



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E**  
**HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS**  
**À HEMATOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CCL5 INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T  
CD8 DE MEMÓRIA E SUA RELAÇÃO COM BIOMARCADORES CLÍNICOS DE  
MALÁRIA VIVAX EM CRIANÇAS ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO**

**ANA CAROLINA SHUAN LACO**

**MANAUS-AM**

**2022**

**ANA CAROLINA SHUAN LACO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CCL5 INTRACELULAR EM LINFÓCITOS T  
CD8 DE MEMÓRIA E SUA RELAÇÃO COM BIOMARCADORES CLÍNICOS DE  
MALÁRIA VIVAX EM CRIANÇAS ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

**Orientador (a):** Dra. Gisely Cardoso de Melo

**Coorientador (a):** Dr. Paulo Afonso Nogueira

**MANAUS-AM**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

A55aa Laco, Ana Carolina Shuan  
Avaliação da expressão de CCL5 intracelular em linfócitos T CD8 de memória e sua relação com biomarcadores clínicos de malária vivax em crianças atendidas na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado / Ana Carolina Shuan Laco. Manaus : [s.n], 2022.  
108 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.  
Inclui bibliografia  
Orientador: de Melo, Gisely Cardoso  
Coorientador: Nogueira, Paulo Afonso

1. Plasmodium vivax. 2. crianças. 3. CCL5. 4. IFN y. 5. memória. I. de Melo, Gisely Cardoso (Orient.). II. Nogueira, Paulo Afonso (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Avaliação da expressão de CCL5 intracelular em linfócitos T CD8 de memória e sua relação com biomarcadores clínicos de malária vivax em crianças atendidas na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado



## DEDICATÓRIA

Dedico este estudo:

A Deus, por sempre está presente na minha vida, me guiando e ajudando,

À minha mãe, Rosa Cabana Shuan por ser a mulher mais guerreira que já conheci, exemplo de determinação e coragem,

Ao meu irmão, Bruno Shuan Laco por me acompanhar nessa jornada,

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisely Cardoso de Melo, Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira e Prof. Dr. Yury Oliveira Chaves, por toda dedicação e apoio.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me direcionar nos bons caminhos, me dando sabedoria, força e coragem para continuar nessa caminhada.

Agradeço à minha mãe, Rosa Shuan, e ao meu irmão, Bruno Shuan, por todo apoio, dedicação e paciência durante todos esses anos e especialmente durante a realização do mestrado. A compreensão e incentivo de vocês foram muito importantes para que chegasse até esse momento.

As minhas amigas, Andresa Cortêz e Thayze Azevedo por me apoiarem em cada etapa da vida pessoal e profissional. Obrigada por todo carinho, compreensão e momentos compartilhados. Obrigada por fazerem parte da minha família.

A Gabrielly Santos, por sua amizade e companheirismo desde a faculdade. Agradeço por todo apoio e incentivo desde a inscrição no mestrado e até sua finalização. Por me escutar e dividir comigo todos os momentos da pós-graduação e por me apresentar ao grupo de pesquisa. Amo muito você!

Aos meus amigos da turma de mestrado que estiveram ao meu lado durante esses dois anos, em especial, Gláucia Lima, Marielle Macedo, Dania Torres e Augusto Bittencourt. Sou muito grata pela oportunidade de compartilhar momentos de alegria e desespero com vocês.

À minha orientadora, Dra. Gisely Cardoso, por confiar a mim este estudo, por sempre me orientar da melhor forma possível e fazer-se presente com muito incentivo e dedicação. Obrigada por ser inspiração como pessoa e profissional.

Ao meu coorientador, Dr. Paulo Nogueira, por todos os conhecimentos compartilhados, pela dedicação e apoio durante a realização do projeto.

Ao Dr. Yury Chaves, por acreditar no meu potencial pessoal e profissional. Sou extremamente grata por todas as contribuições, ensinamentos, paciência e por não conter esforços para tornar

esse projeto possível. Agradeço por todos os momentos especiais e por ser exemplo de profissional e pessoa.

Aos colegas do grupo de pesquisa, especialmente ao Victor Irungu, Carlos Eduardo, Flavia Fontenelle e Anne Almeida por me acolherem e contribuírem para meu crescimento profissional.

Aos amigos que a pesquisa me presenteou, Rebeca Pinheiro, Ana Renate, Thaissy Xavier e a todos do grupo DCDIA, por estarem ao meu lado nesta caminhada. Agradeço imensamente pelas contribuições, ensinamentos e momentos compartilhados de risadas e muito trabalho.

Ao Sr. Arivan, pela disposição em ajudar-me durante a busca ativa dos pacientes.

Agradeço imensamente aos pacientes e seus responsáveis, por aceitarem participar deste projeto e por sua fundamental contribuição para conclusão dos resultados apresentados.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e à Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pela oportunidade de realizar esta etapa da vida acadêmica e profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH), por contribuir no meu crescimento profissional e por sempre buscar melhorias para formação dos acadêmicos.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB), pela infraestrutura cedida à realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por conceder-me bolsa de estudo, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

## **DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo apoio financeiro para realização deste estudo.

## RESUMO

**Introdução:** A malária é uma doença infecciosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, causada por protozoário do gênero *Plasmodium*. A maioria dos casos da doença na Região Amazônica é determinada pelo *Plasmodium vivax* (*P. vivax*). Embora seja considerada benigna e autolimitada, pode agravar em crianças e gestantes, sendo as principais complicações clínicas a anemia e trombocitopenia. O parasito tem preferência por eritrócitos mais jovens e a parasitemia na malária por *P. vivax* não parece ser a principal causa da anemia, de modo que a modulação da resposta imune possa estar mais associada a essa gravidade. Pouco se sabe sobre os mecanismos imunes envolvidos em indivíduos com malária por *P. vivax*, entretanto, alguns estudos em crianças com malária, encontraram associação entre o baixo nível da quimiocina CCL5 com a gravidade da doença. **Objetivo:** Assim, o estudo correlacionou a expressão de CCL5 nas subpopulações de linfócitos T CD8 e biomarcadores clínicos em crianças e adolescentes diagnosticadas com malária por *P. vivax*. **Metodologia:** Foi realizado um estudo observacional prospectivo com crianças e adolescentes de 1 a 16 anos diagnosticados com malária por *P. vivax*. As amostras de sangue foram coletadas em tubo de heparina e EDTA antes do tratamento (D0), fase aguda e na fase convalescença (D60-90). Em cada visita, foram isoladas células mononucleares do sangue periférico (PBMC), realizou-se cultivo celular utilizando a proteína de superfície de merozoíto -1 (PvMSP-1<sub>19</sub>) e após 24 horas foram realizadas as marcações celulares. A expressão de CCL5 e IFN- $\gamma$  foram avaliadas em células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e suas subpopulações por meio de citometria de fluxo. **Resultados:** Foram coletados 13 casos na fase aguda com segmento na fase convalescença. Observamos uma correlação positiva dos níveis de hemoglobina e a porcentagem de linfócitos T CD8 de memória que expressam IFN- $\gamma$  na fase aguda da infecção (P=0,03). Em relação a CCL5, quanto mais jovens eram os indivíduos com malária por *P. vivax* menor foi a porcentagem de linfócitos T CD8 de memória expressores dessa quimiocina (P=0,04). **Conclusão:** A comparação dessas respostas na fase aguda e na convalescença indicaram uma inversão nas correlações entre frequência de linfócitos T CD8 de memória produtoras de CCL5 e a idade, sugerindo um papel importante do estado inflamatório na modulação dessas células. Os resultados são relevantes, indicando que as respostas encontradas no estudo foram provavelmente iniciadas no estágio pré-eritrocítico e, que pesquisas futuras são importantes para entender a relação dessa modulação na resposta imune a malária por *P. vivax*.

**Palavras - chave:** *Plasmodium vivax*, crianças, CCL5, IFN- $\gamma$ , memória.

## ABSTRACT

**Introduction:** Malaria is an infectious disease of chronic evolution, with clinical episodic manifestations of acute profile, caused by the protozoan *Plasmodium* genus. The majority of cases from Amazon Region is caused by *Plasmodium vivax*. Although it has been considered benign and self-limiting, it can worsen in children and pregnant women, having as main complications anaemia and thrombocytopenia. The parasite has preference for young red blood cells and the parasitemia in the malaria *vivax* doesn't seem to be the main cause of anaemia. In a way that the immune response modulation could be associated to this severity. The mechanisms involved in individuals with malaria are not well known. However, some studies on children with malaria have shown an association of low level of CCL5 chemokines with the increase of the disease. **Objective:** Our studies sought to evaluate the CCL5 expression and IFN- $\gamma$  in T CD4 and T CD8 lymphocytes cells and their relation with clinical markers. **Methodology:** A cohort study was realized with children and teenagers from 1 to 16 years with malaria *vivax* at Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. Whole blood with heparin was collected on day 0 (before the treatment) during the acute phase and after that between 60 and 90 days (the convalescence phase). In each day of visit we isolated and cultivated using the antigen merozoite surface protein-1 (MSP1<sub>19</sub>) and after 24 hours we realized the cell appointments. The CCL5 and IFN- $\gamma$  were evaluated in T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> cells by flow cytometry. **Results:** We collected thirteen cases in acute phase and the second one was collected was realized in convalescence phase (after 60 to 90 days of the infection). We noted a positive correlation from the levels of hemoglobin and the percentage of TCD8<sup>+</sup> lymphocytes memory cells IFN- $\gamma$  producers on acute phase of the infection (P=0,03). In relation to RATES, when more young the individuals with malaria *vivax* were, less was the percentage of TCD8<sup>+</sup> lymphocytes memory cells producers of these chemokines (P=0,04). **Conclusions:** The comparison of these responses on acute phase and convalescence indicated on the correlation between the TCD8 lymphocytes memory cells rate of CCL5 and the age, suggesting an important role of the inflammatory stage in the modulation of these cells. The results are relevant indicating that the responses founded in the studies were probably initiated on the pre erythrocyte stage and future research are important to understand the relation of this modulation on anemia pathogenesis of malaria *vivax*.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, malária, CCL5, IFN- $\gamma$ , memory.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-Mapa de risco de malária por município de infecção. Brasil, 2022 (15).....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2-Mapa de municípios prioritários para malária no Brasil em 2021. Brasil, 2021 (15). .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3 - Ciclo biológico da Malária. ....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4 – CCL5 recruta células imunes para o local de inflamação.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5 - Análise citométrica da imunofenotipagem de PBMC de 13 pacientes do estudo.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 6 - Fluxograma da inclusão dos participantes.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 7 - Análise da expressão de IFN-<math>\gamma</math> intracelular em subpopulações de linfócitos T de memória frente a diferentes estímulos.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 8 - Comparação da resposta de IFN-<math>\gamma</math> em linfócitos T de memória por indivíduo na fase aguda e na convalescência.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 9 - Análise da expressão de CCL5 intracelular em subpopulações de linfócitos T CD8 totais e de memória frente a diferentes estímulos.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 10 - Análise pareada da expressão de CCL5 intracelular em subpopulações de linfócitos T CD8 Totais e de memória estimulados com a proteína PvMSP-1 entre os D0 e D60-90. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 11 - Matriz de correlação geral dos pacientes com malária por <i>P. vivax</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 12 - Correlação da resposta celular de linfócitos T CD4 e T CD8 de memória e densidade parasitária na fase aguda.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 13 - Correlações entre linfócitos T de memória produtores de CCL5 e IFN-<math>\gamma</math> com a idade dos 13 participantes do estudo no D0. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 14 - Correlações entre linfócitos T de memória produtor de IFN-<math>\gamma</math> com hemoglobina e hemácias dos 13 participantes do estudo no D0.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 15 - Correlações com a idade e quantidade de células que expressam CCL5. a).55</b>	<b>55</b>
<b>Figura 17 - Comparação da estabilidade e morfologia de linfócitos criopreservados em relação a fresco.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 18 - Comparação da estabilidade e morfologia de plaquetas de plasma criopreservados em relação a fresco. ....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 19 – Análise para controle de qualidade do antígeno. ....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 20 - Análise da concentração ideal da proteína e tempo de cultivo.....</b>	<b>77</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1- Características clínicas dos pacientes no dia do diagnóstico.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 2- Comparação da análise de parâmetros hematológicos dos pacientes no D0 e D60-90.).....</b>	<b>45</b>

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1- Fórmulas utilizadas para isolamento de PBMCs.....</b>	<b>37</b>
<b>Quadro 2- Anticorpos monoclonais.. ..</b>	<b>39</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA**

% - Porcentagem

< - Menor que

> - Maior que

≥ - Maior ou igual a

μL - Microlitro

APC - Célula apresentadora de antígenos (do inglês *antigen-presenting cell*)

APC - Alofococianina

CD - do inglês *Cluster of differentiation*

CID - Coagulação Intravascular Disseminada

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FITC - Isocianato de Fluoresceína

G/DL - Grama por Decilitro

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

Hb - Hemoglobina

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IFN - Interferon

IgG - Imunoglobina G

IgM - Imunoglobina M

IL - Interleucina

IPA - Incidência Parasitária Anual

MHC - I - Complexo principal de histocompatibilidade classe I

MHC- II - Complexo principal de histocompatibilidade classe II

MK - Megacarócitos

mm<sup>3</sup> - Milímetro cúbico

NK - Células assassinas naturais

NK - do inglês, *natural killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMPs - Padrões moleculares associados à patógenos

PBMC - Célula Mononuclear de Sangue Periférico

PE - Ficoeritrina

PerCP - Clorofilpiridina

PMA - Phorbol 12-myristate 13-acetate

CCL5 - Do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

RNA<sub>m</sub> - Acido Ribonucleico Mensageiro

SFB - Soro fetal bovino

Spp. - Espécies

TLR - Receptor do tipo toll

TNF - Fator de necrose tumoral

Treg - Linfócitos T reguladores

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
1.1 Aspectos Epidemiológicos da malária .....	18
1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium ssp.</i> .....	20
1.3 Manifestações clínicas da malária .....	22
1.3.1 Indicadores Clínicos e laboratoriais de gravidade na malária .....	23
1.4 Malária por <i>Plasmodium vivax</i> .....	24
1.5 Resposta imune à malária por <i>P. vivax</i> .....	25
1.6 Imunidade Inata .....	27
1.7 Imunidade Adaptativa.....	28
1.8 A MSP-1 na malária .....	29
1.8 CCL5 e sua relação com malária .....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
2.1. Objetivo Geral.....	34
2.2. Objetivos Específicos .....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 Aspectos éticos .....	35
3.2 Local do estudo .....	35
3.3 População de estudo.....	35
3.4 Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão .....	35
3.5 Diagnóstico e coleta de amostras .....	36
3.6 Análise Hematológica.....	36
3.7 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC).....	36

3.7.1 Separação e armazenamento das células .....	36
3.7.2 Descongelamento de PBMCs .....	38
3.8 Cultivo Celular.....	38
3.8.1 Controle de qualidade do antígeno (PvMSP-1 <sub>19</sub> ) usado como estímulo para cultivo celular.....	39
3.9 Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 de memória com marcação de superfície e intracelular.....	39
3.9.1 Permeabilização e marcação de CCL5 e Interferon-gama.....	40
3.9.2 Leitura e análise das marcações .....	40
3.10 Análise estatística .....	42
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes .....	43
4.2 Parâmetros clínicos dos participantes .....	44
4.3 Análise da imunofenotipagem por citometria de fluxo .....	46
4.3.1 Avaliação da resposta de subpopulações de linfócitos T a PvMSP-1 <sub>19</sub> .....	46
4.4 Correlação da resposta das subpopulações de linfócitos com marcadores clínicos associados a malária.....	50
4.5 Sumario das correlações relevantes entre fatores clínicos e resposta celular ao antígeno MSP-1 <sub>19</sub> .....	52
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>8 ANEXOS E APÊNDICES .....</b>	<b>75</b>
8.1 Considerações sobre o racional e o desenho experimental realizado na pesquisa.....	75

8.1.1 Análise de PBMC com amostra a fresco e congelada em -80°C.....	75
8.1.2 Análise de plaquetas a fresco e congeladas .....	76
8.1.3 Controle de qualidade da proteína PvMSP-1 <sub>19</sub> .....	77
8.1.4 Análise para definição da concentração da proteína PvMSP-1 <sub>19</sub> .....	77
8.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP .....	78
8.3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE.....	81
8.4 TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TALE .....	87
8.5 Procedimento Operacional Padrão – POP – Isolamento de PBMC.....	97

## INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa febril aguda cujo agente etiológico é um protozoário do gênero *Plasmodium*. Sua transmissão é através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* (1). Em humanos, é causada por seis espécies: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. vivax* e *P. knowlesi* (2).

No Brasil, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são às duas espécies predominantes (3). A malária é uma doença hematológica e reflete o ciclo intra-eritrocitário de ruptura das hemácias pelos estágios trofozoíto-esquizonte, invasão de merozoítos e crescimento intra-eritrocitário com uma nova diferenciação em trofozoíto-esquizonte. Todos os sintomas clínicos são consequências da infecção e os mais comuns são: calafrios, febre alta (no início contínua e depois com frequência a cada três dias), dores de cabeça e musculares, taquicardia (aumento dos batimentos cardíacos), aumento do baço e, por vezes, delírios. É mais conhecida por seu padrão cíclico de febres e calafrios, cuja periodicidade (4).

A malária por *P. vivax* pode também evoluir para um amplo espectro de distúrbios clínicos como anemia, trombocitopenia, linfopenia, monocitose e, raramente, a coagulação intravascular disseminada (5). Essas alterações podem variar dependendo de alguns fatores: *idade*, nível de endemicidade da malária, doenças hematológicas secundárias, estado nutricional, fatores sociodemográficos e imunidade a essa infecção (5,6).

No outro extremo do espectro clínico está a malária crônica, a condição resulta de parasitismo repetido ou crônico em indivíduos semi-ímmunes ou que adquiriram imunidade clínica (7,8). Em vista disso, a malária é uma doença complexa e dependendo da resposta imune durante a infecção, ela pode causar doença grave devido a uma resposta insuficiente para sua eliminação ou incapacidade do hospedeiro em controlar a inflamação (9–11). A resposta imune adaptativa é desencadeada devido a não eliminação do parasita pela resposta imune inata. Assim, a participação das células T se faz necessária para a produção de citocinas (10,12,13). As citocinas e quimiocinas induzem a um resultado clínico durante a infecção por malária e sua caracterização a nível plasmático é bem consolidada, porém ainda não existe consenso a respeito da interação celular (14,15).

A CCL5 também conhecida como RANTES (do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), é a quimiocina que consegue atrair células T, basófilos, eosinófilos e células dendríticas para o local de inflamação. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, plaquetas e outras células são responsáveis pela produção de CCL5 (14). Estudos sugerem que em crianças os níveis de CCL5 podem diminuir com o aumento da gravidade da doença. Além disso, mostraram que existe correlação dos níveis da quimiocina com a quantidade de plaquetas, levando a quadros de trombocitopenia, o que pode contribuir em parte para anemia malárica (15,16).

Dessa forma, o entendimento sobre CCL5 e sua relação com células T de memória contribui para uma melhor compreensão da resposta imune e progressão da infecção, assim, o objetivo do estudo foi avaliar a expressão de CCL5 em subpopulações de células T CD8 em resposta a proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP-1<sub>19</sub>) em crianças e adolescentes com malária por *P. vivax*.

## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1 Aspectos Epidemiológicos da malária**

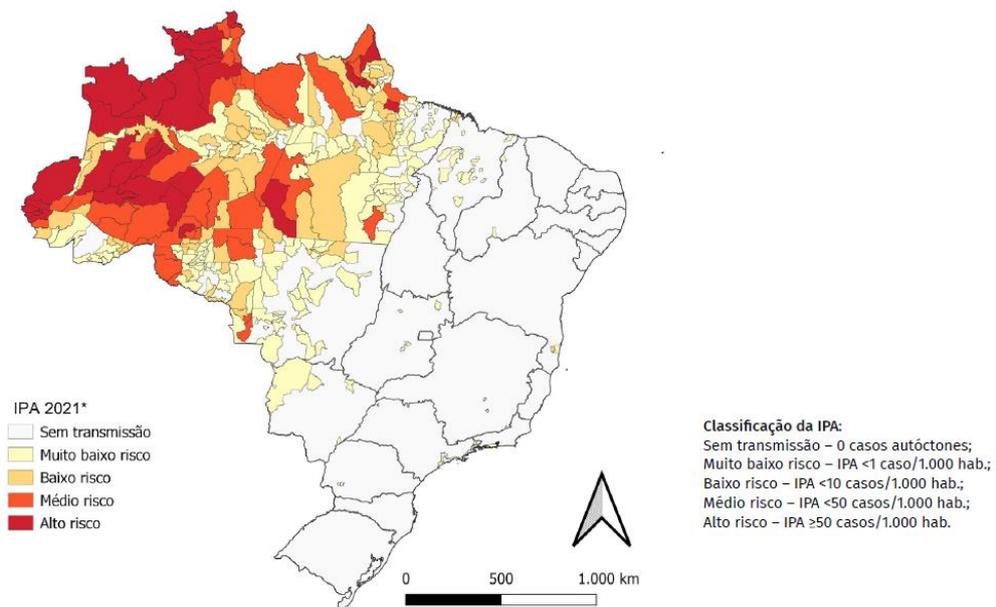
A malária continua sendo um sério problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Atualmente, estima-se que 241 milhões de casos foram detectados em 2020, com quase um milhão de mortes registradas no mundo (17). Outro dado relevante é que as estimativas de morte por malária são mais altas em crianças menores de cinco anos, no período de 2000 a 2019 a porcentagem dessas mortes estava em redução, de 87% para 76%, mas houve aumento em 2020 para 77% (18).

Entre 2000 a 2020, na região das Américas, foi registrado redução de 58% da incidência de casos por malária (de 1,5 milhões para 0,65 milhões). Nesse mesmo período, ocorreu a redução da taxa de mortalidade, o que em parte pode ser devido a alguns fatores, tais como, as restrições estabelecidas em virtude da pandemia da COVID-19, onde a exposição a áreas endêmicas foi afetada, bem como a notificação dos casos nas unidades de saúde (18).

No continente americano, 77% dos casos de malária ocorrem nos países: Brasil, Colômbia e Venezuela (18). Em 2020, o Brasil notificou 145.205 casos de malária, em 2021

houve redução de 4,1% em relação ao ano anterior, tendo sido registrado 139.211 casos. Dos casos notificados no país, aproximadamente 99,0% são autóctones e ocorrem na Amazônia Legal, composta pelo estado do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. A região extra-amazônica é responsável por apenas 1% dos casos notificados no país. Esses casos ocorrem em sua maioria na área de Mata Atlântica e possuem maior índice de letalidade, principalmente por atraso no diagnóstico e tratamento da doença (19,20).

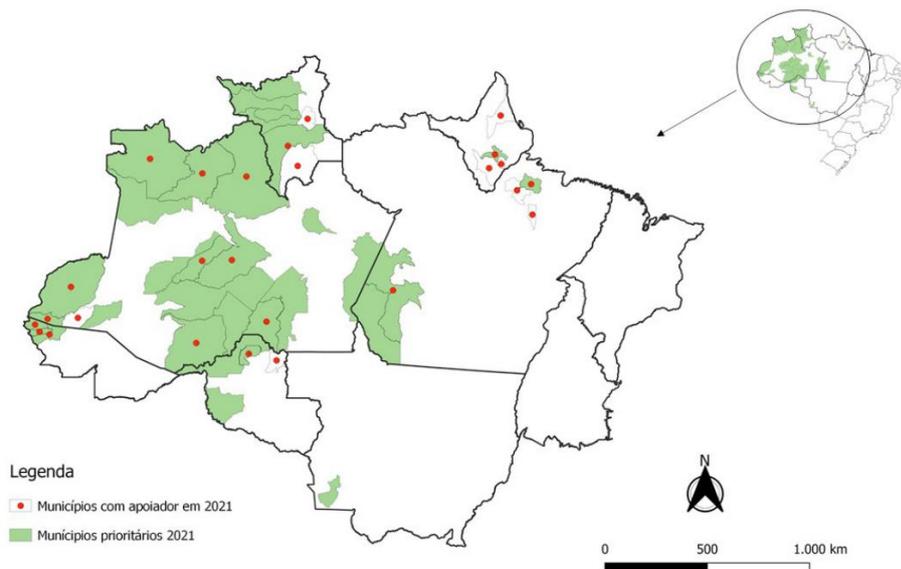
No Brasil, a Incidência Parasitária Anual (IPA) é utilizada como um indicador de risco para infecções por malária, através dos valores dessa incidência é possível verificar a correta interpretação e classificação dos diferentes graus de risco da doença. Em 2021, na região amazônica, observou-se o seguinte cenário: 29 (3,6%) municípios foram classificados como de alto risco (IPA  $\geq$  50 casos/1.000 habitantes), 38 (4,7%) de médio risco (IPA entre 10 e 50 casos/1.000 habitantes), 61 (7,5%) de baixo risco (IPA entre 1 e 10 casos/1.000 habitantes) e outros 163 (20,2%) municípios foram classificados como de muito baixo (IPA < 1 caso/1.000 habitantes) risco de transmissão da doença. Os demais 517 (64,0%) municípios amazônicos não registraram transmissão autóctone da doença (19) (**Figura 1**).



Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Excluídas lâminas de verificação de cura. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022. Dados do Sinan atualizados em: 10/3/2022.  
\*Dados de 2021 são preliminares, sujeitos a alterações.

**Figura 1-Mapa de risco de malária por município de infecção. Brasil, 2022 (15).**

Aproximadamente 80% da malária concentrou-se em 41 municípios, 39,0% no Amazonas, 19,5% no Pará, 17,1% em Roraima, 9,8% no Amapá, 7,3% no Acre, 4,9% em Rondônia e 2,4% no Mato Grosso. No Estado do Amazonas, em 2021 ocorreram 60.380 casos autóctones. A doença acomete crianças, adolescentes e adultos, sendo o *P. vivax* responsável por cerca de 80% casos. Na região Amazônica, as condições são propícias para a sobrevivência do vetor. Além disso, as condições socioeconômicas e ambientais favorecem a transmissão da doença (19,20) (**Figura 2**).



Fonte: Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária. Sivep-Malária. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022

**Figura 2-Mapa de municípios prioritários para malária no Brasil em 2021. Brasil, 2021 (15).**

### 1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium ssp.*

A malária é transmitida através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Existem mais de 400 espécies de mosquitos anofelinos, porém apenas 30 delas são vetores importantes da malária, sendo o *Anopheles darlingi* o principal vetor no Brasil (21,22).

O ciclo do parasita da malária envolve humanos e mosquitos anofelinos. Nos humanos ocorre a fase assexuada, onde os parasitas crescem e se multiplicam primeiramente nas células do fígado (fase exoeritrocítica) em seguida nos eritrócitos (fase eritrocítica). No mosquito ocorre a reprodução sexuada do parasito, chamado ciclo esporogônico (23).

A fase exoeritrocítica inicia durante o repasto sanguíneo da fêmea do inseto *Anopheles* e ocorre a inoculação dos esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado, em seguida, esses esporozoítos que estavam na saliva do mosquito entram na corrente sanguínea e em sua maioria migram para o fígado, onde invadem os hepatócitos e se multiplicam, durante um período de até 4 semanas (21,24). Os hepatócitos infectados amadurecem e passam a ser esquizontes que se rompem e liberam milhares de merozoítos que são os responsáveis por infectar os eritrócitos (20).

Em infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* alguns parasitos se desenvolvem e continuam o ciclo e outros podem ser encontrados em estágios de latência no fígado, os hipnozoítos, estes podem permanecer no organismo por meses ou até mesmo anos antes de iniciarem um novo ciclo de reprodução assexuada e causarem recaídas clínicas. O mecanismo por trás do desenvolvimento da latência e ativação ainda é desconhecido (25).

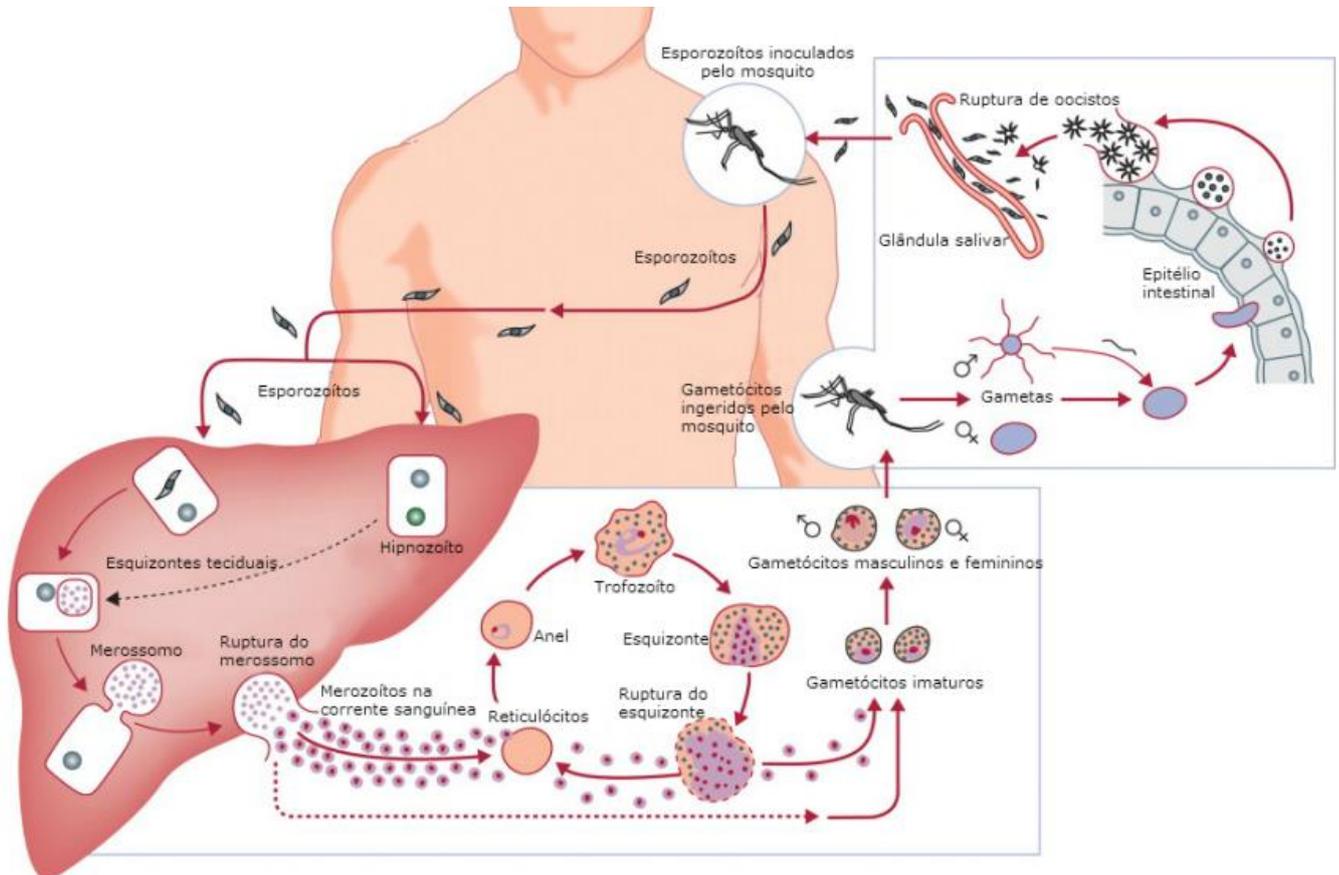
Nos eritrócitos, o estágio em anel dos parasitos, trofozoítos, amadurecem e formam esquizontes que se rompem e liberam novos merozoítos, os quais irão invadir novos eritrócitos dando continuidade ao ciclo (21). O ciclo eritrocítico inicia quando os merozoítos invadem os eritrócitos e repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* (26).

Depois de sucessivas gerações de merozoítos, alguns diferenciam-se em formas sexuadas não multiplicadoras, o feminino (macrogametas) e masculino (microgametas). Esses gametas no interior dos eritrócitos são chamados de gametócitos e não se dividem, quando ingeridos pelo mosquito, irão fecundar-se para dar origem ao ciclo sexuado do parasito (20,26).

Os merozoítos do *P. falciparum* invadem eritrócitos de todas as idades, já os do *P. vivax* invadem preferencialmente, senão exclusivamente, os reticulócitos. Essa interação dos merozoítos com os eritrócitos ou reticulócitos envolve o reconhecimento de receptores específicos que podem permitir a entrada do parasito na célula hospedeira (23,27).

Os merozoítos serão diferenciados em gametócidos (machos e fêmeas) estes estarão presentes no sangue do hospedeiro infectado, e serão ingeridos pelo mosquito, ao chegar ao estômago, os microgametas penetram nos macrogametas gerando zigotos (21,26). Os zigotos irão desenvolver-se no lúmen do intestino médio do mosquito em oocinetos móveis e alongados, o processo pode levar até 16-24 horas, dependendo da espécie de *Plasmodium*, os

oocinetos invadem a parede do intestino médio do mosquito, onde se transformam em oocistos. Estes crescem, rompem-se e liberam esporozoítos, que migram e invadem as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano mantém o ciclo de vida da malária (22,28) (**Figura 3**).



**Figura 3 - Ciclo biológico da Malária.** Uma vez que os esporozoítos são inoculados na pele pelas fêmeas do mosquito anopholes, entram na corrente sanguínea e invadem os hepatócitos. No fígado, o parasito pode se diferenciar em esquizonte e após milhares de replicações liberar os merozoítos na corrente sanguínea, ou passam a ser hipnozoítos (forma latente). Os merozoítos invadem os reticulócitos, no caso de *P. vivax* e diferenciam-se em trofozoítos, em seguida, os esquizontes se rompem e liberam mais merozoítos e o ciclo continua. Porém, alguns podem se diferenciar em gametócitos masculinos e femininos e ao serem ingeridos por mosquitos acabam sendo infectados. Assim, o ciclo continua no inseto vetor. Adaptado de Mueller et al., 2009 (23).

### 1.3 Manifestações clínicas da malária

Na malária, as manifestações clínicas podem iniciar com a ruptura dos esquizontes e com a liberação de merozoítos na circulação periférica. Conforme o desenvolvimento do ciclo de vida do parasito (reinvasão de merozoítos, desenvolvimento de trofozoíto e ruptura de esquizontes) em 24 a 48 horas, o nível de parasitemia torna-se paralelo ao nível de resposta do

hospedeiro até que o indivíduo “sinta-se doente” (29). A gravidade dos sintomas varia de assintomático, sintomas leves e graves, podendo levar a morte. Geralmente, a manifestação clínica da doença é caracterizada por episódios de calafrios, febre, mialgia, cefaleia, náuseas e vômitos (20). Seguido dos primeiros paroxismos, a febre pode ser intermitente e somada a calafrios são reflexos da ruptura dos esquizontes, sendo mais comum em malária por *P. vivax* (30,31).

Os primeiros sintomas da malária são inespecíficos e possuem semelhança com outras doenças infecciosas, como hepatite viral, leptospirose, dengue ou sepsis bacteriana. O quadro clínico pode ser leve, moderado ou grave, dependendo da espécie do parasito, parasitemia, tempo da doença, idade do paciente, da imunidade adquirida do hospedeiro e condição nutricional (20,32).

A malária por *P. vivax* que antigamente era descrita como benigna, atualmente casos graves são relatados em todo o mundo (3,33). Quando a malária é tratada precocemente, as manifestações clínicas não evoluem para complicações graves. No entanto, alguns indivíduos podem apresentar quadros graves com a necessidade de tratamento intensivo (34,35).

### **1.3.1 Indicadores Clínicos e laboratoriais de gravidade na malária**

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as complicações clínicas na malária são: dor intensa no abdômen podendo ocorrer raramente em razão da ruptura do baço, mucosas hipocoradas, icterícia, redução do volume de urina a menos em 24 horas, vômitos persistentes que comprometam a tomada da medicação por via oral, qualquer tipo de sangramento, falta de ar, aumento da frequência cardíaca, convulsão ou desorientação e prostração (especificamente em crianças) sendo essas complicações mais observadas em malária por *P. falciparum* (17,20).

A infecção grave leva a manifestações laboratoriais como: anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, insuficiência renal, hiperlactatemia e hiperparasitemia sendo caracterizada pela quantidade maior que 100.000 parasitas/mm<sup>3</sup>. O comprometimento dos órgãos e consequentemente, alteração na consciência, edema pulmonar, síndrome respiratória, síndrome neurológica, falha renal, lesão renal grave, complicações metabólicas, coma e morte são complicações que podem surgir na malária (34,46). A anemia e a trombocitopenia, são complicações frequentes e quando não tratadas podem levar a óbito principalmente em

indivíduos mais vulneráveis como crianças e grávidas (47,48). Em malária por *P.vivax*, a trombocitopenia e anemia são as complicações mais frequentes onde o paciente não apresenta sangramento, diferente das infecções por dengue (49–51).

#### **1.4 Malária por *Plasmodium vivax***

A malária por *P. vivax* é responsável por cerca de 14-80 milhões de casos de malária a cada ano, a infecção ocorre com maior frequência em todo o Sudeste Asiático e nas Américas (36). Em 2021, no Brasil, os casos autóctones de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* foram de 83% e 17% dos casos por *P. falciparum* e malária mista. Na região Amazônica, aproximadamente 80% dos casos notificados foram por *P. vivax* (19,37).

Até 2025 e 2030, mais de 30 países procuram eliminar os casos de malária de suas regiões. Porém, o *P.vivax* é um obstáculo para a erradicação da doença (38,39). Os desafios no controle e eliminação de *P. vivax* provavelmente estão relacionados a aspectos da biologia do parasito: capacidade dos hipnozoítos causarem a recaída; o parasito possui alto potencial de transmissão causado pela produção precoce e contínua de gametócitos; alta infectividade para mosquitos e ciclo de desenvolvimento mais curto no vetor em comparação com outros *Plasmodium sp.* (39). Essas características facilitam a transmissão do *P. vivax* por mosquitos vetores sazonais e em temperaturas ambientais mais baixas, estendendo assim a distribuição do *P. vivax* em regiões de clima tropical e subtropical (40).

A infecção por *P. vivax* era considerada relativamente benigna, principalmente quando comparada às infecções por *P. falciparum* (41–44). No entanto, evidências crescentes desafiam a percepção da malária por *P. vivax* como benigna e mostram que os sintomas clínicos não são apenas leves como se acreditava e que são existentes formas mais graves e até letais da doença (30,41). Um estudo realizado na região amazônica mostrou associação à malária grave por *P. vivax* (45). Os sintomas mais comuns dessas complicações são anemia grave, dificuldade respiratória, lesão pulmonar, coma, entre outras manifestações (30,40,41,45).

O aumento da resistência aos medicamentos, como a cloroquina, que é o medicamento de primeira linha utilizado para o tratamento de malária por *P. vivax* e as complicações desta doença parasitária, representam também um desafio para os programas de controle e prevenção,

exigindo esforços conjuntos para um melhor entendimento do desenvolvimento da doença (40,41).

### **1.5 Resposta imune à malária por *P. vivax***

A resposta imune à malária pode ser desenvolvida de forma específica contra cada estágio do parasito (52). Tem sido observado que a sobrevivência a malária é ligada a habilidade de controlar a reprodução dos estágios sanguíneos do parasito nas primeiras semanas após a infecção (53).

A virulência do plasmódio, intensidade de transmissão, idade, fatores genéticos, sociais e econômicos interferem na suscetibilidade do hospedeiro e no prognóstico da infecção. Indivíduos que desenvolvem sintomas mais graves após serem expostos ao parasito geralmente nunca foram infectados anteriormente (54–56). No decorrer das diferentes fases evolutivas, o parasito pode ativar a resposta imune do hospedeiro, essa resposta tem o papel fundamental na redução da carga parasitária e eliminação do parasito. Através do reconhecimento dos componentes parasitários, ocorre a formação da imunidade adaptativa (56–58).

A resposta imune do hospedeiro ou a imunidade à malária é fundamental para a patogênese das manifestações clínicas, assim como a resistência e até mesmo a tolerância ao parasito. Tem sido estabelecido que a imunidade natural é (i) eficaz em adultos após exposição intensa ininterrupta ao longo da vida, (ii) perdida após a cessação da exposição, (iii) específica da espécie, (iv) pouco específica do estágio e (v) adquirida a uma taxa que dependia do grau de exposição. As principais características ou os mecanismos de base da imunidade a malária foram definidas pelo desenvolvimento de imunidade clínica e parasitológica à malária, marcada pela capacidade de controlar a doença (sintomatologia) e densidade parasitária (imunidade parasitária) (7).

É estabelecido que a imunidade é teoricamente direcionada a qualquer ponto do ciclo de vida a partir do momento da entrada do esporozoíto. Nos estágios pré-eritrocitários, estudos longitudinais sugerem respostas imunes provavelmente com envolvimento limitado devido ao período de pré-incubação, especialmente na malária por *P. falciparum* que não há o estágio de hipnozoítos. Baseado em estudo de desafio com esporozoítos irradiados, ou modelos murinos, ou vacinas baseadas em antígenos pré-eritrocitários, de uma maneira geral, o mecanismo requer

principalmente células efectoras CD8<sup>+</sup> produtoras de citocinas de resposta imune efectora como o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que matam parasitas em hepatócitos infectados (59). Para os estágios eritrocitários, alvos potenciais para uma resposta imune são merozoítos livres e os parasitas intraeritrocitários. As respostas humorais são fundamentais na imunidade do estágio sanguíneo (59).

A imunidade clínica observada em áreas endêmicas oferece estímulo à ideia do desenvolvimento de vacinas. As respostas imunes protetoras podem ser direcionadas ao parasita pré-eritrocitário, ao merozoíto livre do parasita do estágio sanguíneo ou a novos antígenos induzidos na superfície de eritrócitos infectados. No entanto, a imunidade natural é relativamente ineficiente, por questões relacionadas ao polimorfismo antigênico, bem como a ausência de um consenso sobre os aspectos funcionais da resposta imune (8).

Indivíduos de áreas com alta endemicidade podem desenvolver proteção contra sintomas graves e morte por malária, adquirindo imunidade a doença ou imunidade ao parasito levando a diminuição na carga parasitária (60,61). A infecção assintomática ocorre geralmente em indivíduos que acumularam vários episódios de malária durante sua vida em área endêmica e que foram continuamente expostos ao parasita, pois, ao longo dos anos de exposição ao plasmódio, uma imunidade protetora pode ser desenvolvida por acúmulo de repertório de anticorpos (62–65). Além disso, sugere-se que os mecanismos da imunidade inata se mantêm em alerta por um grande período ou a resposta imune adaptativa efectora é desenvolvida para controlar o parasito. Entretanto, o controle da ativação do sistema imune pode formar um mecanismo de escape do plasmódio, pois, ao permanecer no hospedeiro, tem seu ciclo evolutivo favorecido (61,62).

O sistema imune inato é composto por células dendríticas (CDs), células *natural killer* (NK), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, essas células são responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, sendo a primeira linha de defesa e levam a ativação da resposta imune. Os patógenos são reconhecidos através dos receptores de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), sendo o receptor do tipo *Toll-Like* (TLRs) o de maior importância (66,67). A interação entre hospedeiro e o parasito leva o sistema imune inato a organizar uma defesa imediata contra o patógeno e auxilia no desenvolvimento da resposta do sistema imune adaptativo, sendo este responsável pela memória imunológica, perfis de resposta imune celular e humoral. As células do sistema adaptativo (células B e T), reconhecem

e ligam antígenos estranhos por meio de receptores de superfície. O elo entre receptor-ligante forma interações que direcionam as células do sistema inato e adaptativo a transcrever genes na forma de RNAm, que é traduzido em proteínas de membrana, intracelulares e secretadas que juntas ampliam a resposta imune contra o patógeno (66,67).

Durante os processos infecciosos, danos são consequências geradas em sua maioria por exacerbação da resposta imunológica e inflamatória, ocorrendo a ativação de cascata de sinalização intracelular, mediadores lipídicos e produção de citocinas e quimiocinas. Na malária, assim como em outras doenças infecciosas, danos patológicos são formados por união dessas ações. Além disso, a imunidade a malária é caracterizada por depender da espécie do parasito e estágio da infecção. Na malária por *P. vivax*, a imunidade ou resposta imune efetora contra os estágios pré-eritrocitários tem uma grande relevância devido à existência dos hipnozoítos. Do ponto de vista parasitológico, a existência de hipnozoíto pode ser entendida como uma infecção crônica, e talvez, hipoteticamente, haveria a manutenção dos antígenos desse estágio, uma vez que células T memória foram correlacionadas com essa forma do parasito (68–70).

## 1.6 Imunidade Inata

A imunidade inata influencia diretamente na resposta imune adaptativa do hospedeiro. Possui a capacidade de reconhecer PAMPs e de responder de forma rápida a receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que são essenciais para o entendimento da resposta imune no início da malária (58,71). Os receptores da resposta inata ativam monócitos, macrófagos e CDs que desencadeiam a ativação da resposta imunológica através do reconhecimento de PAMPs de *Plasmodium*, como as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), hemozoína, proteínas MSP1 e MSP2, DNA e RNA. Eles participam como indutores na produção de derivados da resposta imune, tais como, citocinas pró-inflamatórias principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 gerando uma resposta rápida por intermédio de vias de sinalização mediada por MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88) (72–77).

A participação e contribuição dessa via de sinalização na resposta inata à malária são mais relatadas durante a infecção na fase eritrocítica por uma simples razão, acessibilidade. Segundo os estudos, resíduos tóxicos chamados de heme ocorre a partir da digestão da hemoglobina pelo parasita. Para evitar o dano oxidativo, o parasito forma um polímero

cristalino insolúvel, a hemozoína (78). A hemozoína e o GPI podem estimular, via TLR4, monócitos e macrófagos a sintetizarem citocinas próinflamatórias da resposta inata. O DNA do *Plasmodium sp.* associado à hemozoína é reconhecida pelo TLR9 também é responsável pela produção dessas citocinas (74). Tais citocinas, em especial IL-1, IL-6, IL-12, e IFN- $\gamma$ , possuem funções essenciais no controle do crescimento do parasito, porém como mediadores inflamatórios pode prejudicar e ocasionar condições patológicas ao hospedeiro se forem ativados com excesso, como malária cerebral (75,76,79). Por outro lado, os monócitos e macrófagos produzem IL-12 e IL-18 com a finalidade de diminuir a carga parasitária e ativar o IFN- $\gamma$  que é necessário para promover a eliminação do parasito via nas células fagocíticas durante o ciclo pré-eritrocítico (80). Portanto, uma pesquisa voltada à compreensão das subpopulações linfocitária T CD4 e T CD8 em algum modelo de estudo em malária por *P. vivax* pode ser relevante e contribuir para o entendimento da imunidade à malária.

## 1.7 Imunidade Adaptativa

A resposta imune adaptativa é desencadeada pela incapacidade da resposta imune inata em eliminar o parasito. No entanto, a participação de células T e a produção de citocinas são necessárias para a modulação de uma resposta às formas seguintes do ciclo do parasito (10).

Foi relatado que a malária por *P. vivax* e *P. falciparum* leva a redução de células dendríticas e conseqüentemente o perfil de células T (81). Na fase aguda de uma infecção com alta parasitemia, há apoptose dessas células e/ou diminuição da maturação de células dendríticas caracterizada pela baixa expressão de CD80, CD86 e MHC II (82). Outro achado é que há um aumento da proporção de células T reguladoras com a função de modular a resposta imune (10,83).

O aumento na produção de IL-10, é responsável pela modulação da resposta imune a infecção, uma vez que ela é a principal citocina reguladora dos efeitos causados por mediadores como IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-12 (84,85). Ainda há muito a descobrir, porém, alguns estudos com modelos experimentais murinos indicaram que dependendo da modulação da resposta nas células T CD8 há uma persistência aumentada do parasita. No caso malária por *P. vivax*, a busca por respostas aos questionamentos referentes a modulação de células T CD8 e T CD4 pode auxiliar a compreensão sobre a persistência do estágio hipnozoíta do *P. vivax* (10). Por outro lado, a resposta imune de células T CD4 e CD8 são ativadas durante a fase sanguínea da

infecção. Para o desenvolvimento da resposta imune, as células T possuem um papel fundamental, sendo um dos principais, a ativação de células B que levará a produção de anticorpos (52,70,86).

Portanto, ambas situações têm consequências na ativação de células T e na geração de células de memória específica no estágio pré-eritrocítico em infecções futuras, bem como na resposta à fase sanguínea da infecção que segue para o parasito (70).

### **1.8 A MSP-1 na malária**

A MSP-1 é abundante no estágio de merozoíto. Esse estágio é revestido por proteínas de membrana integrais e periféricas que são geralmente chamadas de proteínas de superfície de merozoítos (MSPs). Acredita-se que elas medeiam as interações iniciais relativamente fracas e reversíveis entre o parasita e as hemácias e estão ligadas por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (87).

O precursor da proteína, de 195 kDa sofre proteólise em quatro fragmentos, N-terminal (83 kDa) e dois internos (de 30 e 38 kDa) restando um fragmento C-terminal de MSP-1<sub>19</sub> ligado a âncora GPI na superfície do parasita. A MSP-1<sub>19</sub> se liga a banda 3 à medida que entra nas hemácias (88,89). Possui a característica de ser conservada e possuir dois domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico, características tais que são mais preponderantes em relação à uma outra proteína chamada Duffy-binding (PvDBP) (90).

O domínio de ligação da PvDBP (região II) ao seu receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) é rico em resíduos de cisteína e constitui a região mais polimórfica da proteína. Apesar da conservação da maioria dos aminoácidos envolvidos na interação PvDBP II, a resposta imune parece ser direcionada principalmente contra regiões polimórficas (91).

A produção de IFN por PBMCs após estimulação com proteína recombinante MSP-1<sub>19</sub> contendo os dois domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico é particularmente imunogênica para estimulação de células T (92). Por ser capaz de estimular PBMCs e levar a produção de IFN, a proteína recombinante MSP-1<sub>19</sub> é uma ferramenta que pode ser utilizada na avaliação da imunidade protetora uma vez que é abundante e conservada.

## 1.8 CCL5 e sua relação com malária

Segundo Regev-Rudzki *et al.*, nas doenças infecciosas, a secreção e a dinâmica das proteínas dos patógenos e do hospedeiro são constantemente usadas por ambos para estimar e reagir com intuito de garantir seu desenvolvimento e sobrevivência (93). Outros autores comentam que essa dinâmica é interpretada como um “*crossstalk*”, e que depende de uma rede massiva de proteínas secretadas, incluindo quimiocinas de células hospedeiras e efetores de virulência dos patógenos para, determinar o resultado da infecção. Em relação ao patógeno, a presença de múltiplos mecanismos de defesa do hospedeiro leva os patógenos a estabelecer suas próprias ferramentas para detectar as circunstâncias do hospedeiro (94). Assim, o efeito sistêmico da infecção modula a resposta de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento e que a pesquisa científica tende a utilizá-las como marcadores de lesão e de resposta imunológica protetora (93).

As quimiocinas são pequenas moléculas imunológicas que funcionam para recrutar e ativar células imunes, incluindo leucócitos, para o local da infecção ou invasão (94). Como regra geral, membros da família de quimiocinas CXC são quimiotáticos de neutrófilos e as quimiocinas CC são quimiotáticos de monócitos e subtipos de linfócitos, apesar de existirem algumas exceções (95,96). As quimiocinas regulam a resposta imune do hospedeiro a uma variedade de patógenos. Quimiocinas e conseqüentemente seus receptores têm grande relevância durante as infecções, inicialmente por sua capacidade quimiotática em leucócitos, e agora pelas evidências recentes de que eles não apenas medeiam o tráfego específico de leucócitos para os locais de infecção, mas também apresentam papéis surpreendentes na regulação e na polarização de células T helper celular (97). Além disso, alguns receptores de quimiocinas adquiriam grande relevância nas infecções pelo HIV e pelo *P. vivax*, pois receptores específicos de algumas quimiocinas servem como entrada celular. Ao invés de se opor à transmissão, a porta de entrada acaba facilitando a infecção e conseqüente a progressão dessas doenças (90,97,98).

O *P. vivax* requer interação com o receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC, ou “*Duffy Antigen/Receptor for Chemokine*”) para permitir sua invasão de eritrócitos humanos, pois a interação da proteína Duffy-binding (PvDBP), proteína de ligação Duff do parasita com o DARC é essencial para a formação da junção com a membrana do eritrócito no processo de invasão (90). O receptor DARC é uma proteína transmembranar de sete segmentos, foi

primeiramente descoberto como um antígeno de grupo sanguíneo e tornou-se mais famoso como um receptor de eritrócitos para parasitas da malária (98).

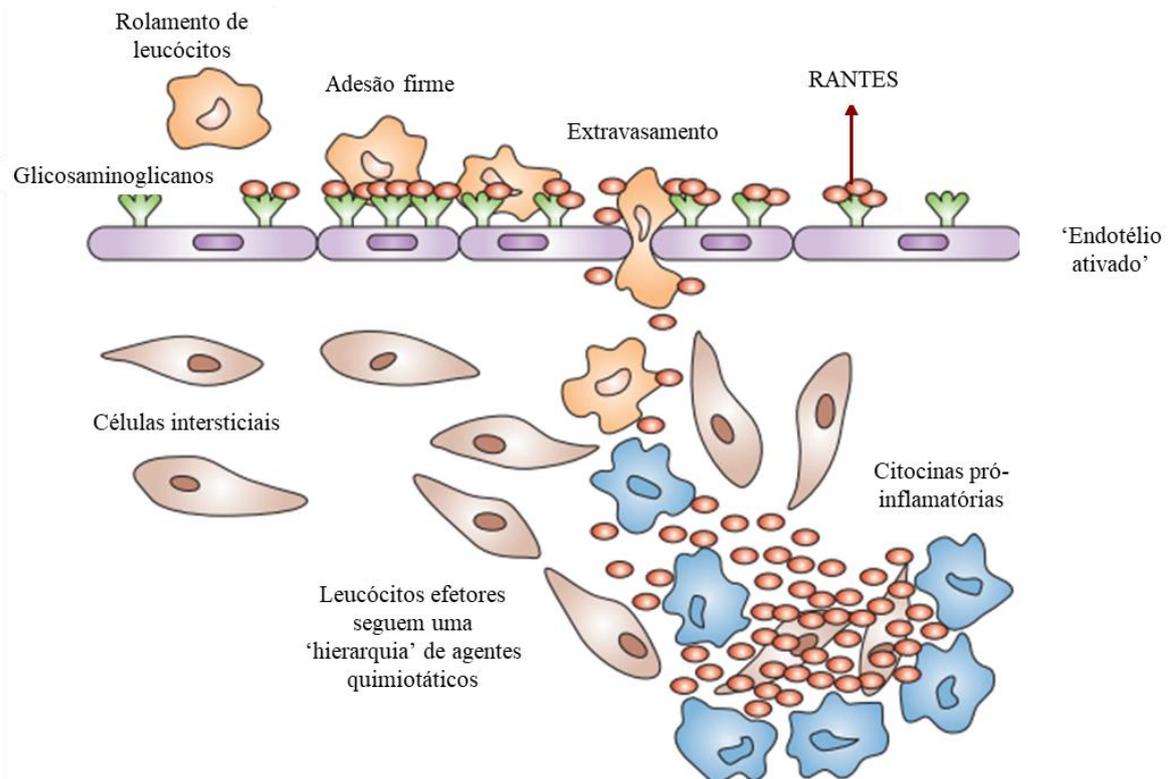
O receptor DARC desempenha um papel complexo na regulação dos níveis de quimiocinas, pelo menos em parte devido à sua capacidade de ligar quimiocinas e adsorvê-las na superfície das células vermelhas, agindo assim como um reservatório de quimiocinas (99). As quimiocinas que se ligam ao DARC podem ser amplamente categorizadas como inflamatórias. As quimiocinas ligantes em DARC com alta afinidade incluem CXCL1 (GRO $\alpha$ ), CXCL2 (GRO $\beta$ ), CXCL3 (GRO $\gamma$ ), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (NAP-2), CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP -1, MCAF, JE), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL11 (Eotaxina), CCL13 (MCP-4), CCL14 (HCC-1) e CCL17 (TARC) (98).

O DARC foi associado a inúmeras respostas fisiológicas e patológicas e faz parte de uma família de receptores atípicos de sinalizadores de quimiocinas, caracterizados pela desordem da ligação do ligante (CCL5 e outros) e especialmente, por uma aparente incapacidade de sinalizar após essa relação. Essa família de receptores atípicos, a qual o DARC faz parte, não sinalizam em resposta ao ligante, mas internalizam a quimiocina e a direcionam para degradação intracelular (100). Por essa razão, acredita-se que o DARC desempenhe um papel na homeostase, seja pela eliminação de quimiocinas inflamatórias da circulação ou pela manutenção dos níveis plasmáticos e liberação subsequente da superfície dos glóbulos vermelhos (98,99).

O equilíbrio entre respostas pró-inflamatórias e imunomoduladoras de citocinas desencadeadas durante a infecção induzem o resultado clínico da malária. Apesar dos estudos sobre a caracterização dos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas, não há consenso sobre o perfil desses mediadores durante a malária no estágio sanguíneo (5).

Um recente estudo, mostrou o potencial diagnóstico na diferenciação de crianças com malária grave (caracterizado pelo evento séptico) de outras com malária com síndrome febril (94). De um Painel Magnético de 25 Plex de Citocina Humana (Thermo Fisher), apenas três quimiocinas, CCL4, CCL5 e CXCL10 aumentaram em crianças com malária grave, e segundo os autores, o aumento delas pode ser utilizada para caracterizar a ativação da resposta imune inata associado ao dano tecidual, devido à caracterização de sepse.

A CCL5 é produzida predominantemente por células T CD8, fibroblastos, células epiteliais e plaquetas. É um químico inflamatório atrativo de células T, basófilos, eosinófilos, células *natural killer* (NK) e células dendríticas ao local inflamatório (**Figura 4**) (101–103).



**Figura 4 – CCL5 recruta células imunes para o local de inflamação.** A CCL5, recruta leucócitos da corrente sanguínea para local onde está ocorrendo a inflamação. A quimiocina liga-se a glicosaminoglicanos na superfície do endotélio, atuando como um sinalizador para as células imunes e auxilia na firme adesão e diapedese. Quando os linfócitos T são ativados, conseguem chegar ao local da lesão e produzem grande quantidade de CCL5 em 3-5 dias, o que leva a quimiocina a exercer um papel importante na manutenção e prolongamento da resposta imune. Adaptado de de krensky A.; Ahn H., 2007 (67).

O papel de CCL5 na malária já havia sido mostrado em outros estudos. Em crianças infectadas por *P. falciparum*, os níveis de RNAm e CCL5 diminuíram com o aumento da gravidade da doença. Outro dado encontrado mostrou que os níveis circulantes de CCL5 são significativamente reduzidos em crianças saudáveis com histórico de malária grave em relação àquelas que tiveram malária leve anteriormente, levando a hipótese que níveis elevados de CCL5 podem fornecer proteção contra doenças graves (104).

Em estudos posteriores, níveis mais baixos de CCL5 também foram encontrados em

crianças com malária cerebral e uma forte correlação positiva foi verificada entre os níveis de CCL5 e a contagem de plaquetas (101,105). No Quênia, verificaram que os níveis circulantes da CCL5 diminuam progressivamente com o quadro de anemia malárica cada vez mais grave e que a supressão da CCL5 está significativamente associada à supressão da eritropoiese e trombocitopenia. A associação entre a supressão da CCL5 circulante e o aumento da gravidade da anemia malárica, com a correlação positiva significativa entre a CCL5 e a hemoglobina, e a supressão da eritropoiese sugerem que a produção diminuída de CCL5 pode desempenhar um papel no desenvolvimento da anemia malárica (16).

Um estudo com indivíduos infectados por *P. vivax* mostraram níveis significativamente baixos de CCL5 e outras citocinas (14). O fato de a DARC ser receptor de quimiocinas e, ao mesmo tempo, o receptor de eritrócitos envolvido na invasão do *P. vivax* e *P. knowlesi*, reforça a necessidade de avaliar a relação entre CCL5 e linfócitos T, em especial o T CD8<sup>+</sup> uma vez que, a quimiocina é produzida por essas células (16,104).

Diante desse contexto, a literatura em relação a CCL5 na malária sugere a necessidade de estudos adicionais, pois pode haver deficiência inerente na produção de CCL5, e contrariamente as quimiocinas MIP-1 e MIP-1 são elevadas na malária (90,98,99). Além disso, a relação da proteína PvDBP do *P. vivax* com o receptor DARC no processo de invasão e o fato de CCL5 se ligar a esse receptor não pode ser ignorado, pois não há consenso sobre o papel da quimiocina na malária.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Correlacionar a expressão de CCL5 nas subpopulações de linfócitos T CD8 e biomarcadores clínicos em crianças e adolescentes diagnosticadas com malária por *Plasmodium vivax*.

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Descrever as características epidemiológicas de crianças infectadas por *P. vivax*;
2. Verificar a expressão de CCL5 e IFN- $\gamma$  em subpopulações de linfócitos T frente a antígeno MSP-1<sub>19</sub> de *P. vivax* em crianças;
3. Comparar a expressão de CCL5 e IFN- $\gamma$  em subpopulações de linfócitos T de memória na fase aguda e após infecção (D60-90);
4. Correlacionar a expressão de CCL5 e IFN- $\gamma$  nestas subpopulações com dados clínicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é observacional prospectivo.

#### 3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), sob CAEE 39198320.8.0000.0005. Todos os participantes e responsáveis assinaram os Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (Item 9.2).

#### 3.2 Local do estudo

O recrutamento dos participantes foi realizado no ambulatório da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Estado do Amazonas.

#### 3.3 População de estudo

A população de estudo foi composta por pacientes de demanda espontânea atendidos no ambulatório da FMT-HVD, no período de julho/2021 a julho/2022.

#### 3.4 Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, entre 1 e 16 anos de idade, com diagnóstico positivo para malária por *P. vivax* através do método de gota espessa. Como controle negativo, foram incluídos o próprio participante por busca ativa após 60 a 90 dias do episódio de malária, com malária negativa.

Não foram incluídos pacientes que apresentavam diagnóstico para malária por *P. falciparum*, malária mista ou portadores de doenças hematológicas, e outras infecções. Foram excluídos pacientes com amostras insuficientes para análise e amostras com menos de 90% de viabilidade após o isolamento das células mononucleares.

### **3.5 Diagnóstico e coleta de amostras**

Foi realizada uma lâmina de gota espessa de cada paciente. As lâminas foram coradas através do método de Walker e analisadas por microscopistas do ambulatório da FMT-HVD, com contagem dos parasitos em 500 leucócitos (20). A parasitemia foi quantificada por mm<sup>3</sup> (microlito).

As amostras de sangue venoso periférico foram coletadas no dia do diagnóstico (D0 - fase aguda) e uma segunda coleta foi realizada após meses da infecção (D60 a D90). Para ambas as coletas, dois tubos foram utilizados: um com heparina (BD *Vacutainer*®) 9 mL de sangue para Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) e outro com ácido etilenodiamino tetracético – EDTA (BD *Vacutainer*® K<sub>2</sub>) 2 mL para análise de parâmetros hematológicos.

### **3.6 Análise Hematológica**

Para realização do hemograma as amostras foram coletadas no tubo de EDTA e foram avaliados os seguintes parâmetros: Contagem de eritrócitos (RBC), Hematócrito (HTC), Hemoglobina (Hb), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (RDW), Plaquetas (PLT), Volume Plaquetário Médio (VPM), Contagem de leucócitos (WBC) e percentual de neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos. Para avaliação destes parâmetros utilizou-se o analisador Sysmex Kx-21N (*Sysmex Corporation*- Japão), devidamente calibrado.

### **3.7 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)**

#### **3.7.1 Separação e armazenamento das células**

As amostras coletadas em tubos de heparina (9 mL) seguiram para o processo de separação das células, a técnica foi realizada através de centrifugação do sangue periférico com gradiente por densidade - Ficoll® Paque Plus (*Sigma-Aldrich*®). Em tubos falcon (*Corning*®) de 15 mL adicionamos a quantidade de ficoll desejada e em seguida colocamos lentamente a mesma quantidade de sangue. Centrifugamos a 500 xg por 20 minutos em temperatura de 20 °C em baixa aceleração e sem freio. Após, com o auxílio de uma pipeta, foi retirado o anel de

células seguido de lavagens com *Phosphate buffered saline* 1x – PBS (*Sigma-Aldrich*®) e centrifugação a 500 xg com baixa aceleração e freio. Em seguida, as células foram ressuspensas em 5 mL de PBS para contagem (106,107).

A contagem e avaliação da viabilidade celular foi realizada através da coloração com a solução de *Trypan Blue* a 0,4% (*Sigma-Aldrich*®), usou-se 10 uL da ressuspensão com 90 uL de *Trypan Blue* e após homogeneização, as células foram observadas nos quatro quadCCL5 da câmara de Neubauer. As células viáveis e não viáveis foram contadas utilizando microscópio de luz em objetivas de 40x. Os cálculos seguiram conforme estabelecido no protocolo do laboratório (descrito no item 9.5):

	<b>Fórmulas</b>
<b>Concentração de células viáveis/mL</b>	$\frac{\text{Número Total de células viáveis (A+B+C+D)}}{4 \text{ (número de quadCCL5 contados)}} \times 10^4 \text{ (Fator de correção)} \times 10 \text{ (Fator de Diluição)}$
<b>Número total de células viáveis</b>	Concentração de células viáveis/mL x 10 (volume da suspensão de células)
<b>Porcentagem de viabilidade celular</b>	$\frac{\text{Número total de célula viáveis} \times 100}{\text{(Número total de células viáveis + Número total de células mortas)}}$
<b>Volume da solução de congelamento (mL)</b>	$\frac{\text{Número total de células viáveis}}{5 \times 10^6}$

#### **Quadro 1- Fórmulas utilizadas para isolamento de PBMCs.**

Para o congelamento das células, foi preparada uma solução específica com 90% Soro Fetal Bovino – SBF (*Gibco*® - *Thermo Scientific*™) e 10% Dimetilsulfóxido – DMSO. Em

seguida, conforme o volume definido pelo cálculo acima (concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL) as células foram ressuspensas em solução de congelamento e colocadas em tubos criogênico (*Corning*®) dentro do *Mr. Frosty*<sup>TM</sup> *Freezing Container* (*Thermo Scientific*<sup>TM</sup>) e armazenadas em freezer de -80 °C por 24 horas, em seguida, os tubos foram transferidos para as caixas destinadas ao projeto no freezer -80 °C. Todas as amostras congeladas estavam com viabilidade celular igual ou acima de 90% e seguiram de acordo com o protocolo estabelecido pelo laboratório (106).

### 3.7.2 Descongelamento de PBMCs

O descongelamento das alíquotas foi gradativo sem interferências e lavagens foram realizadas com meio *Roswell Park Memorial Institute - RPMI 1640 Medium* (*Gibco*® - *Thermo Scientific*<sup>TM</sup>) e FBS a 10% em temperatura de 37 °C e centrifugação em 1500 rpm por 10 minutos com o objetivo de retirar o DMSO (106).

Após o descongelamento, a contagem foi realizada através da coloração de *Trypan Blue* na câmara de Neubauer, a leitura foi em microscópio de luz em objetiva de 40x. As alíquotas com viabilidade acima de 85% seguiram para o cultivo celular.

### 3.8 Cultivo Celular

Para o cultivo foram utilizadas  $0,5 \times 10^6$  células por poço. Em uma placa de 96 poços de fundo em U (*Corning*®), as células foram adicionadas na presença de Brefeldina A (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) em concentração final de 10 ug/mL e Ionomicina (*Sigma-Aldrich*®) em concentração de 1 ug/mL. Cada poço era destinado para um estímulo: controle negativo (CN), Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), Glutathione S-transferase (GST) e Proteína 1 de superfície de merozoíto (PvMSP-1<sub>19</sub>) em fusão com GST, o meio RPMI com 10% de SBF foi usado para completar o volume final de 200uL por poço. O PMA foi utilizado como controle positivo em concentração final de 25 ng/mL, a GST como controle para ligação não específica em 10 ug/mL e a proteína PvMSP-1<sub>19</sub> com GST (GST-PvMSP-1<sub>19</sub>) como antígeno específico para *Plasmodium* a 20 ug/mL, conforme descrito em outros estudos (108–110). As condições foram mantidas em cultivo rápido por 24 horas em estufa úmida a 37 °C rica em CO<sub>2</sub> 5%.

Obteve-se em média 90,5% de células vivas em todos os diferentes estímulos após cultivo de 24 horas. Em seguida, foi utilizada a solução de EDTA (20 mM) para interromper a reação celular frente aos estímulos e iniciar a imunofenotipagem das células.

### 3.8.1 Controle de qualidade do antígeno (PvMSP-1<sub>19</sub>) usado como estímulo para cultivo celular

A proteína PvMSP-1<sub>19</sub> em fusão com GST e GST foram adquiridas em colaboração com o departamento de parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (USP-SP). Foi produzida conforme descrito nestes estudos (108,109). Para controle de qualidade do antígeno devido o percurso de transporte, foi realizado teste de imunoenensaio usando a técnica de ELISA a fim de confirmar a integridade e funcionalidade da proteína. As concentrações utilizadas para o cultivo foram definidas através da resposta metabólica com o corante resazurina e leitura no GloMax®. As figuras estão anexadas no item 9.1.

### 3.9 Imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 de memória com marcação de superfície e intracelular

Para identificação da população de linfócitos T auxiliares e da população TCD4+ produtora de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e CD45RO, foram utilizados os anticorpos monoclonais, anti-humano da BD: anti-CD3, anti-CD4, anti-IFN- $\gamma$  e anti-CD45RO. E para os linfócitos T citotóxicos e da população TCD8+ produtora de RANTES, IFN- $\gamma$  e CD45RO, foram utilizados os anticorpos monoclonais, anti-humano da BD: anti-CD3, anti-CD8, anti-CCL5, anti-IFN- $\gamma$  e anti-CD45RO. Os anticorpos utilizados estão descritos no quadro 2.

Fluoróforo:	FITC	PE	PERCP	PECy7	APC	APC-H7
Anticorpos:	Anti-CD3	Anti-CCL5	Anti-CD4	Anti-IFN- $\gamma$	Anti-CD45-RO	Anti-CD8
População de célula detectada:	Todos os linfócitos T	Expressão de CCL5	Células T auxiliares	Expressão de Interferon-gama	Células de memória	Células T citotóxicas

**Quadro 2- Anticorpos monoclonais.** Painel com anticorpos e o fluoróforo utilizado para caracterização fenotípica das populações de células do sangue periférico.

Após interromper a ação dos estímulos no cultivo celular, as células foram colocadas em tubos de citometria para retirada da solução de EDTA e foi realizada a lavagem com PBS-W (0,5% Albumina e 0,02% de azida sódica) por centrifugação a 10 minutos a 1500 rpm em temperatura de 20 °C. Após, obteve-se um pellet celular sendo realizada a marcação de superfície com anticorpos monoclonais e incubação por 30 minutos ao abrigo de luz. Em seguida, a lise dos eritrócitos ocorreu por homogeneização no vórtex usando 1 mL de solução de lise [0,285 g/L Citrato de Sódio, 5,4 mL/L de Formaldeído P.A., 3 mL/L de Dietileno Glicol P.A., 80 µL/L de Heparina comercial(5000UI/mL)] as células foram incubadas por 10 minutos e as lavagens foram realizadas com PBS-W.

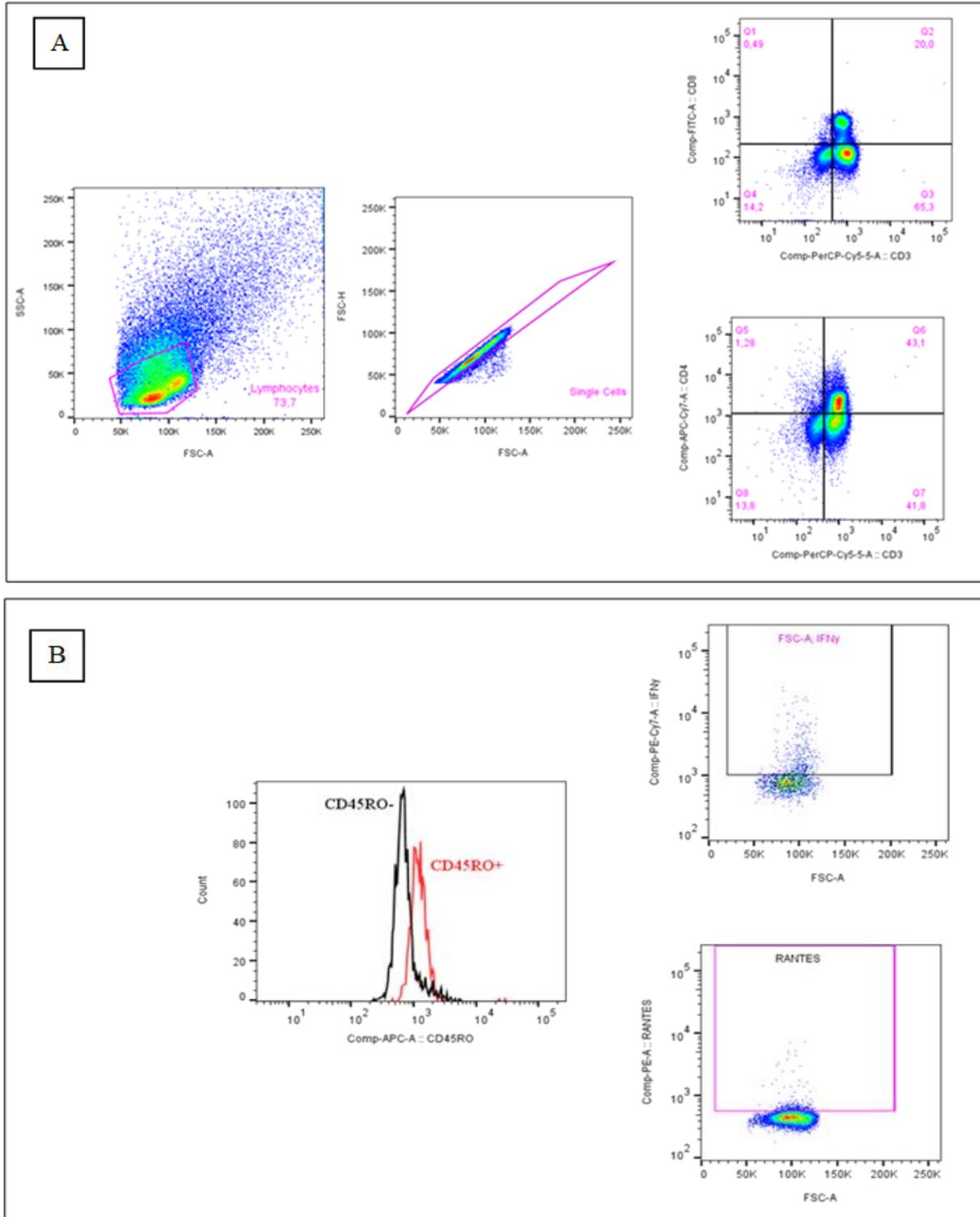
### 3.9.1 Permeabilização e marcação de CCL5 e Interferon-gama

Para marcações intracelulares as células passaram pela etapa de permeabilização com solução PBS-P (0,5% Albumina 0,5% Saponina) por 10 minutos, após esse tempo foi realizado a centrifugação a 1500 rpm em temperatura de 20 °C, uma lavagem com PBS-P e outra com PBS-W. Em seguida, as amostras já marcadas com anticorpos de superfície foram marcadas durante 30 minutos ao abrigo de luz com os anticorpos anti-CCL5 intracitoplasmática e anti-IFN- $\gamma$ . Por fim, foi realizada a última lavagem e ressuspensão com 100uL de PBS-W para leitura no citometro de fluxo.

### 3.9.2 Leitura e análise das marcações

Após o término das marcações as amostras seguiram para análise, a aquisição de 100.000 eventos foi realizada no equipamento FACSCanto®II. Os resultados foram analisados no software FlowJo, pela plataforma de citometria de fluxo da FIOCRUZ.

Para a análise, em gráfico de tamanho (FSC – *forward scatter*) por granulosidade (SSC – *side scatter*), delimitou-se por um *gate* a população que possuía estes parâmetros característicos de linfócitos. Analisou-se a população de interesse CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, dentro dessas populações definiu-se por histograma a população de CD45RO<sup>+</sup> e as células que expressaram CCL5 e IFN- $\gamma$ . Verificou-se a média de intensidade de fluorescência (MIF) e a porcentagem das células (**Figura 5**).



**Figura 5 - Análise citométrica da imunofenotipagem de PBMC de 13 pacientes do estudo. (A) – Determinação do *gate* de linfócitos definido por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), determinação de *single cells* por FSC-H e FSC-A e classificação das populações de linfócitos T CD4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) e T CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). (B) – Determinação das populações de memória (CD45RO<sup>+</sup>) nos linfócitos T. Análise da expressão de IFN- $\gamma$  e CCL5/RANTES nos linfócitos T.**

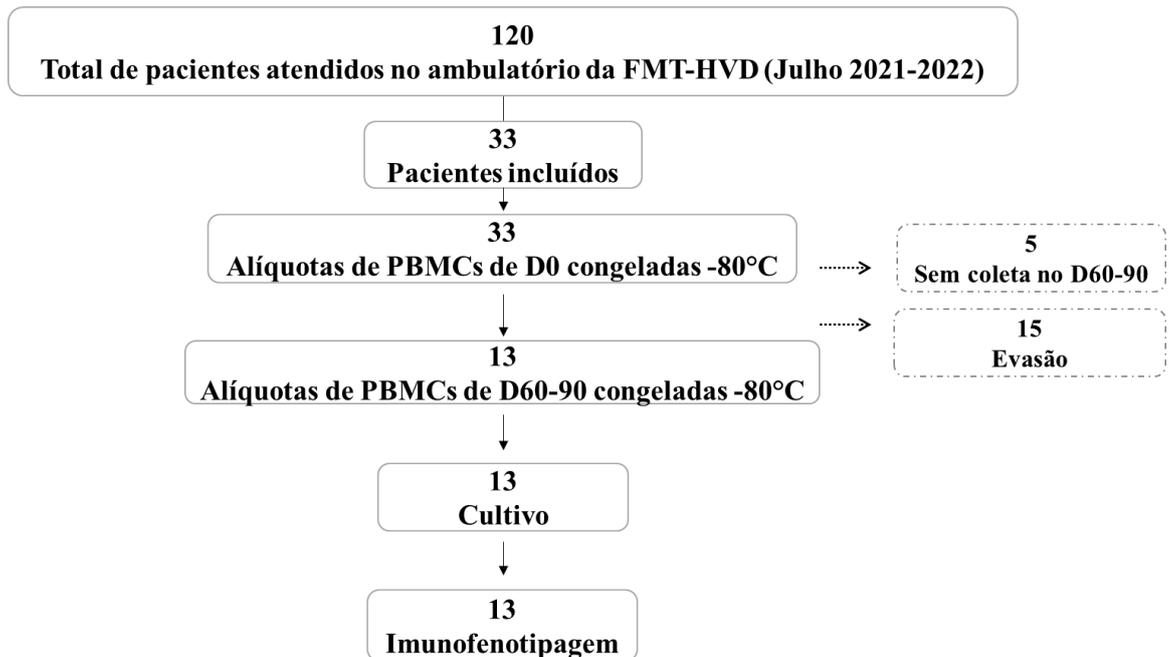
### 3.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Stata (versão 13.0). Inicialmente, foram realizados testes para verificar a distribuição das variáveis pelo teste Shapiro-Wilk e diagrama de dispersão para as correlações. A partir dessa informação foi usado o teste paramétrico teste t student e para análise de duas variáveis numéricas utilizamos o teste de Mann-Whitney não paramétrico. As análises de correlação foram realizadas usando o GraphPad Prism (versão 9.0.2) e teste de Spearman. A matriz de correlação foi construída utilizando o GraphPad Prism e Excel. Os níveis de significância das variáveis e as correlações positivas e negativas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . A partir das análises de correlação, verificou-se quais correlações eram positivas (próximo de 1.0) ou negativas (próximo de -1.0) apenas para células estimuladas por antígeno específico de PvMSP-1<sub>19</sub>. Em seguida, analisamos as correlações das células estimuladas com GST, utilizada como controle de reações não específicas e excluimos as variáveis que se repetiam em PvMSP-1<sub>19</sub> e GST. Em seguida, identificamos qual o maior número de correlações significativas e com tendência significativa para o antígeno de interesse (PvMSP-1<sub>19</sub>).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes

Na FMT-HVD, entre julho/2021 e julho/2022 foram atendidos 120 pacientes. Destes, 33 participantes com malária por *P. vivax* foram incluídos pelos critérios de elegibilidade e 13 amostras foram cultivadas e imunofenotipadas (**Figura 6**).



**Figura 6 - Fluxograma da inclusão dos participantes.** Destino das amostras coletadas e seu devido processamento.

A média da idade dos participantes foi de 11 anos, sendo, 76,9% do sexo masculino e 23,1% do sexo feminino. Desses, 7 (53,8%) foram diagnosticados com a primeira infecção por *P. vivax* e 6 (46,1%) tiveram outros episódios de malária. A mediana de densidade parasitária encontrada foi de 3584 parasitas/mm<sup>3</sup> (**Tabela 1**).

<b>(N=13)</b>	
<b>Idade</b>	
Média ± DP	11.0 ± 2.96
<b>Gênero (%)</b>	
Masculino	10 (76.92)
Feminino	3 (23.08)
<b>Dias de sintomas</b>	
Mediana (IC 95%)	5 (4-7)
<b>Primoinfecção (%)</b>	
Sim	7 (53.85)
Não	6 (46.15)
<b>Densidade Parasitária</b>	
Mediana (IC 95%)	3584 (2550-6077)

**Tabela 1- Características clínicas dos pacientes no dia do diagnóstico.** DP= Desvio padrão; IC= Intervalo de confiança

#### 4.2 Parâmetros clínicos dos participantes

Com relação à análise dos parâmetros hematológicos, comparamos o resultado da fase aguda (D0) e de convalescença, após infecção (D60-90). Observamos diferença significativa quanto aos níveis de hemoglobina ( $P = 0,02$ ) e identificamos que os níveis de hemoglobina na fase aguda estavam reduzidos. No período de convalescença, os valores voltaram ao normal e estavam conforme o padrão de referência.

O valor médio dos eritrócitos reduzido na fase aguda em relação à convalescença. O hematócrito acompanhou os valores da hemoglobina, valor médio reduzido e próximo ao limiar inferior e uma recuperação na convalescença ( $P < 0,01$ ). Em relação aos índices hematimétricos de volume e quantidade de hemoglobina intraeritrocítica não houve diferenças significativas.

Foi observado diferença estatística na quantidade de leucócitos ( $P \leq 0,01$ ) e monócitos ( $P \leq 0,02$ ), porém ambos os valores estavam conforme os padrões normais de referência. Todos os outros parâmetros leucocitários foram considerados normais e não significativos.

Os indivíduos infectados apresentaram plaquetopenia acentuada com recuperação pós-infecção ( $P \leq 0,01$ ) e observamos um aumento no volume plaquetário médio (VPM) em relação à análise no D60 a 90 ( $P \leq 0,01$ ) (Tabela 2).

	<b>Paciente (D0) Média ± DP</b>	<b>Paciente (D60-90) Média ± DP</b>	<b>Valor do p*</b>	<b>Referência</b>
<b>Eritrócitos</b>	4.23 ± 0.65	4.83 ± 0.41	<b>0.009*</b>	4.2 – 5.5 milhões/mm <sup>3</sup>
<b>Hematócrito</b>	35.31 ± 1.67	40.25 ± 0.73	<b>0.012*</b>	36 – 47 %
<b>Hemoglobina</b>	11.43 ± 1.61	12.70 ± 0.97	<b>0.021*</b>	12.5 – 15.5 g/dL
<b>VCM (IC 95%)</b>	84.10 (83.3-86)	83.60 (81.2-86.3)	0.590	80 - 100 fL
<b>HCM</b>	26.12 ± 1.79	25.88 ± 1.82	0.740	27.0 – 32.0 pg
<b>CHCM</b>	31.01 ± 1.93	31.40 ± 1.26	0.546	32.0 – 36.0 g/dL
<b>RDW (IC 95%)</b>	13.30 (12.80-13.80)	12.60 (12-13)	<b>0.012*</b>	10 – 15 %
<b>Leucócitos</b>	4865.3 ± 1376.1	7534.1 ± 1495.0	<b>0.001*</b>	4 000 – 10000 mm <sup>3</sup>
<b>Linfócitos</b>	27.26 ± 12.13	34.26 ± 6.87	0.082	25 – 40 %
<b>Monócitos</b>	11.01 ± 4.91	7.68 ± 1.34	<b>0.026*</b>	2 – 10 %
<b>Neutrófilos</b>	62.49 ± 12.7	55.23 ± 10.5	0.126	40- 70 %
<b>Plaquetas (IC 95%)</b>	65000 (46000-95000)	258800 (220000-305000)	<b>0.001*</b>	150-450/mm <sup>3</sup>
<b>VPM (IC 95%)</b>	12.8 (10-11)	9 (8.7-9.3)	<b>0.001*</b>	7.4 – 10.4 fL

**Tabela 2- Comparação da análise de parâmetros hematológicos dos pacientes no D0 e D60-90.** Valores de média e desvio padrão para comparação entre o grupo D0 e grupo após 60 a 90 dias de infecção, utilizou-se o Test-t de student. Para VCM, RDW, Plaquetas e VPM utilizou-se mediana e intervalo interquartil e para comparação o teste de Mann-Whitney. Consideramos o valor significativo  $P < 0,05^*$ . VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média), CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média), RDW (Red Cell Distribution Width), VPM (Volume médio plaquetário).

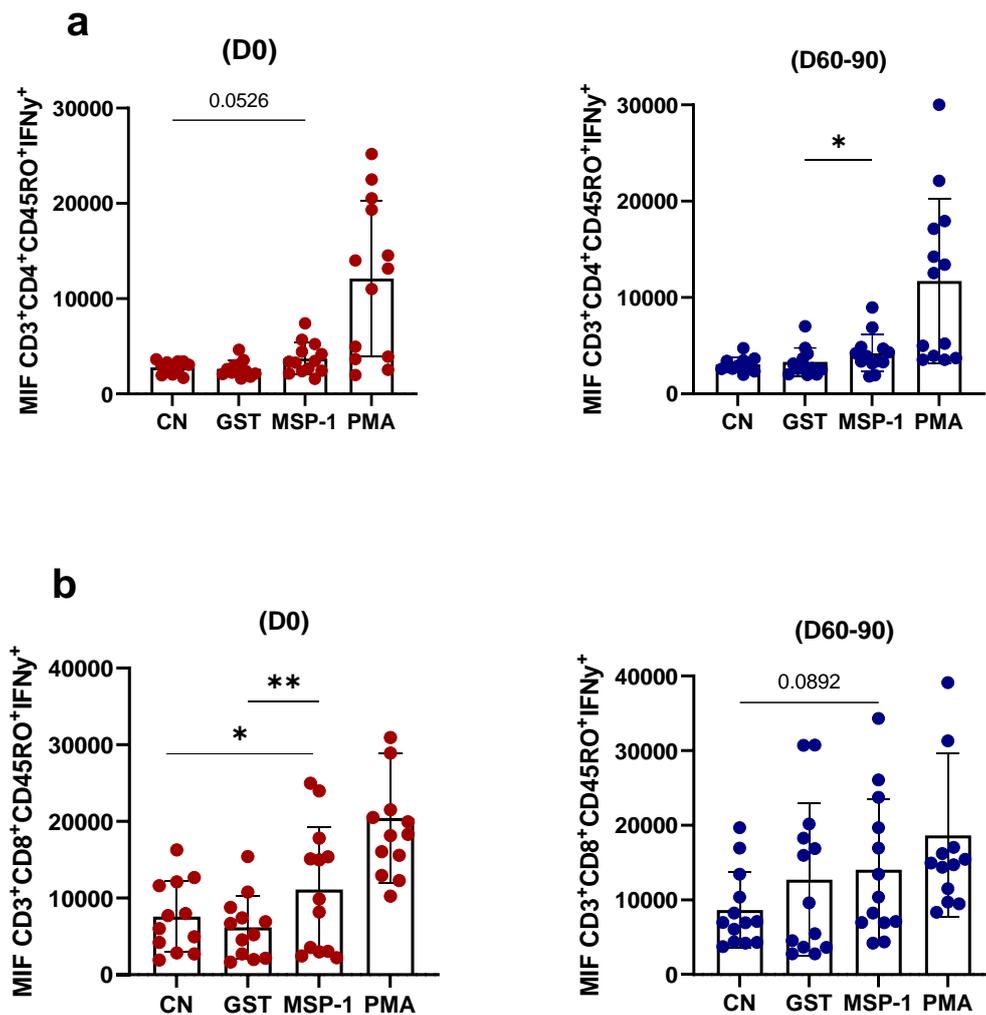
Em relação à anemia, verificamos que no dia do diagnóstico 53,85% pacientes estavam anêmicos e 46,15% não eram anêmicos. Além disso, 84,62% dos pacientes estavam com plaquetopenia e 15,38% estavam com a quantidade de plaquetas > 150.000/uL.

### **4.3 Análise da imunofenotipagem por citometria de fluxo**

A viabilidade das células foi observada e antes do congelamento das amostras, a média de viabilidade foi de 90,8% e ao descongelar, obtivemos 85,0% de células vivas. Essas células foram cultivadas e após 24 horas de cultivo, realizou-se a contagem celular e verificou-se que a média de viabilidade foi de 90,5%.

#### **4.3.1 Avaliação da resposta de subpopulações de linfócitos T a PvMSP-119**

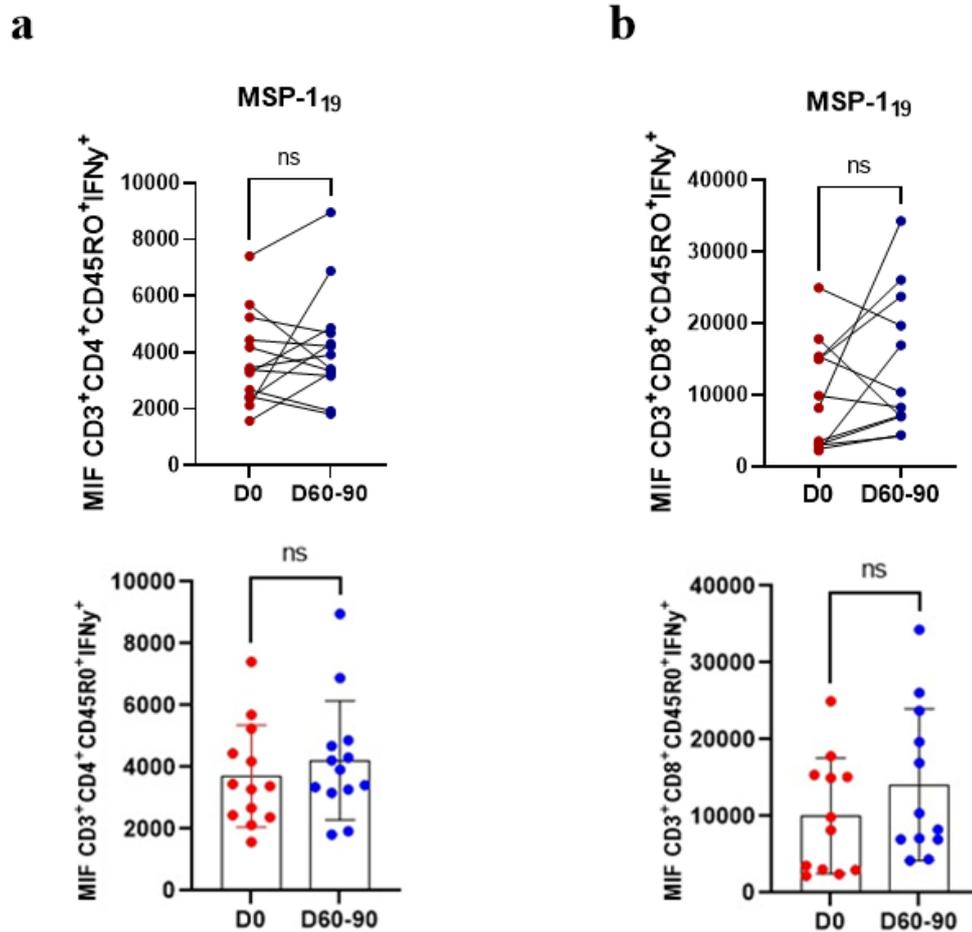
Para verificar a expressão de IFN- $\gamma$  e CCL5 nas subpopulações de linfócitos T foi realizada a análise pareada da expressão desses mediadores imunológicos em PBMC estimulados por 24 horas com GST, GST-PvMSP-119 e PMA entre os grupos D0 e D60-90 (**Figura 7**).



**Figura 7 - Análise da expressão de IFN- $\gamma$  intracelular em subpopulações de linfócitos T de memória frente a diferentes estímulos. (a)** Média de intensidade de fluorescência de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD4 de memória em crianças com malária por *P. vivax* aguda (D0) e média de intensidade de fluorescência de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD4 de memória em crianças curada de malária por *P. vivax* (D60-90). **(b)** Média de intensidade de fluorescência de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD8 de memória em crianças com malária por *P. vivax* aguda (D0) e média de intensidade de fluorescência de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD8 de memória em crianças curada de malária por *P. vivax* (D60-90). O ``\*`` é usado para identificar os resultados com significâncias estatísticas (Teste t pareado) entre os diferentes estímulos ( $P < 0,05$ ). CN- Controle negativo, GST - glutationa-S-transferase, GST-PvMSP-1<sub>19</sub>- Proteína de superfície de merozoíto-1 com GST, PMA -Phorbol-12-myristate-13-acetate.

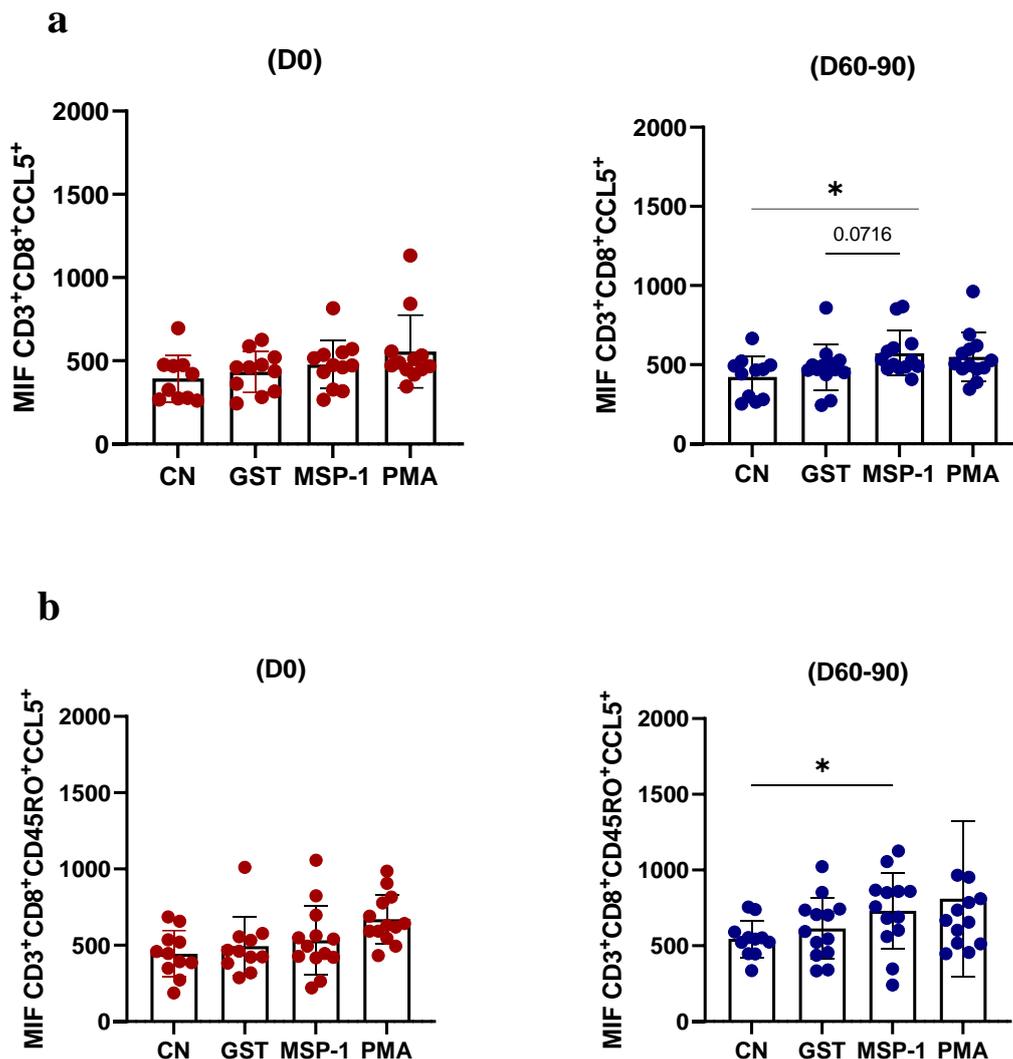
Foi demonstrado um aumento da expressão de IFN- $\gamma$  na fase aguda ( $P = 0,052$ ) em populações T CD4 de memória frente ao antígeno PvMSP-1<sub>19</sub>, enquanto no D60-90 foi possível observar um aumento significativo dessa citocina nas mesmas condições de estímulo. Por outro lado, as populações linfócitos T CD8 de memória apresentaram no D0 um aumento significativo de IFN- $\gamma$  o que não foi observado no D60-90.

Foi realizada uma análise da expressão de IFN- $\gamma$  nas populações de memória de linfócitos T CD4 e T CD8 de cada indivíduo entre o D0 e D60-90. Não houve diferenças estatísticas significantes (**Figura 8**).



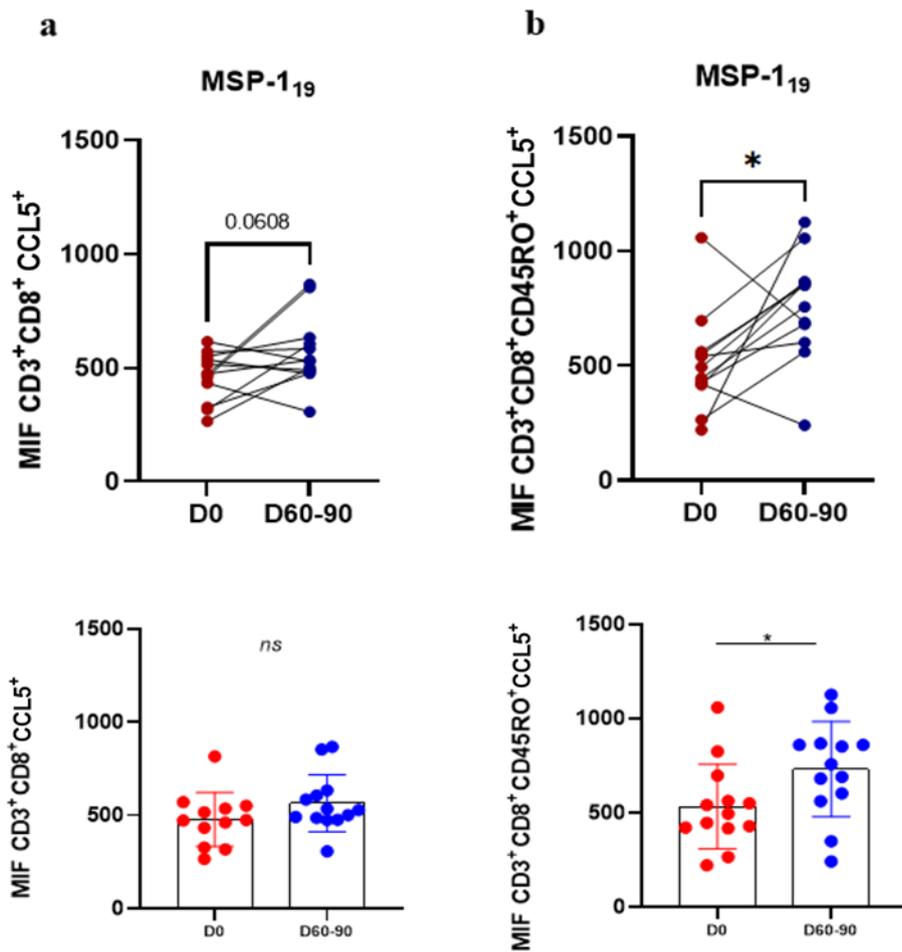
**Figura 8 - Comparação da resposta de IFN- $\gamma$  em linfócitos T de memória por indivíduo na fase aguda e na convalescência.** Análise da expressão de IFN- $\gamma$  foi pareada em subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 de memória estimulados com a proteína PvMSP-1<sub>19</sub> no D0 e D60-90. **(a)** Análise pareada da Média de intensidade de fluorescência de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD4 de memória no D0 e D60-90. **(b)** Análise pareada da Média de intensidade de fluorescência de IFN- $\gamma$  em linfócitos T CD8 de memória no D0 e D60-90.

Nossos resultados demonstraram que no grupo D60-90 houve um aumento da expressão de CCL5 nas células quando estimuladas com a proteína PvMSP-1<sub>19</sub> tanto em populações de linfócitos T CD8 totais quanto os de memória (**Figura 9**).



**Figura 9 - Análise da expressão de CCL5 intracelular em subpopulações de linfócitos T CD8 totais e de memória frente a diferentes estímulos.** (a) Média de intensidade de fluorescência de CCL5 em linfócitos T CD8 Totais em crianças com malária por *P. vivax* aguda (D0) e média de intensidade de fluorescência de CCL5 em linfócitos T CD8 Totais em crianças curada de malária por *P. vivax* (D60-90). (b) Média de intensidade de fluorescência de CCL5 em linfócitos T CD8 de memória em crianças com malária por *P. vivax* aguda (D0) e média de intensidade de fluorescência de CCL5 em linfócitos T CD8 de memória em crianças curada de malária por *P. vivax* (D60-90). O "\*" foi usado para identificar os resultados com significâncias estatísticas (Teste t pareado) entre os diferentes estímulos ( $P < 0,05$ ). CN- Controle negativo GST - glutathione-S-transferase, GST-PvMSP-1<sub>19</sub> Proteína de superfície de merozoíto-1, PMA -Phorbol-12-myristate-13-acetate.

A expressão de CCL5 foi verificada individualmente e pareado na fase aguda e convalescença. Ficou evidenciado um aumento da expressão de CCL5 por linfócitos T CD8 totais ( $P=0,060$ ) e um aumento significativo entre os linfócitos T CD8 de memória ( $P < 0,05$ ) (Figura 10).

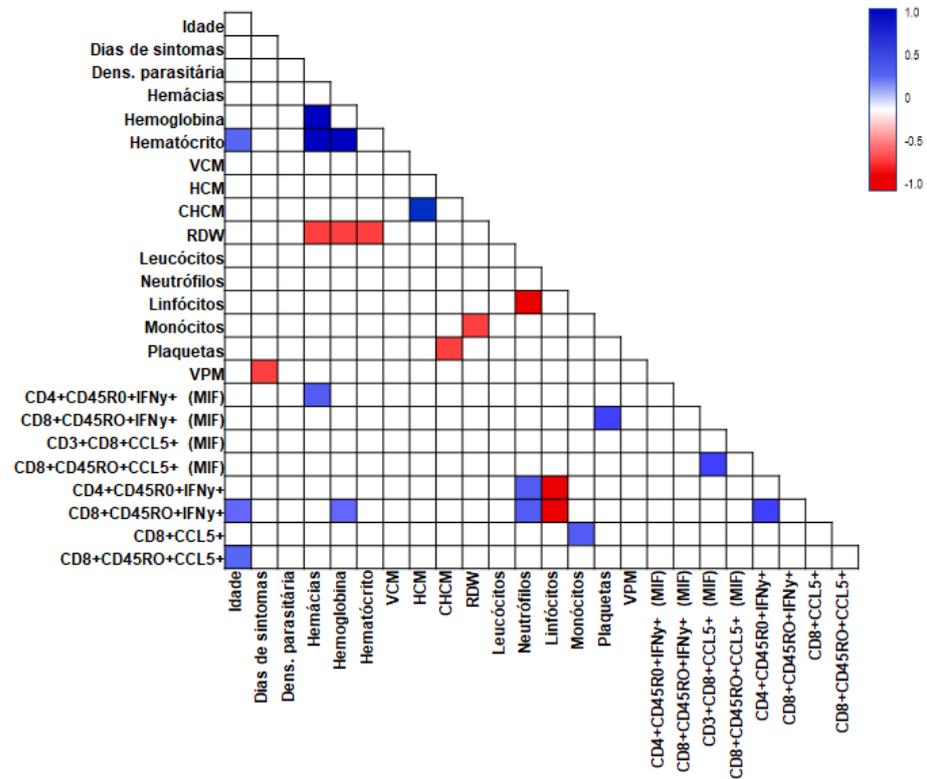


**Figura 10 - Análise pareada da expressão de CCL5 intracelular em subpopulações de linfócitos T CD8 Totais e de memória estimulados com a proteína PvMSP-1 entre os D0 e D60-90. (a) Análise pareada da Média de intensidade de fluorescência de CCL5 em linfócitos T CD8 Totais entre os D0 e D60-90. (b) Análise pareada da Média de intensidade de fluorescência de CCL5 em linfócitos T CD8 de memória entre os D0 e D60-90. O ``\*`` foi usado para identificar os resultados com significâncias estatísticas (Teste t pareado) entre os diferentes estímulos ( $P < 0,05$ ).**

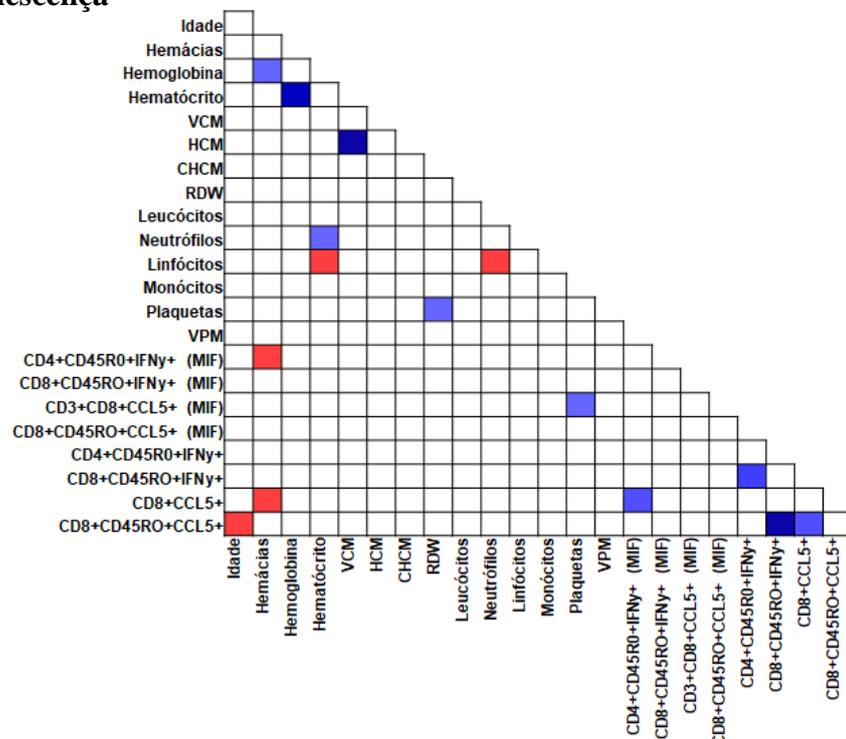
#### 4.4 Correlação da resposta das subpopulações de linfócitos com marcadores clínicos associados a malária

Após a caracterização imunofenotípica, realizou-se a análise de correlações entre as variáveis clínicas e citométricas de estudo e observamos subpopulações de linfócitos T que expressaram CD45RO<sup>+</sup>, CCL5<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$  apresentavam relação com marcadores clínicos dos pacientes infectados com malária por *P. vivax* (Figura 11).

## a) Fase aguda



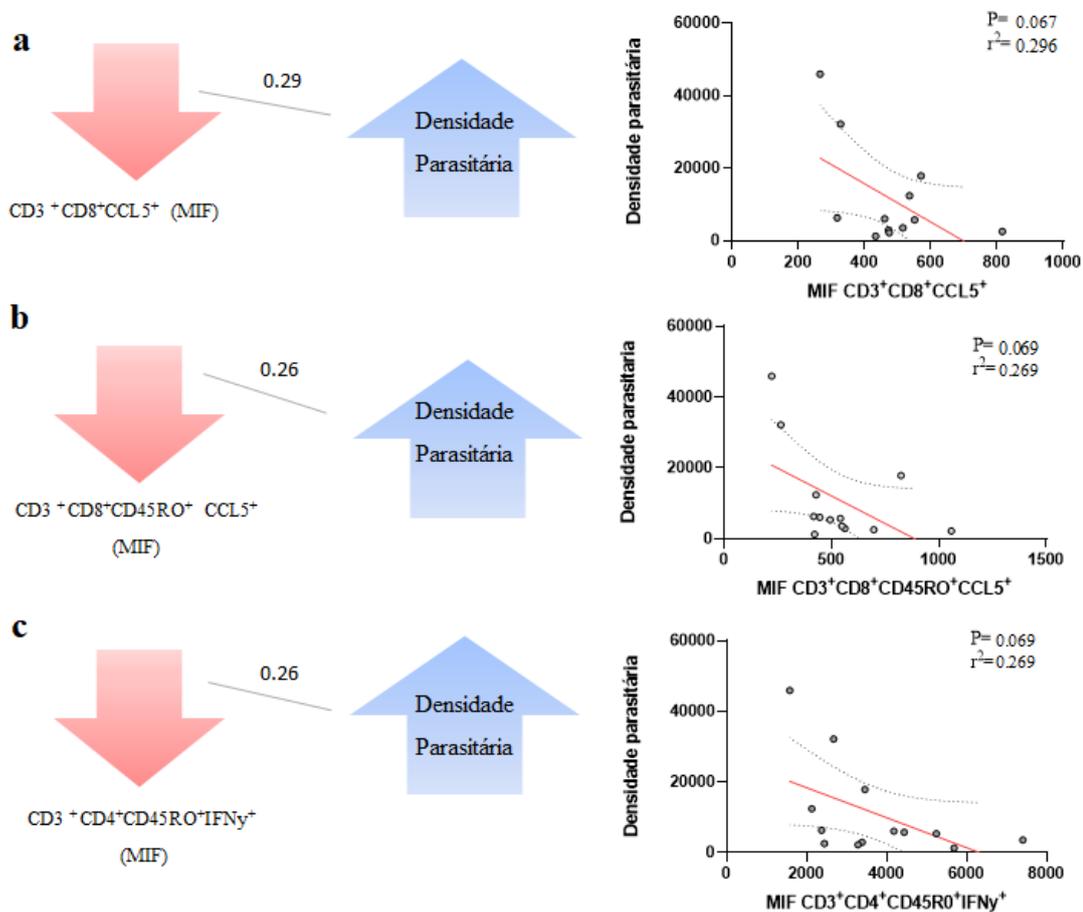
## b) Fase de convalescença



**Figura 11 - Matriz de correlação geral dos pacientes com malária por *P. vivax*. (a) Análise de correlação entre as variáveis clínicas e citométricas no D0. (b) Análise de correlação entre as variáveis clínicas e citométricas no D60-90. A escala visual por intensidade de cores varia de 1 a -1 conforme o valor de correlação. Em azul estão as correlações positivas e em vermelho as negativas. As análises foram realizadas utilizando o teste estatístico de Spearman.**

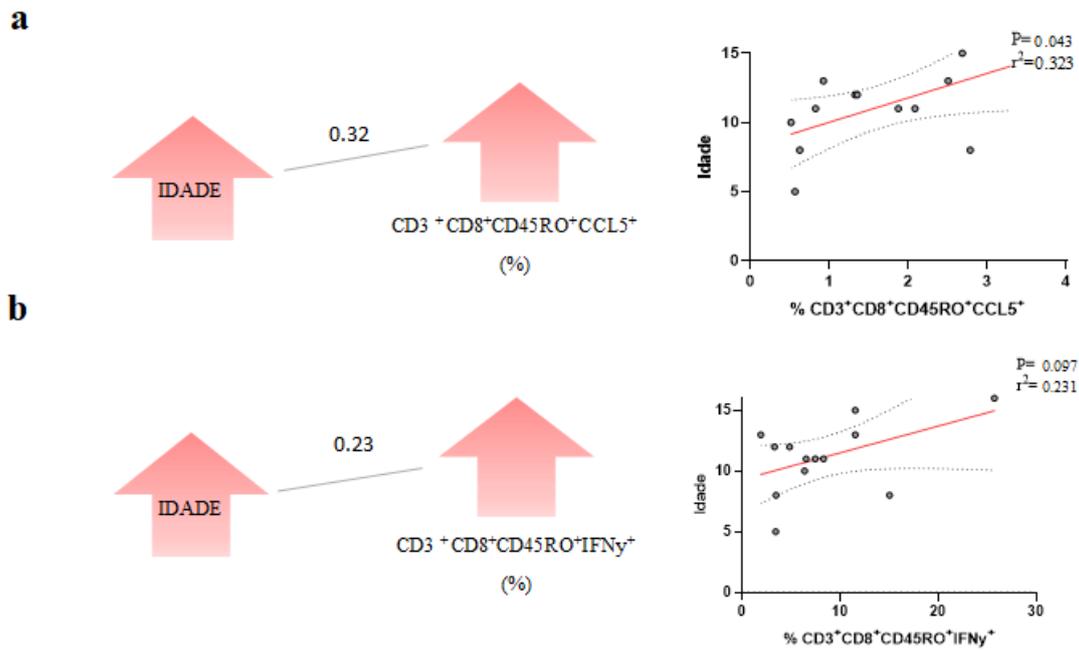
#### 4.5 Sumario das correlações relevantes entre fatores clínicos e resposta celular ao antígeno MSP-119.

Na fase aguda, foram realizadas correlações entre densidade parasitária, idade, hemoglobina e hemácias com as respostas de linfócitos T CD4 e T CD8. Em relação à densidade parasitária (**Figura 12**) foram observadas correlações inversamente proporcionais entre a expressão de CCL5 por linfócitos T CD8 ( $P=0,069$ ), linfócitos T CD8 totais ( $P=0,067$ ) e a expressão de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4 de memória ( $P=0,069$ ).



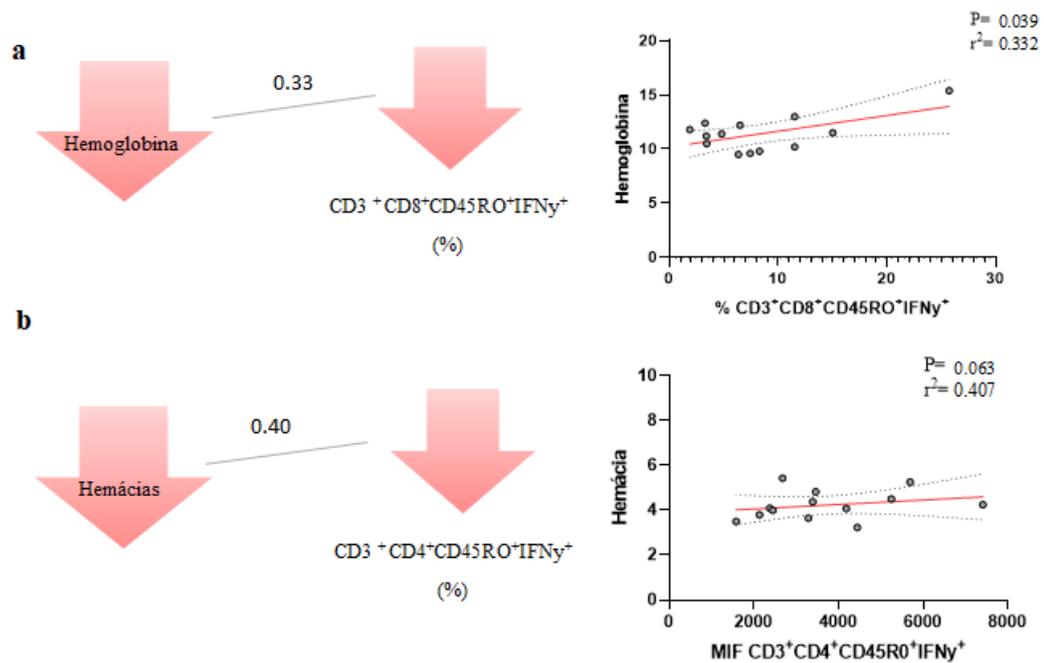
**Figura 12 - Correlação da resposta celular de linfócitos T CD4 e T CD8 de memória e densidade parasitária na fase aguda.** Os valores de média de intensidade de fluorescência da expressão de CCL5 e IFN- $\gamma$  foram comparados com a densidade parasitária dos 13 participantes do estudo durante a fase aguda.

Com relação a idade, foram observadas correlações diretamente proporcionais significantes entre as produções de CCL5 por linfócitos T CD8 ( $P=0,043$ ), e uma tendência notável na expressão de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4 de memória ( $P=0,097$ ) (**Figura 13**).



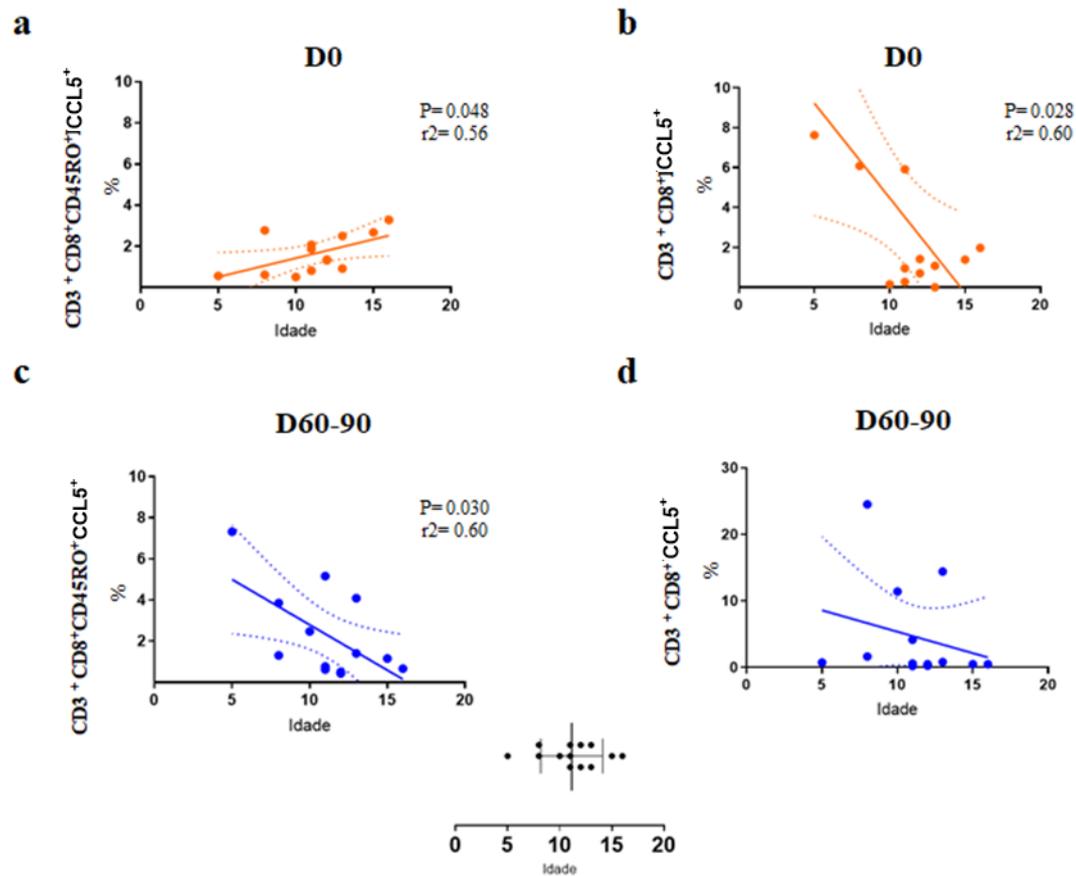
**Figura 13 - Correlações entre linfócitos T de memória produtores de CCL5 e IFN- $\gamma$  com a idade dos 13 participantes do estudo no D0.** Os valores de média de intensidade de fluorescência de expressão de CCL5 e IFN- $\gamma$  foram comparados com a idade dos 13 participantes do estudo durante a fase aguda.

Nossos resultados demonstraram que a quantidade de hemoglobina (Hb) e hemácias possuiu correlações diretamente proporcionais significantes com a quantidade de expressão de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD8 de memória ( $P=0,039$ ), e uma expressão de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4 de memória ( $P=0,063$ ), respectivamente (**Figura 14**).



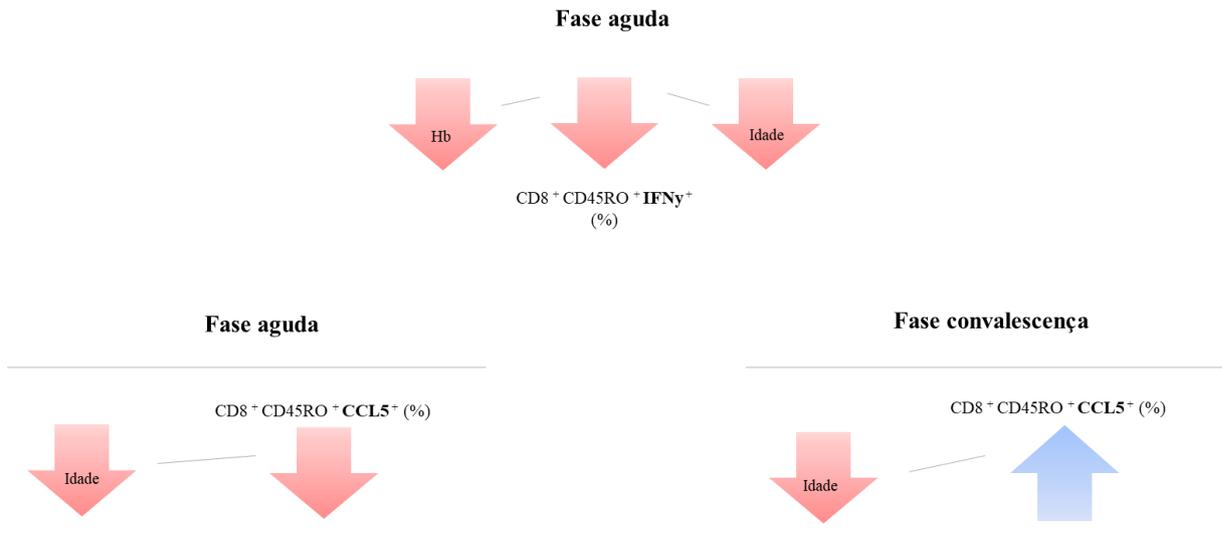
**Figura 14 - Correlações entre linfócitos T de memória produtor de IFN- $\gamma$  com hemoglobina e hemácias dos 13 participantes do estudo no D0.** Os valores em porcentagem da expressão de IFN- $\gamma$  foram comparados com os níveis hemoglobina e hemácias dos 13 participantes do estudo no D0.

No D60-90, foi observado que quanto mais jovens eram as crianças, mais células T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> expressavam CCL5 (P < 0,02). Avaliamos a resposta imunológica modificada nesse segundo contato, e encontramos um aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que expressam CCL5, T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> expressor de CCL5 e T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (**Figura 15**).



**Figura 15 - Correlações com a idade e quantidade de células que expressam CCL5.** a) Correlação positiva entre células T CD8 de memória produtor de CCL5 com a idade na fase aguda. b) Correlação negativa de células T CD8 produtor de CCL5 na fase aguda com a idade. c) Correlação negativa entre linfócito T CD8 de memória produtor de CCL5 com a idade na fase convalescença. d) Correlação negativa entre linfócito T CD8 produtor de CCL5 e idade na fase convalescença. Resultados com significâncias estatísticas  $P < 0,05$ .

Em resumo, os dados foram agrupados para melhor caracterização das correlações, ao qual foi possível evidenciar que quando comparamos os resultados do D0 e D60-90 algumas mudanças fenotípicas puderam ser evidenciadas, como exemplo, observamos que a idade foi o indicador clínico que manteve correlação com a porcentagem de linfócitos T CD8 de memória que expressa CCL5 e no D0 crianças com mais idade possuíam maior prevalência de linfócitos T CD8 memória que expressam CCL5 (**Figura 16**).



**Figura 16 - Esquema do resumo das correlações.** Principais correlações na fase aguda e convalescência.

## 5 DISCUSSÃO

Relatos de malária grave em crianças tem sido reportado em vários lugares do mundo, alguns autores relatam que a idade pode ser um fator agravante para o desenvolvimento de formas graves da doença (111,112). O *P. vivax* é um importante fator de risco para anemia grave em crianças pequenas em áreas endêmicas. Por ter preferência aos reticulócitos, essa propriedade parece limitar sua capacidade reprodutiva, ao ponto que a parasitemia na malária por *P. vivax* raramente excedem 2% das hemácias circulantes e altas cargas parasitárias não são uma característica da doença grave. Essa baixa biomassa parasitária indica que a anemia grave não resulta apenas da destruição de hemácias infectadas, mas por outros fatores, tais como citocinas (113–115). De um lado, o IFN- $\gamma$ , com seu papel reconhecidamente importante no controle da parasitemia, do outro, o CCL5 na malária por *P. vivax* tem uma relação direta com um receptor de eritrócitos envolvido na invasão do parasita (14,16,104). O presente estudo avaliou a importância de ambas na relação parasita-hospedeiro em crianças na fase aguda de malária e na convalescença. Os dados reforçaram a relação de CCL5 e linfócitos T CD8<sup>+</sup> na parasitemia e possível relação na fisiopatologia da anemia na *vivax*.

Seguindo esse contexto, o nosso estudo buscou avaliar a resposta celular de T CD4 e T CD8 contra um antígeno de superfície de merozoíto que fosse imunodominante e conservado. Apesar da proteína PvMSP-1<sub>19</sub> não ser a única reconhecida pelo sistema imunológico e o estudo avaliar a reação frente a uma proteína pequena do merozoíto e não contra o parasito de *P. vivax* nossos resultados mostraram que o IFN- $\gamma$  tem relação com os níveis de hemoglobina, sugerindo sua importante participação na proteção a anemia e uma possível relação direta do CCL5 com um receptor de eritrócitos envolvido na invasão do parasita na malária por *P. vivax*. Uma associação inversa entre a média de intensidade de fluorescência das células T CD8 que expressam CCL5 com a densidade parasitaria, foi semelhante ao encontrado no estudo de CCL5 dosado a nível sérico (14,16,116–119).

Apesar da conhecida vulnerabilidade da população estudada, não houve alterações hematológicas relevantes, apenas indicativos como plaquetopenia e diminuição dos níveis de hemoglobina. Esses resultados podem ter relação com área geográfica e pela espécie do parasita, e por ser uma região de baixa endemicidade com predomínio de malária por *P. vivax*, diferente de áreas holoendêmicas africanas e no sudoeste asiático (120,121). Os resultados

encontrados em relação aos parâmetros hematológicos não diferem de estudos em crianças e adultos com malária por *P. vivax*, isto pode ser devido à terapia efetiva (115,122–124).

Em nossos resultados não foi possível incluir crianças menores, porém observamos que quanto menor a idade dos participantes, menor a porcentagem de células que expressam CCL5 em linfócitos T CD8 de memória. Esses achados estão em acordo com um estudo que verificou a associação dos baixos níveis séricos de CCL5 com a anemia e contagem de plaquetas em crianças com malária cerebral (118). Além disso, estudos mostraram que o *P. vivax* é prevalente em crianças menores de 5 anos e indivíduos infectados na primeira infância possuem maior probabilidade de hospitalização, evolução para doença grave e morte (43,125).

Ao compararmos na fase aguda, foi observado uma correlação positiva entre a porcentagem de linfócitos T CD8 de memória expressores de IFN- $\gamma$  e os níveis de hemoglobina, sugerindo um possível cenário imunológico associado a anemia na malária por *P. vivax*. O IFN- $\gamma$  é produzido por linfócitos NK, linfócitos T CD4 e CD8 e linfócitos regulatórios do tipo receptor T- $\gamma\delta$  durante as fases iniciais da resposta imune a uma infecção por malária (57,71,126,127). Na malária falciparum, a capacidade de gerar IFN- $\gamma$  em PBMCs expostas a antígenos de estágios assexuados do parasita foi correlacionado com controle da densidade parasitaria, consistente com um papel protetor. No caso específico das células T CD8<sup>+</sup>, a resposta com IFN- $\gamma$  contra antígenos do parasita foi associada a níveis mais altos de hemoglobina. Observamos a mesma correlação indicando uma resposta protetora contra a anemia malárica (128).

O estudo comparou os dados hematológicos com respostas celulares na fase aguda e convalescença. Houve diferenças significativas quanto aos níveis de hemoglobina, hematócrito, monócitos, plaquetas e volume plaquetário médio em ambos os períodos, indicando uma recuperação hematológica dos pacientes. Os pacientes foram revisitados entre 60 e 90 dias após a fase aguda e nenhum teve recidiva. Isto indica que, primeiramente, não houve resistência a cloroquina e, conseqüentemente, nenhuma crise recorrente de hemólise e/ou diseritropoiese, pois os níveis voltaram ao normal demonstrando a recuperação clínica pós-infecção por *P. vivax* (129). Segundo, observamos uma inversão na associação entre idade e frequência de linfócitos T CD8 de memória que expressam CCL5 durante a fase aguda e na convalescença.

Ao avaliar a relação da resposta de T CD8 de memória CCL5 na fase aguda de malária e na convalescença (93), observamos uma inversão na resposta. Estudos em *P. falciparum* evidenciaram a redução dos níveis de CCL5 em formas graves da doença. A concentração dessa quimiocina aumentava na recuperação da doença, caracterizada pela correlação inversamente proporcional com a carga parasitária e outros marcadores de gravidade (117). Outro estudo demonstrou que crianças infectadas por malária falciparum, que possuíam baixa concentração de CCL5 sérico tinham um histórico de malária grave anterior, quando comparadas às crianças saudáveis com histórico conhecido de malária não grave (15). Nossos resultados e estes achados na malária falciparum sugerem um papel importante do estado inflamatório na modulação da resposta de células T CD8 de memória que expressam CCL5.

O presente estudo teve limitações, sendo um dos principais o quantitativo de pacientes participantes do estudo. No entanto, essa deficiência será corrigida com inserção de novos experimentos de cultura de um banco de amostras de pacientes já coletadas e incluídos. Vale destacar que outra limitação ocorreu com a evasão de quinze pacientes que não conseguimos coletar na fase de convalescença. Outra limitação foi a não dosagem de CCL5 sérico, contudo, realizaremos essa etapa para elaboração do manuscrito.

## 6 CONCLUSÃO

Apesar do papel da quimiocina CCL5 na malária não ser bem compreendido, estudos tem mostrado que existe um indicativo de gravidade relacionado a quimiocina. Assim, a análise de parâmetros clínicos com células imunológicas na fase aguda e de convalescença da infecção, representam uma descrição do papel de CCL5 na malária por *P. vivax* em crianças. Diante dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- A descrição epidemiológica dos nossos resultados apresentou uma maior prevalência de malária por *P. vivax* em crianças do sexo masculino.
- A resposta imunológica em crianças e adolescentes infectados com *P. vivax* apresentaram um aumento na expressão de CCL5 em linfócitos T CD8 de memória entre a fase aguda (D0) e convalescença (após 60-90 dias da infecção).
- Na fase aguda, a correlação positiva dos níveis de hemoglobina com a porcentagem de linfócitos T CD8 de memória expressores de IFN- $\gamma$  reforça um possível cenário imunológico associado a anemia na malária por *P. vivax* e que são relevantes para pesquisas futuras.

- Quanto menor a idade das crianças e adolescentes com malária por *P. vivax*, menor foi a quantidade de linfócitos T CD8 de memória que expressam RANTES.

- Os resultados com as células T CD8<sup>+</sup> contra a PvMSP-1<sub>19</sub> indicam que: 1) a resposta de IFN- $\gamma$  como protetora à anemia malárica; 2) a inversão das correlações entre frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória que expressam CCL5 conforme a idade na fase aguda e na convalescença sugerem um papel importante do estado inflamatório na modulação dessas células e salienta que essa resposta imune é provavelmente iniciada no estágio pré-eritrocítico.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, van Boeckel TP, Temperley WH, et al. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2010 Aug [cited 2021 May 9];4(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20689816/>
2. Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. Vol. 391, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2018. p. 1608–21.
3. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: An overview [Internet]. Vol. 9, *Malaria Journal*. 2010 [cited 2021 Mar 26]. p. 115. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/9/1/115>
4. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: Mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. Vol. 2, *Annual Review of Pathology*. Annual Reviews Inc.; 2007. p. 217–49.
5. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Haematology* [Internet]. 2000 [cited 2021 May 9];13(2):277–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10942626/>
6. Awoke N, Arota A. Profiles of hematological parameters in *plasmodium falciparum* and *plasmodium vivax* malaria patients attending tercha general hospital, Dawuro zone, south Ethiopia. *Infect Drug Resist*. 2019;12:521–7.
7. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired Immunity to Malaria. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Sep 20];22(1):13. Available from: </pmc/articles/PMC2620631/>
8. Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. Vol. 28, *Parasite Immunology*. 2006.
9. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-Resistant *Plasmodium vivax* Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* [Internet]. 2008 Jun [cited 2022 Aug 21];5(6):0890–9. Available from: </pmc/articles/PMC2429950/>
10. Bueno LL, Guimarães Es Morais C, Fortes F, Jo A, Assis J, Gomes S, et al. *Plasmodium vivax*: Induction of CD4 + CD25 + FoxP3 + Regulatory T Cells during Infection Are Directly Associated with Level of Circulating Parasites. 2010 [cited 2022 Aug 24]; Available from: [www.plosone.org](http://www.plosone.org)

11. Lau LS, Fernandez-Ruiz D, Mollard V, Sturm A, Neller MA, Cozijnsen A, et al. CD8+ T Cells from a Novel T Cell Receptor Transgenic Mouse Induce Liver-Stage Immunity That Can Be Boosted by Blood-Stage Infection in Rodent Malaria. *PLoS Pathog* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 24];10(5). Available from: [/pmc/articles/PMC4031232/](#)
12. Hafalla JCR, Cockburn IA, Zavala F. Protective and pathogenic roles of CD8+ T cells during malaria infection. *Parasite Immunol*. 2006 Jan;28(1–2):15–24.
13. Chaves YO, da Costa AG, Pereira MLM, de Lacerda MVG, Coelho-Dos-Reis JG, Martins-Filho OA, et al. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* [Internet]. 2016 Aug 31 [cited 2022 Aug 24];15(1):1–13. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1501-5>
14. Hojo-Souza NS, Pereira DB, de Souza FSH, de Oliveira Mendes TA, Cardoso MS, Tada MS, et al. On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. *Malar J* [Internet]. 2017 Jan 24 [cited 2020 Sep 29];16(1):1–10. Available from: [/pmc/articles/PMC5260126/?report=abstract](#)
15. Ochiel DO, Awandare GA, Keller CC, Hittner JB, Kremsner PG, Weinberg JB, et al. Differential Regulation of Chemokines in Children with *Plasmodium falciparum* Malaria. *Infect Immun* [Internet]. 2005;73(7):4190–7. Available from: <http://iai.asm.org/>
16. Were T, Hittner JB, Ouma C, Otieno RO, Orago ASS, Ong'echa JM, et al. Suppression of RANTES in children with *Plasmodium falciparum* malaria [Internet]. Vol. 91, *Haematologica*. 2006 Jan [cited 2020 Sep 29]. Available from: <https://haematologica.org/article/view/4185>
17. Health Organization W. WHO Guidelines for malaria - 3 June 2022 [Internet]. 2022. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
18. World Malaria Report. *World\_Malaria\_Report\_2021*. 2021;
19. Secretaria de Vigilância em Saúde - Boletim Epidemiológico. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. 2022.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de tratamento da malária no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. [Internet]. 2. ed. 2021. Available from: [www.bvsms.saude.gov.br](http://www.bvsms.saude.gov.br).
21. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. Vol. 170, *CMAJ*. CMAJ; 2004. p. 1693–702.
22. Pimenta PFP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte APM, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of amazon anopheles vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(1):1–25.

23. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(9):555–66.
24. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. Vol. 24, *Clinical Microbiology Reviews.* American Society for Microbiology (ASM); 2011. p. 377–410.
25. Hulden L, Hulden L. Activation of the hypnozoite: A part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J.* 2011;10:90.
26. Prevention CC for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology. 2020;
27. Kanjee U, Rangel GW, Clark MA, Duraisingh MT. Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes. Vol. 46, *Current Opinion in Microbiology.* Elsevier Ltd; 2018. p. 109–15.
28. Flannery EL, Markus MB, Vaughan AM. *Plasmodium vivax*. Vol. 35, *Trends in Parasitology.* Elsevier Ltd; 2019. p. 583–4.
29. Milner DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Jan 1;8(1).
30. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: Neglected and not benign. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2007 [cited 2021 Mar 22];77(SUPPL. 6):79–87. Available from: /pmc/articles/PMC2653940/
31. Zimmerman PA, Mehlotra RK, Kasehagen LJ, Kazura JW. Why do we need to know more about mixed *Plasmodium* species infections in humans? Vol. 20, *Trends in Parasitology.* NIH Public Access; 2004. p. 440–7.
32. Bassat Q, Alonso PL. Defying malaria: Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. *Nat Med.* 2011;17(1):48–9.
33. Milner DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Jan 1;8(1).
34. World Health Organization. Guidelines for the Treatment of Malaria. 2021;(June):2019. Available from: [http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com\\_dbook&task=readonline&book\\_id=13650&page=73&chckhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component](http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chckhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component)
35. Lança EFC, Magalhães BML, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Benzecry SG, Alexandre MAA, et al. Risk factors and characterization of *plasmodium vivax*-associated admissions to pediatric intensive care units in the brazilian amazon. *PLoS One.* 2012;7(4).

36. Adams JH, Mueller I. The biology of plasmodium vivax. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Sep 1;7(9).
37. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. Boletim epidemiológico vigilância em Saúde no Brasil 2020. 2020;
38. Adams JH, Mueller I. The biology of plasmodium vivax. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Sep 1;7(9).
39. Battle KE, Lucas TCD, Nguyen M, Howes RE, Nandi AK, Twohig KA, et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of Plasmodium vivax, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *The Lancet.* 2019 Jul 27;394(10195):332–43.
40. Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of plasmodium vivax malaria. Vol. 55, *Journal of Vector Borne Diseases.* Wolters Kluwer Medknow Publications; 2018. p. 1–8.
41. Borges QI, Fontes CJF, Damazo AS. Analysis of lymphocytes in patients with Plasmodium vivax malaria and its relation to the annexin-A1 and IL-10. *Malar J* [Internet]. 2013 Dec 20 [cited 2021 Feb 7];12(1):455. Available from: </pmc/articles/PMC3878186/?report=abstract>
42. Kochar DK, Das A, Kochar A, Middha S, Acharya J, Tanwar GS, et al. Thrombocytopenia in Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and mixed infection malaria: A study from Bikaner (Northwestern India). *Platelets* [Internet]. 2010 Dec [cited 2020 Sep 29];21(8):623–7. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09537104.2010.505308>
43. Karyana M, Burdarm L, Yeung S, Kenangalem E, Wariker N, Maristela R, et al. Malaria morbidity in Papua Indonesia, an area with multidrug resistant Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum. *Malar J* [Internet]. 2008 [cited 2022 Aug 25];7:148. Available from: </pmc/articles/PMC2518158/>
44. Naing C, Whittaker MA. Severe thrombocytopaenia in patients with vivax malaria compared to falciparum malaria: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty* [Internet]. 2018 Dec 9 [cited 2021 May 8];7(1):10. Available from: <https://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-018-0392-9>
45. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarncio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J* [Internet]. 2010 [cited 2021 Mar 26];9(1):13. Available from: </pmc/articles/PMC2837053/>

46. Lacerda MV, Mourão MP, Alexandre MA, Siqueira AM, Magalhães BM, Martinez-Espinosa FE, et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: A systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J*. 2012;11:1–18.
47. Patriani D, Arguni E, Kenangalem E, Dini S, Sugiarto P, Hasanuddin A, et al. Early and late mortality after malaria in young children in Papua, Indonesia. *BMC Infect Dis*. 2019 Oct 30;19(1):922.
48. Chu CS, White NJ. Management of relapsing *Plasmodium vivax* malaria. Vol. 14, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 885–900.
49. Kochar DK, Das A, Kochar A, Middha S, Acharya J, Tanwar GS, et al. Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: A study from Bikaner (Northwestern India). *Platelets*. 2010 Dec;21(8):623–7.
50. Kwak YG, Lee HK, Kim M, Um TH, Cho CR. Clinical characteristics of vivax malaria and analysis of recurred patients. *Infect Chemother*. 2013 Mar;45(1):69–75.
51. Sam SS, Omar SFS, Teoh BT, Abd-Jamil J, AbuBakar S. Review of Dengue Hemorrhagic Fever Fatal Cases Seen Among Adults: A Retrospective Study. Vol. 7, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science; 2013.
52. 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. Vol. 23, *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews Inc.; 2005. p. 69–99.
53. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology* 2004 4:3 [Internet]. 2004 [cited 2022 Sep 25];4(3):169–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri1311>
54. Matlani M, Kojom LP, Mishra N, Dogra V, Singh V. Severe vivax malaria trends in the last two years: a study from a tertiary care centre, Delhi, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Sep 1];19(1):49. Available from: </pmc/articles/PMC7602347/>
55. Snow B, Trape JF, Marsh K, Snow RW. The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa [Internet]. Vol. 17, *TRENDS in Parasitology*. 2001. Available from: <http://parasites.trends.com1471>
56. Kevin Baird J, Masbar S, Basri H, Tirtokusumo S, Subianto B, Hoffman SL. Age-Dependent Susceptibility to Severe Disease with Primary Exposure to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* [Internet]. 1998 Aug 1 [cited 2022 Sep 1];178(2):592–5. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/178/2/592/904962>

57. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007 449:7164 [Internet]. 2007 Oct 17 [cited 2022 Sep 1];449(7164):819–26. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature06246>
58. Chua CLL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: Protection or pathology? Vol. 29, *Trends in Parasitology*. 2013.
59. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology* 2008 9:7 [Internet]. 2008 Jul [cited 2022 Sep 21];9(7):725–32. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni.f.205>
60. Day KP, Marsh K. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Immunol Today*. 1991 Jan 1;12(3):A68–71.
61. Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, da Silva LHP. Asymptomatic Carriers of *Plasmodium* spp. as Infection Source for Malaria Vector Mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2022 Sep 1];42(5):777–9. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article/42/5/777/862895>
62. Andrade BB, Rocha BC, Reis-Filho A, Camargo LMA, Tadei WP, Moreira LA, et al. Anti-*Anopheles darlingi* saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar J* [Internet]. 2009 Jun 5 [cited 2022 Sep 1];8(1):1–9. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-8-121>
63. Cutts JC, Powell R, Agius PA, Beeson JG, Simpson JA, Fowkes FJI. Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: A systematic review and meta-analysis. *BMC Med* [Internet]. 2014 Sep 9 [cited 2022 Sep 21];12(1):1–20. Available from: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-014-0150-1>
64. Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, Pereira Da Silva LH, et al. A Reduced Risk of Infection with *Plasmodium vivax* and Clinical Protection against Malaria Are Associated with Antibodies against the N Terminus but Not the C Terminus of Merozoite Surface Protein 1. *Infect Immun* [Internet]. 2006 May [cited 2022 Sep 21];74(5):2726. Available from: [/pmc/articles/PMC1459730/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1459730/)
65. Versiani FG, Almeida ME, Melo GC, Versiani FO, Orlandi PP, Mariúba LAM, et al. High levels of IgG3 anti ICB2-5 in *Plasmodium vivax*-infected individuals who did not develop symptoms. *Malar J* [Internet]. 2013 Aug 27 [cited 2022 Sep 21];12(1):1–12. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-294>

66. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2022 Sep 2];17(1):1–14. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article/17/1/1/721976>
67. Tran TM, Samal B, Kirkness E, Crompton PD. Systems immunology of human malaria. *Trends Parasitol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2022 Sep 2];28(6):248. Available from: </pmc/articles/PMC3361535/>
68. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* [Internet]. 2002; Available from: [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)
69. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* [Internet]. 2006 Feb 24 [cited 2022 Sep 2];124(4):783–801. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867406001905/fulltext>
70. Zevering Y, Khamboonruang C, Rungruengthanakit K, Tunoviboonchai L, Ruengpipattanapan J, Bathurst I, et al. Life-spans of human T-cell responses to determinants from the circumsporozoite proteins of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Jun 6 [cited 2022 Sep 2];91(13):6118. Available from: </pmc/articles/PMC44149/?report=abstract>
71. Medzhitov R, Janeway-Jr C. Innate Immunity. *N Engl J Med*. 2000;343(5):338–44.
72. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* [Internet]. 2002;415(6872):673–9. Available from: [www.nature.com](http://www.nature.com)
73. Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* [Internet]. 1993 Jan 1 [cited 2022 Sep 17];177(1):145. Available from: </pmc/articles/PMC2190877/?report=abstract>
74. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. From the Cover: Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Feb 2 [cited 2022 Sep 17];104(6):1919. Available from: </pmc/articles/PMC1794278/>
75. Guimarães Da Costa A, do Valle Antonelli LR, Augusto Carvalho Costa P, Paulo Diniz Pimentel J, Garcia NP, Monteiro Tarragô A, et al. The Robust and Modulated Biomarker Network Elicited by the *Plasmodium vivax* Infection Is Mainly Mediated by the IL-6/IL-10 Axis and Is Associated with the Parasite Load. *J Immunol Res* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 17];2014. Available from: </pmc/articles/PMC3987793/>

76. Chaves YO, da Costa AG, Pereira MLM, de Lacerda MVG, Coelho-Dos-Reis JG, Martins-Filho OA, et al. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2016;15(1):1–13.
77. Zhu J, Krishnegowda G, Gowda DC. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum*: The requirement of ERK, p38, JNK and NF- $\kappa$ B pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Mar 3 [cited 2022 Sep 17];280(9):8617. Available from: /pmc/articles/PMC4980998/
78. STEPHENS PW, Silvina Pagola. The structure of malaria pigment b-haematin. *Nature* [Internet]. 2000; Available from: www.nature.com
79. Brant F, Miranda AS, Esper L, Rodrigues DH, Kangussu LM, Bonaventura D, et al. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Immune Response Profile and Development of Pathology during *Plasmodium berghei* Anka Infection. *Infect Immun* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 17];82(8):3127. Available from: /pmc/articles/PMC4136209/
80. Torre D. early production of  $\gamma$ - interferon in clinical malaria: Role of interleukin-18 and interleukin-12. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2022 Sep 17];48(10):1481–2. Available from: https://academic.oup.com/cid/article/48/10/1481/425194
81. Gonçalves RM, Salmazi KC, Santos BAN, Bastos MS, Rocha SC, Boscardin SB, et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells, Dendritic Cells, and Circulating Cytokines in Uncomplicated Malaria: Do Different Parasite Species Elicit Similar Host Responses? *Infect Immun* [Internet]. 2010 Nov [cited 2022 Sep 17];78(11):4763. Available from: /pmc/articles/PMC2976362/
82. Bueno LL, Morais CG, da Silva Soares I, Bouillet LEM, Bruna-Romero O, Fontes CJ, et al. *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. *Vaccine*. 2009 Sep 18;27(41):5581–8.
83. Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol* [Internet]. 2008 [cited 2022 Sep 17];38(10):2697. Available from: /pmc/articles/PMC2757553/
84. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ : the role of T regulatory

- cells. *Immunology* [Internet]. 2006 Apr [cited 2022 Sep 17];117(4):433. Available from: [/pmc/articles/PMC1782242/](#)
85. Fernandes AAM, Carvalho LJDM, Zanini GM, Ventura AMRDS, Souza JM, Cotias PM, et al. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clinical and Vaccine Immunology* [Internet]. 2008 Apr [cited 2021 Feb 7];15(4):650–8. Available from: [/pmc/articles/PMC2292669/?report=abstract](#)
  86. Mount AM, Mwapasa V, Elliott SR, Beeson JG, Tadesse E, Lema VM et al. Impairment of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy by HIV infection. *Lancet*. 2004;63(9424):1860-7.
  87. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A Single Fragment of a Malaria Merozoite Surface Protein Remains on the Parasite During Red Cell Invasion and Is the Target of Invasion-inhibiting Antibodies. *J Exp Med*. 1990;172(1):379-82.
  88. Holder AA. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: Structure, specific antibodies and immunity to malaria. Vol. 136, *Parasitology*. 2009. p. 1445–56.
  89. RILEY EM, ALLEN SJ, WHEELER JG, BLACKMAN MJ, BENNETT S, TAKACS B, et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (Pf MSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol* [Internet]. 1992 May 1 [cited 2022 Sep 28];14(3):321–37. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3024.1992.tb00471.x>
  90. Chitnis CE, Sharma A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. Vol. 24, *Trends in Parasitology*. 2008. p. 29–34.
  91. de Sousa TN, Kano FS, de Brito CFA, Carvalho LH. The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 28];109(5):608–17. Available from: <http://www.scielo.br/j/mioc/a/khygqzpNpyKVfRfgw5TqDhn/abstract/?lang=en>
  92. Soares IS, Levitus G, Souza JM, del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun* [Internet]. 1997 [cited 2022 Sep 28];65(5):1606. Available from: [/pmc/articles/PMC175182/?report=abstract](#)

93. Ofir-Birin Y, ben Ami Pilo H, Cruz Camacho A, Rudik A, Rivkin A, Revach OY, et al. Malaria parasites both repress host CXCL10 and use it as a cue for growth acceleration. *Nat Commun.* 2021 Dec 1;12(1).
94. Frimpong A, Owusu EDA, Amponsah JA, Obeng-Aboagye E, Puije W van der, Frempong AF, et al. Cytokines as Potential Biomarkers for Differential Diagnosis of Sepsis and Other Non-Septic Disease Conditions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jun 23;12:758.
95. Xie JH, Nomura N, Lu M, Chen SL, Koch GE, Weng Y, et al. Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2022 Sep 22];73(6):771–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.1102573>
96. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2022 Sep 22];111(6):1185–99. Available from: <http://www.jacionline.org/article/S009167490301460X/fulltext>
97. Mcdermott DH, Murphy PM. Springer Seminars in Immunopathology Chemokines and their receptors in infectious disease. Vol. 22, Springer Semin Immunopathol. 2000.
98. Brevern AG de, Autin L, Colin Y, Bertrand O, Etchebest C. In silico studies on DARC. *Infect Disord Drug Targets* [Internet]. 2009 Nov 14 [cited 2022 Sep 22];9(3):289. Available from: </pmc/articles/PMC3198718/>
99. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hébert CA, Valente AJ, et al. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 1991 [cited 2022 Sep 22];88(4):1362. Available from: </pmc/articles/PMC295607/?report=abstract>
100. Graham GJ. D6 and the atypical chemokine receptor family: Novel regulators of immune and inflammatory processes. Vol. 39, *European Journal of Immunology*. 2009. p. 342–51.
101. Castro-Gomes T, Moura LC, Melo GC, Monteiro WM, Lacerda MVG, Braga EM. Potential immune mechanisms associated with anemia in *Plasmodium vivax* malaria: A Puzzling question. Vol. 82, *Infection and Immunity*. American Society for Microbiology; 2014. p. 3990–4000.

102. Palomino DC, Arolina T, Marti LC, Avelheiro. Chemokines and immunity. Vol. 13, Einstein (São Paulo, Brazil). Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein; 2015. p. 469–73.
103. Krensky AM, Ahn YT. Mechanisms of disease: Regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. Vol. 3, Nature Clinical Practice Nephrology. 2007. p. 164–70.
104. Ochiel DO, Awandare GA, Keller CC, Hittner JB, Kreamsner PG, Weinberg JB, et al. Differential regulation of  $\beta$ -chemokines in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):4190–7.
105. Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5(OCT):1–12.
106. Díaz I. Rules of thumb to obtain, isolate, and preserve porcine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2022 Sep 4];251:110461. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242722000812>
107. Turner RJ, Geraghty NJ, Williams JG, Ly D, Brungs D, Carolan MG, et al. Comparison of peripheral blood mononuclear cell isolation techniques and the impact of cryopreservation on human lymphocytes expressing CD39 and CD73. *Purinergic Signal* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Sep 4];16(3):389. Available from: </pmc/articles/PMC7524993/>
108. de Oliveira CI, Wunderlich G, Levitus G, Soares IS, Rodrigues MM, Tsuji M, et al. Antigenic properties of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. *Vaccine*. 1999 Aug 6;17(23–24):2959–68.
109. Bastos MS, da Silva-Nunes M, Malafrente RS, Hoffmann EHE, Wunderlich G, Moraes SL, et al. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. *Clinical and Vaccine Immunology* [Internet]. 2007 [cited 2022 Sep 4];14(10):1249–59. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CVI.00243-07>
110. Lee S, Choi YK, Goo YK. Humoral and cellular immune response to *Plasmodium vivax* VIR recombinant and synthetic antigens in individuals naturally exposed to *P. vivax* in the Republic of Korea. *Malar J* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Aug 15];20(1):1–8. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-021-03810-2>

111. Tanwar G, Chahar C, Kochar DK. Spectrum of severe *Plasmodium vivax* malaria in children in Bikaner (Northwestern India). *International Journal of Infectious Diseases*. 2012 Jun;16:e273.
112. Poespoprodjo JR, Fobia W, Kenangalem E, Lampah DA, Hasanuddin A, Warikar N, et al. *Vivax malaria: A major cause of morbidity in early infancy*. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2009 Jun 15 [cited 2021 May 9];48(12):1704–12. Available from: </pmc/articles/PMC4337979/>
113. Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, et al. *Severe Plasmodium vivax Malaria: A Report on Serial Cases from Bikaner in Northwestern India*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2009 [cited 2022 Sep 19];80(2):194–8. Available from: [www.ajtmh.org](http://www.ajtmh.org)
114. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax Malaria* [Internet]. Available from: [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid)
115. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. *The pathophysiology of vivax malaria*. Vol. 25, *Trends in Parasitology*. 2009. p. 220–7.
116. Fischer FR, Luo Y, Luo M, Santambrogio L, Dorf ME. *RANTES-Induced Chemokine Cascade in Dendritic Cells*. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2022 Sep 19];167(3):1637–43. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/167/3/1637>
117. Bujarbaruah D, Kalita MP, Baruah V, Basumatary TK, Hazarika S, Begum RH, et al. *RANTES levels as a determinant of falciparum malaria severity or recovery*. *Parasite Immunol*. 2017 Sep 1;39(9).
118. John CC, Opika-Opoka R, Byarugaba J, Idro R, Boivin MJ. *Low Levels of RANTES Are Associated with Mortality in Children with Cerebral Malaria*. *J Infect Dis* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2022 Aug 25];194(6):837–45. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/194/6/837/865785>
119. Catalfamo M, Karpova T, McNally J, Costes S v., Lockett SJ, Bos E, et al. *Human CD8+ T Cells Store RANTES in a Unique Secretory Compartment and Release It Rapidly after TcR Stimulation*. *Immunity* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2022 Sep 19];20(2):219–30. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761304000275/fulltext>
120. Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, et al. *The anaemia of Plasmodium vivax malaria* [Internet]. Vol. 11, *Malaria Journal*. BioMed Central; 2012 [cited 2021 Feb 7]. p. 135. Available from: </pmc/articles/PMC3438072/?report=abstract>

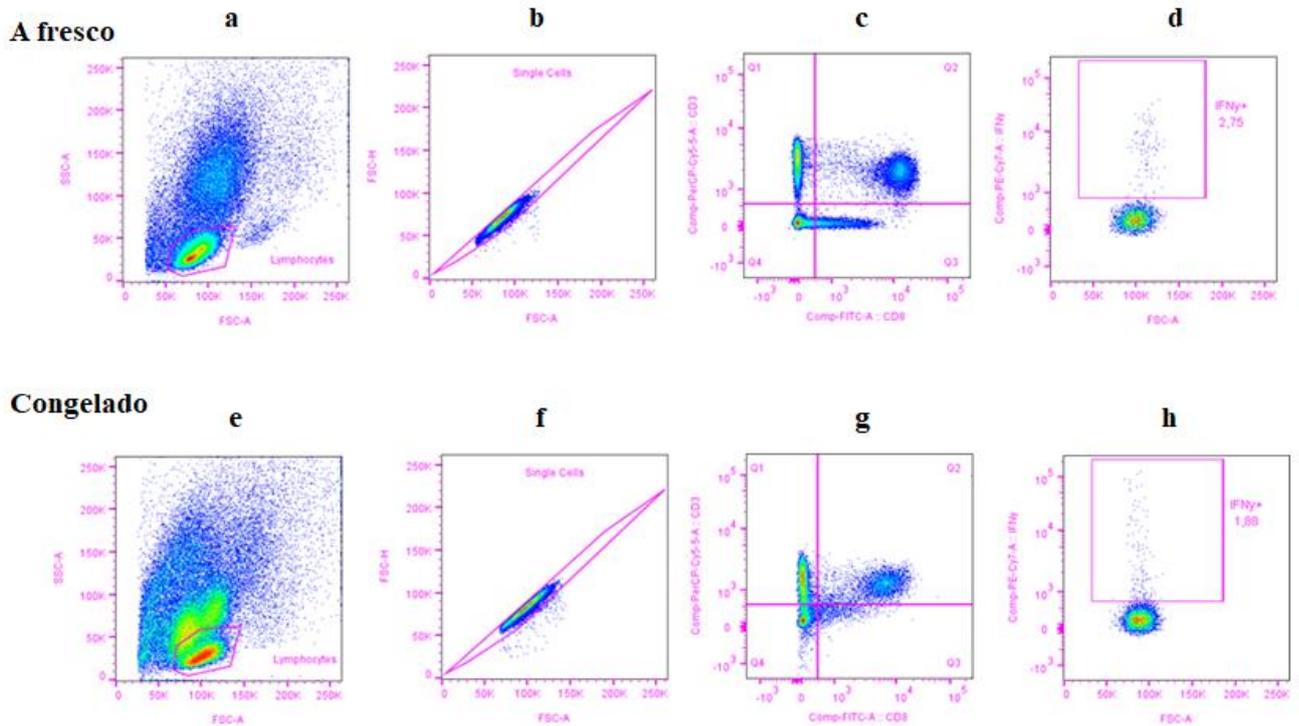
121. Maina RN, Walsh D, Gaddy C, Hongo G, Waitumbi J, Otieno L, et al. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malar J* [Internet]. 2010 [cited 2021 May 8];9(SUPPL. 3):S4. Available from: [/pmc/articles/PMC3002140/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980019/)
122. Rodríguez-Morales AJ, Sánchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M. Anemia and thrombocytopenia in children with *plasmodium vivax* malaria. *J Trop Pediatr* [Internet]. 2006 Feb [cited 2021 May 9];52(1):49–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980019/>
123. Erhart LM, Yingyuen K, Chuanak N, Buathong N, Laoboonchai A, Miller RS, et al. Hematologic and clinical indices of malaria in a semi-immune population of Western Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2021 May 8];70(1):8–14. Available from: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/70/1/article-p8.xml>
124. Price RN, Simpson JA, Nosten F, Luxemburger C, Hkirjaroen L, Kuile FT, et al. Factors contributing to anemia after uncomplicated *falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2001 [cited 2021 Mar 27];65(5):614–22. Available from: [/pmc/articles/PMC4337986/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18563962/)
125. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: A prospective study in Papua, Indonesia [Internet]. Vol. 5, *PLoS Medicine*. *PLoS Med*; 2008 [cited 2020 Sep 29]. p. 0890–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18563962/>
126. Walzer T, Marçais A, Saltel F, Bella C, Jurdic P, Marvel J. Cutting Edge: Immediate RANTES Secretion by Resting Memory CD8 T Cells Following Antigenic Stimulation. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2022 Sep 19];170(4):1615–9. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/170/4/1615>
127. Lelliott PM, Coban C. IFN- $\gamma$  protects hepatocytes against *Plasmodium vivax* infection via LAP-like degradation of sporozoites. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Jun 6 [cited 2022 Sep 19];113(25):6813. Available from: [/pmc/articles/PMC4922169/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26911111/)
128. Ong'echa JMO, Lal AA, Terlouw DJ, ter Kuile FO, Kariuki SK, Udhayakumar V, et al. Association of interferon-gamma responses to pre-erythrocytic stage vaccine candidate antigens of *Plasmodium falciparum* in young Kenyan children with improved hemoglobin levels: XV. Asembo Bay Cohort Project. *Am J Trop Med Hyg* [Internet].

- 2003 [cited 2022 Sep 28];68(5):590–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12812352/>
129. Alves-Junior ER, Gomes LT, Dombroski TCD, Nery AF, Vandresen-Filho S, Nakazato L, et al. New laboratory perspectives for evaluation of vivax malaria infected patients: a useful tool for infection monitoring. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2020 Jun 26 [cited 2022 Sep 19];24(2):120–9. Available from: <http://www.scielo.br/j/bjid/a/j9WR7cjB4x5dZjBpSfYM7tg/?format=html&lang=en>

## 8 ANEXOS E APÊNDICES

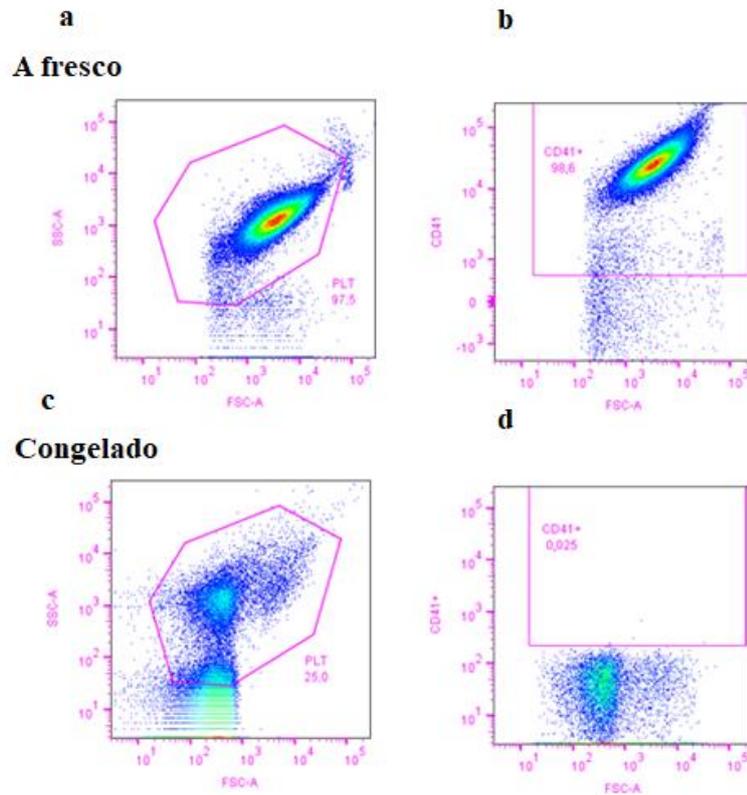
### 8.1 Considerações sobre o racional e o desenho experimental realizado na pesquisa

#### 8.1.1 Análise de PBMC com amostra a fresco e congelada em $-80^{\circ}\text{C}$



**Figura 17 - Comparação da estabilidade e morfologia de linfócitos criopreservados em relação a fresco.** A-D material fresco; E-H) material criopreservado; A) Avaliação de FSC e SSC das células mononucleares; B) análise de célula única para exclusão de artefatos como agregados; C) avaliação de células TCD8 com marcação CD3; D) frequência de células TCD8 produtores de IFN $\gamma$ . E) Avaliação de FSC e SSC das células mononucleares; F) análise de célula única para exclusão de artefatos como agregados; G) avaliação de células TCD8 com marcação CD3; H) frequência de células TCD8 produtores de IFN $\gamma$ .

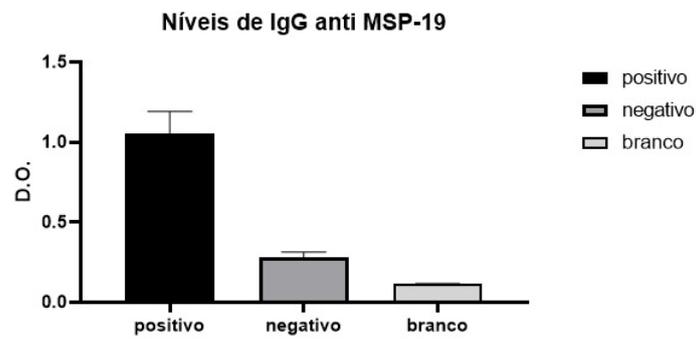
### 8.1.2 Análise de plaquetas a fresco e congeladas



**Figura 18 - Comparação da estabilidade e morfologia de plaquetas de plasma criopreservados em relação a fresco. A-B a fresco e C-D criopreservado. A) Avaliação de FSC e SSC das plaquetas; B) avaliação de eventos CD41+ e frequência de plaquetas. C) Avaliação de FSC e SSC das plaquetas; D) avaliação de eventos CD41+ e frequência de plaquetas.**

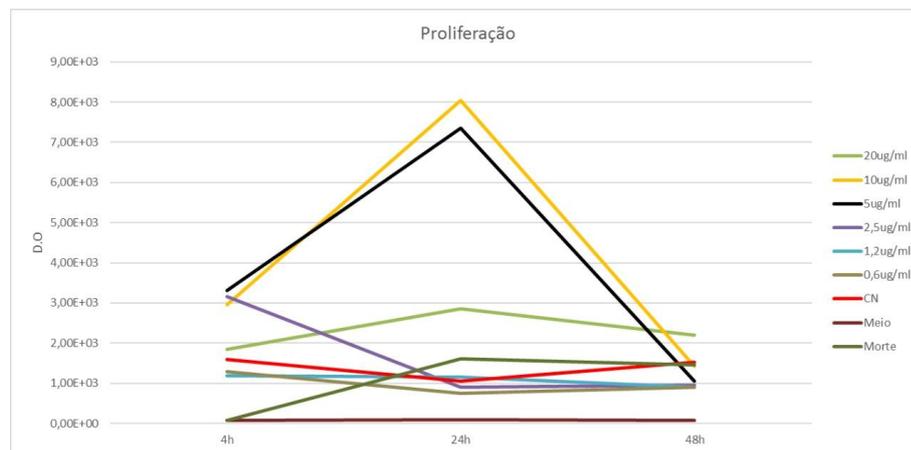
### 8.1.3 Controle de qualidade da proteína PvMSP-119

Ao realizar o ensaio de ELISA, observamos a positividade dos níveis de IgG anti PvMSP-119 e identificamos que a proteína se manteve íntegra e funcional. Avaliamos 10 pacientes positivos e 10 pacientes negativos.



**Figura 19 – Análise para controle de qualidade do antígeno.**

### 8.1.4 Análise para definição da concentração da proteína PvMSP-119



**Figura 20 - Análise da concentração ideal da proteína e tempo de cultivo.**

## 8.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos níveis de CCL5 (RANTES) em células mononucleares por estimulação de Plasmodium vivax.

**Pesquisador:** ANA CAROLINA SHUAN LACO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 39198320.8.0000.0005

**Instituição Proponente:** Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.583.505

#### Apresentação do Projeto:

A malária é uma doença infecciosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, causada por protozoário do gênero Plasmodium. A maioria dos casos da doença na Região Amazônica é determinada pelo Plasmodium vivax. Uma das complicações da malária causada pelo Plasmodium vivax é a anemia principalmente em crianças e adolescentes. O conhecimento das particularidades clínicas, laboratoriais e imunológicas da malária, particularmente sobre a anemia, ainda não estão totalmente elucidados. Pouco se sabe sobre os mecanismos imunes envolvidos na anemia por malária vivax entretanto, alguns estudos em crianças infectadas por Plasmodium falciparum, encontraram associação dos níveis da quimiocina RANTES com o aumento da gravidade da doença e redução de plaquetas. O projeto tem como objetivo avaliar a relação da produção de RANTES dose-dependente de antígeno parasitário com a contagem de reticulócitos e plaquetas reticuladas em crianças de 1 a 16 anos de idade com malária pelo Plasmodium vivax atendidas na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. A produção de RANTES será avaliada através de antígeno de parasitário em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), também será realizada a análise hematológica, bioquímica e imunológica para verificar possíveis correlações do RANTES com outras células. Espera-se encontrar associações dos níveis da quimiocina com aspectos hematológicos buscando

**Endereço:** Av. Pedro Teixeira, 25

**Bairro:** D. Pedro I

**CEP:** 69.040-000

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)2127-3572

**Fax:** (92)2127-3572

**E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.583.505

**ANÁLISE:** Verificou-se que a pesquisadora atendeu conforme a solicitação. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

Diante do exposto e considerando que a pesquisadora atendeu de acordo com todas as solicitações sugere-se que o protocolo de pesquisa seja **APROVADO**.

S.M.J. É o parecer.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O presente projeto está **APROVADO** e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1644150.pdf	02/03/2021 17:18:08		Aceito
Outros	FOLHA_RESPOSTA.docx	02/03/2021 17:11:35	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
Cronograma	cronograma_v03.docx	02/03/2021 17:10:29	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_detalhado_v03.docx	02/03/2021 17:10:03	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_ATE_6a10ANOSv3.docx	02/03/2021 17:09:31	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_11a16ANOS.docx	02/03/2021 16:59:11	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v3.docx	02/03/2021 16:58:09	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 4.583.505

Outros	anuenciadodiretordeassistenciamedica.pdf	11/12/2020 13:06:39	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
Outros	Cartadeanuencia.pdf	12/10/2020 19:46:47	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
Outros	Lista_participantes_do_projeto.docx	12/10/2020 19:45:59	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	12/10/2020 19:40:59	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
Outros	REGULAMENTOARMAZENAMENTOAMT.pdf	12/10/2020 19:36:28	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	12/10/2020 19:29:39	ANA CAROLINA SHUAN LACO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 10 de Março de 2021

---

**Assinado por:**  
**Marilaine Martins**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Pedro Teixeira, 25  
**Bairro:** D. Pedro I **CEP:** 69.040-000  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

### 8.3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

**Estudo:** Avaliação dos níveis de CCL5 (RANTES) em células mononucleares por estimulação de *Plasmodium vivax*.

**Patrocinador:** FAPEAM

**Centro de Pesquisa:** Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado – FMT-HVD

**Pesquisadora responsável:** Ana Carolina Shuan Laco

**Pesquisador Principal:** Dra. Gisely Cardoso de Melo

**Telefone de contato:** (92) 99505-3905/9159-8604

#### I Dados sobre a Pesquisa:

##### 1. Introdução

Vimos por meio deste informá-lo que seu filho(a)/tutelado(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a) neste estudo de pesquisa.

O estudo e este termo foram aprovados pela Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Neste termo são fornecidas as informações corretas e suficientes para que você possa avaliar e julgar se tem interesse ou não em participar deste estudo. Para tanto, leia este documento cuidadosamente e esclareceremos quaisquer dúvidas que possam surgir após a explicação. Além disso, você pode consultar as pessoas que julgar convenientes.

Você deverá assinar esse termo em duas vias, uma ficará com você e outra conosco. Todas as páginas devem ser rubricadas ou conter a impressão digital do responsável legal do participante da pesquisa e do pesquisador responsável.

##### 2. Participação Voluntária

A participação neste estudo é voluntária e se você e/ou seu filho(a)/tutelado(a) não quiserem mais fazer parte da pesquisa poderão desistir a qualquer momento e retirar o seu consentimento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu atendimento, tratamento ou acompanhamento na FMT-HVD.

Em qualquer momento do estudo você e/ou seu filho(a)/tutelado(a) poderão fazer todas as perguntas que quiserem. Disponibilizaremos tempo para decidirem e discutirem a situação com pessoas de sua confiança.

##### 3. Descrição Geral do Estudo

Nesta pesquisa estamos buscando entender melhor os mecanismos envolvidos na anemia por malária por *P. vivax*, especificamente em crianças e adolescentes. A identificação do CCL5 pode contribuir para um melhor entendimento da doença, permitindo o uso de um melhor tratamento para impedir a progressão da malária grave em crianças mais jovens.

O objetivo desta pesquisa é avaliar a produção e influência do RANTES/CCL5 em plaquetas e glóbulos brancos que são as células de defesa do organismo que destroem os agentes estranhos, por exemplo, as bactérias, os vírus, parasitas como no caso da malária, nas amostras coletadas de crianças entre 1 a 16 anos de idade.

Durante a fase de triagem, depois de tirar todas suas dúvidas e assinar esse termo, seu filho(a)/tutelado(a) vai fazer uma entrevista onde vamos perguntar informações sobre a sua vida, o lugar onde moram e o histórico de saúde, bem como os medicamentos que ele toma no dia-a-dia. Depois ele irá passar por uma avaliação médica e fazer alguns exames para a gente saber sobre a saúde dele.

Exame físico e avaliação clínica: seu filho(a)/tutelado(a) passará por um exame físico na inclusão no estudo. Examinaremos: frequência da sua respiração e coração, pressão arterial e pulso. Faremos medições da altura e peso, perguntas sobre a saúde e uso de medicamentos.

Coleta de sangue: será realizado o exame de malária (ponta do dedo) e será coletado amostra de sangue, aproximadamente 20 ml (cerca de duas colheres de sopa) da veia do braço no dia do diagnóstico. Para as crianças menores de dois anos será coletado 5-10ml no máximo. Com o sangue do seu filho(a)/tutelado(a), faremos testes para comprovar nosso questionamento a respeito do motivo da anemia na malária. Durante a coleta, seu filho(a)/tutelado(a) vai ser perguntado sobre o que está sentindo e terá uma equipe clínica à disposição para o caso ele sinta algum desconforto ou outro motivo que você e/ou ele quiserem.

#### **4. Benefícios e Riscos Derivados da Participação no Estudo**

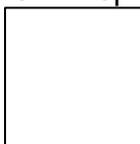
Benefícios: você e seu filho(a)/tutelado(a) estarão contribuindo para o conhecimento da anemia na malária e ajudando a melhorar a saúde dos pacientes. A realização do estudo poderá ter implicações importantes em um contexto de estabelecer estratégias mais precisas de tratamento e melhor gerenciamento de casos graves por anemia em crianças e adolescentes infectados com malária por *P. vivax*. Apesar de sua enorme importância para a saúde, processos envolvidos na anemia por malária por *P. vivax* permanecem incompletos e espera-se que estes possam ser esclarecidos por meio do estudo.

Riscos: É possível que, durante a participação na pesquisa seu filho(a)/tutelado(a) sinta algum incômodo e desconforto. Estes podem ser:

Risco de origem psicológica, intelectual e emocional causando vergonha, desconforto, medo, estresse, quebra de sigilo e anonimato. Para minimizar esses riscos, em nenhum momento seu nome e o nome do seu filho(a)/tutelado(a) ou dados pessoais serão revelados a terceiros, nem mesmo quando os resultados do estudo forem divulgados.

Coleta de sangue: Existe a possibilidade de risco na coleta do exame de malária (picada no dedo) ou pela coleta de amostra de sangue na veia do braço. Mas qualquer dor deve durar apenas alguns instantes. Existe um risco muito pequeno de infecção onde o sangue for coletado, mas qualquer infecção será monitorada e tratada.

Qualquer problema, entre em contato com a Ana Carolina Shuan, responsável da pesquisa na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado



especificadamente Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- 2º andar (de segunda a sexta feira. Das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92)99505-3905 (qualquer dia e horário) ou no e-mail [shuancarolina@gmail.com](mailto:shuancarolina@gmail.com). A responsável irá verificar o andamento da situação. A amostra de sangue colhida é muito pequena e não representa nenhum risco à saúde.

Riscos desconhecidos: Outros efeitos colaterais ainda não conhecidos neste momento podem acontecer durante o estudo. Durante o estudo, será informado sobre quaisquer novas informações que possam afetar sua decisão de permanecer no estudo.

## 5. Acompanhamento e assistência

Os pesquisadores responsáveis por este estudo estarão disponíveis, você também poderá também fazer contato com a Dra. Gisely Cardoso de Melo ou Ana Carolina Shuan Laco na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado especificadamente Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- 2º andar (de segunda a sexta feira. Das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 99159-8604/(92)99505-3905 (qualquer dia e horário) ou no e-mail [cardosogisely@gmail.com](mailto:cardosogisely@gmail.com) e [shuancarolina@gmail.com](mailto:shuancarolina@gmail.com).

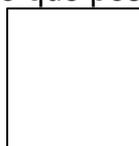
## 6. Confidencialidade

Ao dar o seu consentimento para seu filho(a)/tutelado(a) participar deste estudo, os dados do prontuário médico, assim como os provenientes da participação no estudo, serão coletados, transferidos, utilizados e processados pela equipe, assim como pelo patrocinador e pelas empresas que colaboram com o projeto. Este termo de consentimento ficará armazenado junto ao prontuário médico no centro de pesquisa. O acesso ao prontuário médico será restrito aos pesquisadores do estudo.

Todas as informações coletadas no estudo que possam ferir a sua privacidade ou do seu filho(a)/tutelado(a) serão anonimizadas e, caso seja necessário encaminhamento de suas informações eles jamais saberão nada sobre sua identidade. Sob nenhuma circunstância serão feitas cópias de seu prontuário médico.

Logo após a coleta do sangue, as amostras receberão um código de identificação. Todos os documentos e formulários que você preencher receberão este código e apenas pessoal autorizado terá acesso a ele. Além disso, a equipe é treinada para o acolhimento e a realização de entrevistas de forma segura.

Ao assinar este termo de consentimento, você permitirá à equipe de pesquisa usar informações sobre o prontuário médico do seu filho(a)/tutelado(a) para os objetivos do presente estudo. Toda a equipe médica e de enfermagem envolvida no seu cuidado saberá que seu filho(a)/tutelado(a) participa ou não do estudo. Qualquer informação obtida em relação a este projeto que possa identificá-lo será mantida em



sigilo e não será compartilhada sem a sua permissão, exceto quando exigido por lei. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome ou do seu filho(a)/tutelado(a) não será citado.

Em caso de dúvidas sobre a coleta e o uso de suas informações, entre em contato com o pesquisador do estudo.

### **7. O que ocorre com as informações obtidas no estudo**

Se decidir por participar no estudo, é possível que informações relevantes sejam obtidas na análise das amostras biológicas. De acordo com as leis atuais, você tem o direito de ser informado dos dados obtidos no decorrer do estudo. Caso seja solicitado, poderemos lhe fornecer informações sobre o estudo no que diz respeito ao uso dos dados.

### **8. Ressarcimento/Indenização**

Você e/ou seu filho(a)/tutelado(a) não gastarão, nem ganharão dinheiro por participar desta pesquisa. Você tem o direito de solicitar ressarcimento ou indenização no caso de se sentir materialmente ou fisicamente prejudicado em algum momento da execução deste projeto.

*Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não abrirá mão de nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.*

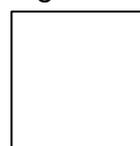
### **9. Contato**

Para tirar qualquer dúvida sobre o estudo, por favor, entre em contato com o responsável do estudo Ana Carolina Shuan Laco ou Dra. Gisely Cardoso de Melo na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira. Das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 99159-8604/(92)99505-3905 (qualquer dia e horário) ou no e-mail cardosogisely@gmail.com e shuancarolina@gmail.com para esclarecer dúvidas que você possa ter e dar as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado; e-mail: cep@fmt.am.gov.br; endereço: na Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM; telefone: (92) 2127-3572. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

## **II. Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Nós gostaríamos de sua permissão para guardar o restante da amostra de sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Isto pode exigir o armazenamento por 5 anos do sangue do seu filho(a)/tutelado(a) em laboratórios da FMT-HVD. Para isso, o sangue será guardado com um código e não deverá identificar



o nome do seu filho(a)/tutelado(a). O restante do material que não for utilizado no estudo será descartado de acordo com as regras, para não poluir o meio ambiente nem contaminar as pessoas.

Ao final do estudo, caso seu filho(a)/tutelado(a) tenha aceitado participar, terá todo o direito ao conhecimento dos resultados obtidos, se assim desejar.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei que meu filho(a)/tutelado(a) irá participar. A explicação que recebi tratou dos riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper a participação do meu filho(a)/tutelado(a) a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta

decisão afete seu tratamento. Eu entendi o que meu filho(a)/tutelado(a) não pode fazer durante a pesquisa e fui informado que ele será atendido sem custos para mim se ele apresentar algum problema por consequência da pesquisa. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Sendo assim, eu aceito voluntariamente a participação do filho(a)/tutelado(a) neste estudo.

Também fui informado de que há interesse em se guardar o material biológico coletado para estudos futuros e entendi as razões para isso, de forma que:

- ( ) Autorizo a guarda do material do filho(a)/tutelado(a).  
 ( ) Não autorizo a guarda do material do filho(a)/tutelado(a).

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo ou de seu representante legal para a participação neste estudo.

<b><u>Participante da Pesquisa ou responsável legal</u></b>	<b><u>Pesquisador ou pessoa por ele delegada</u></b>
<b>Nome:</b>	<b>Nome:</b>
<b>Assinatura ou impressão datiloscópica:</b>	<b>Assinatura ou impressão datiloscópica:</b>
<b>Data:</b>	<b>Data:</b>

*(Este documento será assinado em duas vias originais, ficando uma original com o pesquisador e a outra original com o participante da pesquisa)*

Testemunha imparcial (se aplicável)	Impressão datiloscópica
Nome: _____	
Assinatura: _____	
Data: _____	

## 8.4 TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TALE

### TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR DE IDADE (6 A 10 ANOS)

Avaliação dos níveis de CCL5 (RANTES) em células mononucleares por estimulação de *Plasmodium vivax*.



Olá, como vai?

Você está sendo convidado a participar de um estudo sobre anemia na malária vivax.



Você não é obrigado a participar e se não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento.

Caso tenha alguma pergunta, pode fazer para a pessoa que está te entrevistando, ela vai ajudar você.



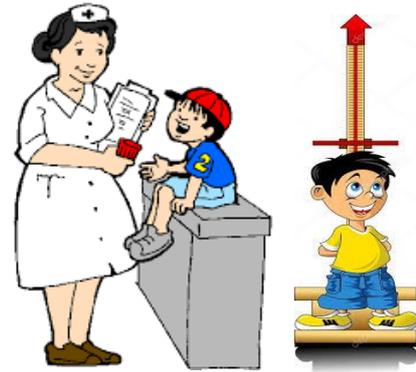
Nesta pesquisa estamos buscando entender melhor a anemia na malária vivax, em crianças e adolescentes. A identificação do RANTES pode ajudar nesse entendimento.



Além disso, não sabemos todos os processos envolvidos na anemia por malária vivax e esperamos entender alguns deles no estudo.



Se aceitar a participar do estudo, vamos fazer algumas perguntas para sabermos como está sua saúde.



Iremos verificar como está sua respiração e coração. Também vamos medir a sua altura e peso.



Vamos precisar coletar 2 gotas de sangue da ponta do dedo para exame de malária e 20 ml (duas colheres de sopa) da veia do braço.

Com seu sangue, faremos testes para comprovar nossa suspeita a respeito da anemia na malária.



Como benefício você estará contribuindo para o conhecimento da anemia na malária e ajudando a melhorar a saúde dos pacientes.



Quais os riscos?

Você pode sentir vergonha, medo, dor leve onde foi retirado o sangue que deve durar apenas alguns instantes. A quantidade de sangue tirada é muito pequena e não tem nenhum risco grave à sua saúde.

**Fique tranquilo, a equipe é bastante treinada e experiente para realizar todos os procedimentos.**



Depois da coleta do sangue, a amostra será identificada por números e/ou letras para garantir que seu nome ou qualquer informação sua não sejam reveladas a outras pessoas.



Você e seus pais ou responsáveis não gastarão, nem ganharão dinheiro por participar desta pesquisa. Você tem o direito de solicitar indenização no caso de se sentir materialmente ou fisicamente prejudicado em algum momento da realização deste projeto.

*Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não abrirá mão de nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.*



Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com a **Dra. Gisely Cardoso de Melo** responsável pelo projeto e com a **Ana Carolina Shuan Laco** na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, especificadamente no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- 2º andar em Manaus (de segunda a sexta feira. Das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo **telefone (92) 99159-8604/(92)99505-3905** (qualquer dia e horário). E poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD sempre que quiser por e-mail: [cep@fmt.am.gov.br](mailto:cep@fmt.am.gov.br); endereço: na Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM; telefone: (92) 2127-3572. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

Nós gostaríamos de sua permissão para guardar o restante da amostra de sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Isto pode exigir o armazenamento por 5 anos do sangue em laboratórios da FMT-HVD. Para isso, o sangue será guardado com um código e não deverá identificar seu nome. O restante do material que não for utilizado no estudo será descartado de acordo com as regras, para não poluir o meio ambiente nem contaminar as pessoas.

Eu entendi o que me foi explicado e aceito participar da pesquisa. Também fui informado de que há interesse em se guardar o material biológico coletado para estudos futuros e entendi as razões para isso, de forma que:

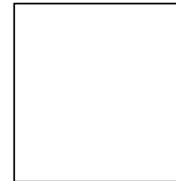
( ) Autorizo a guarda do material.                      ( ) Não autorizo a guarda do material.

**Participante da Pesquisa**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_



Polegar direito

**Pesquisador ou pessoa por ele delegada**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

*(Este documento será assinado em duas vias originais, ficando uma original com o pesquisador e a outra original com o participante da pesquisa)*

Testemunha imparcial (se aplicável)	Impressão datiloscópica
Nome: _____	
Assinatura: _____	
Data: _____	

## TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O MENOR DE IDADE (11 A 16 ANOS)

**Estudo:** Avaliação dos níveis de CCL5 (RANTES) em células mononucleares por estimulação de *Plasmodium vivax*.

**Patrocinador:** FAPEAM

**Centro de Pesquisa:** Fundação de Medicina Tropical Doutor Vieira Dourado – FMT-HVD

**Pesquisadora responsável:** Ana Carolina Shuan Laco

**Pesquisador Principal:** Dra. Gisely Cardoso de Melo

**Telefone de contato:** (92) 99505-3905/9159-8604

### I. Dados sobre a Pesquisa:

#### 1) Introdução

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), do projeto de pesquisa “Avaliação dos níveis de CCL5 (RANTES) em células mononucleares por estimulação de *Plasmodium vivax*.”, porque você está doente de malária. A Dra. Gisely Cardoso de Melo é a pessoa responsável por este estudo.

O estudo e este termo foram aprovados pela Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Neste termo são fornecidas as informações corretas e suficientes para que você possa avaliar e julgar se tem interesse ou não em participar deste estudo. Leia este documento cuidadosamente e esclareceremos quaisquer dúvidas que possam surgir após a explicação. Além disso, você pode consultar as pessoas de confiança.

Você deverá assinar esse termo em duas vias, uma ficará com você e outra conosco. Todas as páginas devem ser rubricadas ou conter a impressão digital do participante da pesquisa e do pesquisador responsável.

#### 2) Participação Voluntária

A participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento. Essa decisão não prejudicará de forma alguma o seu atendimento, tratamento ou acompanhamento na FMT-HVD.

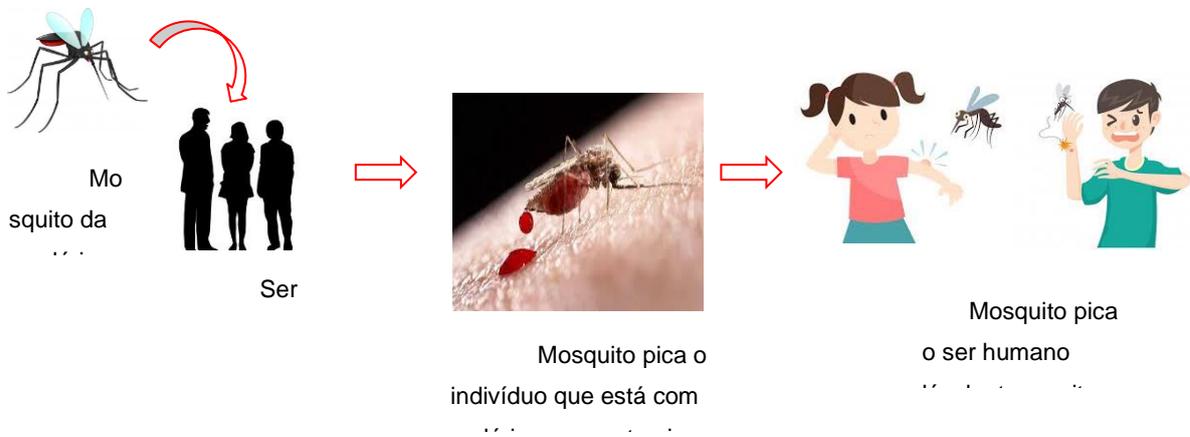
Mesmo que o seu responsável permita a sua participação na pesquisa, você não é obrigado a participar se não quiser. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

#### 3) Descrição Geral do Estudo

Nesta pesquisa estamos buscando entender melhor os processos envolvidos anemia por malária por *P. vivax*, especificadamente em crianças e adolescentes. A identificação do CCL5 pode contribuir para o estudo da doença, permitindo o uso de



um melhor tratamento para impedir o desenvolvimento da malária grave em crianças mais jovens. Abaixo tem o ciclo da malária, para você entender melhor a doença:



### CICLO DA MALÁRIA

Durante a fase de triagem, depois de tirar todas suas dúvidas e assinar esse termo, você vai fazer uma entrevista onde vamos perguntar informações sobre a sua vida, o lugar onde mora e o histórico de saúde, bem como os medicamentos que toma no dia-a-dia.

Exame físico e avaliação clínica: você passará por um exame físico na inclusão no estudo. Examinaremos: frequência da sua respiração e coração, pressão arterial e pulso. Faremos medições da altura e peso, perguntas sobre sua saúde e uso de medicamentos.

Coleta de sangue: será realizada a coleta para exame de malária (ponta do dedo) e amostra de sangue, aproximadamente 20 ml (cerca de duas colheres de sopa) da veia do braço. Com seu sangue, faremos testes para comprovar nossa suspeita sobre a anemia na malária. Representação da coleta de sangue a seguir:



### COLETA DE SANGUE



#### 4) Benefícios e Riscos Derivados da Participação no Estudo

Benefícios: você estará contribuindo para o conhecimento da anemia na malária e ajudando a melhorar a saúde dos pacientes. A realização do estudo poderá ter implicações importantes em um contexto de estabelecer estratégias mais precisas de tratamento e melhor gerenciamento de casos graves por anemia em crianças e adolescentes infectados com malária por *P. vivax*. Apesar de sua enorme importância para a saúde, processos envolvidos na anemia por malária por *P. vivax* permanecem incompletos e espera-se que estes possam ser esclarecidos por meio do estudo.

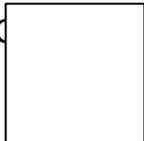
Riscos: É possível que, durante a participação na pesquisa você sinta algum incômodo e desconforto. Estes podem ser:

Risco de origem psicológica, intelectual e emocional causando vergonha, desconforto, medo, estresse, quebra de sigilo e anonimato. Para minimizar esses riscos, em nenhum momento seu nome ou dados pessoais serão revelados a terceiros, nem mesmo quando os resultados do estudo forem divulgados.

Coleta de sangue: Existe a possibilidade de risco na coleta do exame de malária (picada no dedo) ou pela coleta de amostra de sangue na veia do braço. Mas qualquer dor deve durar apenas alguns instantes. Existe um risco muito pequeno de infecção onde o sangue for coletado, mas qualquer infecção será monitorada e tratada. Qualquer problema, entre em contato com a Ana Carolina Shuan, responsável da pesquisa na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado especificadamente Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- 2º andar (de segunda a sexta feira. Das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92)99505-3905 (qualquer dia e horário) ou no e-mail [shuancarolina@gmail.com](mailto:shuancarolina@gmail.com). A responsável irá verificar o andamento da situação. A amostra de sangue colhida é muito pequena e não representa nenhum risco à saúde.

Riscos desconhecidos: Outros efeitos colaterais ainda não conhecidos neste momento podem acontecer durante o estudo. Durante o estudo, será informado sobre quaisquer novas informações que possam afetar sua decisão de permanecer no estudo.

#### 5. Acompanhamento e assistência

Os pesquisadores responsáveis por este estudo estarão disponíveis, você também poderá também fazer contato com a Dra. Gisely Cardoso de Melo ou Ana Carolina Shuan Laco na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado especificadamente Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- 2º andar (de segunda a sexta feira. Das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 99159-8604/(92)99505-3905 (qualquer dia e horário) ou no e-mail [cardosogisely@gmail.com](mailto:cardosogisely@gmail.com) e [shuancarolina@gmail.com](mailto:shuancarolina@gmail.com). Você também pode entrar em contato com o (  ) Ética em Pesquisas (CEP) da

Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado; e-mail: cep@fmt.am.gov.br; endereço: na Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM; telefone: (92) 2127-3572. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

## **6. Confidencialidade**

Todas as informações coletadas no estudo que possam ferir a sua privacidade serão anonimizadas (ocultadas) e, caso seja necessário encaminhamento de suas informações jamais saberão nada sobre sua identidade. Sob nenhuma circunstância serão feitas cópias de seu prontuário médico.

Logo após a coleta do sangue, as amostras receberão um código de identificação. Todos os documentos e formulários que você preencher receberão este código e apenas pessoal autorizado terá acesso a ele. Além disso, a equipe é treinada para o acolhimento e a realização de entrevistas de forma segura.

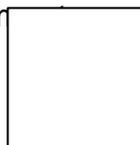
Qualquer informação obtida em relação a este projeto que possa identificá-lo será mantida em sigilo e não será compartilhada sem a sua permissão, exceto quando exigido por lei. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome ou do não será citado. Em caso de dúvidas sobre a coleta e o uso de suas informações, entre em contato com o pesquisador do estudo.

## **7. O que ocorre com as informações obtidas no estudo**

Se decidir por participar no estudo, é possível que informações relevantes sejam obtidas na análise das amostras biológicas. De acordo com as leis atuais, você tem o direito de ser informado dos dados obtidos no decorrer do estudo. Caso seja solicitado, poderemos lhe fornecer informações sobre o estudo no que diz respeito ao uso dos dados.

## **8. Ressarcimento/Indenização**

Você e seus pais ou responsáveis não gastarão, nem ganharão dinheiro por participar desta pesquisa. Você tem o direito de solicitar ressarcimento ou indenização no caso de se sentir materialmente ou fisicamente prejudicado em algum momento da execução deste projeto.



*Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não abrirá mão de nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.*

## **II. Assinatura do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido**

Nós gostaríamos de sua permissão para guardar o restante da amostra de sangue para ser usado em estudos sobre malária no futuro. Isto pode exigir o armazenamento por 5 anos do sangue em laboratórios da FMT-HVD. Para isso, o sangue será guardado com um código e não deverá identificar seu nome. O restante do material que não for utilizado no estudo será descartado de acordo com as regras, para não poluir o meio ambiente nem contaminar as pessoas.

Uma via original deste documento ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com a Dra. Gisely Cardoso de Melo responsável pelo projeto e com a Ana Carolina Shuan Laco na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, especificadamente no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema- 2º andar em Manaus (de segunda a sexta feira. Das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 99159-8604/(92)99505-3905 (qualquer dia e horário). E poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD sempre que quiser por e-mail: cep@fmt.am.gov.br; endereço: na Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM; telefone: (92) 2127-3572. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

Eu entendi o que me foi explicado e aceito participar da pesquisa. Também fui informado de que há interesse em se guardar o material biológico coletado para estudos futuros e entendi as razões para isso, de forma que:

( ) Autorizo a guarda do material.

( ) Não autorizo a guarda do material.

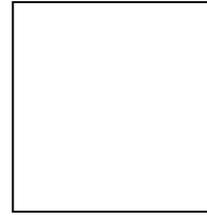


**Participante da Pesquisa**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_



Polegar

**Pesquisador ou pessoa por ele delegada**

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

*(Este documento será assinado em duas vias originais, ficando uma original com o pesquisador e a outra original com o participante da pesquisa)*

<b>Testemunha imparcial (se aplicável)</b>	<b>Impressão datiloscópica</b>
Nome: _____ Assinatura: _____ Data: _____	

## 8.5 Procedimento Operacional Padrão – POP – Isolamento de PBMC

<b>Autor (es):</b>	Carlos Eduardo Morais (FMT-HVD)
	Flavia Alencar Fontenelle (FMT-HVD)

<b>Histórico de revisões</b>	<b>Versão nº1</b>	<b>Data da revisão</b>	<b>Descrição</b>

<b>Cópias distribuídas para:</b>	<b>Local</b>	<b>nº de cópias</b>

*Eu afirmo que li, entendi e concordo com o presente POP.*

<b>Nome</b>	<b>Assinatura</b>	<b>Data</b>
Gisely Cardoso de Melo		
Larissa Wanderley Brasil		
Cecilia Carvalho		

### 1. CONDIÇÕES GERAIS

As amostras de sangue coletadas nas visitas D0, D28, D90 ..... devem seguir este procedimento para isolamento de PBMC. A coleta, transporte e armazenamento temporário destas amostras antes deste procedimento devem seguir as normas estabelecidas no POP XXX – Transporte, processamento e armazenamento de amostras biológicas.

## 2. OBJETIVO

Este documento tem por objetivo descrever e normatizar as exigências de manuseio dos tubos contendo sangue total em XXXXX e posterior procedimento para isolamento, congelamento e armazenamento de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) de sangue total.

## 3. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se ao processamento de amostras de sangue do Projeto XXXXXXXXX coletadas nas visitas D0, D28, D90 .....

## 4. DEFINIÇÕES

**Sangue total:** Amostra de sangue coletada do doador, antes de ser submetida ao fracionamento. Apresenta todos os componentes sanguíneos.

## 5. SIGLAS

**EDTA K3:** Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico **DMSO** – Dimetilsulfoxido  
**g:** A força centrífuga, medida como "g" (gravidade) ou RCF (do inglês, Relative Centrifugal Force). **RPM:** Relative Centrifugal Force. **mL:** Mililitro **µL:** Microlitro

**PBS:** Salina tamponada com fosfato

**PBMC:** Células mononucleares do sangue periférico

**SFB:** Soro fetal bovino

## 6.

## 7. RESPONSABILIDADES

Membros das equipes laboratoriais do Projeto de Pesquisa XXXXXXXXXX.

## 8. MATERIAIS E REAGENTES

- a) Histopaque – 1077 (Sigma) ou Ficoll Plus (Ge HealthCare)
- b) Azul de Trypan (0.4%)

- c) PBS – Salina Tamponada com fosfato
- d) Soro Fetal Bovino – Inativado e estéril
- e) Etanol 70%
- f) Dimetilsulfóxido (DMSO), cell-culture grade
- g) Pipetas sorológicas de 10 mL
- h) Pipetador automático para pipetas sorológicas
- i) Pipetas de 20 µL, 200 µL, 1000 µL
- j) Ponteiras estéreis, livres de DNase e RNase, com filtro (20µL, 200µL, 1000µL)
- k) NALGENE® “**Mr. Frosty**”, Biocision® “CoolCell”, or Stratagene StrataCooler® para o congelamento gradual de PBMC
- l) Álcool isopropílico
- m) Microscópio
- n) Contador manual (e.g. Hemacytometer) e/ou Câmara de Neubauer
- o) Tubos cônicos de 15 mL, estéril, polipropileno.
- p) Tubos cônicos de 50 ml, estéril, polipropileno.
- q) Microtubos de 0,5 ou 1,5 mL
- r) Criotubos de polipropileno (2mL), estéril, de tampa de rosca interna, graduados, “selfstanding”, da marca “**Corning**”, formulados para suportar a imersão em Nitrogênio líquido ou outra marca que atenda as especificações.
- s) Etiquetas de identificação
- t) Caixas 9x9 ou 5x5 próprias para o armazenamento nos tanques de nitrogênio.
- u) Cabine de segurança Classe II
- v) Centrífuga com capacidade de 300 a 1800 x g, com rotor de ângulo móvel (SwingBucket).
- w) Refrigerador (2 a 8°C)
- x) Freezer -20°C
- y) Freezer -80°C (±2)
- z) Gelo picado (-20°C) aa) Tanque de nitrogênio líquido

## PROCEDIMENTOS

Todos os procedimentos devem ser realizados em ambiente estéril, sendo utilizados material descartável estéril, soluções estéreis e ponteiras com barreira estéreis.

### 8.1. Preparação de materiais:

Para agilizar o fluxo de trabalho os seguintes materiais podem ser preparados previamente à chegada da amostra ao laboratório (quantidades para cada paciente):

- Identificar 6 criotubos para armazenamento do PBMC
- 3 tubos cônicos de 15 mL contendo 4 mL de solução Histopaque-1077
- 1 tubo cônico de 50 mL vazio (para transferência do sangue total)

- 4 tubos cônicos de 15 mL vazios
- 1 tubo de 0,5 ou 1,5 mL contendo 90  $\mu$ L de Azul de Trypan

## 8.2. Amostra de sangue

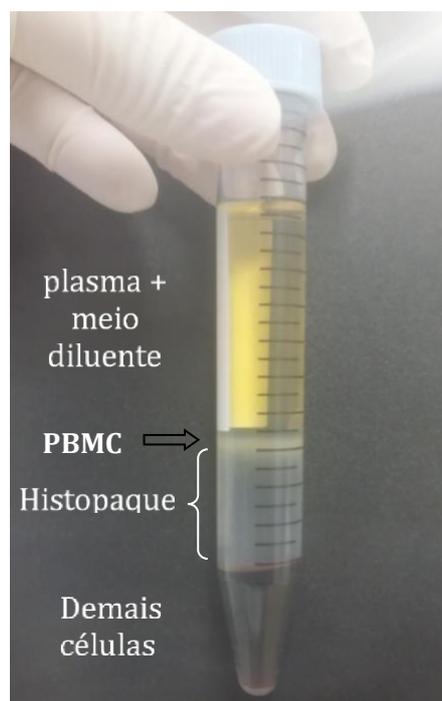
Devem ser recebidos tubos de sangue total contendo XXXXX com volume total de aproximadamente 20 mL. O processamento do sangue total deve ocorrer imediatamente após sua chegada no laboratório.

Documentar qualquer característica inesperada observada nos tubos contendo amostra de sangue como: coágulos, hemólise, volume insuficiente ou excessivo, ausência de identificação (descartar tubo não identificado), tubos com lotes diferentes, tubos com data de validade vencida, etc.

## 8.3. Isolamento de PBMC

- a. Com auxílio de uma pipeta, transferir o sangue total contido nos tubos para o mesmo tubo cônico de 50 mL. Anotar o volume total de sangue coletado.
- b. Acrescentar 50% do volume de sangue total coletado de meio PBS estéril para diluir o sangue (proporção 2:1). Homogeneizar cuidadosamente, evitando formação de bolhas.
- c. Para cada paciente, preparar 3 tubos cônicos de 15 mL contendo 4 mL de solução gradiente de densidade (Ficoll ou histopaque).
- d. Com auxílio de uma pipeta sorológica de 10 mL, adicionar 1/3 do volume de sangue diluído em meio PBS (aproximadamente 10 mL) sobre cada tubo contendo a solução XXXXXX. Para tal, o sangue deve ser adicionado em velocidade lenta, na parede do tubo, para a formação do gradiente. Ao final da realização do gradiente deveremos visualizar duas fases bem definidas, sendo a inferior contendo XXXXXX e a superior contendo sangue diluído.
- e. Feche bem o tubo e centrifugue a 500 x g (1650RPM), durante 30 minutos a 20°C, **em baixa aceleração e sem freio (a temperatura de centrifugação, assim como aceleração e freio devem ser respeitadas, caso contrário o procedimento pode não funcionar).**
- f. Ao finalizar a centrifugação, observe a formação da nuvem de células (Fig. 1) e transfira os tubos cuidadosamente para o fluxo laminar, evitando perturbar o gradiente.

**Figura 1.** Imagem do tubo contendo o gradiente de densidade com as diferentes fases



obtidas após centrifugação (plasma/meio diluente, PBMC, XXXXXX e demais células como hemácias e polimorfonucleares). A seta indica a nuvem de PBMC que deve ser coletado com cuidado para não recolher células presentes na parte inferior do tubo.

g. Com auxílio de uma pipeta sorológica, remova o excesso de plasma + meio diluente da camada superior do tubo.

h. Com o uso de uma pipeta sorológica ou de transferência, colete o anel de células PBMC e transfira para um novo tubo de 15 mL. Nesta etapa, as células coletadas devem ser transferidas para novos tubos cônicos.

i. Complete os tubos cônicos contendo a suspensão de células para 14 mL utilizando

meio

PBS estéril, homogeneizando cuidadosamente

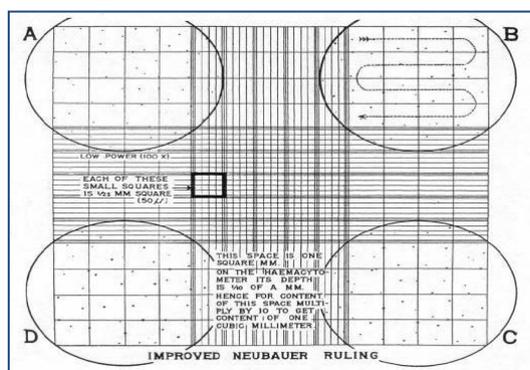
com uma pipeta.

- j. Centrifugue por 10 minutos a 500 x g com o uso do freio a 20 °C.
- k. Em seguida, inverta os tubos cônicos desprezando o sobrenadante com cuidado para não ressuspender o pellet de células no fundo do tubo.
- l. Feche os tubos e desfaça o pellet com leves batidas com o dedo no fundo do tubo. Utilizando um pequeno volume (aproximadamente 2-3 ml) ressuspenda e transfira este pequeno volume para um único novo tubo cônico.
- m. Repita a etapa de lavagem completando o volume para 14 ml de meio PBS estéril (10 minutos a 500 x g com o uso do freio, a 20°C).
- n. Em seguida, inverta o tubo cônico desprezando o sobrenadante com cuidado para não ressuspender o pellet de células no fundo do tubo, e com o auxílio de uma pipeta automática aspire o restante de sobrenadante que fica na borda do tubo mantendo-o invertido.
- o. Feche o tubo e desfaça o pellet com leves batidas com o dedo no fundo do tubo.
- p. Ressuspenda as células em 5 mL de meio PBS e homogenize bem.
- q. Mantenha a suspensão celular refrigerada em banho de gelo durante todo o período da contagem até o momento do congelamento.

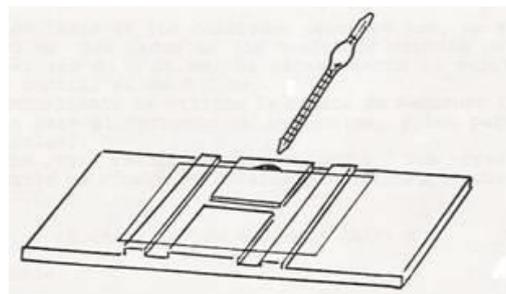
#### 8.4. Contagem de células

- a. Montar uma câmara de Neubauer com cuidado para que a mesma esteja totalmente seca no local onde será inserida a amostra

- b. Para a contagem e avaliação da viabilidade, dilua 10  $\mu\text{L}$  da suspensão celular (**bem homogênea**) em 90  $\mu\text{L}$  de azul tripan 0,4%. Obs. Garanta que a amostra esteja bem homogênea antes de retirar a alíquota para diluir em azul de tripan.



- c. Homogeneizar bem a diluição e carregar o volume necessário para preencher o espaço entre a câmara e a lamínula, aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  (Fig. 2).



**Figura 2:** Câmara de Neubauer

**Figura 3:** Esquema para contagem de células na câmara de Neubauer

- d. Aguarde 30 segundos para que as células sedimentem e estejam no mesmo plano. Faça a contagem das células viáveis (não coradas) e as não viáveis (coradas em azul) utilizando microscópio de luz (objetiva de 40x). A contagem deverá ser realizada nos 4 quadros (A, B, C e D) conforme a Figura 3.

**Cuidado** para não incluir hemácias na contagem do PBMC. Em algumas ocasiões, algumas hemácias podem ser observadas, porém menores que as células mononucleares e podem ser distinguidas pelo tamanho.

- e. Após a contagem realize os seguintes cálculos:

1) **Concentração de células viáveis/mL =**

*Número Total de células viáveis (A + B + C + D)*

*Diluição)*  $\times 10^4$  (Fator de correção)  $\times 10$  (Fator de

4 (número de quadrantes contados)

- 2) **Número total de células viáveis** = Concentração de células viáveis/mL x 10  
(volume da suspensão de células)
- 3) **% viabilidade celular** =  $\frac{\text{Número total de células viáveis} \times 100}{\text{Número total de células viáveis} + \text{Número total de células mortas}}$

4) **Volume de solução de congelamento (mL)** =  $\frac{\text{número total de células viáveis}}{5 \times 10^6}$

$$5 \times 10^6$$

O número total de células viáveis esperado após o processamento de 20 mL de sangue total é de aproximadamente  $20 \times 10^6$  de PBMC e a viabilidade celular deve estar acima de 90%. Rendimentos muito abaixo ou muito acima de  $20 \times 10^6$  de células ou viabilidade celular abaixo de 90% podem sugerir problemas com o processamento da amostra. Neste caso, recomenda-se uma nova diluição (pode-se usar outro fator de diluição) seguida de nova contagem.

Para volume de suspensão de congelamento, utilizar volume mais próximo de 1ml

(arredondar volume para baixo). Registrar quantidade de células/ml em cada criotubo.

### 8.5. Congelamento de PBMC

- Após a contagem de células, preparar volume necessário de solução de congelamento, que consiste de 90% SBF e 10% DMSO. Preparar 1 mL a mais do volume necessário calculado no passo 8.5.e. Homogeneizar e manter a solução estéril em banho de gelo por pelo menos 10 minutos ou até a utilização.
- Centrifugue a suspensão celular por 10 minutos a 500 x g, a 4° C, com o uso de freio.
- Durante a centrifugação, prepare os criotubos com as etiquetas apropriadas e os mantenha-os sem as tampas dentro do fluxo laminar para receber as células.
- Após centrifugação inverta o tubo cônico desprezando o sobrenadante com cuidado para não ressuspender as células no fundo do tubo, e com o auxílio de

uma pipeta automática aspirar o restante do sobrenadante que fica na borda do tubo mantendo-o invertido.

- e. Ressuspenda as células com solução de meio de congelamento gelado utilizando o volume definido pelo cálculo acima (concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL).

Certificar que

a amostra estará bem homogênea para garantir a quantidade exata de células por criotubo.

- f. Distribua rapidamente 1 mL da suspensão celular em cada criotubo ( $5 \times 10^6$  células/criotubo).

- g. Feche os criotubos e transfira imediatamente para o Mr. Frosty previamente acondicionados a 4° C. Feche o container e o coloque no freezer -80° C até o dia seguinte.

Após a adição da solução de congelamento, deve-se trabalhar rapidamente até a transferência das células para o freezer -80° C, pois a solução de DMSO é tóxica e pode afetar a viabilidade celular.

- h. No dia seguinte, transfira os criotubos do Mr. Frosty para uma caixa 10x10 ou 5x5 próprias para o armazenamento nos tanques de nitrogênio, previamente acondicionada a -80° C ou no nitrogênio líquido.

O Mr. Frosty deverá ser mantido a 4° C quando não estiver sendo utilizado. Observar se o nível de isopropanol encontra-se correto e que o mesmo tenha sido substituído a cada 5 ciclos de congelamento a -80° C.

- i. Armazenar a caixa contendo amostras no tanque de nitrogênio líquido, mantendo anotação da localização de cada tubo no tanque.

Versão 2.0 - 12 de Julho de 2021

Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro.  
Manaus - Amazonas - Brasil - 69040-000  
+55 (92) 2127-3555

### FORMULÁRIO DE ISOLAMENTO DE CÉLULAS – PBMC

ID do participante (PID):		
Data de coleta:	Hora da coleta:	
Data de início do processamento:	Hora de início do processamento:	Processado por:

Reagentes	Fabricante	Lote	Data de validade
DMSO			
FBS			
Hank's ou PBS			
Meio de gradiente de densidade			
CPS	Data que foi preparado	Data de validade	Quem preparou

Tipo do tubo de amostra	NaHep
Condição do sangue	NORM / HEMO / COAG / LIPE
Volume de sangue total utilizável	mL
Método de contagem (nome do instrumento ou contagem manual)	
Volume da suspensão de contagem com Hank's ou PBS ( <b>V</b> )	mL
Concentração média de contagem de células ( <b>C</b> )	x 10 <sup>6</sup> células/mL
Número total de células ( <b>T</b> ) = <b>C x V</b>	x 10 <sup>6</sup> células
Calcular o rendimento de célula / mL do sangue total (Verificação de QC)=(T/Volume de sangue total útil)	x 10 <sup>6</sup> células/mL
Calcular o volume da nova suspensão CPS estimada ( <b>V1</b> )=( <b>T/4x10<sup>6</sup> células/mL</b> )( <b>1mL</b> )	mL
Calcular o volume de nova suspensão CPS final ( <b>Vf</b> ), arredondando para BAIXO para o mL inteiro mais próximo	mL
Calcule o número real de células por alíquota <b>N2 = (T/Vf) x V2</b> ; (V2 = 1mL)	x 10 <sup>6</sup> cel/alíquota
Data e hora de congelamento	
Número total de alíquotas congeladas	
Data da transferência dos criotubos para a caixa	

ID do participante (PID):

Contagem de hemocítômetro	Contagem total	Contagem viáveis	Contagem não viáveis
Quadrado N° 1 (células/mm <sup>2</sup> )			
Quadrado N° 2 (células/mm <sup>2</sup> )			
Quadrado N° 3 (células/mm <sup>2</sup> )			
Quadrado N° 4 (células/mm <sup>2</sup> )			
Média de contagem de células por quadrado (células/mm <sup>2</sup> )			
Fator de diluição PBMC (1:DF)			
Fator de hemocítômetro para células/mL	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
Concentração da contagem de células (C) = (média de células/mm <sup>2</sup> )(DF)( 10 <sup>4</sup> ); converter em 10 <sup>6</sup> células/mL	Não se aplica	x 10 <sup>6</sup> células/mL	Não se aplica
% viabilidade = (células viáveis/total de células)(100)	Não se aplica	%	Não se aplica

Comentários e desvios de protocolo: