# Caracterização Hemato-linfocitária em Crianças Infectadas por Malária

**Edna Chemane[1,2], Carla Wale[3], Rosa Macamo[1], Regina Machanhane[1], Annette Cassy[1,3], Nádia Sitoe[1]**

[1]Instituto Nacional de Saúde, [2]Universidade Eduardo Mondlane, [3]Hospital Central de Maputo

Edna Chemane

Instituto Nacional de Saúde | EN1, Bairro da Vila-Parcela No 3943, Marracuene-Moçambique | edna.chemane@gmail.com

## Resumo

**Introdução:** Moçambique é um dos países endémicos à malária. Em 2011, a estimativa de prevalência desta doença era de 40–80% em crianças dos 2–9 anos e 90% em crianças menores de 5 anos. Estas altas prevalências podem ser devido à dificuldade das crianças em desenvolverem uma resposta imune eficaz. São necessários mais estudos para entender a resposta imune nestas crianças. Este estudo teve como objectivo descrever as características imuno-hematológicas em crianças menores de 15 anos infectadas por *Plasmodium falciparum.* **Metodologia:** Foram recrutadas crianças de 2-15 anos, infectadas por *P. falciparum.* Em cada criança, cujo tutor legal consentiu que participasse no estudo, colheu-se 5 ml de sangue venoso para um tubo com anticoagulante $K_3$EDTA. O sangue foi usado para a contagem automática de células por citometria de fluxo. Os resultados foram agrupados por idade, dos 2-8 anos e 9-15 anos. **Resultados:** Das 50 crianças incluídas no estudo, 84% tinham idades entre os 2-8 anos, 70% do sexo masculino e 4% com serologia positiva para HIV. O nível de hemoglobina foi mais elevado no grupo de 9-15 anos (10,3g/dL) em relação ao grupo de 2-8 anos (8,7g/dL). A contagem absoluta de linfócitos T-CD4 foi maior no grupo de 2-8 anos (819 cél./µl). A activação celular não apresentou diferenças entre os grupos. **Conclusão:** A maioria dos casos de malária e anemia aguda foi observada em crianças dos 2 aos 8 anos, predominantemente do sexo masculino. Os valores absolutos de linfócitos foram mais elevados nas crianças dos 2-8 anos, mas os valores percentuais linfocitários não diferiram entre os grupos.

**Palavras-chave:** *Plasmodium falciparum,* Linfócitos, Crianças, Citometria, Malária.

## Abstract

**Introduction:** Mozambique is one of the endemic countries to malaria. In 2011, the estimated prevalence of this disease was 40–80% in children aged from 2–9 years and 90% in children under 5 years. These high rates may be due to the difficulty of children in building an effective immune response. Further studies are needed to understand the immune response mounted by children in the presence of *Plasmodium*. This study aimed to describe the immuno-haematological characteristics of children under 15 years infected with *Plasmodium falciparum*. **Methodology:** Children aged from 2-15 years, infected with *P. falciparum*, were recruited for the study. In each child, whose legal guardian consented to take part of the study, was collected 5 ml of venous blood to a $K_3$EDTA anticoagulant tube. The samples were tested using automatic full blood cell counting and flow cytometry. The results were grouped by age, 2-8 years and 9-15 years. **Results:** From the 50 children included in the study, 84% were aged 2-8 years, 70% were male and 4% were HIV positive. The haemoglobin level was higher in the 9-15 year old group (10.3g/dL) compared to the 2-8 year old group (8.7g/dL). The absolute T-CD4 lymphocytes levels were higher in the 2-8 year old group (819 cells/µl). The T-CD8 lymphocytes activations levels were similar in both groups. **Conclusion:** The majority of the children attended in the Paediatric Emergency who diagnosed malaria were 2 to 8 years old. These children were predominantly male and presented acute anaemia. The absolute T-CD4 and T-CD8 lymphocytes levels were higher in children aged 2-8 years, but the percentage levels of lymphocytes did not differ between groups.

**Key words:** *Plasmodium falciparum*, Lymphocytes, Children, Cytometry, Malaria.

## Introdução

A malária é uma doença causada por um protozoário intracelular do género *Plasmodium*, que é inoculado no hospedeiro humano, através dos mosquitos do género *Anopheles*. Estes mosquitos são encontrados maioritariamente nas regiões tropicais e subtropicais, consequentemente causando uma elevada incidência nestas regiões.[1-3]

Moçambique é um país de clima tropical húmido o que favorece a proliferação dos mosquitos.[4] Neste país, 90% dos casos de Malária são causados por *Plasmodium falciparum (Pf)*. A prevalência nacional de malária causada por Pf em crianças dos 6-59 meses de idade é de 39%.[4] Nas enfermarias de pediatria, 60% das crianças internadas sofrem de malária severa. Aproximadamente 30% de todos os óbitos registados são por causa desta doença.[5,6] O parasita infecta os hepatócitos e eritrócitos, induzindo uma resposta imunológica dependente de linfócitos T citotóxicos (T CD8) e linfócitos T auxiliares (T CD4) activados, respectivamente. Os T CD8 destroem os hepatócitos infectados na tentativa de evitar a fase eritrocitária que é a fase sintomática da malária.[9,17] A maior parte dos estudos referentes à malária, estão relacionados com o estado epidemiológico no país e com a introdução de vacinas contra a malária com a intenção de delinear novas estratégias de prevenção e controlo.[7,8]

O perfil hematológico de Pf em crianças foi descrito em países endémicos, principalmente africanos.[9-12] E, alguns estudos realizados no Malawi e Gana,[13,14] descreveram a activação celular de linfócitos na malária complicada e não complicada mas não observaram a variação entre as idades, o que poderia explicar o caso de Moçambique e esclarecer a tendência das prevalências observadas. Um estudo realizado na região de Calanga em Moçambique,[11] descreveu o perfil imuno-hematológico de crianças com malária assintomática e observou que, consoante a faixa etária, ocorre um forte aumento na contagem percentual de T CD8 em adolescentes de 12 aos 20 anos. Observaram também, que os participantes de 5 aos 11 anos apresentaram uma maior proporção de crianças anémicas com contagens de hemoglobina abaixo de 11,5g/dL.

Pouco se sabe sobre as características imuno-hematológicas de crianças sintomáticas recentemente diagnosticadas com malária e em relação a idade. Nossas hipóteses são que, independentemente da faixa etária, crianças com malária apresentam um quadro de anemia severa e aumento das células T CD8 activadas como consequência da resposta imune contra o Pf. O estudo teve como objectivo caracterizar o perfil imuno-hematológicos das crianças infectadas por Pf atendidas nas urgências de pediatria, do Hospital Central de Maputo no geral, em relação à faixa etária. Espera-se que as crianças apresentem uma resposta imune adequada contra o parasita Pf com altos níveis de activação dos linfócitos citotóxicos T CD8 e quadro de anemia moderada ou severa.

## Métodos

### Recrutamento dos participantes do estudo

O estudo foi transversal tendo recrutado consecutivamente, no período de Agosto-2017 a Abril-2018, crianças atendidas nas urgências do Departamento de Pediatria do Hospital Central de Maputo (DP-HCM) e diagnosticadas com malária. A todas estas crianças que participaram no estudo, foi solicitado um consentimento formal aos seus tutores legais para a sua participação de acordo com o protocolo número 408/CNBS de 2012. O diagnóstico para malária foi realizado usando um teste rápido para *Plasmodium falciparum* (Alere, Coreia). Foram também colhidos 5mL de sangue venoso num tubo de vácuo com anticoagulante $K_3$EDTA (Becton Dickinson, EUA) para a caracterização hematológica e imunológica.

### Caracterização hemato-imunológica

A caracterização hematológica foi feita por hemograma no laboratório de análises clínicas do DP-HCM usando o contador automático KX-21N™ (Sysmex Inc., EUA) para fornecer ao médico de serviço no local de recrutamento. A caracterização imunológica foi elaborada no Laboratório de Imunologia Celular do INS, por Citometria de Fluxo no analisador BD FACSCalibur (Becton Dickinson, EUA), usou-se o anticorpo comercial padrão BD Multitest™ que tem como marcadores: anti-CD3$^{FITC}$, anti-CD8$^{PE}$, anti-CD45$^{PerCP}$, anti-CD4$^{APC}$ para a contagem percentual e absoluta dos linfócitos de acordo com as recomendações do fabricante. Em separado, usaram-se os marcadores extracelulares humanos anti-CD3$^{FITC}$, anti-CD8$^{PerCP}$ e anti-CD38$^{PE}$ (Becton Dickinson, EUA) para avaliar a activação celular.

### Procedimento para marcar a activação celular

Num tubo BD TruCount™ (BD Biosciences, EUA)

adicionou-se 10µL de cada anticorpo monoclonais: anti-CD3$^{FITC}$, anti-CD8$^{PerCP}$ e anti-CD38$^{PE}$ e adicionou-se 50µL de sangue venoso homogeneizado no tubo (**Figura 1**). Após a incubação no escuro por 15 minutos, adicionou-se 450µL de BD FACSLysing (BD Biosciences, EUA) diluído a 10% em água destilada e incubado novamente por 15 minutos e correu-se no citómetro com o programa CellQuest. As marcações foram feitas para a caracterização fenotípica dos linfócitos T citotóxicos com base na proporção de células activadas (%CD8+CD38) e intensidade média de fluorescência (MFI) do marcador CD38 das células (**Figura 1**).

### Análise de dados

Os resultados foram agrupados por idade: 2-8 anos e 9-15 anos; caracterizados e analisados nos programas SPSS versão 20 e Prism versão 8.3.1.. Empregaram os testes estatísticos de Qui-quadrado para as variáveis nominais como género e sero-prevalência ao HIV. O teste de *Mann-Whitney* foi usado para comparação das variáveis numéricas: valores hematológicos e imunológicos e teste de $X^2$ para as variáveis não numéricas. E o teste de correlação de Spearman para a relação entre as variáveis de activação nos dois grupos (%CD8+CD38 e Fluorescência CD38 MFI). Considerou-se uma diferença estatística de $p \leq 0,05$ como significativa.

## Resultados

### Características da população de estudo

Foram recrutadas 58 crianças para o estudo, das quais oito (13,79%) foram excluídas: cinco por falta de resultados imuno-hematológicos, uma por co-infecção por P. *falciparum* e P. *malariae* e duas por complicações neurológicas e respiratórias não relacionadas a malária. Das crianças que continuaram no estudo, 84% tinham idade de 2-8 anos e 16% com 9 a 15 anos. A mediana total das idades dessas crianças foi de 4 anos (2-15 anos). Duas crianças eram HIV positivas e estavam no grupo dos 2 aos 8 anos (**Tabela 1**). Em ambos grupos, a maioria das crianças eram rapazes, com maior incidência no grupo de 9-15 anos (87,5%; p = 0,005).

### Caracterização hemato-imunológica

Os níveis de hemoglobina foram menores no grupo de 2-8 anos, com mediana de 8,7g/dL, em

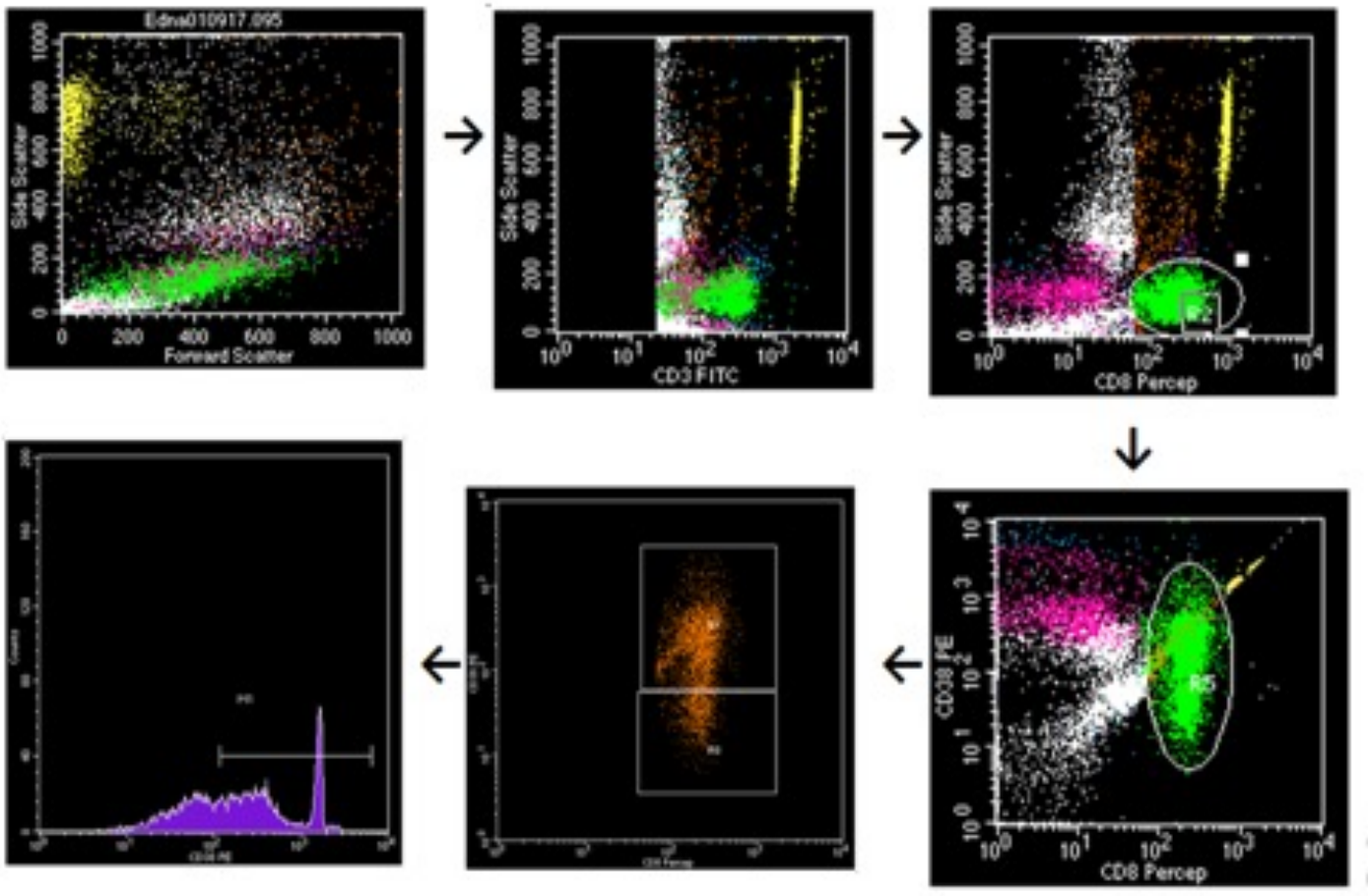


**Figura 1:** Representação do painel de gating das células alvos e medição de activação das células

**Tabela 1:** Comparação das características Imuno-hematológicas entre as faixas etárias de 2-8 anos e 9-15 anos

| Características | Total | Entre 2 - 8 anos | Entre 9 – 15 anos | p-value |
|---|---|---|---|---|
| Frequência N (%) | 50 (100%) | 42 (84%) | 8 (16%) | NA |
| Género (Masculino) (%) | 70% | 66,67% | 87,5% | 0,005**# |
| Idade (Mediana)<br>(Mínimo – Máximo) | 4<br>(2-15) | 3,5<br>(2-7) | 12<br>(9-15) | NA |
| Sero-prevalência ao HIV<br>N (%) | 2 (4%) | 2 (5%) | 0 | NA |
| Hemoglobina (Mediana)<br>(Mínimo – Máximo) | 9<br>(2,8-13) | 8,7<br>(2,8 - 12,4) | 10,3<br>(7,3-13,3) | 0,044*† |
| CD3 Percentual | 64<br>(42 - 86) | 65<br>(42 – 86) | 63,5<br>(54 – 79) | 0,702 † |
| CD3 Absoluto (céls/µL) | 1334<br>(265 - 7563) | 1508<br>(461 – 7563) | 733<br>(265 – 1443) | 0,0027**† |
| CD4 Percentual | 34,5<br>(17 - 52) | 34<br>(17 – 52) | 35,5<br>(25 – 50) | 0,5609 † |
| CD4 Absoluto (céls/µL) | 729,5<br>(182 - 3066) | 819<br>(229 – 3066) | 384,5<br>(182 – 745) | 0,0029** † |
| CD8 Percentual | 24<br>(13 - 35) | 24<br>(13 – 53) | 20,5<br>(17 – 29) | 0,268 † |
| CD8 Absoluto (céls/µL) | 474<br>(64 - 3602) | 550<br>(124 – 3602) | 237<br>(64 – 575) | 0,0044** † |
| %CD8+CD38 (%) | 72,8<br>(32,21-90,1) | 71,13<br>(32,21 - 90,13) | 74,875<br>(55,08 - 81,09) | 0,687 † |
| Fluorescência de CD38 (MFI) | 1357,78<br>(947,46 - 2147,99) | 1345,57<br>(1046 - 2147,99) | 1441,23<br>(947,46 - 1553,84) | 0,589 † |

# - Comparação entre os grupos usando o Teste de Qui-quadrado

† - Comparação entre os grupos usando Teste de Mann-Whitney

*p estatisticamente significativo a 0,05

**p estatisticamente significativo a 0,01

NA – Não aplicável

relação ao grupo de 9-15 anos (10,3g/dL; p = 0,044). Os valores absolutos de linfócitos totais foram maiores no grupo 2-8 anos em relação ao grupo 9-15 anos, com medianas de 1508 céls/µL e 733 céls/µL, respectivamente (p = 0,0012). O mesmo observou-se nos linfócitos T CD4 e CD8 (819vs.384, p = 0,002 e 550vs.237, p = 0,004, respectivamente) (**Tabela 1**).

### Níveis de activação de células T CD8

A proporção de linfócitos T CD8 activados (%CD8+CD38) e a MFI destas células (Fluorescência CD38) não apresentou diferenças entre os grupos (**Tabela 2**). Duas crianças que estiveram previamente expostas ao tratamento anti-malárico há menos de duas semanas, tiveram os níveis de activação mais altos em relação às outras. A análise de correlação mostrou não existir correlação entre o %CD8+CD38 e o CD38 MFI, no grupo de 2-8 anos. No grupo de 9-15 anos houve uma correlação positiva fraca (R = 0,299) entre as duas variáveis. As correlações observadas nos dois grupos não foram estatisticamente significativas (**Figura 2**).

## Discussão

No estudo, a maioria das crianças com malária recrutadas estavam na faixa etária dos 2 e 8 anos. Esta tendência é esperada, pois segundo o INE (2013),[6] maiores prevalências de malária são observadas em crianças dos 2-9 anos. Estes resultados reforçam a dificuldade que esta faixa etária tem em montar uma resposta imune eficaz contra o Pf. A ausência de memória imunológica em crianças menores de 5 anos, também aumenta a susceptibilidade destas crianças à doença.[7,16]

A maioria das crianças incluídas no estudo foram do sexo masculino, isto porque o género tem

**Tabela 2:** Valores imuno-hematológicos de referência para crianças.[19]

| Idade | Linfócitos T CD3 valor absoluto cél/μL (percentagem) | Linfócitos T CD4 valor absoluto cél/μL (percentagem) | Linfócitos T CD8 valor absoluto cél/μL (percentagem) | Hemoglobina (g/dL) |
|---|---|---|---|---|
| 2 – 6 anos | 1400 – 3700 (56 – 75) | 700 – 2200 (28 – 47) | 490 – 1300 (16–30) | 12,6 – 12,9 |
| 6 – 12 anos | 1200 – 2600 (60 – 76) | 650 – 1500 (31 – 47) | 370 – 1100 (18–35) | 13 – 13,8 |
| 12 – 18 anos | 1000 – 2200 (56 – 84) | 530 –1300 (31 – 52) | 330 – 920 (18–35) | 13,9 – 14,9 |

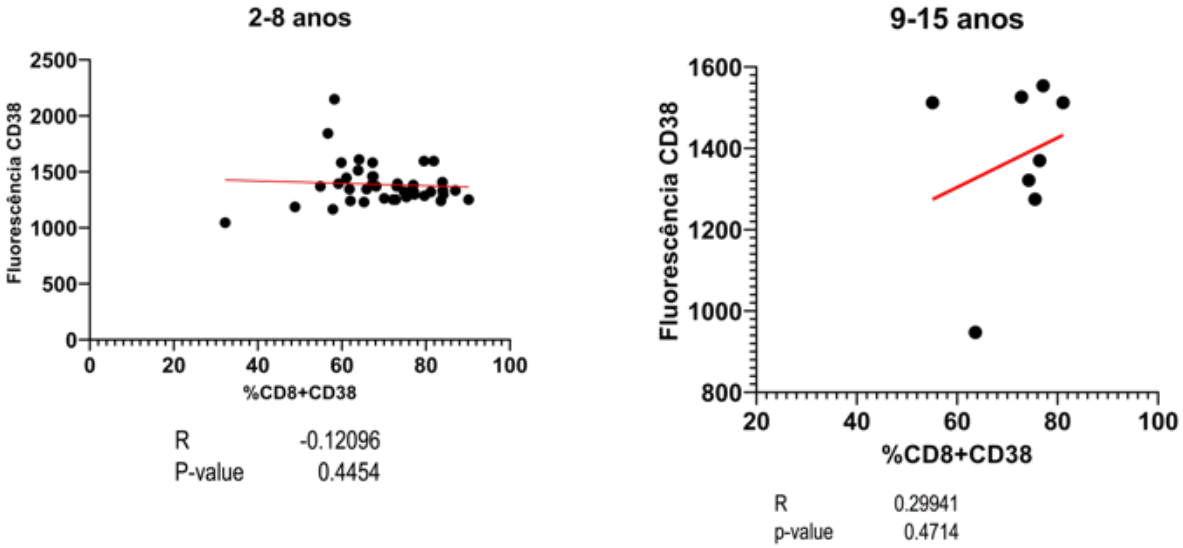


**Figura 2:** Gráficos de correlação entre a proporção de linfócitos T CD8 activados (%CD8+CD38) e a sua intensidade média de fluorescência (Fluorescência CD38) nos grupos de 2-8 anos (esquerda) e 9-15 anos (direita)

um impacto importante na resposta à infecções. A testosterona tem efeitos imunossupressores, reduzindo a secreção de IFN-α e IL-4 em linfócitos T, interferindo na resposta contra a malária e aumentando o nível de susceptibilidade e severidade da doença.[15] As crianças dos 2 aos 8 anos apresentaram níveis de hemoglobina mais baixos e elevados de linfócitos T citotóxicos absolutos. Isto pode ser consequência do parasita que infecta os Hepatócitos.[10] O controlo da replicação destes parasitas no interior dos Hepatócitos é feita pelos linfócitos T citotóxicos, justificando o seu aumento.[17] Por outro lado, o tamanho reduzido das amostras nos grupos dificultou a análise estatística, não permitindo observar as diferenças significativas na activação dos linfócitos T citotóxicos (T CD8).

A correlação positiva, mesmo que fraca e não estatisticamente significativa, observada entre os níveis dos linfócitos T CD8 activados e a sua intensidade média de fluorescência no grupo de 9-15 realça o papel destas células no controlo da infecção pelo Pf. Outro factor, pode ser que com a idade e exposição aos diversos patógenos, estes estejam melhor capacitados em montar uma resposta imune adquirida.[8,15] O estudo detalhado da imunidade adquirida é importante para determinar melhores estratégias de vacinas e prevenção da malária.

As crianças que estiveram previamente expostas ao tratamento anti-malárico há menos de duas semanas, tiveram os níveis de activação mais altos em relação às outras. Isto amplifica a importância do tratamento anti-malárico no seu reforço à resposta imune.[18] Contudo, é necessário fazer estudos semelhantes, longitudinalmente, num tamanho amostral maior para avaliar o efeito do tratamento anti-malárico e o HIV sobre a activação de células T CD8 específicas ao Pf. Este estudo mostra a importância desta resposta como um mecanismo de redução da taxa morbi-mortalidade devido a esta infecção em crianças, focando o desenvolvimento

de estratégias de vacinas para reforçar uma imunidade antiparasitária eficaz em crianças.

## Conclusão

O grupo de crianças mais velhas, dos 9 aos 15 anos, apresentou uma melhor tendência de regular a resposta imune, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. As crianças de 2 - 8 anos tiveram dificuldades de gerar linfócitos devidamente activados para responder contra o parasita. O tamanho amostral debilitou a análise estatística, mas demonstrou a importância de acrescentar maior ênfase na pesquisa da montagem da resposta imune neste grupo de crianças. Deve-se observar com melhor detalhe em grupos de maior escala e faixas etárias para elaborar melhores estratégias de vacinação e para reduzir a predisposição à anemia nas crianças de 2-8 anos.


### Agradecimentos

Os autores agradecem aos tutores legais das crianças participantes do estudo e aos funcionários do Departamento de Pediatria do Hospital Central de Maputo pela colaboração e apoio no percurso do estudo. Ao laboratório de Imunologia celular do Instituto Nacional de Saúde pelo auxílio no decorrer do estudo e aos técnicos laboratoriais que participaram na manutenção técnica e analítica do estudo. Ao Fundo Nacional de Investigação pelo financiamento do projecto.

### Financiamento do estudo

Este estudo foi financiado pelo Fundo Nacional de Investigação do Ministério da Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico-Profissional


## Referências Bibliográficas


1. World Health Organization. World Malaria Report 2017: WHO; 2017. 196pp. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO;
2. Van geertruyden, J-P. Interactions between Malaria and Human Immunodeficiency Virus anno 2014. Clin. Microbiol. Infect. 2014 Fev 15; 20 (4): 278–85;
3. Jamieson A. Malaria: A Traveller's Guide. 3ª Edição. Cidade do Cabo: Struik Publishers; 2006. 144pp;
4. Instituto Nacional de Saúde (INS) e ICF. 2019. Inquérito Nacional sobre Indicadores de Malária em Moçambique 2018. 190pp. Maputo, Moçambique. Rockville, Maryland, EUA
5. PNCM – Programa Nacional de Controlo da Malária (2012). Plano Estratégico da Malária 2012-2016. 51pp. Maputo, MISAU;
6. INE – Instituto Nacional de Estatística (2013). Moçambique Inquérito Demográfico e de Saúde 2011. 430pp. Maputo, MISAU;
7. Chelimo, K., P.B. Embury, P.O. Sumba, J. Vulule, A.V. Ofulla, C. Long, et al. Age-Related Differences in Naturally Acquired T Cell Memory to Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1. PLoS ONE. 2011 Set 16; 6 (9): 1–13;
8. Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, Li S, Padilla C, Crompton PD, et al. Plasmodium falciparum Malaria in the Peruvian Amazon, a Region of Low Transmission, Is Associated with Immunologic Memory. Infect Immun. 2012 Jan 17; 80 (4): 1583–92;
9. Srisurapanon S, Wiwattanakul S, Apibal S, Suwannuruk R, Sujimanaskul S, Petchsuwan B e K Pattanapanyasat. Lymphocyte Subpopulations In Malaria Infected Individuals Living In An Endemic Area. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003 Jun 3; 34 (2): 310–15;
10. Gansane A, Ouedraogo IN, Henry NB, Soulama I, Ouedraogo E, Yaro J-B, et al. Variation in Haematological Parameters in Children Less Than Five Years of Age with Asymptomatic Plasmodium Infection: Implication for Malaria Field Studies. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013 Ago; 108 (5): 644–50;
11. Gudo ES, Prista A e Jani IV. Impact of Asymptomatic Plasmodium falciparum Parasitemia on the Immuno-hematological Indices among School Children and Adolescents in a Rural Area Highly Endemic for Malaria in Southern Mozambique. BMC Infectious Diseases. 2013; 13 (244): 1 – 8;
12. Warimwe GM, Murungi LM, Kamuyu G, Nyangweso GM, Wambua J, Naranbhai V, et al. The Ratio of Monocytes to Lymphocytes in Peripheral Blood Correlates with Increased Susceptibility to Clinical Malaria in Kenyan Children. PLoS ONE. 2013 Fev 20; 8(2): 1–7;
13. Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Gilchrist JJ, Graham SM, Pensulo P, et al. Lymphocyte Perturbations in Malawian Children with Severe and Uncomplicated Malaria. Clin Vaccine Immunol. 2016 Fev; 23 (2): 95–103;
14. Abel A, Steeg C, Aminkiah F, Addai-Mensah O, Addo M, Gagliani N, et al. Differential Expression Pattern Of Co-inhibitory Molecules On CD4+ T Cells In Uncomplicated Versus Complicated Malaria. Scientific Reports. 2018 Mar 19; 8 (4789): 1–9;
15. Muenchhoff M e Goulder PJ. Sex Differences in Pediatric Infectious Diseases. The Journal of Infectious Diseases. 2014 Jul 15; 209 (3): 120–26;
16. Crompton PD, Moebius J, Portugal S, Waisberg M, Hart G, Garver LS, et al. Malaria Immunity in Man and Mosquito: Insights into Unsolved Mysteries of a Deadly Infectious Disease. Annu Rev Immunol. 2014 Jul 1; 32: 157 – 87;
17. Malaguarnera L e Musumeci S. The Immune Response to Plasmodium falciparum Malaria. The Lancet: Infectious Diseases. 2002 Ago; 2: 472 – 478;
18. Houth YK, Kim KE, Park S, Hur DY, Kim S, Kim D, et al. The Effects of Artemisinin on the Cytolytic Activity of Natural Killer (NK) Cells. Int J Mol Sci. 2017 Jul 24; 18 (1600): 1–11;
19. Tschudy, M.M. e Arcara, K.M. Pediatrics-Handbooks, Manuals, etc., Johns Hopkins Hospital, Childrens Medical and Surgical Center. 19ª Edição; 2012. 1136pp