

## Imunossupressão induzida pela malária: existe um papel para o óxido nítrico?

*Malaria induced immunosuppression: is there a role to nitric oxide?*

**Maristela Böhlke**

Mestre em Clínica Médica pela PUC-RS, Professora auxiliar / Fisiologia Médica e Biofísica / UCPel, Universidade Católica de Pelotas, Escola de Medicina - Departamento de Fisiologia Médica e Biofísica

### **Resumo**

**Objetivo:** abordar a hipótese de que a imunossupressão associada à malária seja causada por produção macrófágica de óxido nítrico.

**Métodos:** revisão de literatura pertinente.

**Resultados:** uma série de estudos demonstra falha da imunidade celular em animais experimentais e humanos parasitados por *Plasmodium*. Foi recentemente observado que a ativação crônica de macrófagos induz biossíntese de óxido nítrico, o qual inibe a ribonucleotídeo redutase linfocitária e conseqüentemente, a proliferação desse tipo celular. O aumento na produção de óxido nítrico e a proliferação reduzida de linfócitos estão bem documentadas em pacientes contaminados por *Plasmodium*.

**Conclusões:** a ativação crônica de células mononucleares humanas, como ocorre na malária, provoca secreção de óxido nítrico, o que provavelmente, seja a base de funcionamento dos macrófagos supressores. O óxido nítrico inibe a ribonucleotídeo redutase da célula-alvo, nesse caso o linfócito, impedindo sua proliferação. Embora dados definitivos ainda não estejam disponíveis, esse parece ser o mecanismo da imunossupressão associada à malária.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 1999; 22(6):173-178 imunossupressão, óxido nítrico, malária, auto-imunidade.

### **Abstract**

**Objective:** to evaluate the hypothesis that malaria - associated immunosuppression is caused by macrophage produced nitric oxide.

**Methods:** related literature review.

**Results:** a number of reports have described impaired cellular immunity in *Plasmodium* infected rodents, monkeys and humans. It was recently observed that macrophages chronic stimulation induces nitric oxide synthesis, that inhibits lymphocyte ribonucleotide reductase, thus limiting lymphocyte proliferation. The increased production of nitric oxide and the reduced lymphocyte proliferation are well-documented in

### **Óxido nítrico e supressão de linfócitos**

reação de hipersensibilidade do tipo IV<sup>20</sup>. A síntese e liberação de NO pelo macrófago pode ser induzida por lipopolissacarídeo (LPS), interferon (IFN)  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  e IL-1; provavelmente o interferon  $\gamma$  produzido pelo próprio linfócito T ativa essa via no macrófago, instalando uma alça de retroalimentação. É sabido que a ativação de macrófagos induzida por IFN  $\gamma$  resulta em alterações da função macrófágica, incluindo expressão de receptores para antígenos do MHC II, processamento e apresentação de antígenos e liberação de IL-1, os quais estão associados com aumento da proliferação de células T. Esses efeitos pró-proliferativos podem predominar quando macrófagos e linfócitos interagem em razões quantitativas ótimas. Dados apresentados em estudo de Albina e cols.<sup>21</sup> indicam que, se um grande número de macrófagos é estimulado simultaneamente pelo IFN  $\gamma$ , isoladamente ou em combinação com outras citocinas, a produção resultante de NO provavelmente é supressiva para as células T presentes naquele ambiente. Esse perfil de supressão parece ocorrer, principalmente, em vigência de infecções crônicas, com permanência prolongada de estimulação antigênica.

O NO liberado pelo macrófago apresenta uma série de funções, entre as quais inibir a ribonucleotídeo redutase (enzima indispensável na síntese do DNA) da célula alvo<sup>13,14</sup>, o que impede sua proliferação; aparentemente, é através desse mecanismo que o NO liberado por macrófagos, em indivíduos tolerantes à malária, inibe a proliferação linfocitária<sup>22-24</sup>. O controle da ativação de linfócitos pelo NO também tem sido estudado na resposta imune a aloantígeno e mitógenos<sup>21,25</sup>; essa parece ser a base de funcionamento dos macrófagos "supressores"<sup>23</sup>, conforme claramente demonstrado por Mills<sup>23</sup> em estudo realizado com células esplênicas de rato, em 1991. Até mesmo uma ação supressora na rejeição de órgãos transplantados é atribuída ao NO produzido por macrófagos<sup>23,26</sup>. A produção aumentada de NO em indivíduos tolerantes à malária tem sido bem documentada, tanto através de dosagem de produtos da degradação do óxido nítrico (nitrito e nitrato)<sup>27,28</sup>, como através da medida

*Plasmodium infected patients.*

**Conclusions:** *human mononuclear phagocytes chronic stimulation, as it happens in malaria, induces nitric oxide secretion, that seems to be the basis of suppressor macrophage function. Nitric oxide inhibits target cell ribonucleotide reductase, preventing lymphocyte proliferation. Although conclusive data are not available yet, this appears to be the mechanism of malaria associated immunosuppression.*

Rev. bras. alerg. imunopatol. 1999; 22(6):173-178 immunosuppression, nitric oxide, malaria, autoimmunity

## Introdução

A malária é uma doença infecciosa endêmica em algumas regiões tropicais, causada por parasita do gênero *Plasmodium*. O parasita é transmitido ao homem pela fêmea do mosquito *Anopheles*; através da corrente circulatória atinge o fígado, sofre maturação no hepatócito, de onde é liberado novamente para o sangue, penetra na hemácia através de receptores, sofre maturação adicional, ocorrendo finalmente a ruptura do eritrócito com liberação de grande número de parasitas na corrente circulatória, os quais passarão a invadir outras hemácias. Esses episódios de liberação maciça de plasmódios na circulação repercutem clinicamente nos episódios febris intermitentes e regulares característicos da malária<sup>1</sup>.

A malária é amplamente distribuída através dos trópicos, com áreas altamente endêmicas na África, Nova Guiné, Haiti, América Central e sul da Ásia. No Brasil, a malária é endêmica no Pará, Amazonas, Acre, Amapá, Roraima, Rondônia, Goiás, Maranhão e parte do Mato Grosso<sup>2</sup>. Nas áreas tropicais endêmicas, ocorrem cerca de dois a três milhões de mortes causadas pela malária a cada ano. O perfil epidemiológico da malária pode ser dividido em dois tipos: (a) malária estável, ocorre em locais de alta transmissibilidade do parasita; teoricamente todos os indivíduos são infectados logo após o nascimento, a parasitemia é quase universal na infância e a mortalidade, quando ocorre, é nos primeiros anos de vida, após o que imunidade ou tolerância se estabelecem; não ocorrem epidemias; esse é o padrão da África subsahariana e da Nova Guiné; (b) malária instável, ocorre em locais com taxas baixas de transmissão do plasmódio; a doença ocorre sob a forma de surtos epidêmicos e pode afetar pessoas de todas as idades, em função do baixo grau de imunidade da população.

Nas áreas endêmicas, principalmente naquelas de malária estável, onde ocorrem infecções repetidas pelo plasmódio, a imunidade é gradualmente adquirida em vários estágios. A primeira alteração observada é uma redução dos sinais e sintomas clínicos para um determinado nível de parasitemia. O indivíduo pode permanecer vários anos assintomático, porém com plasmódio circulante. Esse fenômeno é conhecido como tolerância, ocorre por um mecanismo não adequadamente compreendido e é acompanhado de alterações do sistema imunológico, principalmente depressão

da NOS indutível em células mononucleares periféricas por *western blot*<sup>15</sup>.

O aumento da produção de NO na malária parece constituir-se em fator protetor, uma vez que os indivíduos que apresentam doença grave pelo plasmódio, com manifestações de sistema nervoso central, apresentam níveis de nitrito e nitrito plasmáticos significativamente inferiores em relação aos indivíduos que desenvolveram tolerância<sup>27,28</sup>. Muito provavelmente essa proteção ocorra através da inibição linfocitária: estudos de malária cerebral em modelos murinos demonstraram que a ausência do timo protege os animais infectados do desenvolvimento de lesões encefálicas<sup>2</sup>.

## Imunossupressão induzida por doença infecciosa X auto-imunidade

O relato inicial de Greenwood atribuindo a reduzida incidência de doenças auto-imunes na África tropical à ocorrência de sucessivas infecções<sup>3</sup>, vem encontrar subsídio molecular na evidência de supressão de linfócitos T pelo óxido nítrico produzido por macrófagos ativados<sup>23</sup>, não só na malária<sup>22</sup>, como na infecção por *Trypanosoma brucei*<sup>29</sup>, estafilococos<sup>30</sup> e talvez outros patógenos. O *Trypanosoma brucei*, parasita também endêmico na África subsahariana, que causa doença do sono em humanos e animais domésticos, divide com o plasmódio da malária a característica de escapar do sistema imunológico do hospedeiro e causar infecção crônica, além de causar imunossupressão associada a falha na resposta proliferativa de linfócitos T a mitógenos e antígenos variados. Evidências apontam para o papel dos macrófagos (que produzem óxido nítrico) na supressão *in vitro* da liberação de IL-2 e da expressão do receptor de IL-2 por linfócitos T de ratos contaminados por *T. brucei*.

Evidências adicionais do papel supressor de linfócitos desempenhado pelo óxido nítrico vêm do estudo de mieloencefalite alérgica, modelo experimental de esclerose múltipla (doença auto-imune), onde o desenvolvimento da doença depende da proliferação de células T, ocorrendo supressão da doença com o bloqueio da proliferação desse tipo celular<sup>31</sup>. A administração de análogos da Larginina, que inibem a geração de óxido nítrico, aumenta a gravidade das lesões em mieloencefalite alérgica, possivelmente em decorrência da proliferação aumentada de linfócitos<sup>32</sup>.

Por fim, vale a pena lembrar que a mesma população da África tropical, que apresenta uma baixa incidência de doenças auto-imunes<sup>33</sup>, quando migra para países desenvolvidos, como foi observado no Reino Unido<sup>34</sup>, passa a apresentar algumas doenças auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico<sup>34</sup> e a sarcoidose<sup>35</sup>, com uma frequência até mesmo superior à da população branca; além do aspecto de auto-imunidade, os negros que vivem em países desenvolvidos apresentam outras características especiais: a incidência de rejeição aguda após transplante

da imunidade celular, aspecto central na presente discussão.

Adolescentes e adultos de áreas altamente endêmicas freqüentemente persistem com parasitemia em nível muito baixo, assintomáticos, combinado com relativa resistência a superinfecção, um estado chamado premunicação ou imunidade infecciosa. A aquisição de imunidade em áreas holoendêmicas está associada a elevação maciça das imunoglobulinas séricas IgM, IgG e IgA; crianças nascem protegidas pelos anticorpos maternos e geralmente apresentarão os primeiros ataques de malária com poucos meses, após o que a resistência será gradualmente adquirida. A aquisição de imunidade completa, com extinção total da parasitemia, é rara na malária, em função da variação antigênica: os antígenos são diferentes para cada estágio do ciclo do parasita, cada cepa e cada espécie de plasmódio. Além disso, o parasita apresenta localização intracelular durante a maior parte do ciclo em humanos e a ausência de antígenos do MHC II na superfície da hemácia impede o reconhecimento direto da célula parasitada pelo linfócito T auxiliar.

Em função dessas particularidades do perfil epidemiológico da malária e das características do plasmódio, apesar da grande produção de anticorpos, aumento da atividade de macrófagos e das células *natural killer* e agressão da hemácia parasitada por mecanismo célula T- dependente anticorpo - mediada, a persistência de parasitemia por longos períodos da vida na população de áreas altamente endêmicas é muito comum, impondo uma situação peculiar ao sistema imunológico humano.

### Imunossupressão na malária

Greenwood, em 1968, chamou a atenção para a ocorrência infreqüente de doença auto-imune na África tropical, porém não em africanos vivendo na América do Norte, e propôs que essa diferença seria causada pelas múltiplas infecções parasitárias que ocorrem na África, alterando o estado imunológico de sua população<sup>3</sup>.

Os indivíduos que sobrevivem à malária e tornam-se tolerantes apresentam episódios mais graves de infecções gastrintestinais e respiratórias<sup>4</sup> e não desenvolvem resposta imunológica adequada a vacinas<sup>5</sup>. Uma correlação negativa significativa foi encontrada entre o grau de parasitemia e a resposta anticórpica: crianças com as maiores taxas de parasitemia não desenvolvem qualquer resposta à vacina meningocócica<sup>5</sup>. Além disso, é alta a incidência de linfomas, especialmente o de Burkitt, em maláricos imunodeprimidos da África equatorial. Segundo alguns autores, a resposta imune suprimida pela malária poderia potencializar o poder malignizante do vírus oncogênico, como o Epstein-Barr<sup>6</sup>. O Epstein-Barr aumenta a proliferação do linfócito B contaminado. Em presença de imunidade celular competente o linfócito T citotóxico (CD8) reconhece e destrói o linfócito B alterado; se esse mecanismo de vigilância estiver comprometido, pode advir a proliferação monoclonal neoplásica.

renal é maior em relação à população branca e a sobrevida do enxerto significativamente reduzida<sup>36</sup>. As constatações acima descritas falam fortemente contra um fator racial determinando a baixa incidência de auto-imunidade na África tropical e a favor de fator ambiental, possivelmente envolvendo o grande número de infecções crônicas ou recorrentes a que essa população está exposta<sup>37</sup>.

### Referências bibliográficas

- Bradley DJ, Newbold CI, Warrell DA. Malaria. In: Oxford Textbook of Medicine. 1988; vol II: 5475-5502.
- Lopes ER, Chapadeiro E, Costa CE. Malaria. In: Bogliolo Patologia. 1987; 1107-1112.
- Greenwood BM. Autoimmune disease and para-sitic infections in Nigerians. *Lancet* 1968; 2: 380-382.
- Greenwood BM, Bradley-Moore AM, Palit A, Bryceson AM. Immunosuppression in children with malaria. *Lancet* 1972; 1:169-172.
- Williamson WA, Greenwood BM. Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria. *Lancet* 1978; 1:1328-1329.
- Whittle HC, Brown J, Marsh K. T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B cells is lost during *P. falciparum* malaria. *Nature* 1984; 312:449-450.
- Taylor DW, Siddiqui WA. Effect of falciparum malaria infection on the in vitro mitogen responses of spleen and peripheral blood lymphocytes from owl monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27:738-742.
- Osunkoya BD, William AO, Reddy S. Spontaneous lymphocyte transformation in leukocyte cultures of children with falciparum malaria. *Trop Geogr Med* 1972; 24:157-161.
- Rubenstein M, Mulholland JH, Jeffery GM. Malaria-induced endotoxin tolerance. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965; 118:238-287.
- Ziegler-Heitbrock HL. Molecular mechanism of tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* 1995; 45:13-26.
- Fahmi H, Charon D, Mondange M. Endotoxin-induced desensitisation of mouse macrophages is mediated in part by nitric oxide production. *Infect Immun* 1995; 63:1863-1869.
- Zingarelli B, Halushka PV, Caputi AP. Increased nitric oxide synthesis during the development of endotoxin tolerance. *Shock* 1995; 3:102-108.
- Angaard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199-1206.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine - nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-2012.
- Anstey NM, Weinberg JB, Hassassali M. Nitric oxide in tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production / nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med* 1996; 184: 557-567.
- Schoedon G, Schneemann M, Walter R, Blau N, Hofer S, Schaffner A. Nitric oxide and infection: another view. *Clin Infect Dis* 1995; 21:152-157.
- Murray HW, Teitelbaum RF. L-arginine dependent reactive nitrogen intermediates and the anti-microbial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 1992; 165:513-517.
- Metzger Z, Hoffeld JT, Oppenheim JJ. Macrophage-mediated suppression - Evidence for participation of both hydrogen peroxide and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte proliferation. *J Immunol* 1980; 124:983-988.
- Glassock W. Clinical manifestations of uremia. In: *Textbook of Renal Disease* 1995
- Barnetson R, Gawkrödger D, Britton W. Hyper-sensitivity - type IV. In: *Immunology* 1996; 25.1-25.8.
- Albina JE, Abate JA, Henry WL. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation: role of IFN  $\gamma$  in the induction of the nitric oxide synthesizing pathway. *J Immunol* 1991; 147:144-148.
- Rockett KA, Auburn MM, Rockett EJ. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasit Immunol* 1994; 16:243-249.
- Mills CD. Molecular basis of "suppressor" macrophages: arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J Immunol* 1991; 146:2719-2723.
- Clark IA, Al-Yaman FM, Cowden WB, Rockett KA. Does malarial tolerance, through nitric oxide, explain the low incidence of autoimmune disease in tropical Africa? *Lancet* 1996; 348:1492-1494.
- Hoffman RA, Langrehr JM, Billiar TR, Cunan RD, Simmons RL. Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *J Immunol* 1990; 145: 2220-2226.
- Langrehr JM, Hoffman RA, Billiar TR, Lee KW, Schraut WH, Simmons RL. Nitric oxide synthesis in the in vivo allograft response: a possible regulatory mechanism. *Surgery* 1991; 110:335-342.
- Nussler AK, Eling W, Kremsner PG. Patients with Plasmodium falciparum malaria and Plasmodium vivax malaria show increased nitrite and nitrate plasma levels. *J Infect Dis* 1994; 169: 1418-1419.
- Al Yaman F, Genton B, Mokela D. Association between serum levels of

Para investigar a imunidade celular na malária, foi conduzido estudo experimental com macacos (*Aotus trivigatus*) contaminados por *Plasmodium falciparum*, na Universidade do Havaí, em 1978. Foi detectada redução da resposta de linfócitos ao estímulo mitogênico com fitohemoaglutina, concanavalina A e mitógeno *pokeweed* em relação a animais não infectados, e que essa redução de resposta ocorria em proporção direta com o aumento da parasitemia<sup>7</sup>. Estudos anteriores já descreviam resultados similares em humanos<sup>8</sup>.

Mesmo uma primeira infecção pela malária gera tolerância aos efeitos deletérios tanto do plasmódio como da endotoxina bacteriana. Estudo realizado em humanos, em 1965, demonstrou reação febril à infusão de endotoxinas significativamente reduzida após a infecção pelo plasmódio<sup>9</sup>. A tolerância às endotoxinas tem sido vista atualmente como um processo ativo, com alteração da expressão gênica<sup>10</sup>. Produtos gênicos com expressão reduzida durante a tolerância à endotoxina incluem os fatores de necrose tumoral, e entre aqueles com expressão aumentada figura a forma indutível de sintase do óxido nítrico (NOS<sub>i</sub>)<sup>11,12</sup>.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula filogeneticamente muito antiga com funções as mais diversas em fisiologia e patologias humanas. É produzido a partir do substrato Larginina pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), que existe sob duas formas: (a) a forma constitucional, com atividade discreta e flutuante, e (b) a forma indutível, expressa somente mediante determinados estímulos, produzindo óxido nítrico em grande quantidade e de maneira constante. As várias funções imunológicas atribuídas ao NO geralmente estão ligadas a essa última forma de produção, pela NOS indutível<sup>13,14</sup>.

A NOS indutível existe comprovadamente em várias células do sistema imunológico humano, inclusive em macrófagos<sup>15</sup>, embora com produção de NO inferior àquela da linhagem monocitária de animais experimentais<sup>16,17</sup>. Macrófagos, baseado no que tem sido demonstrado, funcionam de maneira contraditória no controle da atividade linfocitária. Uma das funções é dar suporte à resposta imune mediada por células T através do processamento e apresentação de antígenos e secreção de citocinas; outra função é suprimir a proliferação linfocitária pela liberação de peróxido de hidrogênio, prostaglandinas<sup>18</sup> e, provavelmente, óxido nítrico. A prostaglandina E secretada pelo macrófago, com sua função supressora de linfócitos, tem sido implicada na disfunção da imunidade celular da uremia<sup>19</sup> e no mecanismo de frenagem da

reactive nitrogen inter-mediate and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:270-273.

29. Stenberg J, Mc Guigan F. Nitric oxide mediates suppression of T-cell response in murine *Trypanosoma brucei* infection. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2741-2744.
30. Isobe KI, Nakashima, I. Feedback suppression of staphylococcal enterotoxin - stimulated lymphocyte-T proliferation by macrophages through in-ductive nitric-oxide synthesis. *Infect Immun* 1992; 60: 4832-4837.
31. Von Müller CS, Spittler LE, Le Cocq J. Experimental allergic encephalitis: study of cellular immunity during disease suppression. *Eur J Immunol* 1978; 8:771-776.
32. Ruuls SR, Vanderlinden S, Sontrop K. Aggravation of experimental allergic encephalomyelitis by administration of nitric oxide synthase inhibitors. *Clin Exp Immunol* 1996; 103:467-474.
33. McGregor IA. Immunology of malarial infection and its possible consequences. *Br Med Bull* 1972; 28:22-27.
34. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. *Arthritis Rheum* 1995; 38:551-558.
35. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Medical progress: sarcoidosis. *N Engl J Med* ,1997; 336:1224-1234.
36. Opelz G, Mickey M, Terasaki PI. Influence of race on kidney transplant survival. *Transplant Proc* 1977; 9:137.
37. Cook GC. Africa. In: *Oxford Textbook of Medicine* 1988; vol 1:12281-12282.

## Endereço para correspondência

### Maristela Böhlke

Rua Anchieta, 1.155 – ap. 302  
96015-420 - Pelotas - RS  
Fone/fax: 0XX-53-2272555  
Email: mbohlke@conesul.com.br



[\[Home Page SBAI\]](#) [\[Índice Geral\]](#) [\[Índice do Fascículo\]](#)