



## HETEROGENEIDADE DA RESPOSTA ENDOTELIAL EM PACIENTES SINTOMÁTICOS COM MALÁRIA POR *PLASMODIUM VIVAX*

João L. Silva-Filho<sup>1</sup>, João CK Dos-Santos<sup>1</sup>, Carla Judice<sup>1</sup>, Julio Aliberti<sup>2</sup>, Marcus VG Lacerda<sup>3</sup>, Ricardo Khouri<sup>4</sup>, Diogenes Lima<sup>5</sup>, Helder Nakaya<sup>5</sup>, Erich V De Paula<sup>6</sup>, Stefanie CP Lopes<sup>7</sup>, Fabio TM Costa<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratório de Doenças Tropicais Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva, Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia (IB), Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, <sup>2</sup>Division of Extramural Activities, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <sup>3</sup>Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Veira Dourado, Manaus, AM, Brasil, <sup>4</sup>Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador, BA, Brasil, <sup>5</sup>Escola de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, <sup>6</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, <sup>7</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz, Manaus, AM, Brasil

### Introdução

No Brasil a infecção pelo *P. vivax* é o principal causador da malária, sendo responsável por cerca de 84% dos casos, 99% deles concentrados na região norte do país. Diversos estudos mostram que as infecções por *P. vivax* podem evoluir para formas graves e até ao óbito, mudando o paradigma de que a malária vivax é benigna. Nesse contexto, a ativação endotelial tem papel central na progressão para quadros graves, o que requer um melhor entendimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos nas alterações do endotélio, a fim de identificar potenciais alvos terapêuticos para os casos graves. Neste estudo, utilizamos amostras de plasma de indivíduos saudáveis e sintomáticos infectados pelo *P. vivax*, com o objetivo de avaliar como componentes solúveis do plasma, envolvidos com diferentes respostas do hospedeiro, participam na ativação e disfunção endoteliais.

### Metodologia

Realizamos ensaio de multiplex para dosagem de três grupos de moléculas no plasma: marcadores de ativação/disfunção endotelial, resposta imune e coagulação. Em seguida, análises rede e de bioinformática foram usadas para verificar as relações entre as moléculas dosadas e identificar padrões de resposta dos pacientes frente à infecção pelo *P. vivax*.

### Resultados

Para a análise dos fatores solúveis, foram incluídos 40 indivíduos (nove controles e 31 pacientes) no ensaio de multiplex – os dados de idade, gênero e hemograma estão apresentados na Tabela 1. Como é possível observar há diferença significativa na contagem de linfócitos entre os grupos de controles e pacientes e também trombocitopenia nos pacientes em relação aos controles (Tabela1).

Parâmetro	Controles (n=9)	Pacientes (n=31)	P
Idade	Média [DP]	Média [DP]	
Idade	32.3 [10.7]	32.4 [8.9]	0.9952
Gênero masculino	7/9 (77.8%)	25/31 (80.6%)	1.0000
Hemoglobina (g/dL)	13.4 [0.9]	12.3 [2.5]	0.1912
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	2.0 [0.4]	0.8 [0.4]	<0.0001*
Neutrófilos (x10 <sup>3</sup> /μL)	2.9 [1.0]	2.7 [1.4]	0.6355
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	240.1 [45.1]	89.3 [43.7]	<0.0001*

Tabela 1. Idade, gênero e hemograma completo de pacientes com malária vivax e controles.

A mensuração plasmática revelou significativa ativação/disfunção endotelial, produção de citocinas pró-inflamatórias e maior produção de IL10 nos pacientes com malária por *P. vivax* (Tabelas 2 e 3). Esta é a primeira mensuração de Syndecan-1 circulante em pacientes com malária vivax, demonstrando que a degradação do glicocalice endotelial, marcador de dano endotelial é um evento importante para a disfunção do endotélio. O aumento de IL-8 no plasma, associado a níveis aumentados de L-selectina, sugerem que há estímulo para o recrutamento e ativação de neutrófilos no plasma dos pacientes. Citocinas solúveis associadas à trombose e fatores circulantes associados a ativação plaquetária também encontram-se elevados nos pacientes com malária por *P. vivax* (Tabela 5). Como mostrado na Tabela 6, também há uma tendência de diminuição de ADAMTS13 nos pacientes com malária por *P. vivax*, o que correlaciona com os maiores níveis de VWF nesses indivíduos, e maior produção de PAI-1, o que também sugere um estado pró-coagulante nos pacientes (Tabela 6).

Parâmetro	Controles (n=9)	Pacientes (n=31)	P
ICAM-1 (ng/mL)	323 [260-464]	634 [456-849]	0.0026*
VCAM-1 (ng/mL)	819 [623-959]	2875 [1753-5108]	<0.0001*
E-Selectina (ng/mL)	26.4 [22.5-33.7]	56.7 [41.5-74.1]	0.0001*
L-Selectina (ng/mL)	326 [287-391]	481 [386-579]	0.0001*
Syndecan-1	1.8 [1.6-2.4]	3.7 [2.9-6.0]	0.0003*
Ang-2 (ng/mL)	1.8 [1.5-2.1]	4.3 [2.7-5.3]	0.0003*
VWF-A2 (pg/mL)	126 [120-150]	218 [199-277]	<0.0001*

Tabela 2. Marcadores de ativação endotelial no plasma de pacientes e controles.

Parâmetro	Controles (n=9)	Pacientes (n=31)	P
IL-11 (ng/mL)	3.5 [2.9-4.3]	5.7 [4.7-6.4]	<0.0001*
TPO (ng/mL)	2.0 [1.7-2.2]	3.0 [2.6-3.4]	<0.0001*
CXCL4 (ng/mL)	0.8 [0.6-1.2]	1.42 [0.7-2.8]	0.1236
CXCL7 (ng/mL)	0.4 [0.4-0.5]	0.73 [0.4-1.7]	0.1958
CD40L (ng/mL)	0.5 [0.4-0.7]	1.0 [0.7-1.3]	0.0001*
P-selectina (ng/mL)	17.0 [15.4-20.6]	22.2 [17.6-25.7]	0.0621
Ang-1 (ng/mL)	0.4 [0.3-0.6]	0.5 [0.2-0.9]	0.8874

Tabela 4. Concentração plasmática de moléculas associadas a trombose e ativação plaquetária em pacientes e controles.

Parâmetro	Controles (n=9)	Pacientes (n=31)	P
TNF-α (pg/mL)	17.2 [11.0-22.3]	38.4 [30.0-69.6]	<0.0001*
IL-1α (pg/mL)	11.9 [10.0-19.5]	25.4 [19.8-33.5]	0.0004*
IL-1β (pg/mL)	12.0 [8.0-12.8]	21.4 [14.5-27.6]	<0.0001*
IL-6 (pg/mL)	3.0 [2.5-3.7]	33.4 [7.6-133.1]	<0.0001*
IL-8 (pg/mL)	2.2 [0.6-2.4]	6.4 [2.7-19.9]	0.0005*
IL-10 (pg/mL)	n.d.	314 [169-562]	--

Tabela 3. Citocinas dosadas no plasma de pacientes e controles.

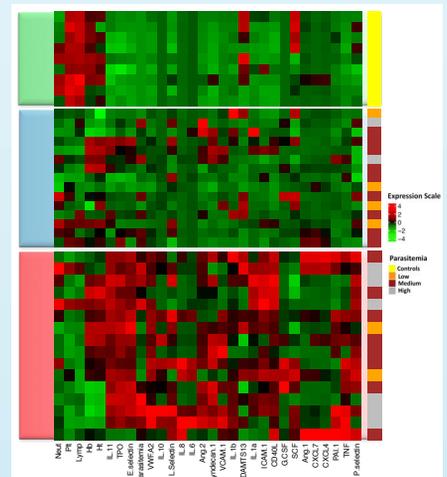
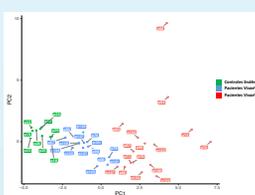
Parâmetro (pg/mL)	Controles (n=9)	Pacientes (n=31)	P
CXCL4 (x10 <sup>3</sup> /μL)	3.6 [2.9-4.1]	17.0 [8.7-30.5]	0.0001*
CD40L	1.8 [1.7-2.0]	13.8 [8.6-26.9]	<0.0001*
P-selectina	73.8 [54.7-89.8]	252 [162-387]	<0.0001*

Tabela 5. Concentração em pg/mL dos marcadores de ativação plaquetária por plasma.

Parâmetro	Controles (n=9)	Pacientes (n=31)	P
ADAMTS13 (ng/mL)	1110 [453-1740]	776 [572-1228]	0.5485
PAI-1 (pg/mL)	78.9 [62.4-96.4]	112 [89.3-242]	0.1541

Tabela 6. Concentração plasmática de proteínas associadas a hemostasia em pacientes e controles.

Embora os pacientes apresentem sintomatologia clínica semelhante, há diferenças intrínsecas quanto à resposta frente ao parasita. Um subgrupo de pacientes, com menor parasitemia, tem um fenótipo de resposta semelhante aos indivíduos controle (*Vivax<sup>low</sup>*), com menor grau de trombocitopenia e linfopenia, menor ativação/disfunção endoteliais, coagulação e citocinas pró-inflamatórias. No outro subgrupo (*Vivax<sup>high</sup>*) há predominância de indivíduos com parasitemias mais altas, maior grau de trombocitopenia, linfopenia, ativação/disfunção endoteliais, produção de citocinas pró-inflamatórias e um maior estado pró-coagulante, o que indica um potencial de agravamento da doença nesses indivíduos.



Análises *ex vivo* mostram que o plasma desses subgrupos de pacientes induz, diferencialmente, ativação e disfunção endoteliais, alteração da produção de diferentes citocinas e um fenótipo pró-coagulante. Em conjunto, nossos dados mostram que há uma heterogeneidade na intensidade das alterações endoteliais dentro os pacientes vivax sintomáticos, o que pode estar associado ao agravamento da doença em um determinado grupo de indivíduos e não em outro.

