

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CÉLULAS T ANTÍGENO-ESPECÍFICA NA
INFEÇÃO PELO *Plasmodium vivax***

por

Camila Medeiros Costa

Belo Horizonte - MG

2022

DISSERTAÇÃO

MCS - IRR

C. M. COSTA

2022

CAMILA MEDEIROS COSTA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CÉLULAS T ANTÍGENO-ESPECÍFICA NA
INFEÇÃO PELO *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli
Coorientação: Dr. Gregório Guilherme Almeida

Belo Horizonte - MG

2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

C823a
2022

Costa, Camila Medeiros.

Avaliação da resposta de células T antígeno-específica na infecção pelo *Plasmodium vivax*/ Camila Medeiros Costa. – Belo Horizonte, 2022.

XVI, 98 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 85 – 98

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária vivax. 2. Imunidade adaptativa. 3. Peptídeo. I. Título. II. Antonelli, Lis Ribeiro do Valle (Orientação). III. Almeida, Gregório Guilherme (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.93

CAMILA MEDEIROS COSTA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE CÉLULAS T ANTÍGENO-ESPECÍFICA NA
INFECÇÃO PELO *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli
Coorientação: Dr. Gregório Guilherme Almeida

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (IRR/Fiocruz Minas) - Presidente

Profa. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (IRR/Fiocruz Minas) - Titular

Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima (USP) - Titular

Profa. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (IRR/Fiocruz Minas) – Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 07/03/2022

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.

Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por guiar meu caminho durante a realização desta pesquisa. A fé foi combustível para minha disciplina, persistência e força. Obrigada por todas as bênçãos que recaíram sobre mim e permitiu que eu chegasse até aqui.

À minha família, especialmente meus pais Tânia e Ademir, e minha irmã Sílvia, que fizeram de tudo para tornar os momentos difíceis mais brandos. Obrigada pelo apoio, força e amor incondicional. Sem vocês, a realização desse sonho não seria possível.

À minha orientadora Lis, pelas oportunidades durante o mestrado e por exigir muito mais do que eu me imaginava capaz. Minha eterna gratidão por compartilhar sua sabedoria e seu tempo. Obrigada também por todo acolhimento, conversas e por me ouvir sempre que busquei ajuda. Você é uma pesquisadora incrível, Lis! Saiba que foi e continuará sendo essencial em minha formação.

Ao meu coorientador Greg, não só pela dedicação e por transmitir seu saber com muito profissionalismo, inclusive quando está ensinando *R*, mas pelo carinho comigo. Obrigada por ter deixado meus dias e minhas noites mais leves. Já falei pessoalmente, mas saiba que você e Lis são minhas inspirações de profissionais.

Ao Rafa, por todo amor, carinho e apoio durante essa etapa e pela compreensão dos meus momentos de ausência.

Aos meus amigos de Ita/BH, que mesmo de longe, me incentivaram e vibraram com minhas conquistas.

Ao laboratório de Biologia e Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias (BIP), pela infraestrutura que permitiu a execução desse projeto e meus estudos diários. O BIP se tornou minha 2ª casa em muito pouco tempo.

Aos pesquisadores e jovens pesquisadores do BIP, em especial às madaminhas e à Gabi, pela amizade, cumplicidade e por ouvir meus desabafos nesses dois anos.

Ao Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores (GIPB) e aos pesquisadores envolvidos, por terem aberto as portas do laboratório a mim e por todo suporte necessário para realização dos experimentos.

Aos diretores do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), Dr. Mauro Shugiro Tada e Dr. Dhélio Pereira, por viabilizar as etapas iniciais do projeto.

Aos pacientes e controles do projeto, conhecidos ou desconhecidos, que consentiram em participar, obrigada pela colaboração durante sua participação voluntária neste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, *National Institutes of Health* (NIH), *International Center of Excellence in Malaria Research* (ICEMR) e Instituto René Rachou - Fiocruz Minas.

Enfim, obrigada a todas as pessoas que torceram por mim e fizeram parte dessa etapa decisiva de minha vida.

RESUMO

A malária é uma doença potencialmente grave, transmitida por vetores *Anopheles* infectados com protozoários do gênero *Plasmodium*. No Brasil, cerca de 89,3% dos casos ocasionados pelo *Plasmodium vivax*. Embora a malária não induza uma proteção esterilizante de longo prazo, sabe-se que a resposta imune adaptativa humoral e celular são essenciais no controle do parasito. Entretanto, tem sido difícil mensurar a imunidade celular para *P. vivax*, principalmente devido à falta de antígenos adequados ou ao pequeno número de epítomos utilizados nos estudos. Por isso, com a finalidade de obtê-la de forma abrangente, o presente estudo visou construir uma biblioteca de 310 peptídeos de *P. vivax* (MPv310), envolvendo os antígenos com maior reconhecimento pelo sistema imune humano e, a partir dela, avaliar a resposta antígeno-específica de células T CD4⁺ e de suas subpopulações de memória (*naive*, CM, EM e efetora), baseada na produção de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-17A) e expressão de marcadores de ativação (CD69 e CD154). Para isso, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados com o *P. vivax*, sintomáticos antes (SY-I) e após (SY-R) o tratamento, assintomáticos (ASY) e de indivíduos saudáveis (CTL) foram coletadas. Os linfócitos foram estimulados *in vitro* com MPv310 e analisados por citometria de fluxo. Os resultados demonstram que a biblioteca de peptídeos de *P. vivax* induziu aumento na frequência de células T CD4⁺ de memória produtoras de IFN- γ e TNF em ASY. Além disso, houve aumento da expressão simultânea de IFN- γ e TNF em células T CD4⁺ em SY-R e ASY e em células T CD4⁺ de memória em ASY. Com relação aos marcadores de ativação, observou-se que MPv310 induziu a expressão de CD69 em células T CD4⁺ em SY-R e ASY e em células T CD4⁺ de EM e efetoras em ASY. Por outro lado, houve aumento de células T CD4⁺ e suas subpopulações expressando CD154 em indivíduos sintomáticos. A frequência de células T CD4⁺CD69⁺CD154⁺ também foram mais altas em SY-I e SY-R. A caracterização fenotípica realizada neste estudo sugere que a biblioteca de peptídeos foi capaz de ativar células T em indivíduos sintomáticos e assintomáticos, evidenciando a presença de células T de memória específicas para os antígenos de *P. vivax* selecionados. Assim, a biblioteca de peptídeos utilizada nesse estudo agregou conhecimento sobre a resposta imune adaptativa de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax*, apresentando diferentes formas clínicas da doença.

Palavras-chave: Peptídeos, *Plasmodium vivax*, Imunidade.

ABSTRACT

Malaria is a potential severe disease transmitted by *Anopheles* vectors infected with protozoa of the genus *Plasmodium*. In Brazil, about 89.3% of cases were caused by *Plasmodium vivax*. Although *Plasmodium* infection does not induce long-term sterilizing protection, it is known that adaptive humoral and cellular immune responses are essential in controlling the parasite burden. The evaluation of the cellular immunity to *P. vivax* is impacted mainly due to the lack of well-defined antigens or by the low number of epitopes used in the studies. The overall aim of this project is to build the pool of 310 peptides from *P. vivax* (MPv310), identify antigens for which clones are generated in symptomatic and asymptomatic infection and characterize the antigen-specific response during malaria. This project will provide information on the mechanisms of immunological memory and protection against *P. vivax*, aiming to identify new tools for diagnosis and immunotherapy. Thus, the aim of this study was to build a library of 310 *P. vivax* peptides (MPv310) and to assess the response of antigen-specific CD4⁺ T cells and their memory subpopulations (*naive*, CM, EM and effector) from *P. vivax*-infected focusing on the production of cytokines (IFN- γ , TNF and IL-17A) and expression of activation markers (CD69 and CD154). To do so, blood samples were collected from symptomatic patients infected with *P. vivax*, before (SY-I) and after (SY-R) treatment, asymptomatic volunteers and healthy controls (CTL). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated *in vitro* with MPv310 and analyzed by flow cytometry. The results demonstrate that the *P. vivax* peptide library induced an increase in the frequency of IFN- γ and TNF-producing memory CD4⁺ T cells in ASY. In addition, there was an increase in the frequency of CD4⁺ T cells producing simultaneously IFN- γ and TNF in SY-R and ASY and in the frequency of memory CD4⁺ T cells also producing IFN- γ and TNF in ASY. Regarding activation markers, it was observed that MPv310 induced the expression of CD69 in CD4⁺ T cells in SY-R and ASY and in EM and effector CD4⁺ T cells in ASY. On the other hand, there was an increase in CD154 expressing CD4⁺ T cells and their memory compartments in symptomatic patients. The frequency of CD69⁺CD154⁺CD4⁺ T cells was also higher in SY-I and SY-R than in CTL. Our results show that the peptide library was able to reveal the presence of antigen-specific T cell response in individuals with symptomatic and asymptomatic infection due to *P. vivax*. Thus, the peptide library used in this study has provided new knowledge about the adaptive immune response during *P. vivax* infection, presenting different clinical forms of the disease.

Keywords: Peptides, *Plasmodium vivax*, Immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países endêmicos para malária baseado no risco estimado de contrair a doença.	18
Figura 2 - Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2020.	22
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> na malária humana.	25
Figura 4 - Esquema de ativação antígeno-específica de célula T.	32
Figura 5 - Mapa de risco de malária no estado de Rondônia em 2020.	40
Figura 6 - Fluxograma representativo sobre a seleção de epítomos para a construção da biblioteca de peptídeos MPv310.	42
Figura 7 - Estratégia de <i>gating</i> para linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico.	46
Figura 8 - Produção de IFN-γ em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	50
Figura 9 - Produção de IFN-γ em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	52
Figura 10 - Expressão de TNF em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	54
Figura 11 - Produção de TNF por subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	57
Figura 12 - Produção de IL-17A por células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	57
Figura 13 - Produção de IL-17A por subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	59
Figura 14 - Produção de IFN-γ e TNF em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	60
Figura 15 - Co-expressão de IFN-γ e TNF em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	62
Figura 16 - Expressão de CD69 em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	64
Figura 17 - Expressão de CD69 em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310), avaliada separadamente por experimento.	64
Figura 18 - Expressão de CD69 em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	66

Figura 19 - Frequência de células T CD4⁺CD154⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	67
Figura 20 - Expressão de CD154 em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	70
Figura 21 - Expressão concomitante de CD69 e CD154 em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	70
Figura 22 - Co-expressão de CD69 e CD154 em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).	73
Figura 23 - Expressão de marcadores de ativação em células T CD4⁺ estimuladas com o pool de peptídeos (MPv310).	73
Figura 24 - Sumário dos resultados.	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos e fluorocromos utilizados para imunofenotipagem	45
Quadro 2 - Variáveis sociodemográficas e clínicas de pacientes e controles saudáveis ..	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de genes e antígenos usados para a construção da biblioteca de peptídeos	42
Tabela 2 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam IFN-γ dos grupos SY-I, SY-R e ASY com os grupos CTL e CTL NE	51
Tabela 3 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam TNF dos grupos SY-I, SY-R e ASY com os grupos CTL e CTL NE	55
Tabela 4 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam IL-17A dos grupos SY-I, SY-R e ASY com os grupos CTL e CTL NE	59
Tabela 5 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que co-expressam IFN-γ e TNF nos grupos SY-I, SY-R e ASY comparado a CTL e CTL NE	61
Tabela 6 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam CD69 nos grupos SY-I, SY-R e ASY comparado a CTL e CTL NE	65
Tabela 7- Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam CD154 nos grupos SY-I, SY-R e ASY comparado a CTL e CTL NE	68
Tabela 8- Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que co-expressam CD69 e CD154 nos grupos SY-I, SY-R e ASY comparado a CTL e CTL NE	71

LISTA DE ABREVIATURAS E MEDIDAS

- AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- AMA-1** - Proteína 1 da membrana apical do merozoíto (*Apical membrane antigen 1*)
- APC** - Células apresentadoras de antígeno (*Antigen-presenting cell*)
- ASY** - Indivíduos assintomáticos
- CD** - Grupamento de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
- CDC** - *Centers for disease control and prevention*
- CM** - Células T de memória central
- COVID-19** - Doença causada pelo coronavírus (*Coronavirus Disease 2019*)
- CSP** - Proteína circunsporozoíta (*Circumsporozoite protein*)
- CTL** - Controles saudáveis
- CTL NE** - Controles saudáveis de área não endêmica
- CTLA-4** - Proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (*Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*)
- DBP** - Proteína de ligação ao antígeno *Duffy* (*Duffy binding protein*)
- DC** - Célula dendrítica (*Dendritic cell*)
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico (*Desoxyribonucleic acid*)
- EDTA** - Ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ELISA** - Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- ELISpot** - Ponto imune absorvente ligado à enzima (*Enzyme-Linked Immune absorbent Spot*)
- EM** - Células T de memória efetora
- Etramp** - Proteína de membrana de transcrição precoce (*Early transcribed membrane protein*)
- GAMA** - Antígeno micronemal ancorado por GPI (*GPI-anchored micronemal antigen*)
- HIV** - Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency vírus*)
- ICAM** - Molécula de adesão intercelular (*Intercellular adhesion molecule*)
- IEDB** - *Immune Epitope Database and Analysis Resource*
- IFN- γ** - Interferon- γ
- Ig** - Imunoglobulina
- IL** - Interleucina
- IPA** - Incidência parasitária anual
- LB** - Linfócito B
- LTc** - Linfócito T citotóxico (*T cytotoxic lymphocyte*)

LTh - Linfócito T auxiliar (*T helper lymphocyte*)

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal (*Major histocompatibility complex*)

MO - Microscopia óptica

MPv310 - Biblioteca de 310 peptídeos do *Plasmodium vivax*

MSP - Proteína de superfície do merozoíto (*Merozoite surface protein*)

NK - Célula Assassina Natural (*Natural killer*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PAMP - Padrões moleculares associado à patógenos

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral blood mononuclear cells*)

PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate-buffered saline*)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PD-1 - Proteína de morte celular programada 1 (*Programmed cell death protein 1*)

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa (*Quantitative Polimerase Chain Reaction*)

qRT-PCR - Reação quantitativa em cadeia de polimerase em tempo real (*Quantitative real-time polymerase chain reaction*)

RALP - Proteína zíper de leucina associada a roptria (*Rhoptry-associated leucine (Leu) zipper-like protein*)

RAMA - Antígeno de membrana associado a roptria (*Rhoptry-associated membrane antigen*)

RBC - Eritrócitos (*Red blood cells*)

RBP - Proteína de ligação ao reticulócito (*Reticulocyte binding protein*)

RDT - Teste rápido de diagnóstico (*Rapid diagnostic test*)

RhopH2 - Proteína 2 de alto peso molecular (High molecular weight rhoptry protein 2)

RON2 - Proteína do pescoço de roptria (*Rhoptry neck protein*)

SFB - Soro fetal bovino

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição (*Signal transducer and activator of transcription*)

SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde

SY - Indivíduos sintomáticos

TA - Temperatura ambiente

T-bet - T-box expresso em células T (*T-box expressed in T cells*)

TCR - Receptor de células T (*T cell receptor*)

Tfh - Linfócitos T auxiliares foliculares (*Follicular helper T lymphocyte*)

TIM-3 - Proteína 3 contendo domínio de mucina (*Mucin domain-containing protein 3*)

TNF - Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*)

Tph - Linfócitos T auxiliares periféricos (*Peripheral helper T lymphocyte*)

TRAg - Antígenos ricos em triptofano (*Tryptophan-rich antigens*)

Tregs - Linfócitos T reguladores (*Regulatory T lymphocyte*)

mL - Mililitro

μL - Microlitro

rpm - Rotações por minuto

°C - graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Aspectos gerais.....	17
1.2 Malária no mundo	18
1.3 Malária no Brasil.....	21
1.4 Ciclo de vida dos parasitos da malária humana	24
1.5 Diagnóstico laboratorial da malária	25
1.6 Imunidade na malária.....	26
1.6.1 Linfócitos T auxiliares CD4 ⁺ (LTh).....	27
1.6.2 Linfócitos T citotóxicos CD8 ⁺ (CTLs).....	29
1.7 Ativação de células T	31
1.8 Peptídeos de <i>P. vivax</i>	34
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo principal.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Tipo de estudo	39
4.2 Cuidados éticos	39
4.3 Área de estudo e participantes.....	39
4.4 Peptídeos para uso <i>in vitro</i>	40
4.5 Caracterização fenotípica de células T.....	43
4.6 Estratégia de seleção para caracterização das populações celulares	45
4.7 Análise estatística.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Caracterização da população de estudo.....	48
5.2 Caracterização fenotípica de células T.....	48
5.3 Sumário dos resultados.....	74
6 DISCUSSÃO	76

7 CONCLUSÃO	83
8 PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao filo *Apicomplexa* e família *Plasmodiidae*. Sabe-se que cinco espécies desse parasito são capazes de infectar os seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* (MENKIN-SMITH; WINDERS, 2020). Mais recentemente, infecções de humanos por *Plasmodium simium* e *Plasmodium cynomolgi* foram descritas (BRASIL et al., 2017; IMWONG et al., 2019).

Dentre todas as espécies que causam a doença, o *P. falciparum* e o *P. vivax* respondem por mais de 95% de todas as infecções por malária humana e, portanto, representam um sério desafio à saúde pública (LARSON, 2019). Enquanto o *P. falciparum* é altamente prevalente na África Subsaariana e responsável por um maior número de mortes, o *P. vivax* é o mais difundido de todas as espécies da malária. Essa espécie pode causar infecções graves e fatais e resultar em significativa morbimortalidade global, embora em menor frequência que o *P. falciparum* (PLEWES et al., 2019; MENKIN-SMITH; WINDERS, 2020).

A transmissão da doença ocorre através da picada de mosquitos infectados do gênero *Anopheles*. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), 30 espécies desses mosquitos são vetores importantes na malária. Os fatores relacionados a eles, bem como ao parasito, hospedeiro humano e ambiente, influenciam diretamente na intensidade de transmissão (OPAS, 2016).

Considerada como uma síndrome febril, a infecção por plasmódios pode ocorrer na ausência de sintomas ou gerar uma ampla variedade de sintomas, de leves a graves, podendo culminar na morte do indivíduo (CDC, 2020). Comumente, a forma sintomática inclui febre alta, mal-estar, fadiga, dor de cabeça, sudorese, calafrios, diarreia, dor abdominal leve e náusea, que aparecem no estágio sanguíneo, que ocorre após a ruptura dos esquizontes do fígado e liberação de merozoítos na circulação periférica (GREENWOOD et al., 2008; OAKLEY et al., 2011). Entretanto, alguns grupos populacionais apresentam um risco consideravelmente maior de contrair malária e desenvolver formas graves. Entre eles se encontram crianças menores de 5 anos, mulheres grávidas e pacientes com HIV/AIDS, bem como migrantes não imunes, populações móveis e viajantes (WHO, 2020).

1.2 Malária no mundo

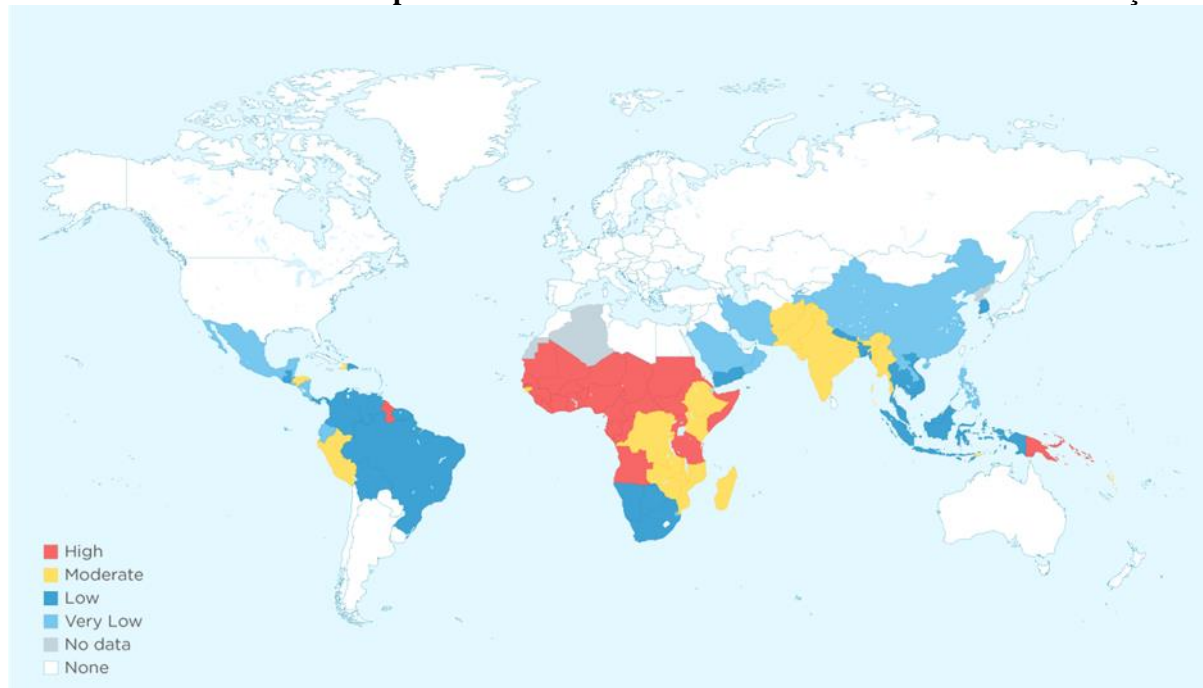
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária é uma doença endêmica de 85 países, apresentados na **Figura 1**, e, em 2019, foi responsável por cerca de 241 milhões de casos e 627 mil mortes (77% em crianças menores de 5 anos) (WHO, 2021). Além disso, a malária é mais frequente em países tropicais e o aumento da incidência está relacionado à baixa renda, serviços de saúde precários e à globalização da economia mundial, que possibilita maior circulação de mercadoria e pessoas entre os países e as regiões (ABREU et al., 2018).

Em 2019, a África foi responsável pela maior parte destes casos (82%) e mortes (95%). Na região asiática, ocorreram 10% dos casos e na região do Mediterrâneo e do Pacífico, foram notificados 5 milhões e 1,7 milhões de casos, respectivamente (OPAS, 2020).

Já nas Américas, a doença acometeu 19 países, com cerca de 900 mil pessoas infectadas. No primeiro semestre de 2020, houve redução no número de casos em relação ao ano anterior. Brasil, Colômbia e Venezuela responderam por, aproximadamente, 80% dos casos americanos (OPAS, 2020).

Desde 2015, a malária foi erradicada na Europa e, em 2018, Paraguai e Argentina também foram certificados como países livres de malária. Em 2017 e 2019, respectivamente, El Salvador e Belize relataram zero casos autóctones da doença (OPAS, 2020).

FIGURA 1 - Países endêmicos para malária baseado no risco estimado de contrair a doença



FONTE: CDC, 2018. 85 países em todo o mundo são endêmicos para malária e são classificados de acordo com o risco de transmissão (*high* = alto, *moderate* = moderado, *low* = baixo, *very low* = muito baixo, *no data* = sem dados, *none* = nenhum). O continente africano responde pelo maior número de casos e alguns dos seus países são considerados de alto risco (destacados em vermelho no centro do mapa).

A malária ainda é considerada um problema de saúde pública global, entretanto, o número de casos vem diminuindo, com o passar dos anos. De 2018 para 2019, houve redução de 19 milhões de casos, o que corresponde, aproximadamente, a 8%. Essa redução ocorreu, principalmente, devido às medidas de intervenção e controle da malária empregadas em todo o mundo. No mesmo período, para prevenção da malária, 229 milhões de mosquiteiros tratados com inseticidas foram entregues para países endêmicos, dos quais 84% foram destinados à África Subsaariana. Além disso, para diagnóstico e tratamento de pacientes, foram distribuídos 275 milhões de testes e 191 milhões de terapias antimaláricas, respectivamente. Destes, 88% concentrou-se na região subsaariana da África (WHO, 2021).

Apesar destas medidas, a eliminação da doença ainda conta com diversos desafios. Destacam-se a resistência dos vetores aos inseticidas, resistência dos plasmódios às drogas antimaláricas e a presença de infecções assintomáticas e submicroscópicas (FRIMPONG et al., 2018). O uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas é uma das ferramentas mais eficazes no controle e eliminação da malária. Entretanto, a resistência dos vetores às principais classes de inseticidas (piretroides, organoclorinos, organofosforados e carbamatos) foi detectada em diversos países (WHO, 2012). Entre 2010 e 2020, 88 países endêmicos reportaram resistência. Destes, 78 países confirmaram resistência a pelo menos uma, incluindo o Brasil; 29, a três; e 19 países, às 4 classes de inseticidas (WHO, 2021). Até recentemente, os piretroides eram a única classe usada em mosquiteiros, porém a OMS já recomendou que eles não devem ser mais utilizados, a fim de reduzir o desenvolvimento de mosquitos resistentes (RANSON; LISSENDEN, 2016).

Assim como a resistência aos inseticidas, a resistência dos plasmódios às drogas antimaláricas representa uma ameaça aos esforços globais que visam reduzir os casos de malária. A OMS recomenda que, como primeira linha de tratamento, devem ser utilizadas as terapias combinadas à base de artemisinina para tratar infecções não complicadas causadas pelo *P. falciparum* e a cloroquina para tratar a malária causada pelo *P. vivax* (WHO, 2021). Entretanto, desde o século XIX, há relatos de que os plasmódios foram capazes de se tornar resistentes à maioria dessas medicações. Geralmente, o desenvolvimento de resistência às drogas se inicia na Ásia, por ser uma área de alta carga parasitária, baixa adesão ao tratamento e baixos níveis de imunidade adquirida. Todos esses fatores contribuem para a sobrevivência de parasitos mutantes (ATAÍDE et al., 2017; HANBOONKUNUPAKARN; WHITE, 2016).

Outro desafio chave enfrentado pelas políticas de saúde no combate à malária é a presença de infecções assintomáticas e submicroscópicas, visto que os indivíduos podem agir

como reservatórios e carreadores dos parasitos nas regiões onde vivem, perpetuando a transmissão da malária (SLATER et al., 2019). Sabe-se que essas infecções são causadas, principalmente, pelo *P. vivax*, devido ao seu potencial de exibir baixo índice de parasitemia e à sua preferência em invadir reticulócitos em vez de eritrócitos maduros (DAYANANDA; ACHUR; GOWDA, 2018).

Embora não esteja completamente esclarecido, sabe-se que diversos fatores estão associados ao desenvolvimento dessas infecções, entre eles o aumento da idade e da imunidade adquirida (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2018), fatores do parasito envolvidos na virulência da infecção (MILLER et al., 2013), fatores genéticos (ROMAN et al., 2018) e o estado de saúde geral do hospedeiro (GALATAS; BASSAT; MAYOR, 2016).

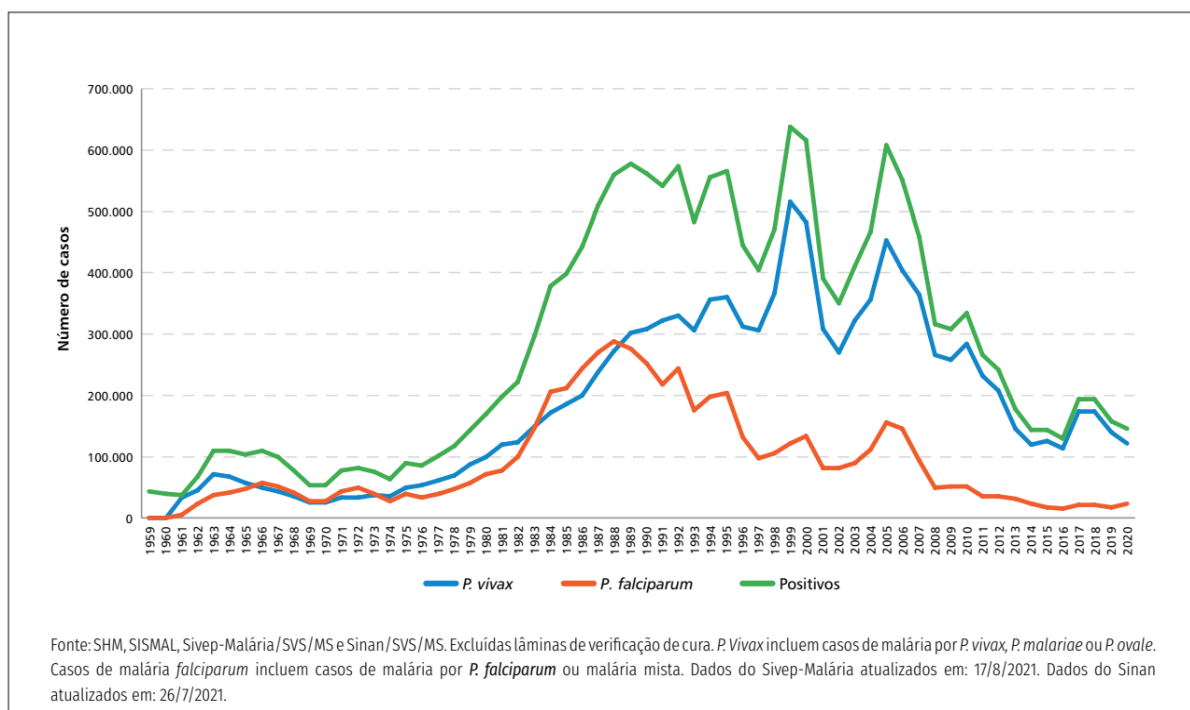
Outro determinante que pode favorecer a ausência de sintomas na malária causada pelo *P. vivax* são as condições fisiológicas do hospedeiro, particularmente a maior capacidade de defesa (GALATAS; BASSAT; MAYOR, 2016; MEDZHITOV; SCHNEIDER; SOARES, 2012) e imunotolerância à infecção (ANTONELLI et al., 2020; ARÉVALO-HERRERA et al., 2016; CROMPTON et al., 2014). Devido a isso, não há indução da produção de citocinas anti e pró-inflamatórias em indivíduos assintomáticos, e, conseqüentemente, esses não apresentam sinais de inflamação sistêmica durante a infecção (ANTONELLI et al., 2020; GONÇALVES et al., 2012).

1.3 Malária no Brasil

No Brasil, três espécies de *Plasmodium* são encontradas, sendo elas o *P. vivax*, o *P. falciparum* e o *P. malariae* (SVS/MS, 2020). Entretanto, em 2017, foi registrado infecção por *Plasmodium simium* no Rio de Janeiro (BRASIL et al., 2017). O *P. vivax* apresenta maior dispersão geográfica e é responsável por cerca de 89,3% dos casos. O restante dos casos é causado pelo *P. falciparum*, espécie de plasmódio que gera a forma mais grave da doença, e por infecção mista (OMS, 2019; SVS/MS, 2020b). No país, a região endêmica se concentra na Amazônia, onde ocorrem 99,9% dos casos (SVS/MS, 2020b). Esta grande incidência pode ser justificada por fatores demográficos, ambientais e sociais que favorecem a manutenção do ciclo de transmissão (FERREIRA; CASTRO, 2016).

Segundo dados do Ministério da Saúde, nos últimos anos, a incidência da malária no país vem decaindo (**Figura 2**). No que se refere ao primeiro semestre de 2020, 65.558 casos de malária foram notificados. Já, no mesmo período de 2021, esse número passou para 57.374, representando uma redução de 12,5% no número total de casos autóctones. Essa queda foi observada tanto na região amazônica quanto na região extra-amazônica. Entretanto, houve um aumento de 5%, correspondendo a 478 casos das infecções por *P. falciparum* e mistas neste mesmo período (SVS/MS, 2021).

FIGURA 2 - Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2020



FONTE: *Epidemiological Report – Malaria 2021*, 2021. A representação gráfica acima mostra a relação entre o número de casos de malária por espécie no Brasil, entre os anos de 1959 até 2020. Evidencia-se um declínio no número de infecções por *P. falciparum* (linha laranja) e *P. vivax* (linha azul) com o passar dos anos.

Embora a maioria dos casos de malária no país sejam autóctones, o Brasil ainda conta com casos importados. Sabe-se que de dez países que fazem fronteira com o território brasileiro, sete são endêmicos. Dessa forma, acredita-se que a importação de malária de países vizinhos pode desempenhar um importante papel na transmissão e controle da doença (CARLOS et al., 2019).

Entre janeiro de 2020 e junho de 2021, o Brasil registrou 2.330 casos importados, provenientes principalmente da Venezuela, Guiana Francesa, Guiana Inglesa e Bolívia. O maior número desses casos (2.249 casos) foi notificado na região norte do país, com 61% deles ocorrendo no estado de Roraima e os demais no Amazonas, Acre, Maranhão e Rondônia. Já na região extra-amazônica (81 casos), o estado de São Paulo recebeu 23,5% dos mesmos. Uma redução de 51% no número total de casos importados foi observada, podendo se justificar pela redução dos deslocamentos entre países devido à pandemia de COVID-19 (SVS/MS, 2021).

O fluxo migratório intenso entre o Brasil e esses países é o maior responsável por essa situação (CARLOS et al., 2019). Portanto, é fundamental que medidas de vigilância epidemiológica continuem sendo aplicadas e que o monitoramento de áreas de risco seja feito.

A reintrodução do plasmódio em áreas sob controle e a introdução em áreas sem registro de casos pode gerar surtos, proporcionando intensa transmissão, altos níveis de parasitemia e, possivelmente, desenvolvimento de quadros graves da doença.

Embora o Brasil venha registrando diminuição progressiva de casos e óbitos por malária, no ano de 2020, 44 mortes foram relatadas, representando um aumento de 18,9% comparado a 2019, com letalidade de 3,3%, na região extra-amazônica, e 0,02%, na região amazônica. Essa diferença na taxa de letalidade pode se justificar pelo tempo prolongado até que haja suspeita pela infecção em estados não endêmicos. Isso leva ao agravamento do quadro clínico e aumenta o risco de óbito do paciente (SVS/MS, 2021).

1.4 Ciclo de vida dos parasitos da malária humana

A infecção por malária inicia com a picada de um mosquito-fêmea infectado, do gênero *Anopheles*, que inocula os esporozoítos do plasmódio na pele do hospedeiro humano. Ao atingir a corrente sanguínea ou a linfa, os esporozoítos chegam até o fígado, onde infectarão os hepatócitos para uma fase de replicação inicial e obrigatória (FRISCHKNECHT; MATUSCHEWSKI, 2017). Nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam em esquizontes e se multiplicam dando origem aos merozoítos. Em algumas espécies de plasmódio como *P. vivax*, podem ser encontradas formas dormentes no fígado, chamadas hipnozoítos, que podem ser reativados reiniciando o ciclo eritrocítico meses, ou até mesmo, anos após a infecção (BRIQUET et al., 2021).

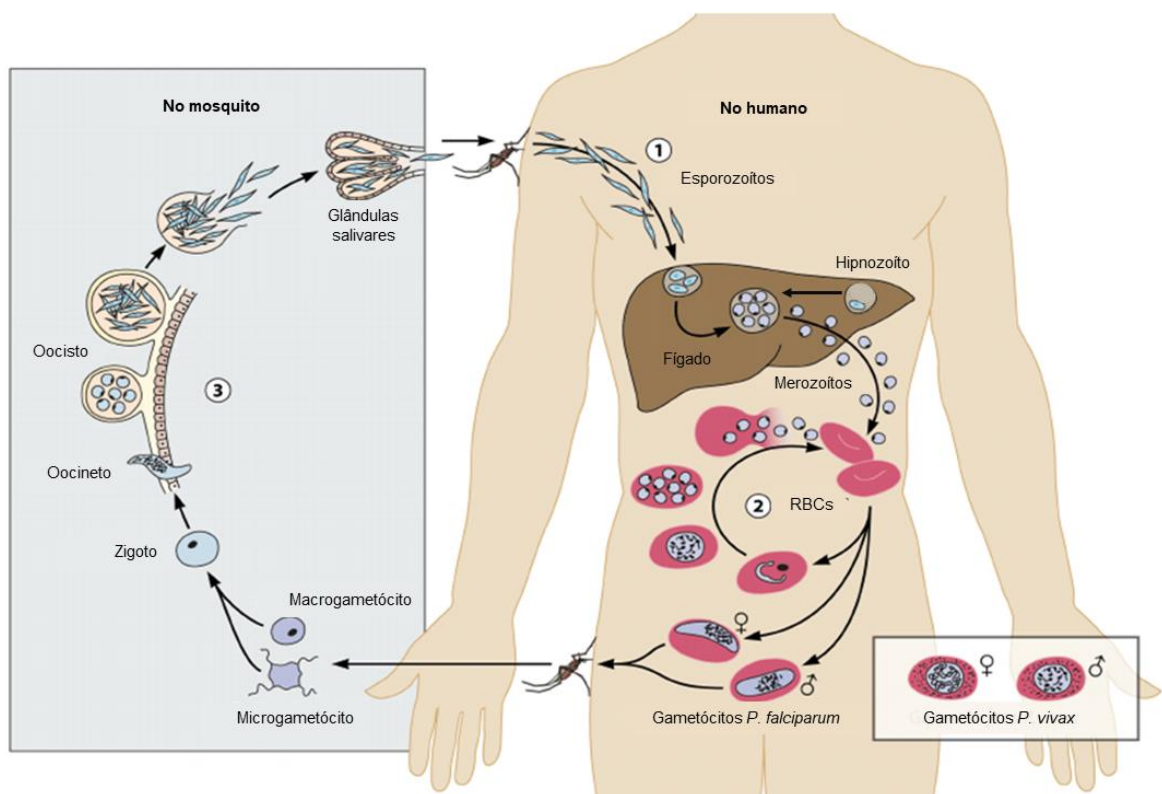
Os merozoítos são liberados no sangue, individualmente ou na forma de merossomos, estruturas semelhantes a vesículas contendo dezenas de merozoítos. Uma vez na circulação, os merozoítos rapidamente infectam os eritrócitos e iniciam o ciclo assexuado intraeritrocítico, liberando mais merozoítos para invadir novos eritrócitos. O tempo do estágio sanguíneo varia com a espécie do plasmódio. Levando em consideração às que infectam humanos, a duração é de, aproximadamente, 24h para *P. knowlesi*; 48h para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*; e 72h para *P. malariae* (HE et al., 2020).

Os sintomas da malária aparecem no estágio sanguíneo (CROMPTON et al., 2014). Os parasitos expressam várias proteínas nos eritrócitos que são liberadas em grande quantidade na corrente sanguínea quando ocorre o seu rompimento, levando ao estímulo da resposta imune e sinais e sintomas da malária (HE et al., 2020). Esses incluem febre alta, mal-estar, fadiga, dor de cabeça, diaforese (sudorese intensa), calafrios, diarreia, dor abdominal leve e náusea (BARTOLONI; ZAMMARCHI, 2012; CDC, 2020). Dentro de cada ciclo de replicação, uma pequena proporção desses merozoítos se desenvolve em estágios sexuais (gametócitos) masculinos e femininos e podem ser ingeridos pelo vetor quando fazem o repasto sanguíneo (MEIBALAN; MARTI, 2017). Evidências mostram que a gametocitogênese de *P. vivax* acontece precocemente e em maiores níveis quando comparado ao *P. falciparum* (SATTABONGKOT et al., 2004). Em função disto, esse processo permite a transmissão do *P. vivax* antes do aparecimento dos sintomas da doença e, portanto, antes da quimioterapia ser iniciada (SATTABONGKOT et al., 2004).

Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, o mosquito anofelino ingere os gametócitos femininos e masculinos. No intestino do inseto, ocorre a fusão dos gametas para formação dos oocinetos, que são capazes de atravessar o epitélio intestinal e se transformar em

oocistos (BRIQUET et al., 2021). Dentro do oocisto, o núcleo se divide, repetitivamente, com a formação de milhares de esporozoítos. Quando os esporozoítos estão completamente formados, o oocisto se rompe, liberando-os. Esses, por sua vez, migram para as glândulas salivares onde formam esporoblastos, que por sua vez podem dar origem a milhares de esporozoítos (MÉNARD et al., 1997). Quando acontece um novo repasto sanguíneo pelo inseto, esporozoítos são inoculados e infectarão novos hospedeiros, perpetuando o ciclo de vida do plasmódio (NUREYE; ASSEFA, 2020). Todas as informações descritas anteriormente estão representadas na **Figura 3**.

FIGURA 3 - Ciclo de vida de Plasmodium na malária humana.



FONTE: BOUSEMA; DRAKELEY, p.379, 2011, adaptado. Após a picada do mosquito *Anopheles*, esporozoítos são inoculadas na pele (1) e se dirigem para o fígado, onde infectarão os hepatócitos. Nessas células, eles se tornam formas dormentes (hipnozoítos), no caso de *P. vivax*, ou se multiplicam e transformam em merozoítos, que por sua vez, infectarão os eritrócitos (2). Alguns parasitos se diferenciam em gametócitos masculinos e/ou femininos e são ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. No anofelino, essas formas sexuadas se fundem, gerando zigoto e oocinetos (3). Por fim, estes últimos se transformam em esporozoítos e migram para a glândula salivar do mosquito para reiniciar o ciclo.

1.5 Diagnóstico laboratorial da malária

A ferramenta padrão-ouro para diagnóstico da infecção pelo plasmódio é a sua detecção no sangue. A técnica mais utilizada para tal é a microscopia óptica (MO) e permite a

visualização do parasito em gota espessa ou esfregaço sanguíneo delgado. Embora seja tradicionalmente empregado e de processamento parcial ou total relativamente rápido, a eficácia desse método depende da qualidade dos reagentes e da experiência dos profissionais para a identificação de suas espécies (SVS/MS, 2020).

Outro método empregado para o diagnóstico da infecção pelo plasmódio são os testes rápidos (RDT) que detectam antígenos do parasito em sangue fresco por meio de imunocromatografia (WHO, 2006). Geralmente, os RDT são fáceis de usar e não requerem estrutura de laboratório, equipamento especial ou treinamento especializado (AGARWAL et al., 2020). No entanto, não medem o nível de parasitemia e há possível perda de qualidade quando armazenado por muitos meses em condições de campo (SVS/MS, 2020). No Brasil, a recomendação é que os RDT sejam usados, preferencialmente, em áreas remotas com instalações limitadas e falta de experiência laboratorial dos profissionais de saúde.

O *P. vivax*, especificamente, devido a várias particularidades de seu ciclo de vida, ameaça ser um problema para os esforços recentes de eliminação da malária em todo o mundo. Há diversas lacunas que dificultam o diagnóstico dessa espécie, entre elas a falta de RDT mais sensíveis para o estágio sanguíneo; incapacidade de identificar indivíduos infectados com a forma hipnozoíta para erradicar o reservatório e formação inicial de gametócitos e transmissão. Além disso, como essa espécie tem potencial de ocasionar infecções submicroscópicas, com baixos níveis de parasitemia e sem sintomatologia clínica, em alguns casos, o diagnóstico desses indivíduos parasitêmicos assintomáticos pode ser um problema, necessitando a utilização de métodos moleculares (Reação em cadeia da polimerase - PCR) (CHENG; CUNNINGHAM; GATTON, 2015).

Estudos anteriores sugerem que a PCR detecta mais que o dobro do número de infecções por *Plasmodium* em comparação com MO e RDT em áreas de baixa transmissão (KAURA et al., 2019). Assim, se a PCR fosse considerada como padrão ouro, a sensibilidade do RDT e microscopia seria apenas de 57% para a detecção do *P. vivax* (AHMAD et al., 2021).

1.6 Imunidade na malária

Na literatura, já é bem consolidado que a malária não induz uma proteção de longo prazo (ANTONELLI et al., 2020; OPATA et al., 2018). O ciclo de vida complexo compreendendo vários estágios dos parasitos contribui para o lento desenvolvimento da imunidade, que decai rapidamente na ausência da exposição contínua. Sendo assim, esse atraso resulta no fracasso

em alcançar a cura estéril em tempo hábil, aumentando o risco de doença e/ou recaídas (CROMPTON et al., 2014).

Acredita-se que tanto a imunidade humoral quanto a celular seja essencial no controle da replicação parasitária. A imunidade celular desencadeada pelo *P. vivax* tem sido sobretudo difícil de ser definida em decorrência da falta de ferramentas capazes de mensurá-la (LONGLEY; SATTABONGKOT; MUELLER, 2016).

Em animais imunes e em humanos parcialmente imunes, as células T desempenham papéis importantes na defesa da malária. A resposta de anticorpos dependentes de células T CD4⁺ pode prevenir a invasão de células hepáticas por esporozoítos. Durante o estágio sanguíneo, eritrócitos infectados se tornam indiretamente alvos das células T auxiliares e linfócitos T $\gamma\delta$, que podem orquestrar as respostas de anticorpos. Já as células T CD8⁺ eliminam hepatócitos infectados seguido do reconhecimento de antígenos do plasmódio apresentados pelo MHC de classe I (KURUP; BUTLER; HARTY, 2019).

1.6.1 Linfócitos T auxiliares CD4⁺ (LTh)

Os LTh desempenham um papel chave em ambas as imunidades - inata e adaptativa - durante a infecção por malária. A presença dessas células específicas para o *Plasmodium* tem sido correlacionada com o desenvolvimento de imunidade protetora frente à infecção natural ou induzida pela vacina (ANTONELLI et al., 2020; MORDMÜLLER et al., 2017).

Atualmente, nove subpopulações ou linhagens de células T CD4⁺ foram identificados: Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 e Th25 (CAZA; LANDAS, 2015) que têm como alvo classes específicas de patógenos, células T regulatórias (Tregs) que são necessárias para manter a auto tolerância, células T auxiliares foliculares (Tfh) (GEGINAT et al., 2014) e células T auxiliares periféricas (Tph) que fornecem ajuda às células B para a produção de anticorpos (RAO et al., 2017). As características que os definem são as citocinas que produzem e as que os levam à ativação (KURUP; BUTLER; HARTY, 2019), os fatores de transcrição que expressam e as alterações epigenéticas nos *loci* genéticos específicos das citocinas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015).

A diferenciação das células Th1 é induzida, principalmente, por microrganismos intracelulares que ativam células dendríticas, monócitos, macrófagos e células NK. Sua diferenciação é estimulada pelas citocinas IL-12 e IFN- γ , que por sua vez, ativam a expressão dos fatores de transcrição de T-bet, STAT1 e STAT4. Essa subpopulação celular é responsável por produzir, principalmente, IFN- γ . Dentre as inúmeras funções, essa citocina promove a

ativação clássica dos macrófagos; atua sobre células B para proporcionar a mudança para certas subclasses de IgG e inibe o desenvolvimento de células Th2 e Th17, a fim de potencializar a resposta Th1 vigente. Entretanto, além de IFN- γ , as células Th1 também são **FONTEs** de TNF, IL-2 e várias quimiocinas que contribuem para a resposta inflamatória; e IL-10, que modula a ativação de células Th1, por um processo de retroalimentação negativa (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015).

Na malária, evidências sugerem que células Th1 e níveis elevados de IFN- γ são as principais assinaturas da doença. Essas assinaturas também estão ligadas a resistência do hospedeiro durante o estágio hepático da infecção, redução da carga parasitária e severidade da doença (OPATA et al., 2018). Além disso, alguns achados em roedores mostram que, na infecção, a resposta Th1 e secreção de IFN- γ pode não melhorar as respostas imunes, mas desempenhar um papel patológico, induzindo a formação de células B de memória atípicas. Esses achados podem se repetir em humanos (OBENG-ADJEI et al., 2017) e exacerbar os quadros de anemia. Isso pode ocorrer devido ao aumento dos níveis de anticorpos específicos contra fosfatidilserina (FERNANDEZ-ARIAS et al., 2016; RIVERA-CORREA et al., 2017).

Por outro lado, a diferenciação no subgrupo Th2 é estimulada pela citocina IL-4, frente a helmintos, alérgenos ou qualquer antígeno que induzam uma resposta imune persistente, com caráter ou não inflamatório. Essa interleucina pode ser produzida pelas células T ativadas ou por mastócitos e eosinófilos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015).

As funções das células Th2 são mediadas por citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Durante uma infecção, acredita-se que a IL-4 pode promover a mudança de classe da cadeia pesada da Ig de células B para o isotipo IgE (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015) e modular a resposta de fagócitos (WU et al., 2021). Além disso, na presença de helmintos ou em doenças alérgicas, IL-4 em sintonia com a IL-13 induz o recrutamento de leucócitos, o peristaltismo do trato gastrointestinal e maior secreção de muco das células epiteliais e das vias respiratórias e intestinais para auxiliar na eliminação parasitária. Por sua vez, a IL-5 estimula o crescimento e diferenciação dos eosinófilos e atua na produção de anticorpos da classe IgA (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015).

Na malária, o papel de células Th2 não está totalmente elucidado. Coomes e colaboradores (2015) hipotetizaram ainda que a resposta Th2 é reduzida na infecção pelo plasmódio, pelo fato de que a forte polarização do tipo Th1 pode limitar a diferenciação Th2 (COOMES et al., 2015). Em um estudo recente, Wu et al. (2021) mostraram que o tratamento de camundongos infectados com *P. falciparum* com IL-4 induziu maior depuração do parasita mediada pela regulação positiva dos receptores fagocitários e produção de IgM, diminuição das

respostas inflamatórias cerebrais e regulação negativa do potencial lítico das células T citotóxicas (WU et al., 2021). Isso sugere que a resposta Th2 pode estar envolvida na proteção contra malária grave.

Igualmente às células Th2, poucos estudos relatam sobre a participação de células Th17 na doença. Níveis elevados desse tipo celular e das citocinas produzidas por essas células, como IL-17 e IL-22, já foram descritos em pacientes infectados pelo *P. vivax* (BUENO et al., 2012) e *P. falciparum* (OYEGUE-LIABAGUI et al., 2017). Esse tipo de resposta parece atuar contra o plasmódio, contribuindo para o recrutamento de neutrófilos e indução da secreção de outras citocinas pró-inflamatórias (BUENO et al., 2012). Entretanto, embora haja evidências do surgimento de células Th17 como parte da resposta inflamatória associada à malária, poucas demonstram algum papel antiparasitário ou patogênico para essas células (KUMAR et al., 2020).

As células T auxiliares foliculares (Tfh) também atuam na defesa imune contra o plasmódio. Essas células são amplamente caracterizadas pela expressão do fator transcricional BCL-6, do receptor de quimiocina CXCR5 e da proteína de morte celular programada (PD-1) e são essenciais para iniciar as reações dos centros germinativos, selecionar e maturar as células B e promover o desenvolvimento de anticorpos de alta afinidade (CROTTY, 2019).

Estudos afirmam que há um aumento na circulação dessas células na malária causada pelo *P. vivax* e outras espécies (SALLES et al., 2017) e que o número de episódios de malária influencia diretamente na proporção dessas células no sangue periférico (FIGUEIREDO et al., 2017). Além disso, evidências sugerem que células Tfh específicas para plasmódio secretam IL-21 (RYG-CORNEJO et al., 2016) e expressam o coestimulador indutor de célula T (ICOS) (SEBINA et al., 2016), promovendo a geração de plasmócitos de longa vida e células B de memória.

1.6.2 Linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs)

As células T CD8⁺ citotóxicas (CTL) são linfócitos responsáveis por eliminar patógenos intracelulares, como bactérias, vírus e protozoários. Além do seu papel na defesa contra microrganismos, são capazes de erradicar diversos tumores. Dessa forma, para um eficiente reconhecimento, as células-alvo devem expressar moléculas MHC de classe I associadas a um peptídeo e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM 1) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015).

O principal mecanismo de morte de alvos celulares mediada por CTLs é a liberação de proteínas citotóxicas, como granzima e perforina, armazenadas dentro de grânulos citoplasmáticos (também chamados lisossomos secretores) em células-alvo. Essas causam a apoptose das mesmas, cerca de 2 a 6 horas após o reconhecimento do antígeno e prossegue mesmo após desacoplamento das CTL. Entretanto, há outro mecanismo, que se baseia nas interações de moléculas da membrana das CTL com as células-alvo. Durante sua ativação, as CTL expressam uma proteína de membrana denominada ligante Fas (FasL), que se liga ao receptor de morte Fas. Esta interação também resulta na ativação de caspases e apoptose de alvos que expressam Fas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015).

Além disso, as CTL podem produzir citocinas, como o IFN- γ , e quimiocinas capazes de ativar e recrutar macrófagos. Essas moléculas inflamatórias também podem restringir a replicação parasitária. Ambas ações auxiliam no combate à infecção (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015). Após a eliminação do patógeno, as células T CD8⁺ efetoras sofrem contração. A maior parte delas morrem por apoptose, mas aproximadamente 5-10% delas sobrevivem e amadurecem em células T CD8⁺ de memória de vida longa (CUI; KAECH, 2010).

Embora o número de subpopulações de células T CD8⁺ de memória seja maior, há duas subpopulações principais: memória efetora (EM), caracterizada pela baixa expressão de CD62L e CCR7 e memória central (CM), caracterizada pela alta expressão de CD62L e CCR7. A expressão de CCR7 e CD62L em células CM facilita o direcionamento para órgãos linfoides secundários, enquanto as células EM são mais citotóxicas e expressam integrinas e receptores de quimiocinas necessários para localização em tecidos inflamados (MARTIN; BADOVINAC, 2018). Além disso, em humanos, essas células ainda expressam os marcadores de superfície CD45RO e CD27, sendo CM CD45RO⁺CD27⁺ e EM CD45RO⁺CD27⁻ (NANCY et al., 2013).

Na malária, a contribuição das células T CD8⁺ na defesa contra o parasito permanece obscura. Na literatura, a maioria dos estudos evidenciaram que as células T citotóxicas parasito-específicas parecem eliminar os hepatócitos infectados após reconhecimento de antígenos pelo MHC de classe I (AKBARI et al., 2018; FREVERT; NACER, 2013).

Os achados também são escassos no que se refere a essas células no estágio eritrocítico da doença. Embora não haja moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I em eritrócitos maduros, recentemente, Junqueira et al. (2018) demonstraram que há um aumento na frequência e ativação de CTL no sangue periférico, na expressão de HLA-ABC em reticulócitos infectados e na lise da célula hospedeira mediada por granulísina em pacientes com *P. vivax* (JUNQUEIRA et al., 2018).

Imai et al. (2015) também relataram que a depleção de células T CD8⁺ em camundongos C57BL/6 infectados com *P. yoelii* levou ao aumento significativo da parasitemia e esses animais morreram devido à infecção. Além disso, a infecção por *P. yoelii* aumentou a proporção de CTL que expressavam marcadores de ativação, como CD25 e CD69, e FasL. Complementar a esses achados, os autores demonstraram que eritrócitos expressam Fas. Portanto, todos esses resultados em conjunto indicam que essas células desempenham um papel essencial na proteção de camundongos contra a malária e contribuem para a defesa via interação Fas-FasL (IMAI et al., 2015).

1.7 Ativação de células T

As células T são geradas na medula óssea, migram para o timo onde amadurecem e são programadas para serem específicas para um único antígeno. Uma vez que saem do timo, os linfócitos T imaturos (*naive*) se movimentam pelos órgãos linfoides e entram em contato com várias células apresentadoras de antígeno (APCs), até reconhecerem seu antígeno cognato e se tornarem células efetoras ou de memória. Esse reconhecimento gera sinais bioquímicos, permitindo que o programa de ativação de célula T seja iniciado (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015).

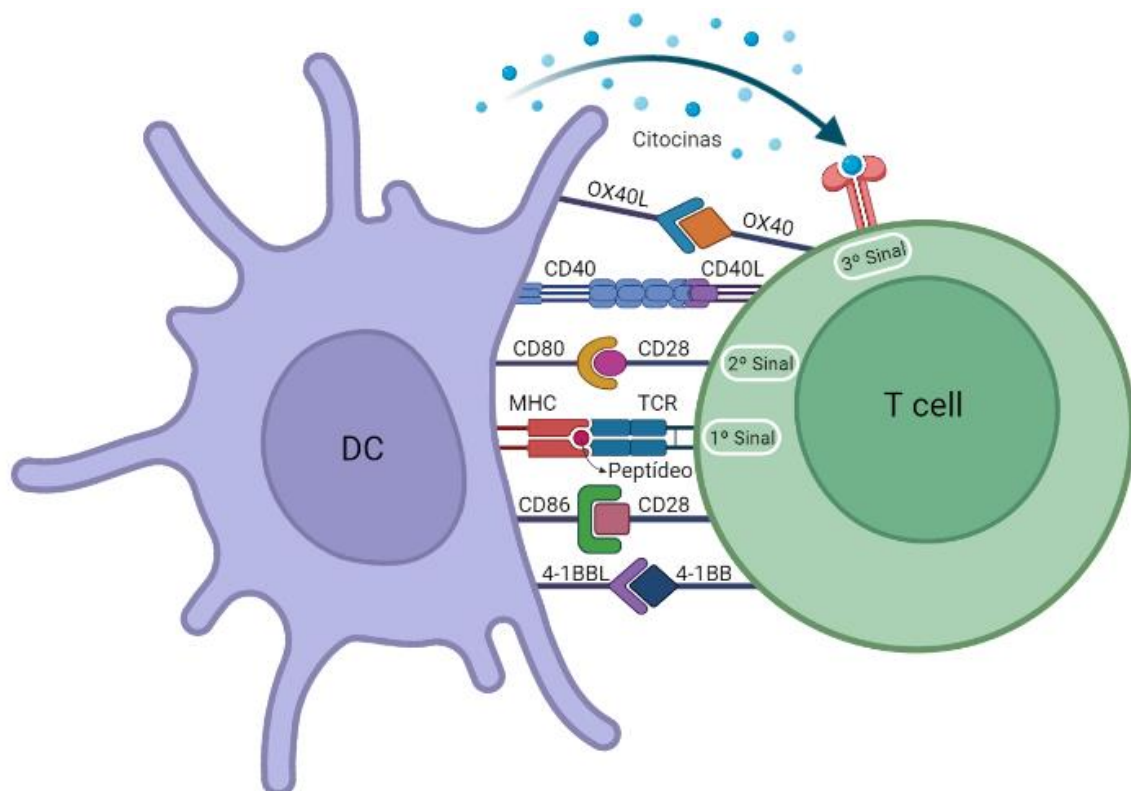
Dessa forma, a ativação inicial de linfócito T acontece quando o receptor de célula T (TCR) nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ liga-se ao antígeno, que por sua vez, está ligado respectivamente ao complexo MHC de classe I ou II. Essa ligação MHC-antígeno-TCR, normalmente, acontece nos órgãos linfoides secundários (CAVANAGH, FINDLAY; n.d.).

Além da ligação do TCR ao MHC carregado com antígeno, tanto as células T auxiliares quanto as células T citotóxicas requerem uma série de sinais secundários, denominados coestimuladores, para se tornarem ativadas e responsivas (HWANG et al., 2020). No caso das células T auxiliares, o principal deles é fornecido pelo CD28. Esta molécula na célula T liga-se a uma das duas moléculas na APC - B7.1 (CD80) ou B7.2 (CD86) - e promove a proliferação de células T, produção de citocinas (via transcrição gênica e estabilidade de mRNA), sobrevivência celular e alterações do metabolismo celular (ACUTO; MICHEL, 2003). Além deste, múltiplos receptores de superfície foram descritos como tendo funções coestimuladoras, entre eles CD2, CD5, CD30, 4-1BB, OX40, ICOS e LFA-1 (SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009). No caso das células T citotóxicas, estas dependem menos do CD28 para ativação, mas requerem sinais de outras moléculas coestimuladoras, como o 4-1BB (CD137) (CAVANAGH, FINDLAY; n.d.).

Uma vez ativada, a célula T tem sua expressão proteica modulada de acordo com o ambiente de citocinas em que ela está exposta. Essas moléculas induzem a diferenciação celular em diferentes subtipos de células T - no caso de células T auxiliares, tipo Th1 (células expostas à citocina IL-12), Th2 (IL-4) ou Th17 (IL-6, IL-23). Cada uma dessas subpopulações expressa diferentes combinações de genes e desempenham uma tarefa específica no tecido e no desenvolvimento de novas respostas imunológicas (BEVINGTON et al., 2017). Todas as etapas de ativação de célula T estão demonstradas na **figura 4**.

A população de células resultante pode ser recrutada para os tecidos inflamados para compor o repertório celular necessário para responder ao patógeno. Outras células presentes no local da inflamação do tecido, como neutrófilos, mastócitos e células epiteliais, também liberam citocinas, quimiocinas, peptídeos curtos e outras moléculas que induzem mais ativação e proliferação das células T (CAVANAGH, FINDLAY; n.d.).

FIGURA 4 - Esquema de ativação antígeno-específica de célula T.



FONTE: Autor. A célula T (*T cell*) encontra uma célula dendrítica (DC) apresentando seu peptídeo cognato em uma molécula de MHC e se liga ao peptídeo-MHC através do TCR (1º sinal). Subsequentemente, a coestimulação ocorre através da interação entre CD40L, OX40L, CD80, CD86 e 4-1BBL e seus respectivos ligantes na célula T (2º sinal). Por fim, é necessário o 3º sinal, que corresponde à polarização mediada por citocinas produzidas por DC. A somatória desses sinais induz a ativação e a função efetora da célula T. Essa imagem foi criada usando o BioRender (<https://app.biorender.com/>).

Adicionalmente, vale ressaltar que após a ativação inicial de células T, ocorrem inúmeras alterações na expressão de moléculas de superfície dos linfócitos, entre elas CD69 e CD154 (CD40L). A expressão de CD69 é prontamente regulada positivamente após sinalização via TCR/CD3, o que fundamenta seu uso generalizado como um marcador de linfócitos ativadas e células NK, principalmente (GONZÁLEZ-AMARO et al., 2013). Além de seu valor intrínseco como marcador de ativação, evidências recentes sugerem que o CD69 é um importante regulador das respostas imunológicas (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017), controlando a diferenciação de células de perfil Th1 e Th17 e favorecendo a diferenciação de células T CD4 em Tregs (MARTÍN et al., 2010; RADULOVIC et al., 2012).

O CD69 é uma proteína de membrana que se liga e reduz a expressão de superfície do receptor de esfingosina 1-fosfato (S1PR1). Consequentemente, ele regula a migração de linfócitos e promove a retenção de células T nos órgãos linfoides, tempo suficiente para que os mesmos recebam os sinais para proliferação e diferenciação (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015). Por esse motivo, as células T CD69⁺ são encontradas em menor número na circulação em comparação com os linfonodos ou tecidos inflamados. Condições inflamatórias crônicas, como lúpus, induzem a expansão dessas células na periferia (HERVIER et al., 2011). Esse perfil também se repete em inflamações agudas, como na malária. Estudos demonstraram que os níveis de expressão do marcador de ativação CD69 em ambas as subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺ são mais altos em pacientes sintomáticos do que em controles (FRIMPONG et al., 2018; MUNIZ et al., 2016)

O CD154, por sua vez, é uma proteína de membrana da superfamília do TNF, transitoriamente expresso na superfície das células T ativadas, sendo imediatamente regulado negativamente após sua interação com o CD40. Sabe-se que a interação do CD154 com o CD40 amplifica as respostas de linfócitos, visto que ativa as APC e as torna mais potentes. Isso acontece através da amplificação da expressão de moléculas B7 e da indução da secreção de citocinas, como a IL-12. Além disso, a expressão de CD154 possibilita a realização das funções efetoras dos linfócitos, como a ativação de macrófagos e de células B (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2015).

Por outro lado, a estabilização da expressão intracelular de CD154 permite a caracterização de células T antígeno-específicas. Esta abordagem permite a análise de respostas de células T específicas do antígeno, mesmo quando as células T em questão são produtoras fracas de citocinas (MÖLLER et al., 2011). Em 2005, Frentsch et al. validaram a especificidade antigênica de células T CD4⁺. Os experimentos mostraram que mais da metade das células T CD4⁺ CD40L⁺ específicas para citomegalovírus obtidas por expansão *in vitro* de longo prazo

produziram grandes quantidades de IFN- γ após a reestimulação (FRENTSCH et al., 2005). Posteriormente, Bacher et al. (2013) também mostraram que as células T CD4⁺ que expressam CD154 são facilmente detectadas após estimulação com vários antígenos virais, bacterianos ou fúngicos (BACHER et al., 2013).

Estudos recentes mostram que CD154 pode ter um papel importante nas respostas imunes contra malária. Parmar et al. (2018), ao desafiarem camundongos com a inoculação de esporozoítos de *P. berghei*, mostraram um aumento no número de células T CD4⁺ que expressam CD154 (PARMAR et al., 2018). Estas, poderiam auxiliar as funções de células T CD8⁺ no fígado por meio da ativação das células apresentadoras de antígeno. Diferentemente, estudos anteriores em modelo animal avaliaram o polimorfismo do gene CD154 e correlacionaram com a gravidade da malária. Evidências sugerem que este marcador é um *locus* importante para uma investigação mais aprofundada em relação à suscetibilidade à malária, bem como sua atuação na imunidade ou na patogênese desta doença (PUROHIT et al., [s.d.]; SABETI et al., 2002).

1.8 Peptídeos de *P. vivax*

Na malária, embora os mecanismos de imunodominância e amplitude das respostas das células T contra antígenos de *P. falciparum* tenham sido amplamente analisados (HEIDE et al., 2020; KOTRAIAH et al., 2021; TUCKER et al., 2021), os estudos com *P. vivax* são escassos. Além disso, a maioria dos estudos de perfil imunológico tem, como alvo, antígenos individuais (isto é, proteínas recombinantes do *P. vivax* como o MSP-1, AMA-1 ou DBP) ou um conjunto limitado de epítomos sob a suposição de que eles sejam representativos da resposta específica induzida pelo patógeno (MARTINEZ et al., 2010; NAZ et al., 2021; YEPES-PÉREZ et al., 2018).

Nesse contexto, a fim de avaliar a resposta de células TCD4⁺ antígeno-específica, diversas bibliotecas pequenas de peptídeos já foram testadas em cultura. Em um estudo, López et al. (2018) demonstraram que ao trabalhar com 4 epítomos de PvRON2, 3 deles induziram proliferação celular e 2 induziram produção de TNF, IL-10 e IL-6 (LÓPEZ et al., 2018). Resultados semelhantes foram obtidos por Yepes-Pérez et al. (2018). Estes utilizaram 10 peptídeos de ligação ao HLA-DR de PvI2, biblioteca que induziu produção de citocinas pró-inflamatórias (YEPES-PÉREZ et al., 2018).

Estudos anteriores como o de Martinez et al. (2010), mostrou a antigenicidade de dois epítomos universais de PvDBPII (1635 e 1638), avaliada pela proliferação de linfócitos e

produção de citocinas por PBMC isoladas de indivíduos residentes em uma região endêmica de *P. vivax* que apresentavam diferentes alelos HLA-DR e diferentes graus de exposição a *P. vivax* (MARTINEZ et al., 2010).

Por outro lado, quando se avalia a resposta imune celular utilizando bibliotecas de epítomos de *P. vivax* maiores que as descritas anteriormente, os resultados são controversos. Zheeshan et al. (2015) testaram 21 antígenos ricos em triptofano (TRAg), mas não observaram resposta de linfócitos Th após estimulação (ZEESHAN; TYAGI; SHARMA, 2015a). Entretanto, Caro-Aguilar et al. (2002) utilizando uma biblioteca de 86 peptídeos promíscuos de MSP-1 (CARO-AGUILAR et al., 2002), e Lima-Júnior et al. (2010) utilizando 11 epítomos de MSP-9 (LIMA-JUNIOR et al., 2010), evidenciaram resposta efetora de células T CD4⁺.

Diante do exposto, é possível notar que as respostas de células T CD4⁺ podem ser heterogêneas, quando em contato com determinados antígenos. Além disso, a resposta induzida por um pequeno número de epítomos pode não refletir a resposta parasito-específica efetora e de memória dessas células. Por isso, com a finalidade de obtê-la de forma abrangente, o presente estudo construiu uma biblioteca de 310 peptídeos de *P. vivax*, envolvendo os antígenos com maior reconhecimento pelo sistema imune humano, quando em contato com o parasito.

2 JUSTIFICATIVA

As funções efetoras da resposta imune desencadeada durante a malária humana e sua regulação são complexas e mal compreendidas. Um número limitado de estudos foi realizado até o momento em humanos infectados com o *P. vivax* (CHAVES et al., 2016; JANGPATARAPONGSA et al., 2012; LIMA-JUNIOR et al., 2010). Após a infecção pelo plasmódio, indivíduos desenvolvem imunidade parcial e, portanto, podem ter a doença mais de uma vez. Isso sugere um defeito no desenvolvimento da memória imunológica após infecções naturais da malária. A razão exata para esse comprometimento da memória imunológica não é completamente elucidada (ABUGA; JONES-WARNER; HAFALLA, 2021). Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos imunológicos que favorecem que indivíduos mantenham níveis baixos de parasitemia tornando-se assintomáticos.

Embora a função efetora das células T seja aceita como crucial para a imunidade protetora contra a malária em estágio sanguíneo em camundongos, os mecanismos de proteção em humanos não são claros. Trabalhos do nosso grupo mostram que a infecção aguda pelo *P. vivax* induz ativação de células T que expressam moléculas coestimuladoras e inibitórias, as quais coletivamente indicam exaustão celular. Curiosamente, uma proporção significativa de células T com esse fenótipo mantém a capacidade de proliferar. Além disso, quando a sinalização de algumas dessas moléculas é bloqueada, a capacidade delas de produzir citocinas é restaurada (COSTA et al., 2015, 2018), sugerindo que a exaustão pode ser revertida. Esse mecanismo é evidente na malária sintomática, em que um microambiente rico em citocinas e antígenos do parasito pode desencadear forte ativação das células T e, conseqüentemente, exaustão, podendo prejudicar o desenvolvimento da memória imunológica.

Apesar dos estudos da resposta imune adaptativa durante a malária terem aumentado recentemente, o estudo da função das células T na infecção pelo *P. vivax* e sobretudo na malária assintomática, é dificultado pela falta de ferramentas como a identificação de antígenos proteicos bem definidos. Nossa hipótese é que a baixa carga de antígenos e a inflamação modulada induzida por *P. vivax* acionam a função efetora de células T parasito-específica responsável pelo controle das manifestações clínicas da malária. Nosso objetivo é testar essa hipótese, avaliando as funções das células T nas malárias sintomática e assintomática, com o intuito de propor intervenções para reverter a memória imunológica deficiente desencadeada pela infecção aguda pelo *P. vivax*.

Importante salientar que estratégias de controle da malária estão sendo discutidas em todo o mundo (MARTIN; VINETZ, 2018) e que a falta da imunidade esterilizante representa

uma das maiores barreiras para tal. Portanto, para que os esforços de eliminação da malária tenham sucesso e para que seja possível o desenvolvimento de uma vacina eficaz, é essencial conhecer os mecanismos celulares induzidos por diferentes tipos de infecções e identificar antígenos para os quais indivíduos naturalmente expostos respondam.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Avaliar a resposta de células T CD4⁺ de pacientes sintomáticos e assintomáticos infectados pelo *Plasmodium vivax* utilizando uma biblioteca compreensiva de peptídeos do mesmo.

3.2 Objetivos específicos

- Construir uma biblioteca de peptídeos do *P. vivax*;
- Avaliar a resposta de células T auxiliares específicas para a biblioteca de peptídeos de *P. vivax* de indivíduos infectados assintomáticos e de pacientes com sintomas da malária;
- Avaliar a resposta de subpopulações de células T auxiliares de memória de indivíduos infectados assintomáticos e sintomáticos, empregando a biblioteca de peptídeos de *P. vivax*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Tratou-se de um estudo de caráter experimental, transversal, controlado e unicêntrico, que avaliou a resposta imune celular frente a determinados antígenos do *P. vivax* e o perfil de diferenciação das células T.

4.2 Cuidados éticos

O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas sob número CAAE: 59902816.7.0000.5091. As amostras foram coletadas de voluntários após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este e os demais cuidados éticos foram pautados nas recomendações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

4.3 Área de estudo e participantes

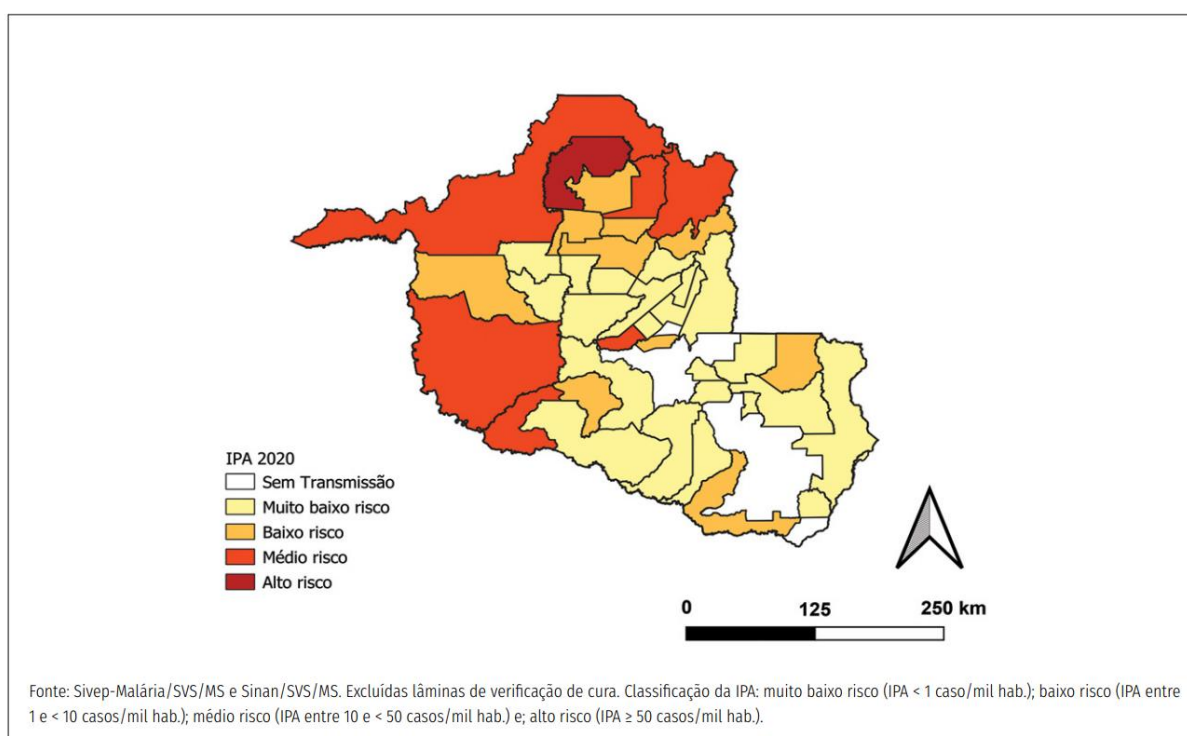
Amostras de sangue de 17 indivíduos sintomáticos agudos antes do tratamento (SY-I), 21 sintomáticos tratados (SY-R), 29 assintomáticos (ASY) e 27 controles saudáveis (CTL), sendo 11 de área não endêmica e 16 de área endêmica, foram usados neste estudo. PBMC (células mononucleares do sangue periférico) foram processadas e criopreservadas em meio de congelamento (Soro fetal bovino, 10% DMSO) em nitrogênio líquido até o uso. Indivíduos com infecção ativa pelo *P. vivax* e sintomáticos foram selecionados dentre aqueles que tiveram diagnóstico por gota espessa e buscaram tratamento no Ambulatório de Malária do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM). Dentre 30 a 45 dias após o início do tratamento, estes indivíduos foram procurados para uma nova coleta de amostras. Indivíduos assintomáticos foram identificados, por meio de busca ativa e testagem em massa, por qPCR, dentre indivíduos residentes em Candeias do Jamari, Rondônia, que relatam não terem sintomas compatíveis com malária nas últimas duas semanas. O status de assintomático foi confirmado pela ausência de sintomas clássicos de malária (febre, dor de cabeça e dor no corpo) no período de 30 a 45 dias após o diagnóstico. A caracterização dos indivíduos dos grupos avaliados será apresentada no tópico seguinte (*seção 5 - Resultados*).

A escolha da área de estudo se baseou no fato de que, entre os 52 municípios de Rondônia, considerando o recorte de janeiro de 2020 a junho de 2021, Porto Velho, Candeias do Jamari e Guajará-Mirim foram responsáveis por 80% do total de casos autóctones de

malária. Além disso, conforme a **figura 5**, Candeias do Jamari é o único município com alto risco de malária (incidência parasitária anual (IPA) ≥ 50 casos/ mil habitantes) (SVS/MS, 2021).

Além disso, indivíduos saudáveis com PCR negativa foram convidados para participar do estudo. Participantes do grupo controle não poderiam apresentar nenhuma doença em curso nem ter tido malária prévia. Além disso, não foram incluídos no estudo aqueles que apresentaram outra doença inflamatória, crônica e/ou autoimune, grávidas, lactantes e menores de 18 anos. Os controles saudáveis envolvidos no estudo eram residentes do município de Belo Horizonte - MG, área não endêmica, e dos municípios de Porto Velho e Candeias do Jamari - RO, áreas endêmicas de malária.

FIGURA 5 - Mapa de risco de malária no estado de Rondônia em 2020.



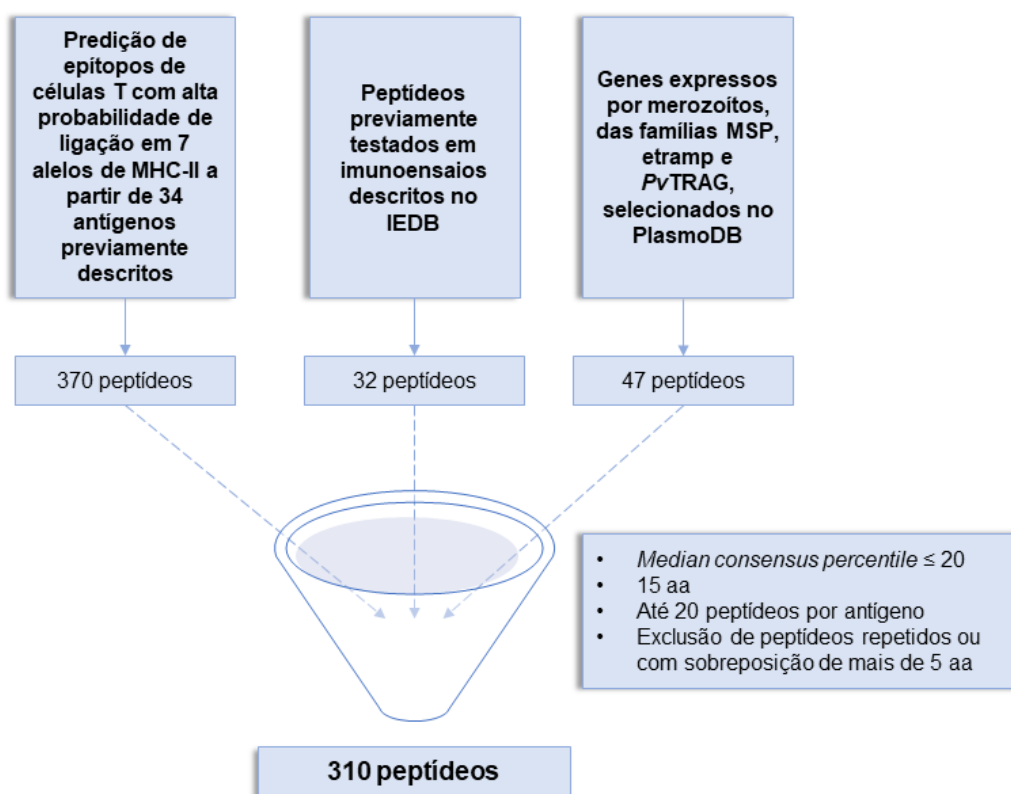
FONTE: *Epidemiological Report - Malaria 2021, 2021*. Mapa de Rondônia, dividido por município, mostrando as áreas de muito baixo a alto risco de transmissão e/ou sem transmissão da malária. Candeias do Jamari, área endêmica e de estudo deste trabalho, é o único município destacado em vermelho representando alto risco, na parte superior do estado.

4.4 Peptídeos para uso *in vitro*

Para a construção da biblioteca de peptídeos foi usada a plataforma IEDB (*Immune Epitope Database and Analysis Resource*), empregando os seguintes termos “*positive assay only*”, “*linear epitopes*”, “*P. vivax*”, “*No B or MHC ligand assays*” and “*human*” (Immune Epitope Database (IEDB), [s.d.]).

Inicialmente, foi feita uma busca na literatura por antígenos proteicos de *P. vivax* que já tivessem sido testados em ensaios que envolviam resposta de células T. Esta busca resultou em uma lista de 34 antígenos, que foram usados para predição de epítomos usando a ferramenta Tepitool e o método de 7 alelos. Este método faz a previsão com base no *median consensus percentile* (MCP) para 7 alelos do HLA-DR comuns (DRB1*03:01, DRB1*07:01, DRB1*15:01, DRB3*01:01, DRB3*02:02, DRB4*01:01, DRB5*01:01). Peptídeos com MCP menor ou igual a 20 são selecionados como ligantes (Paul et al., 2016). A seleção desses alelos e o estabelecimento deste corte foram baseados em uma ampla avaliação da eficácia da predição de epítomos com potencial de ligação em MHC classe II, descrita em Paul et al. (2015). Dessa forma, a ferramenta foi ajustada e resultou em 370 peptídeos. Adicionalmente, 79 peptídeos foram incluídos na biblioteca, sendo 32 selecionados a partir da avaliação de imunoenaios publicados no IEDB e 47 representando genes expressos em merozoítos com potencial antigênico descrito no PlasmoDB. Por conseguinte, essa lista de 449 epítomos foi inspecionada para remoção de duplicatas e sequências super-representadas (sobreposição de 5 ou mais aa) e para determinação de até 20 peptídeos para cada antígeno, sendo escolhidos aqueles com melhores predição de ligação ao HLA-DR e com *median consensus percetile* (MCP) menor ou igual a 20. Todas essas etapas estão descritas no fluxograma abaixo (**Figura 6**).

FIGURA 6 – Fluxograma representativo da seleção de epítomos para a construção da biblioteca de peptídeos MPv310



FONTE: Autor.

Finalmente, a biblioteca de peptídeos foi sintetizada por A e A (Califórnia, EUA) sendo constituída de 310 peptídeos sintéticos (MPv310), cada qual com até 15 aminoácidos. A **tabela 1** descreve os antígenos e genes usados para a construção da biblioteca.

TABELA 1 - Lista de genes e antígenos usados para a construção da biblioteca de peptídeos

	Antígeno/Gene	Número de acesso no PlasmoDB	Número de peptídeos usados
1	AMA-1	PVP01_0934200	6
2	CSP	PVP01_0835600	21
3	DBP	PVX_110810	18
4	Etramp	PVX_090230	5
5	Etramp10.2	PVX_111065	3
6	Etramp10.3	PVX_001715	3
7	Etramp2/Etramp11.2	PVX_003565	4
8	Etramp4	PVX_090230	3
9	Etramp5	PVX_096070	2

10	Etramp8	PVX_088870	3
11	Etramp9	PVX_086915	2
12	MSP-1	PVP01_0728900	22
13	MSP-10	PVX_114145	3
14	MSP-3	PVX_097720	4
15	MSP-4	PVP01_0418300	5
16	MSP-5	PVX_003770	4
17	MSP-9	PVX_124060	6
18	MSP8	PVX_097625	6
19	<i>Pv</i> -fam-a	PVX_088850	8
20	<i>Pv</i> 12	PVX_113775	4
21	<i>Pv</i> 24	PVX_002950	10
22	<i>Pv</i> ATRAg74 (TRD)	PVX_101510	6
23	<i>Pv</i> GAMA	PVX_088910	12
24	<i>Pv</i> MSA180	PVX_094920	20
25	<i>Pv</i> RALP1	PVX_096245	4
26	<i>Pv</i> RAMA	PVX_087885	4
27	<i>Pv</i> RBP2-P1	PVX_094255	20
28	<i>Pv</i> RhopH2	PVX_099930	20
29	<i>Pv</i> TRAg_13	PVX_090275	3
30	<i>Pv</i> TRAg_15	PVX_092990	6
31	<i>Pv</i> TRAg_16	PVX_092995	2
32	<i>Pv</i> TRAg_26	PVX_112660	3
33	<i>Pv</i> TRAg_29	PVX_112675	2
34	<i>Pv</i> TRAg35.2	PVX_109280	2
35	<i>Pv</i> TRAg39.8	PVX_090250	5
36	<i>Pv</i> TRAg40	PVX_101515	2
37	<i>Pv</i> TRAg80.6	PVX_112655	5
38	RBP1a	PVX_098585	20
39	RBP2c	PVX_090325	20
40	RON2	PVX_117880	4
41	TRAG2	PVX_096995	4

FONTE: Autor

4.5 Caracterização fenotípica de células T

A caracterização fenotípica foi realizada a partir de PBMC, congelados em nitrogênio líquido, de um biorrepositório do grupo. Aproximadamente 5×10^6 células foram descongeladas em 10mL de RPMI (Gibco) contendo penicilina e estreptomicina (100 μ g/mL e 100 μ g/mL, respectivamente, Gibco) contendo 1 μ l de Benzonase Nuclease (>250unidades/ μ L, Sigma-Aldrich). As células foram centrifugadas a 700 x g e ressuspensas em 1mL de RPMI completo contendo penicilina e estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco).

Para realização da contagem e verificação da viabilidade em azul de trypan foi usado o contador automático (Thermo Fisher Countess II Automated Cell Counter). Após uma nova centrifugação, as células foram divididas igualmente em 2 poços, cada qual recebendo de $1,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^6$ células, dependendo do número total de células da amostra. Estas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas para permitir o reestabelecimento do metabolismo celular após o descongelamento.

Após esse período, adicionou-se os estímulos. Metade dos poços recebeu 5µg/mL da biblioteca de peptídeos (MPv310, grupo MP) e a outra metade a mesma concentração de DMSO (Sigma) contida na preparação da biblioteca diluído em RPMI (PBMC não estimulado, grupo NE). Para os controles positivos, cerca de um milhão de PBMC foram estimulados com 1µg/mL de anti-CD3 e 0,5µg/mL de anti-CD28 (ambos livres de endotoxinas, BD).

Após 5h de incubação, adicionou-se 2,5µg/mL de Brefeldina e Monensina e as células foram cultivadas por mais 11 horas nas mesmas condições previamente descritas. PBMC não estimulados foram usados para avaliar a produção inespecífica de citocinas. As células então foram centrifugadas, lavadas uma vez com 200µL de PBS e centrifugadas a 800 x g por 3 minutos para retirada de qualquer proteína presente na suspensão e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz com o reagente indicador de viabilidade *Live/Dead Fixable Dead Cell Stain* (Thermo), conforme recomendado pelo fabricante.

Por fim, a suspensão celular foi centrifugada (800 x g, 3 minutos) e incubada por 20 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz com a solução contendo os anticorpos, selecionados para avaliação da resposta antígeno-específica (**Quadro 1**). O painel foi composto por anticorpos contra antígenos de superfície celular, conjugados a fluorocromos, diluídos em tampão de FACS (PBS 1x com 2% SFB): anti-CD4 (BV605, RPA-T4, BD), anti-CD8 (Alexa Fluor 700, SK1, BD), anti-CD45RO (BV786, UCHL1, BD), anti-CD27 (PE, 323, BD) e anti-CD154 (APC-eFluor 780, 24-31, BD). Após a lavagem, as células foram fixadas por 30 minutos à TA e protegidas da luz com o tampão de fixação (*Fixation/Permeabilization Concentrate* diluído em *eBioscience Fixation/Perm Diluent, Invitrogen/Thermo*) e permeabilizadas com o tampão de permeabilização (*Permeabilization Buffer IX, Invitrogen/Thermo*) e, em seguida, marcadas com os anticorpos intracelulares diluídos em tampão de permeabilização (*destacados com asterisco no quadro 1*): anti-CD3 (BV650, UCHT1, BD), anti-CD69 (BV510, FN50, BD) e as citocinas de interesse: IFN-γ (BV605, 4S.B3, BD), TNF (PERCP-Cy5.5, Mab11, BD) e IL-17A (BV605, N49-653, BD). Cerca de 500 mil eventos por amostra foram adquiridos em citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Bioscience) e os dados gerados foram analisados usando o *software* FlowJo v.10 (BD).

QUADRO 1 - Anticorpos e fluorocromos utilizados para imunofenotipagem

Fluorocromo	Anticorpo	Clone
Aqua Stain (405nm)	Viabilidade	-
BV510	CD69*	FN50
BV605	CD4	RPA-T4
BV650	CD3*	UCHT1
BV786	CD45RO	UCLH1
AlexaFluor 488	IL-17A*	N49-653
PE	CD27	323
PERCP-Cy5.5	TNF*	Mab11
PE-Cy7	IFN- γ *	4S.B3
AlexaFluor 700	CD8	SK1
APC-eFluor 780	CD154	24-31

FONTE: Autor. Painel de citometria desenvolvido para análise de células T CD4⁺ *P. vivax*-específicas utilizando equipamento contendo 3 lasers: violeta, azul e vermelho. Nesta imagem encontram-se discriminados os canais onde os anticorpos conjugados com os fluoróforos foram detectados, os fluorocromos e os anticorpos. *Anticorpos marcados intracelularmente.

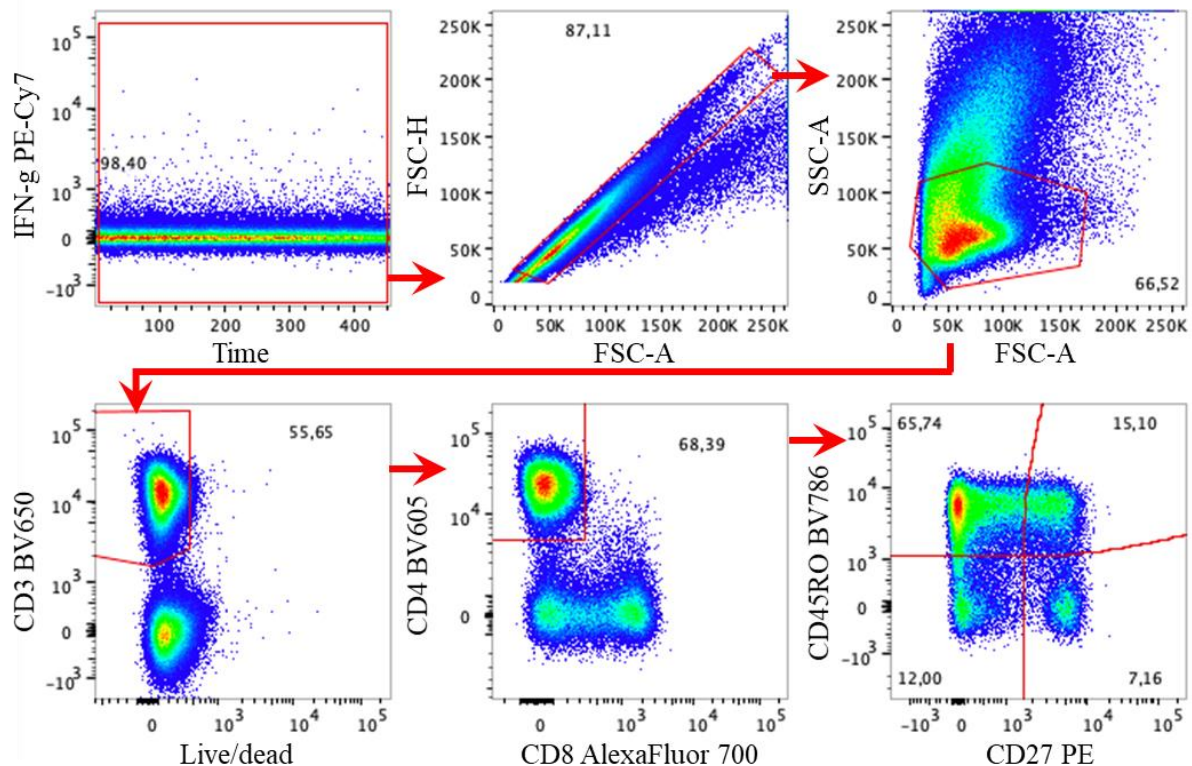
4.6 Estratégia de seleção para caracterização das populações celulares

Para definição da matriz de compensação, foram usadas *beads* não marcada e marcadas com os mesmos anticorpos conjugados à fluorocromos usados nos painéis descritos acima. Foram feitos ajustes manuais na matriz de compensação para melhor adequação dos dados aos padrões esperados para a citometria. A estratégia de seleção das populações de interesse (estratégia de *gating*) está representada na **Figura 8**.

Brevemente, selecionou-se, para cada parâmetro de fluorescência, todos os eventos com intensidade de fluorescência abaixo de 10^5 . A seguir estes eventos foram concatenados utilizando a abordagem booleana para exclusão de todos os eventos apresentando fluorescência inespecífica (acima de 10^5). A partir dessa população foi verificada a intensidade de fluorescência de PE-Cy7 (IFN- γ) contra o tempo de aquisição para exclusão de eventos adquiridos concomitantemente com interrupções de fluxo de aquisição. Também a partir dessa população selecionou-se somente eventos com elevada correlação entre altura e área, utilizando os parâmetros FSC-H (altura) e FSC-A (área), excluindo, portanto, eventos que correspondessem a grumos celulares (*doublets*). Foram utilizados os parâmetros de tamanho (FSC-A) e complexidade intracelular (granulosidade, SSC-A) para a seleção de eventos com características compatíveis com linfócitos. A seguir foram utilizados os parâmetros de viabilidade celular (Live/Dead, 405nm) e a marcação com o anticorpo anti-CD3 para seleção de células T viáveis. A partir dessa população, utilizou-se a fluorescência de CD4 (BV605) para seleção de linfócitos T auxiliares. As subpopulações de memória de linfócitos T auxiliares

foram definidas a partir da expressão combinada de CD45RO e CD27, sendo diferenciadas em células de memória central (CM, CD45RO⁺CD27⁺), memória efetora (EM, CD45RO⁺CD27⁻), células efetoras (efetora, CD45RO⁻CD27⁻) e células não-experientes (*naive*, CD45RO⁻CD27⁺). A expressão das demais moléculas foi avaliada dentro do total de células CD4⁺CD3⁺ ou dentro de cada uma das quatro subpopulações previamente citadas. A expressão da combinação entre as moléculas de ativação e citocinas foi realizada utilizando a abordagem booleana (**Figura 7**).

FIGURA 7 - Estratégia de gating para linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico



FONTE: Autor. Inicialmente as células foram selecionadas a partir do *gate* tempo para excluir potenciais bolhas e interrupções de fluxo. A seguir foi feito um *gate* de FSC-A e FSC-H (*Singlets*) a fim de excluir *doublets*. Posteriormente, selecionou-se o *gate* de linfócitos seguido da exclusão de CD3⁻. Dentro do *gate* de CD3⁺, foi determinada a população CD4⁺. Expressão de citocinas e marcadores de ativação foi avaliada no *gate* de CD4. As subpopulações de CD4 *naive*, CM, EM e efetora foram definidas através da expressão de CD27 e CD45RO.

A produção de uma determinada citocina ou expressão de um determinado marcador de ativação foi avaliada na população total de células T CD4⁺ e nas suas subpopulações de memória. Foram definidos como respondedores os indivíduos cujas frequências do parâmetro avaliado são maiores na condição em que o estímulo com a biblioteca de peptídeos de *P. vivax* foi utilizada em relação a condição não estimulada. Para a definição de respondedores também foi considerado o ponto de corte de cada experimento, definido a partir da média mais 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados de cada experimento. Foram realizados 5 experimentos e os dados foram compilados para análise.

4.7 Análise estatística

Os dados de frequência das populações de interesse obtidos no FlowJo foram exportados e organizados em tabelas utilizando o *software* Excel (Microsoft). Os dados de cada população celular foram então transferidos e analisados no *software* GraphPad Prism v.8. O teste de Shapiro-Wilk foi então utilizado para avaliar se as variáveis em cada grupo clínico apresentavam distribuição paramétrica. O teste de Wilcoxon foi utilizado para verificar a diferença entre as frequências celulares, pareadas por voluntário, para cada grupo, comparando amostras sem estímulo (NE) com aquelas estimuladas com MPv310. Adicionalmente, dos valores obtidos das amostras estimuladas com MPv310 foram subtraídos os valores das amostras pareadas sem estímulo para verificar a produção antígeno-específica das citocinas. Os valores obtidos da subtração foram usados para comparar diferenças na expressão de citocinas entre os grupos clínicos utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. A resposta ao estímulo pelo MPv310 foi utilizada como desfecho para comparar as frequências de indivíduos respondedores entre os grupos em tabelas de contingência. Para comparar as frequências foi utilizado o teste exato de Fisher. As razões de chance foram calculadas utilizando o método Baptista-Pike. Para todas as análises foi estipulado o nível de significância de 0,05 ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população de estudo

A amostra do estudo foi composta por 77 participantes: 17 pacientes sintomáticos antes (SY-I) e 21 após tratamento (SY-R), sendo que 17 voluntários tiveram amostras coletadas de maneira pareada nos dois tempos, 29 assintomáticos (ASY) e 27 controles saudáveis (CTL). As características dos participantes do estudo estão mostradas no **quadro 2**. Todos os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (DP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

QUADRO 2 - Variáveis sociodemográficas e clínicas de pacientes e controles saudáveis

Variáveis	SY-I (n=17)	SY-R (n=21)	ASY (n=29)	CTL (n=27)
Idade (anos)	37,50 \pm 11,12 (31,58-43,42) ^a	35,94 \pm 10,81 (30,57-41,32) ^b	40,44 \pm 14,35 (34,77-46,12) ^c	29,38 \pm 7,77 (26,24-32,53) ^{a,b,c}
Gênero (M/F)	14/17	18/21	12/17	15/13
Parasitemia (nº estimado de parasitos/μL de sangue)	78195 \pm 116176 (13858-142531) ^d	-	109,20 \pm 319,40 (-19,79-238,30) ^d	-
Número de episódios prévios de malária	3,92 \pm 4,25 (1,74-6,38) ^e	3,47 \pm 3,97 (1,42-5,51) ^f	10,52 \pm 10,98 (6,17-14,86) ^{e,f}	-

Resultados das características dos participantes do estudo, expressas em média e desvio padrão (IC 95%). Letras iguais representam diferenças estatísticas entre os grupos.

O grupo CTL foi composto de indivíduos mais jovens que aqueles dos demais grupos ($p < 0,05$, Mann-Whitney). Os indivíduos diagnosticados como ASY possuíam mais episódios prévios de malária, quando comparado com os demais ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis). Além disso, como esperado, indivíduos ASY apresentaram menor parasitemia que pacientes SY-I, estimada através da qPCR ($p = 0,001$).

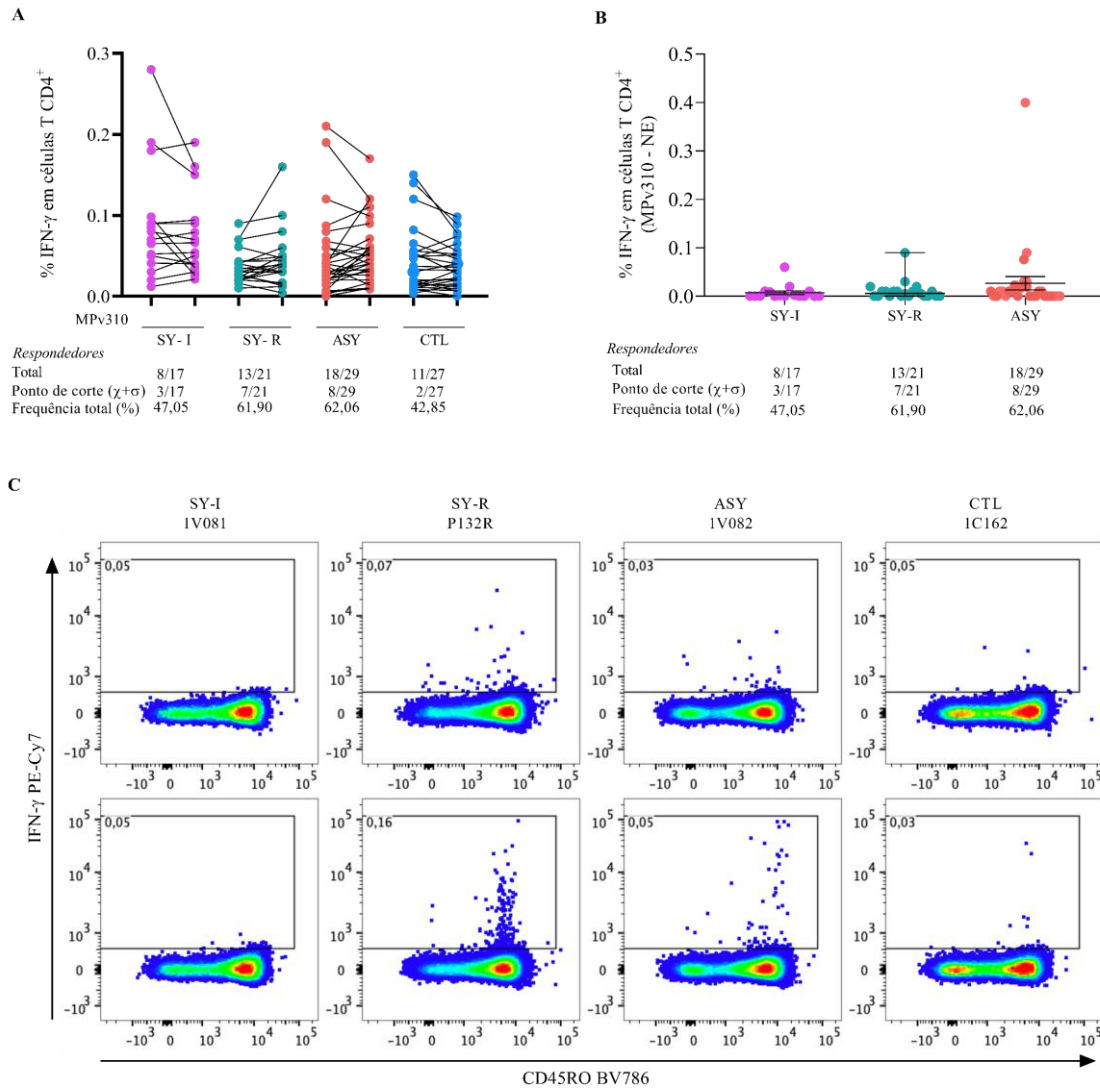
5.2 Caracterização fenotípica de células T

Conforme descrito no item 4.6, as células T CD4⁺ foram selecionadas para avaliação de sua resposta antígeno-específica frente ao estímulo MPv310.

O estímulo com MPv310 induziu a produção de IFN- γ em 47,05% dos SY-I, 61,90% dos SY-R, 62,06% dos ASY e 42,85% dos CTL. Não houve diferença estatística entre as frequências de respondedores entre os grupos (**Figura 8A e 8B**). Foram definidos como respondedores os indivíduos cujas frequências do parâmetro avaliado são maiores na condição em que o estímulo com a biblioteca de peptídeos de *P. vivax* foi utilizada em relação a condição não estimulada. Para a definição de respondedores também foi considerado o ponto de corte de

cada experimento, definido a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados de cada experimento. Vale ressaltar que todos os indivíduos incluídos no grupo CTL de área endêmica relataram nunca terem tido malária e não apresentaram anticorpos anti-PvMSP1₁₉, anti-PvAMA1₆₆ e anti-PvDBPII_{brz2}. Da mesma forma, CTL residentes de área não endêmica não apresentaram histórico de malária (ALMEIDA et al., 2021). Dentre os 27 CTL utilizados neste estudo, 16 são residentes da área de endêmica de Porto Velho e Candeias do Jamari e 11 residem em Belo Horizonte, área sabidamente não endêmica. Não foi observada diferença estatística entre as frequências de respondedores no grupo CTL, mesmo quando segregados entre os que vivem em área endêmica ou não endêmica (CTL NE), quando comparado aos demais grupos (SY-I, SY-R e ASY) (**Tabela 2**). Contudo, quando avaliados individualmente, foi observado que a resposta ao estímulo antigênico é nítida em alguns indivíduos dos grupos ASY e SY-R (**Figura 8C**).

FIGURA 8 - Produção de IFN- γ em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando IFN- γ avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células T CD4⁺ estimuladas e não estimuladas expressando IFN- γ em células T CD4⁺. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ aumentam após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. (C) Gráficos de densidade representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4⁺ expressando IFN- γ de pacientes infectados pelo *P. vivax* e controles saudáveis com e sem estímulo com MPv310.

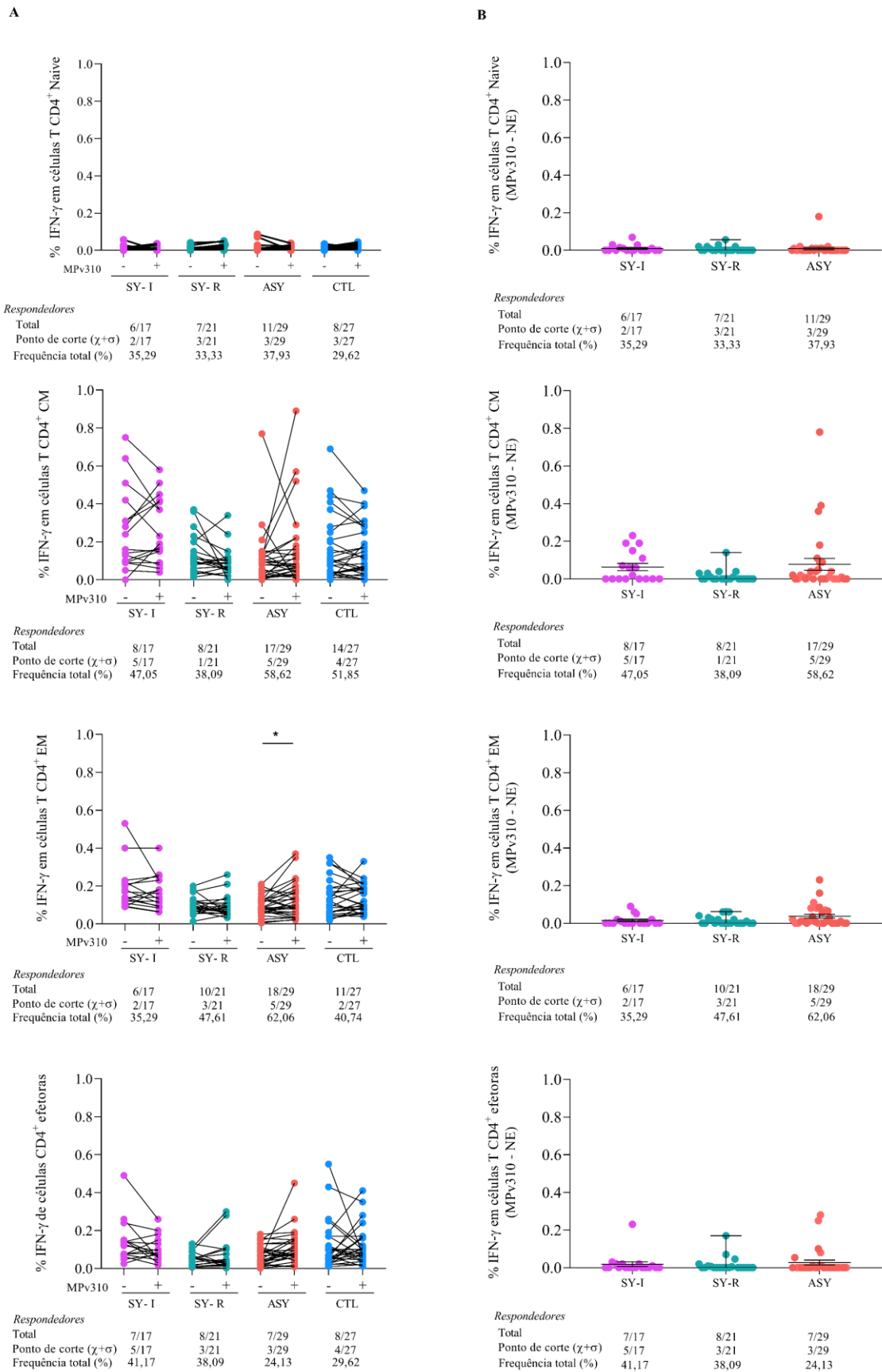
TABELA 2 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que produzem IFN- γ dos grupos SY-I, SY-R e ASY com os grupos CTL e CTL NE

Grupo	R	NR	Comparado a:	Valor <i>p</i>	CI	OR
SY-I	8	9	SY-R	0,51	-0,18 a 0,44	1,82 (0,50 a 6,46)
			ASY	0,36	-0,13 a 0,46	0,54 (0,16 a 1,69)
			CTL	0,76	-0,24 a 0,36	1,12 (0,39 a 4,23)
			CTL (NE)	0,70	-0,28 a 0,44	1,55 (0,34 a 6,09)
SY-R	13	8	ASY	>0,99	-0,28 a 0,27	0,99 (0,29 a 2,94)
			CTL	0,24	-0,09 a 0,47	2,36 (0,71 a 7,34)
			CTL (NE)	0,26	-0,14 a 0,56	2,84 (0,69 a 10,58)
ASY	18	11	CTL	0,18	-0,07 a 0,45	2,38 (0,86 a 7,28)
			CTL (NE)	0,17	-0,11 a 0,54	2,86 (0,67 a 10,09)
SY-I	8	9	-	-	-	-
SY-R	13	8	-	-	-	-
ASY	18	11	-	-	-	-
CTL	11	16	-	-	-	-
CTL (NE)	3	8	-	-	-	-

Valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo pelo teste exato de Fisher. CI = Intervalo de confiança, OR = *Odds ratio*.

No que se refere às subpopulações de memória (*naive*, CM, EM e efetora), observou-se produção significativa de IFN- γ apenas em células T CD4⁺ de EM em indivíduos assintomáticos ($p=0,040$) (**Figura 9A e 9B**).

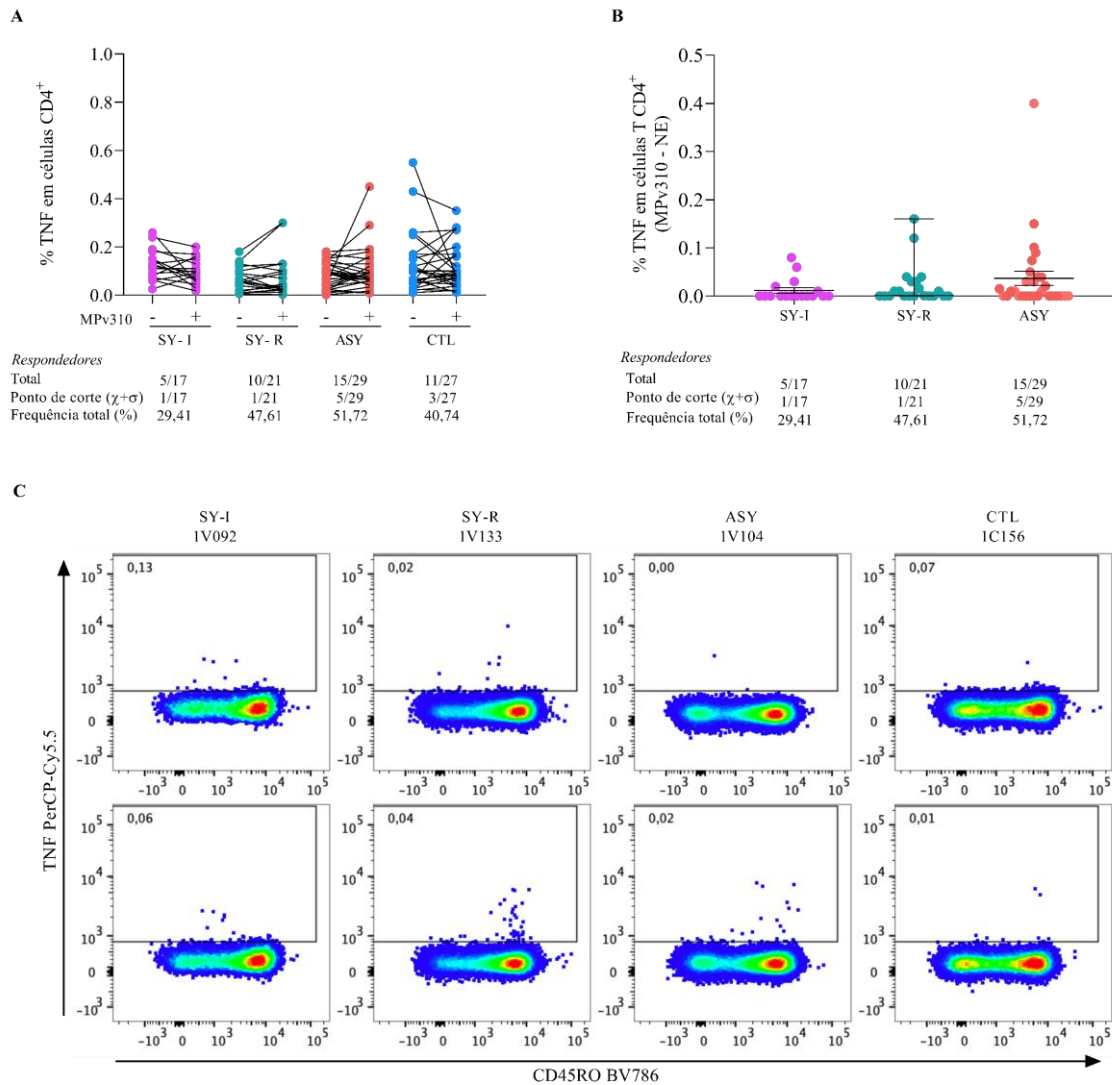
FIGURA 9 - Produção de IFN- γ em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequências de linfócitos T CD4 *naive*, CM, EM e efetora (de cima para baixo) expressando IFN- γ avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas com MPv310 e não estimuladas expressando IFN- γ em subpopulações *naive*, CM, EM e efetores (de cima para baixo). As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ aumentam após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi + \sigma$): Indivíduos que respondem acima do cut-off calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. * $p < 0,05$.

O estímulo com MPv310 induziu a produção de TNF em 29,41%, 47,61% e 51,72% dos indivíduos nos grupos SY-I, SY-R e ASY, respectivamente. O grupo controle apresentou 40,74% de indivíduos respondedores. Nenhuma diferença estatística foi observada nos grupos quando as frequências de células produtoras de TNF foram avaliadas nas condições não estimulada e estimulada com MPv310 (**Figura 10A e 10B**). Não foi observada diferença estatística entre as frequências de respondedores no grupo CTL, mesmo quando segregados entre os que vivem em área endêmica (CTL) ou não (CTL NE), quando comparado aos demais grupos (SY-I, SY-R e ASY) (**Tabela 3**). Novamente, vale ressaltar que a resposta observada é heterogênea e a produção de TNF é nítida em alguns indivíduos (**Figura 10C**).

FIGURA 10 - Expressão de TNF em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando TNF avaliada em pacientes SY-I (cor roxa), SY-R (cor verde), ASY (cor salmão) e CTL (cor azul) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas expressando TNF em células T CD4⁺. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ produtoras de TNF aumentam após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. (C) *Dot plots* representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4 expressando TNF de pacientes infectados pelo *P. vivax* e controles saudáveis com e sem estímulo com MPv310.

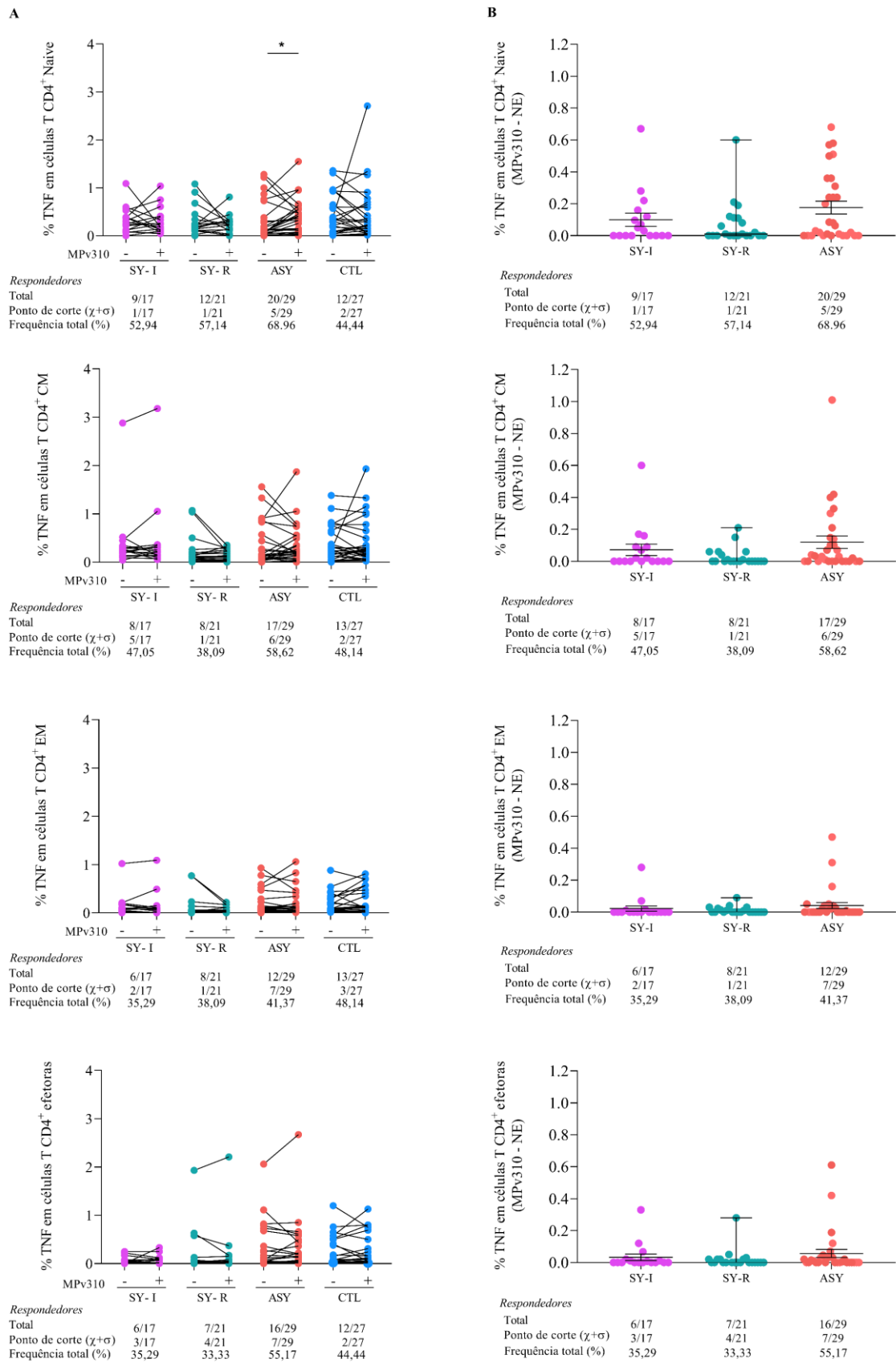
Tabela 3 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam TNF dos grupos SY-I, SY-R e ASY com os grupos CTL e CTL NE

Grupo	R	NR	Comparado a:	Valor <i>p</i>	CI	OR
SY-I	5	12	SY-R	0,32	-0,10 a 0,52	0,45 (0,12 a 1,75)
			ASY	0,21	-0,03 a 0,54	0,38 (0,11 a 1,33)
			CTL	0,53	-0,15 a 0,43	0,60 (0,17 a 2,07)
			CTL (NE)	0,66	-0,27 a 0,41	1,87 (0,33 a 10,88)
SY-R	11	10	ASY	>0,99	-0,23 a 0,33	0,84 (0,25 a 2,70)
			CTL	0,77	-0,22 a 0,35	1,32 (0,38 a 3,90)
			CTL (NE)	0,13	-0,10 a 0,56	4,09 (0,80 a 21,55)
ASY	15	14	CTL	0,43	-0,16 a 0,36	1,55 (0,57 a 4,49)
			CTL (NE)	0,07	-0,05 a 0,57	4,82 (0,85 a 24,40)
SY-I	5	12	-	-	-	-
SY-R	11	10	-	-	-	-
ASY	15	14	-	-	-	-
CTL	11	16	-	-	-	-
CTL (NE)	2	9	-	-	-	-

Valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo pelo teste exato de Fisher. CI = Intervalo de confiança, OR = *Odds ratio*.

Dentre as subpopulações de memória em células T CD4⁺, a maior frequência de células produzindo TNF foi observada em células *naive* e apenas no grupo ASY ($p=0,040$, Wilcoxon). Não foi observada indução significativa da produção de TNF em células T CD4⁺ CM, EM e efetoras nos grupos estudados (**Figura 11A e 11B**).

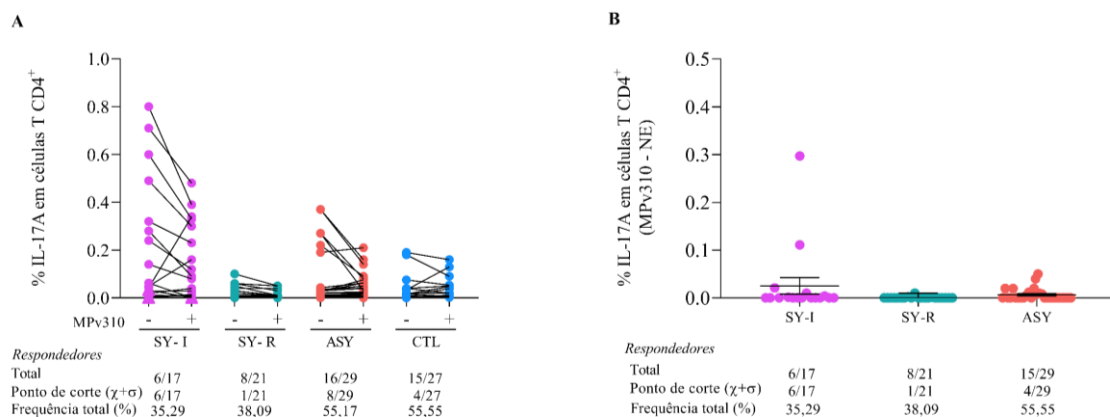
FIGURA 11 - Produção de TNF por subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) As frequências de linfócitos T CD4 *naive*, CM, EM e efetora expressando TNF avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas expressando TNF em subpopulações *naive*, CM, EM e efetoras (de cima para baixo). As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ produtoras de TNF aumentam após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. *p<0,05.

Não foi observada indução significativa da produção de IL-17A nos grupos clínicos estudados (**Figura 12A e 12B**). Não foi observada diferença estatística entre as frequências de respondedores no grupo CTL, mesmo quando segregados entre os que vivem em área endêmica (CTL) ou não (CTL NE), quando comparado aos demais grupos (SY-I, SY-R e ASY) (**Tabela 4**).

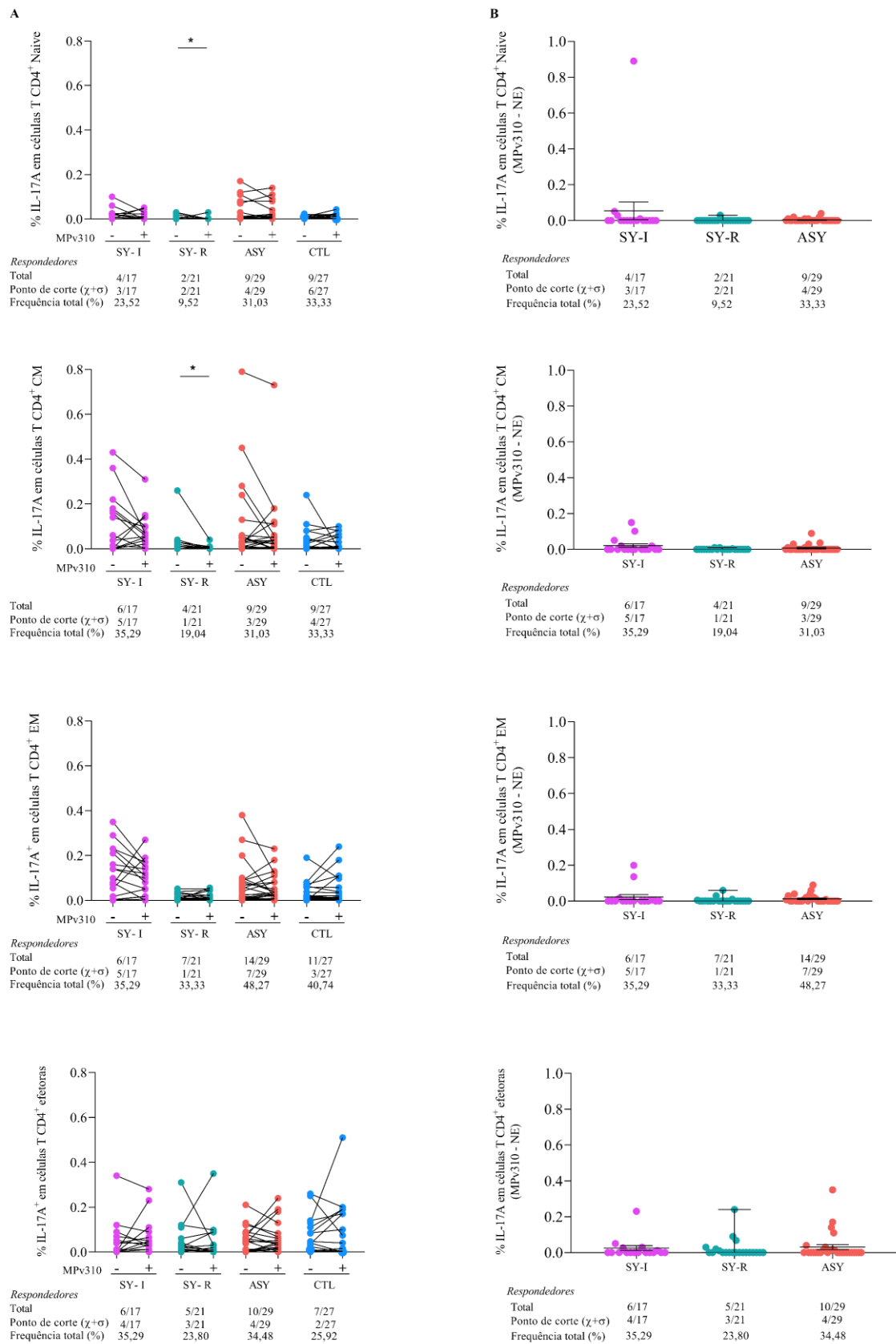
FIGURA 12 - Produção de IL-17A por células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequência de linfócitos T CD4⁺ produtoras de IL-17A avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células T CD4⁺ estimuladas e não estimuladas produzindo IL-17A. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A aumentam após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores.

Em relação aos compartimentos de memória, em células T *naive* (p=0,030) e de CM (p=0,010) de indivíduos do grupo SY-R, foi observada uma redução na frequência de células produzindo IL-17A nos grupos estimulados com MPv310 em relação ao não estimulado (**Figura 13A e 13B**).

FIGURA 13- Produção de IL-17A por subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequências e (B) diferenças entre as frequências de linfócitos T CD4⁺ *naive*, CM, EM e efetora (de cima para baixo) produzindo IL-17A estimuladas (+) e não estimuladas (-), avaliadas nos 4 grupos clínicos. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ produtoras de IL-17A aumentam após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. * $p<0,05$.

TABELA 4 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam IL-17A dos grupos SY-I, SY-R e ASY com os grupos CTL e CTL NE

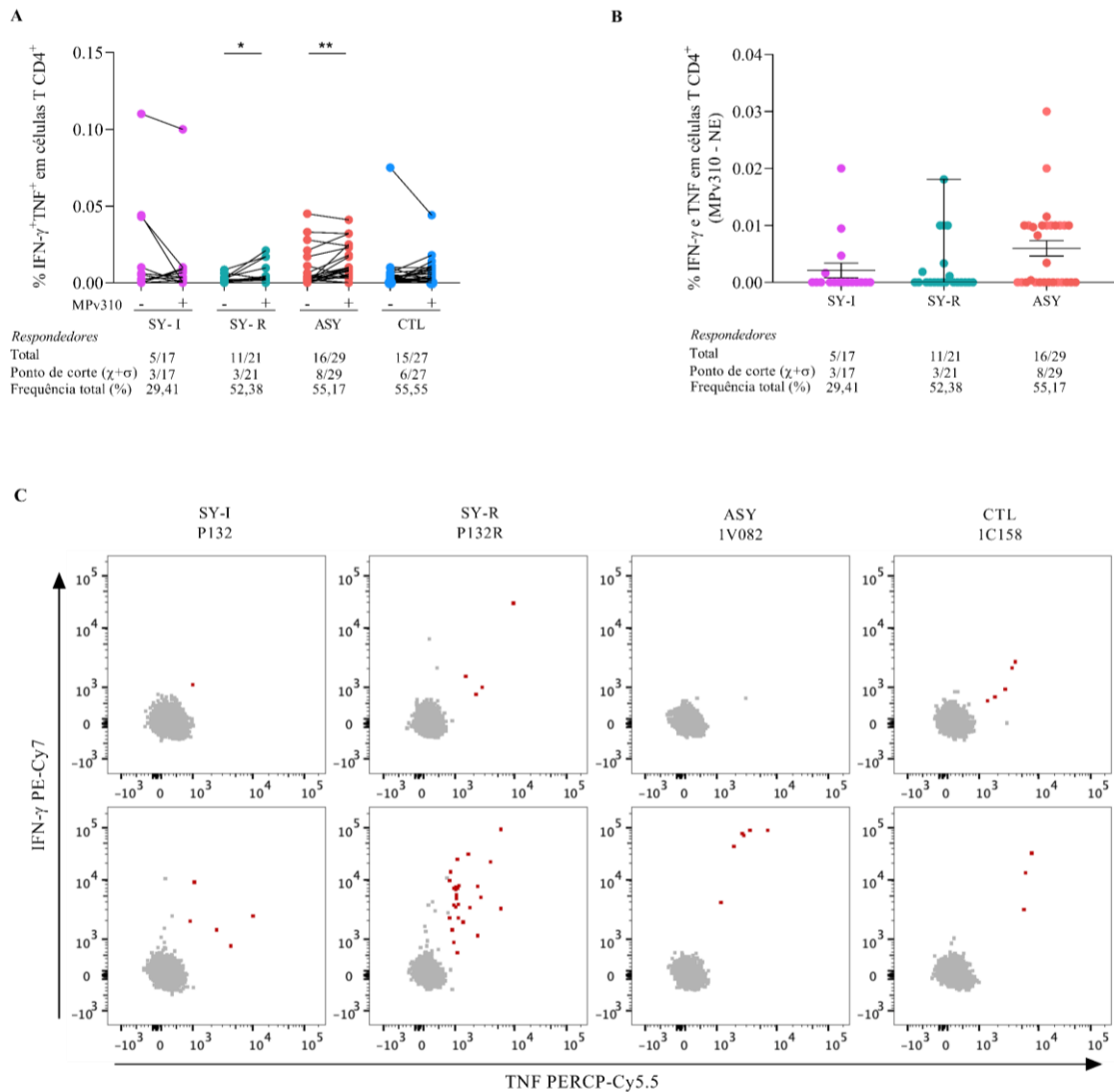
Grupo	R	NR	Comparado a:	Valor <i>p</i>	CI	OR
SY-I	6	11	SY-R	>0,99	-0,29 a 0,33	1,12 (0,28 a 3,77)
			ASY	0,23	-0,06 a 0,52	0,44 (0,14 a 1,48)
			CTL	0,22	-0,07 a 0,53	0,43 (0,13 a 1,41)
			CTL (NE)	0,70	-0,25 a 0,47	0,65 (0,12 a 3,41)
SY-R	8	13	ASY	0,26	-0,09 a 0,47	0,50 (0,16 a 1,58)
			CTL	0,25	-0,090 a 0,48	0,49 (0,16 a 1,62)
			CTL (NE)	0,72	-0,28 a 0,43	0,73 (0,17 a 3,41)
ASY	16	13	CTL	>0,99	-0,26 a 0,27	0,98 (0,35 a 2,72)
			CTL (NE)	0,48	-0,18 a 0,48	2,15 (0,52 a 7,58)
CTL	15	12	-	-	-	-
CTL (NE)	4	7	-	-	-	-

Valor de $p<0,05$ foi considerado como significativo pelo teste exato de Fisher. CI = Intervalo de confiança, OR = *Odds ratio*.

A fim de avaliar a frequência de células que produzem simultaneamente TNF e IFN- γ foi utilizada a abordagem de intersecção das células produtoras de ambas as citocinas (TNF e IFN- γ). O estímulo com MPv310 induziu a produção concomitante de TNF e IFN- γ em 29,41% dos SY-I, 52,38% dos SY-R, 55,17% dos ASY e 55,55% dos CTL. Foi observado que o pool de peptídeos induziu aumento estatisticamente significativa na expressão concomitante das citocinas nos grupos SY-R ($p=0,010$) e ASY ($p=0,004$) (**Figura 14A e 14B**).

Entretanto, a frequência de respondedores (indivíduos em que houve indução da expressão de IFN- γ e TNF após estímulo) não diferiu entre os grupos clínicos estudados (**Tabela 5**). Vale ressaltar que embora as diferenças não sejam significativas, pode-se observar nitidamente a indução de IFN- γ e TNF em alguns indivíduos (**Figura 14C**).

FIGURA 14 - Produção de IFN- γ e TNF em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequência de linfócitos T CD4⁺ co-expressando IFN- γ e TNF avaliada em pacientes SY-I (cor roxa), SY-R (cor verde), ASY (cor salmão) e CTL (cor azul) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas co-expressando IFN- γ e TNF em células T CD4⁺. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e TNF após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. (C) *Dot plots* representativos mostram as frequências de linfócitos T CD4⁺ (cinza) co-expressando IFN- γ e TNF (vermelho) de pacientes infectados pelo *P. vivax* e controles saudáveis com e sem estímulo com MPv310. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

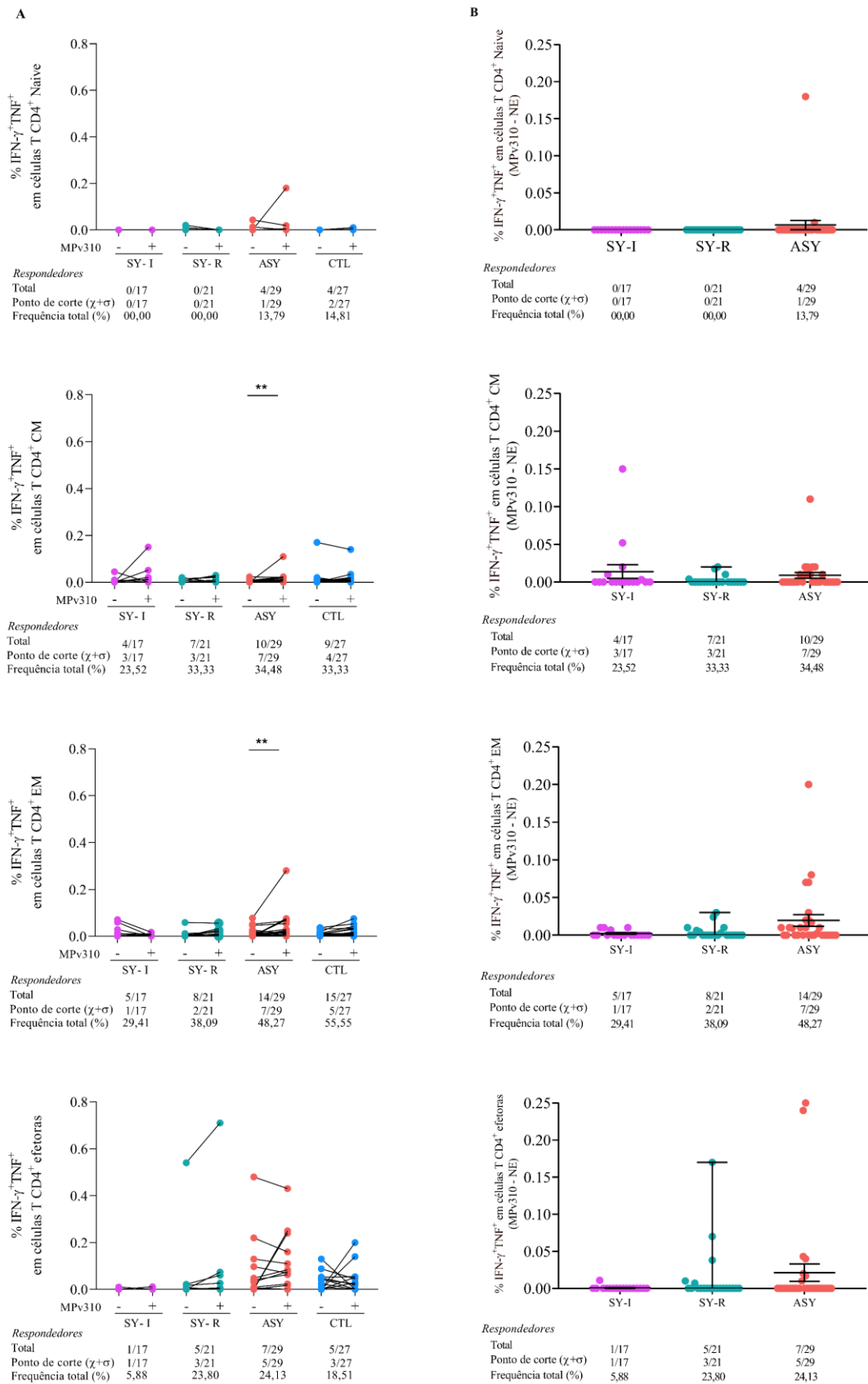
TABELA 5 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que co-expressam IFN- γ e TNF nos grupos SY-I, SY-R e ASY comparado a CTL e CTL NE

Grupo	R	NR	Comparado a:	Valor <i>p</i>	CI	OR
SY-I	5	12	SY-R	0,19	-0,04 a 0,57	0,37 (0,09 a 1,43)
			ASY	0,12	0,003 a 0,58	0,33 (0,10 a 1,31)
			CTL	0,12	0,003 a 0,59	0,33 (0,09 a 1,12)
			CTL (NE)	0,12	0,04 a 0,75	0,23 (0,05 a 1,13)
SY-R	11	10	ASY	>0,99	-0,25 a 0,32	0,89 (0,27 a 2,91)
			CTL	>0,99	-0,25 a 0,32	0,88 (0,25 a 2,97)
			CTL (NE)	0,71	-0,21 a 0,49	0,62 (0,16 a 2,53)
ASY	16	13	CTL	>0,99	-0,26 a 0,27	0,98 (0,35 a 2,72)
			CTL (NE)	0,72	-0,22 a 0,45	0,70 (0,19 a 2,73)
CTL	11	16	-	-	-	-
CTL (NE)	7	4	-	-	-	-

Valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo pelo teste exato de Fisher. CI = Intervalo de confiança, OR = *Odds ratio*.

Com relação às subpopulações de células T CD4⁺, mais uma vez destacam-se as diferenças encontradas no grupo ASY com aumento na indução concomitante de IFN- γ e TNF em células CM ($p=0,002$) e EM ($p=0,005$), após estímulo antígeno-específico (**Figura 15A e 15B**).

FIGURA 15 - Co-expressão de IFN- γ e TNF em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)

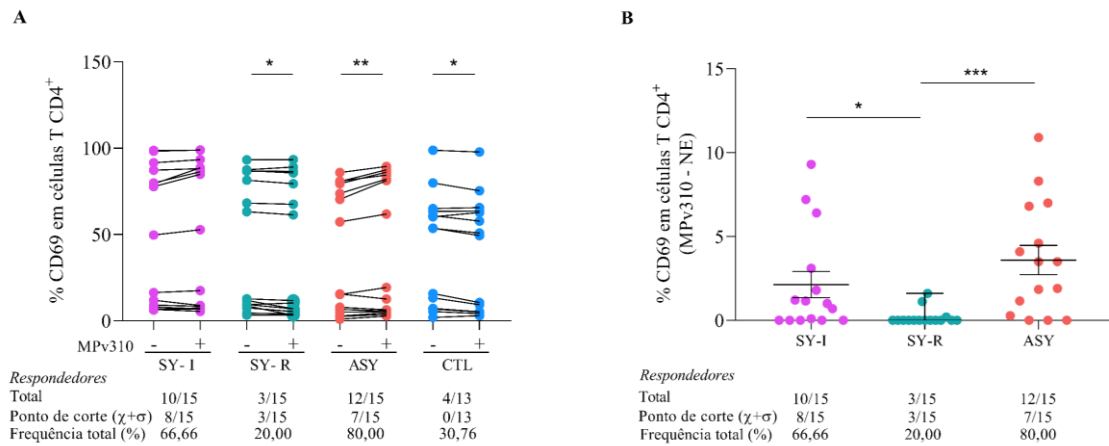


FONTE: Autor. (A) As frequências de linfócitos T CD4⁺ *naive*, CM, EM e efetora (de cima para baixo) expressando concomitante IFN- γ e TNF avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas expressando concomitante IFN- γ e TNF em subpopulações *naive*, CM, EM e efetoras (de cima para baixo). As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e TNF após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi + \sigma$): Indivíduos que respondem acima do cut-off calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. **p<0,01

Tomados em conjunto, esses resultados mostram uma discreta resposta geral de alguns indivíduos assintomáticos e recuperados contra o MPv310, principalmente com indução concomitante de TNF e IFN- γ .

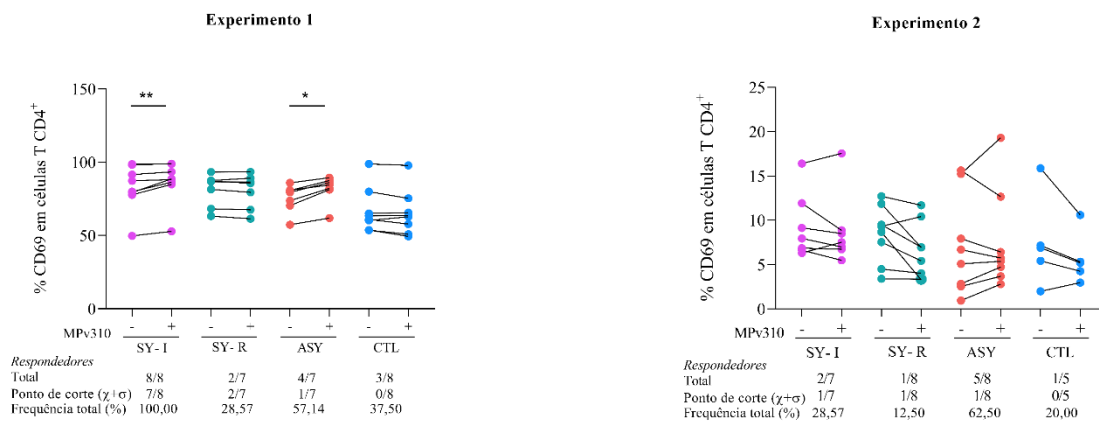
A frequência de células produtoras de IFN- γ induzidas por estímulo específico, em geral, é muito baixa. Portanto, marcadores extracelulares de ativação induzida têm sido constantemente utilizados para identificar células antígeno-específicas. Com a finalidade de verificar o potencial da biblioteca de peptídeos selecionada na ativação das células T CD4⁺ na infecção por *P. vivax*, avaliadas as expressões das moléculas CD69 e CD154. Observou-se indução da expressão de CD69 em células T CD4⁺ no grupo ASY (p=0,005). Por outro lado, foi observada uma diminuição na frequência de células expressando CD69 nos grupos SY-R (p=0,010) e CTL (p=0,010) quando estimuladas com MPv310 e comparadas com NE (**Figura 16A**). Embora o padrão de expressão de CD69 tenha se mantido similar quando as frequências de cada indivíduo foram comparadas com ou sem estímulo com o MPv310, é importante mencionar que houve uma grande variação na expressão de CD69 entre os experimentos executados. Observamos que, somente no experimento 1, indivíduos SY-I e ASY apresentaram frequências maiores após estímulo com o MPv310 (**Figura 17**). Para minimizar o efeito da variação entre experimentos, optou-se por analisar a expressão dessa molécula somente considerando a diferença entre MPv310 e NE. Consequentemente, foi observada diferença significativa na indução da expressão de CD69 entre indivíduos SY-I e SY-R (p<0,05) e SY-R e ASY (p<0,001) (**Figura 16B**). Além disso, a frequência de respondedores do grupo SY-R em comparação a SY-I e ASY foi significativamente menor. Por outro lado, a frequência de respondedores ASY foi significativamente maior que CTL (**Tabela 6**).

FIGURA 16 - Expressão de CD69 em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequência de linfócitos T CD4 expressando CD69 avaliada em pacientes SY-I (cor roxa), SY-R (cor verde), ASY (cor salmão) e CTL (cor azul) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas expressando CD69 em células T CD4⁺. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ expressando CD69 após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

FIGURA 17 - Expressão de CD69 em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310), avaliada separadamente por experimento



FONTE: Autor. Frequência de linfócitos T CD4 expressando CD69 avaliada em pacientes SY-I (cor roxa), SY-R (cor verde), ASY (cor salmão) e CTL (cor azul) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+), avaliada, separadamente, por experimento 1 (gráfico à esquerda) e experimento 2 (gráfico à direita). As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ expressando CD69 após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

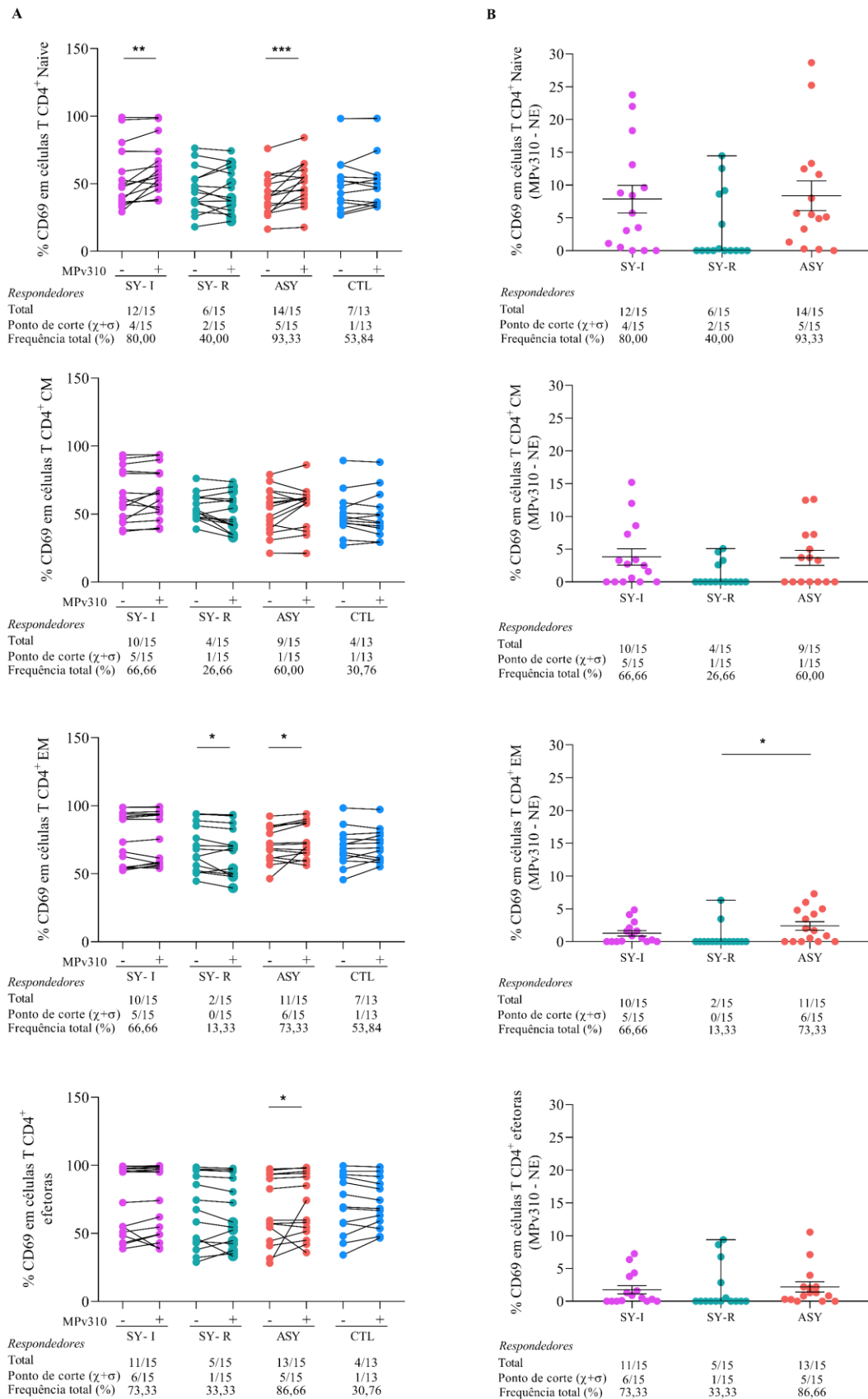
TABELA 6 - Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam CD69 nos grupos SY-I, SY-R e ASY comparado a CTL e CTL NE

Grupo	R	NR	Comparado a:	Valor <i>p</i>	CI	OR
SY-I	10	5	SY-R	0,02*	0,06 a 0,71	8,00 (1,64 a 33,60)
			ASY	0,31	-0,15 a 0,42	2,44 (0,57 a 9,36)
			CTL	0,12	-0,05 a 0,64	4,50 (1,00 a 19,45)
			CTL (NE)	0,20	-0,12 a 0,65	4,00 (0,63 a 18,47)
SY-R	3	12	ASY	0,01*	0,19 a 0,76	0,15 (0,04 a 0,62)
			CTL	0,67	-0,22 a 0,45	0,56 (0,12 a 2,66)
			CTL (NE)	0,63	-0,25 a 0,50	0,50 (0,09 a 2,74)
ASY	12	3	CTL	0,02*	0,07 a 0,74	9,00 (1,69 a 39,62)
			CTL (NE)	0,46	0,008 a 0,75	8,00 (1,08 a 39,96)
CTL	4	9	-	-	-	-
CTL (NE)	3	6	-	-	-	-

Valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo pelo teste exato de Fisher. CI = Intervalo de confiança, OR = *Odds ratio*. * $p < 0,05$.

Com relação às subpopulações de T CD4⁺, foi observada indução da expressão de CD69, nos grupos SY-I ($p=0,002$) e ASY ($p=0,004$) em células T *naive*, no grupo ASY em células de EM ($p=0,030$) e efetora ($p=0,030$). Por outro lado, houve redução na frequência de células de EM expressando CD69 no grupo SY-R ($p=0,030$) quando submetidas ao estímulo com MPv310 (**Figura 18A**). Além disso, foi observada diferença significativa na indução da expressão de CD69 em células de EM entre indivíduos SY-R e ASY ($p < 0,05$) (**Figura 18B**). Diante desses dados, nota-se que o estímulo antigênico tem um efeito estimulador para o grupo ASY e modulador para o grupo SY-R. Isso poderia ocorrer devido à maior disponibilidade antigênica e/ou diferentes repertórios de células de memória.

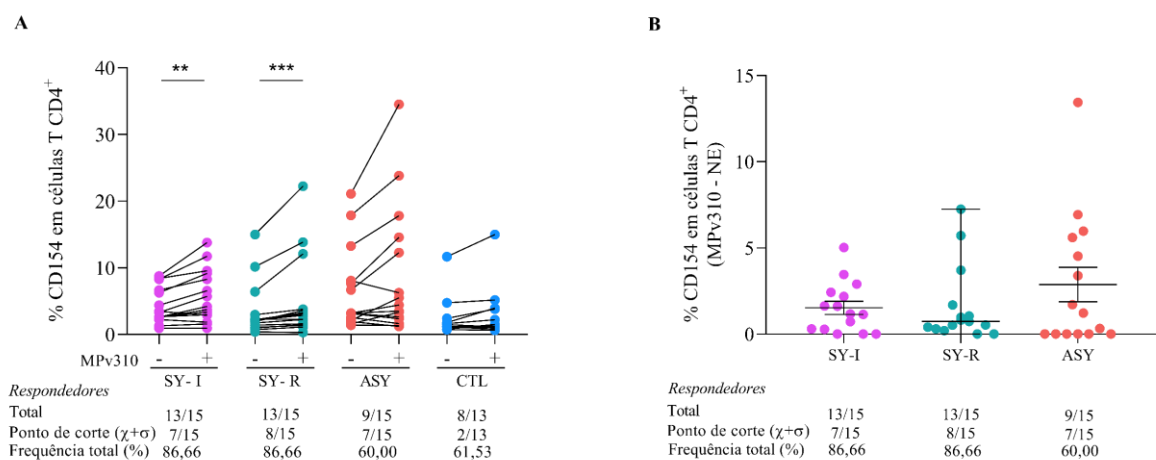
FIGURA 18 - Expressão de CD69 em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) As frequências de linfócitos T CD4 *naive*, CM, EM e efetora expressando CD69 avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas expressando CD69 em subpopulações *naive*, CM, EM e efetoras. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ expressando CD69 após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do cut-off calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Houve indução da expressão de CD154 em células T CD4⁺ nos grupos SY-I ($p<0,01$) e SY-R ($p<0,001$). Observou-se também indução da expressão de CD154 em células estimuladas com MPv310 nos assintomáticos, mas as diferenças não atingiram significância estatística ($p=0,070$) (**Figura 19A e 19B**). Embora sintomáticos e assintomáticos apresentem frequência de respondedores maiores comparadas aos de CTL, não foi observada diferença estatística entre os grupos clínicos estudados (**Tabela 7**).

FIGURA 19 - Frequência de células T CD4⁺CD154⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequência de linfócitos T CD4⁺CD154⁺ avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas expressando CD154 em células T CD4⁺. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos que aumentam a expressão de CD154 após estímulo. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

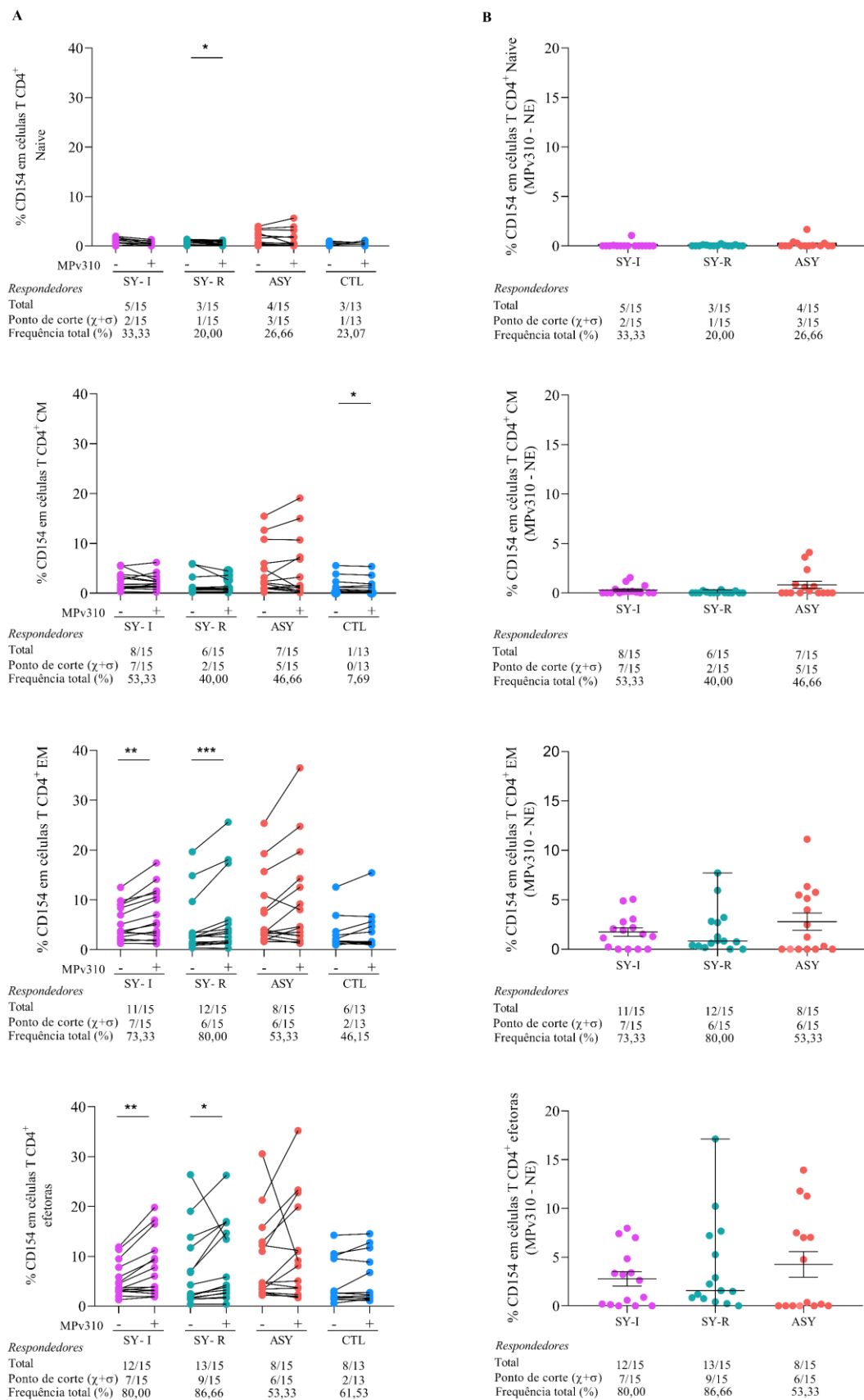
TABELA 7- Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que expressam CD154 nos grupos SY-I, SY-R e ASY comparado a CTL e CTL NE

Grupo	R	NR	Comparado a:	Valor <i>p</i>	CI	OR
SY-I	13	2	SY-R	>0,99	-0,30 a 0,30	1,00 (0,14 a 7,12)
			ASY	0,21	-0,09 a 0,55	4,33 (0,71 a 23,67)
			CTL	0,19	-0,11 a 0,56	4,06 (0,66 a 23,00)
			CTL (NE)	0,06	-0,011 a 0,73	8,12 (1,26 a 47,87)
SY-R	13	2	ASY	0,21	-0,09 a 0,55	4,33 (0,71 a 23,67)
			CTL	0,19	-0,11 a 0,56	4,06 (0,66 a 23,00)
			CTL (NE)	0,06	-0,011 a 0,73	8,12 (1,26 a 47,87)
ASY	9	6	CTL	>0,99	-0,34 a 0,38	0,93 (0,18 a 4,31)
			CTL (NE)	0,67	-0,27 a 0,52	1,87 (0,36 a 8,80)
CTL	8	5	-	-	-	-
CTL (NE)	4	5	-	-	-	-

Valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo pelo teste exato de Fisher. CI = Intervalo de confiança, OR = *Odds ratio*.

Dentre as subpopulações de memória em células T CD4⁺, observou-se aumento na frequência de células de EM e efetora expressando CD154 no grupo SY-I ($p=0,004$ e $p=0,002$, respectivamente) e SY-R ($p=0,004$ e $p=0,010$, respectivamente) quando estimuladas com MPv310. Curiosamente, os grupos SY-R ($p=0,030$) e CTL ($p=0,010$) demonstraram redução na expressão de CD154 nas subpopulações *naive* e CM, respectivamente quando estimuladas com MPv310 (**Figura 20A e 20B**).

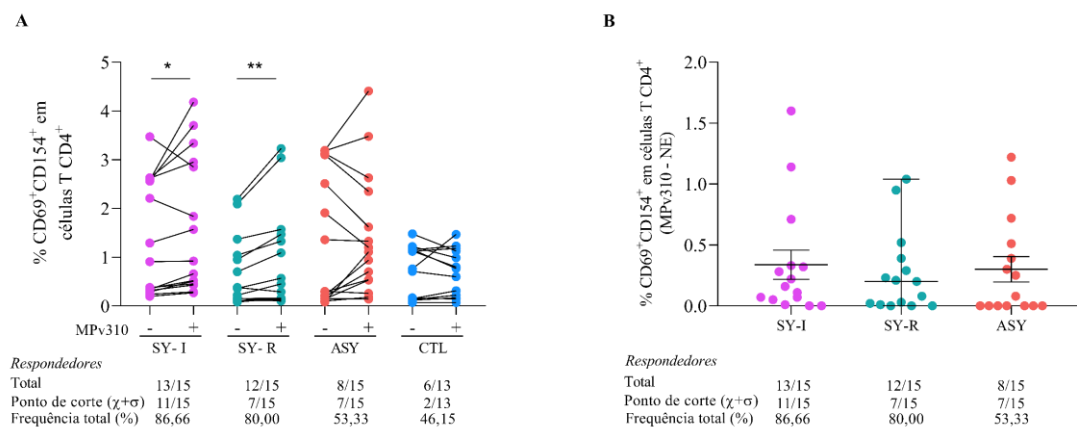
FIGURA 20 - Expressão de CD154 em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) As frequências de linfócitos T CD4 *naive*, CM, EM e efetora expressando CD154 avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas expressando CD154 em subpopulações *naive*, CM, EM e efetoras. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ expressando CD154 após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Por fim, foi observado aumento na frequência de células T CD4⁺ co-expressando CD69 e CD154, nos grupos SY-I ($p=0,034$) e SY-R ($p=0,005$) quando estimuladas com MPv310 (**Figura 21A e 21B**). Dentre as frequências de respondedores, foi observada diferença estatística entre SY-I e CTL, evidenciando indivíduos infectados estão em frequência aumentada em relação ao CTL (**Tabela 8**).

FIGURA 21 - Expressão concomitante de CD69 e CD154 em células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310)



FONTE: Autor. (A) Frequência de linfócitos T CD4 co-expressando CD69 e CD154 avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas co-expressando CD69 e CD154 em células T CD4⁺. As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ expressando CD69 e CD154 após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi+\sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. * $p<0,05$, ** $p<0,01$

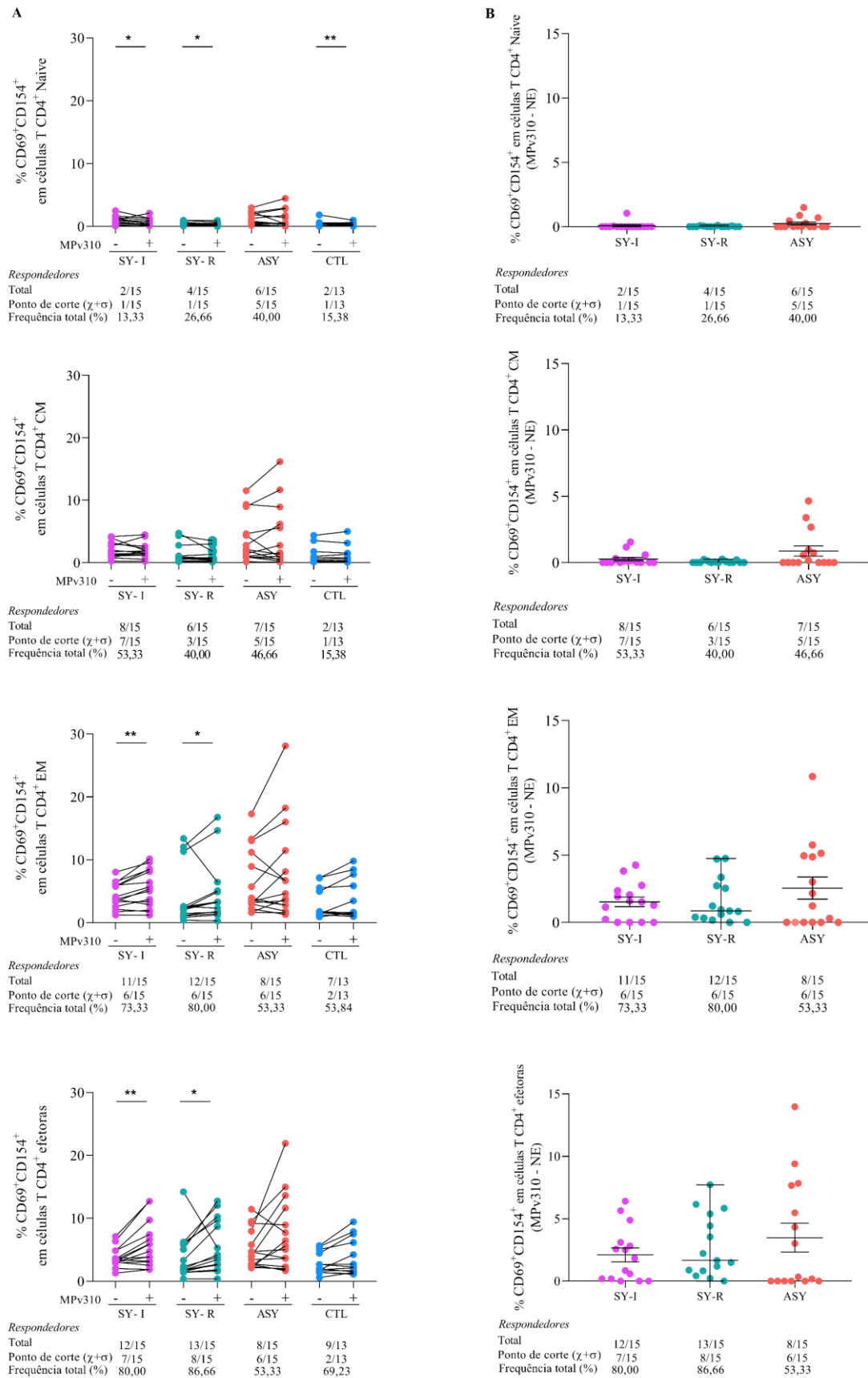
TABELA 8- Associação entre as frequências de indivíduos respondedores (R) e não respondedores (NR) que co-expressam CD69 e CD154 nos grupos SY-I, SY-R e ASY comparado a CTL e CTL NE

Grupo	R	NR	Comparado a:	Valor p	CI	OR
SY-I	13	2	SY-R	>0,99	-0,25 a 0,37	1,62 (0,28 a 10,22)
			ASY	0,10	-0,04 a 0,61	5,68 (1,00 a 30,47)
			CTL	0,04*	0,009 a 0,68	7,58 (1,22 a 41,12)
			CTL (NE)	0,06	-0,01 a 0,73	8,12 (1,26 a 47,87)
SY-R	12	3	ASY	0,24	-0,10 a 0,56	3,50 (0,74 a 14,76)
			CTL	0,11	-0,06 a 0,63	4,66 (0,91 a 20,16)
			CTL (NE)	0,09	-0,08 a 0,68	5,00 (0,86 a 24,24)
ASY	8	7	CTL	>0,99	-0,30 a 0,42	1,33 (0,31 a 6,04)
			CTL (NE)	>0,99	-0,32 a 0,46	1,42 (0,28 a 6,49)
CTL	6	7	-	-	-	-
CTL (NE)	4	5	-	-	-	-

Valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo pelo teste exato de Fisher. CI = Intervalo de confiança, OR = *Odds ratio*. * $p < 0,05$.

Houve aumento da frequência de células co-expressando CD69 e CD154 nos grupos SY-I e SY-R nas populações de células T CD4⁺ *naive* ($p=0,010$ e $p=0,040$, respectivamente), EM ($p=0,005$ e $p=0,010$, respectivamente) e efetora ($p=0,002$ e $p=0,010$, respectivamente), quando estimuladas com MPv310. O grupo CTL apresentou redução na frequência de células *naive* co-expressando esses marcadores quando estimuladas com MPv310 ($p=0,008$) (**Figura 22A e 22B**).

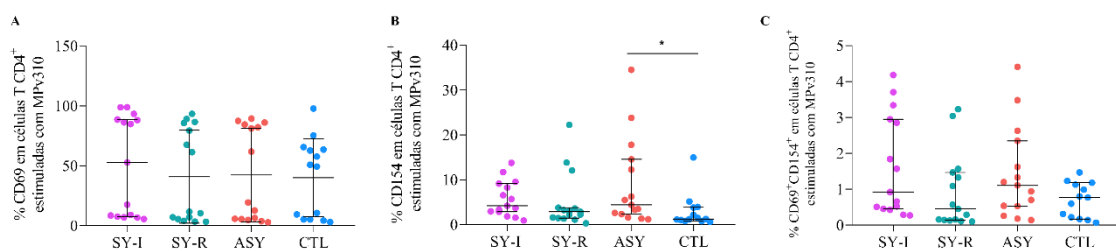
FIGURA 22 - Co-expressão de CD69 e CD154 em subpopulações de células T CD4⁺ após estímulo com o pool de peptídeos (MPv310).



FONTE: Autor. (A) As frequências de linfócitos T CD4⁺ *naive*, CM, EM e efetora (de cima para baixo) expressando concomitante CD69 e CD154 avaliada em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*) sem estímulo (-) ou com estímulo pelo MPv310 (+). (B) Diferença entre as frequências de células estimuladas e não estimuladas expressando concomitante CD69 e CD154 em subpopulações *naive*, CM, EM e efetoras (de cima para baixo). As linhas representam as medianas de cada grupo e barras de erro delimitam os quartis (25%, 75%). Os respondedores foram definidos como indivíduos cujas frequências de células T CD4⁺ co-expressando CD69 e CD154 após estímulo com MPv310. Nas tabelas abaixo dos gráficos: Total: valores indicam o total de respondedores sobre o número total de participantes do grupo. Ponto de corte ($\chi + \sigma$): Indivíduos que respondem acima do *cut-off* calculado a partir da média + 1 desvio padrão dos valores de CTL estimulados. Frequência total: porcentagem total de respondedores. *p<0,05, **p<0,01.

Ao considerar apenas as análises das frequências de linfócitos T CD4⁺ estimulados expressando CD69, CD154 e ambos os marcadores, foi possível perceber que ASY apresenta maior frequência de células CD154⁺ comparado a CTL (p=0,030) (**Figura 23B**). Em relação aos demais marcadores, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos estudados (**Figura 23A e 23C**).

FIGURA 23 - Expressão de marcadores de ativação em células T CD4⁺ estimuladas com o pool de peptídeos (MPv310)



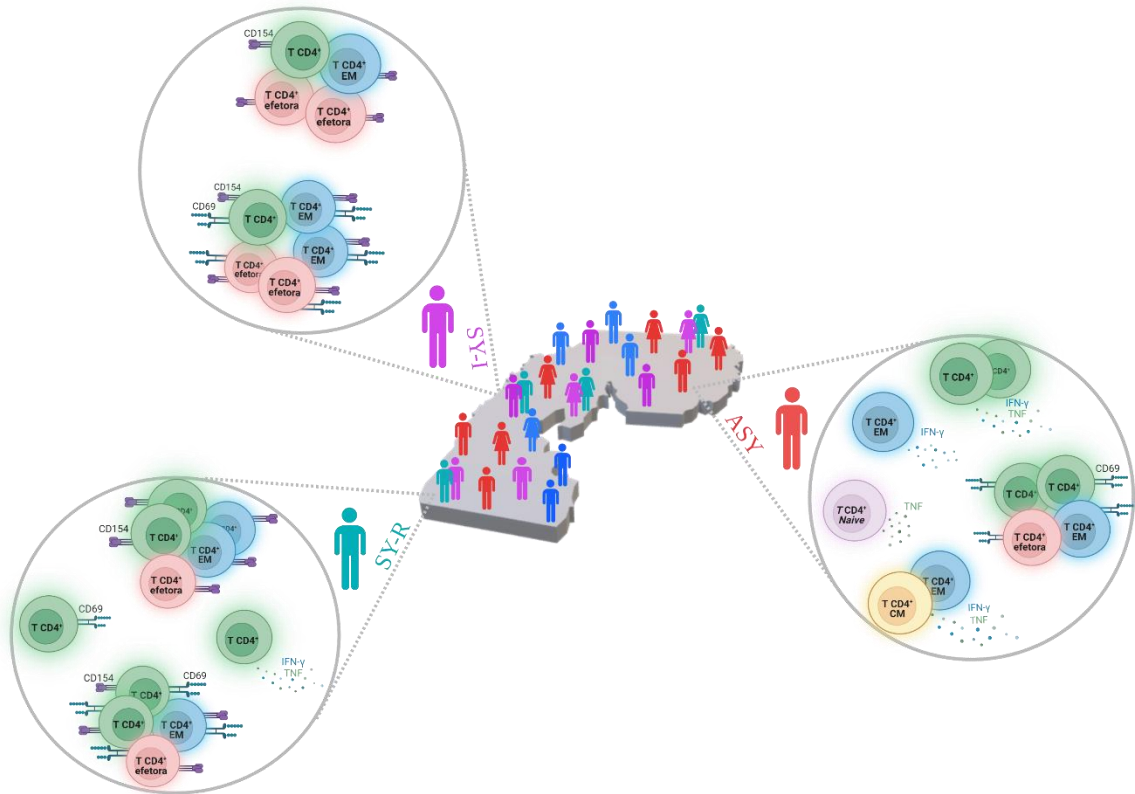
FONTE: Autor. Frequências de linfócitos T CD4⁺ estimulados expressando (A) CD69, (B) CD154 e (C) concomitantemente CD69 e CD154 avaliados em pacientes SY-I (*cor roxa*), SY-R (*cor verde*), ASY (*cor salmão*) e CTL (*cor azul*). *p<0,05.

5.3 Sumário dos resultados

A biblioteca de peptídeos de *P. vivax* induziu:

- em ASY, maior frequência de células T CD4⁺
 - i. EM produtoras de IFN- γ ;
 - ii. *naive* produtoras de TNF;
 - iii. totais, CM e EM expressando simultaneamente IFN- γ e TNF;
 - iv. totais e EM expressando CD69 (80% dos pacientes comparado com 20% dos controles);
- em SY-I, maior frequência de células T CD4⁺
 - i. expressando CD69 (66,66%) comparado a SY-R (20%);
 - ii. totais, EM e efetoras expressando CD154;
 - iii. totais, EM e efetoras expressando simultaneamente CD69 e CD154;
- em SY-R, maior frequência de células T CD4⁺
 - i. expressando CD69;
 - ii. expressando simultaneamente IFN- γ e TNF;
 - iii. totais, EM e efetoras expressando CD154;
 - iv. totais, EM e efetoras expressando simultaneamente CD69 e CD154.

FIGURA 24 - Sumário dos resultados



FONTE: Autor. Resultados da avaliação da resposta de células T antígeno-específica frente à MPv310 em indivíduos infectados (SY-I, SY-R e ASY). Essa imagem foi criada usando Tinkercad (<https://www.tinkercad.com>) e BioRender (<https://app.biorender.com/>).

6 DISCUSSÃO

O *P. vivax* é um dos parasitos causadores da malária em humanos e responde por altas taxas de morbidade em todo o mundo. Essa espécie apresenta características particulares, como desenvolvimento de hipnozoítos no fígado e rápida formação de gametócitos (SATTABONGKOT et al., 2004). Sabe-se que o *P. vivax* infecta exclusivamente reticulócitos, eritrócitos imaturos que correspondem cerca de 1-2% do total de hemácias do sangue periférico (BERMÚDEZ et al., 2018). Além de escassas, essas células apresentam maturação rápida e tem baixa viabilidade (MORAS; LEFEVRE; OSTUNI, 2017), tornando a cultura contínua de *P. vivax* extremamente complexa.

A ausência da cultura *in vitro* de *P. vivax* pode ser considerado o principal fator que dificulta a realização de certos estudos, como a determinação de epítomos e antígenos essenciais para a compreensão dos mecanismos da imunidade adaptativa. Embora a primeira cultura de *P. vivax* tenha sido relatada em 1912 (BASS; JOHNS, 1912), até o momento não há uma metodologia eficaz para a manutenção de *P. vivax* em cultivo.

Para tentar contornar esses obstáculos, a produção de proteínas recombinantes representa uma importante ferramenta e tem sido utilizada para entender a patogênese e a suscetibilidade do hospedeiro em diversas doenças (CARDOSO et al., 2007). Essas proteínas são produzidas com sequências de peptídeos conhecidas e são obtidas, principalmente, através da clonagem em vetores de *Escherichia coli*, contendo cDNA que codifica a proteína desejada. Entretanto, uma limitação comum a este processo é a contaminação da proteína recombinante com endotoxina (TIEMEIER, 1983), sendo um dos padrões moleculares associado à patógenos (PAMP) que se liga a múltiplos receptores expressos principalmente por células da imunidade inata. Isso resulta na ativação de vias de sinalização intracelular e produção de citocinas pró-inflamatórias (LIU et al., 2018), dificultando a avaliação de resposta celular antígeno-específica.

Na malária, enquanto já foram descritas mais de 50 proteínas envolvidas na ligação e invasão do parasito o *P. falciparum*, poucas proteínas de *P. vivax* foram caracterizadas (BERMÚDEZ et al., 2018). As principais proteínas estudadas com potencial antigênico são a proteína circunsporozoíta (CSP), proteína de superfície merozoíta 1 (MSP1), antígeno de membrana apical 1 (AMA1) e proteína de ligação Duffy (DBP) de *P. vivax*.

Na literatura, a maioria dos estudos visam avaliar a resposta adaptativa humoral na malária. Sabe-se que esta é essencial para o desenvolvimento da imunidade anti- *P. vivax*, e os anticorpos conferem proteção tanto controlando a parasitemia quanto inibindo a replicação do

estágio sanguíneo (KING et al., 2008). Entretanto, evidências mostram que embora indivíduos infectados apresentem níveis elevados de IgG contra essas proteínas, estes decaem rapidamente após o tratamento, sugerindo que a proteção conferida por anticorpos não é estável (CERAVOLO et al., 2009; HALL et al., 2019; LONGLEY et al., 2017; SOARES et al., 2019).

Sabe-se que para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora duradoura, é necessário a formação de células T de memória capazes de reconhecer múltiplos antígenos do parasito (MORDMÜLLER et al., 2017). Modelos experimentais de malária em roedores e primatas não humanos expandiram nossa compreensão da proteção mediada por células T contra a malária, no entanto, permanecem grandes desafios para a eliminação da doença.

A fim de contribuir para um maior entendimento sobre a resposta imune celular na malária, o presente estudo utilizou ferramentas de bioinformática para selecionar epítomos de células T de *P. vivax* e avaliar a resposta de células T CD4⁺ específicas para uma biblioteca de 310 peptídeos, que compreende grande parte dos antígenos conhecidos para *P. vivax*, em indivíduos infectados sintomáticos e assintomáticos e controles saudáveis.

A população do nosso estudo foi constituída principalmente por homens. O tipo de atividade desenvolvida, bem como a permanência em locais de transmissão, faz com que pessoas do sexo masculino fiquem mais expostas à doença. Outra característica dos participantes do estudo é que indivíduos assintomáticos apresentaram carga parasitária menor que indivíduos sintomáticos, corroborando com resultados prévios da literatura (ALMEIDA et al., 2021; TADESSE et al., 2018),.

Com relação às análises de citometria, nossos resultados demonstram que, em todos os grupos avaliados, o MPV310 induziu claramente a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ em parte dos indivíduos, embora no geral não tenha sido observada diferença estatística. IFN- γ tem sido apontada como uma molécula efetora essencial na eliminação de parasitos da malária (HOJO-SOUZA et al., 2020; KING; LAMB, 2015) e uma ferramenta importante na detecção de resposta antígeno-específica. Diversos estudos demonstraram que células T CD4⁺ e subpopulações de memória são capazes de produzir citocinas, como IFN- γ , durante a infecção por *P. falciparum* e podem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento da imunidade antimalárica (BOYLE et al., 2017; JAGANNATHAN et al., 2014; PORTUGAL et al., 2014; RABALLAH et al., 2017; WALTHER et al., 2009).

Na literatura, a avaliação da resposta de células T contra antígenos de *P. vivax* é escassa e a maioria dos estudos avaliam a resposta celular baseado em biblioteca de peptídeos menores e metodologias diferentes das utilizadas no presente estudo. Changrob et al. (2015) identificaram uma discreta produção de IFN- γ por indivíduos com malária vivax aguda. Os

níveis dessa citocina foram mensurados no sobrenadante de cultura de células estimuladas com a proteína recombinante PvMSP1P₁₉. Os autores observaram aumento dos níveis de IFN- γ no sobrenadante e também da frequência de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ em PBMC estimulados de indivíduos convalescentes, quando comparado a controles saudáveis (CHANGROB et al., 2015). Assim como Changrob et al., Zeeshan et al. (2015) avaliaram a frequência de células T CD4⁺ produtoras de citocinas (IFN- γ , IL-2 e IL-4) depois da estimulação com diferentes antígenos ricos em triptofano de *P. vivax* (PvTRAGs). Eles também demonstraram que a frequência dessas células estava aumentada em indivíduos tratados. Por outro lado, mostrou que, não houve diferença nos níveis de IFN- γ produzidos por células estimuladas e não estimuladas mensurados no sobrenadante. Apenas o lisado de *P. vivax*, utilizado como controle positivo, foi capaz de induzir a produção de IFN- γ . Contudo, este estudo não especifica como foi obtido e preparado o lisado (YEPES-PÉREZ et al., 2018).

Evidências mostram que pacientes infectados por *P. vivax* apresentam frequências aumentadas de células T CD4⁺ expressando CTLA-4, PD-1 e TIM-3, quando comparadas aos mesmos indivíduos após o tratamento específico contra o parasito. Essas moléculas são expressas após estímulo antigênico, podendo inibir a resposta efetora de células T (COSTA et al., 2015). Nosso grupo também demonstrou que o bloqueio das vias de sinalização dessas moléculas restaura a produção de citocinas, como IFN- γ (COSTA et al., 2015). Dessa forma, a frequência aumentada de células T CD4⁺ expressando CTLA-4, PD-1 e TIM-3 na malária vivax, após tratamento, pode ser uma das razões que explique a baixa produção de IFN-gama pelos indivíduos infectados avaliados neste estudo. Além disso, sabe-se que a células T antígeno-específicas comumente ocorrem em baixas frequências *in vivo* (OTT; TARY-LEHMANN; LEHMANN, 2007). Portanto, a detecção e avaliação de células T em sangue periférico, continua a ser um grande desafio.

Assim como o IFN- γ , o estímulo de células T CD4⁺ com MPv310 também não gerou aumento substancial na frequência de células produzindo TNF. Os indivíduos assintomáticos foram os que apresentaram maior frequência de respondedores, totalizando 51,72%. Isso ocorre também para IFN- γ , sugerindo que ASY apresentam um perfil responsivo do Tipo 1, embora mais mediadores teriam que ser avaliados para uma melhor definição. Entretanto, nossos resultados reafirmam os resultados de Martinez et al. (2010). Os autores estimularam PBMC de indivíduos expostos e não expostos ao *P. vivax* com epítomos da proteína PvDBP e dosaram citocinas inflamatórias nos sobrenadantes de cultura. Eles também não observaram diferenças significativas na produção de TNF quando os epítomos da PvDBPII foram utilizados nas culturas (MARTINEZ et al., 2010). Em contrapartida, outros estudos que estimularam PBMC de indivíduos infectados

com diferentes antígenos (proteína recombinante de PvTARAg55 (SIDDIQUI; SINGH; SHARMA, 2007), epítomos de PvRON2 (LÓPEZ et al., 2018), proteínas e peptídeos VIR (REQUENA et al., 2016), proteína recombinante de PvMSP1₁₉(RICCIO et al., 2013), demonstraram aumento dos níveis de TNF no sobrenadante de cultura. Similarmente, macacos imunizados com a proteína recombinante PvCSP apresentaram uma resposta imune celular antígeno-específica evidenciada pelo aumento de células T CD4⁺ secretoras de TNF (LUMSDEN et al., 2011b). Por outro lado, Lumsden et al. (2011) investigaram se a vacina RTS, S era capaz de induzir células T CD4⁺ nos compartimentos CM, EM e efetoras específicas para PfcSP. Os resultados demonstraram que PBMC de indivíduos imunizados com RTS, S continham células de memória e efetoras produzindo TNF após reestimulação *in vitro* com peptídeos PfcSP. Além disso, tanto as frequências quanto os números totais de células T CD4⁺ de CM, EM e efetoras produtoras de TNF de indivíduos imunizados foram significativamente maiores do que aqueles que não receberam o imunizante (LUMSDEN et al., 2011a).

Embora na malária haja uma polarização da resposta imune em padrões predominantemente Th1, o envolvimento de células Th17 não é claro. Estudos anteriores mostraram que durante a infecção há aumento na produção sérica de IL-17 (HOJO-SOUZA et al., 2017) e expansão de células Th17 na malária aguda (BUENO et al., 2012). Além disso, Bueno et al. (2010) demonstraram que pacientes infectados apresentam contagem aumentada de células T CD4⁺ IL-17⁺ comparado a indivíduos saudáveis. Neste estudo, não houve diferença estatística ao se avaliar a expressão de IL-17 em células T CD4⁺ nos grupos avaliados. Entretanto, em células *naive* e células de CM, a frequência de células T CD4⁺IL-17A⁺ reduziu em indivíduos do grupo SY-R. Na literatura, os estudos avaliando a expressão de IL-17A em células T CD4⁺ são escassos e outros trabalhos precisam ser feitos para que o papel de células Th17 na malária causada por *P. vivax* seja esclarecido.

Nossos dados mostram que o MPv310 foi capaz de aumentar a frequência de células T CD4⁺ co-expressando IFN- γ e TNF em indivíduos sintomáticos tratados e assintomáticos. Era de se esperar que as diferenças estatísticas ocorressem nesses grupos, uma vez que sintomáticos, por apresentar alta carga parasitária e resposta inflamatória, apresentam um potencial prejuízo na ativação de PBMC. Ainda, tanto em indivíduos tratados quanto em assintomáticos era esperada uma resposta mais robusta em decorrência da exposição prévia ao parasito que propicia a expansão dos clones específicos para os antígenos do *P. vivax*. Em camundongos, já foi descrito que a imunização com a proteína quimera PvCSP induziu altas frequências de células T multifuncionais CD4⁺ (CABRERA-MORA et al., 2015). Esses resultados corroboram com os descritos na literatura, de que a resposta imune contra malária é mediada,

principalmente, por IFN- γ e TNF, citocinas produzidas por células Th1 (GOOD et al., 2005; LUMSDEN et al., 2011a). Além disso, observamos que essas células duplo positivas apresentam um fenótipo de memória central ou de memória efetora. Esses dados corroboram com estudos anteriores que mostraram que as células que sofrem expansão após ativação e se tornavam responsivas aos peptídeos de *P. vivax* são CD45RO⁺ (CM ou EM) (SILVA et al., 2013; ZEVERTING et al., 1994). Estas descobertas evidenciam que a exposição repetida a antígenos de malária gera a manutenção de células de memória (FREITAS DO ROSÁRIO et al., 2008; LANGHORNE et al., 2008) e que da mesma forma, essas células são perdidas em seres humanos que se afastam de áreas endêmicas por tempo prolongado.

Baseado na premissa de que células efetoras são precursoras das células de memória, Lanzavecchia e Sallusto (2000) propuseram um modelo em que a célula T *naive* se diferencia em célula T de memória central e posteriormente, em célula de memória efetora (LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2000). Nesse contexto, o aumento de células de memória central e efetora produtoras de citocinas sugere uma consequente expansão de células de memória efetoras e central após a estimulação por antígenos de *P. vivax*, provenientes de sucessivas infecções pelo parasito.

A detecção de células T CD4⁺ específicas para certos antígenos é dificultada tanto pela sua raridade quanto pela heterogeneidade destas células para a produção de citocinas. Acredita-se que mesmo células antígeno-específicas podem responder ao seu ligante de TCR de forma muito heterogênea devido à elevada plasticidade deste linfócito (CROTTY, 2018; SALLUSTO et al., 2018). Neste contexto, células antígeno-específicas poderiam produzir um repertório de citocinas diferentes das convencionalmente verificadas. Além disso, hipotetizamos que algumas células podem ter um atraso na produção de algumas citocinas ou mesmo necessitarem de estímulos adicionais do meio para a produção substancial de citocinas.

Para contornar esta dificuldade, recentemente tem-se usado marcadores de ativação induzida, que compreendem moléculas co-estimulatórias induzidas após ativação via TCR (REISS et al., 2017). No presente estudo, utilizamos dois marcadores de ativação induzida, CD40L(CD154) e CD69, na expectativa de identificar um número maior de células T CD4⁺ específicas independente da produção de citocinas.

Demonstramos que SY-R e ASY possuem frequências aumentadas de células T CD4⁺ expressando CD69 quando estimuladas com o MPv310. Dados anteriormente publicados também mostraram um aumento na expressão de CD69 nos pacientes infectados quando antígenos de *PvTrags* são utilizados como estímulo (ZEESHAN; BORA; SHARMA, 2013; ZEESHAN; TYAGI; SHARMA, 2015b). Gonçalves-Lopes et al. (2016) também

demonstraram que indivíduos infectados agudos com *P. vivax* apresentavam maiores frequências de células T CD4⁺ expressando CD69 em comparação às de CTL e, que após o tratamento, a proporção dessas células se reduziam. Os autores acreditam que essas alterações podem ser devidas a uma regulação negativa na expressão superficial desses marcadores em células circulantes ou devido a um retorno de marcadores negativos para o sangue periférico após a cura da infecção (GONÇALVES-LOPES et al., 2016). No nosso estudo, observamos que, diferentemente dos demais, indivíduos controles também tiveram indução da expressão de CD69. Não sabemos claramente os mecanismos envolvidos para tal ativação. Uma hipótese alternativa seria que epítomos contidos no MPv310 poderiam ter similaridade com outros epítomos para os quais indivíduos de áreas não endêmicas pudessem responder.

Por outro lado, níveis elevados de CD154 foram identificados em SY-I e SY-R, quando comparamos células estimuladas e não estimuladas. Quando avaliamos as respostas intergrupos, houve maior a expressão desse marcador em células de T CD4⁺ de indivíduos do grupo ASY comparado com o grupo CTL. Entretanto, não observamos correlação entre a frequência de células T CD4⁺ expressando CD154 e a parasitemia de indivíduos infectados. Na literatura, não há estudos em humanos infectados com *P. vivax* mostrando a expressão de CD154 em células T CD4⁺. Entretanto, estudos com outros patógenos já foram feitos. Dan et al. (2016) objetivaram identificar células Tfh antígeno-específicas do centro germinativo (GC Tfh) de amígdalas humanas, mas relataram que essas células produzem pouca citocina. Para isso, utilizando a metodologia de marcador induzido por ativação independente de citocina (AIM), eles demonstraram que a fixação intracelular para TNF e regulação positiva de CD40L foi capaz de identificar células GC Tfh específicas de *Streptococcus* (DAN et al., 2016). Em estudos com animais, Vanloubbeeck et al. (2013) projetaram duas versões de uma potencial vacina baseada em PvCSP. Macacos rhesus foram vacinados e, após a 3ª imunização, tiveram PBMC reestimuladas *in vitro* com o antígeno vacinal. Os autores demonstraram que células T CD4⁺ expressaram CD154 e produziram pelo menos 2 das 3 citocinas avaliadas (IL-2, IFN- γ e TNF) (VANLOUBBEECK et al., 2013). Inoue et al. (2014) examinaram a expressão de CD154 em células T CD4⁺ em baços de camundongos antes e após infecção com *P. berghei*. Notou-se que as células T CD4⁺ aumentaram a expressão de CD154 a partir do dia 7 pós infecção, permanecendo estável até o dia 14 pós infecção (INOUE et al., 2014). Todos esses dados somados aos nossos, sugerem que CD154 é expresso em células T CD4⁺ durante a infecção por *Plasmodium* e é sensível para identificar células antígeno-específicas.

Por último, nós avaliamos a co-expressão de CD69 e CD154 e evidenciamos que indivíduos sintomáticos, mas não assintomáticos, possuem aumento na frequência de células T

CD4⁺ duplo-positivas. Além disso, nossos resultados evidenciaram a presença de células T CD4⁺ CD69⁺CD154⁺ de memória efetora e efectoras após estimulação com MPv310 em sintomáticos e assintomáticos. Reiss et al. (2017) avaliaram a concordância entre dois ensaios, baseados na expressão simultânea de CD69 mais CD40L (CD154) ou expressão de OX40 mais CD25, para detecção de células antígeno-específicas. Os autores estimularam PBMC humanas de indivíduos infectados com HIV e citomegalovírus (CMV) com bibliotecas de peptídeos (hCMVA pp65, pool de peptídeo de CMV humano e HIV-1 Gag ou HIV-ENV, pools de peptídeos de HIV). Os resultados demonstraram que ambos os ensaios são métodos sensíveis e valiosos para a detecção de células T CD4⁺ antígeno-específicas (REISS et al., 2017). Embora, este seja o primeiro estudo demonstrando co-expressão desses marcadores em células estimuladas com peptídeos de *Plasmodium vivax*, em conjunto, nossos dados corroboram com os de Reiss et al. (2017) e sugerem que a biblioteca de peptídeos foi capaz de ativar os linfócitos T de maneira antígeno-específica e que indivíduos infectados apresentam resposta adaptativa de memória a antígenos do *P. vivax*.

7 CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que a biblioteca de peptídeos MPv310 é capaz de estimular células T CD4⁺ de indivíduos assintomáticos e sintomáticos, tendo potencial para ser utilizada como ferramenta para avaliação da resposta imune adaptativa na infecção pelo *Plasmodium vivax*. Além disso, observamos que, em indivíduos assintomáticos, as células T CD4⁺ são mais ativadas por MPv310 quando comparadas aos indivíduos dos demais grupos. Demonstramos também que houve indução de um padrão heterogêneo de resposta imune tanto intra- quanto intergrupos e esse comportamento pode ser uma das razões de não termos uma vacina contra malária até os dias atuais.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo demonstraram que peptídeos da biblioteca MPv310 foram reconhecidos por células T *P. vivax*-específicas de pacientes com malária sintomática e assintomática. Esse trabalho traz como perspectivas avaliar peptídeos desta biblioteca reorganizados em grupos menores, já confeccionados. Além disso, utilizaremos métodos mais sensíveis para detecção de células antígeno-específicas, como o ELISpot. Uma vez que a imunogenicidade seja definida para os grupos de peptídeos, esperamos encontrar associações destes com as diferentes formas clínicas da malária. Estas bibliotecas poderão ser úteis para identificar novos alvos vacinais e de diagnóstico que sejam eficientes na identificação de indivíduos portadores da malária assintomática.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABREU, A. S. S. T. et al. A Efetividade da Artemisinina e da Quinina no Tratamento da Malária por *Plasmodium falciparum*: uma Revisão de Literatura. **Revista Científica Semana Acadêmica**, p. 1–14, 2018.

ABUGA, K. M.; JONES-WARNER, W.; HAFALLA, J. C. R. Immune responses to malaria pre-erythrocytic stages: Implications for vaccine development. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 2, 9 fev. 2021.

ACUTO, O.; MICHEL, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 939–951, dez. 2003.

AGARWAL, R. et al. Rapid diagnostic tests for *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2020, n. 11, 4 nov. 2020.

AHMAD, A. et al. Comparison of polymerase chain reaction, microscopy, and rapid diagnostic test in malaria detection in a high burden state (Odisha) of India. **Pathogens and Global Health**, v. 115, n. 4, p. 267–272, 19 maio 2021.

AKBARI, M. et al. Nonspecific CD8⁺ T Cells and Dendritic Cells/Macrophages Participate in Formation of CD8⁺ T Cell-Mediated Clusters against Malaria Liver-Stage Infection. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 4, abr. 2018.

ALMEIDA, G. G. et al. Asymptomatic *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: Submicroscopic parasitemic blood infects *Nyssorhynchus darlingi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 10, p. e0009077, 29 out. 2021.

ANTONELLI, L. R. et al. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 163–189, 2020.

ARÉVALO-HERRERA, M. et al. Antibody Profiling in Naïve and Semi-immune Individuals Experimentally Challenged with *Plasmodium vivax* Sporozoites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004563, 25 mar. 2016.

ATAÍDE, R. et al. Declining Transmission and Immunity to Malaria and Emerging Artemisinin Resistance in Thailand: A Longitudinal Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 6, p. 723–731, 15 set. 2017.

BACHER, P. et al. Antigen-Reactive T Cell Enrichment for Direct, High-Resolution Analysis of the Human Naive and Memory Th Cell Repertoire. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 3967–3976, 15 abr. 2013.

BARTOLONI, A.; ZAMMARCHI, L. CLINICAL ASPECTS OF UNCOMPLICATED AND SEVERE MALARIA. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. e2012026, 4 maio 2012.

BASS, C. C.; JOHNS, F. M. THE CULTIVATION OF MALARIAL PLASMODIA (PLASMODIUM VIVAX AND PLASMODIUM FALCIPARUM) IN VITRO. **Journal of Experimental Medicine**, v. 16, n. 4, 1 out. 1912.

BERMÚDEZ, M. et al. Plasmodium vivax in vitro continuous culture: the spoke in the wheel. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, 20 dez. 2018.

BEVINGTON, S. L. et al. T Cell Receptor and Cytokine Signaling Can Function at Different Stages to Establish and Maintain Transcriptional Memory and Enable T Helper Cell Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 3 mar. 2017.

BOYLE, M. J. et al. The Development of Plasmodium falciparum-Specific IL10 CD4 T Cells and Protection from Malaria in Children in an Area of High Malaria Transmission. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 19 out. 2017.

BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017.

BRIQUET, S. et al. Preparing for Transmission: Gene Regulation in Plasmodium Sporozoites. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 29 jan. 2021.

BUENO, L. L. et al. Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural Plasmodium vivax infection. **Acta Tropica**, v. 123, n. 1, p. 53–57, jul. 2012.

CABRERA-MORA, M. et al. Induction of Multifunctional Broadly Reactive T Cell Responses by a *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein Recombinant Chimera. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 9, p. 3749–3761, set. 2015.

CARDOSO, L. S. et al. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, 2007.

CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2 jan. 2019.

CARO-AGUILAR, I. et al. *Plasmodium vivax* Promiscuous T-Helper Epitopes Defined and Evaluated as Linear Peptide Chimera Immunogens. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3479–3492, jul. 2002.

CAZA, T.; LANDAS, S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4⁺ T Cell Subsets. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

CERAVOLO, I. P. et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 3, p. 502–510, 7 maio 2009.

CHANGROB, S. et al. Naturally-acquired cellular immune response against *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 paralog antigen. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 159, 15 dez. 2015.

CHAVES, Y. O. et al. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 445, 31 dez. 2016.

CHENG, Q.; CUNNINGHAM, J.; GATTON, M. L. Systematic Review of Sub-microscopic *P. vivax* Infections: Prevalence and Determining Factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3413, 8 jan. 2015.

CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 6, p. 946–953, jun. 2017.

COOMES, S. M. et al. IFN γ and IL-12 Restrict Th2 Responses during Helminth/*Plasmodium* Co-Infection and Promote IFN γ from Th2 Cells. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004994, 6 jul. 2015.

COSTA, P. A. C. et al. Induction of Inhibitory Receptors on T Cells During *Plasmodium vivax* Malaria Impairs Cytokine Production. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 12, p. 1999–2010, 15 dez. 2015.

COSTA, P. A. C. et al. *Plasmodium vivax* Infection Impairs Regulatory T-Cell Suppressive Function During Acute Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 8, p. 1314–1323, 8 set. 2018.

CROMPTON, P. D. et al. Malaria Immunity in Man and Mosquito: Insights into Unsolved Mysteries of a Deadly Infectious Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 157–187, 21 mar. 2014.

CROTTY, S. Do Memory CD4 T Cells Keep Their Cell-Type Programming: Plasticity versus Fate Commitment? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 3, p. a032102, mar. 2018.

CROTTY, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. **Immunity**, v. 50, n. 5, p. 1132–1148, maio 2019.

CUI, W.; KAECH, S. M. Generation of effector CD8⁺ T cells and their conversion to memory T cells. **Immunological Reviews**, v. 236, n. 1, p. 151–166, 15 jun. 2010.

DAN, J. M. et al. A Cytokine-Independent Approach To Identify Antigen-Specific Human Germinal Center T Follicular Helper Cells and Rare Antigen-Specific CD4⁺ T Cells in Blood. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 3, p. 983–993, 1 ago. 2016.

DAYANANDA, K.; ACHUR, R.; GOWDA, DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 1, p. 1, 2018.

FERNANDEZ-ARIAS, C. et al. Anti-Self Phosphatidylserine Antibodies Recognize Uninfected Erythrocytes Promoting Malarial Anemia. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 2, p. 194–203, fev. 2016.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 284, 20 dez. 2016.

FIGUEIREDO, M. M. et al. T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 7, p. e1006484, 10 jul. 2017.

FREITAS DO ROSÁRIO, A. P. et al. Gradual Decline in Malaria-Specific Memory T Cell Responses Leads to Failure to Maintain Long-Term Protective Immunity to *Plasmodium chabaudi* AS Despite Persistence of B Cell Memory and Circulating Antibody. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8344–8355, 15 dez. 2008.

FRENTSCH, M. et al. Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. **Nature Medicine**, v. 11, n. 10, p. 1118–1124, 25 out. 2005.

FREVERT, U.; NACER, A. Immunobiology of *Plasmodium* in liver and brain. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 9–10, p. 267–282, set. 2013.

FRIMPONG, A. et al. Novel Strategies for Malaria Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 29 nov. 2018.

FRISCHKNECHT, F.; MATUSCHEWSKI, K. *Plasmodium* Sporozoite Biology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 5, p. a025478, maio 2017.

GALATAS, B.; BASSAT, Q.; MAYOR, A. Malaria Parasites in the Asymptomatic: Looking for the Hay in the Haystack. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 296–308, abr. 2016.

EGINAT, J. et al. Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 16 dez. 2014.

GONÇALVES, R. M. et al. Cytokine Balance in Human Malaria: Does *Plasmodium vivax* Elicit More Inflammatory Responses than *Plasmodium falciparum*? **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

GONÇALVES-LOPES, R. M. et al. Surface expression of inhibitory (CTLA-4) and stimulatory (OX40) receptors by CD4⁺ regulatory T cell subsets circulating in human malaria. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 10, p. 639–648, out. 2016.

GONZÁLEZ-AMARO, R. et al. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 10, p. 625–632, out. 2013.

GOOD, M. F. et al. DEVELOPMENT AND REGULATION OF CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES TO THE BLOOD STAGES OF MALARIA: Implications for Vaccine Research. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 69–99, 1 abr. 2005.

HALL, C. E. et al. Mosquito Bite-Induced Controlled Human Malaria Infection with *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* Generates Immune Responses to Homologous and Heterologous Preerythrocytic and Erythrocytic Antigens. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 3, mar. 2019.

HANBOONKUNUPAKARN, B.; WHITE, N. J. The threat of antimalarial drug resistance. **Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines**, v. 2, n. 1, p. 10, 7 dez. 2016.

HE, X. et al. Type I Interferons and Malaria: A Double-Edge Sword Against a Complex Parasitic Disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2 dez. 2020.

HEIDE, J. et al. Comprehensive Review of Human *Plasmodium falciparum*-Specific CD8+ T Cell Epitopes. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 21 mar. 2019.

HEIDE, J. et al. Detection of EXP1-Specific CD4+ T Cell Responses Directed Against a Broad Range of Epitopes Including Two Promiscuous MHC Class II Binders During Acute *Plasmodium falciparum* Malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 22 jan. 2020.

HERVIER, B. et al. Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: Excess interferon- γ production in patients with active disease. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 6, p. 1698–1706, jun. 2011.

HOJO-SOUZA, N. S. et al. On the cytokine/chemokine network during *Plasmodium vivax* malaria: new insights to understand the disease. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 42, 24 dez. 2017.

HOJO-SOUZA, N. S. et al. Contributions of IFN- γ and granulysin to the clearance of *Plasmodium yoelii* blood stage. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 9, p. e1008840, 10 set. 2020.

HWANG, J.-R. et al. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 5, p. 750–761, 21 maio 2020.

IMAI, T. et al. Cytotoxic activities of CD8⁺ T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. **eLife**, v. 4, 11 mar. 2015.

Immune Epitope Database (IEDB). Disponível em: <iedb.org>. Acesso em: 31 jan. 2020.

INOUE, S.-I. et al. The protective effect of CD40 ligand-CD40 signalling is limited during the early phase of *Plasmodium* infection. **FEBS Letters**, v. 588, n. 13, p. 2147–2153, 13 jun. 2014.

JAGANNATHAN, P. et al. IFN γ /IL-10 Co-producing Cells Dominate the CD4 Response to Malaria in Highly Exposed Children. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003864, 9 jan. 2014.

JANGPATARAPONGSA, K. et al. Immunity to Malaria in *Plasmodium vivax* Infection: A Study in Central China. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45971, 25 set. 2012.

JUNQUEIRA, C. et al. Cytotoxic CD8⁺ T cells recognize and kill *Plasmodium vivax*-infected reticulocytes. **Nature Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1330–1336, 23 set. 2018.

KAURA, T. et al. Prevalence of submicroscopic malaria in low transmission state of Punjab: A potential threat to malaria elimination. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 56, n. 1, p. 78, 2019.

KING, C. L. et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8363–8368, 17 jun. 2008.

KING, T.; LAMB, T. Interferon- γ : The Jekyll and Hyde of Malaria. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005118, 1 out. 2015.

KOTRAIAH, V. et al. Identification and Immune Assessment of T Cell Epitopes in Five *Plasmodium falciparum* Blood Stage Antigens to Facilitate Vaccine Candidate Selection and Optimization. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 7 jul. 2021.

- KUMAR, R. et al. The regulation of CD4⁺ T cells during malaria. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 70–87, jan. 2020.
- KURUP, S. P.; BUTLER, N. S.; HARTY, J. T. T cell-mediated immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 7, p. 457–471, 2 jul. 2019.
- LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 725–732, jul. 2008.
- LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Dynamics of T Lymphocyte Responses: Intermediates, Effectors, and Memory Cells. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 92–97, 6 out. 2000.
- LIMA-JUNIOR, J. C. et al. Promiscuous T-cell epitopes of Plasmodium merozoite surface protein 9 (PvMSP9) induces IFN- γ and IL-4 responses in individuals naturally exposed to malaria in the Brazilian Amazon. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3185–3191, abr. 2010.
- LIU, X. et al. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- κ B, STAT3 or AP-1 activation. **Molecular Medicine Reports**, 2 fev. 2018.
- LONGLEY, R. J. et al. Naturally acquired antibody responses to more than 300 Plasmodium vivax proteins in three geographic regions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005888, 11 set. 2017.
- LONGLEY, R. J.; SATTABONGKOT, J.; MUELLER, I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. **Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 154–170, 7 fev. 2016.
- LÓPEZ, C. et al. The in Vitro Antigenicity of Plasmodium vivax Rhoptry Neck Protein 2 (PvRON2) B- and T-Epitopes Selected by HLA-DRB1 Binding Profile. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 15 maio 2018.
- LUMSDEN, J. M. et al. Protective Immunity Induced with the RTS,S/AS Vaccine Is Associated with IL-2 and TNF- α Producing Effector and Central Memory CD4⁺ T Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e20775, 11 jul. 2011a.
- LUMSDEN, J. M. et al. Evaluation of the Safety and Immunogenicity in Rhesus Monkeys of a Recombinant Malaria Vaccine for Plasmodium vivax with a Synthetic Toll-Like Receptor 4

Agonist Formulated in an Emulsion. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3492–3500, set. 2011b.

MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. Defining Memory CD8 T Cell. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 20 nov. 2018.

MARTÍN, P. et al. CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 20, p. 4877–89, out. 2010.

MARTIN, T. C. S.; VINETZ, J. M. Asymptomatic Plasmodium vivax parasitaemia in the low-transmission setting: The role for a population-based transmission-blocking vaccine for malaria elimination. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2018.

MARTINEZ, P. et al. Evaluation of the antigenicity of universal epitopes from PvDBPII in individuals exposed to Plasmodium vivax malaria. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 14–15, p. 1188–1197, dez. 2010.

MEDZHITOV, R.; SCHNEIDER, D. S.; SOARES, M. P. Disease Tolerance as a Defense Strategy. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 936–941, 24 fev. 2012.

MEIBALAN, E.; MARTI, M. Biology of Malaria Transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 3, p. a025452, mar. 2017.

MÉNARD, R. et al. Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. **Nature**, v. 385, n. 6614, p. 336–340, jan. 1997.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–167, 6 fev. 2013.

MÖLLER, J. F. et al. CD154, a marker of antigen-specific stimulation of CD4 T cells, is associated with response to treatment in patients with chronic HCV infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 18, n. 7, 18 jul. 2011.

MORAS, M.; LEFEVRE, S. D.; OSTUNI, M. A. From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 19 dez. 2017.

MORDMÜLLER, B. et al. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. **Nature**, v. 542, n. 7642, p. 445–449, 15 fev. 2017.

MUNIZ, T. F. et al. AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO E REGULAÇÃO EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES INFECTADOS POR *Plasmodium vivax*. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 18, n. 1, p. 22–31, 2016.

NANCY, M. et al. Phenotypic and functional heterogeneity of circulating CD4+ and CD8+ T cell subsets and their age related changes. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.

NAZ, S. et al. Identification of immunodominant epitopes in allelic variants VK210 and VK247 of *Plasmodium Vivax* Circumsporozoite immunogen. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 96, p. 105120, dez. 2021.

NUREYE, D.; ASSEFA, S. Old and Recent Advances in Life Cycle, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Treatment of Malaria Including Perspectives in Ethiopia. **The Scientific World Journal**, v. 2020, p. 1–17, 14 fev. 2020.

OBENG-ADJEI, N. et al. Malaria-induced interferon- γ drives the expansion of Tbethi atypical memory B cells. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006576, 27 set. 2017.

OPATA, M. M. et al. Protection by and maintenance of CD4 effector memory and effector T cell subsets in persistent malaria infection. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006960, 9 abr. 2018.

OTT, P. A.; TARY-LEHMANN, M.; LEHMANN, P. V. The secretory IFN- γ response of single CD4 memory cells after activation on different antigen presenting cell types. **Clinical Immunology**, v. 124, n. 3, p. 267–276, set. 2007.

OYEGUE-LIABAGUI, S. L. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in children with malaria in Franceville, Gabon. **American journal of clinical and experimental immunology**, v. 6, n. 2, p. 9–20, 2017.

PAUL, S. et al. Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes. **J Immunol Methods**, v. 422, p. 28-34, 2015.

PAUL, S. et al. TepiTool: a pipeline for computational prediction of T cell epitope candidates. **Current protocols in immunology**, v. 114, n. 1, p. 18.19. 1-18.19. 24, 2016.

PARMAR, R. et al. Infectious Sporozoites of *Plasmodium berghei* Effectively Activate Liver CD8 α + Dendritic Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 8 fev. 2018.

PORTUGAL, S. et al. Exposure-Dependent Control of Malaria-Induced Inflammation in Children. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, p. e1004079, 17 abr. 2014.

PUROHIT, P. et al. Association of CD40L gene polymorphism with severe Plasmodium falciparum malaria in Indian population. **Journal of vector borne diseases**, v. 54, n. 1, p. 74–79, [s.d.].

RABALLAH, E. et al. CD4 T-cell expression of IFN- γ and IL-17 in pediatric malarial anemia. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175864, 20 abr. 2017.

RADULOVIC, K. et al. CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 4, p. 2001–13, 15 fev. 2012.

RANSON, H.; LISSENDEN, N. Insecticide Resistance in African Anopheles Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 3, p. 187–196, mar. 2016.

RAO, D. A. et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 542, n. 7639, p. 110–114, 2 fev. 2017.

REISS, S. et al. Comparative analysis of activation induced marker (AIM) assays for sensitive identification of antigen-specific CD4 T cells. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0186998, 24 out. 2017.

REQUENA, P. et al. Plasmodium vivax VIR Proteins Are Targets of Naturally-Acquired Antibody and T Cell Immune Responses to Malaria in Pregnant Women. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005009, 6 out. 2016.

RICCIO, E. K. et al. Cellular and humoral immune responses against the Plasmodium vivax MSP-119 malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 326, 16 dez. 2013.

RIVERA-CORREA, J. et al. Plasmodium DNA-mediated TLR9 activation of T-bet⁺ B cells contributes to autoimmune anaemia during malaria. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1282, 3 dez. 2017.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. Quantification of anti-parasite and anti-disease immunity to malaria as a function of age and exposure. **eLife**, v. 7, 25 jul. 2018.

ROMAN, D. N. R. et al. Role of genetic factors and ethnicity on the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in children with asymptomatic malaria in Yaoundé, Cameroon. **Heliyon**, v. 4, n. 8, p. e00760, ago. 2018.

RYG-CORNEJO, V. et al. Severe Malaria Infections Impair Germinal Center Responses by Inhibiting T Follicular Helper Cell Differentiation. **Cell Reports**, v. 14, n. 1, p. 68–81, jan. 2016.

SABETI, P. et al. CD40L association with protection from severe malaria. **Genes & Immunity**, v. 3, n. 5, p. 286–291, 25 ago. 2002.

SALLES, É. M. DE et al. P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 8, p. e1006595, 31 ago. 2017.

SALLUSTO, F. et al. Do Memory CD4 T Cells Keep Their Cell-Type Programming: Plasticity versus Fate Commitment? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 3, p. a029421, mar. 2018.

SALWATI, E. et al. Differential Cellular Recognition of Antigens During Acute *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 8, p. 1192–1199, 15 abr. 2011.

SATTABONGKOT, J. et al. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 192–198, abr. 2004.

SEBINA, I. et al. IFNAR1-Signalling Obstructs ICOS-mediated Humoral Immunity during Non-lethal Blood-Stage *Plasmodium* Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. e1005999, 3 nov. 2016.

SIDDIQUI, A. A.; SINGH, N.; SHARMA, Y. D. Expression and purification of a *Plasmodium vivax* antigen – PvTARAg55 tryptophan- and alanine-rich antigen and its immunological responses in human subjects. **Vaccine**, v. 26, n. 1, p. 96–107, dez. 2007.

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

SLATER, H. C. et al. The temporal dynamics and infectiousness of subpatent Plasmodium falciparum infections in relation to parasite density. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1433, 29 dez. 2019.

SMITH-GARVIN, J. E.; KORETZKY, G. A.; JORDAN, M. S. T Cell Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 591–619, 1 abr. 2009.

SOARES, R. R. et al. Apical membrane protein 1-specific antibody profile and temporal changes in peripheral blood B-cell populations in *Plasmodium vivax* malaria. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 9, 24 set. 2019.

TADESSE, F. G. et al. The Relative Contribution of Symptomatic and Asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum Infections to the Infectious Reservoir in a Low-Endemic Setting in Ethiopia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 12, p. 1883–1891, 1 jun. 2018.

TIEMEIER, D. C. The recombinant DNA technology. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 6, n. 1, mar. 1983.

TUCKER, K. D. et al. Identification, Selection and Immune Assessment of Liver Stage CD8 T Cell Epitopes From Plasmodium falciparum. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 7 maio 2021.

VANLOUBBEECK, Y. et al. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate Plasmodium vivax circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. **Vaccine**, v. 31, n. 52, p. 6216–6224, dez. 2013.

WALTHER, M. et al. Distinct Roles for FOXP3⁺ and FOXP3⁻ CD4⁺ T Cells in Regulating Cellular Immunity to Uncomplicated and Severe Plasmodium falciparum Malaria. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000364, 3 abr. 2009.

WU, X. et al. IL-4 Treatment Mitigates Experimental Cerebral Malaria by Reducing Parasitemia, Dampening Inflammation, and Lessening the Cytotoxicity of T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 1, p. 118–131, 1 jan. 2021.

YEPES-PÉREZ, Y. et al. Plasmodium vivax Pv12 B-cell epitopes and HLA-DRβ1*-dependent T-cell epitopes in vitro antigenicity. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203715, 10 set. 2018.

ZEESHAN, M.; BORA, H.; SHARMA, Y. D. Presence of Memory T Cells and Naturally Acquired Antibodies in Plasmodium vivax Malaria-Exposed Individuals Against a Group of Tryptophan-Rich Antigens With Conserved Sequences. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 175–185, 1 jan. 2013.

ZEESHAN, M.; TYAGI, K.; SHARMA, Y. D. CD4⁺ T Cell Response Correlates with Naturally Acquired Antibodies against Plasmodium vivax Tryptophan-Rich Antigens. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 2018–2029, maio 2015a.

ZEESHAN, M.; TYAGI, K.; SHARMA, Y. D. CD4⁺ T Cell Response Correlates with Naturally Acquired Antibodies against Plasmodium vivax Tryptophan-Rich Antigens. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 2018–2029, maio 2015b.

ZEVEERING, Y. et al. Life-spans of human T-cell responses to determinants from the circumsporozoite proteins of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 13, p. 6118–6122, 21 jun. 1994.