela 1** – Descrição da população estudada por parâmetros hematológicos (média ± EPM)

|   | Indivíduos                        |                     |
|---|-----------------------------------|---------------------|
|   | Malária <i>P. vivax</i><br>(n=69) | Controles<br>(n=37) |
| Hemoglobina (g/dL)                                  | 12,6 ± 0,3**                      | 13,8 ± 0,2          |
| Hematócrito (%)                                     | 37,4 ± 0,9*                       | 40,1 ± 0,7          |
| Células Brancas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 5561 ± 232,1***                   | 7520 ± 350,2        |
| Linfócitos (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )      | 1415 ± 163,9***                   | 2309 ± 137,4        |
| Plaquetas (cél/mm <sup>3</sup> )                    | 128,9 ± 11,6***                   | 285,4 ± 10,9        |
| Parasitemia (parasitos/μL)                          | 3255 ± 454,9                      | 0                   |
| Células CD4+  | 858,4 ± 99,9**                    | 1355,0 ± 51,3       |
| Células CD8+  | 422,8 ± 49,2***                   | 742,4 ± 50,3        |
| Células CD4+CD25+FOXP3+                             | 52,1 ± 7,4                        | 40,7 ± 5,9          |
| Células CD4/CD8                                     | 2,2 ± 0,1                         | 1,9 ± 0,1           |

Análise da população estudada segundo parâmetros hematológicos e parasitológicos.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle; na análise de Mann-Whitney's U e student's t test.

A média dos parâmetros hematológicos do grupo de pacientes sintomáticos de malária aguda infectados por *P. vivax* foi estatisticamente menor quando comparada à controles saudáveis. Como esperado, a média das células T CD4+ e CD8+ foi significativamente inferior durante a doença aguda ( $p < 0,001$ ). A relação CD4/CD8 não apresentou diferença estatística.

Com relação aos linfócitos Treg, o número de células não apresentou diferença estatística quando comparado pacientes com malária e controles. Porém, avaliando esses pacientes de acordo com o número de parasitos e com o número de episódios prévios, foi observado que os pacientes com parasitemia baixa e pacientes com mais de um episódio prévio de malária apresentavam um aumento significativo dessas células ( $96,0 \pm 8,6$  e  $81,9 \pm 8,2$ , respectivamente) quando comparado aos pacientes controle. Os pacientes com parasitemia alta e os primoinfectados ( $52,6 \pm 7,2$  e  $37,8 \pm 6,8$ , respectivamente) não apresentaram diferença estatística quando comparado aos controles.

#### 4.2 Níveis plasmáticos das citocinas de acordo com a parasitemia e exposição prévia a malária

Os níveis de citocinas circulantes, dentre elas IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 e TNF- $\alpha$ , foram avaliados em todas as amostras de plasma provenientes de indivíduos com malária e controles, sendo os resultados descritos na tabela 2.

**Tabela 2** – Comparação das concentrações plasmáticas das citocinas no plasma de indivíduos infectados *P. vivax*, distribuídos de acordo com o nível de parasitos circulantes e o número de episódios prévios

| Citocinas                      | Concentração plasmática das citocinas (pg/mL) |                                  |                                 |                                 |                  |
|--------------------------------|---|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------|
|                                | Média $\pm$ EPM                               |                                  |                                 |                                 |                  |
|                                | Parasitemia baixa                             |                                  | Parasitemia alta                |                                 | Controles        |
| $\emptyset$ episódio           | > 1 episódio                                  | $\emptyset$ episódio             | > 1 episódio                    |                                 |                  |
| <b>IL-2</b>                    | 220,2 $\pm$ 20,7                              | 200,7 $\pm$ 18,6                 | 260,3 $\pm$ 16,8                | 218,9 $\pm$ 20,1                | 228,3 $\pm$ 16,7 |
| <b>IL-4</b>                    | 7,0 $\pm$ 0,1**                               | 15,0 $\pm$ 1,4                   | 6,1 $\pm$ 0,9**                 | 15,8 $\pm$ 1,9                  | 21,6 $\pm$ 2,6   |
| <b>IL-10</b>                   | 451,8 $\pm$ 37,7 <sup>++</sup>                | 915,1 $\pm$ 119,6 <sup>***</sup> | 402,9 $\pm$ 99,9 <sup>+++</sup> | 726,0 $\pm$ 48,1                | 326,1 $\pm$ 40,1 |
| <b>IL-13</b>                   | 6,9 $\pm$ 0,1 <sup>#***</sup>                 | 48,1 $\pm$ 8,3 <sup>***</sup>    | 75,8 $\pm$ 5,2 <sup>**</sup>    | 52,2 $\pm$ 5,1 <sup>***</sup>   | 134,2 $\pm$ 12,6 |
| <b>IL-17</b>                   | 7,0 $\pm$ 0,1 <sup>#***</sup>                 | 36,5 $\pm$ 5,0 <sup>***</sup>    | 77,5 $\pm$ 4,5 <sup>**</sup>    | 59,9 $\pm$ 5,0 <sup>***</sup>   | 145,9 $\pm$ 16,6 |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | 136,3 $\pm$ 11,6                              | 140,2 $\pm$ 10,3                 | 136,4 $\pm$ 9,8                 | 134,5 $\pm$ 9,9                 | 148,1 $\pm$ 18,0 |
| <b>TGF-<math>\beta</math>1</b> | 112,2 $\pm$ 2,3 <sup>+++</sup>                | 356,1 $\pm$ 66,1                 | 253,6 $\pm$ 24,2 <sup>***</sup> | 243,5 $\pm$ 13,9 <sup>***</sup> | 521,8 $\pm$ 45,3 |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 87,8 $\pm$ 5,1                                | 90,5 $\pm$ 6,9                   | 95,9 $\pm$ 7,2                  | 93,2 $\pm$ 10,2                 | 97,6 $\pm$ 5,4   |

Relação entre concentração plasmática de citocinas com o nível de parasitemia e o número de episódios prévios em pacientes infectados por *Plasmodium vivax*. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle; ++ $p > 0,01$ ; +++ $p < 0,001$  comparado ao grupo parasitemia baixa e mais de 1 episódio; # $p < 0,05$  comparado ao grupo parasitemia alta e mais de 1 episódio.

Não houve associação entre o nível plasmático das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  dos indivíduos infectados comparados de acordo com o nível de parasitemia e com o número de episódios prévios de malária, mostrando-se equivalentes aos controles saudáveis (Tabela 2).

Desta forma foi verificado que houve uma redução significativa no nível plasmático de IL-4 em pacientes primoinfectados com parasitemia baixa e alta (7,0  $\pm$  0,1 pg/mL, 6,1  $\pm$  0,9 pg/mL) em comparação ao grupo controle (21,6  $\pm$  2,6 pg/mL). Já o TGF- $\beta$ 1 quando comparado aos controles (521,8  $\pm$  45,3 pg/mL) notou-se uma redução nos primoinfectados com parasitemia baixa e alta (112,2  $\pm$  2,3 pg/mL, 253,6  $\pm$  24,2 pg/mL) e nos que relataram episódios anteriores de malária com parasitemia alta (243,5  $\pm$  13,9 pg/mL), nota-se também uma redução dessa citocina em indivíduos primoinfectados com parasitemia baixa (112,2  $\pm$  2,3 pg/mL) em comparação aos com parasitemia baixa e mais de um episódio de malária (356,1  $\pm$  66,1 pg/mL). Entretanto a



IL13 e a IL-17 sofreram redução de suas concentrações em todos os níveis de parasitemia e de episódios de malária ( $6,9 \pm 0,1$  pg/mL e  $7,0 \pm 0,1$  pg/mL, respectivamente primoinfectados com parasitemia baixa de IL-13 e IL-17) quando comparado ao grupo controle ( $134,2 \pm 12,6$  pg/mL e  $145,9 \pm 16,6$  pg/mL, respectivamente IL-13 e IL-17), e ambas as concentrações das citocinas reduziram de forma significativa quando comparados os grupos primoinfectados com parasitemia baixa ( $6,9 \pm 0,1$  pg/mL e  $7,0 \pm 0,1$  pg/mL, respectivamente IL-13 e IL-17) e o grupo com parasitemia alta e mais de um episódio recorrente de malária ( $52,2 \pm 5,1$  pg/mL e  $59,9 \pm 5,0$  pg/mL, respectivamente IL-13 e IL-17).

Já para IL-10, observa-se que durante o episódio agudo da doença, houve um aumento significativo nos pacientes com parasitemia baixa e mais de um episódio prévio de malária ( $915,1 \pm 119,6$  pg/mL) em comparação ao grupo controle ( $326,1 \pm 40,1$  pg/mL). Verificou-se também uma redução de seus níveis plasmáticos em indivíduos primoinfectados com parasitemia baixa e alta ( $451,8 \pm 37,7$  pg/mL e  $402,9 \pm 99,9$  pg/mL, respectivamente) quando comparado com indivíduos de parasitemia baixa e mais de um episódio de malária ( $915,1 \pm 119,6$  pg/mL).

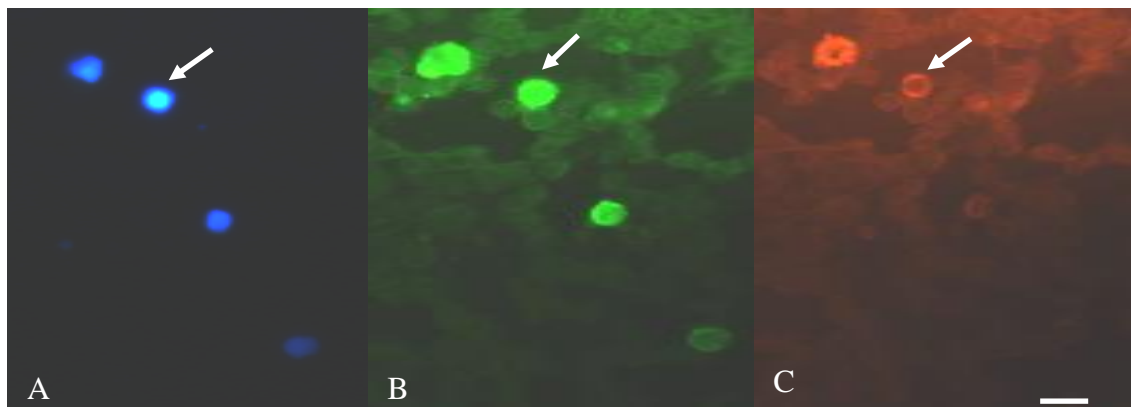
#### **4.3 Quantificação da Expressão de ANXA1 em Linfócitos CD4+, CD8+ e Treg**

A quantificação da expressão da proteína ANXA1 endógena e a identificação dos subtipos de linfócitos circulantes de pacientes com malária *P. vivax* e de indivíduos saudáveis, foi realizada através da técnica de imunofluorescência (Figura 1).

Quando se classificou os pacientes pelo número de parasitos e de episódios prévios de malária verifica-se uma redução na expressão de ANXA1 em células T CD4+ e T CD8+ quando comparado ao grupo controle (Tabela 3). Nos pacientes com o fenótipo T CD4+ houve uma redução significativa em ambos os grupos primoinfectados de parasitemia baixa ( $34,0 \pm 1,5$  Unidades Arbitrárias;  $p < 0,001$ ) e alta ( $58,5 \pm 1,2$  U.A.;  $p < 0,001$ ) e no grupo parasitemia baixa com mais de um episódio de malária ( $80,4 \pm 2,0$  U.A.) quando comprado ao grupo controle T CD4+ ( $108,4 \pm 3,4$  U.A.), o mesmo pode ser verificado para os indivíduos com fenótipo T CD8+ ( $62,9 \pm 1,0$  U.A.,  $65,4 \pm 1,0$  U.A., respectivamente primoinfectados com parasitemia baixa e alta;  $p < 0,001$ ). De maneira geral observa-se que a expressão de ANXA1 pelas células T CD4+ e T CD8+ é

dependente da carga parasitária e do número de episódios prévios de malária causada por *P. vivax*.

Os dados referentes à expressão de ANXA1 em células Treg indicam um aumento dessa proteína em pacientes primoinfectados com baixa parasitemia ( $151,5 \pm 4,6$  U.A.) quando comparados com pacientes com alta parasitemia e infecção prévia ( $103,3 \pm 3,1$  U.A.;  $p < 0,001$ ). A expressão de ANXA1 apresentou uma discreta redução em indivíduos parasitemia baixa e mais de uma infecção ( $102,9 \pm 3,8$  U.A.) quando comparado aos primoinfectados ( $151,5 \pm 4,6$  U.A.;  $p < 0,001$ ). Em relação ao grupo controle ( $95,3 \pm 2,9$  U.A.) pode-se observar um aumento dessa proteína em primoinfectados com parasitemia baixa ( $151,5 \pm 4,6$  U.A.;  $p < 0,001$ ).



**Figura 1** – Imunorreação para ANXA1 e CD4+ em pacientes infectados com *P. vivax*. (A) coloração dos núcleos com DAPI (B) anticorpo primário anti-annexin-A1 com FITC-conjugado com anticorpo secundário (C) anticorpo primário anti-CD4 com TRITC-conjugado com anticorpo secundário. Bar = 10  $\mu$ m.

**Tabela 3** – Relação entre expressão de ANXA1 com a parasitemia e o número de episódios prévios em pacientes infectados com *P. vivax*

| Linfócitos  | Expressão intracelular de ANXA1 (U.A.) em T CD4+, T CD8+ e Treg |                               |                             |                 |                 |
|-------------|---|-------------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|
|             | Média $\pm$ EPM   |                               |                             |                 | Controles       |
|             | Parasitemia baixa   |                               | Parasitemia alta            |                 |                 |
|             | $\emptyset$ episódio  | > 1 episódio                  | $\emptyset$ episódio        | > 1 episódio    |                 |
| <b>CD4+</b> | $34,0 \pm 1,5$<br>+++####**                                     | $80,4 \pm 2,0$ <sup>***</sup> | $58,5 \pm 1,2$<br>+++####** | $109,2 \pm 1,7$ | $108,4 \pm 3,4$ |
| <b>CD8+</b> | $62,9 \pm 1,0$<br>+++####**                                     | $91,8 \pm 2,5$ <sup>***</sup> | $65,4 \pm 1,0$<br>+++####** | $107,2 \pm 3,1$ | $110,9 \pm 5,5$ |
| <b>Treg</b> | $151,5 \pm 4,6$<br>+++####**                                    | $102,9 \pm 3,8$               | $68,4 \pm 2,6$<br>+++####** | $103,3 \pm 3,1$ | $95,3 \pm 2,9$  |

Relação entre expressão endógena de ANXA1 com o nível de parasitemia e a quantidade de episódios de malária em células TCD4+, T CD8+ e Treg de pacientes infectados por *Plasmodium vivax*. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle; +++ $p < 0,001$  comparado ao grupo parasitemia baixa e mais de 1 episódio; #### $p < 0,001$  comparado ao grupo parasitemia alta e mais de 1 episódio.

## DISCUSSÃO

Os estudos que avaliam os mecanismos imunológicos envolvidos na infecção por *Plasmodium* sp mostram que o sistema imune do hospedeiro desenvolve uma potente resposta contra o parasito, causando alterações em quase todos os seus componentes [56,66]. Por isso estudos acerca da imunidade na malária causada por *P. vivax* são de grande relevância, pois o entendimento dessas alterações poderá gerar futuramente um subsídio para o controle mais eficiente dessa parasitose. Além disso, mais de 80% dos casos diagnosticados no Brasil são causados por esta espécie [67].

Alguns estudos relatam que os dois principais mecanismos que explicam a depleção de linfócitos nos pacientes *P. falciparum* e *P. vivax* na fase aguda da doença são: o sequestro de células para os nódulos linfáticos ou outras partes do corpo e/ou a morte das células anormais através da apoptose [40]. Além disso, Braga e colaboradores (2002) demonstraram que as respostas proliferativas de células T a vários antígenos do *Plasmodium* são comumente mais elevadas em indivíduos não-imunes do que em indivíduos imunes, isto é, respostas de células T a certos antígenos são ativamente reguladas em função da exposição ao parasito. Mostrou também uma baixa resposta proliferativa de células T malária-específicas em adultos que eram recorrentes de malária aguda por *P. vivax* e que vivenciaram repetidas infecções em épocas de pico de ocorrência da doença. O mecanismo responsável pela baixa resposta das células T em indivíduos expostos a ativação antigênica por longos períodos é incerto. A exposição permanente do sistema imune a antígenos do *Plasmodium* pode induzir níveis aumentados de apoptose de células mononucleares que causam supressão de células T reativas, como descritos para superantígenos [45].

Da mesma maneira a redução de plaquetas durante a fase aguda da doença é uma alteração bem documentada [47,68,69]. A relevância clínica da plaquetopenia ainda precisa ser melhor compreendida, visto que as complicações hemorrágicas são raríssimas em pacientes com malária [70] e, como já foi demonstrado as plaquetas estão associadas à destruição do parasito [71]. Como esperado, as células T CD4+ [57,72,73] e CD8+ [39] foram significativamente inferiores durante a doença aguda.

Na busca por marcadores biológicos que caracterizem a evolução clínica do paciente, decidiu-se avaliar diferentes citocinas quanto ao nível de parasitemia destes indivíduos e o número de episódios prévios de malária.

Os níveis plasmáticos de IL-10 estavam elevados nos pacientes que apresentavam mais de um episódio de malária, independentemente do nível de parasitemia causadas por *P. vivax*. Este resultado mostra que a reexposição ao *P. vivax* influencia de maneira aditiva na produção da IL-10. Os altos níveis de IL-10 foram igualmente detectados em crianças africanas com anemia e altos níveis de parasitemia [74,75]. Outros estudos também mostraram uma correlação positiva entre os níveis de IL-10 e a densidade parasitária em indivíduos infectados por *P. vivax* [76]. A IL-10 tem um papel importante na imunorregulação, inibindo a função Th1, e promovendo a atividade das células NK [77-79]. Outros resultados indicam que os níveis de IL-10 estavam associados a resposta Th2 durante a resposta imune à malária [53]. Os resultados apresentados neste trabalho, associados com os dados da literatura, sugerem que a IL-10 pode estar atuando para regular a resposta pró-inflamatória, participando tanto da ação direta para eliminação do parasito como contribuindo com a fisiopatogenia da doença. Assim, quando o paciente é exposto mais de uma vez ao parasito, os níveis séricos aumentam, levando a regulação da resposta pró-inflamatória e susceptibilidade do paciente a doença.

Avaliando os níveis de IL-4 constatou-se que estes se encontravam aumentados em pacientes com mais de um episódio de infecção pelo *P. vivax*. Outros estudos observaram resultados semelhantes, sugerindo a participação da IL-10 na regulação da resposta mediada por IL-4, na malária causada por *P. falciparum* [80,81]. Entretanto, a resposta imune humoral na malária pode ser mantida independente dos níveis de IL-4, podendo aumentar ou diminuir consideravelmente com o decorrer da infecção [82].

A IL-13 aumentou em pacientes com mais de um episódio de infecção pelo parasito em níveis baixos de parasitemia. Segundo Taylor e colaboradores (1993) uma importante célula produtora de IL-13 são as CD4+ [83]. Essa citocina tem se mostrado importante para o controle parasitário, pois foi demonstrado que o tratamento com IL-13 aumenta significativamente a fagocitose de parasitos eritrocíticos através da modulação das funções de monócitos e ativação do receptor nuclear PPARC [84].

Demonstrou-se também que indivíduos infectados por *P. vivax* apresentaram um aumento de IL-17 em pacientes com mais de um episódio de infecção pelo parasito em níveis baixos de parasitemia. Ishida e colaboradores (2010) demonstraram o desenvolvimento de malária cerebral e parasitemia durante a infecção *P. berghei* ANKA em camundongos deficientes para IL-17 [85]. Interessante ressaltar que a produção de

IL-17 pelas células CD4<sup>+</sup> na malária foi demonstrada previamente [11,86], o que reflete na diferenciação do fenótipo Th17 na presença de citocinas do tipo TGF- $\beta$  e IL-6 [87].

Já TGF- $\beta$ 1 alterou-se entre os indivíduos que nunca tiveram um episódio prévio de malária comparado aos que já foram expostos uma única vez. O TGF- $\beta$ 1 é um mediador funcional de imunossupressão [88,89] e desempenha um papel importante na regulação da resposta imune durante a infecção da malária [90,91].

Em seguida avaliou-se a expressão de ANXA1 nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e Treg. A ANXA1 é expressa constitutivamente em leucócitos e células epiteliais [17,92,93]. Dependendo do estímulo celular, a expressão da ANXA1 pode ser aumentada, levando a regulação de processos inflamatórios [59]. Neste estudo observou-se que as subpopulações de linfócitos estudadas expressam ANXA1 de modo que os dados estão de acordo com a literatura, que indicam uma ação diferencial dessa proteína no sistema imune inato e adaptativo [61,93].

Alguns estudos indicam uma ligação entre a expressão de ANXA1 e a proliferação de linfócitos [59,94], sendo caracterizada como uma proteína antiproliferativa [17]. Demonstrou-se que a expressão da ANXA1 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de pacientes com malária, apresentava uma redução nos níveis citoplasmáticos durante a infecção por *Plasmodium vivax*. Além disso, observou-se também que em linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> há uma relação positiva entre expressão de ANXA1 com o número de episódios prévios de malária e a parasitemia. Levado em consideração a atividade antiproliferativa da ANXA1 e o baixo número de células T CD4<sup>+</sup> nos pacientes com malária pode-se supor que essa proteína poderia estar regulando a quantidade dessa população celular. Essa é a primeira vez que um trabalho analisa a expressão de ANXA1 na infecção por esse parasito.

Com relação aos linfócitos Treg, o número dessas células e a expressão da proteína ANXA1 estavam aumentados em pacientes primoinfectados com parasitemia baixa. Até o presente momento, não existem dados na literatura que indiquem a funcionalidade dessa proteína nas células Treg. Porém, sabe-se que a elevação dos níveis de ANXA1 em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> induz uma ação antiproliferativa [17]. Esses resultados são interessantes e podem indicar uma ação diferenciada nessa subpopulação de linfócitos.

Ainda pode-se destacar que a ANXA1 pode influenciar na produção de IL-10 [95,96] através da ativação da cascata de ERK [97]. Essa citocina pode ser produzida por diversos tipos celulares como os linfócitos Treg [53], linfócitos CD8<sup>+</sup>, monócitos,

dentre outras [98]. Esses dados associados às análises realizadas nesse estudo indicam que os altos níveis de IL-10 durante a malária poderia ser induzida pela proteína ANXA1 que está sendo produzida e liberada por leucócitos.

## 5 CONCLUSÃO

Em conclusão este estudo demonstra evidências que em pacientes infectados por *Plasmodium vivax* existe uma relação entre: o nível de citocinas, a expressão de ANXA1, nível de parasitos circulantes e o número de episódios prévios de malária.

Como conclusões pontuais têm-se que:

1. Na população de estudo, houve uma redução no número absoluto de células T CD4+ e T CD8+ durante a malária aguda;
2. Pacientes infectados por *P. vivax* apresentaram um aumento de IL-10 no plasma e os níveis dessa citocina estão relacionados com a expressão de ANXA1;
3. A expressão de ANXA1 nos linfócitos T CD4+ e T CD8+ estava reduzida nos indivíduos infectados, sugerindo que essa proteína desempenha seu papel na regulação dessa subpopulação de linfócitos;
4. Expressão de ANXA1 nas células Treg apresentou um aumento nos indivíduos infectados;
5. A redução na expressão de ANXA1 em pacientes com malária *vivax* aguda parece estar atuando nos linfócitos de maneira antiproliferativa.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (Brasil). Dados epidemiológicos de malária por Estado. Amazônia Legal, jan a dez de 2010 a 2011. Portal da saúde 2012. <http://www.portal.saude.gov.br>.
2. Arruda ME, Zimmerman RH, Souza RM, Oliveira-Ferreira J: **Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil**. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007, **102**:367-371.
3. Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM: **High prevalence of Plasmodium malariae infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction**. Acta Trop 2004, **90**:61-64.
4. Ministério da Saúde: *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. Brasil; 2010.
5. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN: **The pathophysiology of vivax malaria**. Trends Parasitol 2009, **25**:220-227.
6. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR: **Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil**. Am J Trop Med Hyg 2009, **80**:452-459.
7. Anstey NM, Douglas NM, Poespoprodjo JR, Price RN: **Plasmodium vivax: Clinical Spectrum, Risk Factors and Pathogenesis**. Adv Parasitol 2012, **80**:151-201
8. Kemp K, Akanmori BD, Adabayeri V, Goka BQ, Kurtzhals JAL, Behr C, Hviid L: **Cytokine production and apoptosis among T cells from patients under treatment for Plasmodium falciparum malaria**. Clin Exp Immunol 2002, **127**:151-157.
9. Schmidt NW, Butler NS, Harty JT: **Plasmodium-host interactions directly influence the threshold of memory CD8 T cells required for protective immunity**. J Immunol 2011, **186**:5873-5884.
10. Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, Tetsutani K, Moriya C, Ishida H, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H, Himeno K: **Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with Plasmodium yoelii 17XL strain**. Eur J Immunol 2010, **40**:1053-1061.
11. Bueno LL, Morais CG, Araújo FF, Silva JA, Correa-Oliveira R, Soares IS, Lacerda MV, Fujiwara RT, Braga EM: **Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3 regulatory T cells during infection are directly associated with the level of circulating parasite**. PLoS One 2010, **5**:e9623.
12. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LMA, Barral A, Barral-Netto M: **Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance**. Malar J 2010, **9**:13.
13. Janeway Jr CA, Bottomly K: **Signals and signs for lymphocyte responses**. Cell 1994, **76**:275-285.
14. Blander JM, Sant'Angelo DB, Bottomly K, Janeway Jr CA: **Alteration at a single amino acid residue in the T cell receptor alpha chain complementarity determining region 2 changes the differentiation of naive TCD4 cells in response to antigen from T helper cell type 1 (Th1) to Th2**. J Exp Med 2000, **191**:2065-2074.
15. Perretti M: **Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction**. Trends Pharmacol Sci 1997, **18**:418-425.
16. Perretti M, Flower RJ: **Annexin 1 and the biology of the neutrophil**. J Leukoc Biol 2004, **76**: 25-29.



17. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M: **An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2005, **100**:39-47.
18. Bledsoe GH: **Malaria primer for clinicians in the United States.** South Med J 2005, **98**:1197-1204.
19. Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A: **Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection.** Science 2001, **291**:141-144.
20. Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R: **Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host.** C R Biol 2006, **329**:858-862.
21. Carrolo M, Giordano S, Cabrita-Santos L, Corso S, Vigario AM, Silva S, Leiriao P, Carapau D, Armas-Portela R, Comoglio PM, Rodriguez A, Mota MM: **Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection.** Nat Med 2003, **9**:1363-1369.
22. Krotoski WA: **Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1985, **79**:1-11.
23. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT: **Manipulation of hosthepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids.** Science 2006, **313**:1287-1290.
24. Nardin EH, Nussenzweig RS: **T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages.** Annu Rev Immunol 1993, **11**:687-727.
25. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR: **Development and regulation of cell mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research.** Annu Rev Immunol 2005, **23**:69-99.
26. Dyer M, Day KP: **Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*.** Parasitol Today 2000, **16**:102-107.
27. **World Health Organization (WHO). Database 2005** [<http://www.who.org>]
28. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R: **The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria.** Am J Trop Med Hyg 2001, **64**:97-106.
29. Svenson JE, MacLean JD, Gyorkos TW, Keystone J: **Imported malaria clinical presentation and examination of symptomatic travelers.** Arch Intern Med 1995, **155**:861-868.
30. Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G: **The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations.** Trends Parasitol 2003, **19**:220-226.
31. Torres JR, Perez H, Postigo MM, Silva JR: **Acute non-cardiogenic lung injury in benign tertian malaria.** Lancet 1997, **350**:31-32.
32. Carlini ME, White AC Jr, Atmar RL: ***Vivax* malaria complicated by adult respiratory distress syndrome.** Clin Infect Dis 1999, **28**:1182-1183.
33. Leclerc Y, Verreault J, Bisson G: **Diffuse lung uptake of technetium-99m sulfur colloid in malaria.** J Nucl Med 1989, **30**:117-119.
34. Cogswell FB: **The hypnozoite and relapse in primate malaria.** Clin Microbiol Rev 1992, **5**:26-35.
35. Kirchgatter K, del Portilho HA: **Molecular Analyses of *Plasmodium vivax* Relapses Using the MSP1 Molecule as a Genetic Marker.** J Infec Dis 1998, **177**:511-515.
36. Stevenson MM, Riley EM: **Innate immunity to malaria.** Nat Rev Immunol 2004, **4**:169-180.
37. Weidanz WP: **Malaria and alterations in immune reactivity.** Br Med Bull 1982, **38**:167-172.

38. Alves MFC, Santos-Neto LL, Junqueira, MIM, Costa CE: **Cytokines and dysregulation of the immune response in human malaria.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1992, **87**:331-336.
39. Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D: **Characterization of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients with Acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Malaria Infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia.** Clin Vaccine Immunol 2006, **13**:376-379.
40. Riccio EKP, Júnior IN, Riccio LRP, Alecrim MG, Corte-Real S, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF: **Malaria associated apoptosis is not significantly correlated with either parasitemia or the number of previous malaria attacks.** Parasitol Res 2003, **90**: 9-18.
41. Cohen S, Mc GI, Carrington S: **Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria.** Nature 1961, **192**:733-737.
42. Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, Purnomo, Masbar S: **Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria.** Am J Trop Med Hyg 1991, **45**:65-76.
43. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, Holder AA, Riley EM: **Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1.** J Infect Dis 1996, **173**:765-769.
44. Watanabe H, Weerasinghe A, Miyaji C, Sekikawa H, Toyabe S, Mannor MK, Morshed SRM, Halder RC, Kobayashi J, Toma H, Sato Y, Iwai K, Matsuoka H, Abo T: **Expansion of unconventional T cells with natural killer markers in malaria patients.** Parasitol Int 2003, **52**:61-70.
45. Braga EM, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU: **Low cellular response *in vitro* among subjects with long-term exposure to malaria transmission in Brazilian endemic areas.** Am S Trop Med Hyg 2002, **66**: 299-303.
46. Jangpatarapongsa K, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Cui L, Montgomery SM, Looareesuwan S, Troye-Blomberg M, Udomsangpetch R: **Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection.** Microbes Infect 2006, **8**:680-686.
47. Lee HK, Lim J, Kim M, Lee S, Oh EJ, Lee J, Oh J, Kim Y, Han K, Lee EJ, Kang CS, Kim BK: **Immunological alterations associated with *Plasmodium vivax* malaria in South Korea.** Ann Trop Med Parasitol 2001, **95**:31-39.
48. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V: **Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites.** Nature 1987, **330**:664-666.
49. Nussler AK, Rénia L, Pasquetto V, Miltgen F, Matile H, Mazier D: **In vivo induction of the nitric oxide pathway in hepatocytes after injection with irradiated malaria sporozoites, malaria blood parasites or adjuvants.** Eur J Immunol 1993, **23**:882-887.
50. Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbary M, Slayter M, Raney JJ, Aniagolu JU, Green SJ: **Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells.** J Exp Med 1994, **180**:353-358.
51. Klotz FW, Scheller LF, Seguin MC, Kumar N, Marletta MA, Green SJ, Azad AF: **Co-localization of inducible-nitric oxide synthase and *Plasmodium berghei* in hepatocytes from rats immunized with irradiated sporozoites.** J Immunol 1995, **154**:3391-3395.

52. Oliveira-Ferreira J, Daniel-Ribeiro CT: **Protective CD8+ T responses against the pre-erythrocytic stages of malaria parasites: an overview.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2001, **96**:221-227.
53. Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, Hisaeda H, Troye-Blomberg M, Cui, L, Udomsangpetch R: ***Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells.** Eur J Immunol 2008, **38**:2697-2705.
54. Nussenzweig V, Nussenzweig RS: **Circumsporozoite proteins of malaria parasites.** Cell 1985, **42**:401-403.
55. Rodrigues MM, Dutra AP, Yoshida N: **Cellular immune response of humans to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1991, **86**:153-158.
56. Riley EM, wahl S, Perkins DJ, Schofield L: **Regulating immunity to malaria.** Parasite Immunol 2006, **28**:35-49.
57. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, Lawrence E, Ngwa-Amambua A, Jayasooriya S, Cheeseman IH, Gomez-Escobar N, Okebe J, Conway DJ, Riley EM: **Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria.** PLoS Pathog 2009, **5**:e1000364.
58. Hansen DS, Schofield L: **Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?.** PLoS Pathog 2010, **6**:e1000771.
59. Scholzen A, Minigo G, Plebanski M: **Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection.** Trends Parasitol 2010, **26**:16-25.
60. D'acquistio F, Perretti M, Flower RJ: **Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptative immune systems.** Br J Pharmacol 2008, **155**:152-169.
61. Goulding NJ, Pan L, Wardwell K, Guyre VC, Guyre PM: **Evidence for specific annexin I-binding proteins on human monocytes.** Biochem J 1996, **316**:593-597.
62. Goulding NJ, Ogbourn S, Pipitone N, Biagini P, Gerli R, Pitzalis C: **The inhibitory effect of dexamethasone on lymphocyte adhesion molecule expression and intercellular aggregation is not mediated by lipocortin 1.** Clin Exp Immunol 1999, **118**:376-383.
63. D'acquistio F, Paschalidis N, Raza K, Buckley CD, Flower RJ, Perretti M: **Glucocorticoid treatment inhibits annexin-1 expression in rheumatoid arthritis CD4+ T cells.** Rheumatology 2008, **47**:636-639.
64. D'acquistio F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza R, Buckley CD, Flower RJ, Perretti M: **Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation.** Blood 2007, **109**:1095-1102.
65. Damazo AS, Paul-Clark MJ, Straus AH, Takahashi HK, Perretti M, Oliani SM: **Analysis of the annexin 1 expression in rat trachea: study of the mast cell heterogeneity.** Annexins 2004, **1**:12-18.
66. Schofield L, Grau GE: **Immunological processes in malária pathogenesis.** Nat Ver Immunol 2005, **9**:722-735.
67. World Health Organization: *World Malaria Report 2008.* Geneva; 2008.
68. Erhart LM, Yingyuen K, Chuanak N, Buathong N, Laoboochai A, Miller RS, Meshnick SR, Gasser RA Jr, Wongsrichanalai C: **Hematologic and clinical indices of malaria in a semi-immune population of Western Thailand.** Am J Trop Med Hyg 2004, **70**:8-14.
69. Hanscheid T, Langihazoinemon M, Lell B, Potschke M, Oyakhirome S, Kremsner PG, Grobusch MP: **Full blood count and hemozoin-containing leukocytes in**

- children with malaria: diagnostic value and association with disease severity.** Mal J 2008, **7**:109.
70. Ghosh K, Shetty S: **Blood coagulation in falciparum malaria – a review.** Parasitol Res 2008, **102**:571-576.
  71. McMorran BJ, Marshall VM, de Graaf C, Drysdale KE, Shabbar M, Smyth GK, Corbin JE, Alexander WS, Foote SJ: **Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection.** Science 2009, **323**:797-800.
  72. Hviid L, Kurtzhals JA, Goka BQ, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Theander TG: **Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.** Infect Immun 1997, **65**:4090-4093.
  73. Lisse IM, Aaby P, Whittle H, Knudsen K: **A community study of T lymphocyte subsets and malaria parasitaemia.** Trans R Soc Trop Med Hyg 1994, **88**:709-710.
  74. Gopinathan VP, Subramanian AR: **Vivax and falciparum malaria seen at an Indian service hospital.** J Trop Med Hyg 1986, **89**:51-55.
  75. Ouma C, Davenport GC, Were T, Otieno MF, Hittner JB, Vulule JM, Martinson J, Ong'echa JM, Ferrell RE, Perkins DJ: **Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production.** Human Genetics 2008, **124**:515-524.
  76. Zeyrek FY, Kurcer MA, Zeyrek D, Simsek Z: **Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey.** Parasite Immunol 2006, **28**:201-207.
  77. Cai G, Kastelein RA, Hunter CA: **IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN- $\gamma$  when combined with IL-18.** Eur J Immunol 1999, **29**:2658-2665.
  78. Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC: **IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always.** Immunol Lett 2003, **86**:123-129.
  79. Pestka, S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB: **Interleukin-10 and related cytokines and receptors.** Annu Rev Immunol 2004, **22**:929-979.
  80. Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, Bell M, Buchanan I, Larned J, Kazembe PN, Dobbie H, Parekh B, Byrd MG, Eick A, Han A, Jarvis WR: **Cytokines and malaria parasitemia.** Clin Immunol 2001, **100**:208-218.
  81. Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, Pied S: **Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum–infected patients from endemic areas of Central India.** J Infect Dis 2006, **194**:198-207.
  82. Torre D, Speranza F, Giola M, Matteelli A, Tambini R, Biondi G: **Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria.** Am Society for Microbiol 2002, **9**:348-351.
  83. Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY: **The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection.** Science 1993, **260**:1931-1934.
  84. Berry A, Balard P, Coste A, Olagnier D, Lagane C, Authier H, Benoit-Vical F, Lepert JC, Séguéla JP, Magnaval JF, Chambon P, Metzger D, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J, Pipy B: **IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR $\gamma$  activation.** Eur J Immunol 2007, **37**:1642-1652.
  85. Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, Hirai M, Iwakura Y, Yoshimura A, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H: **Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17.** Biochem Biophys Res Commun 2010, **402**:790-795.

86. Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M: ***Plasmodium falciparum*-mediated induction of human CD25Foxp3 CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta.** PLoS Pathog 2009, **5**:e1000543.
87. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK: **IL-17 and Th17 Cells.** Annu Ver Immunol 2009, **27**:485-517.
88. Shevach EM, Tran DQ, Davidson TS, Andersson J: **The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function.** Eur J Immunol 2008, **38**:915-917.
89. Li MO, Flavell RA: **Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10.** Immunity 2008, **28**:468-476.
90. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Belkaid Y, Kamanaka M, Flavell RA, de Souza JB, Riley EM: **IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection.** PLoS Pathog 2008, **4**:e1000004.
91. Kobayashi F, Ishida H, Matsui T, Tsuji M: **Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN-gamma monoclonal antibody on the host defense mechanism against *Plasmodium yoelii yoelii* infection.** J Vet Med Sci 2000, **62**:583-587.
92. Morand EF, Jefferiss CM, Dixey J, Mitra D, Goulding NJ: **Impaired glucocorticoid induction of mononuclear leukocyte lipocortin 1 in rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum 1994, **37**:207-211.
93. Goulding NJ, Dixey J, Morand EF, Dodds RA, Wilkinson LS, Pitsillides AA, Edwards JC: **Differential distribution of annexins-I, -II, -IV and -VI in synovium.** Ann Rheum Dis 1995, **54**:841-845.
94. Paschalidis N, Huggins A, Rowbotham NJ, Furmanski AL, Crompton T: **Role of endogenous annexin-A1 in the regulation of thymocyte positive and negative selection.** Cell Cycle 2010, **15**:784-793.
95. Parente L, Solito E: **Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein.** Inflamm res 2004, **53**:125-132.
96. Cunha EE, Oliani SM, Damazo AS: **Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide.** Pulm Pharmacol Ther 2012, **25**:303-311.
97. Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, Parente L: **Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis.** Int Immunopharmacol 2003, **3**:1363-1369.
98. Nussenblatt V, Mukasa G, Metzger A, Ndeezi G, Garrett E, Semba RD: **Anemia and Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Erythropoietin Levels among Children with Acute, Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria.** Am Society for Microbiol 2001, **8**:1164-1170.